

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA



**Selección y caracterización de mutantes de Clementina.
Cambios del transcriptoma asociados a la maduración del
fruto de los cítricos y análisis de la expresión del gen
fosfoenolpiruvato carboxiquinasa.**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:
Victoria Ibáñez González

Para optar al grado de:
Doctor Ingeniero Agrónomo

Codirectores:
Dr. D. Manuel Talón Cubillo
Dr. D. Domingo José Iglesias Fuente

Valencia, Diciembre de 2011

Para Elena

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a todo aquel que lea esto pues significará que en mayor o menor medida me ha ayudado a que haya llegado hasta aquí.

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento al Doctor Manuel Talón Cubillo por su magnífica y extraordinaria labor en la dirección de esta tesis. Tengo que agradecerle la oportunidad y confianza en mí que en su día me dio para realizar la tesis doctoral bajo su dirección. Especial mención también para el Doctor Domingo J. Iglesias Fuente que es el principal causante de mi interés por este mundillo, con el que tantísimo he aprendido y que ha sido profesor y amigo por igual. Durante todo este periodo he aprendido de ellos muchísimos aspectos relacionados con la investigación pero tengo que destacar su gran calidad humana por encima de todo.

Agradecer a todas las personas que me han ayudado, enseñado y acompañado durante mi estancia en el Centro de Genómica: Manuel Cercós (¡ese gran libro!), mis queridísimas chicas: Isabel Sanchis, Ana Almenar e Isabel López por sus grandes enseñanzas e inigualable ayuda. A Francisco Tadeo, Concha Domingo, Jose M^a Colmenero, Esther Carreras, Omar Ruiz, Miguel Ángel Naranjo y Ángel Boix que han estado ahí siempre que he necesitado su ayuda para resolver cualquier duda o problema. A Javier Terol por su gran ayuda en todos los aspectos bioinformáticas que tan valiosos han sido. A Gabino Rios, agradecer su ayuda ante cualquier duda durante la realización y muy especialmente durante la revisión del trabajo, sus observaciones han sido muy interesantes. Por esos grandes momentos de ameno trabajo y risas a Toni, Juanvi, Amparo, Alicia, Elena, Mati, Cristina, Pilar, Javier B, Guillermo, Enri, Javier A y Paz.

A Lorenzo Zacarías y Aurelio Gómez agradecerles particularmente su tiempo e interés en la revisión del trabajo.

Agradecer a Ramón Serrano su colaboración y ayuda en cualquiera de los trámites universitarios que he necesitado.

Dar las gracias a Josep A. Roselló por permitir mi estancia en su laboratorio y especialmente a Marcela Rosato agradecerle su ayuda en la revisión del capítulo V y de quien profesionalmente he aprendido mucho pero sobre todo me ha enseñado a reír en la desesperanza.

Por último pero no por ello menos importante, todo lo contrario, quisiera agradecer a mi familia: a mis padres y hermanos el apoyo y ánimo en todo lo que he necesitado y que han sido claves en el tramo final. Y muy muy especialmente agradecer a mi queridísimo Jose todo el cariño y apoyo que me ha dado y da día a día, ayudándome, animándome y respetándome en cualquier decisión que tomo porque él y nuestra pequeña Elena son pilares en mi vida.

A todos:

¡¡INFINTAS GRACIAS!!

Abreviaturas

AIA	Ácido indol acético
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CGH	Hibridación genómica comparativa (Comparative Genomic Hybridization)
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
E.S.	Error estándar
ESTs	Marcador de secuencia expresada (Expressed Sequence Tags)
FISH	Hibridación Fluorescente in situ (Fluorescence In Situ Hybridization)
GABA	ácido γ -aminobutirico
GC/MS	Cromatografía de gases unida a espectrofotometría de masas (Gas Chromatography Mass Spectrometry)
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia (High Performance Liquid Chromatography)
ICC	Índice de color
IM	Índice de madurez
Mg ²⁺	Ión Magnesio
NCBI	Nacional Center for Biotechnology Information
OAA	Oxalacetato
PEP	Fosfoenolpiruvato
PEPCL	Fosfoenolpiruvato carboxilasa
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
PEPCL-K	Fosfoenolpiruvato carboxilasa quinasa
PFK	Fosfofructoquinasa
qRT-PCR	Retrotranscripción cuantitativa mediante la reacción en cadena de la polimerasa (quantitative retrotranscription-polymerase chain reaction)

RNA	Ácido desoxi-ribonucleico.
RT	Temperatura ambiente
SDS	Sodio dodecil sulfato
SSC	Na ₃ -Citrato 0,15 M pH 7, NaCl 1,5 M
Tris	2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol
UV	Ultravioleta.

Índice

ÍNDICE

Resúmenes	IX
Resumen	XI
Resum	XIII
Abstract	XV
I. <u>Introducción general</u>	1
I.1. <u>Los cítricos</u>	3
I.1.1. Origen y expansión.....	3
I.1.2. Clasificación botánica	3
I.1.3. Importancia económica.	4
I.2. <u>Los frutos cítricos</u>	7
I.2.1. Morfología, desarrollo y maduración.....	7
I.2.2. Parámetros de la calidad de la fruta en los cítricos.....	9
I.2.3. Mejora de variedades. Inducción de mutaciones.....	12
II. <u>Objetivos</u>	17
III. <u>Selección y descripción de cinco nuevos genotipos de Clementina con alteraciones en la maduración interna</u>	21
III.1. <u>Introducción</u>	23
III.2. <u>Metodología</u>	29
III.2.1. Material vegetal.....	29
III.2.2. Determinación de los parámetros de calidad.....	29
III.2.3. Tratamiento estadístico de los datos.	30
III.2.4. Criterio de selección de los genotipos.....	31
III.3. <u>Resultados y discusión</u>	33
III.3.1. Naturaleza de los datos fenotípicos.	33

III.3.2. Selección de los nuevos genotipos.....	43
III.3.3. Caracterización de los genotipos seleccionados.	44
III.3.3.1. Z46	47
III.3.3.2. D11	59
III.3.3.3. I09	63
III.3.3.4. H03.....	69
III.3.3.5. J59.....	73
III.4. Conclusiones.....	79

IV. <u>Análisis de los cambios en el transcriptoma de cinco nuevos genotipos de Clementina durante la maduración interna del fruto</u>	81
IV.1. <u>Introducción</u>	83
IV.2. <u>Metodología</u>.....	85
IV.2.1. Material vegetal.....	85
IV.2.2. Extracción de ARN.....	86
IV.2.3. Cuantificación de RNAs mensajeros mediante análisis qRT-PCR.	87
IV.2.4. Hibridación de micromatrices de cDNA con mRNA.....	89
IV.2.4.1. Marcaje con fluoróforos.	89
IV.2.4.2. Hibridación de micromatrices de cDNA.	90
IV.2.4.3. Análisis y adquisición de datos.....	90
IV.2.5. Micromatrices de 7 y 20 Ks.....	92
IV.2.6. Cuantificación de azúcares	93
IV.2.7. Cuantificación de ácidos orgánicos.	94
IV.3. <u>Resultados y discusión</u>.....	95
IV.3.1. Validación mediante análisis qRT-PCR de los datos obtenidos en la hibridación.	95
IV.3.2. Análisis de la expresión génica.....	96

IV.3.2.1. Micromatriz de 7 y 20 Ks.....	96
IV.3.2.1.1. Sólidos solubles totales.....	96
IV.3.2.1.2. Acidez del fruto.....	97
IV.3.2.2. Micromatriz de 20 K.....	100
IV.3.2.2.1. Sólidos solubles totales.....	101
IV.3.2.2.2. Acidez del fruto.....	105
IV.3.3. Estudio del transcriptoma de cinco genotipos con alteraciones en la maduración.	120
IV.3.3.1. Expresión global.	120
IV.3.3.2. Z46.....	122
IV.3.3.3. D11.....	130
IV.3.3.4. I09.....	136
IV.3.3.5. H03.....	141
IV.3.3.6. J59.....	146
IV.4. Conclusiones	151

V. <u>Mapeo de deleciones del genotipo Z46 en el genoma de Clementina mediante CGH y FISH</u>	153
V.1. <u>Introducción</u>	155
V.2. <u>Metodología</u>	157
V.2.1. Material vegetal.	157
V.2.2. Extracción de ADN.	158
V.2.3. Hibridación genómica comparada (CGH).	158
V.2.3.1. Marcaje con fluoróforos.....	158
V.2.3.2. Hibridación de las micromatrices.....	159
V.2.3.3. Análisis y adquisición de los datos.....	159
V.2.4. Análisis de los cambios en el transcriptoma del genotipo Z46.....	160
V.2.5. Medida de dosis génica mediante PCR a tiempo real.....	160

V.2.6. Detección de ácido indol acético (AIA)	161
V.2.7. Hibridación fluorescente <i>in situ</i> (FISH).....	161
V.2.7.1. Fijación y tinción del material vegetal	162
V.2.7.2. Marcaje de la sonda.....	162
V.2.7.3. Hibridación <i>in situ</i>	163
V.2.7.4. Lavados post-hibridatorios de astringencia	164
V.2.7.5. Incubación con anticuerpos	164
V.3. Resultados y discusión.	166
V.3.1. Detección y mapeo de deleciones en el genotipo Z46.	166
V.3.2. FISH sobre el genotipo Z46 con sondas BAC.	168
V.4. Conclusiones.	175
VI. <u>Identificación y expresión del gen fosfoenolpiruvato</u>	
<u>carboxiquinasa y su implicación en el metabolismo de los</u>	
<u>ácidos del fruto.</u>	177
VI.1. <u>Introducción</u>	179
VI.2. <u>Metodología</u>	185
VI.2.1. Material vegetal.	185
VI.2.1.1. Expresión génica	185
VI.2.1.2. Efecto del ácido cítrico y el ácido oxalacético	
sobre la expresión del gen que codifica para	
fosfoenolpiruvato carboxiquinasa.....	186
VI.2.1.3. Efecto del suplemento de ácido cítrico en el	
contenido de ácidos y azúcares del zumo.....	186
VI.2.2. Extracción de RNA.....	186
VI.2.3. Cuantificación de RNAs mensajeros mediante	
análisis qRT-PCR.....	187
VI.2.4. Cultivo <i>in vitro</i> de secciones de frutos cítricos.....	187
VI.2.5. Cultivo <i>in vitro</i> de vesículas de frutos cítricos.	188

VI.2.6. Cuantificación de azúcares y ácidos orgánicos	190
VI.2.7. Tratamiento estadístico de los datos.....	190
VI.3. Resultados y discusión	192
VI.3.1. <u>Identificación y expresión del gen fosfoenolpiruvato</u> <u>carboxiquinasa en cítricos</u>	192
VI.3.1.1. Expresión génica de PEPCK en diferentes órganos, estadios de desarrollo y tejidos del fruto.....	198
VI.3.1.2. Expresión génica de PEPCK durante la maduración del fruto.	202
A- Inducción durante la maduración del fruto en mandarinas y limones.....	204
B- Inducción durante la maduración del fruto en naranjas.....	216
VI.3.2. <u>Identificación y expresión del gen que codifica para</u> <u>fosfoenolpiruvato decarboxilasa (PEPCL) en variedades</u> <u>de cítricos</u>	223
VI.3.2.1. Inducción de PEPCL durante la maduración del fruto en mandarinas y naranjas.....	227
VI.3.2.2. Inducción de PEPCL durante la maduración del fruto en limones.....	229
VI.3.3. <u>Identificación y expresión del gen fosfoenolpiruvato</u> <u>carboxilasa quinasa (PEPCL-K) en variedades de</u> <u>cítricos</u>	233
VI.3.3.1. Estudio de la expresión génica	236
VI.3.4. <u>Análisis multivariante del comportamiento de</u> <u>PEPCK, PEPCL, PEPCL-K en las variedades de cítricos</u> <u>estudiadas</u>	241

VI.3.5. <u>Efecto del ácido cítrico y el ácido oxalacético sobre la expresión del gen que codifica la proteína PEPCK.</u>	246
VI.3.6. <u>Efecto del ácido cítrico en el contenido de ácidos y azúcares del zumo.</u>	249
VI.4. <u>Conclusiones</u>	260
VII. <u>Conclusiones generales.</u>	261
VIII. <u>Referencias bibliográficas.</u>	267
IX. <u>Anexos y tablas suplementarias.</u>	(CD)

Resúmenes

RESUMEN

En este trabajo se ha utilizado una colección de nuevos genotipos de cítricos, obtenidas mediante un programa de mutagénesis física desarrollado en el IVIA para estudiar distintos aspectos fenotípicos, moleculares y metabólicos relacionados con la maduración del fruto.

Para conseguir estos objetivos se seleccionaron y caracterizaron genotipos de Clementina con alteraciones en la maduración de sus frutos y se identificaron y caracterizó funcionalmente genes involucrados en la maduración interna de los cítricos. Por otro lado se detectaron genes delecionados en mutantes de Clementina y por último se estudió el proceso de degradación de ácido cítrico en los frutos, haciendo especial hincapié en la función del gen que codifica la proteína fosfoenolpiruvato carboxiquinasa.

Así, se han empleado micromatrices de cDNA específicas de cítricos generadas por el Consorcio de Genómica de Cítricos, para estudiar la expresión simultánea de 20.000 genes en varios estados de maduración del fruto en los genotipos seleccionados. El análisis bioinformático permitió identificar 161 genes correlacionados con los procesos de maduración del fruto. Además, se encontró una correlación significativa entre la acidez y algunos de estos genes, cuya expresión se confirmó mediante RT-PCR en tiempo real. Así, se comprobó que la expresión del gen que codifica para fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK), aumentó conforme avanza la maduración interna del fruto. Se determinó el número de genes que en cítricos pertenecen a la familia de PEPCK, así como su especificidad en diferentes variedades comerciales. Durante la maduración de frutos de Clementina de Nules, la inducción inicial de PEPCK se produjo durante la fase de reducción rápida de la acidez e incremento de

azúcares. Un experimento con suplemento de ácido cítrico sugirió que el flujo de carbono proveniente de la degradación de los ácidos producido por la ruta GABA es utilizado en la gluconeogénesis para la síntesis de azúcares, siendo la activación de PEPCK el elemento conector de ambos procesos.

RESUM.

En aquest treball s'ha utilitzat una col·lecció de nous genotips de cítrics, obtinguts mitjançant un programa de mutagènesis física desenvolupat al IVIA per estudiar distints aspectes fenotípics, moleculars i metabòlics relacionats amb la maduració del fruit.

Per aconseguir aquests objectius s'han seleccionat i caracteritzat genotips de Clementina amb alteracions en la maduració dels seus fruits i s'identificaren i es caracteritzó funcionalment gens involucrats en la maduració interna dels cítrics. D'altra banda es detectaren gens delecionats en mutants de Clementina i per últim s'estudià el procés de degradació d'àcid cítric en els fruits, recalçant el gen que codifica la proteïna fosfoenolpiruvat carboxiquinasa.

Així s'han emprat micromatrius de cDNA específiques de cítrics generades pel Consorci de Genòmica de Cítrics, per estudiar simultàniament l'expressió de 20.000 gens en varis estats de maduració del fruit als genotips seleccionats. L'anàlisi bioinformàtic permeté identificar 161 gens correlacionats amb els processos de maduració del fruit. A més, es trobà una correlació significativa entre l'acidesa i alguns d'aquets gens, l'expressió del qual es confirmà mitjançant RT-PCR en temps real. Així, es comprovà que l'expressió del gen que codifica per a fosfoenolpiruvat carboxiquinasa (PEPCK), augmentà segons avança la maduració interna del fruit. Es va determinar el número de gens que als cítrics pertanyen a la família de PEPCK, així com la seua especificitat en diferents varietats comercials. Durant la maduració de fruits de Clementina de Nules, la inducció inicial de PEPCK es va produir durant la fase de reducció ràpida de l'acidessa i l'increment de sucres. Un experiment amb suplement d'àcid cítric va suggerir que el flux de carboni provinent de la degradació dels àcids produïts per la ruta GABA és utilitzat a la

gluconegènesi per a la síntesi de sucres, sent l'activació de PEPCk l'element connector d'ambós processos.

ABSTRACT.

In this work has been used a collection of a new genotypes of citrus, obtained by means of a physical mutagenesis program developed in the IVIA to study different phenotypic, molecular and metabolic aspects related with the fruit ripening.

To achieve these aims, genotypes of Clementina with alterations in the ripening of their fruits were selected and characterized and genes involved in internal ripening of the citrus fruit were functional characterized. On the other hand, deletion genes were detected in Clementine's mutants and finally the degradation of citric acid process in the fruits was studied, doing special upsetting in the function of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene.

Like this, microarrays of cDNA specific of citrus generated by the Consortium of Citrus Genome have been employed to study the simultaneous expression of 20.000 genes in several states of ripening fruit in the genotypes selected. The bioinformatic analysis allowed to identify 161 genes correlated with the fruit ripening process. Moreover, it was found a significant correlation between the acidity and some of these genes, which expression was confirmed by means of real-time RT-PCR. Like this, was checked that the PEPCCK expression increased along the fruit ripening. The number of genes in citrus belong to the family of PEPCCK was determined just as its specificity in different commercial varieties. During the Clementine's fruit ripening, the initial induction of PEPCCK was happened during the fast acidity reduction phase and the increase of sugars. An experiment with supplement of citric acid suggested that the carbon flux come from the acids degradation by the GABA route is employed in the gluconeogenesis to sugar synthesis, being the activation of PEPCCK the connector element of both processes.

I. Introducción general

I. Introducción general.

I.1. Los cítricos.

I.1.1. Origen y expansión

El origen de los agrios se localiza en Asia oriental extendiéndose desde la vertiente meridional del Himalaya hasta China meridional, Indochina, Tailandia, Malasia e Indonesia. Actualmente se cultivan en la mayor parte de las regiones tropicales y subtropicales de ambos hemisferios del planeta, principalmente entre los paralelos 44°N y 41°S (Agustí 2003).

La presencia del cidro en España se establece en el siglo VII pero hasta el siglo XII no existen evidencias de su cultivo. A través de los árabes llegaron a España el naranjo amargo (*Citrus aurantium* L.) y el limonero (*Citrus limon* (L.) Burm.f) en el siglo XII. Del naranjo dulce (*Citrus sinensis* (L.) Obs.) no existe ninguna referencia hasta el siglo XV y probablemente se introdujo a través de las rutas comerciales genovesas con Oriente. La introducción del mandarino común (*Citrus reticulata* Blanco) fue mucho más tardía. En 1845 se promovió la aclimatación de injertos de mandarino común en Valencia y en 1856 su cultivo empezó a difundirse en la provincia de Castellón de la Plana. La introducción del pomelo (*Citrus paradisi* Macf.) es mucho más reciente. En 1910 se importaron las primeras plantas desde California por la Estación Naranjera de Levante, hoy integrada en el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (Zaragoza 1993; Agustí 2003).

I.1.2. Clasificación botánica

Las especies de cítricos con interés comercial pertenecen a la familia de las *Rutaceas*, subfamilia *Aurantioideas*. Las rutáceas se encuentran dentro de la división *Embryophita Siphonogama*,

subdivisión *Angiospermae*, clase *Dicotyledonea*, subclase *Rosidae*, superorden *Rutanae*, orden *Rutales*. Según Swingle (1967) se incluyen dentro de este orden las tribus *Clauseneae* y *Citreae*. A su vez, la tribu *Citreae* se subdivide en tres tribus, siendo *Citrinae* la que contiene todos los géneros a los que pertenecen los cítricos cultivados: *Fortunella*, *Poncirus* y *Citrus*. Las especies del género *Citrus* son las más importantes bajo el punto de vista agronómico.

I.1.3. Importancia económica.

Desde el punto de vista comercial, los dos grupos más importantes de cítricos son los mandarinos y los naranjos. Agronómicamente, los mandarinos se pueden clasificar en tres grupos: grupo Satsumas (*C.unshiu*), grupo Clementinas (*C.clementina*) y otros mandarinos (Amorós 2003).

Los cítricos suponen una importante fuente de riqueza para el sector agroalimentario mundial y nacional. En España, la citricultura ocupa un papel relevante en la economía ya que proporciona un elevado número de divisas. En la última década, las mandarinas y las naranjas se encuentran entre las 5 primeras partidas de ingresos del capítulo general de las exportaciones nacionales llegando a generar más de 2.000 millones de euros en 2008, de los cuales 1.229 millones proceden de las exportaciones de mandarinas y 861 millones son ingresados por la venta de naranjas. En los últimos años tanto las exportaciones de mandarinas como de naranjas han aumentado de forma gradual (Figura I-1).

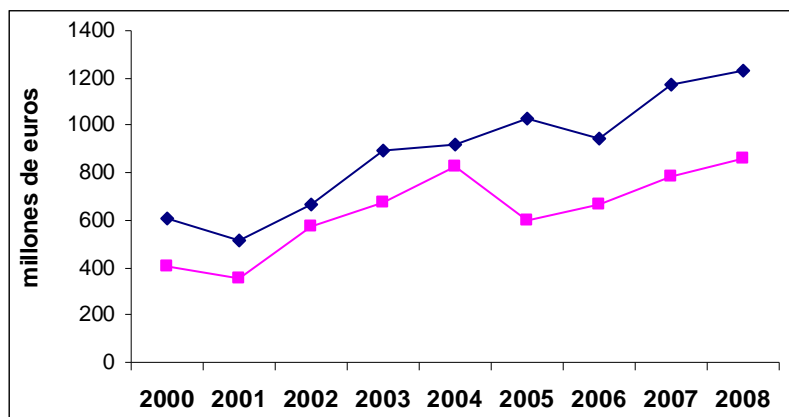


Figura I-1: Exportaciones de mandarinas (—◆—) y naranjas (—■—) en España desde el año 2000 al año 2008. (1 €= 1,4362 \$).

Fuente: FAO 2010.

En términos económicos, los cítricos son los frutales más importantes, superando los 122 millones de toneladas en el año 2009 (<http://faostat.fao.org/>). Los mayores productores a nivel mundial son China, Brasil y EEUU seguidos de otros países con producciones similares, entre los cuales cabe destacar España con 5.240.100 de toneladas (Tabla I-1).

Tabla I-1: Principales productores mundiales de cítricos en 2009 (toneladas).

	Mandarinas	Naranjas	Limonos y Limas	Pomelos	Otros	Total
China	9746287	4864959	1014446	2768308	4694471	23088471
Brasil	1094430	17618500	972437	66895	-	19752262
EEUU	401880	8280780	827350	1182970	47170	10740150
India	-	5201350	2571530	193822	161691	8128393
México	442108	4193480	1987450	395000	106539	7124577
España	2026200	2617700	551000	38700	6500	5240100
Irán	566548	2713240	711729	50722	96461	4138700
Nigeria	-	-	-	-	3769420	3769420
Italia	863900	2359400	486200	7500	28000	3745000
Turquía	846390	1689920	783587	190973	2901	3513771
Prod.mundial	22396549	68475267	13607350	6565351	11324215	122368732

Fuente: FAO 2010

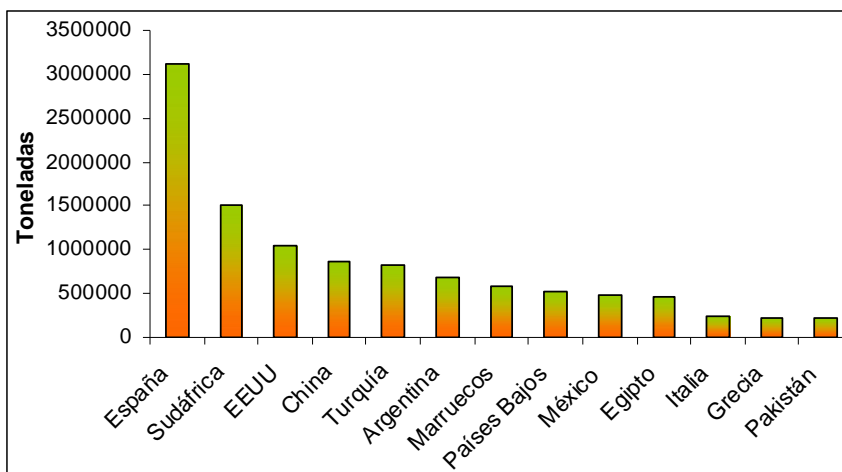


Figura I-2: Principales países exportadores de cítricos en 2008. Fuente FAO 2008.

España es el primer exportador de cítricos a nivel mundial con más de 3.000 millones de toneladas, seguido de Sudáfrica y EEUU (Figura I-2) siendo sus principales importadores: Alemania, Francia, Reino Unido, Países bajos y Polonia (Tabla I-2) (www.intercitrus.org).

	Satsumas	Clementinas	Wiling	Forrtuna	Total mandarinas	naranjas	Limones	Pomelos	Total 09/10
Alemania	14207	287787	21353	31766	355113	343605	89380	13011	801109
Francia	254	231826	11733	44223	288036	337708	79172	14702	719618
R.Unido	13001	80012	6141	14566	113720	85210	40082	1295	240307
Países bajos	4961	65420	4262	7335	81978	130449	17824	1310	231561
Polonia	351	71604	18374	8959	99288	73476	46969	5995	225728
Países Terceros	3060	99485	19	11985	114549	74685	25266	2305	216805
Bélgica	3600	40763	634	5307	50304	60038	9384	1152	120878
Italia	279	43586	3115	8126	55106	37157	25312	803	118378
Suecia	7118	32494	220	1115	40947	46510	7279	70	94806
República Checa	3395	32368	515	4894	41172	24589	6546	2469	74776

Fuente: Intercitrus 2010

España es el primer país exportador del mundo de naranjas y grupo mandarinas para su consumo en fresco. Del total de esta producción, en torno al 70% se destina al mercado exterior, principalmente a los países de la Unión Europea. Las zonas de producción citrícola española se concentran en el litoral este y suroeste de la península. El 61% de la producción citrícola se encuentra en la Comunidad Valenciana, el 25% en Andalucía, el 10% en Murcia y el 3% en Cataluña. (www.intercitrus.org).

Durante la Campaña 2010/2011, la producción de cítricos en la Comunidad Valenciana fue de 3.508.982 toneladas distribuidas en 1.729.314 tn de mandarinas, 1.602.840 tn de naranjas y 176.828 tn de limones (www.agricultura.gva.es).

I.2. Los frutos cítricos

I.2.1. Morfología, desarrollo y maduración.

Los frutos cítricos son un tipo de baya denominada hesperidio formado por un número variable de carpelos unidos alrededor del eje floral formando así lóculos dentro de los cuales se forman las semillas y las vesículas del zumo. La parte exterior a los lóbulos se denomina pericarpio. El pericarpio o piel es la parte del fruto exterior a los lóculos y se divide en tres partes: el exocarpo o flavedo que es la parte más externa del fruto formado por la epidermis y una cutícula; el mesocarpo o albedo formado por tejido parenquimático y el endocarpo que es la parte más interna y donde se encuentran las vesículas de zumo. Las vesículas de zumo son unas estructuras multicelulares alargadas unidas al endocarpo a través de un filamento y que se inician en el endocarpo y se orientan hacia el interior del lóculo (Figura I-3). Las vesículas

maduras están formadas por grandes células muy vacuoladas que contienen el zumo (Tadeo y cols 2003)

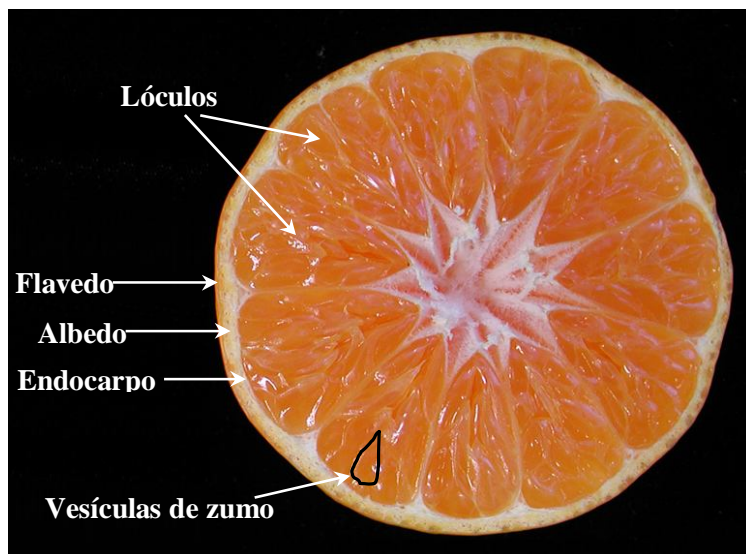


Figura I-3: Corte transversal de un fruto de Clementina de Nules.

Bain (1958) estudió el crecimiento de la naranja Valencia (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck) dividiendo su desarrollo en tres fases: la fase I o periodo de crecimiento exponencial que abarca desde la antesis hasta el final de la caída fisiológica de los frutos, caracterizada por un rápido crecimiento del fruto provocado por la división celular; la fase II o periodo de crecimiento lineal que comprende desde la caída fisiológica del fruto hasta poco antes de su cambio de color, caracterizada por una expansión de los tejidos acompañada por un agrandamiento celular y la fase III o periodo de maduración caracterizada por una reducida tasa de crecimiento y donde se producen la mayoría de los cambios internos (fundamentalmente reducción de acidez y acumulación de azúcares en la pulpa) y externos (principalmente el cambio de color del flavedo) que conforman la maduración de los frutos (Figura I-4).

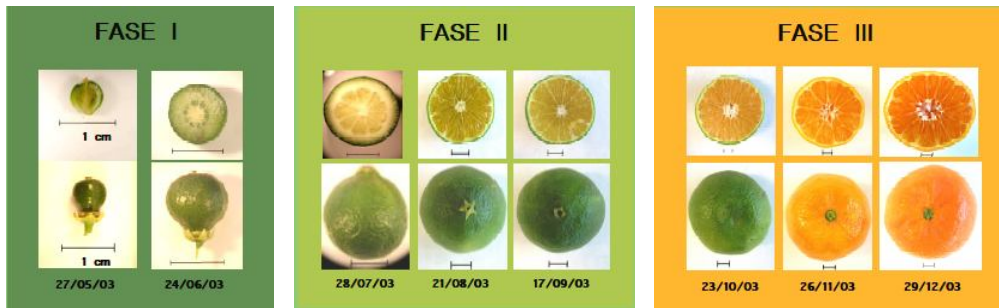


Figura I-4: Frutos, enteros y seccionados, de mandarino de la variedad Clementina de Nules (*Citrus clementina* Hort.Ex Tan.) durante las tres fases del desarrollo (Soler 2009).

Los frutos cítricos se caracterizan por tener una elevada concentración de ácidos antes de la maduración siendo el ácido cítrico el más abundante seguido del ácido málico y el fumárico (Karadeniz 2003). Como demostró Koch (1984) los ácidos son sintetizados en el fruto durante la fase I y se reducen durante las fases II y III del desarrollo del fruto (Bain 1958). Los ácidos son sintetizados en la mitocondria de las células de las vesículas del zumo y mediante un transportador de membrana son exportados al citosol y acumulados en las vacuolas (Gout 1993). La acumulación de ácido cítrico en la vacuola está determinada por su concentración en el citosol, que a su vez se debe al balance entre la síntesis y la degradación (Lobit y cols 2003).

I.2.2. Parámetros de la calidad de la fruta en los cítricos.

La industria cítrica y los consumidores de frutos cítricos tienen unos parámetros de calidad establecidos. Los caracteres establecidos son: el calibre del fruto, el contenido mínimo en zumo, el índice de color (ICC) que indica la coloración del fruto y el índice de madurez (IM). El IM determina la maduración interna y es la relación entre el extracto seco correspondiente a los sólidos solubles

del zumo, medido por el índice refractométrico, expresado en °Brix y la acidez, expresada como el contenido de ácido cítrico anhidro del zumo en tanto por ciento. Entre un 75% y un 85% de los grados Brix del zumo son azúcares, de los cuales, fructosa, glucosa y sacarosa son los más abundantes (Agusti 2003; Tewari y cols 2008). La acidez del zumo de los frutos cítricos se debe principalmente al elevado contenido en ácido cítrico siendo el ácido málico y el ácido fumárico, los siguientes en abundancia (Karadeniz 2003).

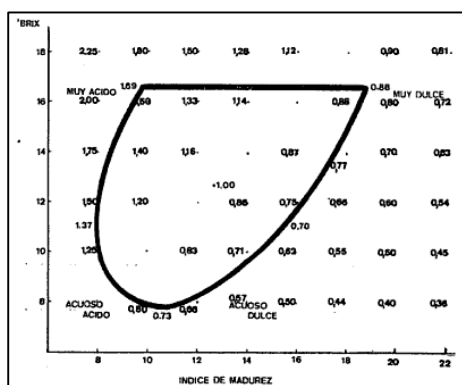


Figura III-1: Lengua de Pritchett. La relación entre los °Brix y el Índice de madurez indica la calidad organoléptica del fruto

El balance entre los dos componentes del índice de madurez configura el sabor del fruto, característica organoléptica muy valorada por parte del consumidor y que configura la calidad interna del fruto. Esta viene determinada por la “lengua de Pritchett” que indica la calidad del fruto en función de los °Brix y el IM (Figura III-1) siendo frutos con características organolépticas adecuadas para el consumo aquellos que se encuentren dentro del recinto (Soule y Grierson 1986).

Para la comercialización en fresco de los frutos cítricos en España, están determinadas las condiciones mínimas de calidad

que deben ser aplicadas (DOGV: orden del 14-septiembre-2006. Conselleria de Agricultura, Pesca i Alimentación). Para determinar si un fruto cítrico puede ser recolectado y comercializado, deben tener los siguientes valores mínimos de índice de madurez: Satsumas 6.5, Clementinas y otras mandarinas 7.0, Mandarina fortune 8.0 y Ortanique 7.5. Los mandarinos y los híbridos en la Comunidad Valenciana tienen el siguiente calendario de recolección (Soler 1999) (Figura III-2).

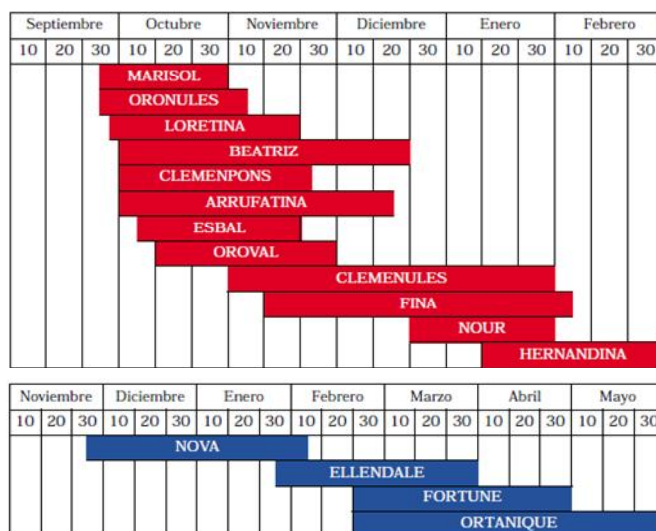


Figura III-2: Periodo de recolección de mandarinos (■) e híbridos de Clementina (■) de la Comunidad Valenciana (Soler 1999).

Un objetivo en la mejora de las Clementinas que resulta muy interesante por su importancia económica es la obtención de variedades que puedan ser recolectadas en periodos de tiempo alejados del momento de recolección de su parental, ampliando así el calendario de recolección y por lo tanto el periodo de comercialización, que en el caso de las Clementinas actualmente va de septiembre a enero (Agustí 2003). Una ampliación del periodo de recolección implicaría entre las características más relevantes, cambios en el índice de madurez externo (retraso o adelanto del

color). Sin embargo, la calidad organoléptica del fruto es determinante para su aceptación en el mercado. Por tanto los cambios en la maduración externa deben ir acompañados de cambios en la maduración interna del fruto, puesto que un retraso o adelanto de la maduración interna, y no de la externa, permite la recolección de la misma y no a la inversa. En consecuencia, la obtención de variedades que alcancen el índice de madurez interno mínimo establecido antes o después del estipulado para su parental tiene un doble interés. Un interés científico porque pueden servir como material vegetal para estudiar las diferencias moleculares y/o metabólicas que han resultado en una variación del índice de madurez y un interés agronómico, puesto que son posibles nuevas variedades que permitirían ampliar el mercado cítrico. Así pues, resulta necesaria la generación de nuevas colecciones que amplíen la variabilidad fenotípica de las variedades cítricas actuales. Estas colecciones resultan especialmente útiles por el material vegetal generado, el cual puede ser aplicado en las dos vertientes mencionadas, la científica y la agronómica. Una vez obtenido el nuevo material, el tratamiento de los datos de la población resulta de gran importancia porque determinará la selección y la caracterización de posibles nuevos genotipos que podrían ser incluidos en el mercado cítrico.

1.2.3. Mejora de variedades. Inducción de mutaciones.

A lo largo del último siglo diversos factores como la degradación de los terrenos cultivables: por erosión del suelo, salinización, la explotación intensiva de los terrenos, los procesos derivadas por el calentamiento global, así como aspectos socioeconómicos derivados del aumento en la población mundial plantean un desafío para la agricultura actual tanto en aspectos

medioambientales como en productivos (Mifflin 2000; Parry y cols 2009). Este desafío se puede abordar mediante avances agronómicos, como un mejor uso de los fertilizantes (Lea y Azevedo 2006), una mayor eficiencia del agua de riego (Richards 2000) y programas para la obtención de nuevas variedades (Parry y cols 2009; Reynolds y cols 2009). Por otro lado, en los últimos años ha habido un incremento considerable de la cantidad de secuencias en especies vegetales completándose el genoma de algunas como el arroz (Matsumoto y cols 2005) el sorgo (Patterson y cols 2009), el chopo (Tuskan y cols 2006) y la vid (Jaillon y cols 2007) y obteniéndose colecciones de ESTs en otras especies herbáceas como la remolacha, soja, pimiento, guisante, alfalfa, patata, tomate... etc y leñosas como el almendro o el roble (www.ncbi.nlm.nih.gov).

En relación con la mejora de cultivos, la mutagénesis tiene la ventaja de introducir uno o varios cambios en el genoma además de generar un amplio rango de variación fenotípica. De hecho, la explotación natural de la diversidad genética o su inducción mediante mutagénesis ha sido una de las estrategias que históricamente mayor éxito ha logrado si se consideran las más de 3000 nuevas variedades que se han obtenido mediante tratamientos de mutagénesis (www.fao.org). Estas mutaciones pueden ser inducidas por mutágenos físicos o químicos y son aplicables a todas las plantas. Las alteraciones que causan pueden ir desde cambios puntuales de unos pocos pares de bases característico de los mutágenos químicos a grandes deleciones en el ADN más frecuente empleando mutágenos físicos. A pesar de que los análisis transcriptómicos revelan que la mutagénesis puede producir grandes cambios en el transcriptoma (Batista y cols 2008), es un método de mejora que genera colecciones de genotipos con un amplio rango de variación fenotípica para diferentes caracteres

agronómicos. Esta variabilidad genética ha sido y está siendo ampliamente empleada en estudios de genómica, desarrollándose líneas de investigación sobre caracteres de interés agronómico en diversos centros de investigación en el mundo (Kharkmal y Shu 2009).

Uno de los principales objetivos de la citricultura es la obtención de nuevas variedades para satisfacer la demanda de la actual industria cítrica y los consumidores existiendo varias estrategias para ello. Tradicionalmente se ha empleado el cruce de variedades pero en el caso de los cítricos presenta problemas asociados al empleo de semillas como la juvenilidad, la esterilidad y la heterocigosis. También es un método de mejora lento en la obtención de nuevas variedades, si los caracteres a mejorar están relacionados con caracteres reproductivos. El abordaje mediante herramientas biotecnológicas tiene ciertos inconvenientes como son los efectos pleiotrópicos adversos en algunas plantas como los cítricos (Peña y cols 2001; Endo y cols 2005). Otro abordaje es el aprovechamiento de la selección de mutaciones gemárias espontáneas, pero pese a haber sido el origen de varias variedades actuales, queda supeditada a la tasa de mutación natural de las variedades. La mutagénesis inducida aumenta la frecuencia de mutación natural de las variedades de cítricos hasta 300 veces (Zhang y cols 1988) y es una herramienta que se encuentra libre de las restricciones existentes sobre los organismos modificados genéticamente (Parry y cols 2009) y mediante la cual se han obtenido nuevas variedades de limón (Eureka 22INTA), pomelo (Rio Red y Star Ruby) y Clementinas: Nova (Froneman y cols 1996), Nulessin (Asins y cols 2002). Las mutaciones pueden ser inducidas mediante agentes químicos o físicos. Los mutágenos químicos son empleados mayoritariamente cuando el material vegetal a emplear

son semillas que en el caso de los cítricos conllevaría problemas inherentes a la biología de sus especies como son los largos periodos de juvenilidad, la apomixis y el alto grado de heterocigosidad que se alejaría de los parámetros de calidad establecidos por los consumidores y el mercado. Además daría lugar a un método lento para la selección de nuevas variedades comerciales sobre todo si lo que se desea mejorar son características del fruto. Los mutágenos físicos, específicamente los rayos gamma y los neutrones rápidos son más empleados en yemas por su mayor penetración en este tejido, siendo así los más usados en frutales (Walther y Sauer 1985; Predieri y Fasolo 1989; Sammarcelli-Ollittraut y Legrave 1991; Pinet-Leblay y cols 1992; Lima da Silva y Daozan 1995; Fuentes y cols 2004) y los de mayor efectividad (Predieri 2001). Además el empleo de los mutágenos físicos en yemas de cítricos daría lugar a un método rápido comparado al empleo de semillas ya que estas yemas pueden ser injertadas en pie adulto, ahorrándose el periodo de juvenilidad y permitiendo una selección de nuevas variedades directa en campo tanto en aspectos vegetativos como reproductivos.

La colección de nuevos genotipos de Clementina descrita en el capítulo III se generó mediante mutagénesis física. De esta colección ya han sido registradas algunas nuevas variedades: Clemenverd, Nero (Iglesias y cols 2006; Rios y cols 2007) y Clementina de Marzo (Iglesias y cols 2009). Esto es indicativo de la variabilidad fenotípica y genética generada y existente en la colección.

II. Objetivos

II. Objetivos.

El objetivo del presente trabajo fue identificar genes relacionados o implicados con la maduración de fruto de los cítricos. Para ello se siguió una estrategia basada en la identificación de genes alterados en mutantes de maduración de cítricos. La estrategia incluyó los siguientes pasos:

- 1- Selección y caracterización de nuevos genotipos de Clementina con alteraciones en la maduración interna.
- 2- Identificación de genes alterados en estos genotipos mediante micromatrices de cDNA específicas de cítricos.
- 3- Correlación simultánea de los genes alterados en los mutantes con los parámetros de maduración para identificar genes involucrados en el proceso de maduración.
- 4- Detección de genes delecionados en mutantes irradiados de Clementina mediante CGH y FISH-BAC.
- 5- Estudio de la degradación de ácido cítrico en los frutos cítricos y análisis de la participación en el proceso del gen fosfoenolpiruvato carboxiquinasa.

III. Selección y descripción de cinco nuevos genotipos de Clementina con alteraciones en la maduración interna.

III. Selección y descripción de cinco nuevos genotipos de Clementina con alteraciones en la maduración interna.

III.1. Introducción.

La obtención de nuevas variedades en cítricos puede abordarse mediante varias estrategias. La estrategia que tradicionalmente ha sido empleada en la mejora de muchas especies vegetales es el cruce entre variedades. Sin embargo, en el caso de los cítricos, presenta problemas en su metodología debido a las características particulares de su biología como son la juvenilidad, la esterilidad y la heterocigosis, que da lugar a nuevos genotipos con características muy diferentes a los parentales, alejándose de los parámetros de calidad establecidos por los consumidores. Otra estrategia es la obtención de nuevas variedades mediante la selección de mutaciones gemarias espontáneas; estrategia que pese a haber generado muchas variedades actuales de Clementina (Clementina de Nules, Hernandina, Marisol, Oronules, Arrufatina, Esbal, Clemenpons, Loretina, Capola, Beatriz de Anna, Clemenrubí, Prenules, Cultifort, Orogros y Basol), y de satsuma (Clausellina y Planellina), tiene una tasa de obtención de nuevas variedades muy baja, ya que queda supeditada a la capacidad mutágena natural de la variedad parental y a la posterior detección en campo por parte del agricultor. Un tercer abordaje es mediante la biotecnología, obteniéndose material genético modificado. Esta estrategia ha sido empleada en variedades de cítricos (Cervera y cols 2000; Dominguez y cols 2000), pero presenta ciertos inconvenientes, como por ejemplo que la sobreexpresión del transgen pueda inducir efectos pleiotrópicos adversos en plantas (Peña y cols 2001; Endo y cols 2005). Otra estrategia que permite mejorar aspectos concretos de una determinada variedad sin modificar el fondo genético del

mismo, manteniendo los caracteres generales de la misma, es la inducción de mutaciones (Predieri 2001). La mutagénesis es una herramienta importante en la mejora de cultivos y está libre de las restricciones impuestas sobre los organismos modificados genéticamente (Parry y cols 2009). Mediante este abordaje, en los últimos 70 años se han obtenido más de 3000 variedades a partir de programas de mutagénesis (IAEA/FAO) (<http://www-infocris.iaea.org/MVD/>).

En el trabajo aquí descrito, los genotipos estudiados proceden de una colección obtenida mediante irradiación a partir de yemas de la variedad Clementina de Nules. Los mutágenos empleados en la generación de la colección fueron de tipo físico, neutrones rápidos y rayos gamma; de este último, se empleó el Cobalto 60 (^{60}Co). Ambos mutágenos son radiaciones ionizantes que provocan reordenamientos cromosómicos de todo tipo, deleciones, duplicaciones, inversiones y translocaciones (Yost 1954) y tienen una gran capacidad de penetración en los tejidos, característica muy deseable si se trabaja con yemas, que fue el material empleado. Además, tanto los rayos gamma como los neutrones rápidos han sido los más usados en frutales (Walther y Sauer 1985; Pedrieri y Fasolo 1989; Sammarcelli-Ollitrait y Legrave 1991; Pinet-Leblay y cols 1992; Lima da Silva y Daozan 1995; Fuentes y cols 2004) y son los que han tenido mayor efectividad (Predieri 2001). En el caso de los cítricos, la irradiación aumenta la frecuencia de mutación hasta 300 veces más que la frecuencia de mutación natural (Zhang y cols 1988). Mediante el empleo de estos mutágenos se han obtenido nuevas variedades de limón (Eureka 22INTA), pomelo (Rio Red y Star Ruby) y Clementinas como Nova SL (Froneman y cols 1996) y Nulesin (Asins y cols 2002). La mutagénesis genera una variabilidad genética que ha sido y está siendo ampliamente

empleada en estudios de genómica (Ahloowalia 2004), desarrollándose líneas de investigación sobre caracteres de interés agronómicos en diversos centros de investigación en el mundo (Kharkmal y Shu 2009). Por ejemplo, se trabaja en aspectos de nutrición y calidad de frutos de tomate con mayor contenido en antioxidantes (Tomlekova y cols 2009), un mayor aporte de proteínas en semillas de soja (Yathaputanon y cols 2009) o ampliando el mercado varietal en cuanto a coloración, tamaño y contenido en antocianinas en frutos de pimiento (Tomlekova y cols 2009).

El material vegetal empleado en este trabajo procede de una colección previamente existente de nuevos genotipos generada mediante mutagénesis física entre los años 2000 y 2002. Esta colección se obtuvo irradiando homogéneamente 10500 estaquillas con cinco yemas axilares. Las dosis empleadas fueron de 5,6 y 10 Gy en los neutrones rápidos y 50, 75 y 100 Gy con el ^{60}Co . El material irradiado se transfirió a 3 parcelas diferentes, la parcela A, la parcela B y la parcela C mediante injerto en púa. Tras el injerto, a partir de la masa de células de cada yema se desarrollaron los primordios foliares en espiral con una filotaxis 2/5 para el caso del mandarino Clementino de Nules dando lugar a la primera brotación de cada yema que se conoce como M1. De cada M1, brotó la segunda generación M2. La distinción entre M1 y M2 en campo es clave para la interpretación del fenotipo, puesto que es a partir de la generación M2 cuando se considera que los cambios genéticos que hayan podido producirse por efecto de la irradiación han comenzado a ser estables (Asins 2002). El número total de posibles nuevos genotipos existentes en la colección se estimó en unos 17 000 procedentes de irradiación con rayos gamma y 10500 con neutrones rápidos, haciendo un total de 27500 posibles nuevos genotipos de la

colección distribuidos en tres parcelas: A, B y C. En las parcelas A y B, el material irradiado fue previamente trasplantado mediante injerto en púa en vivero, donde se desarrolló la primera generación M1. A partir de ella, fueron transferidos mediante injerto en púa sobre patrón adulto de *Citrange carrizo* a 2 parcelas: la parcela A, localizada en la estación del I.V.I.A. de Moncada, cuyas yemas habían sido irradiadas con neutrones rápidos a la dosis de 6 Gy y la parcela B, con yemas irradiadas con rayos gamma a dosis de 50 y 75 Gy, localizada en la estación de la parcela C (Figura III-3).

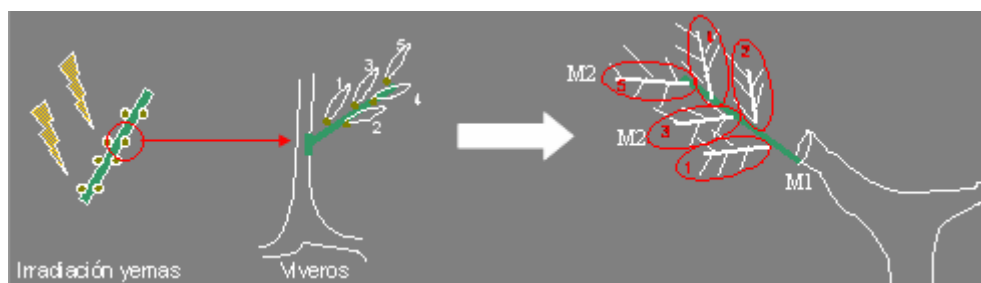


Figura III-3: Proceso de irradiación e injerto de las estaquillas de yema en una primera etapa en un vivero donde se desarrolló la generación M1. Mediante injerto en púa, estas yemas fueron transferidas a las parcelas definitivas, generándose la gemación M2.

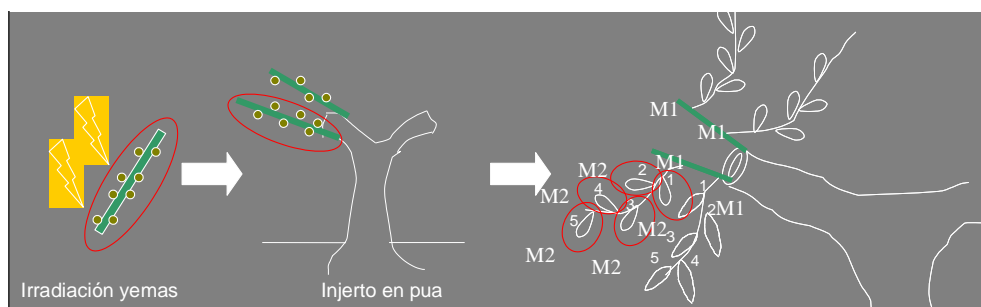


Figura III-4: Proceso de irradiación e injerto de las estaquillas de yema en campo. La primera generación en la parcela definitiva corresponde a una M1.

Otra parte del material irradiado fue trasplantado directamente, mediante injerto en púa, en la parcela C de la

estación del IVIA en Moncada. De cada púa se distinguieron la generación M1 y la M2 (Figura III-4).

El conocimiento del tipo de material empleado en la irradiación, así como el tipo de injerto y las características fisiológicas de la especie empleada resultan claves para realizar el muestreo, el tratamiento de los datos y por tanto para la selección de los nuevos genotipos. Así, en este caso se emplearon yemas axilares, cuyo uso conlleva una mayor probabilidad de quimeras, porque cada yema está formada por varias capas de células o túnica que reviste a una masa de células en división (Tadeo y cols 2003) y por lo tanto cada una puede recibir un tipo de daño. Sin embargo, el inconveniente de la aparición de quimeras puede ser subsanado analizando los genotipos a partir de la segunda generación, considerada genéticamente estable (Asins 2002). Además, para trabajar con cítricos, el empleo de yemas resulta un proceso rápido porque permite analizar el fenotipo en un menor tiempo. Utilizando otro material vegetal de partida como son las semillas o los óvulos, se pueden necesitar pasos de cultivo *in vitro*, generación de callo, embriogénesis, desarrollo del explante, aclimatación y finalmente injerto en campo, prolongándose el tiempo hasta poder analizar el fenotipo. Como las yemas irradiadas pueden ser transferidas mediante injerto a campo, se pudo obtener en unos pocos meses material vegetal del mismo. Hay que remarcar la gran ventaja de tener el posible nuevo genotipo bajo condiciones de campo: que la selección de los genotipos es directa, adelantando el tiempo de ensayo en campo para la obtención de una nueva variedad. De hecho, a partir de esta colección ya se han registrado las nuevas variedades de Clemenverd, Nero y Clementina de Marzo (Iglesias y cols 2006; Rios y cols 2007; Iglesias y cols 2009) con retraso en la maduración externa, ausencia de semillas y una mayor

perdurabilidad en el árbol respectivamente, indicación del potencial tanto agronómico como científico existente en la colección.

Por tanto, la selección y caracterización de estos nuevos genotipos de Clementina tiene una doble utilidad: por una parte sirven como material vegetal para poder realizar estudios más profundos en los cambios en el transcriptoma asociados a cambios en alguno de los parámetros de la maduración interna, la determinación de cambios genético estructurales realizados en alguno de estos genotipos a causa del tratamiento de irradiación o el estudio detallado de genes que estén relacionados con la maduración interna. Por otro lado, con una utilidad agronómica, ya que estos genotipos seleccionados pueden ser empleados como nuevas variedades comerciales de Clementina ampliando así el cuadro varietal.

En este capítulo se tratan los datos de una colección existente en el I.V.I.A. de posibles nuevos genotipos de Clementina obtenidos mediante tratamientos de inducción de mutaciones por irradiación y la posterior selección y caracterización de 5 nuevos genotipos con al menos uno de los parámetros de la maduración interna alterados. La selección se realizó en primer lugar en base a los datos de dos campañas y los genotipos preseleccionados se evaluaron durante 4 campañas, con el objetivo de confirmar el fenotipo observado. Para ello, se emplearon los parámetros de calidad: producción, diámetro, altura, peso, °Brix, acidez e índice de madurez interna del fruto en zumo. En la selección, se consideró el número de frutos de cada genotipo ya que éste influye en la concentración de azúcares en el fruto, así como en el calibre del mismo (Iglesias y cols 2003) y el tamaño en la concentración de ácidos en el fruto (Soler 2009).

III.2. Metodología.

III.2.1. Material vegetal.

El material vegetal empleado procede de la colección previamente existente de posibles nuevos genotipos generada mediante mutagénesis física entre los años 2000 y 2002 descrito en el apartado III.1.2. Los genotipos analizados se encuentran ubicados en tres parcelas: la parcela A y la parcela B de la estación del I.V.I.A. de Moncada y la parcela C en Godella. Se tomaron muestras entre septiembre y diciembre frutos de los genotipos obtenidos a partir de la segunda generación (M2). Se muestrearon al menos tres réplicas biológicas y de cada réplica biológica se realizaron dos réplicas técnicas. En el caso del genotipo Z46 se obtuvieron además tres réplicas biológicas del mutante mediante injerto en plancha sobre pie de *Citrange carrizo* situadas sobre dos parcelas diferentes a las de la colección situadas en la estación del I.V.I.A. en Moncada; dos de ellas ubicadas en una parcela 43 (replica Z46-R1 y replica Z46-R2) y la tercera en la parcela 03 (replica Z46-R3). Los controles para cada réplica fueron árboles de Clementina de Nules adyacentes a los árboles con las réplicas.

III.2.2. Determinación de los parámetros de calidad.

Los parámetros analizados en los frutos de los genotipos fueron:

- Floración: mediante comparación del estado fenológico de los genotipos.
- Peso del fruto: medido en gramos por fruto.
- Diámetro y altura del fruto: medido en mm, mediante un pie de rey.
- Sólidos solubles totales: empleando un refractómetro (Atago Pal-Alfa) que establece la concentración mediante la

determinación de su índice de refracción en grados Brix. Un grado Brix se define como el índice de refracción de una solución acuosa de sacarosa con una concentración de un gramo por litro (López 1995).

- Acidez total del zumo: obtenida mediante valoración de alícuotas de 5 ml de NaOH 0.1 N, usando fenoftaleína como indicador. Como el ácido cítrico es el mayoritario de los frutos cítricos (He 1999), el contenido total de ácidos en el zumo se expresó como equivalentes de ácido cítrico.
- IM: índice de madurez del fruto. Calculado como el ratio entre los °Brix y la acidez del fruto.
- Deformación del fruto: empleando un penetrómetro, se determinó la firmeza del fruto, medido por la deformación del diámetro en milímetros que sufre el fruto al aplicarle una fuerza constante de 1 kg, en unidades de def 1kg%.

III.2.3. Tratamiento estadístico de los datos.

Los criterios estadísticos empleados en el tratamiento de los datos fueron similares a los empleados en otros estudios (Rodríguez y cols 2005). La comparación de los promedios para los caracteres con distribución normal se realizó mediante la prueba de t de student y en los caracteres agronómicos cuya distribución no es normal, se les aplicó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis (Lynch & Walsh 1998). El número de réplicas biológicas empleadas fue al menos de 3.

Los paquetes informáticos empleados en el tratamiento de los datos estudiados fueron:

- Statgraphics Centurion XVI (versión de evaluación).
- XLSTAT Pro (Addinsoft) (versión de evaluación).

III.2.4. Criterio de selección de los genotipos.

En un primer lugar, previo a la selección, se realizó un análisis de la naturaleza de los datos fenotípicos estudiando la distribución de los datos a lo largo del periodo de muestreo en cada parcela de la colección, estimándose el tipo de estandarización a emplear para la selección posterior. Para la selección se emplearon dos estrategias. La selección de genotipos con varias alteraciones en varios parámetros fisiológicos y la selección de genotipos con *a priori* un solo parámetro fisiológico alterado. Para seleccionar genotipos con varias alteraciones se emplearon análisis multivariantes como son los gráficos de control ya que permiten detectar genotipos que se alejan del patrón estándar. Para la selección de genotipos con *a priori* un solo parámetro fisiológico alterado se seleccionaron aquellos genotipos que presentaron diferencias significativas ($P < 0.05$) al menos del 20% respecto del control. Se consideró como tal al promedio de al menos 50 datos obtenidos entre los muestreos del mismo día de los genotipos ubicados en árboles adyacentes a la del genotipo estudiado durante las campañas efectuadas en 2004, 2005, 2006, 2007, 2008, en base a los valores de ratio obtenidos de cada uno de los parámetros estudiados tras su estandarización centrados en 1.0 (equivalente al 100%). Así, un ratio de 0.80 y 1.20 indicó una diferencia del 20% inferior o superior al control respectivamente. Los tres primeros años se seleccionaron los genotipos cuyos valores de cada parámetro se situaban en los extremos de la distribución de la población. Para disminuir el posible efecto ambiental que pudiese existir dentro de la propia parcela, durante los siguientes años se realizaron muestreos a lo largo del periodo completo de la maduración de los frutos de Clementina de Nules, comparándolo con un control de su mismo

pie. En cada muestreo, se evaluó la diferencia de los distintos parámetros respecto al control.

III.3. Resultados y discusión.

Uno de los objetivos de este trabajo es la selección y caracterización de genotipos con parámetros de maduración alterados. Este aspecto puede abordarse desde varios puntos: por un lado se pueden seleccionar genotipos que presenten alteraciones en varios parámetros fisiológicos y por otro seleccionar genotipos con *a priori* un solo parámetro fisiológico alterado. En función del tipo de genotipo que se desee seleccionar, se deben emplear unas determinadas herramientas estadísticas para su selección.

En primer lugar se realizó un estudio estadístico de la naturaleza de los datos, tras el cual se procedió a la selección de los genotipos, escogiendo tanto genotipos con varias alteraciones como con una sola alteración en los parámetros estudiados. Los genotipos se evaluaron a lo largo de varios años.

III.3.1. Naturaleza de los datos fenotípicos.

Los gráficos de control son un tipo de análisis multivariante que permitieron detectar genotipos alejados del patrón estándar. Han sido mayoritariamente empleados en las industrias como técnicas de diagnósticos para supervisar procesos de producción e identificar inestabilidad. Esta herramienta puede enfocarse en la selección de nuevos genotipos, detectándolos como casos "anómalos" que corresponderían a genotipos con varias alteraciones.

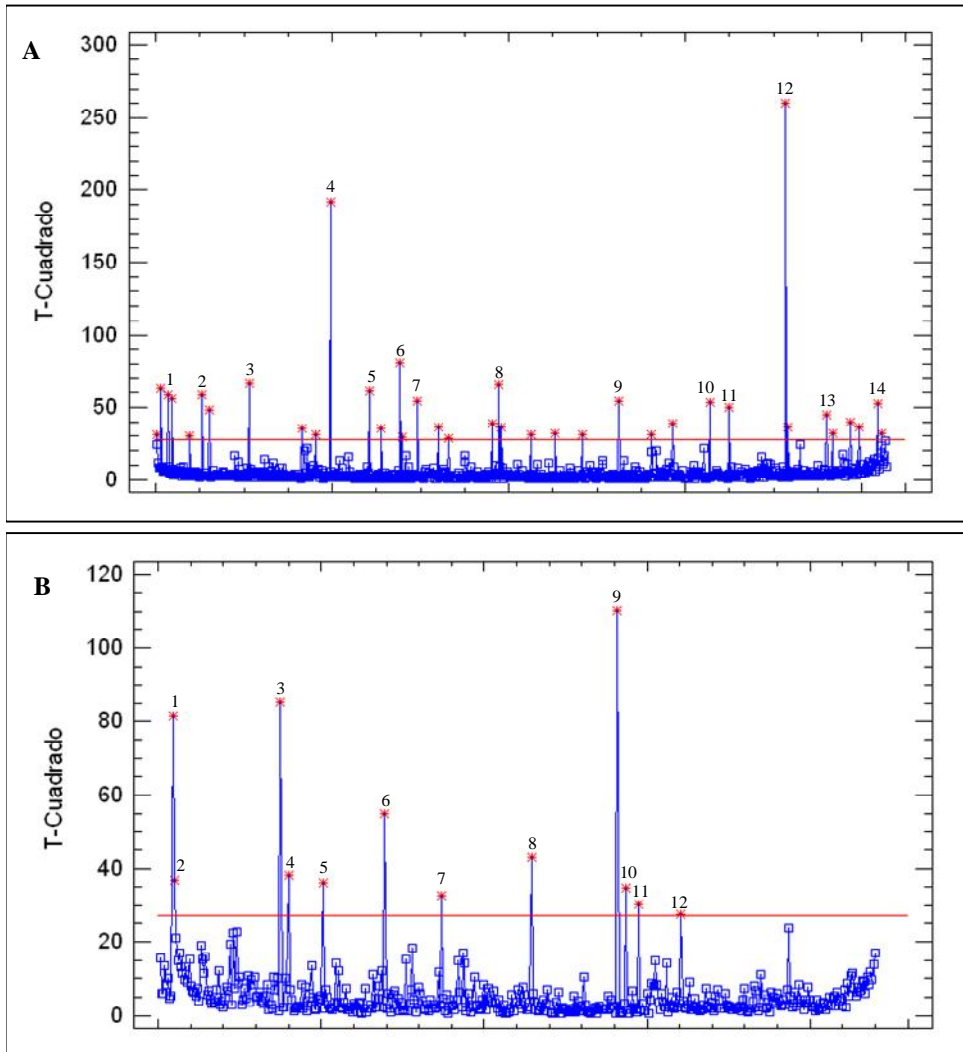


Figura III-5: Gráfico de control de dos años consecutivos sobre datos procedentes de la parcela A. Variables estudiadas: peso, diámetro, altura, sólidos solubles totales, acidez e índice de madurez interna del fruto. La T-cuadrada mide lo alejado que cada caso está del centroide de los datos, teniendo en cuenta cada variable y las posibles correlaciones entre las mismas. ($\alpha = 0.01$. A: $n=828$ (1=B3VRAA, 2=A9VBB, 3=Z07RO, 4= D8ARB, 5=A4SPAR, 6=X14RO, 7=B9RG, 8=C8VAV, 9=B9VBV, 10=Y26RO, 11=Y18RO, 12=Z46RO, 13=Z18RO, 14=Y19RO). B: $n=484$ (1=B9VBA, 2=C7RRV, 3=Z46RO, 4=D11RO, 5=J08BL, 6=AE68M, 7=K95RO, 8=D3BB, 9= Y5AM, 10=A2BRB, 11=B5RRR, 12=K16Z)).

Mediante esta herramienta de análisis multivariante se analizaron los genotipos muestreados durante dos años consecutivos, destacándose varios genotipos, como puede observarse en las Figura III-5-A y III-5-B. Se seleccionó mediante esta herramienta el genotipo Z46, por presentar diferencias en el calibre y alteraciones muy marcadas en la acidez y los sólidos solubles totales del zumo comparándolo con el resto de genotipos.

Por otro lado, resultó muy interesante seleccionar genotipos con solo uno de los parámetros fisiológicos alterados, sobre todo porque fueron empleados en estudios de transcriptoma, ya que los cambios en el transcriptoma son más fácilmente interpretables si *a priori* sólo está alterado uno de los parámetros. En este caso se seleccionaron los genotipos que se encontraron ubicados en las colas de la distribución del parámetro a seleccionar. Esta selección resulta difícil si se trabaja con parámetros relacionados con la maduración. Como el número de genotipos existentes en las diferentes parcelas era elevado, resultó necesaria la realización de muestreos escalonados en el tiempo. Los muestreos escalonados pueden dar lugar a diferencias en valores absolutos para las variables estudiadas, especialmente los grados Brix, acidez e índice de madurez, pudiendo dificultar la comparación entre los genotipos analizados al principio y al final del periodo de muestreo. Para subsanar estas diferencias y poder comparar variables que están medidas en unidades diferentes, las variables estudiadas deben estandarizarse (Yan y cols 2009). Un tipo de estandarización es la normalización, si bien, ésta debe ser aplicada cuando la distribución de los datos es normal. Entre las pruebas estadísticas más empleadas para testar la normalidad de una población están: Jarque-Bera, Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov con la modificación de Lilliefors y Anderson-Darling. La prueba Shapiro-

Wilk suele aconsejarse para tamaños poblaciones pequeños ($N < 30$), que no es el caso de la población de la colección. La prueba de Kolmogorov-Smirnov, válida para cualquier tamaño muestral (Sánchez 2003) ha sido ampliamente utilizada para testar la normalidad si bien es más sensible para valores cercanos a la media que a los extremos, mientras que la prueba de Anderson-Darling, es más sensible a las desviaciones en los extremos de la distribución. Como la distribución de datos provenia de una colección de posibles nuevos genotipos irradiados, era esperable y deseable, obtener individuos con valores extremos en alguno de los parámetros estudiados, por lo tanto, se empleó la prueba de Anderson-Darling para testar la normalidad de los datos.

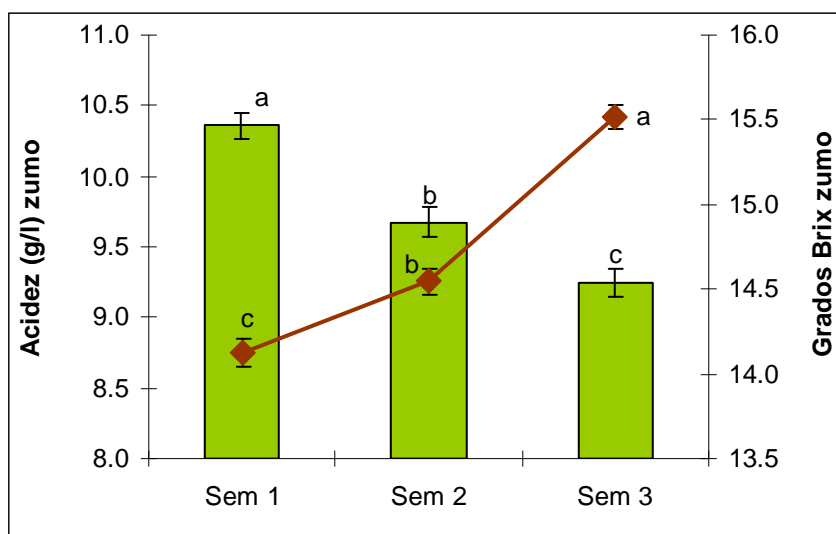


Figura III-6: Acidez (■) y °Brix (◆) del zumo del conjunto de posibles nuevos genotipos analizados en 3 semanas consecutivas de noviembre. ($P < 0.05$) ($\mu \pm$ E.S; Sem 1 $n = 181$, Sem 2 $n = 229$, Sem 3 $n = 221$).

Al comparar los diferentes parámetros de la madurez interna (°Brix y acidez) en cada uno de los muestreos realizados escalonadamente en el tiempo, se puede observar que variaron a lo largo de la recolección (Figura III-6). Pareció necesaria la

estandarización de las diferentes variables agronómicas previa a la selección por parámetros.

La prueba de Anderson-Darling para testar la normalidad de los datos en la parcela A y parcela B de estudio, indicó la no normalidad de las variables agronómicas estudiadas: Altura, Diámetro, Peso, °Brix, Acidez e IM medio del fruto (ver Anexo I, Tabla 1) con una probabilidad superior al 95%.

Cuando los datos no son normales se pueden aplicar transformaciones para lograr que los datos se ajusten a una distribución normal comprimiendo los valores altos y expandiendo los bajos. Las transformaciones más habituales en caracteres biológicos son en sentido creciente: \sqrt{x} , $\log(x)$ y $1/x$ (Milton 2007). Así pues, se realizaron estas tres transformaciones. La transformación $1/x$ en la variable acidez de la parcela B consiguió la normalidad de los datos, junto con las transformaciones \sqrt{x} y $\log(x)$ en la variable diámetro del fruto (DI) de la parcela A. Sin embargo, ninguna de las transformaciones obtuvo una distribución normal (test de Anderson-Darling, $n= 822$ en parcela A, $n=354$ en parcela B, $P<0.05$) para todas las variables estudiadas de cada parcela (ver Anexo I, Tabla 2). Al no cumplir la normalidad para todas las variables, se procedió a realizar otro tipo de estandarización, que se llamó ratio (X_{ir}) definiéndola como: $X_{ir}=X_i/\mu$; siendo X_i el valor de la variable numérica de cada genotipo y μ la media de la variable numérica de la subpoblación muestreo.

Esta estandarización permitió homogeneizar y centrar los valores en 1.0. El valor 1.0 puede interpretarse como un valor del 100%, para todas las variables antes y después de la estandarización (Figura III-7).

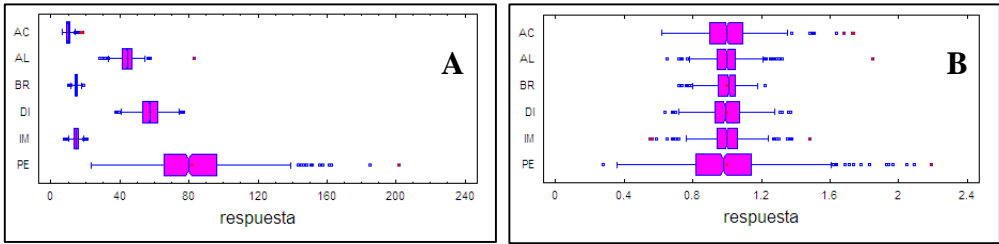


Figura III-7: Gráfico de Box-Whisker de las variables fenotípicas peso (PE), acidez (AC), altura (AL), °Brix (BR), diámetro (DI) e índice de madurez (IM) antes de estandarizar mediante transformación ratio (Figura A) y después (Figura B) en la parcela A. (test de Kruskal-Wallis, $P=0.05$ Figura A y $P=0.10$ Figura B, $n=824$).

Este tipo de estandarización permitió la selección de genotipos procedentes de diferentes muestreos realizados en el tiempo, centrando los valores de las variables estudiadas en 1.0, tal y como puede verse en la Figura III-8 cuyos ratios corresponden a los ratios de los valores de las variables acidez y sólidos solubles totales mostrados en la Figura III-6. Además, permitió comparar las diferencias de cada parámetro analizado en cada genotipo respecto al control es decir, un ratio de 0.80 en el peso y un ratio de 0.80 en la acidez, significa en ambos casos un valor un 20% inferior al control, independientemente de los valores absolutos de cada variable.

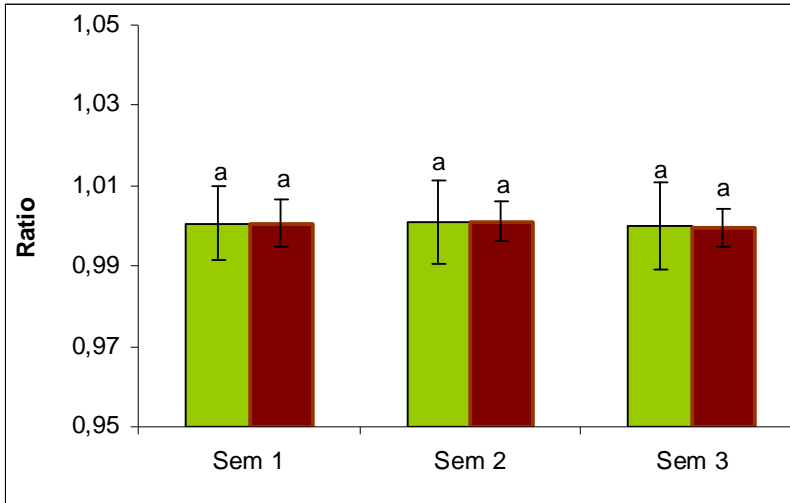


Figura III-8: Comparación de medias de los datos de acidez (■) y grados Brix (■) del zumo estandarizados con ratio del conjunto de posibles nuevos genotipos analizados en 3 semanas consecutivas de noviembre. Prueba de Kruskal-Wallis ($P < 0.05$). Letras diferentes indican diferencias significativas (prueba de Kruskal-Wallis, $P < 0.05$, Sem 1. $n=181$, Sem 2: $n=229$, Sem 3: $n=221$).

Tras la estandarización, se realizó un análisis multivariable de los parámetros estudiados. Los parámetros relacionados con el tamaño del fruto, el diámetro, la altura y el peso obtuvieron una correlación positiva significativa entre sí ($P < 0.05$). Por otro lado, la alta correlación entre el índice de madurez y la acidez, $r = -0.797$, comparándola con la de los grados Brix, $r = 0.2307$, parece indicar que la maduración interna de los frutos está condicionada marcadamente por la dinámica de la acidez en el fruto. Los resultados de la correlación pueden observarse en la Tabla III-1.

Tabla III-1: Matriz de correlación (Pearson) entre las variables estandarizadas mediante radio, Acidez del zumo, Sólidos solubles totales (°Brix) del zumo, Índice de madurez interno (IM), Altura del fruto, Diámetro del fruto y Peso del fruto. $n= 117$.

	Acidez	Altura	°Brix	Diámetro	IM
Acidez	1				
Altura	-0.4431	1			
°Brix	0.3492	-0.3764	1		
Diámetro	-0.4914	0.7333	-0.2029	1	
IM	-0.7766	0.2641	0.2307	0.4360	1
Peso	-0.5004	0.7843	-0.2284	0.9708	-0.797

Los valores de las variables empleadas para la selección de, en este caso, los sólidos solubles totales y la acidez, deben tener un límite fisiológico. Esto significa que biológicamente es poco probable que una alteración debida a la mutación haya provocado una ausencia total de todos los ácidos del fruto o de todos los sólidos solubles totales del mismo, puesto que estos compuestos son necesarios para la supervivencia del individuo y por consiguiente, el individuo no estaría dentro de la colección. Por lo tanto, en la selección de nuevos genotipos con alteraciones en alguno de estos parámetros, hay que tener en cuenta que una pequeña diferencia para los individuos en las colas de la distribución de datos, puede tener una gran relevancia genética y/o biológica. Las Figuras III-9-A y III-9-B muestran los valores de acidez y de sólidos solubles totales de los datos obtenidos en una campaña respectivamente.

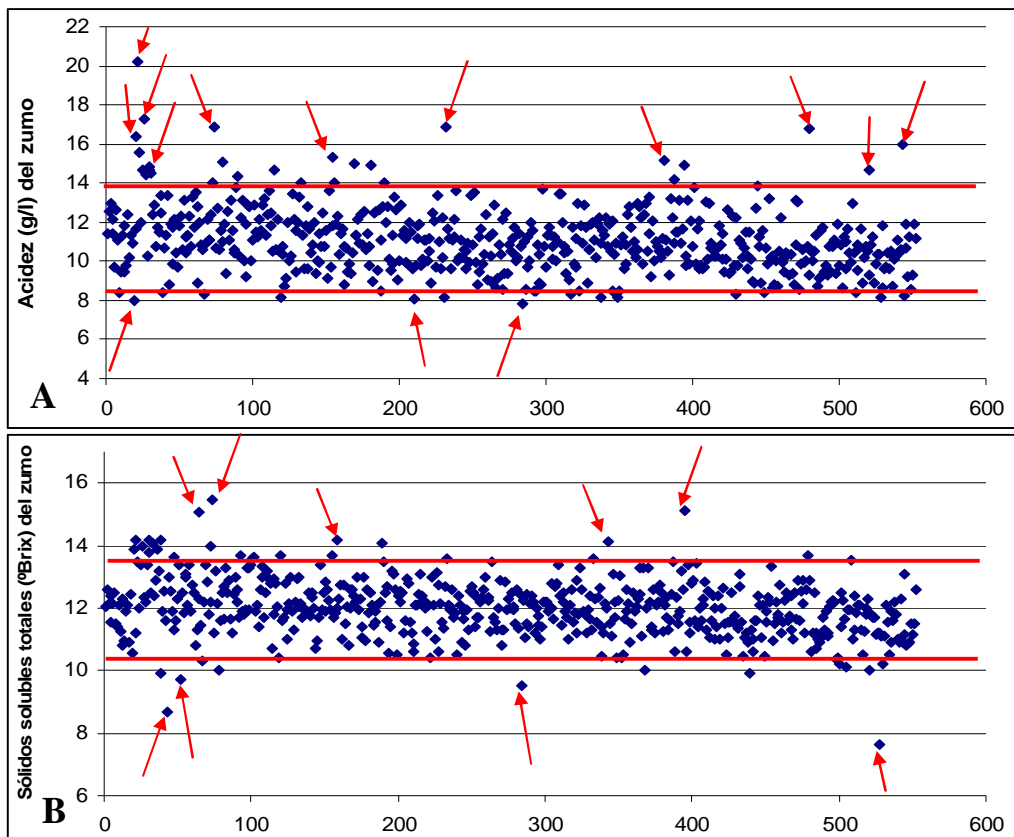


Figura III-9: Acidez (g/l) (A) y sólidos solubles totales (B) del zumo de los genotipos muestreados durante una campaña en la parcela B. En flechas se indican los individuos con valores extremos. $n=552$.

Estudiando la evolución de la maduración de Clementina de Nules (www.ivia.es/sdta) puede apreciarse que la oscilación de los valores de °Brix es menor respecto a los valores de acidez, ya que la desviación respecto a la media es de un 10.61% en la acidez frente al 2.30% de los °Brix. Esta observación, junto con los resultados obtenidos en la correlación, sugiere que la evolución del índice de madurez de los frutos de Clementina está más marcada por la evolución de la acidez en el fruto que por los SST. El ácido cítrico, el ácido málico y el ácido fumárico son los principales compuestos

ácidos en la pulpa de los frutos cítricos (Karadeniz 2003). Mediante un estudio de regresión se estudió la relación entre el parámetro fisiológico de acidez y la concentración de ácido cítrico, málico y fumárico en los zumos de varios genotipos. La regresión múltiple entre la acidez y la concentración de citrato, malato y fumarato obtuvo que las variables malato y fumarato no eran estadísticamente significativas ($P < 0.05$). Al realizar una regresión simple de la acidez con las concentraciones de cada ácido por separado se obtuvo el grado de relación entre la acidez y los ácidos mayoritarios cuantificado mediante dos estadísticos, el coeficiente de correlación lineal (r) que indica el grado de relación entre las dos variables y el estadístico R^2 , indicador del porcentaje de la variabilidad de la acidez explicada por el modelo (Tabla III-2).

Tabla III-2: Correlación lineal (r) y variabilidad de la acidez explicada por el modelo (R^2) entre la acidez (g/l) y la concentración del ácido cítrico, el ácido málico o el ácido fumárico en el zumo de Clementina. $n=60$.		
	r	R^2
Ácido cítrico	0.95	90.40%
Ácido málico	-0.56	31.84%
Ácido fumárico	0.56	32.19%

Estos resultados indican una relación fuerte entre la acidez titulable y la concentración de ácido cítrico en el zumo, sin existir una relación estrecha con el segundo ácido mayoritario, el ácido málico a diferencia de lo observado en otros frutos ácidos como en uva, frambuesa o arándanos donde la acidez se debe principalmente a este ácido (Famiani y cols 2005). Por lo tanto, las

diferencias de acidez de los genotipos seleccionados pueden deberse principalmente al balance entre la síntesis y la degradación de ácido cítrico en el fruto.

III.3.2. Selección de los nuevos genotipos.

Durante dos campañas, se seleccionaron aquellos genotipos que mostraron diferencias superiores a un 20% respecto a su parental.

Tabla III-3: Parámetros fisiológicos estandarizados con ratio durante dos años de una selección de genotipos. Un ratio de 0.80 y 1.20 indican diferencias del 20% inferior o superior al parental respectivamente. Muestras realizadas en noviembre. $n \geq 3$.

	Año 1		Año 2	
	Brix	Acidez	Brix	Acidez
C01	0.90	0.62	1.07	0.78
D08	0.81	0.80	1.02	0.73
Z46	1.37	1.66	1.37	1.66
C06	0.79	0.66	0.87	0.71
H03	0.73	0.70	0.82	0.68
I09	1.01	1.29	1.19	1.19
J59	1.00	0.62	1.00	0.85
Ñ17	0.78	0.59	0.74	0.63

Esta selección se efectuó escogiendo aquellos genotipos que tuvieron en principio, un solo parámetro alterado, manteniendo los demás similares al parental. La Tabla III-3 muestra un subgrupo de genotipos seleccionados en base a datos de dos campañas.

Con el objetivo de minimizar la posible variación existente en el fenotipo por causas ambientales, durante el tercer y cuarto año de muestreo, se efectuó una comparación respecto a la media control del mismo árbol donde se encontraba el genotipo seleccionado. La selección final de los genotipos empleados para los estudios de expresión, se realizó con aquellos que durante los

diferentes muestreos realizados durante 4 años mostraron diferencias significativas ($P<0.05$) para el parámetro de acidez y/o °Brix. La Tabla III-4 muestra los genotipos seleccionados.

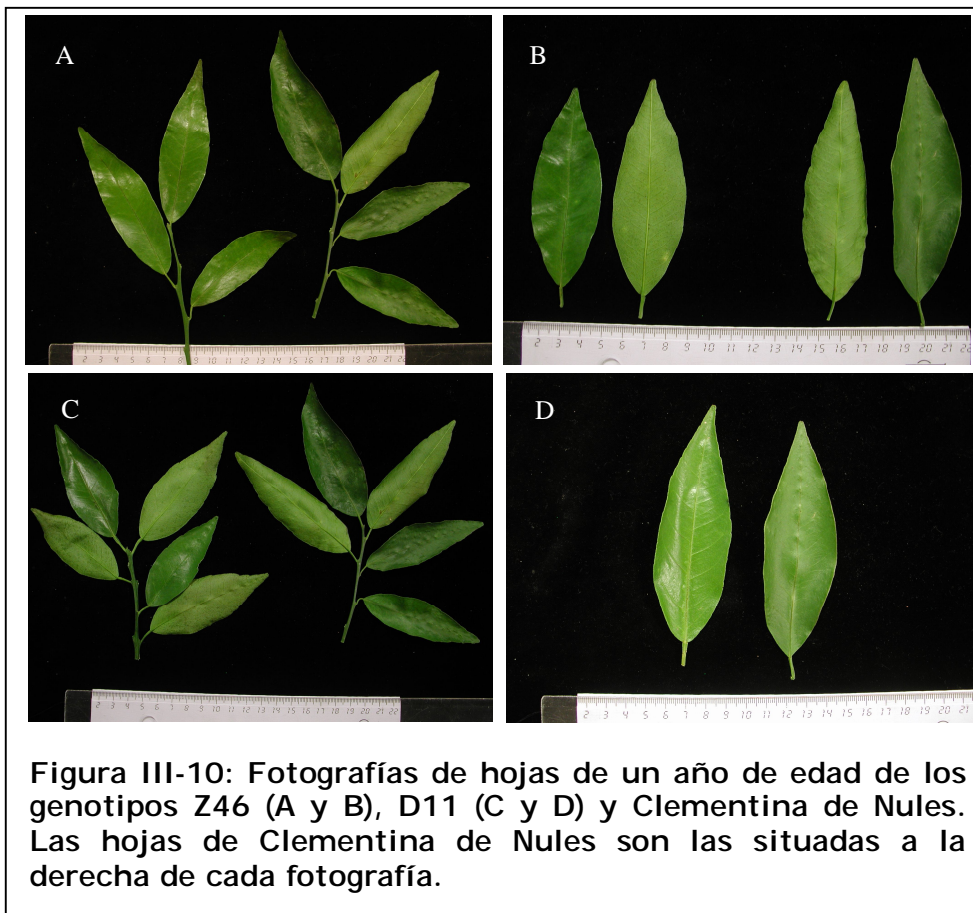
Tabla III-4: Parámetros de maduración (Acidez, °Brix, IM) de los 5 genotipos seleccionados. Los signos +, -, = indica mayor, menor o ausencia de diferencias significativas ($P<0.05$).

	Acidez	°Brix	IM
Z46	+	+	-
D11	-	=	=
I09	+	=	-
H03	-	-	=
J59	-	=	+

De la colección de posibles nuevos genotipos obtenida mediante irradiación de yemas de Clementina de Nules, se han seleccionado los mutantes citados en la Tabla III-4 por tener algunos de los parámetros de maduración interna alterada, manteniendo los demás caracteres analizados sin cambios aparentes en la mayoría de los casos. Este grupo de genotipos proporcionó una variabilidad fenotípica específica de los mecanismos que rigen la maduración interna de las Clementinas.

III.3.3. Caracterización de los genotipos seleccionados.

A pesar de que cada mutante seleccionado presentó rasgos que lo hacían único, el desarrollo vegetativo de los genotipos fue similar a Clementina de Nules, presentando un buen vigor y desarrollo, con muy poca espinosidad en las ramas y un follaje denso.



Las hojas eran de color verde oscuro sin observarse coloraciones indicadoras de sensibilidad a carencias nutricionales en ninguno de los genotipos, lanceadas y con peciolo no alado, similares en tamaño y forma a su parental tal y como puede apreciarse en las Figura III-10. Pese a que todos los genotipos seleccionados presentaron alteración en alguno de los parámetros de maduración del fruto, la floración en todos los genotipos tanto en intensidad como en época fue similar a Clementina, produciéndose una floración principal en primavera a finales de marzo o principios de abril originando más del 90% de la producción y algún año una segunda floración. Los frutos procedentes de la segunda floración

no se consideraron en los muestreos durante el periodo de maduración del fruto.

En resumen, en los genotipos estudiados el desarrollo vegetativo, la morfología y coloración de las hojas, así como la intensidad y época de floración son semejantes a Clementina de Nules, observándose únicamente diferencias en los parámetros de calidad de los frutos.

III.3.3.1. Z46

Este genotipo procede de la irradiación de yemas con neutrones rápidos a la dosis de 10 Gy de la variedad Clementina de Nules. Está situado en la parcela A de la estación del I.V.I.A. en Moncada.

La **producción** de este genotipo fue un 20%, 46%, 40% y 50% inferior respecto al control durante 4 campañas (2004, 2005, 2006 y 2007). En ningún caso se observó vecería, es decir, todos los años presentó una producción similar.

El **peso** medio del fruto a excepción del año 2004 con 16 g/fruto menos que Clementina de Nules, no mostró diferencias significativas ($P < 0.05$) respecto a su control en todos los muestreos realizados durante las 3 campañas consecutivas, noviembre del 2005, noviembre del 2006 y noviembre del 2007.

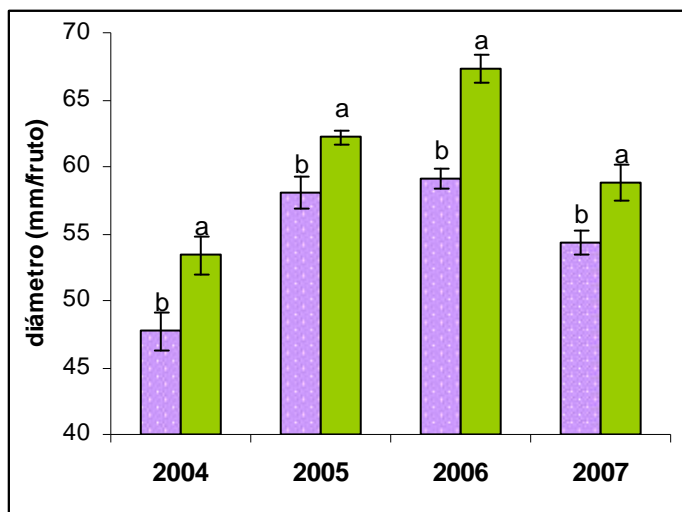


Figura III-11: Diámetro (mm) medio por fruto del genotipo Z46 (■) y su control (■) en noviembre del 2004, noviembre del 2005, noviembre del 2006 y noviembre del 2007. Letras diferentes indican diferencias **significativas comparación por año** ($\mu \pm E.S$, $P < 0.05$, $n \geq 3$).

La **altura** del fruto tampoco mostró diferencias estadísticamente significativas ($P<0.05$) respecto al control en los mismos muestreos. Sin embargo, el **calibre** del fruto (diámetro) resultó de media un 9.2% menor significativamente ($P<0.05$), es decir, entre 4.1 mm y 8.2 mm menos por fruto (Figura III-11).

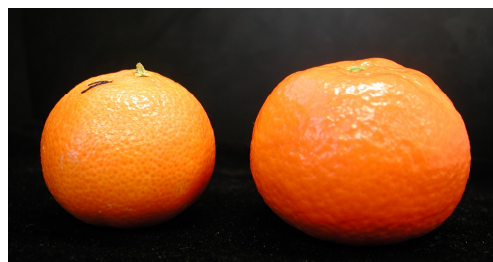


Figura III-12: Fruto entero del genotipo Z46 (izquierda) y Clementina de Nules (derecha).



Figura III-13: Fruto cortado ecuatorialmente del genotipo Z46 (izquierda) y Clementina de Nules (derecha).

La relación entre los valores del diámetro y la altura del fruto indican una forma esférica. En el caso del genotipo Z46 se observa que sus frutos son más redondeados que los de Clementina de Nules (Figura III-12 y III-13).

El contenido en **sólidos solubles totales** del fruto, cuantificado como °Brix, fue superior significativamente ($P<0.05$) respecto al control en los muestreos realizados en 2004, 2005 y 2006 a excepción del realizado en 2007 donde no se obtuvieron diferencias significativas. Estas diferencias pueden observarse en el Figura III-14, donde el genotipo Z46 tuvo un contenido en °Brix superior al control en un 18.37%, 27.74% y 18.10%, para las fechas de muestreo de noviembre de 2004, 2005 y 2006, respectivamente.

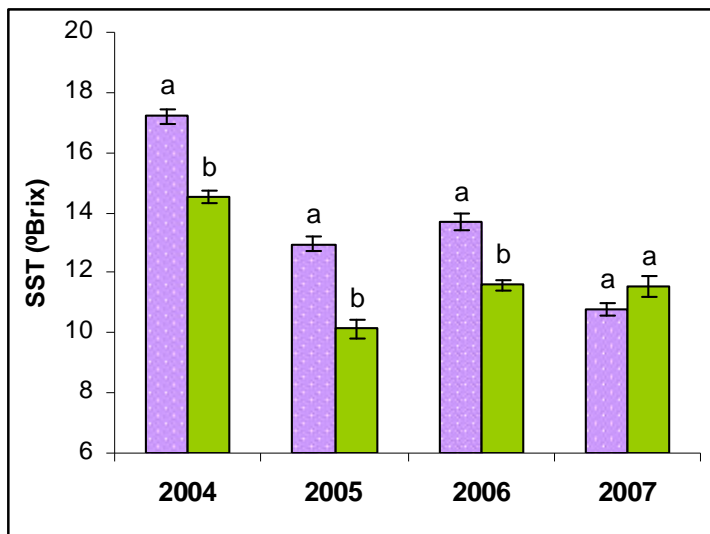


Figura III-14: Sólidos solubles totales del zumo del genotipo Z46 (■) y su control (■) en noviembre del 2004, noviembre del 2005, noviembre del 2006 y noviembre del 2007. Letras diferentes indican diferencias **significativas comparación por año** ($\mu \pm E.S$, $P < 0.05$, $n \geq 3$).

La **acidez** del zumo del genotipo Z46, cuantificado en las mismas fechas de muestreo que los grados Brix, indicaron diferencias en las medias significativamente mayores ($P < 0.05$) respecto al control: 26.69 g/l del genotipo frente a 18.88 g/l en el control en noviembre del 2004; 17,66 g/l de Z46 respecto a 9.98 g/l del control en noviembre del 2005; 11,98 g/l de Z46 respecto a 7.22 g/l en el control en noviembre del 2006 y 22.12 g/l del genotipo frente a los 13.80 g/l del control en noviembre del 2007 (Figura III-15).

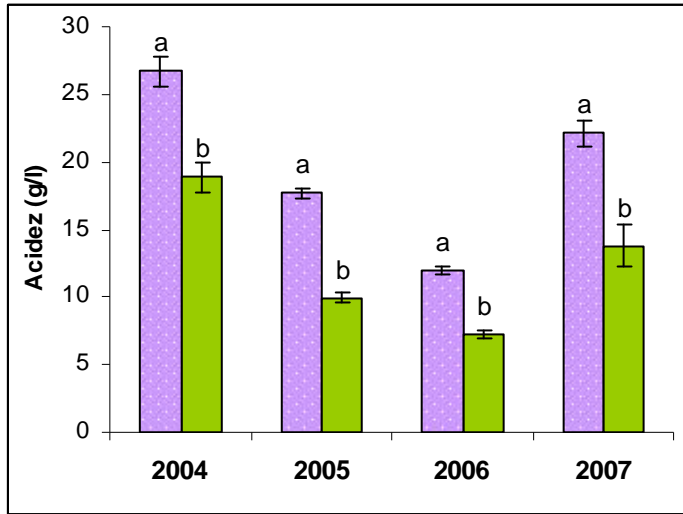


Figura III-15: Acidez (g/l) del zumo del fruto del genotipo Z46 (■) y su control (■) en noviembre del 2004, noviembre del 2005, noviembre del 2006 y noviembre del 2007. Letras diferentes indican diferencias **significativas comparación por año** ($\mu \pm E.S$, $P < 0.05$, $n \geq 3$).

Los valores de sólidos solubles totales y de acidez mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) de Z46 respecto al control y su relación, el **índice de madurez interna** tuvo valores inferiores significativamente ($P < 0.05$) entre un 13.05% y un 58.82% comparándolo con su control (Figura III-16).

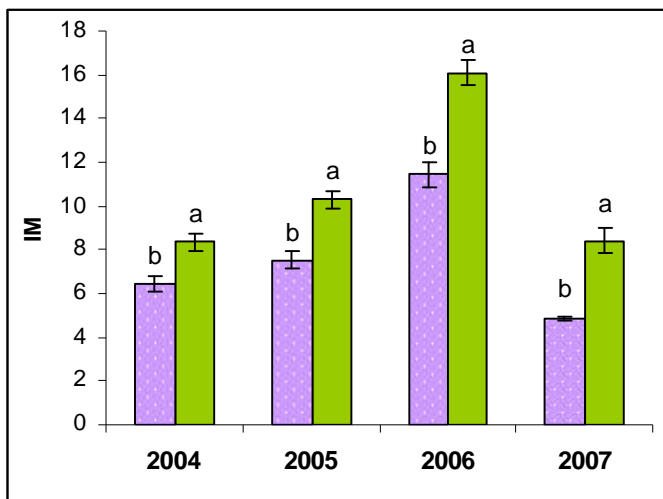


Figura III-16: Índice de madurez interna del genotipo Z46 (■) y su control (■) en noviembre del 2004, noviembre del 2005, noviembre del 2006, noviembre del 2007. Letras diferentes indican diferencias **significativas comparación por año ($\mu \pm E.S$, $P < 0.05$, $n \geq 3$).**

Puesto que este genotipo presentó un retraso en la maduración interna, se evaluó también la madurez externa tomando como parámetro el índice de color del fruto para determinar si también presentaba retraso.

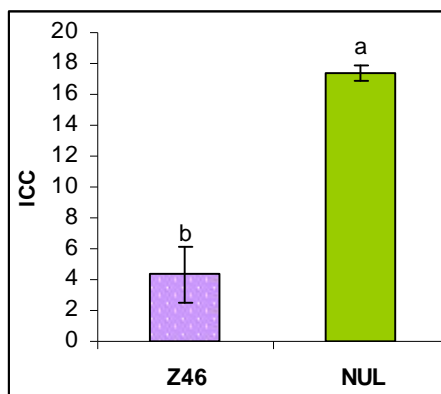


Figura III-17: Índice de color externo del fruto (ICC) del genotipo Z46 la clementina de Nules en noviembre del 2007. ($\mu \pm E.S$, $P = 0.014$), $n=3$

En el muestreo realizado en noviembre del 2007, donde la madurez interna del genotipo Z46 era un 58.82% inferior al control, el **índice de color externo del fruto** (ICC) de Z46 fue un 75% inferior al control (Figura III-17), indicando un retraso en la madurez fisiológica tanto en la interna como en la externa en el genotipo Z46.

A partir de los datos anteriores se puede concluir que el genotipo Z46 presenta un menor diámetro del fruto, un mayor contenido en sólidos solubles totales, una mayor acidez y un retraso tanto en la maduración interna como en la externa respecto a su parental Clementina de Nules al menos en los muestreos realizados en la época de recolección de su parental.

Puesto que Z46 mostró un retraso de la maduración, durante la campaña del 2007 se evaluaron los parámetros del genotipo Z46 un mes posterior al periodo de recolección de Clementina de Nules en la población donde se encuentra ubicadas las parcelas de la colección, de noviembre a diciembre. Así, el 9 de Febrero se evaluaron los parámetros de madurez interna del fruto y el grado de firmeza, comparándolo con Clementina de Nules y una variedad comercial de tipo tardía que se encontraba en su periodo de recolección (mitad de enero a finales de febrero) en el momento del muestreo, la variedad Hernandina.

El porcentaje de deformación que expresa **la firmeza del fruto**, en el genotipo Z46 fue la mitad respecto a Clementina de Nules y similar a la de Hernandina, siendo del 3.17%, 6.44% y 3.79% respectivamente (Figura III-18), dato que es paralelo con la aparición de alteraciones en la piel como el bufado. En Clementina

de Nules se observó un cierto bufado mientras que en el mutante Z46 no.

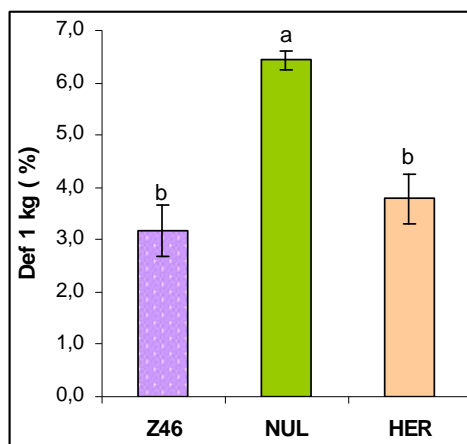


Figura III-18: Deformación (mm que se deforma el fruto cuando se le aplica una fuerza de 1kg de presión) del fruto del genotipo Z46, de Clementina de Nules (NUL) y de Hernandina (HER) el 9-Feb-2008. ($\mu \pm E.S$, $P < 0.01$, $n=3$)

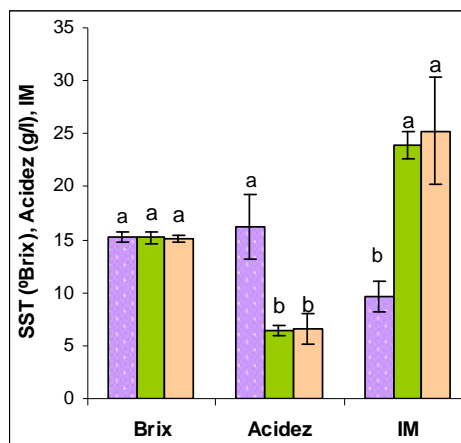


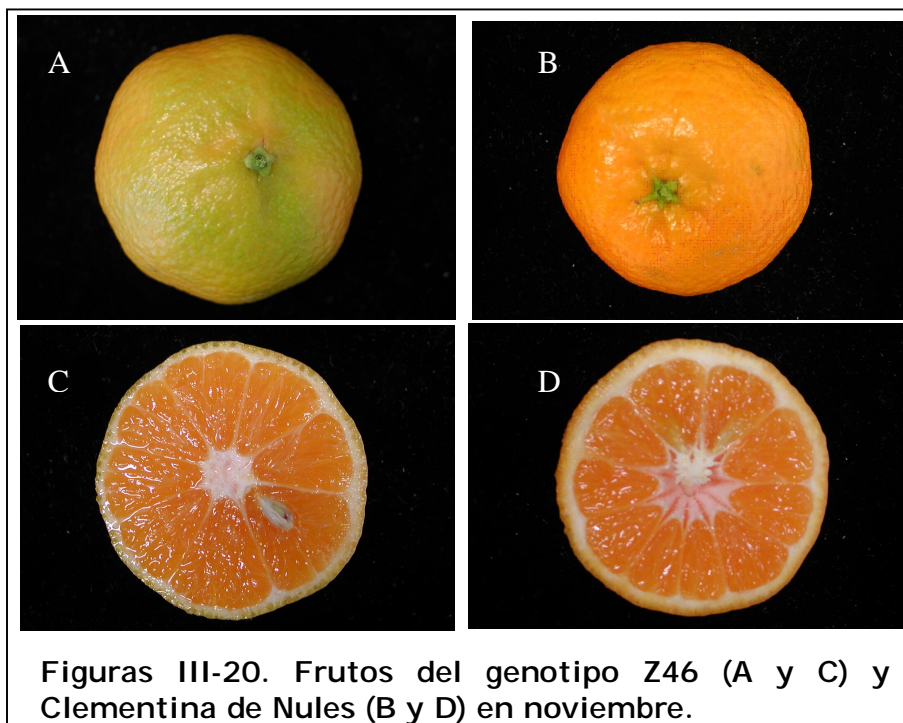
Figura III-19: SST (°Brix), Acidez (g/l) e IM del genotipo Z46 (■), de Clementina de Nules (■) y de Hernandina (■) el 9-Feb-2008. ($\mu \pm E.S$, $P < 0.01$, $n=3$)

La concentración de SST de Z46 no difirió de Clementina de Nules o Hernandina, mientras que la acidez del zumo fue significativamente mayor ($P < 0.05$), siendo de 16.25 g/l para Z46 y de 6.40 g/l y 6.58 g/l para Clementina de Nules y Hernandina respectivamente. Estas diferencias de acidez, sin variación de los SST, configuran un menor índice de madurez interno de Z46 respecto a Clementina de Nules o Hernandina (Figura III-19).

Los resultados realizados un mes después al periodo de recolección de Clementina de Nules (noviembre-diciembre) señalaron que Z46 tiene una firmeza similar a Hernandina (Figura III-18) y un retraso en la maduración interna del fruto a causa de su

mayor contenido en ácidos (Figura III-19), dando lugar a frutos que pueden ser recolectados en el periodo de recolección de las variedades tardías: Clementina Fina, Nour y Hernandina, ampliando así el mercado varietal de Clementinas tardías.

Como se observa en la Figura III-11, el calibre del fruto resultó menor respecto a Clementina de Nules, mientras que la altura no varió. En consecuencia, el peso debería de haber sido menor. Sin embargo no se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) con el control (ver Anexo II, Z46). Estos datos indican que los frutos de Z46 son más redondeados como se pueden apreciar en las Figura III-20-A, III-20-C y están más compactos resultado que apoyaría la menor deformación del genotipo Z46 observado en febrero respecto a Clementina de Nules y similar a la variedad tardía Hernandina (Figura III-18).



Con el objetivo de evaluar la estabilidad génica de Z46, se obtuvieron 3 réplicas biológicas del genotipo Z46 mediante injerto en plancha sobre pie adulto de *Citrangé carrizo*: dos ubicados en la parcela 43 (Z46-R1 y Z46-R2) y la tercera en la parcela 03 (Z46-R3) de la estación del I.V.I.A. en Moncada. Los controles pertenecen a injertos de Clementina de Nules realizados sobre el mismo pie donde se encuentran las réplicas biológicas del genotipo Z46. La caracterización de los años anteriores indicó que es un genotipo cuyo contenido de acidez y °Brix es mayor y menor su índice de madurez respecto a su parental Clementina de Nules. Para observar si estas características las mantenía más allá del periodo de recolección establecido para Clementina de Nules (noviembre-diciembre) se realizó el muestreo el 23 de enero del 2009, aproximadamente un mes después a este periodo de recolección. En las tres réplicas el genotipo Z46 presentó un contenido mayor significativamente ($P < 0.05$) en el zumo tanto de **°Brix** como de **acidez** respecto a su parental control, Clementina de Nules y un menor **índice de madurez interna** comparándolo con su control con una probabilidad superior al 95%. Estas características se mantuvieron en las tres réplicas biológicas del genotipo situado en dos parcelas diferentes (Figura III-21) confirmando el fenotipo detectado en la parcela original.

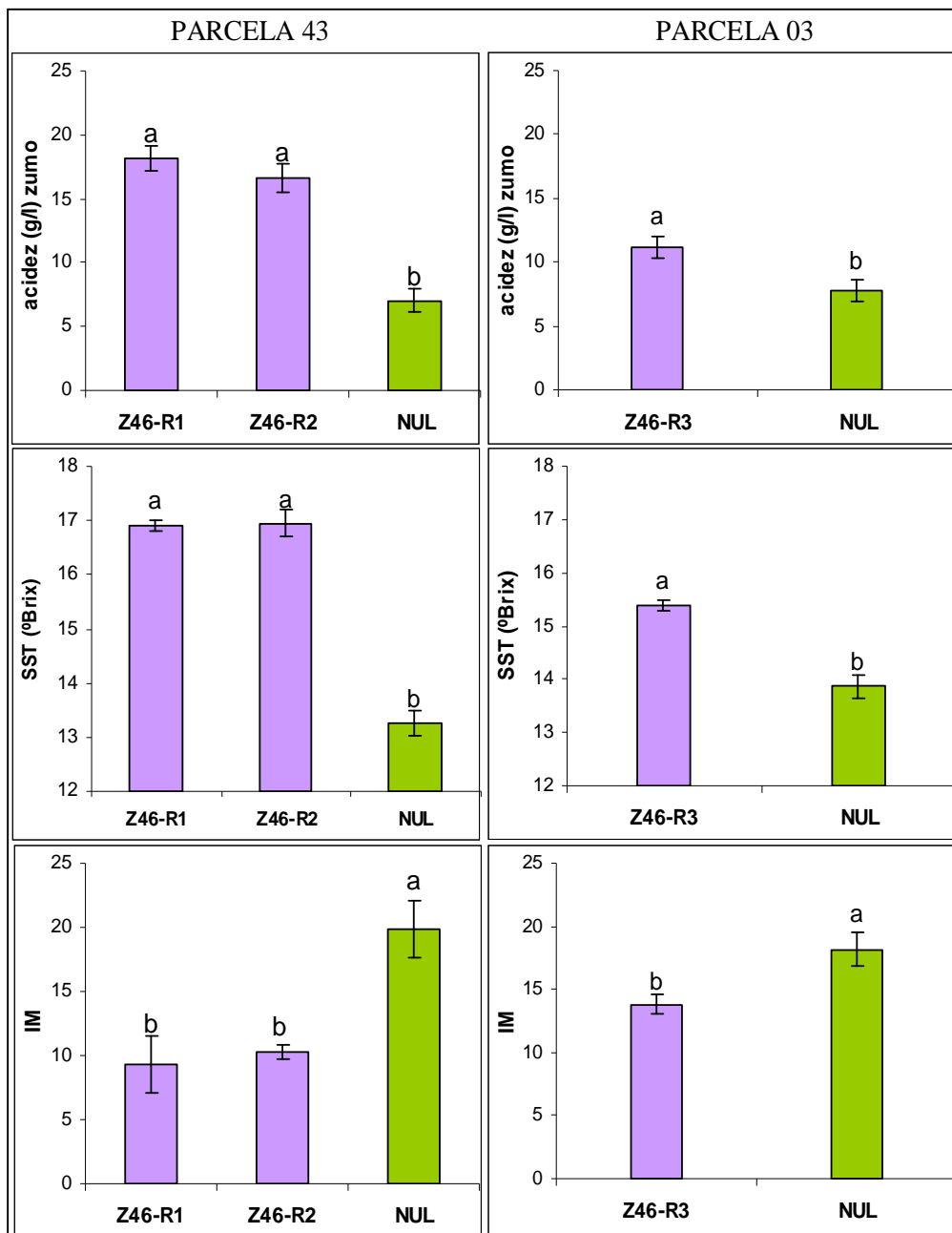


Figura III-21: SST (°Brix), acidez (g/l) e índice de madurez interna (IM) del zumo de los frutos de 3 réplicas biológicas del genotipo Z46 y de clementina de Nules (NUL). Dos de ellas situadas sobre la parcela 43 (Z46-R1 y X46-R2) y el tercero en la parcela 03 (Z46-R3). ($\mu \pm E.S.$, $P < 0.05$ $n \geq 3$ parcela 43 y $n \geq 5$ parcela 03). Muestreo realizado en enero del 2009.

En conclusión, los datos obtenidos de las parcelas donde están situadas las réplicas biológicas del nutante Z46 confirman los resultados obtenidos del genotipo en la parcela de origen, pudiendo concluir que el mutante Z46 es un nuevo genotipo de Clementina que puede ser recolectado desde noviembre hasta mitad de febrero con lo que solaparía su periodo de recolección con las variedades actuales: Clementina de Nules, Clementina Fina, Nour, Clementard y Hernandina, ampliando el mercado varietal de las Clementinas (Figura III-22).

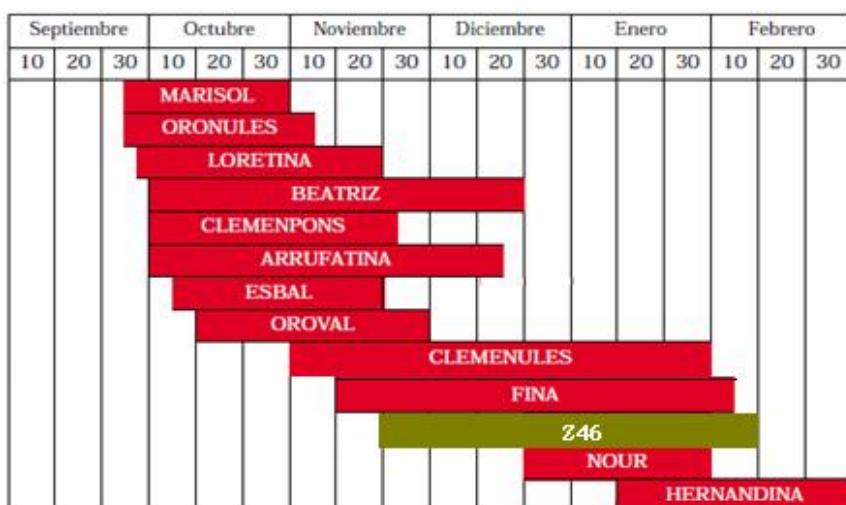


Figura III-22: Cuadro de los periodos de recolección de Clementinas en la Comunidad Valenciana (■) y del periodo estimado para el genotipo Z46 (■).

A diferencia de las Clementinas con las que solapa, no es un genotipo propenso al bufado, característica que lo diferencia y a destacar por ser un parámetro apreciado por el consumidor. Por otro lado, las características organolépticas del fruto son similares a Clementina de Nules: con una buena proporción de SST y acidez, estando dentro de la zona aceptable del diagrama de lengua del sabor de los cítricos desde noviembre a febrero. El fruto es de fácil pelado siendo la pulpa fundente y no presentó vecería durante las

diferentes campañas. Finalmente, podría ser considerada una variedad que abarcaría periodos de recolección de variedades precoces como Beatriz o Arrufatina y de variedades tardías como Nour o Hernandina.

III.3.3.2. D11

El genotipo D11 está situado en la parcela B de la estación del I.V.I.A. en Moncada. Procede de la irradiación de yemas de Clementina de Nules con neutrones rápidos a la dosis de 6 Gy.



Figura III-23: Vista en planta de un fruto del genotipo D11 (izquierda) y un fruto de Clementina de Nules (derecha) en octubre.



Figura III-24: Vista frontal de un fruto del genotipo D11 (izquierda) y un fruto de Clementina de Nules (derecha) en octubre.

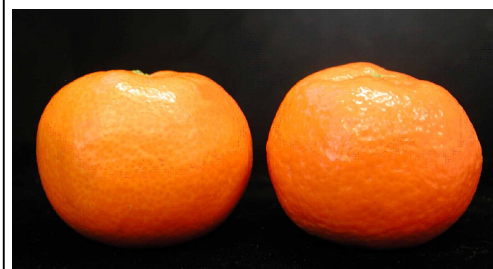


Figura III-25: Vista frontal de un fruto del genotipo D11 (izquierda) y un fruto de Clementina de Nules (derecha) en enero.



Figura III-26: Corte transversal de un fruto del genotipo D11 (izquierda) y un fruto de Clementina de Nules (derecha) en enero.

La morfología del fruto, caracterizada por el **peso**, el **diámetro** y la **altura** media por fruto no mostró diferencias significativas ($P < 0.05$) comparada con su control (ver Anexo II, D11), siendo el aspecto del fruto similar al control tal y como puede observarse en las Figuras III-23, III-24, III-25 y III-26. Las medidas de **SST** ($^{\circ}$ Brix) del zumo del genotipo D11 no indicaron diferencias

estables en comparación con su control durante los diferentes muestreos realizados a lo largo de 4 años. La madurez interna de los frutos tampoco presentó diferencias significativas ($P < 0.05$) comparándolo con su control a excepción de la medida realizada el primer año de muestreo (ver Anexo II, D11).

Sin embargo, **la acidez** del zumo del genotipo D11 fue inferior con una probabilidad superior al 95% en los 4 años, siendo de: 8.23 g/l, frente a los 11.33 g/l del control en el 2004, 8.36 g/l respecto a 9.90 g/l del control en 2005, 8.44 g/l frente a 11.30 g/l del control en 2007 y 8.06 g/l respecto a los 14.34 g/l del control en 2008 (Figura III-27).

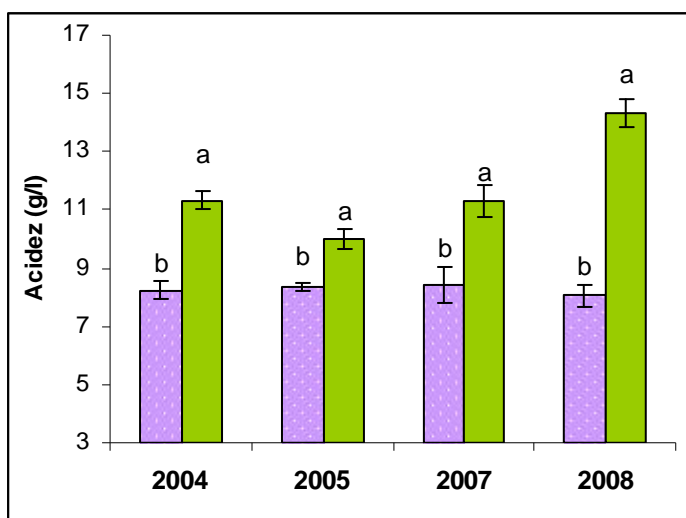


Figura III-27: Acidez (g/l) del zumo del genotipo D11 (■) y su control (■) en noviembre del 2004, noviembre del 2005, diciembre del 2007 y noviembre del 2008. Letras diferentes indican diferencias significativas; comparación por año ($\mu \pm$ E.S, $P < 0.05$, $n \geq 3$).

Durante el periodo de maduración de una campaña de Clementina de Nules (septiembre a noviembre) se evaluó la

evolución de los parámetros de **maduración interna** en el genotipo D11 y su control, no observándose diferencias significativas en los SST (°Brix) o el IM del fruto.

Sin embargo, **la acidez** del zumo fue menor significativamente ($P<0.05$) siendo de 17.77 g/l, 11.55 g/l y 8.6 g/l en el genotipo D11 frente a los 27.42 g/l, 14.05 g/l y 9.99 g/l de su control en los muestreos de septiembre, octubre y noviembre respectivamente observándose que las diferencias de acidez iban disminuyendo a lo largo del tiempo (Figura III-28).

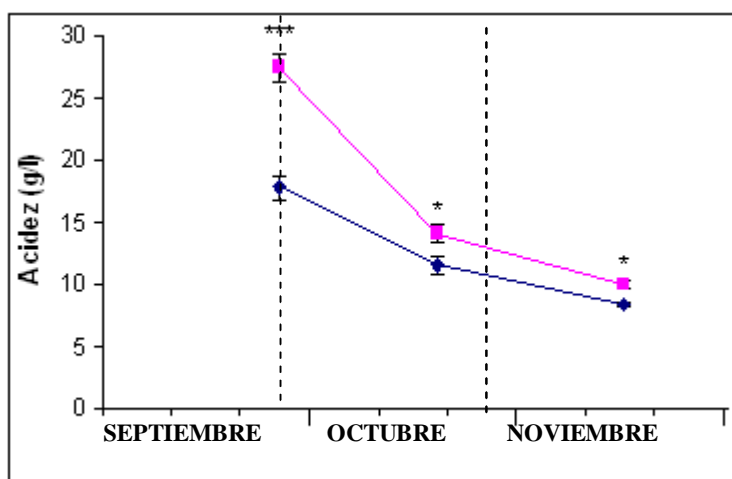


Figura III-28: Acidez (g/l) del zumo del genotipo D11 (—◆—) y su control (—■—) en septiembre, octubre y noviembre. Diferencias estadísticas: **comparación por fecha** ($\mu \pm E.S$, $P<0.001$ (***) , $P<0.05$ (*), $n\geq 3$).

El menor contenido en ácidos del zumo en el genotipo D11 posibilita de esta manera la recolección de los frutos a principios de octubre, unas dos semanas antes del periodo de recolección de Clementina de Nules. Como las diferencias en la acidez van disminuyendo a lo largo del tiempo sin variar el IM, su periodo de recolección se mantendría hasta finales de noviembre, sin presentar problemas de sobremaduración como el bufado. Esto

puede observarse en un corte transversal de un fruto del D11 frente a un fruto de Clementina de Nules incluso un mes después del periodo de recolección de Clementina de Nules, en enero (Figura III-26).

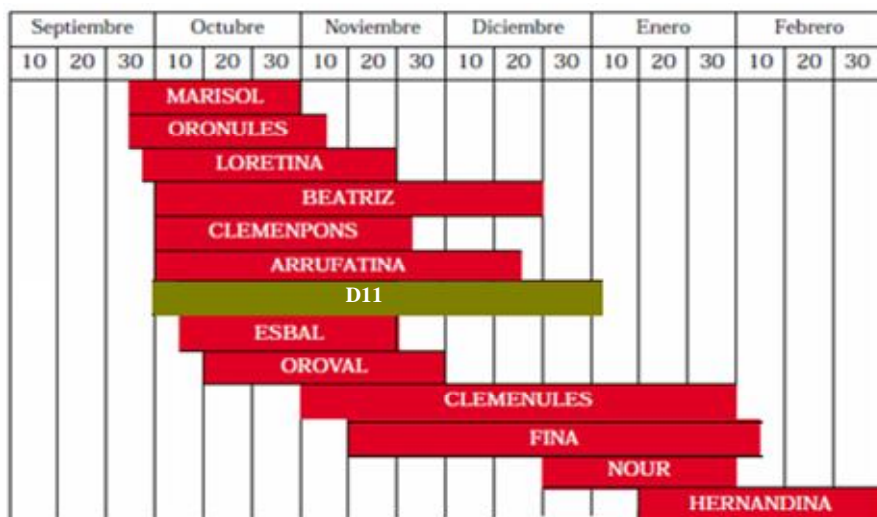


Figura III-29: Cuadro de los periodos de recolección de Clementinas en la Comunidad Valenciana (■) y del periodo estimado para el genotipo D11(■).

En conclusión el genotipo D11 presenta un sabor más dulce que Clementina de Nules debido a su menor acidez del zumo. El mutante D11 se caracteriza por presentar una acidez del zumo inferior a su parental, sin observarse diferencias significativas ($P < 0.05$) en los demás valores fenotípicos estudiados. Por tanto, es un genotipo interesante para ser empleado en otros estudios como los de transcriptoma ya que los datos de expresión que se obtengan deben estar relacionados en gran medida con las rutas implicadas en el metabolismo de los ácidos: su degradación, síntesis y/o acumulación.

III.3.3.3. I09

El genotipo I09 está situado en la parcela B de la estación del I.V.I.A. en Moncada. Procede de la irradiación de yemas de Clementina de Nules con rayos gamma (Co^{60}) a la dosis de 50 Gy.

El tamaño del fruto del genotipo I09 fue similar a Clementina de Nules. El **peso** medio de los frutos no mostró diferencias respecto al control con una probabilidad superior al 95% en los muestreos realizados en noviembre del 2004, octubre del 2005, octubre del 2006 y noviembre del 2007. Paralelamente, ni el **diámetro** ni la **altura** media del fruto del genotipo I09 mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) en estos 4 años (ver Anexo II, I09). El tamaño y apariencia interna de los frutos pueden observarse en las Figuras III-30 y III-31.

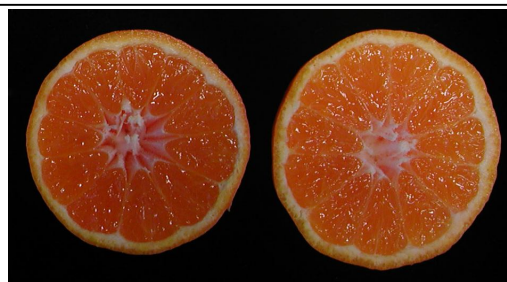


Figura 30: Corte transversal de un fruto del genotipo I09 (izquierda) y un fruto de Clementina de Nules (derecha) en noviembre.



Figura 31: Vista en planta de un fruto del genotipo I09 (izquierda) y un fruto de Clementina de Nules (derecha) en octubre.

El genotipo I09 presentó un **índice de madurez interno** del fruto respecto al control entre un 14.87% y un 26.73% inferior significativamente ($P < 0.05$) respecto al control. Tuvo un IM de 7.81 frente a 10.66 del control en noviembre del 2004, 6.44 respecto a 9.20 en octubre del 2005, 5.69 frente a 6.68 en octubre del 2006 y

10.76 respecto a 13.52 en noviembre del 2007 (Figura III-32). Sin embargo, estas diferencias en el índice de madurez interno no fueron acompañadas con diferencias en **el índice de color externo** del fruto; como ejemplo en noviembre del 2007, donde el **IM** del genotipo I09 resultó un 20.47% inferior respecto al control, el ICC no mostró diferencias significativas ($P < 0.05$) (ver Anexo II, I09) indicando un retraso en la maduración interna pero no externa de sus frutos.

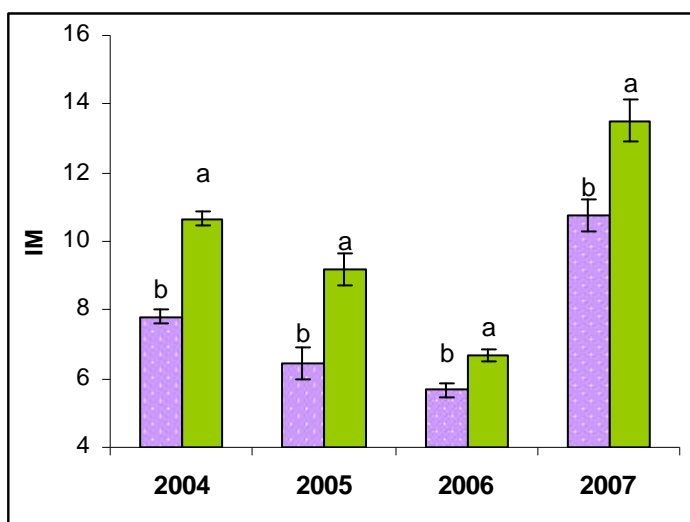


Figura III-32. IM del genotipo I09 (■) y su control (■) en 2004, 2005, 2006 y 2007. Comparación por año ($\mu \pm E.S.$, $P \geq 0.05$, $n \geq 3$).

El menor IM del genotipo I09 determina su periodo de recolección unas 2 semanas más tarde que el de Clementina de Nules, solapándose con Clementina de Nules, Clementina Fina y Nour, variedades propensas a fisiopatías del exocarpo como el bufado o el "pixat" (Soler 1999) que en el mutante I09 no se observaron.

De los parámetros que configuran el IM, el contenido en **sólidos solubles totales** del zumo no mostró diferencias significativas ($P<0.05$) entre el genotipo I09 y su control en los muestreos realizados (ver Anexo II, I09), mientras que el contenido en **la acidez** del zumo del genotipo I09 fue significativamente superior ($P<0.05$) en todos los muestreos realizados respecto al control, determinándose en noviembre del 2004 y octubre del 2005 un contenido en acidez de 15.32 g/l y 19.72 g/l, frente a los 11.28 g/l y 14.05 g/l del control. En octubre del 2006 y noviembre del 2007, comparándolo con un genotipo control procedente del mismo pie de árbol, la concentración de acidez en el zumo del fruto del genotipo I09 fue de 19.01 g/l y 10.94 g/l, frente a los 15.87 g/l y 8.60 g/l de su control con diferencias estadísticamente significativas ($P<0.05$) (Figura III-33).

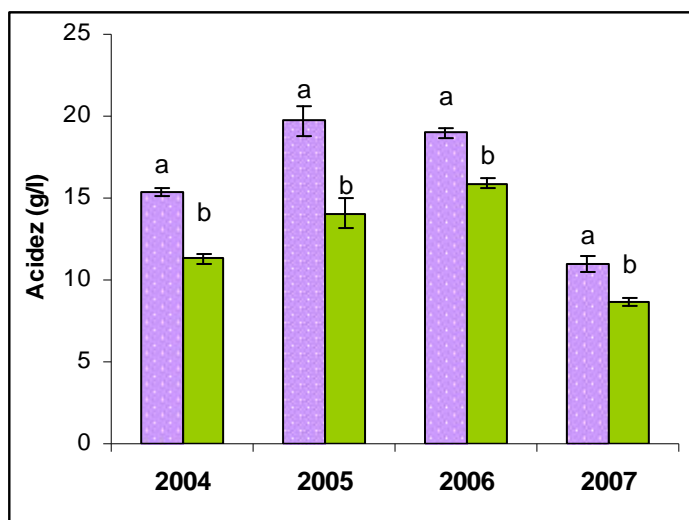


Figura III-33: Acidez (g/l) del zumo del genotipo I09 (■) y su control (■) en Noviembre del 2004, Octubre del 2005, Octubre del 2006 y noviembre del 2007. Letras diferentes indican diferencias **significativas comparación por año** ($\mu \pm E.S$, $P \geq 0.05$, $n \geq 3$).

La acidez del zumo del genotipo I09 a lo largo del periodo de maduración comprendido entre principios de septiembre del 2007 y principios de febrero del 2008, fue mayor significativamente ($P<0.05$) de septiembre a noviembre del 2007 respecto a Clementina de Nules. Estas diferencias fueron disminuyendo un 86.3%, 56.5% a 27.2% respectivamente durante los tres primeros muestreos hasta no presentar diferencias significativas (Figura III-34). En estadios más avanzados, considerados como sobremaduración en la Clementina de Nules (enero-febrero), la acidez, SST e IM así como la firmeza de los frutos de I09 no mostraron diferencias significativas ($P<0.05$) respecto al control (ver Anexo II, I09).

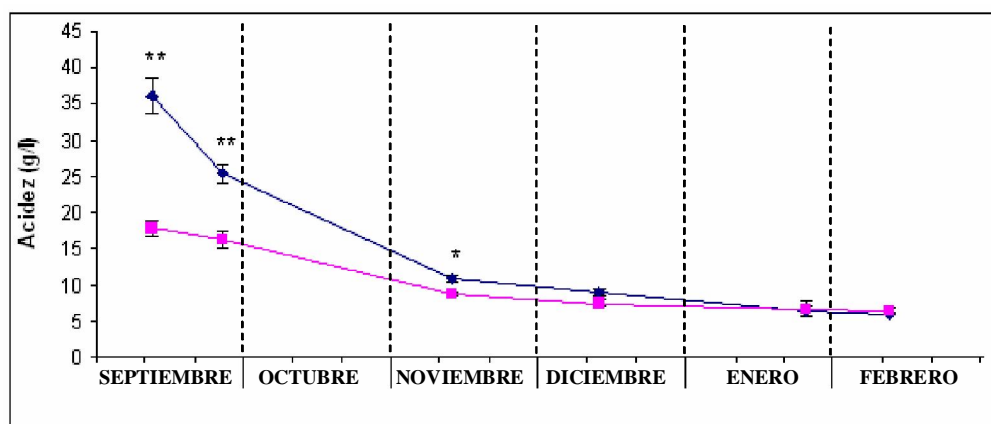


Figura III-34: Acidez del zumo del genotipo I09 (◆) y su control (■), en 6 fechas de muestreo independientes: 12 y 26 de septiembre, 12 de noviembre, 12 de diciembre, 23 de enero y 7 de febrero. Letras diferentes indican diferencias significativas comparación por fecha ($\mu \pm E.S$, $P < 0.01$ (), $P < 0.05$ (*) $n \geq 3$).**

Las variaciones en el IM y la acidez, sin variar los SST, determinan un fruto más ácido según la "lengua de Pritchett" (Souler y Grierson 1986), manteniéndose las demás características organolépticas similares a Clementina de Nules.

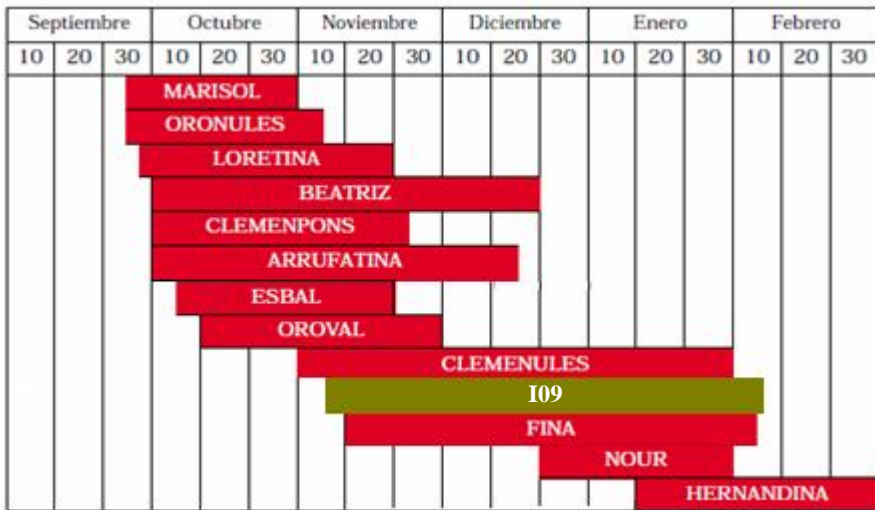


Figura III-35: Cuadro de los periodos de recolección de Clementinas en la Comunidad Valenciana (■) y del periodo estimado para el genotipo I09 (■).

Como conclusión de los resultados obtenidos se puede decir que el genotipo I09 se caracteriza por presentar una mayor acidez del zumo en el mismo periodo de recolección que su parental Clementina de Nules, si bien estas diferencias están más acusadas durante los primeros meses de maduración del fruto (septiembre a noviembre) indicando que este genotipo sintetiza y/o acumula más cantidad de ácidos orgánicos en el fruto. Los ácidos acumulados parece que son metabolizados a un ritmo superior a Clementina de Nules, puesto que estas diferencias van atenuándose a lo largo del periodo de maduración, hasta desaparecer. Por tanto, I09 puede considerarse una Clementina precoz, cuyo periodo de recolección solapa con las variedades precoces actuales, pero aportando características organolépticas del fruto diferentes con un sabor más ácido, ampliando así la gama varietal de Clementinas precoces existentes (Figura III-35). Finalmente, I09 es un genotipo que

presenta alteración en el parámetro de la acidez y el IM, manteniéndose todos los demás parámetros estudiados sin diferencias respecto a su parental, Clementina de Nules; por tanto es un genotipo interesante para su empleo en estudios más específicos como los análisis de transcriptoma mediante hibridaciones con micromatrices, ya que los cambios de expresión que se deriven de su estudio deben deberse principalmente a cambios en el genoma involucrados en el metabolismo de los ácidos principalmente.

III.3.3.4. H03.

El genotipo H03 está situado en la parcela B de la estación del I.V.I.A. en Moncada y procede de la irradiación de yemas de Clementina de Nules con rayos gamma (Co^{60}) a la dosis de 75 Gy. En época de sobremaduración de su parental Clementina de Nules (febrero), **la firmeza** del fruto del genotipo H03 tuvo una media de 6.23% no siendo significativamente diferente ($P=0.83$, $n=3$) de los 6.44% de Clementina de Nules. El tamaño del fruto fue similar a Clementina de Nules, no mostrando diferencias significativas ($P<0.05$) ni en **peso** ni en **diámetro** ni en **altura** del mismo (ver Anexo II, H03), siendo el aspecto del mismo similar al de Clementina de Nules (Figuras III-36, III-37, III-38 y III-39).



Figura III-36: Vista en planta de un fruto de H03 (izquierda) y de un fruto de Clementina de Nules (derecha) en Octubre.



Figura III-37: Vista frontal de un fruto del genotipo H03 (izquierda) y de un fruto de Clementina de Nules (derecha) en Octubre.



Figura III-38: Vista en planta de un fruto cortado ecuatorialmente de H03 (izquierda) y un fruto de Clementina de Nules (derecha) en Noviembre.



Figura III-39: Vista en planta de un fruto del genotipo H03 (izquierda) y de un fruto de Clementina de Nules (derecha) en Noviembre.

En cuanto a la **maduración interna** del fruto, el genotipo H03 no presentó diferencias significativas al 95% de probabilidad respecto al control en el IM, por tanto su periodo de recolección es el mismo que el determinado para Clementina de Nules. Sin embargo, el promedio de **sólidos solubles totales** del zumo analizados, fueron un 15.81%, 12.30%, 26.99% y 22.00% menores significativamente al control en noviembre del 2004, noviembre del 2005, diciembre del 2006 y noviembre del 2008 respectivamente (Figura III-40).

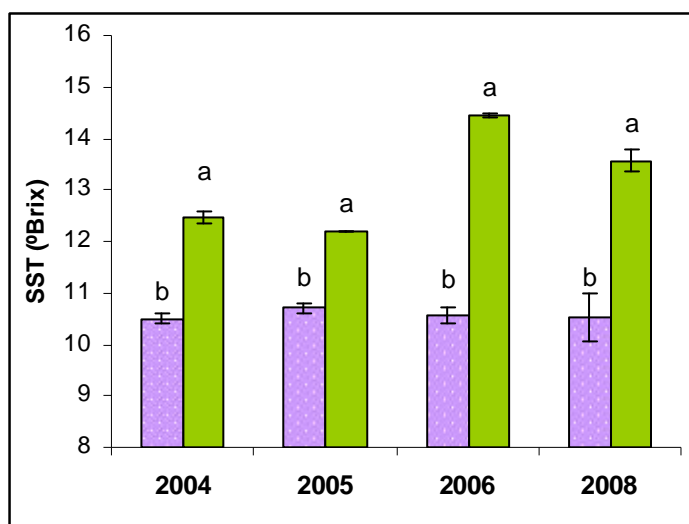


Figura III-40: SST (°Brix) del zumo del genotipo H03 (■) y su control (■), en noviembre del 2004, noviembre del 2005, diciembre del 2006 y noviembre del 2008. Letras diferentes indican diferencias **significativas comparación por año** ($\mu \pm$ E.S, $P < 0.05$, $n \geq 3$).

La **acidez** del zumo del genotipo H03 fue menor significativamente ($P < 0.05$) con 8.88 g/l frente a los 11.54 g/l del control en noviembre del 2004, 7.85 g/l de H03 respecto a 9.66 g/l del control en noviembre del 2005; 7.69 g/l del H03 frente a 10.15

g/l del control en diciembre del 2006 y 8.10 g/l respecto a 9.55 g/l en noviembre del 2008 (Figura III-41). La menor diferencia existente en los muestreos realizados del genotipo H03 respecto al control fue del 15.19%.

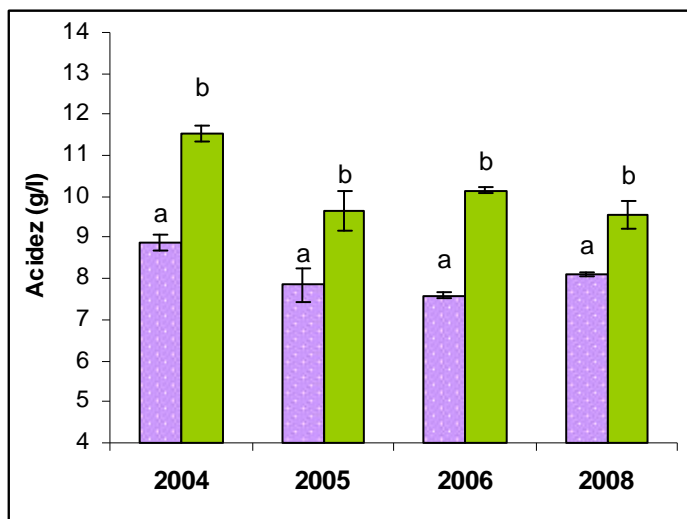


Figura III-41: Acidez (g/l) del zumo del genotipo H03 (■) y su control (■), en noviembre del 2004, noviembre del 2005, diciembre del 2006 y noviembre del 2008. Letras diferentes indican diferencias **significativas comparación por año** ($\mu \pm E.S$, $P < 0.05$, $n \geq 3$).

El balance entre los SST y el IM de los frutos del genotipo H03 da como resultado un sabor más dulce que el de Clementina de Nules, sin llegar a resultar un sabor acuoso-dulce a causa de la contribución de la acidez del zumo de manera proporcionada a los SST, manteniéndose las demás características organolépticas del fruto, como la fundencia del mismo o el aroma similar a su parental.

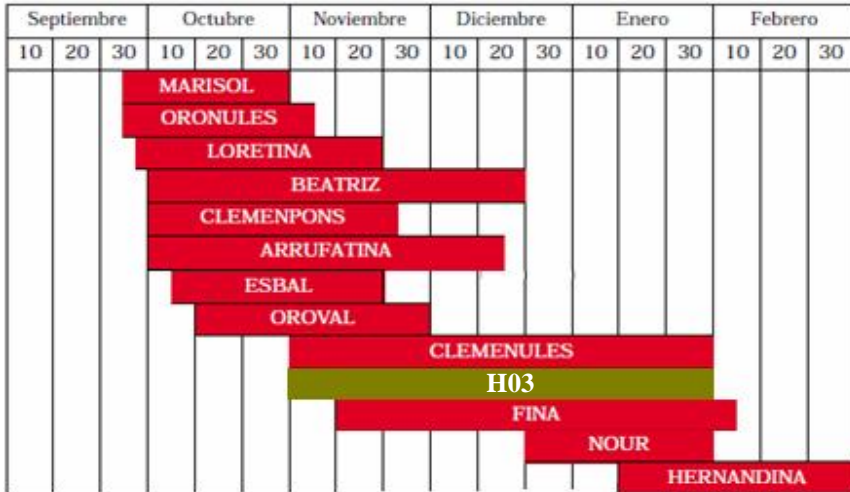


Figura III-42: Cuadro de los periodos de recolección de Clementinas en la Comunidad Valenciana (■) y del periodo estimado para el genotipo H03 (■).

En resumen, el mutante H03 tiene una menor concentración de SST y de acidez en el zumo aunque estas concentraciones parecen estar proporcionadas puesto que no se observan diferencias significativas ($P < 0.05$) en el índice de madurez interno respecto a su parental. Así pues, este genotipo resulta interesante para ser estudiado en profundidad en los estudios de transcriptoma. Las diferencias observadas en los parámetros SST y acidez del zumo deben estar causadas, al menos en parte, por diferencias de expresión génica de las rutas involucradas en la regulación de la maduración interna, ya que esos cambios han generado un genotipo con menor contenido en azúcares y ácidos, pero compensados. Finalmente, H03 puede considerarse una variedad precoz que solapa su periodo de recolección con su parental Clementina de Nules y con Clementina Fina y Nour. Se diferencia de éstas por tener un sabor más dulce que Clementina de Nules contribuyendo a la ampliación de la gama varietal existente de variedades de Clementinas (Figura III-42).

III.3.3.5. J59.

El genotipo J59 está situado en parcela C. Procede de la irradiación de yemas de la variedad Clementina de Nules con rayos gamma (Co^{60}) a la dosis de 50 Gy.

El tamaño de los frutos fue similar (Figuras III-43 y III-44) a Clementina de Nules, ya que los valores de **peso, diámetro y altura** del fruto no mostraron diferencias significativas ($P<0.05$) entre el genotipo J59 y el control en los muestreos realizados durante 4 campañas (ver Anexo II, J59).

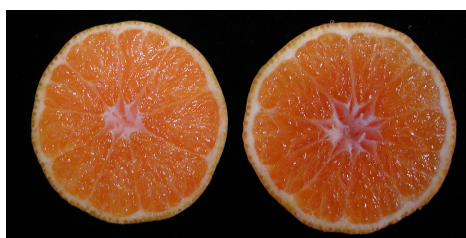


Figura III-43: Vista en planta de un fruto del genotipo J59 (izquierda) y un fruto de clementina de Nules (derecha) en noviembre.

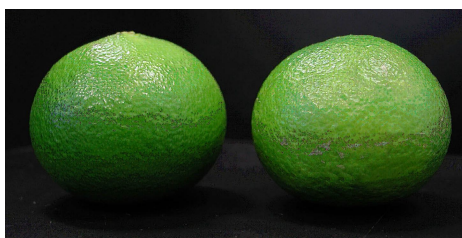


Figura III-44: Vista frontal de un fruto del genotipo J59 (izquierda) y un fruto de clementina de Nules (derecha) en octubre.

Los valores los **sólidos solubles totales** no mostraron diferencias significativas ($P<0.05$) en los muestreos realizados durante 4 campañas (ver Anexo II, J59). Sin embargo, el genotipo J59 mostró un valor de **acidez** del zumo un 26.13% inferior de media respecto al control, presentando valores inferiores significativamente ($P<0.05$) con 4.84 g/l, 7.04 g/l, 6.70 g/l y 5.02 g/l del genotipos J59 frente a los 7.17 g/l, 8.98 g/l, 7.83 g/l y 7.84 g/l del control en diciembre del 2004, noviembre del 2005, noviembre del 2006 y noviembre del 2007 respectivamente (Figura III-45). Al no presentar variaciones en los SST, J59 es una

Clementina con un sabor menos ácido que Clementina de Nules, manteniendo las demás características organolépticas similares.

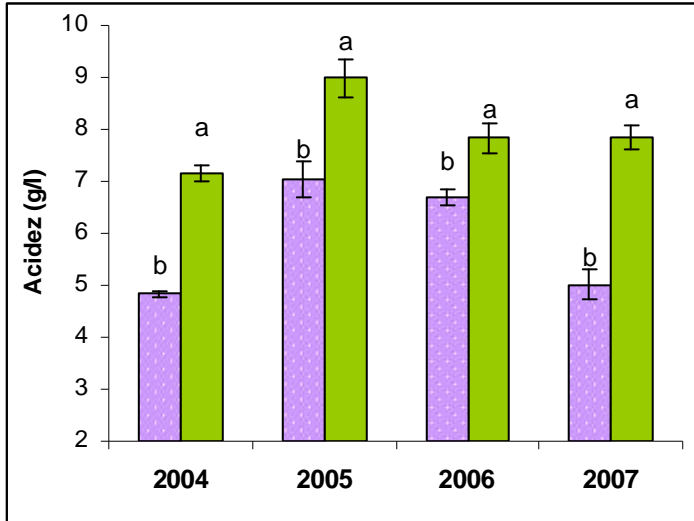


Figura III-45: Acidez (g/l) del zumo del genotipo J59 (■) y su control (■), en noviembre del 2004, noviembre del 2005, octubre del 2006 y noviembre del 2007. Letras diferentes indican diferencias **significativas comparación por año ($\mu \pm E.S$, $P<0.05$, $n\geq 3$).**

La **acidez** del zumo de los frutos del genotipo J59 a lo largo del periodo de maduración comprendido entre los meses de septiembre a diciembre fue un 18,45%, 20,95%, 14,55% y un 28,56% inferior significativamente ($P<0,05$) respecto a su control (Figura III-46), teniendo J59 en septiembre valores de acidez similares a su control de octubre. A diferencia de las observaciones realizadas en el genotipo I09 caracterizado por un mayor contenido en ácidos en el fruto y donde el descenso de septiembre a octubre era acusado, el descenso en el contenido de ácidos en el zumo de J59 fue prácticamente paralelo a Clementina de Nules, lo cual sugiere que, en principio, los procesos de síntesis o acumulación de ácidos en el fruto del genotipo J59 deben estar modificados en

mayor medida que los procesos de degradación de los mismos comparándolos con Clementina de Nules.

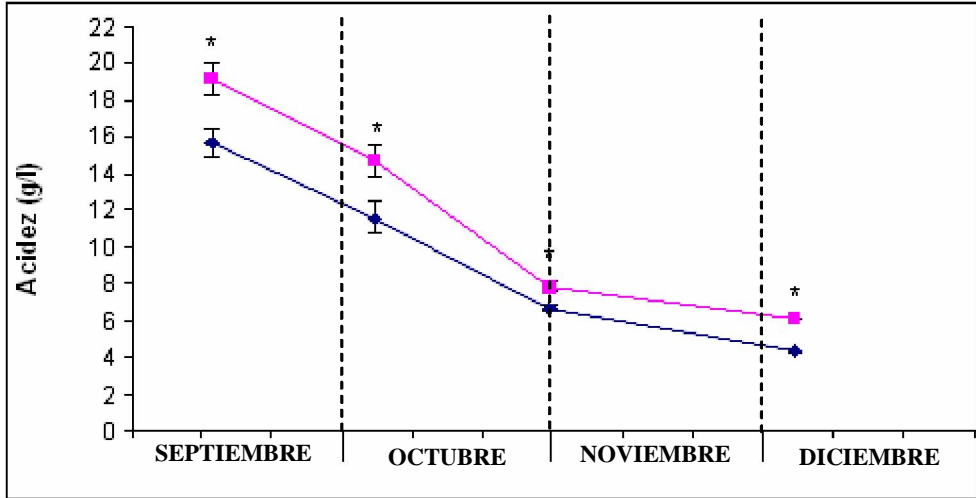


Figura III-46: Acidez del zumo del genotipo J59 (—◆—) y su control (—■—), en 4 fechas de muestreo independientes. **Comparación por fecha ($\mu \pm E.S$, $P < 0.05$ (*), $n \geq 3$)**

El índice de madurez interna del genotipo J59 fue mayor significativamente en los muestreos realizados en un 43.62%, 26.76%, 19.41% y 68.79% respecto a su control en los meses de noviembre de los años: 2004, 2005, 2006 y 2007 (Figura III-48).

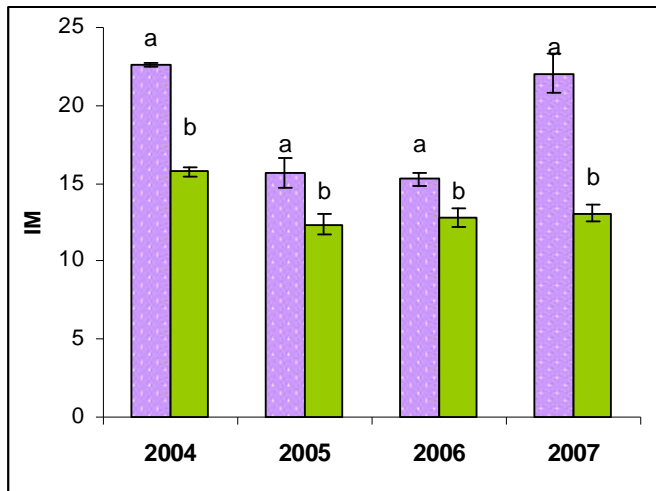


Figura III-48: Índice de madurez interno del fruto del genotipo J59 (■) y su control (■), en noviembre del 2004, noviembre del 2005, Noviembre del 2006 y noviembre del 2008. Letras diferentes indican diferencias significativas **comparación por año ($\mu \pm E.S$, $P < 0.05$, $n \geq 3$)**.

El contenido en ácidos en los frutos de J59 resultó más semejante a los valores de acidez de variedades de Clementina extratempranas como Clemenpons o Loretina donde en septiembre presentan valores de 17,40 g/l y 15, g/l respectivamente, similares a los 15,65 g/l de J59 (www.ivia.es/sdt). Por tanto, el mutante J59 podría ser así recolectado aproximadamente un mes anterior al periodo de recolección de su parental Clementina de Nules y entrando así dentro del periodo de recolección de las variedades extratempranas, ampliando la gama varietal (Figura III-47).

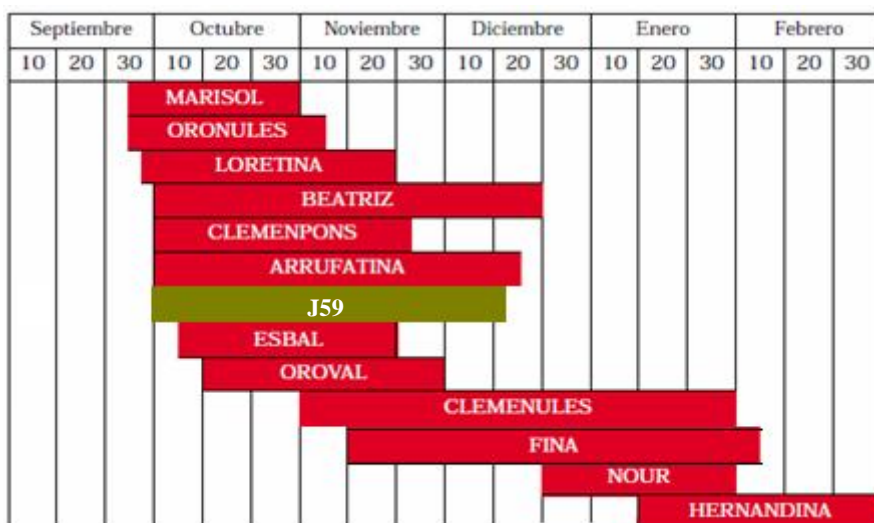


Figura III-47: Cuadro de los periodos de recolección de Clementinas en la Comunidad Valenciana (■) y del periodo estimado para el genotipo J59 (■).

En conclusión el genotipo J59 puede considerarse una variedad de Clementina cuyo periodo de recolección solapa parcialmente con el de las variedades muy precoces actuales: Marisol, Oronules, Loretina, Beatriz, Clemenpons y Arrufatina y con parte del periodo de recolección de las variedades precoces: Esbal, Oroval, Clementina de Nules y Clementina Fina pudiendo ser

recolectada a principios de octubre y sin presentar problemas de bufado. La característica más destacable de J59 es una acidez del zumo inferior a su parental. En consecuencia el sabor del fruto es más dulce que el de Clementina de Nules, manteniendo las demás características organolépticas sin diferencias. Por ello, resulta interesante como una nueva Clementina que ampliaría la gama varietal existente de Clementinas precoces. No se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) en los demás valores fenotípicos estudiados, por tanto es un genotipo altamente interesante para ser empleado en estudios de transcriptoma puesto que los datos que se obtengan de expresión deben estar relacionados en gran medida con las rutas implicadas en el metabolismo de los ácidos: su degradación, síntesis y/o acumulación.

Este trabajo ha permitido la identificación de mutantes de Clementina con alteraciones en parámetros relevantes en la maduración de los frutos (Z46, D11, I09, H03 y J59). Estos genotipos pueden ser empleados con una doble finalidad. Por un lado son un material vegetal muy interesante a utilizar en estudios de expresión génica por aportar una amplia variación fenotípica en la acidez y en los SST. Permiten estudiar genes que estén relacionados con los parámetros de SST, acidez y maduración interna ya que en general, presentan alteraciones solo en alguno de estos parámetros, pudiéndose obtener una relación relativamente directa entre la expresión génica y el fenotipo. Por otro lado son Clementinas que ampliarían el cuadro varietal de Clementinas existente tanto en características organolépticas como en el periodo de recolección (Figura III-49). No obstante los genotipos estudiados

III.4. Conclusiones.

- Se han caracterizado cinco genotipos de Clementina con los códigos: Z46, D11, I09, H03 y J59 con alteraciones en la maduración de sus frutos.
- Los frutos del genotipo Z46 presentan, respecto a Clementina de Nules, una morfología más redondeada, ya que tienen un diámetro menor, aunque su altura no difiere respecto a Clementina de Nules. En época de sobremaduración, el mutante Z46 es más firme que Clementina de Nules. Los tres parámetros de la maduración del fruto difieren de Clementina de Nules, presentando un contenido en sólidos solubles totales mayor, un índice de madurez interna y externa menor y la acidez del zumo mayor. Los parámetros de maduración son los que mayores diferencias muestran respecto a Clementina de Nules.
- Los frutos del genotipo D11 tienen un menor contenido en ácidos respecto a los de Clementina de Nules, manteniendo los demás parámetros de maduración sin diferencias significativas.
- Los frutos del genotipo I09 son semejantes en peso, diámetro, altura, grados Brix del zumo e índice de color externo del fruto a los de Clementina de Nules. Su contenido en ácidos es mayor y su índice de madurez interna menor hasta noviembre. A lo largo del periodo de maduración las diferencias en la acidez van disminuyendo.

- Los frutos del genotipo H03 presentan, respecto a Clementina de Nules una acidez y una concentración de sólidos solubles totales menor, siendo su índice de maurez interno similar.
- Los frutos del genotipo J59 se caracterizan por tener un menor contenido de acidez y una mayor maduración interna respecto a los de Clementina de Nules, aunque los grados Brix, el peso, diámetro y altura del fruto no varían.

IV. Análisis de los cambios en el transcriptoma de cinco nuevos genotipos de Clementina durante la maduración interna del fruto.

IV. Análisis de los cambios en el transcriptoma de cinco nuevos genotipos de Clementina durante la maduración interna del fruto.

IV.1. Introducción

El estudio de los procesos biológicos con interés agronómico derivados de la utilización de la mutagénesis requiere herramientas eficaces y capaces de abarcar el mayor número posible de procesos fisiológicos y metabólicos. El Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) en colaboración con el Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP) y financiado por la Conselleria de Agricultura, Pesca y Alimentación desarrollaron en el marco del Consorcio de Genómica Funcional de Cítricos (CFGP) un proyecto para desarrollar herramientas genómicas para la mejora tanto de patrones como de variedades de cítricos, poniendo especial énfasis en los aspectos relacionados con los procesos productivos y de calidad de los frutos.

Para el desarrollo de estas herramientas en los últimos años se generaron colecciones de ESTs (*Expressed Sequence Tags*) a partir de clones procedentes de un total de 52 genotecas de cDNA. En aquellos organismos donde no se ha secuenciado el genoma completo, el análisis de ESTs puede ser una vía para obtener información sobre los genes, proteínas y rutas metabólicas de dicho organismo. Para que la colección de ESTs fuera lo más representativa posible, las genotecas fueron construidas a partir de un rango de tejidos lo más variado posible, utilizándose diferentes tejidos procedentes de varias especies de cítricos en diferentes estados de desarrollo y bajo diversas condiciones de estrés (Forment y cols 2005; Terol y cols 2007). El número total de clones obtenidos a partir de las 52 genotecas del CFGP fue de 91138 que generaron

85.965 ESTs que tras su ensamblaje se produjeron 15700 *singletons* y 11844 *contigs*, dando un total de 27.551 posibles unigenes (Talón y Gmitter 2008). Los clones de la colección se emplearon para la construcción de micromatrices de cDNA, herramienta que permite el estudio de la expresión de miles de genes a la vez en un solo experimento. El número de clones presentes en la micromatriz de cDNA de cítricos fue ampliándose, construyéndose una primera micromatriz de 6875 posibles unigenes (micromatriz de 7K) y posteriormente una micromatriz de 21081 unigenes (micromatriz de 20K). Recientemente, estas micromatrices de cítricos han sido empleadas para definir los perfiles de expresión de los cítricos en diferentes procesos como la abscisión (Agustí y cols 2008; Agustí y cols 2009), la respuesta a estrés (Brumós y cols 2009) o el desarrollo y maduración del fruto (Cercós y cols 2006). Asimismo, su uso ha permitido la identificación de genes implicados en diferentes procesos fisiológicos como es el cambio de color del fruto (Ríos y cols 2010) y la caracterización de mutantes de cítricos (Alós y cols 2008).

En este capítulo se ha realizado un estudio transcriptómico de los genes que están relacionados con los parámetros de maduración interna; sólidos solubles totales, acidez y de las rutas alteradas. Este estudio se ha realizado en los cinco genotipos seleccionados en el capítulo anterior por presentar diferencias en alguno de estos parámetros. Además, se evaluó la concentración de los tres azúcares mayoritarios de los frutos cítricos: fructosa, glucosa y sacarosa (Agusti 2003; Tewari y cols 2008; Soler 2009) así como la concentración de los ácidos mayoritarios: ácido cítrico, ácido málico, ácido fumárico y ácido succínico (Karadeniz 2003).

IV.2. Metodología.

IV.2.1. Material vegetal.

En las hibridaciones de micromatrices de cDNA con mRNA se empleó la pulpa de los genotipos seleccionados en el capítulo III. Para cada genotipo se empleó al menos dos fechas de muestreo. Para cada fecha de muestreo se cogieron al menos tres frutos en diferentes momentos a lo largo del estadio II y III de la maduración del fruto. Los frutos fueron tomados al azar a partir de todas las orientaciones del árbol (norte, sur, este y oeste). De cada fruto recolectado, se aisló la pulpa de la corteza. La pulpa procedente de la mitad inferior del fruto, se trituró con nitrógeno líquido y se conservó a -80°C. De la parte superior de la pulpa del fruto se extrajo mediante procedimientos mecánicos el zumo y se conservó a -20°C hasta su uso. Las fechas de muestreo para cada genotipo considerando como 0 días después de anthesis (DDA) el 1 de abril, fueron:

- J59: octubre (200 DDA) y noviembre (225 DDA).
- Z46: octubre (200 DDA) y noviembre (225 DDA), 2 muestreos de noviembre correspondientes a dos años consecutivos.
- H03: septiembre (170 DDA) y noviembre (225 DDA).
- D11: septiembre (170 DDA) y noviembre (225 DDA).
- I09: septiembre (170 DDA) y octubre (200 DDA).

El conjunto de las muestras obtenidas proporcionó un material vegetal con una alta variabilidad fenotípica para los parámetros de maduración interna, acidez, sólidos solubles totales e IM. Esto permitió estudiar la expresión de los genes relacionados con los procesos biológicos de la maduración. Por otro lado, se

estudió la expresión génica de cada genotipo durante la maduración de sus frutos.

IV.2.2. Extracción de ARN.

La extracción de ARN de pulpa de los frutos fue realizada por el método descrito por Sambrook y cols (1989) con algunas modificaciones. A 2 g de pulpa triturada con nitrógeno líquido y conservada a -80°C , se añadió 2 ml de tampón de extracción TCES (0.2 M Tris pH=8.0, 0.2 M NaCl, 50 mM EDTA, 2%SDS), 2 ml de fenol y 0.04 ml de β -mercaptoetanol, mezclándolos mediante vortex. La mezcla se incubó a 50°C durante 5 min. Se centrifugó a 4000 rpm durante 30 min a 4°C y al sobrenadante se le añadió 1 volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Se volvió a agitar con vortex y se centrifugó a 4000 rpm durante 30 min a 4°C . Al sobrenadante se le añadió 0.5 volúmenes de LiCl 6M y el ARN se dejó precipitar a -20°C durante 24 horas. Tras la precipitación se centrifugó a 12000 rpm durante 30 min a 4°C . A continuación se eliminó el sobrenadante. El ARN obtenido se lavó con etanol 70% y se resuspendió en agua. Se purificó empleando el "RNeasy Plant Mini Kit" (Qiagen, Cat no: 74904) siguiendo las instrucciones del fabricante. El DNA contaminante se eliminó por tratamiento con DNasa I ("Rnase-free DNase set", Cat No 79254, Qiagen) en la columna de purificación.

La calidad del ARN se evaluó mediante espectrofotometría de UV (Nanodrop ND-100) y electroforesis en gel de agarosa (Sambrook y cols 1989).

IV.2.3. Cuantificación de RNAs mensajeros mediante análisis qRT-PCR.

La concentración de ARN de las muestras estudiadas se determinó mediante ensayos fluorométricos mediante el Kit “RiboGreen RNA Quantitation kit” (Molecular Probes, Ref. R11490) siguiendo el protocolo del fabricante y utilizando el fluorímetro Fluostar Galaxy de BMG Labtechnologies (Offernburg, Alemania). Se diseñaron oligos específicos de 10 secuencias de la micromatriz de 20K empleando el software Primer3 (Rozen and Skaletsky 2000) (frodo.wi.mit.edu/). El tamaño de fragmentos amplificados fue entre 50 y 150 pb (Tabla IV-1).

Tabla IV-1: Oligonucleótidos utilizados como cebadores para la RT-PCR a tiempo real

Spot micromatriz 20K	Orientación del oligonucleótido	Secuencia del oligonucleótido	Tamaño del amplicón
341007	F	5'-AGCTCACGTTCCCTGTCAGT-3'	52
	R	5'-GCAGAAGACGCTAAGGGTTG-3'	
110517	F	5'-AACCTGTCTCACGACGGTCT-3'	101
	R	5'-TCGGCTCTTCTATCATTGC-3'	
120208	F	5'-TCGAGACGCCATTAAAGAC-3'	65
	R	5'-CACAACTCCTTCGAGCTTCC-3'	
251501	F	5'-TCCAGCATCAGAGACTGCAT-3'	127
	R	5'-GTAAGGCTTGTCGCTGAG-3'	
232103	F	5'-CTCTCTGATCATCGGCCTGT-3'	95
	R	5'-GCAGAGCTGACATTGAGTGC-3'	
102012	F	5'-GGACAATGAGGGCAAGACTC-3'	101
	R	5'-CTCTCCGCTGCTTCTACT-3'	
111805	F	5'-TCCAAATCTTCGCCGTTTAC-3'	135
	R	5'-GCTTCACTATCGGCTTCGAC-3'	
151101	F	5'-CAAGATTGGCAAGGACAACA-3'	109
	R	5'-TTCCCAAACCACTCACG-3'	
150215	F	5'-AAGCCGAAGGGTAATTGAT-3'	200
	R	5'-CGCAGTAGGACCCTCGTTTA-3'	
081721	F	5'-TTGCAGCTCCCTCTTATCGT-3'	168
	R	5'-CTTGCGTCTGGATAGCGAAT-3'	

El análisis de expresión de los genes se realizó mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real en un solo paso, sobre diferentes

tejidos de Clementina (pulpa y flavedo de fruto maduro, floema de ramas de 3 años y hoja adulta de 1 año). El análisis de PCR cuantitativa a tiempo real se realizó con un instrumento LightCycler 2.0 de Roche (Penzberg, Alemania) equipado con el software LightCycler versión 4.0. La mezcla de la reacción se realizó siguiendo las recomendaciones del kit "FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I" de Roche (Ref. 03515885001) mezclando 62.5 ng de ARN total, 1 unidad de *RNase Inhibitor* (Applied Biosystems MP3247), 2.5 unidades de *MultiScribe Reverse Transcriptase* (Applied Biosystems LP0571), 2 μ l de *LC Fast-Start DNA Master PLUS SYBR Green I* (Roche, Ref. 03515885001) y 0.5 μ l de cada solución de oligonucleótidos específicos de cada gen a 5 μ M en un volumen total de 10 μ l. La retrotranscripción se realizó mediante una incubación de 48°C durante 30 minutos. A continuación se desnaturalizó el ADN a 95°C durante 10 minutos. Se amplificó posteriormente mediante 45 ciclos de polimerización en cadena (PCR): 95°C durante 20 segundos, a una temperatura específica para cada gen (generalmente a 60°C) durante 10 segundos y a 72°C durante 15 segundos. Los valores de intensidad de la fluorescencia fueron adquiridos durante los pasos de extensión a 72°C. Mediante curvas de desnaturalización tras la amplificación se evaluó la especificidad de la reacción. Se prepararon curvas de calibrado utilizando diluciones decimales seriadas de una de las muestras de ARN para convertir en niveles relativos de mARN las medidas de intensidad de fluorescencia. La normalización de los niveles de mARN se realizó frente a la concentración de ARN total medida mediante fluorimetría con RiboGreen (Molecular Probes) obteniéndose datos altamente reproducibles tal y como se ha realizado en estudios previos

(Bustin 2002; Hashimoto y cols 2004). La especificidad de la reacción de amplificación fue testada por secuenciación del producto de reacción.

IV.2.4. Hibridación de micromatrices de cDNA con mRNA.

Se emplearon las micromatrices específicas de cítricos generadas por el Consorcio de Genómica Funcional de Cítricos (CFGP) de 7K (primera generación) y 20K (segunda generación).

De cada genotipo se realizaron al menos dos hibridaciones con réplicas biológicas independientes por fecha, empleándose como muestra control frutos de Clementina de Nules en la misma fecha de muestreo que los genotipos.

IV.2.4.1. Marcaje con fluoróforos.

A partir de 2 μg de ARN extraído tal y como se indica en el punto IV.2.3. se amplificó el mRNA mediante el kit "AminoAllyl MessageAmp II aRNA kit" (Ambion, Cat#AM1753) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez, obtenido el aRNA, se llevaron 5 μg a sequedad y se resuspendieron en 4 μl de tampón 0.1 M Na_2CO_3 pH= 8.5. A esta suspensión se le añadieron 4 μl de solución del fluoróforo NHS-Cy3 o NHS-Cy5. Los fluoróforos Cyanine 3 (Cat No. PA23001, Amersham) o Cyanine 5 (Cat No. PA25001, Amersham) se resuspendieron previamente en 73 μl de dimetil sulfoxido (No. D818, Sigma). La solución de aRNA-tampón-fluoróforo se incubó 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Trascorrida la hora se purificó por columnas específicas de aRNA-marcado del kit "AminoAllyl MessageAmp II aRNA kit" (Ambion, Cat#AM1753). La cuantificación y el cálculo de la fracción de incorporación de cada fluoróforo se realizó midiendo la absorbancia

a 230, 260, 550 y 650 nm. En las hibridaciones se emplearon aquellas muestras cuya fracción de incorporación fue al menos de 50 moléculas de fluoróforo por kb.

IV.2.4.2. Hibridación de micromatrices de cDNA.

Las micromatrices empleadas requirieron una prehibridación en la cual se sumergieron durante 1 hora a 42°C en el tampón de prehibridación (SSC 5X, SDS 0.1%, BSA 1%). Se realizaron 3 lavados con agua-DEPC de 5 min a temperatura ambiente y se secaron mediante centrifugación durante 3 min a 300 rpm. Paralelamente, se mezclaron 100 pmol de cada pareja de muestras marcadas con fluoroforos diferentes para cada micromatriz y se concentraron hasta que el volumen fue de 9 µl. Se añadió 1 µl de *Fragmentation Reagent* (Cat#8740, Ambion) y la mezcla se incubó a 70°C durante 15 min, tras lo cual se añadió 1 µl de *Stop Solution* (Cat#9264G, Ambion). Se calentaron las muestras a 80°C, durante 2 min y se les añadieron 60 µl de tampón de hibridación (Formamida 50%, SSC 5X, SDS 0.1% y DNA de esperma de salmón 1 µg/ml). La mezcla resultante se depositó sobre la superficie de la micromatriz y se incubó durante 18h a 42°C protegida de la luz. A continuación se realizaron dos lavados de SSC 2X + SDS 0.1% a 42°C durante 5 min cada uno. En el primero se eliminó el cubre colocándolo hacia abajo y dejando que se deslizase sobre la micromatriz; 2 lavados durante 5 min cada uno de SSC 0.1X + SDS 0.1%; 5 lavados de 1 min cada uno de SSC 0.1X y un último lavado de 10 segundos de SSC 0.01X. La micromatriz se secó mediante centrifugación a 300 rpm durante 3 min a temperatura ambiente conservándose en ambiente seco y en oscuridad hasta su escaneo.

IV.2.4.3. Análisis y adquisición de datos.

Las micromatrices hibridadas se escanearon con un ScanArray Gx Microarray Scanner (PerkinElmer), obteniéndose un escaneado simultáneo de las dos longitudes de onda, 635 y 647 nm correspondientes a los dos fluoróforos empleados en la hibridación. Los valores de ganancia de los fotomultiplicadores se ajustaron de manera que la relación entre las intensidades totales de los dos canales se aproximó a 1. El escaneado se realizó con una resolución de 5 μm . Empleando el software GenePix Pro 6.1 (Axon Instruments) se tomaron como datos las medianas de las intensidades de los píxeles de los spots y del fondo para cada uno de los canales. Se calculó el ratio de expresión como la división de la señal del canal rojo entre el canal verde, obteniéndose esos valores de señal como el valor de intensidad de la sonda a la cual se le sustrae el valor de intensidad del fondo, definiéndose así el valor de M como el logaritmo en base dos del ratio de expresión ($M = \log_2 R/G$). Del total de spots, se eliminaron los spots no detectados por el lector, los que tenían defectos en la hibridación, los spots saturados y aquellos en los que el cociente entre la señal y el fondo fue menor de dos.

Los datos crudos se importaron al programa estadístico R (versión 2.13.0, <http://cran.es.r-project.org/>) donde se llevaron a cabo los análisis estadísticos. La identificación de las sondas que presentaron diferencias de expresión estadísticamente significativas entre las distintas muestras se realizó utilizando el programa Limma (Smith, 2005) utilizando principalmente la función *Print-tip Lowess* (Yang y cols 2002). Los P-valores asociados a los análisis estadísticos de expresión diferencial fueron corregidos por múltiples comparaciones utilizando el procedimiento de Benjamini y Hochberg para el reconocimiento de valores falsos (Reiner y cols 2003). Se consideraron diferencias significativas aquellas que tuvieron

asociado un *P*-valor inferior a 0,05 y cambios de expresión superiores al 25% ($M \geq |0,33|$).

IV.2.5. Micromatrices de 7 y 20 Ks.

Se emplearon los dos micromatrices de cDNA de cítricos: la primera micromatriz de 7000 unigenes (7K) y la última versión de 21081 unigenes (20K) (Martínez-Godoy MA y cols 2008) desarrollados por el Consorcio de Genómica de Cítricos (CFGP, <http://bioinfo.ibmcp.upv.es/>). En general, las secuencias de ESTs empleadas en cada uno de las micromatrices para un mismo gen no son las mismas, siendo más abundantes en el de 7K los oligos más cortos y cercanos al extremo terminal del gen y en el de 20K las de una longitud mayor, más homogéneas y suelen pertenecer a zonas tanto terminales como centrales del gen. Empleando estas dos herramientas se obtuvo un listado de genes relacionados con alteraciones de parámetros fisiológicos de acidez, sólidos solubles totales (°Brix) e IM.

Para ello, se calculó el coeficiente de correlación de Pearson entre el valor de expresión de cada gen (*M*) y el parámetro fisiológico correspondiente. El valor de expresión génica *M* se representó como el logaritmo en base 2 del ratio de intensidad entre el canal rojo (marcado para el mutante) y el canal verde (marcado para el control):

$$M = \log_2(\text{rojo/verde}).$$

El valor del parámetro fisiológico *F* fue calculado mediante la ecuación:

$$F = ((X_{\text{mutante}}/X_{\text{control}}) * 100) - 100$$

Donde *X* es el valor de cada parámetro en las unidades correspondientes: acidez (g/l), sólidos solubles totales (°Brix) e índice de madurez interna (IM).

Se calculó el estadístico "t" asociado a la correlación "r" entre M y F ($t=r(\text{raiz}((N-2)/(1-r^2)))$). El cálculo para determinar que el coeficiente de correlación de Pearson (r) era estadísticamente significativo fue la aplicación de un test basado en la distribución de la t de Student (Milton 2007).

El empleo de este método permitió la obtención de un listado de genes relacionados con los parámetros fisiológicos de acidez y °Brix, con gran relevancia al estar confirmados en dos tipos de micromatrices.

IV.2.6. Cuantificación de azúcares.

Se cuantificó la concentración de fructosa, glucosa, sacarosa e inositol en el zumo. El zumo fue extraído mediante métodos mecánicos y conservado a -20°C hasta el momento de su utilización. Se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min a 4°C y se filtró con filtros de Whatman de 0.2 µm. La separación y cuantificación de los azúcares mayoritarios en el zumo de los frutos cítricos: glucosa, fructosa y sacarosa (Agusti 2003; Tewari y cols 2008; Soler 2009) se realizó mediante un equipo HPLC (Waters) equipado con una columna para carbohidratos (4.6x256 mm, Waters Part. No. WAT044355) y un refractómetro diferencial 2410 (Waters). Para ello, de una mezcla de: zumo-agua-acetonitrilo (1:1:3) se inyectó 30 µl a flujo de 1.7 l/min. Se realizaron 2 réplicas técnicas de cada una de las 3 réplicas biológicas.

La cuantificación de otros azúcares minoritarios, como el inositol, se realizó empleando un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (Varian Saturn, 3 GC-MS). Para ello se evaporaron 10 µl de zumo previamente filtrado con un filtro de Watman de 0.22 µm. A continuación se le adicionó MH en exceso

(0.2 g de O-Methylhydroxylamine hydrochloride, Fluka no.6754, en 1 ml de piridina, Fluka no.82702) y se incubó la mezcla durante 45 min a 37°C en baño con agitación. La mezcla se evaporó a sequedad y se trimetilsililó añadiendo TMS (Supelco no 3.-3084 BSTFA kit). A la hora se inyectaron 2 µl de solución a través de una válvula estanca. La presión de entrada de helio fue de 85 Kpa y las temperaturas del inyector, la zona media y el espectrómetro de masas fueron de 250, 250 y 200°C, respectivamente. La cuantificación de los diferentes compuestos analizados se realizó mediante calibrado de los mismos con estándares internos.

IV.2.7. Cuantificación de ácidos orgánicos.

Se cuantificó la concentración de ácido cítrico, ácido málico y ácido isocítrico en el zumo mediante HPLC. El zumo extraído y conservado a -20°C, fue centrifugado a 12000 rpm durante 10 min a 4°C y filtrado con filtros Whatman de 0.2 µm. La separación y cuantificación de ácido cítrico, málico e isocítrico se realizó mediante cromatografía líquida empleando un cromatógrafo DIONEX ICS-2000 Ion Chromatography System. Se realizaron 2 réplicas técnicas por cada una de las 3 réplicas biológicas.

La separación y cuantificación de ácidos minoritarios: ácido fumárico y succínico, se realizó empleando un espectrómetro de gases acoplado a un espectrómetro de masas (Varian Saturn 3) tal y como se ha explicado en el apartado IV.2.5.

IV.3. Resultados y discusión.

IV.3.1. Validación mediante análisis qRT-PCR de los datos obtenidos en la hibridación.

Con el objetivo de confirmar y validar los resultados obtenidos tras los análisis de las micromatrices se determinó la abundancia del transcrito de 11 sondas (Anexo III). Mediante qRT-PCR se utilizó el ARN de las mismas muestras de pulpa y de control empleadas en las hibridaciones. Estos resultados se normalizaron y correlacionaron con los resultados de expresión de las micromatrices. Se obtuvo una regresión lineal con una R^2 de 0,91 mostrando una buena correlación entre ambas series de valores (Figura IV-1).

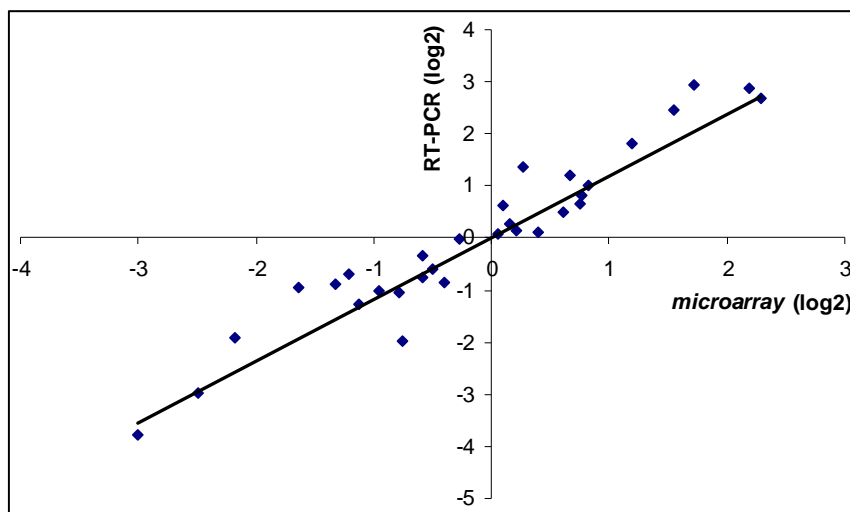


Figura IV-1: Correlación entre la expresión de muestras de los genotipos seleccionados y su control obtenida mediante qRT-PCR y micromatriz de ADNc.

IV.3.2. Análisis de la expresión génica

IV.3.2.1. Micromatriz de 7 y 20 Ks.

Se determinó la expresión génica en cinco genotipos (Z46, D11, I09, H03 y J59) en dos fechas (de septiembre a noviembre) con tres réplicas y se obtuvo una matriz de correlación con la acidez y otra con los sólidos solubles totales. Los sólidos solubles totales aumentan a lo largo de la maduración del fruto de los cítricos mientras que la acidez disminuye. Una correlación positiva entre la expresión de un gen y el °Brix significó una inducción de dicho gen durante la maduración y viceversa. Por el contrario, una correlación positiva entre la expresión de un gen y la acidez significó una represión de ese gen durante la maduración del fruto de los cítricos y viceversa.

De 12315 secuencias que conforman la micromatriz de primera generación (7k), correlacionaron significativamente ($P < 0.10$) un 12.59% con la acidez y un 7.62% con el °Brix. El porcentaje de secuencias de la micromatriz de segunda generación (20K) que correlacionaron significativamente ($P < 0.10$) fue del 3.5% para la acidez y un 1.2% con el °Brix. Se seleccionaron los genes con correlaciones significativas y comunes a ambas micromatrices. Por tanto, el número de genes obtenidos con el método 7K-20K estuvo limitado por el número existente de genes en la micromatriz de 7K. Así, se obtuvieron 17 genes correlacionados con el °Brix (Tabla IV-2) y 40 genes correlacionados con la acidez (Tabla IV-3).

IV.3.2.1.1. Sólidos solubles totales.

De los 17 genes que correlacionaron con el °Brix caben destacar dos genes relacionados con la pared celular, el ácido cafeico O-metiltransferasa (EC 2.1.1.68) implicada en la biosíntesis de lignina (Louie y cols 2010) y la proteína CER1, participante en la

biosíntesis de cera (Bourdenx y cols 2011) (Tabla IV-2). Otro gen muy interesante es NADP-isocitrato dehidrogenasa por intervenir en el metabolismo de ácidos orgánicos: tanto en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos como en la ruta de la degradación de citrato (Cercós y cols 2006). Su correlación positiva con el °Brix señaló una relación entre los azúcares y el metabolismo de los ácidos, estando inducido durante la maduración de los frutos cítricos.

Tabla IV-2: Genes anotados que mostraron correlación significativa al menos del 90% entre la expresión génica y el °Brix (r =coeficiente de correlación lineal). La expresión génica se estudió en 5 genotipos mutantes: Z46 (acidez y brix mayores), D11 (acidez menor), I09 (acidez mayor), H03 (acidez y brix menores) y J59 (acidez menor). Se utilizaron dos fechas y tres réplicas biológicas. Los genes considerados más relevantes están destacados en azul.

Anotación	20K		7K	
	r	p-value	r	p-value
Tubulin beta-2/beta-3 chain	0,7	0,05	0,59	0,05
putative glycosyltransferase	0,75	0,1	0,7	0,02
Caffeic acid O-methyltransferase	0,71	0,05	0,8	0,01
Adenosine kinase 2	0,99	0,05	0,59	0,05
NADP-dependent isocitrate dehydrogenase	0,89	0,01	0,8	0,01
strictosidine synthase family protein	0,66	0,1	0,63	0,05
glucose inhibited division protein A from prokaryotes	-0,99	0,1	-0,58	0,05
AAA-type ATPase family protein	-0,71	0,05	-0,55	0,1
Hypothetical protein	-0,71	0,05	-0,71	0,02
Early tobacco anther 1	-0,57	0,1	-0,61	0,05
calcium-binding EF hand family protein	-0,63	0,1	-0,67	0,02
RING-H2 zinc finger protein RHA2a	-0,74	0,1	-0,5	0,1
Homolog protein	-0,55	0,1	-0,65	0,05
Protein	-0,57	0,1	-0,68	0,02
Transcription elongation factor 1 homolog	-0,74	0,02	-0,62	0,05
CER1 protein	-0,64	0,05	-0,85	0,01
transcription factor S-II (TFIIS) domain	-0,65	0,05	-0,59	0,05

IV.3.2.1.2. Acidez del fruto.

De los 40 genes que correlacionaron con el parámetro de acidez (Tabla IV-3), fueron de mención aquellos que codifican para las proteínas con dominio NAC puesto que su expresión está relacionada con procesos de maduración de los frutos cítricos, UDP-glucosa dehidrogenasa (EC1.1.1.22) que interviene en el metabolismo de la sacarosa y fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK), todas ellas inducidas durante la maduración. La fosfoenolpiruvato carboxiquinasa resulta muy interesante ya que participa en varias rutas metabólicas como el metabolismo de los ácidos orgánicos (Ciclo de los ácidos tricarbóxicos) y el de los azúcares (glicólisis y/o gluconeogénesis), rutas claves en la maduración de los frutos cítricos (Blanke y Lenz 1989; Famiani y cols 2009).

Tabla IV-3: Genes anotados que mostraron una correlación significativa al menos del 90% entre la expresión génica y la acidez (r =coeficiente de correlación lineal). La expresión génica se estudió en 5 genotipos mutantes: Z46 (acidez y brix mayores), D11 (acidez menor), I09 (acidez mayor), H03 (acidez y brix menores) y J59 (acidez menor). Se utilizaron dos fechas y tres réplicas biológicas. Los genes considerados más relevantes están destacados en azul.

Anotación	20K		7K	
	r	p-value	r	p-value
N-acetyltransferase hookless1	-0,85	0,01	-0,51	0,10
alpha-expnasin precursor	0,69	0,10	0,54	0,10
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	-0,64	0,05	-0,52	0,10
(1-4)-beta-mannan endohydrolase precursor	-0,81	0,02	-0,55	0,10
UDP-glucose dehydrogenase	-0,76	0,02	-0,56	0,10
delta-8 sphingolipid desaturase	-0,88	0,01	-0,52	0,10
Protein	-1,00	0,05	-0,79	0,10
SNAP25 homologous protein SNAP33	-0,77	0,01	-0,59	0,05
Xyloglucan endotransglycosylase	-0,78	0,01	-0,51	0,10
Alcohol dehydrogenase	0,81	0,01	0,63	0,05
Phosphoenolpyruvate carboxykinase	-0,76	0,02	-0,53	0,10
Protein	0,70	0,10	0,72	0,02
glycine-rich protein-like	-0,71	0,05	-0,62	0,05

NAC2 domain protein	-0,68	0,05	-0,73	0,01
beta-glucanase	-0,85	0,01	-0,53	0,10
Tubulin alpha-2 chain	-0,73	0,05	-0,68	0,05
DNA binding protein	-0,82	0,05	-0,61	0,05
Initiation factor	0,73	0,05	0,72	0,01
f-box family protein	0,68	0,05	0,63	0,10
inositol-1,4,5-triphosphate-5-phosphatase	-0,97	0,01	-0,60	0,10
40s ribosomal protein S29	0,70	0,10	0,69	0,02
Protein	-0,76	0,02	-0,65	0,05
GEM	-1,00	0,05	-0,69	0,10
Calcium-dependent protein kinase 8	-0,95	0,01	-0,52	0,10
Cinnamyl-alcohol dehydrogenase	0,89	0,02	0,64	0,05
Chloroplast acetyl-CoA carboxylase carboxyltransferase	-0,64	0,05	-0,80	0,01
Kelch repeat containing protein	0,75	0,02	0,69	0,02
5'-3' exoribonuclease	-0,84	0,01	-0,54	0,10
Dehydrin	-0,70	0,05	-0,93	0,01
Vacuolar processing enzyme precursor	-0,87	0,01	-0,54	0,10
Conserved hypothetical protein	0,83	0,05	0,72	0,02
Heat shock protein 26	-0,86	0,05	-0,88	0,01
Sugar transporter	-0,77	0,01	-0,55	0,10
Protein	-0,72	0,10	-0,57	0,10
Protein	-0,96	0,05	-0,74	0,10
Pectinacylesterase precursor	-0,86	0,01	-0,87	0,01
Protein kinase	-0,91	0,01	-0,63	0,05
delta-cadinene synthase isozyme	-0,88	0,01	-0,82	0,01
Endomembrane associated protein	-0,84	0,05	-0,64	0,05
Cyclophilin	0,74	0,02	0,57	0,10

Los resultados anteriores mostraron que parece existir una relación entre el metabolismo de los azúcares y el de los ácidos ya que entre los genes que correlacionan con el °Brix, uno de ellos está implicado en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos y entre los genes que correlacionan con la acidez varios están relacionados con el metabolismo de los carbohidratos. Puesto que el número de genes compartidos por ambas micromatrices que en esencia corresponden a los mismos estuvo limitado por el número existente de genes en la micromatriz de 7K, se consideraron los genes que obtuvieron una mejor correlación con el °Brix y la acidez en las hibridaciones realizadas exclusivamente con la micromatriz de 20K.

IV.3.2.2. Micromatriz de 20K.

Empleando la micromatriz de 20K que contiene 21240 genes, se estudió el número de posibles genes implicados en el proceso de maduración interna de los frutos cítricos. Se correlacionó la expresión relativa de cada gen con los valores de acidez (g/l) y sólidos solubles totales (°Brix).

Los genotipos que se emplearon para el estudio tuvieron un mayor rango de variación en el parámetro de acidez (coeficiente de variación, CV=72) que en el °Brix (CV=13). Este mayor rango de variación en la acidez es coherente con el mayor número de genes correlacionados con la acidez que con el °Brix: 309 positivamente y 336 negativamente con el °Brix y 661 positivamente y 985 negativamente con la acidez (Figura IV-2 y IV-3).

Del total de ESTs que obtuvieron correlación positiva y negativa con la acidez un 62,94% y un 60,21% fueron secuencias anotadas, valores similares a los de °Brix con un 63,09% y 61,16% respectivamente. Estos valores muestran que aproximadamente un 40% de las secuencias que obtuvieron correlación con los parámetros de acidez y °Brix no se encuentran anotadas actualmente. Para facilitar el estudio de los genes relacionados con los parámetros de °Brix y acidez, éstos se han agrupado en apartados temáticos.

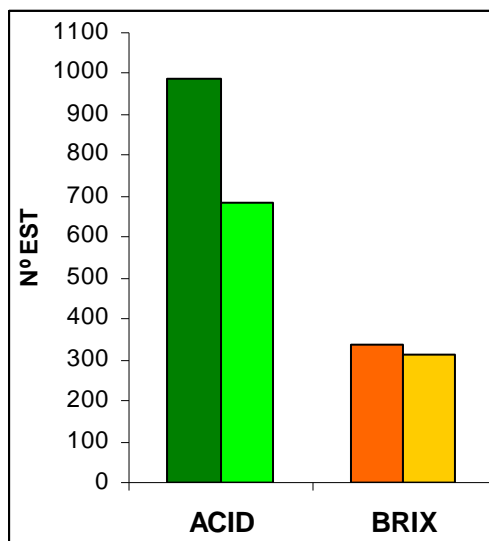


Figura IV-2: Número de ESTs que mostraron una correlación entre la expresión génica, realizada sobre 5 genotipos mutantes (Z46 (acidez y brix mayores), D11 (acidez menor), I09 (acidez mayor), H03 (acidez y brix menores) y J59 (acidez menor) en 2 fechas y 3 réplicas biológicas y la acidez y/o el °Brix. Correlación positiva con la acidez (■), con °Brix (■) y correlación negativa con la acidez (■) y con °Brix (■), empleando las micromatrices de 20K de cítricos. ($P < 0,05$).

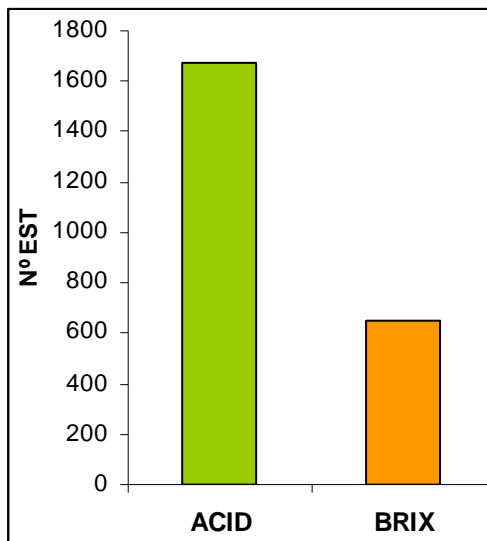


Figura IV-3: Número total ESTs que mostraron una correlación entre la expresión génica, realizada sobre 5 genotipos mutantes (Z46 (acidez y brix mayores), D11 (acidez menor), I09 (acidez mayor), H03 (acidez y brix menores) y J59 (acidez menor) en 2 fechas y 3 réplicas biológicas y la acidez y/o °Brix, empleando las micromatrices de 20K de cítricos. ($P < 0,05$).

IV.3.2.2.1. Sólidos solubles totales.

En el periodo de maduración o fase III del desarrollo de los frutos cítricos, se produce un aumento del contenido en sólidos solubles totales, de los cuales entre el 75% y el 85% corresponden a azúcares. De ellos, glucosa, fructosa y sacarosa son los más abundantes (Agustí 2003).

Varios genes implicados en el metabolismo de la sacarosa, obtuvieron una correlación con °Brix. La sacarosa sintasa (EC 2.4.1.14) que cataliza la reacción de UDP-glucosa a sacarosa se indujo mientras que la sacarosa-P-fosfatasa (EC 3.1.3.24) que toma la sacarosa y la transforma en α -D-glucosa-6P y β -D-fructosa se inhibió (Tabla IV-4). La expresión de ambos genes indica una acumulación de sacarosa en el fruto durante la maduración.

Tabla IV-4: Genes del metabolismo de los carbohidratos que correlacionaron con °Brix (r=coeficiente de correlación lineal). La expresión génica se estudió en 5 genotipos mutantes: Z46 (acidez y brix mayores), D11 (acidez menor), I09 (acidez mayor), H03 (acidez y brix menores) y J59 (acidez menor). Se utilizaron dos fechas y tres réplicas biológicas ($P < 0,05$).

Anotación	r	p-value	Citrus ID	EC
Sucrose synthase	0,69	0,05	aKN0AAP10YJ03FM1_c	2.4.1.14
Sucrose-phosphatase	-0,84	0,05	aC31808H07EF_c	3.1.3.24
Alpha glucosidase	0,69	0,05	aKN0AAI2DD02FM1_c	3.2.1.0
Alpha-glucosidase	1,00	0,05	aCL7583Contig1	3.2.1.0.
Glucosidase	-0,88	0,02	alC0AAA33DB03RM1_c	3.2.1.0.
Glucan endo-1,3-beta-glucosidase	0,93	0,01	KN0AAP11YO23FM1_c	3.2.1.0.
alpha- glucan phosphorylase	0,79	0,05	aC08027G04SK_c	2.4.1.1
Alpha-amylase	-0,96	0,05	aC34210A03EF_c	3.2.1.1
Alpha-D-xylosidase precursor	0,83	0,05	aCL7733Contig1	
Inositol-3-phosphate synthase	0,66	0,05	aCL25Contig1	5.5.4.1
6-phosphofructokinase	0,82	0,05	alC0AAA52DF03RM1_c	2.7.1.11
Phosphoenolpyruvate carboxylase	0,88	0,05	IC0AAA29CH02RM1_c	4.1.1.38

También se indujo la expresión de inositol-3-fosfato sintasa que cataliza el paso limitante de la síntesis de inositol, azúcar implicado en varios procesos como la transducción de señales intracelulares (Irving y Schell 2001) o la construcción de la membrana y la pared celular (Loewus 1973; Cullen y cols 2001).

Se indujeron un grupo de genes que codifican glucosidasas (EC3.2.1.0) que a partir de sacarosa, dan lugar a fructosa y glucosa. También algunos enzimas hidrolíticos del almidón, como son

glucano-fosforilasa (EC 2.4.1.1) que produce amilosa y α -amilasa (EC 3.2.1.1) que sintetiza dextrina a partir del almidón.

Algunos genes involucrados en la glucólisis como 6-fosfofructoquinasa (EC 2.7.1.11) y fosfoenolpiruvato carboxilasa (EC4.4.1.38) se correlacionaron positivamente con el °Brix (Tabla IV-4). Estos resultados parecen confirmar la dinámica de los carbohidratos que tiene lugar durante la maduración de los frutos cítricos, donde se produce un aumento en la concentración de azúcares solubles (fructosa, glucosa y sacarosa) y un descenso del almidón.

Algunos genes que codifican proteínas que están involucrados en la síntesis de antioxidantes, compuestos del metabolismo secundario, correlacionaron con el °Brix (Tabla IV-5). Como por ejemplo, superóxido dismutasa (EC 1.15.1.1) y L-ascorbato peroxidasa (EC 1.11.1.11) que sintetiza ácido ascórbico a partir del ácido dehidroascórbico, se indujo también durante la maduración del fruto.

Tabla IV-5: Genes con función antioxidante correlacionados con el °Brix (r=coeficiente de correlación lineal) (P<0,05). Vease tablas anteriores para más información.				
Anotación	r	p-value	Citrus ID	EC
Fe-superoxide dismutase	0,74	0,05	aCL8011Contig1	1.15.1.1
L-ascorbate peroxidase	0,85	0,02	KN0AAB3CB05ZM1_c	1.11.1.11
Violaxanthin de-epoxidase	-0,67	0,05	aC31504E01EF_c	1.10.99.3

Otro gen "antioxidante" que obtuvo correlación negativa con el °Brix fue la violaxantina de-epoxidasa (EC 1.10.99.3) que interviene en la síntesis de la violaxantina. La violaxantina protege a las plantas del estrés oxidativo (Havaux 1999). La inhibición de la violaxantina de-epoxidasa fue en principio coherente con la inducción obtenida con L-ascorbato peroxidasa ya que se ha observado que la abundancia de ácido ascórbico está inversamente

relacionado con la actividad de violaxantina de-epoxidasa en plantas (Müller-Moulé y cols 2002).

Algunos factores de transcripción también obtuvieron correlación con el °Brix (Tabla IV-6).

Tabla IV-6: Genes anotados como factores de transcripción correlacionados con el °Brix (r=coeficiente de correlación lineal) ($P<0,05$). Vease tablas anteriores para más información.

Anotación	r	p-value	Citrus ID
Transcription elongation factor 1 homolog	-0,74	0,02	aCL6301Contig1
Nuclear transcription factor Y subunit B-10	-0,65	0,05	aCL8375Contig1
Transcription factor E2F	-0,72	0,05	alC0AAA36AF03RM2_c
Myb-related transcription activator	-0,68	0,05	alC0AAA89AA04RM1_c
AP2 domain-containing transcription factor	-1,00	0,02	aKN0AAP7YL15FM1_c
GT-1 like transcription factor	1,00	0,02	aC31009D07EF_c
Myb-like transcription factor 5	1,00	0,05	aC31805F09EF_c
BHLH transcription factor	0,84	0,01	aCL4487Contig2
ATERF13 encodes a member of the ERF subfamily B-3 of ERF/AP2 transcription factor	0,88	0,05	C08020E12SK_c
MYB22	-0,70	0,05	alC0AAA27AA05RM1_c
MYB92	0,97	0,05	aC02008E10SK_c

La última tabla (Tabla IV-7) de este apartado recoge un número de genes importantes, no recogidos en los apartados previos que se correlacionaron asimismo con el °Brix.

Tabla IV-7: Genes de relevancia que correlacionaron con el °Brix (r=coeficiente de correlación lineal) ($P<0,05$). Vease tablas anteriores para más información

Anotación	r	p-value	Citrus ID	EC
NADP-dependent isocitrate dehydrogenase	0,89	0,01	aCL211Contig1	1.1.1.42
Alanine-glyoxylate aminotransferase AGT1	0,71	0,05	alC0AAA81AD04RM1_c	2.6.1.44
Anthranilate synthase α -subunit	-0,88	0,01	aCL4223Contig1	4.1.3.27
Arginino succinate synthase	-0,91	0,02	aCL6306Contig1	6.3.4.5
Asparagine synthetase	-0,64	0,05	aCL1102Contig1	6.3.5.4
Gamma-aminobutyrate transaminase	0,64	0,05	aCL5262Contig1	2.6.1.19
Glutamate decarboxylase	0,91	0,01	aCL65Contig5	4.1.1.15
Glutamate receptor 3.4 precursor	0,89	0,01	aCL6462Contig1	
Limonoid UDP-glucosyltransferase	0,85	0,02	aCL194Contig2	2.4.1.210
Succinate dehydrogenase	0,80	0,01	aCL917Contig1	1.3.99.1

Los resultados obtenidos al correlacionar la expresión génica con el °Brix, señalan una inducción de la ruta de degradación del citrato vía GABA, ruta catabólica del ácido cítrico (Cercós y cols 2006) ya que NADP-isocitrato deshidrogenasa (EC 1.1.1.42) que produce 2-oxoglutarato a partir de isocitrato, alanina aminotransferasa (EC 2.6.1.2) que a partir de la alanina y 2-oxoglutarato produce glutamato y piruvato, glutamato decarboxilasa (EC 4.1.1.15) que cataliza la reacción de glutamato a GABA y gamma-aminobutirato transaminasa (EC 2.6.1.19) que transforma GABA en succinato semialdehído obtuvieron una correlación positiva con el °Brix (Tabla IV-7). Por último se encontró correlación con succinato deshidrogenasa (EC 1.3.99.1) que se indujo durante la maduración del fruto.

IV.3.2.2.2. Acidez del fruto.

La maduración interna de los frutos cítricos se caracteriza por una síntesis de ácidos durante la fase II de maduración del fruto y una posterior degradación de éstos, paralelo a un aumento en los sólidos solubles totales en la fase III. El ácido mayoritario es el ácido cítrico y el ácido málico el segundo mayoritario (Karadeniz 2003). La acumulación del ácido cítrico es característica de este género, con lo cual es esperable que existan rutas alteradas relacionadas con la acumulación y degradación de este ácido, además de modificarse otras rutas en respuesta a la acumulación de ácidos.

Entre los genes alterados como respuesta a los cambios en los ácidos destacan varios factores de transcripción: MYB, Bzip o BHLH que al igual que correlacionaron con el °Brix (apartado IV.3.2.2.1), también correlacionaron con la acidez.

También se encontraron genes pertenecientes al metabolismo secundario: biosíntesis de carotenoides, fenilpropanoides y flavonoides. Los flavonoides son metabolitos con una gran actividad antioxidante (Pietta 2000) característica que ha dado al consumo de los frutos cítricos un papel relevante por sus efectos beneficiosos para la salud humana (Yao y cols 2004) y cuyo contenido se ha visto que disminuye a lo largo de la maduración. Se encontró una relación positiva de varios genes que codifican enzimas implicadas en la síntesis de los flavonoides, entre los que se encuentran flavonol sintetasa (EC 1.14.11.23) y dehidroflavonol 4-reductasa (EC 1.1.1.219). Esta correlación indica una inhibición de la síntesis de los flavonoides durante el descenso de la acidez.

Se encontraron inducidos durante la maduración del fruto varios genes relacionados con la degradación de almidón y la pared celular (beta-amilasa y celulosa sintasa) así como del metabolismo de los fenilpropanoides implicados en la síntesis de lignina: cinnamil-alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.195) y fenilalanina amonía-liasa (EC 4.3.1.24) (Tabla IV-8). Su inducción podría estar relacionada con el crecimiento del fruto y el reblandecimiento del fruto en la fase III de la maduración. El crecimiento del fruto también puede verse afectado por la concentración de auxinas en la pulpa. Se encontraron genes relacionados con las auxinas correlacionados con la acidez (Tabla IV-8).

Tabla IV-8: Genes correlacionados con acidez no necesariamente implicados en la síntesis de ácidos (r =coeficiente de correlación lineal). La expresión génica se estudió en 5 genotipos mutantes: Z46 (acidez y brix mayores), D11 (acidez menor), I09 (acidez mayor), H03 (acidez y brix menores) y J59 (acidez menor). Se utilizaron dos fechas y tres réplicas biológicas ($P < 0,05$).

Anotación	r	P-value	Citrus ID
Metabolismo de carbohidratos			
78 kDa glucose-regulated protein homolog precursor	-0,84	0,02	aC34204F08EF_c
Glucose dehydrogenase	1,00	0,01	aIC0AAA55DD03RM1_c
Glucose-repressible gene protein	1,00	0,01	aKN0AAL1AA05FM2_c
Glucosidase	-0,75	0,02	aCL1849Contig1
Phosphoenolpyruvate carboxykinase	-0,76	0,02	aCL1193Contig1
Phosphoenolpyruvate carboxylase kinase	0,70	0,05	aCL2282Contig1
Pyruvate dehydrogenase	0,69	0,05	aIC0AAA1BD10RM1_c
Pyruvate dehydrogenase	0,89	0,05	IC0AAA92BB04RM1_c
Pyruvate kinase	-0,77	0,01	aCL4729Contig1
Pyruvate kinase	0,75	0,02	aIC0AAA83AB08RM1_c
UDP-glucose 4-epimerase	-0,67	0,05	aCL7427Contig1
UDP-glucose dehydrogenase	-0,81	0,01	aCL7635Contig1
UDP-glucose dehydrogenase	-0,72	0,05	KN0AAP5YD20FM1_c
UDP-glucose dehydrogenase	-0,76	0,02	aC04006F12SK_c
UDP-glucose pyrophosphorylase	-0,66	0,05	aIC0AAA47DB09RM1_c
fructose- bisphosphatase	-0,79	0,01	C31806H11EF_c
glucokinase	-0,70	0,05	aC08006E04SK_c
glucokinase	-0,79	0,01	aCL8331Contig1
phosphoglycerate mutase	-1,00	0,01	aCL2315Contig2
beta-fructofuranosidase	-0,77	0,01	aCL1142Contig2
Síntesis de fosfolípidos y mensajeros secundarios			
Inositol-tetrakisphosphate 1-kinase	0,68	0,05	aCL6345Contig1
3-phosphoinositide	0,84	0,01	C34205A05EF_c
phosphatidylinositol 4-kinase	0,78	0,02	KN0AAQ13YH04RM1_c
phosphatidylinositol transfer protein	-0,98	0,01	aCL6613Contig1
Biosíntesis de flavonoides			
Dihydroflavonol 4-reductase	0,75	0,02	aCL4037Contig2
Flavonoid 3'-hydroxylase	-0,79	0,02	aKN0AAP12YF15FM1_c
Flavonol synthase	0,83	0,01	aC31703B04EF_c
Flavonol synthase	0,75	0,02	aIC0AAA71CG12RM1_c
Hormonas			
Auxin response factor 1	-0,65	0,05	aCL2271Contig1
Auxin-regulated protein	-1,00	0,05	aC20001C06SK_c
IAA-amino acid hydrolase ILR1	0,90	0,01	aCL1382Contig1
auxin-amidohydrolase precursor	-0,79	0,05	aCL1920Contig1
auxin-independent growth promoter	-0,76	0,05	aCL5024Contig1

auxin-regulated protein	-0,78	0,05	aCL1903Contig2
Abscisic acid-induced	0,81	0,05	aC31106H02EF_c
S-adenosyl-L-methionine synthetase	-0,76	0,02	aCL414Contig2
S-adenosylmethionine synthetase	-0,71	0,05	aCL33Contig2
ACC synthase	-0,67	0,05	aCL4017Contig1
Factores de transcripción			
BEL1-like homeodomain transcription factor	-0,80	0,05	aCL3104Contig1
BHLH transcription factor	-0,75	0,02	aCL1231Contig2
transcription factor	0,91	0,05	aCL2593Contig1
WRKY transcription factor 27	0,73	0,05	aIC0AAA24AB01RM2_c
BZIP transcription factor	-0,76	0,05	C31303E08EF_c
Homeobox transcription factor KN2	0,72	0,05	aIC0AAA92DD06RM1_c
MYB transcription factor	-1,00	0,01	aCL8980Contig1
NAC domain protein NAC1	-0,68	0,05	aCL1571Contig1
NAC domain protein NAC4	-0,67	0,05	aCL35Contig5
NAC domain protein NAC5	-0,84	0,01	aCL5303Contig1
transcription factor BIM2	0,68	0,05	aC20002B11SK_c
Transcription factor DREB1A	-0,93	0,01	C06017B01SK_c
transcription factor IIB	-0,70	0,05	KN0AAQ5YH17RM1_c
Transcription factor TINY	-0,72	0,05	IC0AAA16CF09RM1_c
Transcriptional activator RF2a	-0,69	0,05	C05057A02SK_c
Pared celular			
Beta-amylase	-1,00	0,05	aCL3609Contig1
Cellulose synthase	-0,76	0,02	aCL4029Contig1
CER1 protein	-0,95	0,02	C06013B05SK_c
Biosíntesis fenilpropanoides			
Cinnamyl-alcohol dehydrogenase	-0,68	0,05	aIC0AAA18AD10RM1_c
Phenylalanine ammonia-lyase	0,68	0,05	aIC0AAA36DF10RM1_c
Biosíntesis carotenos			
Phytoene dehydrogenase	0,74	0,05	aCL8062Contig1
Metabolismo ácido linolénico			
Lipoxygenase	-0,91	0,01	aCL2406Contig1c
Metabolismo del nitrógeno			
Nitrate transporter NRT1-2	-0,88	0,01	aCL1914Contig1
Nitrate transporter NRT1-5	-0,66	0,05	aCL6020Contig1
Allantoinase	-0,79	0,01	aC34001D12EF_c
Nitrate reductase	-0,89	0,02	aCI7801Contig1
Metabolismo de aminoácidos			
Methionine synthase	-0,65	0,05	aIC0AAA35BH01RM1_c
Proline dehydrogenase	-0,71	0,05	aC06054A08T7_c
L-proline oxidase	0,71	0,05	aCL4610Contig1
Proline-tRNA ligase	-0,83	0,01	aCL8684Contig1
glutamate-tRNA synthetase	-0,75	0,05	aCL4441Contig1

Los genes más relevantes y en principio directamente implicados en el metabolismo de los ácidos obtenidos mediante la matriz de correlaciones de la expresión génica y la acidez se recogen en la Tabla IV-9.

Tabla IV-9: Genes correlacionados con acidez en principio directamente implicados en el metabolismo de los ácidos. (r=coeficiente de correlación lineal). La expresión génica se estudió en 5 genotipos mutantes: Z46 (acidez y brix mayores), D11 (acidez menor), I09 (acidez mayor), H03 (acidez y brix menores) y J59 (acidez menor). Se utilizaron dos fechas y tres réplicas biológicas ($P<0,05$).

Anotación	r	p-value	Citrus ID	EC
Citrate synthase	0,84	0,02	IC0AAA29CD12RM1_c	2.3.3.1
Aconitase	-0,82	0,02	aC04011B01SK_c	4.2.1.3
Aspartate aminotransferase	-0,72	0,02	KN0AAI2DE02FM1_c	2.6.1.1.
Glutamate decarboxylase	-0,68	0,05	aCL505Contig2	4.1.1.15
Glutamate dehydrogenase	0,73	0,05	alC0AAA93AF06RM1_c	1.4.1.2
Glutamate synthase	-0,70	0,05	aC05068F04SK_c	1.4.7.1
Succinate dehydrogenase	-0,79	0,05	alC0AAA33DD08RM1_c	1.3.99.1
Succinate dehydrogenase	-0,74	0,02	alC0AAA35CF05RM2_c	1.3.5.1

El ácido cítrico no se trasloca de las hojas al fruto, sino que es sintetizado en la pulpa del mismo (Ramakrishnan 1971), concretamente en la mitocondria de las células de las vesículas de zumo en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Canel y cols 1996; Cercós y cols 2006). Se encontró una correlación positiva, es decir, que su expresión disminuye durante la maduración, con piruvato deshidrogenasa (EC 1.2.4.1) que codifica la condensación del piruvato a acetil-CoA así como con citrato sintasa (EC 2.3.3.1). Los genes que catalizan algunas de las reacciones del ciclo de los ácidos tricarboxílicos posteriores a la síntesis del ácido cítrico, aconitasa hidratasa (EC 4.2.1.3), succinato-CoA sintetasa (EC 6.2.1.4) y succinato dehidrogenasa (EC 1.3.99.1) obtuvieron una correlación negativa con la acidez, es decir, se indujeron durante la

maduración. Estos resultados corroboran estudios realizados en plantas con genes antisentido de algunos enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, donde una alteración de los enzimas previos a la síntesis del succinato modifica la actividad hacia la derivación del GABA (Lemaitre y cols 2007) y cuando fueron alterados enzimas posteriores, no se vió afectada (Nunes-Nesi y cols 2005).

En plantas, el ácido cítrico producido en la mitocondria, es liberado al citosol mediante un transportador específico, donde puede ser catabolizado por dos rutas distintas (Heldt 2004). En la primera, el citrato es transformado en acetil-CoA y oxalacetato mediante ATP citrato liasa (EC 2.3.3.8). Esta vía de catabolismo del ácido cítrico se ha visto que está inhibida a lo largo de la maduración de frutos de clementina (Cercós y cols 2006). En la segunda, la degradación de ácido cítrico se produce mediante su derivación a γ -aminobutirato (GABA). En ella, mediante aconitasa hidratasa (EC 4.2.1.3) el citrato es isomerizado a isocitrato que posteriormente es transformado en 2-oxoglutarato, reacción catalizada por isocitrato deshidrogenasa (EC 1.1.1.41). A continuación, el 2-oxoglutarato puede ser transformado en glutamato mediante aspartato aminotransferasa (EC 2.6.1.1) o mediante glutamato deshidrogenasa (EC 1.4.1.3). Esta última, bajo condiciones de estrés, se induce produciendo glutamato para la síntesis de prolina en tabaco y uva (Nanjo y cols 2003; Skopelitis y cols 2006). Por otro lado, el glutamato obtenido puede ser catabolizado por glutamato decarboxilasa (EC 4.1.1.15) obteniéndose GABA, reacción que consume protones y que puede representar una respuesta adaptativa contribuyendo a la regulación del pH citoplasmático (Patterson and Graham 1987; Crawford y cols 1994; Ratcliffe 1995). La acidificación del citoplasma debido a los ácidos débiles, inducen la acumulación de GABA (Crawford y cols

1994) y la activación de esta ruta promueve el consumo de protones de esta reacción en presencia de niveles altos de acidez durante la maduración del fruto (Cercós y cols 2006). Así pues, el catabolismo del ácido cítrico es muy importante puesto que la presencia de una elevada cantidad de citrato, resulta dañino para las células. En este caso se estimula la actividad de antioxidantes (peroxidasas y superóxido dismutasas) (Iona y cols 2008) los cuales se indujeron durante la maduración (Tabla IV-5). La ruta de la derivación del GABA es una vía para disminuir el estrés (Snedden y Fromm 1999) que puede generar la acumulación de citrato en el fruto.

Mediante el estudio de correlación con la acidez, encontramos correlaciones con varios genes de la vía GABA descritos previamente (Cercós y cols 2006). Probablemente se inhibió glutamato deshidrogenasa-NADP⁺ (EC 1.4.1.3) y se indujeron glutamato sintasa (EC 1.4.7.1.) y glutamato descarboxilasa (EC 4.1.1.15), corroborando la inducción de la ruta de degradación del citrato vía GABA (Cercós y cols 2006).

La concentración de glutamato no cambia ni antes ni después del pico máximo de acidez en los frutos de Clementina (Cercós y cols 2006). Los resultados obtenidos mediante la correlación sugieren una posible utilización del glutamato en la síntesis de prolina en los frutos cítricos ya que prolina oxidasa se inhibió (EC 1.5.1.2) mientras que prolina dehidrogenasa (EC 1.5.99.8) que cataliza la formación de prolina a partir de glutamato se indujo (Tabla IV-8). La prolina y el glutamato son regulados específicamente mediante procesos de traslación y la posible derivación del glutamato a prolina en los frutos de Clementina está acorde con los genes obtenidos mediante la correlación con la acidez, ya que ESTs que codifican prolina-tRNA ligasa (EC6.1.115)

como ESTs que codifican glutamato-tRNA sintasa (EC. 6.1.1.17) se encontraron inducidos (Tabla IV-8).

En frutos de tomate, el aumento de la actividad de aspartato aminotransferasa junto con un descenso de la actividad de glutamina sintasa se produce durante la maduración de sus frutos (Boggio y cols 2000). Resultados similares se obtuvieron en los cítricos ya que también se indujo aspartato aminotransferasa (EC 2.6.1.1) (Tabla IV-9). Aspartato aminotransferasa resulta interesante puesto que a partir de 2-oxoglutarato y aspartato, genera glutamato y oxalacetato, este último, intermediario en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos. El 2-oxoglutarato es producido en la ruta de derivación del GABA y el aspartato puede ser sintetizado a partir de metionina (Hackam y cols 2008). En plantas, la metionina es catalizada en los plástidos, sirviendo como sustrato para la síntesis de etileno, hormona asociada a la senescencia en plantas y muy importante en la maduración de los frutos. Se encontró correlacionada negativamente con la acidez la expresión de s-adenosylmetionina sintasa (EC 2.5.1.6) y ACC sintasa (EC 4.4.1.14) (Tabla IV-8) indicando una inducción de la síntesis de etileno durante la maduración de los frutos. Estudios previos indican que aspartato aminotransferasa así como la síntesis de amino ácidos se inducen a niveles altos de acidez (Degu y cols 2011). Los resultados obtenidos mediante correlaciones sugieren una inducción de aspartato aminotransferasa pero la síntesis de aminoácidos no fue general. La síntesis de glutamina a partir de glutamato se inhibió, el catabolismo de alanina en piruvato se indujo, mientras que la conversión de asparagina en aspartato y éste en argino-succinato también se inhibió. Las diferencias podrían deberse a que la síntesis de aminoácidos se inducen cuando se inhibía la actividad de aconitasa provocando una acumulación de

citrato (Degu y cols 2011) mientras que el estudio de correlaciones se realizó durante la maduración de los frutos cítricos de forma natural, estando inducida aconitasa y sin alterar drásticamente los niveles de acidez.

Otra de las rutas alteradas obtenidas mediante el análisis de las correlaciones con la acidez fue la gluconeogénesis. Uno de los tres enzimas específicos de esta ruta es fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (EC 4.1.1.49), la cual tranforma el oxalacetato (OAA) en fosfoenolpiruvato (PEP) y se encontró inducida durante la maduración. Inversamente, PEP puede ser transformado en OAA mediante fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPCL, EC 4.1.1.31) cuya expresión correlacionó positivamente con el °Brix y cuya actividad es modulada por la actividad de fosfoenolpiruvato carboxilasa quinasa (PEPCL-K) que como PEPCK, también correlacionó negativamente con la acidez del fruto. Otra de las tres enzimas específicas de la gluconeogénesis, fructosa bifosfatasa, que produce fructosa-1,6-bisfosfato a partir de fructosa-6P, correlacionó también negativamente con la acidez, mientras que la 6-fosfofructoquinasa (PFK-1), que cataliza la reacción irreversible opuesta, propia de la glicólisis lo hizo con el °Brix, indicando inducción de ambas durante la maduración de los frutos cítricos. Esto concuerda con la regulación de la glicolisis o gluconeogénesis por parte de la glucosa, puesto que niveles de citrato alto y glucosa bajo, situación que se produce al inicio de la maduración del fruto en la fase III, inhiben la expresión de PFK-1, reduciéndose la glicólisis y activándose la gluconeogénesis, mientras que al final de la maduración los niveles de citrato son bajos y los de glucosa altos, induciéndose la expresión de PFK-1. Sin embargo, no es esperable que todos los azúcares del fruto provengan de la activación de la gluconeogénesis por el aporte del fosfoenolpiruvato proveniente del oxalacetato como sustrato.

Los principales resultados obtenidos en relación con la expresión génica relativa al metabolismo de los ácidos se ilustran en la Figura siguiente.

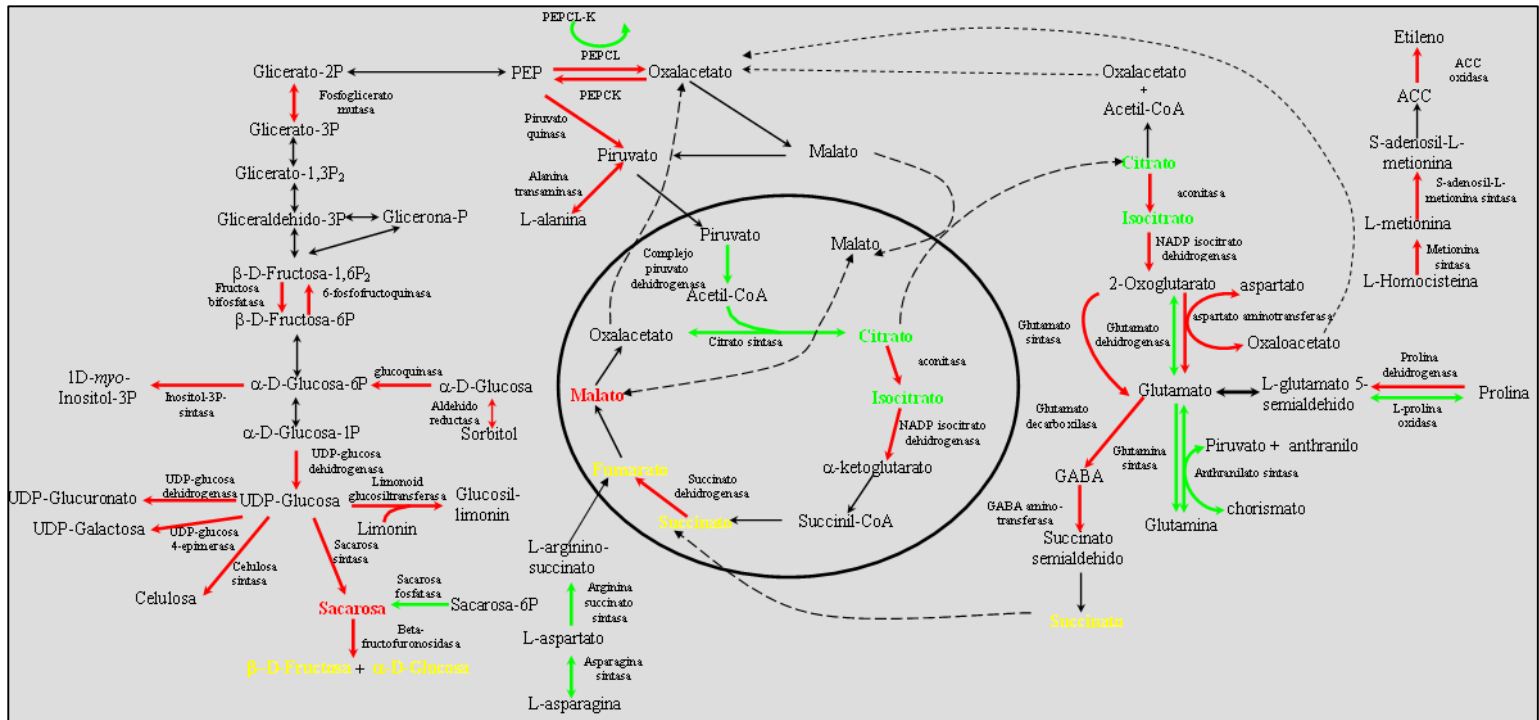


Figura IV-4: Expresión génica relacionada con el metabolismo de los ácidos durante el periodo de maduración del fruto comprendido entre septiembre y noviembre. La expresión génica se estudió en 5 genotipos mutantes: Z46 (acidez y brix mayores), D11 (acidez menor), IO9 (acidez mayor), H03 (acidez y brix menores) y J59 (acidez menor). Se utilizaron dos fechas y tres réplicas biológicas ($P < 0,05$). Verde = expresión génica inhibida/menor concentración de metabolito. Rojo = expresión génica inducida/mayor concentración de metabolito. Amarillo = similar concentración de metabolito.

Los resultados obtenidos mediante el análisis de las correlaciones entre la expresión génica y la acidez o el °Brix fueron apoyados por la cuantificación en septiembre y noviembre de varios metabolitos en el zumo de Clementina de Nules.

Así, durante la maduración del fruto de Clementina, la expresión de citrato sintasa (EC 2.3.3.1) probablemente se inhibió (Figura IV-4) y la concentración de ácido cítrico disminuyó significativamente ($P<0,05$) de 36,03 g/l a 5,92 g/l al igual que la de ácido isocítrico que pasó de 3,81 g/l a 0,61 g/l en septiembre y noviembre respectivamente (Figura IV-5 y IV-6). La concentración de ácido fumárico y ácido succínico fueron similares entre septiembre y noviembre (Figura IV-7 y IV-8).

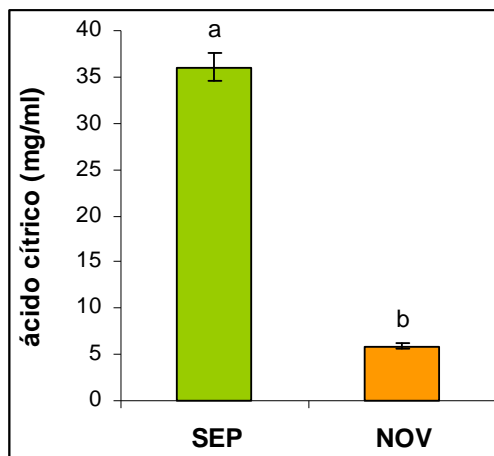


Figura IV-5: Concentración de ácido cítrico en zumo de Clementina de Nules en septiembre 170 DDA (■) y noviembre 225 DDA (■). Letras diferentes indican diferencias **significativas** ($\mu \pm$ E.S., $P<0.05$, $n=3$).

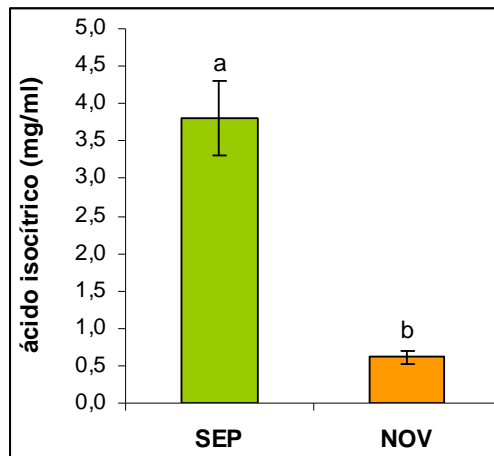


Figura IV-6: Concentración de ácido isocítrico en zumo de Clementina de Nules en septiembre 170 DDA (■) y noviembre 225 DDA (■). Letras diferentes indican diferencias **significativas** ($\mu \pm$ E.S., $P<0.05$, $n=3$).

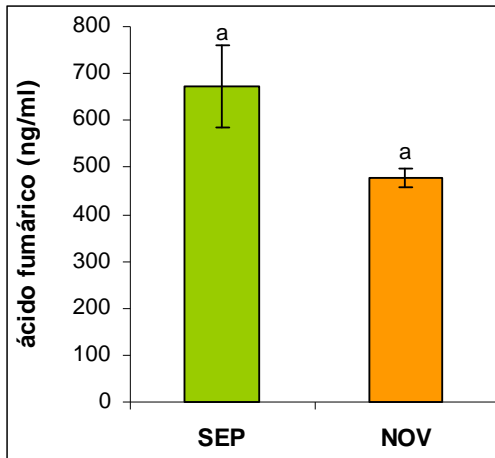


Figura IV-7: Concentración de ácido fumárico en zumo de Clementina de Nules en septiembre 170 DDA (■) y noviembre 225 DDA (■). Letras diferentes indican diferencias significativas ($\mu \pm$ E.S., $P < 0.05$, $n = 3$).

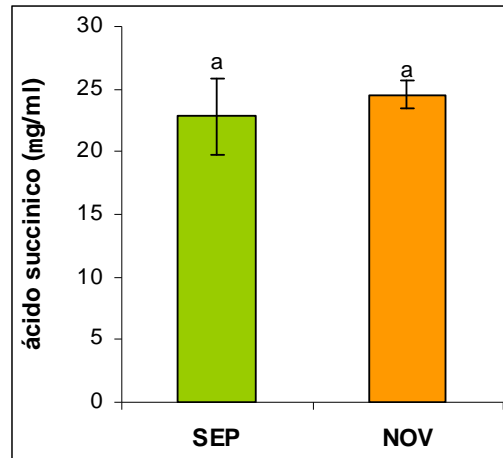


Figura IV-8: Concentración de ácido succínico en zumo de Clementina de Nules en septiembre 170 DDA (■) y noviembre 225 DDA (■). Letras diferentes indican diferencias significativas ($\mu \pm$ E.S., $P < 0.05$, $n = 3$).

En las plantas, el ácido cítrico es sintetizado en la mitocondria y se exporta al citosol mediante un cotransportador específico que introduce ácido málico y ácido oxalacético en la mitocondria y libera ácido cítrico al citosol (Heldt 2004). El citrato liberado en el citosol se acumula en la vacuola que se libera posteriormente y se degrada por la ruta GABA a lo largo de la maduración (Cercós y cols 2006). Al analizar el contenido de ácido málico en el zumo de Clementina se observó que aumentó significativamente de septiembre con 1,10 g/l a 2,43 g/l en noviembre (Figura IV-9).

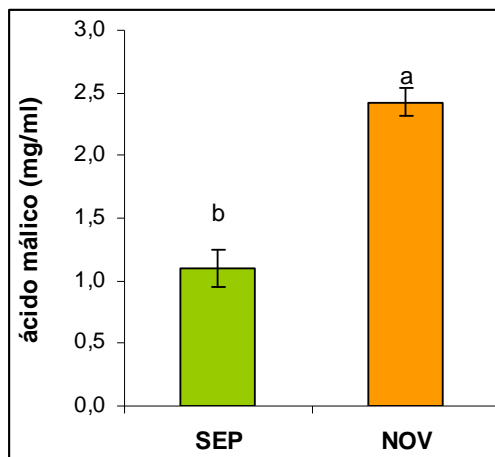


Figura IV-9: Concentración de ácido málico en zumo de Clementina de Nules en septiembre 170 DDA (■) y noviembre 225 DDA (■). Letras diferentes indican **diferencias significativas** ($\mu \pm$ E.S., $P < 0.05$, $n=3$).

La ruta de **gluconeogénesis** probablemente se indujo durante la maduración del fruto. La concentración de sacarosa en el zumo fue significativamente mayor en noviembre con 68,99 mg/ml respecto a los 35,92 mg/ml en septiembre mientras que la concentración de fructosa y glucosa fueron similares entre las dos fechas (Figura IV-10).

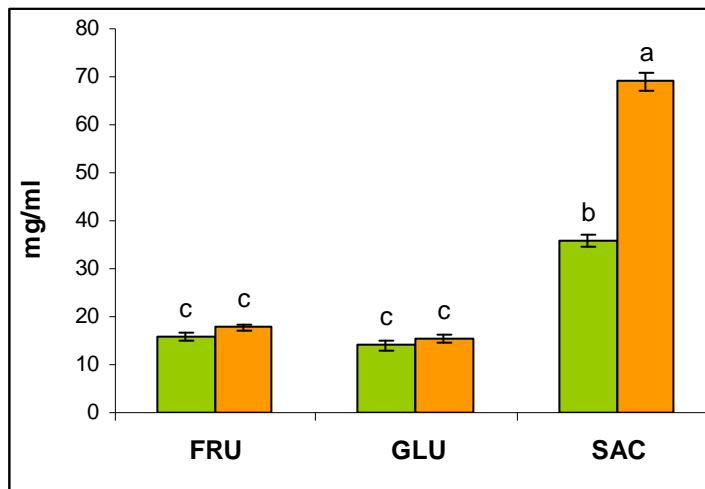


Figura IV-10: Concentración de fructosa (FRU), glucosa (GLU) y sacarosa (SAC) en zumo de Clementina de Nules en septiembre 170 DDA (■) y noviembre 225 DDA (■). Letras diferentes indican diferencias significativas ($\mu \pm E.S.$, $P < 0.05$, $n=3$).

Entre los genes obtenidos en la correlación con la acidez, el gen que codifica para **fosfoenolpiruvato carboxiquinasa** resultó muy interesante puesto que ha sido relacionado con el metabolismo de los ácidos (Famiani y cols 2005). Esta enzima cataliza la conversión del ácido oxalacético en fosfoenolpiruvato. Los genes más relevantes de esta reacción, fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, **fosfoenolpiruvato carboxilasa** y **fosfoenolpiruvato carboxilasa quinasa** han sido estudiados con más detalle en el capítulo IV.

IV.3.3. Estudio del transcriptoma de cinco genotipos con alteraciones en la maduración.

IV.3.3.1. Expresión global.

La micromatriz de 20K se usó para estudiar la expresión génica de los 5 genotipos seleccionados en el capítulo III.

De los 5 genotipos, Z46 fue el que presentó un mayor número de parámetros alterados: contenido en sólidos solubles totales, acidez, índice de madurez interna y externa, diámetro y firmeza. También fue el genotipo con más genes diferencialmente expresados. H03 tuvo menos parámetros alterados que Z46: el contenido de sólidos solubles totales y acidez, siendo el número de genes inhibidos y sobreexpresados similar entre sí e inferior a Z46. Los genotipos I09, D11 y J59 mostraron, en principio, únicamente alteraciones del contenido de ácidos en el fruto. De los tres, I09 fue el que mostró una mayor acidez y más genes (Figura IV-11).

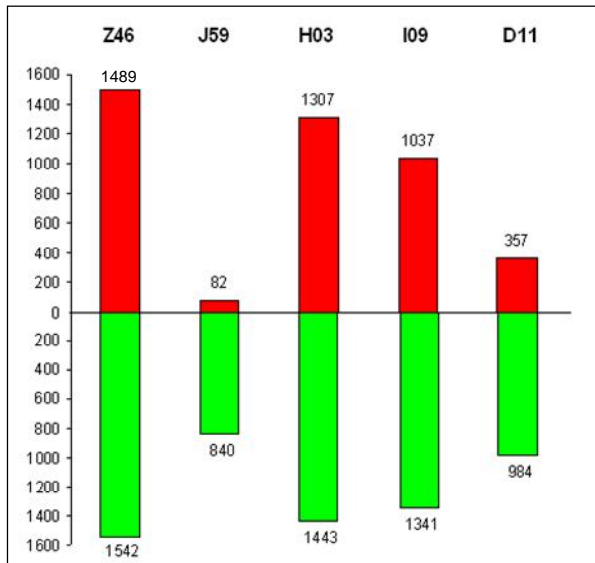


Figura IV-11: Número total de genes sobreexpresados (■) e inhibidos (■) en las hibridaciones realizadas en noviembre 225 DDA entre cada uno de los genotipos y su control Clementina de Nules.

Al analizar el número total de genes sobreexpresados e inhibidos se puede sugerir que cuantos más cambios fenotípicos existen, más genes se expresan diferencialmente respecto a su parental. Además, parece que las alteraciones que provocaron una acidez mayor provocaron más cambios en el transcriptoma.

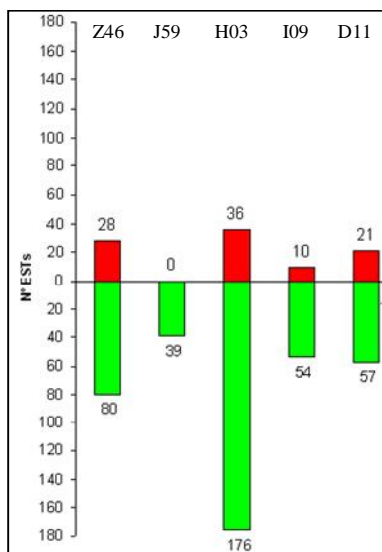


Figura IV-12: Numero de ESTs relacionados con respuestas a estrés en los genotipos Z46, J59, H03, I09 y D11.

Los cinco genotipos tienen alterado el contenido en ácidos en el zumo. La acidez en el fruto crea un ambiente oxidativo. De entre las categorías funcionales analizadas cabe destacar el número de genes relacionados con las respuestas a estrés (Figura IV-12).

Tras realizar el estudio global de los genes expresados en los distintos genotipos, se procedió a destacar las rutas metabólicas con mayor número de genes expresados relacionándose la expresión génica con el fenotipo observado en cada uno de los genotipos.

IV.3.3.2. Z46.

Mediante el análisis de micromatrices de cDNA se estudió los cambios de expresión génica producidos en el transcriptoma del genotipo Z46 en la misma época de recolección durante dos años consecutivos comparándolo con muestras de pulpa procedentes de su control en la misma fecha de muestreo. El análisis señaló que el número de sondas expresadas diferencialmente ($FDR < 0.05$) fue de 4180 en octubre y 2646 en noviembre del año 1 y 3031 en noviembre del año 2. El porcentaje de genes inhibidos y sobreexpresados de cada fecha fueron similares (Figura IV-13).

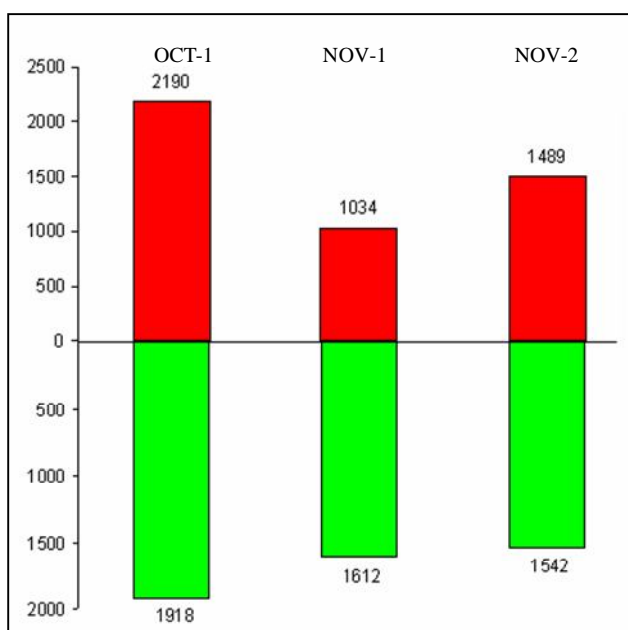


Figura IV-13: Número total de genes sobreexpresados (■) e inhibidos (■) en las hibridaciones realizadas con pulpa del genotipo Z46 respecto a Clementina de nules.

El mayor número de genes expresados en octubre respecto a noviembre resulta esperable teniendo en cuenta que hay más rutas metabólicas activas al principio que al final de la maduración de los cítricos (Cercós y cols 2006).

De acuerdo con los resultados obtenidos en la hibridación con las micromatrices de cDNA en noviembre del genotipo Z46 mostró probables cambios en la expresión génica de varias rutas; destacándose el **ciclo de los ácidos tricarboxílicos**, la **glicólisis/gluconeogénesis** y la **síntesis de etileno**. De esta última ruta se encontraron inhibidos la expresión del gen que codifica la proteína ACC sintasa (EC 4.4.1.14) y de ACC oxidasa (EC 1.14.17.4), los dos últimos pasos en la síntesis de etileno. En principio, estas inhibiciones podrían estar relacionadas con el retraso en la madurez tanto externa como interna que presentó este genotipo (vease III. 3.3.1).

Otra de las principales rutas probablemente alteradas fue la **síntesis del ácido cítrico**. En el mutante Z46 citrato sintasa se indujo y aconitasa, isocitrato deshidrogenasa, 2-oxoglutarato deshidrogenasa, succinato deshidrogenasa y fumarasa se reprimieron (Figura IV-21), a diferencia de lo observado en Clementina de Nules donde citrato sintasa se reprimió y aconitasa, isocitrato deshidrogenasa y succinato deshidrogenasa se indujeron (Figura IV-4)

Además, la ruta de **degradación del citrato vía GABA** se reprimió en Z46 y parte del glutamato sintetizado en esta vía parece que se derivó a la síntesis de glutamina puesto que glutamina sintetasa así como nitrito reductasa (EC 1.7.7.1) que transforma el nitrito en amonía y ésta a su vez en glutamina mediante glutamato amonía ligasa (EC 6.3.1.2) se encontraron inducidas (Figura IV-21). La inducción en la síntesis de citrato y la represión de una de sus rutas de degradación, así como de las rutas intermedias del ciclo de los ácidos tricarboxílicos resultó coherente con la acumulación de ácidos cuantificados en el zumo de Z46.

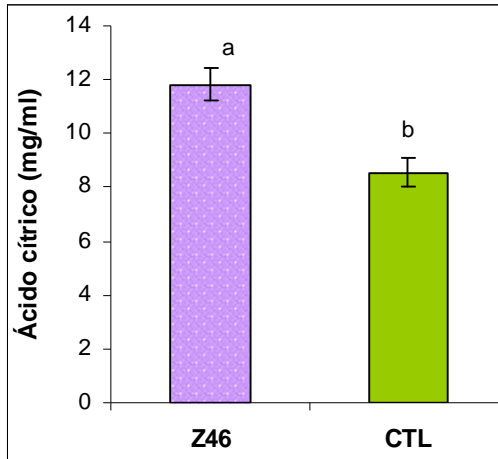


Figura IV-14: Concentración de ácido cítrico en zumo del genotipo Z46 (■) y su control (■) en noviembre 225 DDA. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\mu \pm$ E.S., $P < 0.05$, $n = 3$).

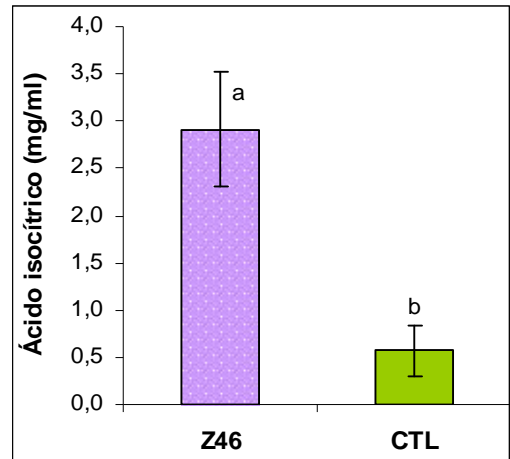


Figura IV-15: Concentración de ácido isocítrico en zumo del genotipo Z46 (■) y su control (■) en noviembre 225 DDA. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\mu \pm$ E.S., $P < 0.05$, $n = 3$).

La concentración de ácido cítrico en los frutos de Z46 fue mayor respecto a Clementina de Nules un 38.49%, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.02$) (Figura IV-14). La concentración de ácido isocítrico en Z46 fue de 2.91 mg/ml valor significativamente superior ($P < 0.05$) a 0.57 mg/ml del control (Figura IV-15) mientras que la concentración del ácido málico fue similar al control (datos no mostrados). La concentración de ácido succínico y ácido fumárico en Z46 fueron mayores significativamente ($P < 0.04$) a Clementina de Nules (Figura IV-16 y IV-17).

En el mutante Z46, la mayor concentración de ácidos en el fruto probablemente generó un ambiente oxidativo que podría ser causa de la inducción observada de mecanismos **antioxidantes** para contrarrestarlo, como la expresión del gen que codifica para ascorbato peroxidasa (EC 1.11.1.11).

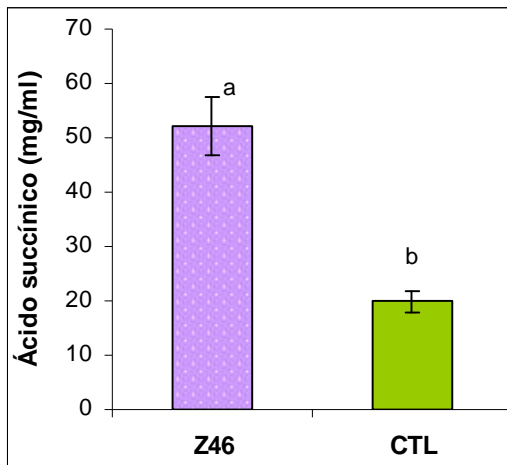


Figura IV-16: Concentración de ácido succínico en zumo del genotipo Z46 (■) y su control (■) en noviembre 225 DDA. Letras diferentes indican **diferencias significativas** ($\mu \pm$ E.S., $P < 0.05$, $n = 3$).

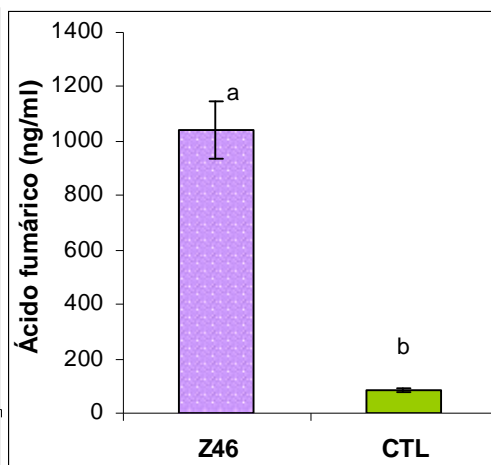


Figura IV-17: Concentración de ácido fumárico en zumo del genotipo Z46 (■) y su control (■) en noviembre 225 DDA. Letras diferentes indican **diferencias significativas** ($\mu \pm$ E.S., $P < 0.05$, $n = 3$).

El genotipo Z46 mostró una concentración de SST (°Brix) superior al control (vease III 3.3.1). Los azúcares mayoritarios del zumo son: fructosa, glucosa y sacarosa (Agustí 2003). Sin embargo pese a tener mayor contenido en °Brix, la concentración en zumo de fructosa, glucosa y sacarosa no mostró diferencias significativas ($P < 0.05$) respecto a su parental (Figura IV-18).

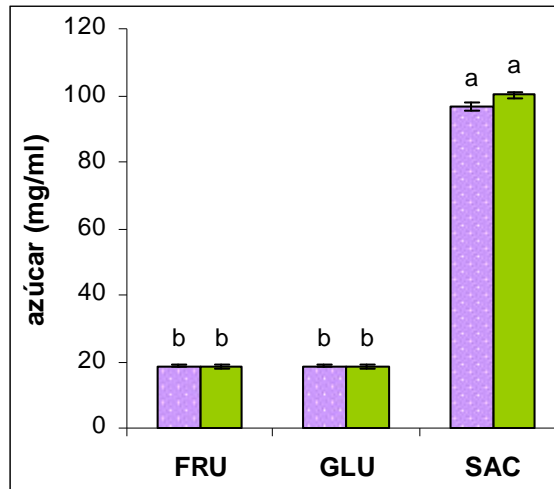


Figura IV-18: Concentración de fructosa (FRU), glucosa (GLU) y sacarosa (SAC) en zumo del genotipo Z46 (■) y su control (■) en noviembre 225 DDA. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\mu \pm E.S.$, $P < 0.05$, $n=3$).

La síntesis de carbohidratos se produce principalmente en la fotosíntesis y rubisco es la enzima clave en la fijación del carbono. El CO_2 se une a pentosa ribulosa-1,5-bisfosfato gracias a rubisco (EC 4.1.1.39) sintetizando ácido-3-fosfoglicérico que en el citosol origina glucosa y fructosa vía gluconeogénesis. Los resultados del análisis del transcriptoma sugirieron que en el genotipo Z46, rubisco y los últimos pasos de la **gluconeogénesis** que dan lugar a glucosa y fructosa se encontraron inhibidos. Por otro lado, α -D-Glucosa-6P, compuesto intermedio de la gluconeogénesis parece que fue derivada a la síntesis de inositol mediante la inducción de inositol-3P-sintasa (EC 5.5.1.4). El inositol, otro azúcar presente en los zumos, mostró una concentración superior en el mutante Z46 que en el control

(11.01 mg/ml y 2.01 mg/ml respectivamente) (Figura IV-19) apoyando los resultados obtenidos de expresión génica.

La suma de fructosa, glucosa, sacarosa e inositol en el mutante Z46 fue significativamente mayor al control ($P < 0,05$) (Figura IV-20), resultando coherente con el mayor contenido en °Brix determinado en este genotipo.

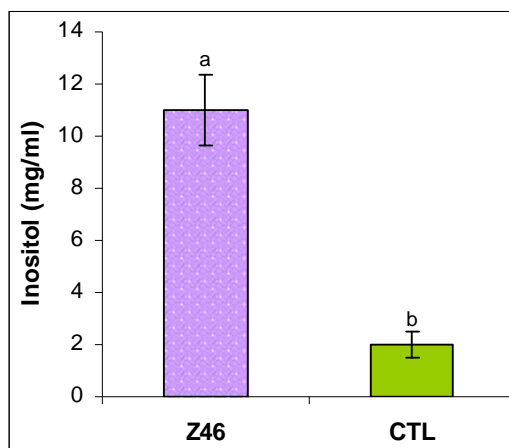


Figura IV-19: Concentración de inositol en zumo del genotipo Z46 (■) y su control (■) en noviembre 225 DDA. Letras diferentes indican **diferencias significativas** ($\mu \pm$ E.S., $P < 0.05$, $n=3$).

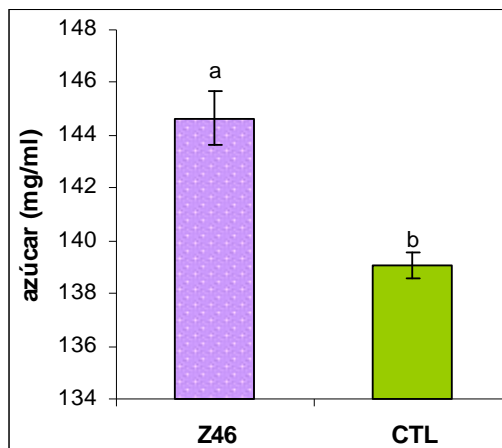


Figura IV-20: Concentración de la suma de fructosa, glucosa, sacarosa e inositol en zumo del genotipo Z46 (■) y su control (■) en noviembre 225 DDA. Letras diferentes indican **diferencias significativas** ($\mu \pm$ E.S., $P < 0.05$, $n=3$).

Los resultados anteriores muestran que el genotipo Z46 probablemente tiene reducida la ruta de **fijación de carbono**, la **síntesis de etileno** y la **degradación de ácido cítrico vía GABA**. Por otro lado parece presentar mecanismos **antioxidantes** inducidos así como la síntesis de ácido cítrico en el **ciclo de los ácidos tricarbóxicos**. En resumen, en el mutante Z46 los resultados de expresión génica son coherentes con las concentraciones de ácidos y

azúcares cuantificados. Las concentraciones de ácido cítrico, ácido isocítrico, ácido succínico y ácido fumárico son superiores a Clementina de Nules. La concentración de fructosa, glucosa y sacarosa son similares mientras que la concentración de inositol es superior a Clementina de Nules.

La figura siguiente resume la expresión génica asociada al metabolismo de los ácidos en el mutante Z46 (Figura IV-21)

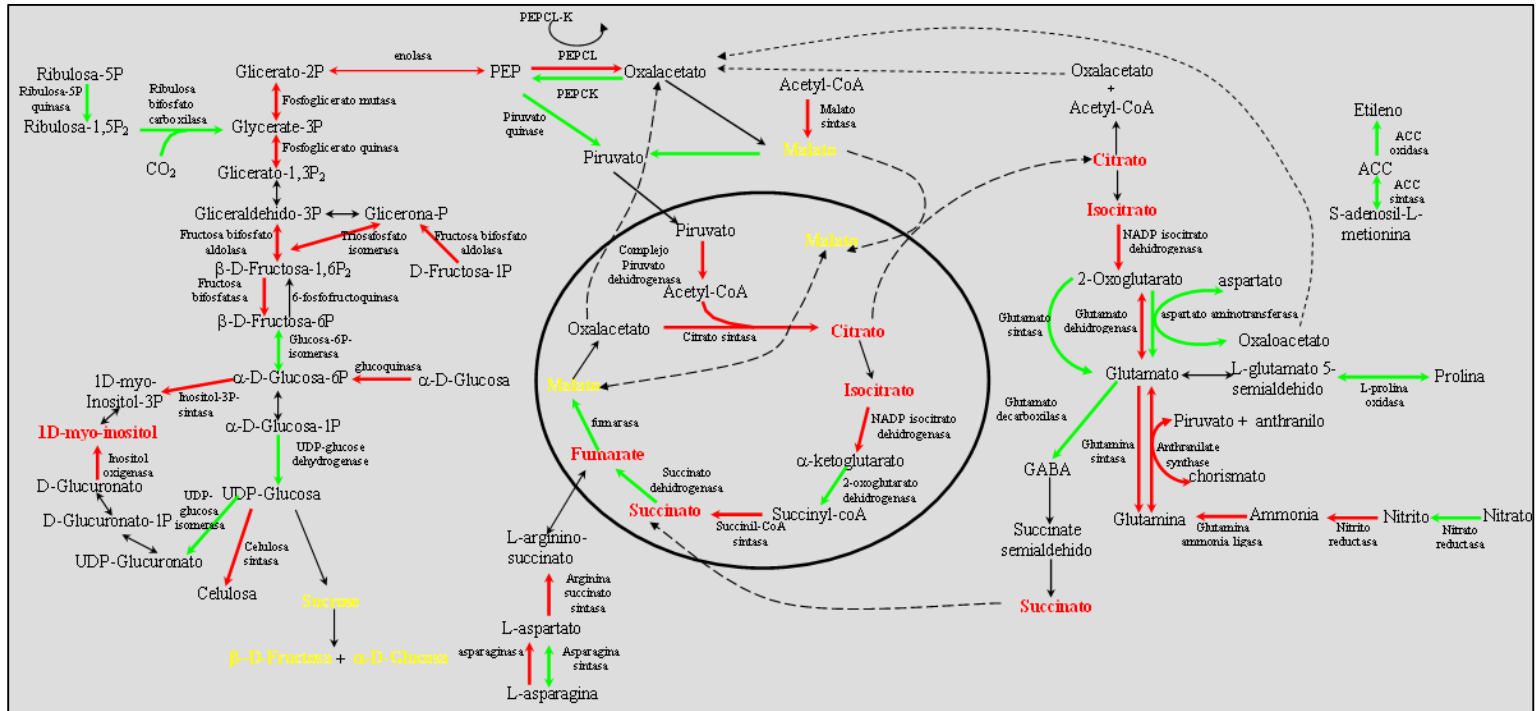


Figura IV-21: Alteraciones de la expresión génica y de algunos metabolitos en el genotipo Z46 respecto a Clementina de Nules en noviembre 225 DDA ($P < 0,05$). Verde= expresión génica inhibida/menor concentración de metabolito. Rojo= expresión génica inducida/mayor concentración de metabolito. Amarillo= similar concentración de metabolito.

IV.3.3.3. D11.

D11 se caracteriza por presentar una acidez en el zumo inferior a Clementina de Nules sin observarse diferencias significativas ($P < 0.05$) en los demás valores fenotípicos estudiados (vease III. 3.3.2).

Se estudiaron los cambios en el transcriptoma del genotipo D11 durante una campaña, en septiembre y noviembre. Se analizaron los resultados considerándose como réplicas las hibridaciones de septiembre y de noviembre, estudiando las rutas cuya alteración resultó similar en las dos fechas. El número de sondas expresadas diferencialmente ($FDR < 0.05$) fue de 1441: 357 inducidas y 984 inhibidas respecto a Clementina de Nules.

El análisis del transcriptoma del genotipo D11 sugirió cambios en la expresión génica de varias rutas destacándose el **ciclo de los ácidos tricarbóxicos**, la **glicólisis/gluconeogénesis** y la **síntesis de etileno**. De esta última, al contrario que en Z46, se encontraron inducidos los dos últimos pasos en la síntesis de etileno: la expresión de ACC oxidasa (EC 1.14.17.4) y ACC sintasa (EC 4.4.1.14), sugiriendo un adelanto en la maduración del fruto.

Varios genes del **ciclo de los ácidos tricarbóxicos** se encontraron inhibidos: piruvato dehidrogenasa (EC 1.2.4.1), isocitrato dehidrogenasa (EC 1.1.1.42), 2-oxoglutarato dehidrogenasa (EC 1.2.4.2), succinato dehidrogenasa (EC 1.3.99.1) y malato dehidrogenasa (EC 1.1.1.37). De los ácidos participantes en el ciclo, la concentración de ácido cítrico y ácido fumárico en el zumo fue un 21,23% y un 28,89% significativamente menor ($P < 0,05$) respecto a Clementina de Nules (Figura IV-22 y IV-23).

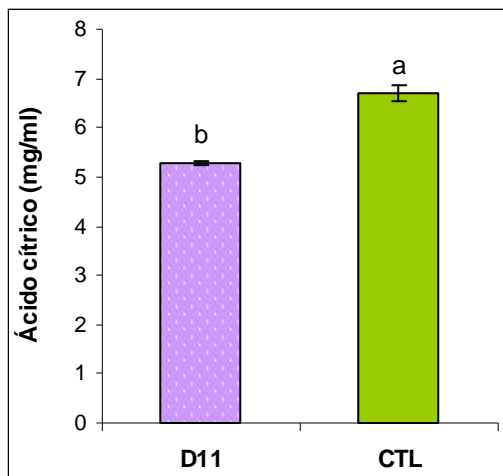


Figura IV-22: Concentración de ácido cítrico en zumo del genotipo D11 (■) y su control (■) en noviembre 225 DDA. Letras diferentes indican **diferencias significativas** ($\mu \pm$ E.S., $P < 0.05$, $n = 3$).

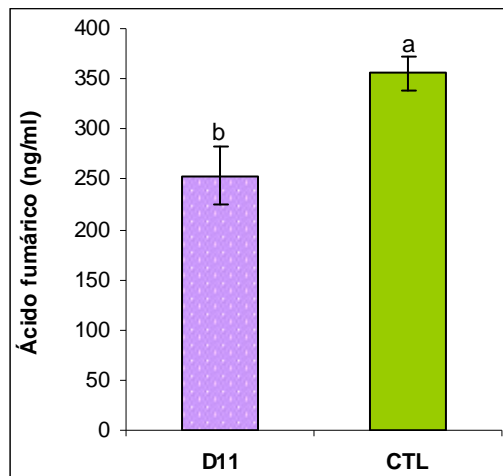


Figura IV-23: Concentración de ácido fumárico en zumo del genotipo D11 (■) y su control (■) en noviembre 225 DDA. Letras diferentes indican **diferencias significativas** ($\mu \pm$ E.S., $P < 0.05$, $n = 3$).

De la **ruta de degradación de citrato vía GABA** también se encontraron inhibidas la expresión de los genes que codifican para glutamato sintasa (EC 1.4.7.1) y GABA aminotransferasa (EC 2.6.1.19) así como reacciones adyacentes como la expresión de aspartato aminotransferasa (EC 2.6.1.1) que sintetiza glutamato y oxalacetato a partir de aspartato y 2-oxoglutarato, la conversión de glutamato a glutamina mediante glutamina sintasa (EC 6.3.1.2) o anthranilato sintasa (EC 4.1.3.27). Paralelamente se observó una sobreexpresión de isocitrato liasa (EC 4.1.3.2) que cataliza la conversión de ácido isocítrico en glioxilato y succinato. De hecho, la concentración de ácido succínico en el zumo en el genotipo D11 fue más de 12 veces superior que en Clementina de Nules (Figura IV-24).

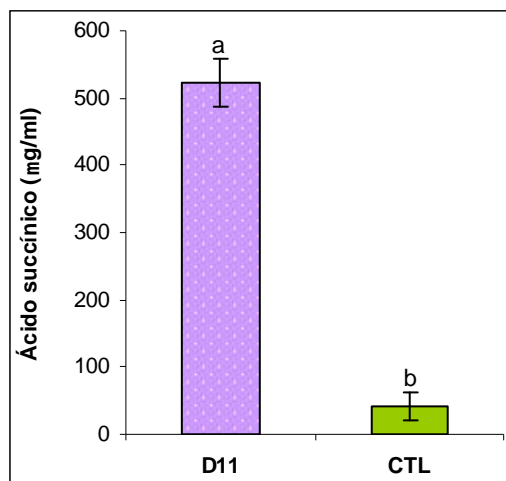


Figura IV-24: Concentración de ácido succínico en zumo del genotipo D11 (■) y su control (■) en noviembre 225 DDA. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\mu \pm$ E.S., $P < 0.05$, $n=3$).

Pese a que la concentración de ácido succínico en el genotipo D11 fue significativamente superior a Clementina de Nules, la suma total de ácidos continuó siendo inferior porque la contribución de este ácido a la acidez total es muy baja. La menor concentración de ácidos en el fruto podría relacionarse con la inhibición de mecanismos **antioxidantes**. De hecho, en la pulpa del mutante D11 se inhibieron monodehidroascorbato reductasa (EC 1.6.5.4) y glutatión dehidrogenasa (EC 1.8.5.1) ambas involucradas en mecanismos de defensa frente a estrés oxidativo (Gill y Tuteja 2010).

En este mutante, las primeras reacciones de la ruta de la **gluconeogénesis** parece que se encontraron inhibidas (Figura IV-27). La concentración de sacarosa en el zumo fue significativamente menor ($P < 0,05$) mientras que las concentraciones de fructosa y glucosa fueron similares a Clementina de Nules (Figura IV-25).

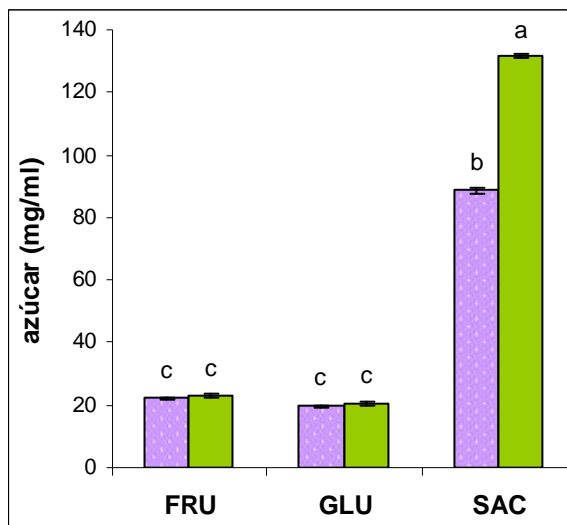


Figura IV-25: Concentración de fructosa (FRU), glucosa (GLU) y sacarosa (SAC) en zumo del genotipo D11 (■) y su control (■) en noviembre 225 DDA. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\mu \pm E.S.$, $P < 0.05$, $n=3$).

Otra ruta que particularmente se vió alterada en el genotipo D11 fue el **metabolismo del ácido α -linolénico**. Las lipoxigenasas son enzimas que actúan en esta ruta y que están involucradas específicamente en la maduración contribuyendo a una menor firmeza del fruto (Kurt 1997) y a la transformación de lípidos en aromas (Leone y cols 2006). En el genotipo D11 la expresión de lipoxigenasa (EC 1.13.11.12) y de hidropéroxido hidratasa (EC 4.2.1.92) se encontraron inducidas (Figura IV-26).

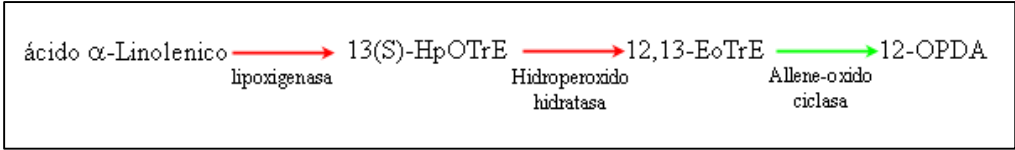


Figura IV-26: Esquema de las reacciones catalizadas por lipoxigenasa, hidroperoxido hidratasa y allene-oxido ciclasa en el metabolismo del ácido linolénico en el mutante D11. Rojo= inducción de la expresión génica, Verde=represión de la expresión génica.

Del estudio del transcriptoma de D11 se puede sugerir que la síntesis de ácido cítrico está inhibida en el **ciclo de los ácidos tricarboxílicos** así como la **ruta de degradación vía GABA**, los primeros pasos de la **gluconeogénesis** y algunos mecanismos **antioxidantes**. Por otro lado parece inducirse el **metabolismo del ácido α -linolénico**, la **síntesis de etileno** y la **síntesis de succinato** a partir de isocitrato. Los resultados de expresión génica son coherentes con la cuantificación de azúcares y ácidos. El zumo de los frutos del mutante D11 contiene igual cantidad de fructosa y glucosa, más sacarosa, menos ácido cítrico, menos ácido fumárico y más ácido succínico que Clementina de Nules. La Figura IV-27 resume los resultados de expresión génica asociado al metabolismo de los ácidos en el genotipo D11.

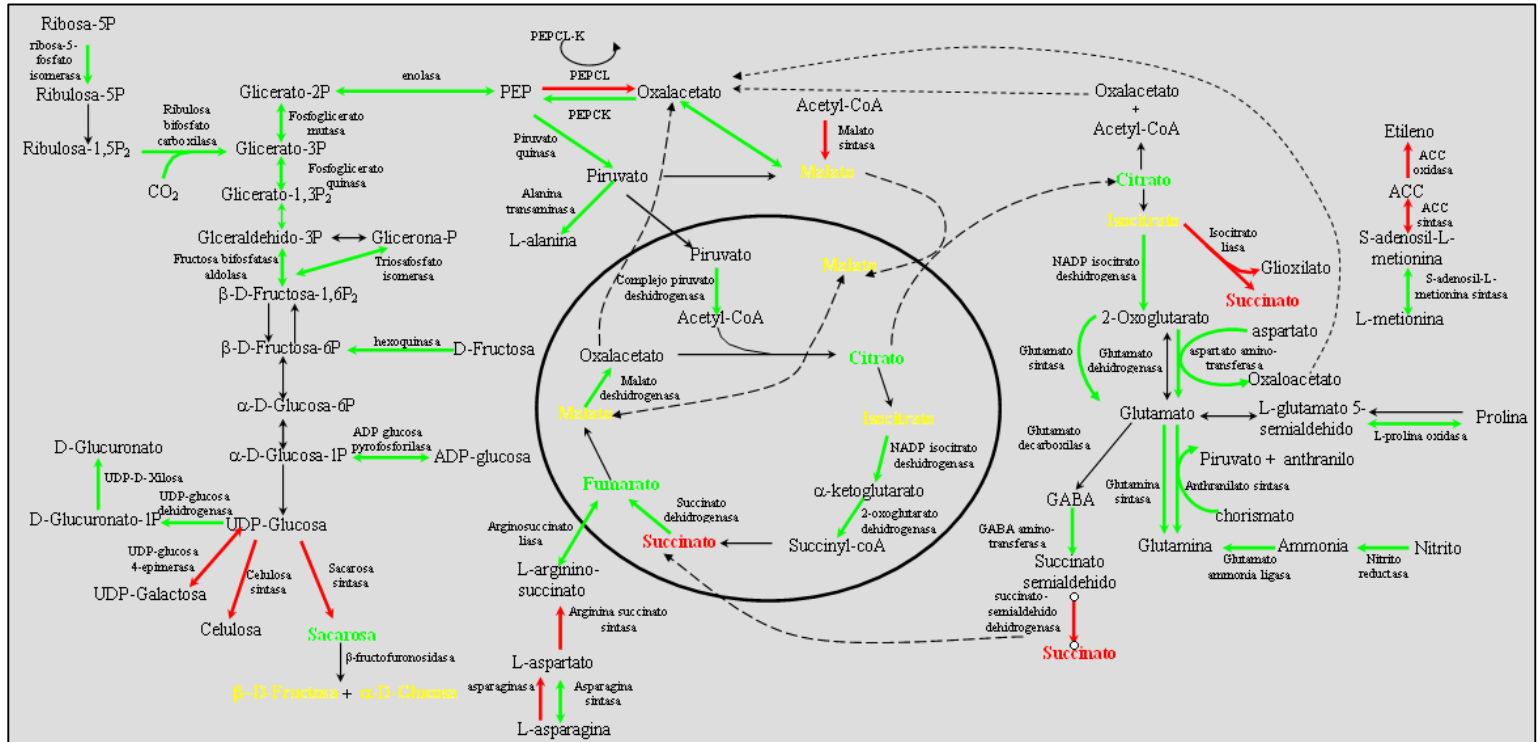


Figura IV-27: Alteraciones de la expresión génica y de algunos metabolitos en el genotipo D11 respecto a Clementina de Nules ($P < 0,05$).
Verde= expresión génica inhibida/menor concentración de metabolito.
Rojo= expresión génica inducida/mayor concentración de metabolito.
Amarillo= similar concentración de metabolito.

IV.3.3.4. I09.

El genotipo de I09 se caracteriza por una acidez en zumo superior y un índice de madurez interna inferior a Clementina de Nules.

Se cuantificaron los principales ácidos y azúcares del zumo de los cítricos y se estudiaron los cambios en el transcriptoma del genotipo I09 durante una campaña considerándose como réplicas las hibridaciones realizadas en octubre y noviembre. Se estudiaron las rutas cuya alteración resultó similar en las dos fechas. El número de sondas expresadas diferencialmente ($FDR < 0.05$) fue de 2378: 1037 inducidas y 1341 inhibidas respecto a Clementina de Nules.

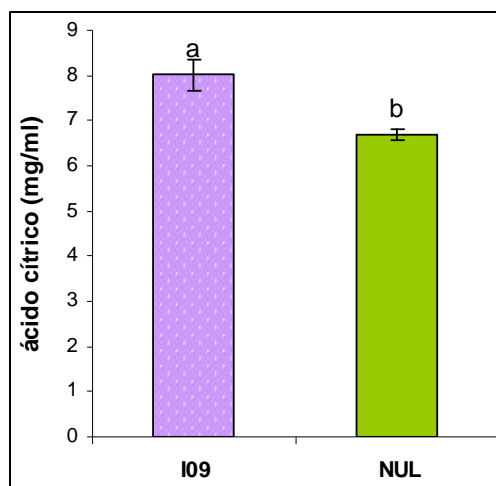


Figura IV-28: Concentración de ácido cítrico en zumo del genotipo I09 (■) y su control (■) en noviembre 225 DDA. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\mu \pm E.S.$, $P < 0.05$, $n=3$).

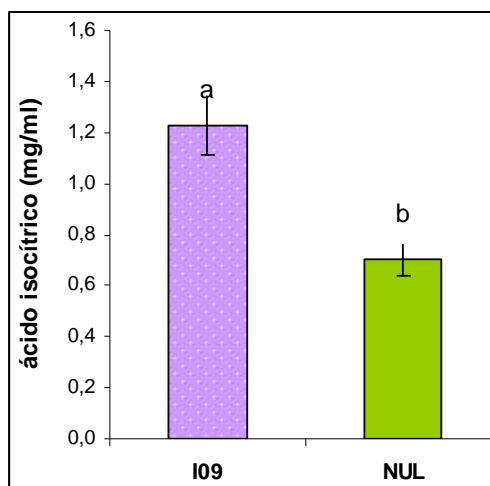


Figura IV-29: Concentración de ácido isocítrico en zumo del genotipo I09 (■) y su control (■) en noviembre 225 DDA. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\mu \pm E.S.$, $P < 0.05$, $n=3$).

Aunque no se observó alteración en la síntesis de ácido cítrico en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos se encontraron inhibidos varios genes de la **ruta de degradación vía GABA**: glutamato sintasa (EC 1.4.7.1) y GABA aminotransferasa (EC

2.6.1.19). Esta inhibición podría haber contribuido a la acumulación de ácido cítrico y ácido isocítrico en el zumo de I09 (Figura IV-28 y IV-29). Así, la concentración en los frutos del mutante I09 de ácido cítrico y de ácido isocítrico fue un 19,49% y un 75,15% significativamente mayor ($P<0.05$) al control (Figura IV-28 y IV-29). Por el contrario, la concentración de ácido fumárico en I09 fue un 38,8% significativamente inferior ($P<0,05$) a Clementina de Nules (Figura IV-30). Los contenidos de ácido málico y ácido succínico en el zumo de I09 fueron similares al control (ver Anexo VII).

El menor contenido de ácido fumárico en el zumo resultó coherente con la inhibición observada de succinato dehidrogenasa (EC 1.3.99.1) que cataliza la conversión de succinato en fumarato así como de arginosuccinato liasa (EC 4.3.2.1) que cataliza la conversión de L-arginino-succinato en fumarato.

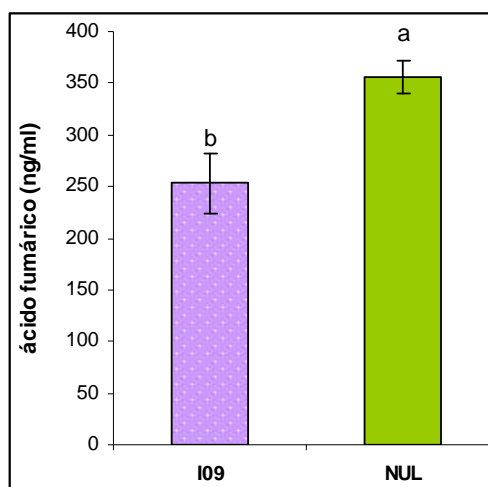


Figura IV-30: Concentración de ácido fumárico en zumo del genotipo I09 (■) y su control (■) en noviembre 225 DDA. Letras diferentes indican **diferencias significativas** ($\mu \pm$ E.S., $P<0.05$, $n=3$).

La **gluconeogénesis**, otra de las principales rutas estudiadas, también se encontró inhibida en I09. En esta ruta se sintetizan glucosa y sacarosa. La concentración de glucosa en el zumo de I09 fue un 10,3% menor que Clementina de Nules (Figura IV-31) mientras que la de sacarosa fue mayor un 16,9%, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) (Figura IV-32). Estando inhibida la gluconeogénesis, la mayor concentración en glucosa podría deberse a su síntesis a partir de maltosa ya que la expresión de α -glucosidasa (EC 3.2.1.20) que sintetiza α -D-glucosa a partir de maltosa se encontraron inducidas en I09 respecto a Clementina de Nules.

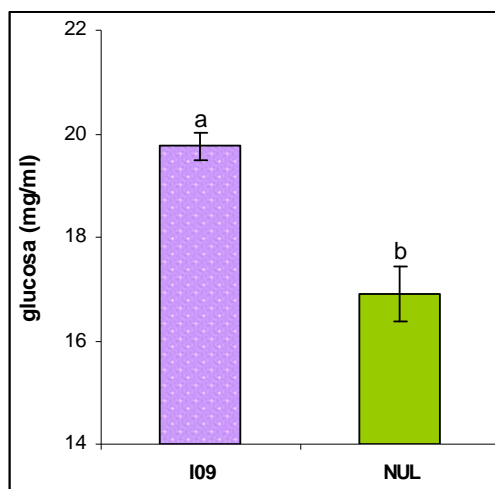


Figura IV-30: Concentración de glucosa en zumo del genotipo I09 (■) y su control (■) en noviembre 225 DDA. Letras diferentes indican **diferencias significativas** ($\mu \pm$ E.S., $P < 0.05$, $n=3$).

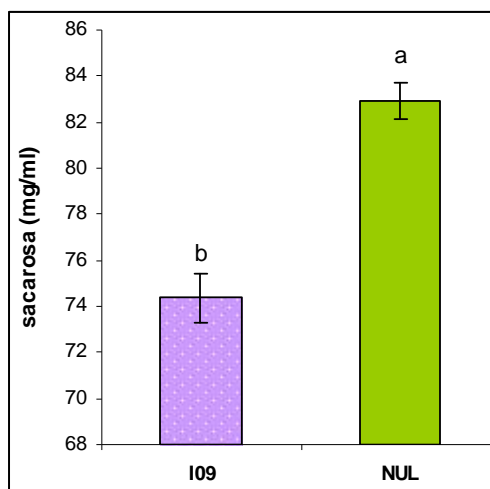


Figura IV-31: Concentración de sacarosa en zumo del genotipo I09 (■) y su control (■) en noviembre 225 DDA. Letras diferentes indican **diferencias significativas** ($\mu \pm$ E.S., $P < 0.05$, $n=3$).

En resumen, el genotipo I09 parece tener reducido el **ciclo de los ácidos tricarboxílicos**, la **degradación de ácido cítrico vía GABA** y la **gluconeogénesis**. Los resultados de expresión génica en el mutante I09 resultan coherentes con la concentración de ácidos y azúcares cuantificados. Los resultados de expresión génica asociados al metabolismo de los ácidos y de los azúcares del mutante I09 se resumen en la Figura IV-32.

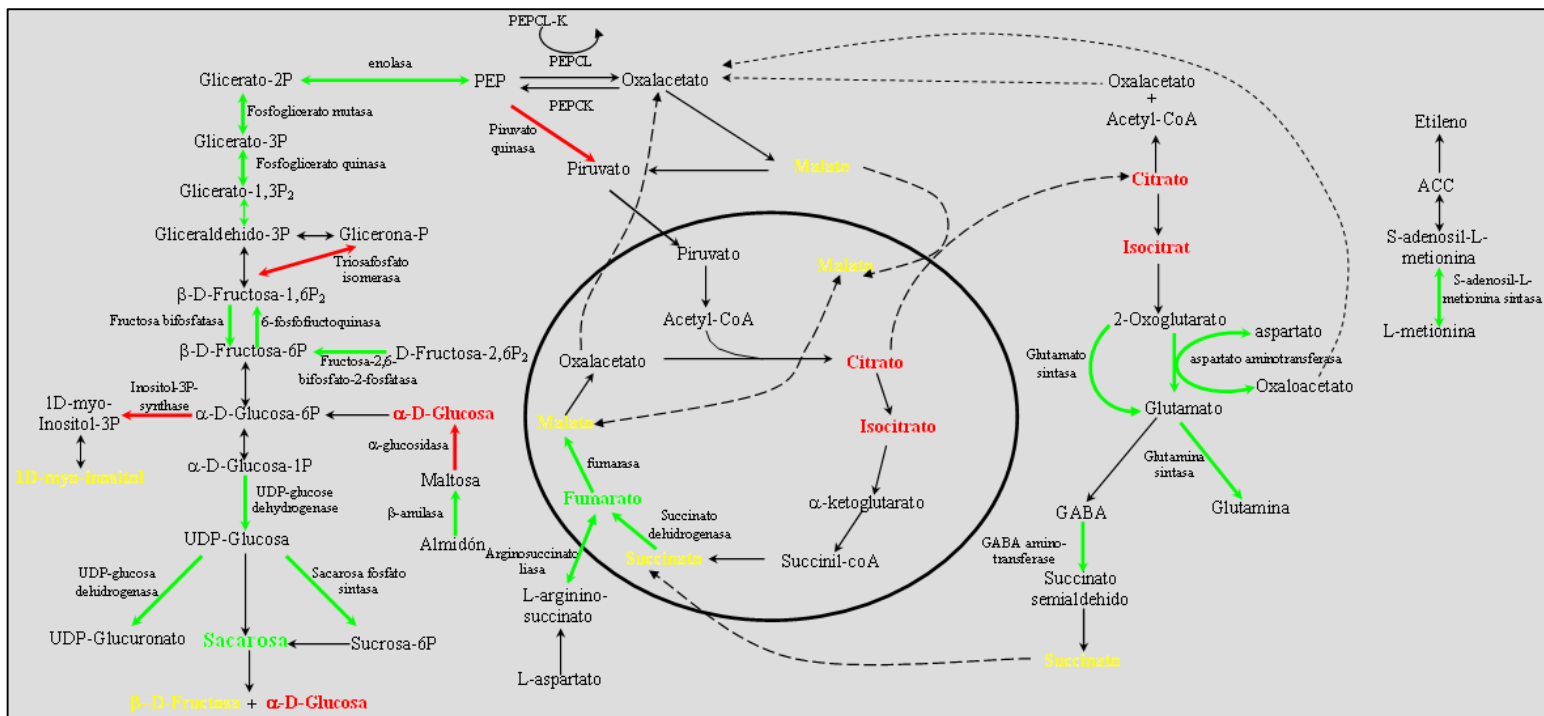


Figura IV-32: Alteraciones de la expresión génica y de algunos metabolitos en el genotipo I09 respecto a Clementina de Nules ($P < 0,05$).

Verde= expresión génica inhibida/menor concentración de metabolito.

Rojo= expresión génica inducida/mayor concentración de metabolito.

Amarillo= similar concentración de metabolito.

IV.3.3.5. H03.

El genotipo H03 se caracteriza por una menor acidez y un menor contenido de SST en el zumo (vease apartado III.3.3.4).

Durante una campaña, en septiembre y noviembre, se estudiaron las rutas que estuvieron alteradas de forma similar en las dos fechas. El número de sondas expresadas diferencialmente ($FDR < 0.05$) fue de 2750: 1307 inducidas y 1443 inhibidas respecto a Clementina de Nules.

Se encontraron reprimidos varios genes del **ciclo de los ácidos tricarboxílicos**: piruvato dehidrogenasa (EC 1.2.4.1), aconitasa (EC 4.2.1.3), lipoico transsuccinasa (EC 2.3.1.61), succinato dehidrogenasa (EC 1.3.99.1) y malato dehidrogenasa (EC 1.1.1.37). Esto sugiere una represión de la síntesis de ácidos en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. También se inhibieron los genes que codifican para aconitasa y glutamato decarboxilasa, involucradas en la **degradación de ácido cítrico vía GABA**.

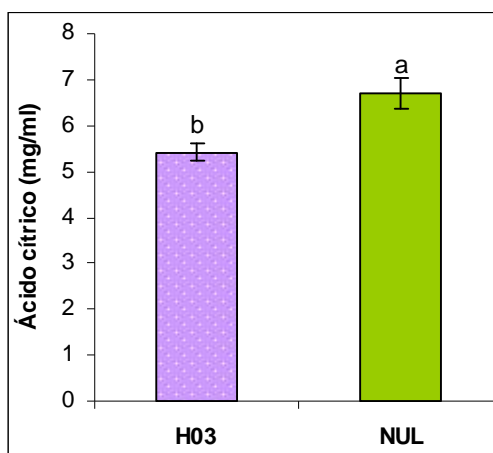


Figura IV-33: Concentración de ácido cítrico en zumo del genotipo H03 (■) y su control (■) en noviembre 225 DDA. Letras diferentes indican **diferencias significativas** ($\mu \pm$ E.S., $P < 0.05$, $n=3$).

La concentración de ácido cítrico en el zumo de H03 fue de 5,42 g/l, significativamente menor ($P<0,05$) a los 6,71 g/l del control (Figura IV-33).

Las concentraciones de ácido fumárico y ácido succínico fueron respectivamente tres y nueve veces superiores al control, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($P<0,05$) (Figura IV-34 y IV-35) mientras que las concentraciones de ácido málico y de ácido isocítrico fueron similares (ver Anexo VIII).

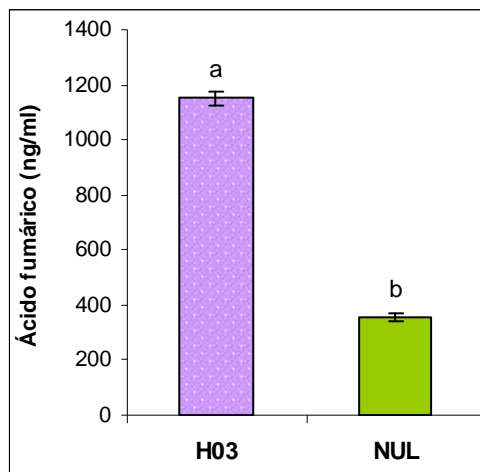


Figura IV-34: Concentración de ácido fumárico en zumo del genotipo H03 (■) y su control (■) en noviembre 225 DDA. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\mu \pm$ E.S., $P<0.05$, $n=3$).

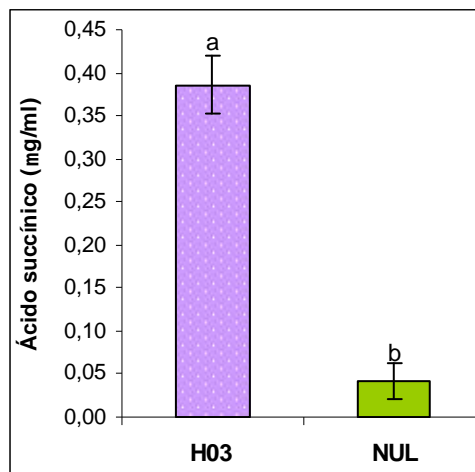


Figura IV-35: Concentración de ácido succínico en zumo del genotipo H03 (■) y su control (■) en noviembre 225 DDA. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\mu \pm$ E.S., $P<0.05$, $n=3$).

La mayor concentración de ácido succínico en el zumo se relacionó con la inducción observada en el mutante H03 de isocitrato liasa (EC 4.1.3.1) que sintetiza succinato a partir de isocitrato, activándose así otra ruta de degradación del ácido cítrico además de la vía GABA.

La contribución de ácido fumárico y de ácido succínico a la acidez total, es muy pequeña comparándola con la de ácido cítrico o

ácido málico, por tanto, pese a que la concentración de ácido succínico y ácido fumárico fue mayor en H03 la acidez fue significativamente menor ($P < 0,05$) (Figura IV-36).

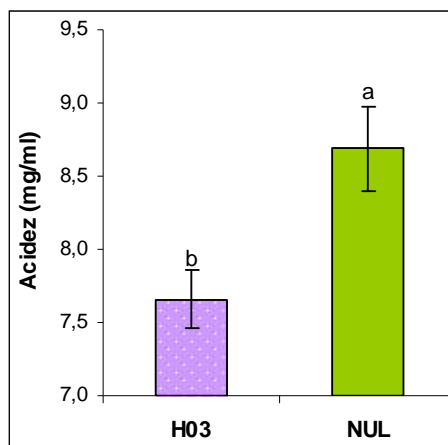


Figura IV-36: Suma de las concentraciones de ácido cítrico, ácido isocítrico, ácido málico, ácido fumárico y ácido succínico en zumo del genotipo H03 (■) y su control (■) en noviembre 225 DDA. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\mu \pm$ E.S., $P < 0.05$, $n=3$).

El pH ácido de los frutos cítricos probablemente desencadena mecanismos **antioxidantes** para su regulación como ascorbato peroxidasa (EC 1.11.1.11). H03 es un genotipo con frutos menos ácidos que Clementina de Nules y al contrario que en los genotipos de acidez alta: Z46 e I09, en H03 la expresión génica de ascorbato peroxidasa se reprimió.

La **glicólisis** y la **gluconeogénesis** también se reprimieron. La inhibición de la ruta de la gluconeogénesis fue coherente tanto con el menor contenido en SST (°Brix) del fruto como con la cuantificación de los azúcares mayoritarios. En H03 la concentración de fructosa, glucosa, sacarosa fue un 31.21% un 23.04% y un 75.73% inferior

respectivamente comparándolo con el control (Figura IV-37). Así como en Z46 la concentración de inositol fue superior al control, en H03 la concentración fue similar (ver Anexo VIII). La diferencia parece deberse a que en Z46 varios genes relacionados con el metabolismo del inositol se encontraron alterados y en H03 no.

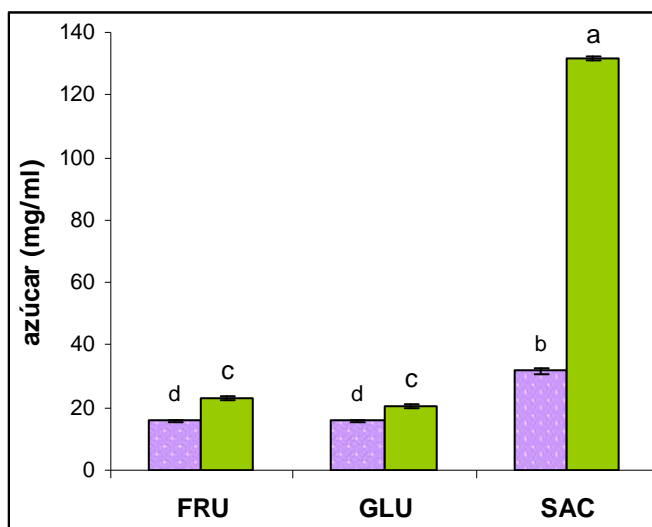


Figura IV-37: Concentración de fructosa (FRU), glucosa (GLU) y sacarosa (SAC) del zumo del genotipo H03 (■) y su control (■) en noviembre 225 DDA. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\mu \pm E.S.$, $P < 0.05$, $n=3$).

Los resultados anteriores muestran que el mutante H03 parece tener reducida la síntesis de ácido cítrico en el **ciclo de los ácidos tricarbóxicos**, así como **mecanismos antioxidantes** y la **gluconeogénesis**. Por otro lado la **síntesis de succinato** a partir de isocitrato parece encontrarse inducida. En resumen, en el mutante H03 las concentraciones de ácidos y azúcares cuantificados en zumo resultaron coherentes con los resultados de expresión génica. La Figura IV-38 resume la expresión génica asociada al metabolismo de los ácidos y los azúcares del genotipo H03.

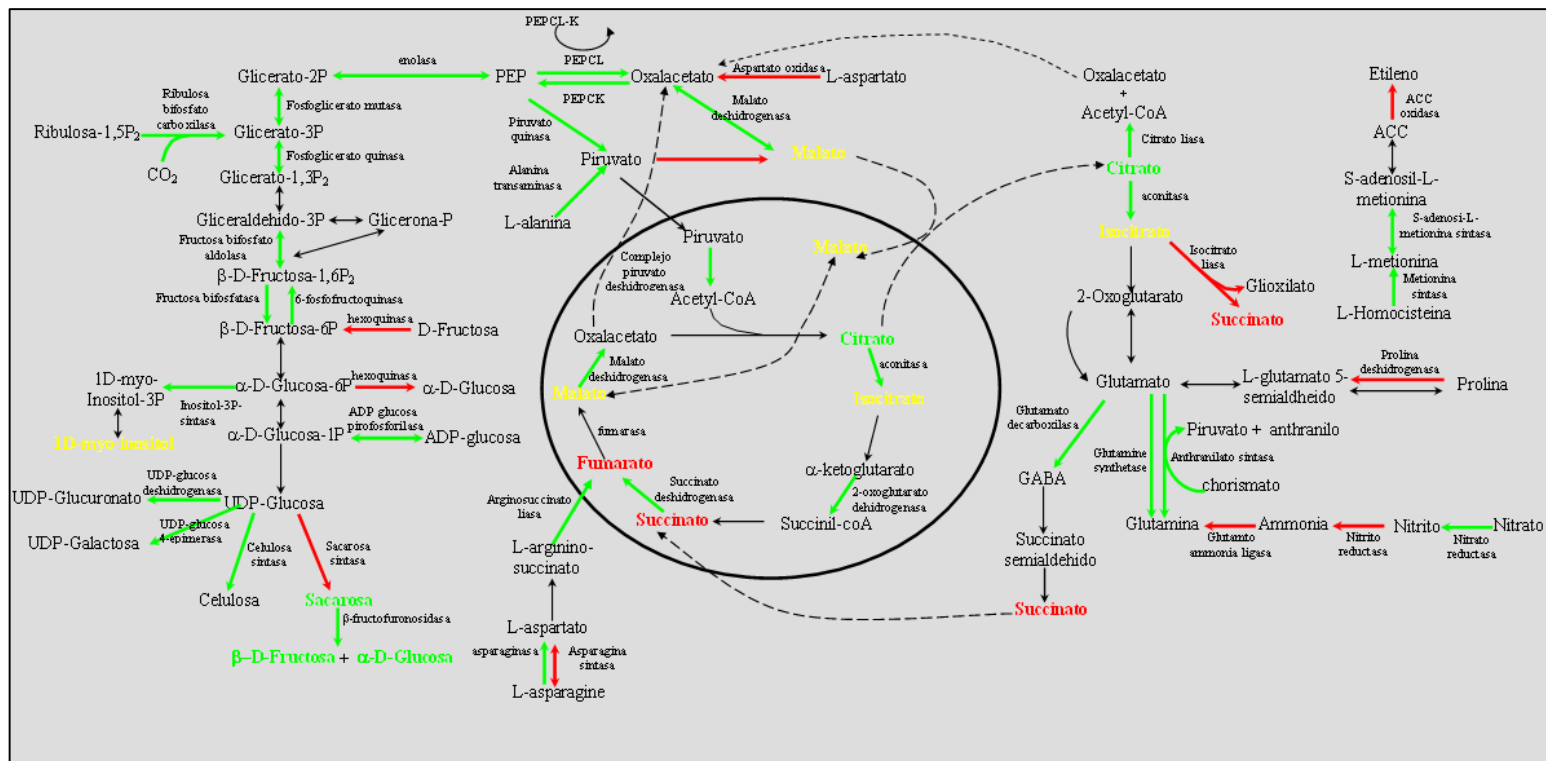


Figura IV-38: Alteraciones de la expresión génica y de algunos metabolitos en el genotipo H03 respecto a Clementina de Nules ($P < 0,05$).

Verde= expresión génica inhibida/menor concentración de metabolito.

Rojo= expresión génica inducida/mayor concentración de metabolito.

Amarillo= similar concentración de metabolito.

IV.3.3.6. J59.

El mutante J59 se caracteriza por un menor contenido en ácidos en el zumo y un mayor índice de madurez del fruto respecto a Clementina de Nules.

El número de sondas expresadas diferencialmente ($FDR < 0.05$) en noviembre (225 DDA) fue de 922: 82 inducidas y 840 inhibidas respecto a Clementina de Nules. Entre las principales rutas alteradas cabe destacar la **glicólisis**. Se observó inducción de una de sus enzimas específicas, 6-fosfofructoquinasa (EC 2.7.1.11). La inducción de la glicólisis que cataboliza azúcares y la represión de la **gluconeogénesis** que los sintetiza resultaron coherentes con el menor contenido en sacarosa en zumo del genotipo J59 respecto a Clementina de Nules (Figura IV-39).

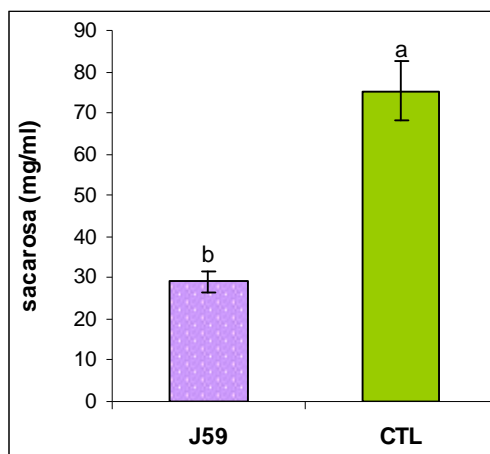


Figura IV-39: Concentración de sacarosa en zumo del genotipo J59 (■) y su control (■) en noviembre 225 DDA. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\mu \pm E.S.$, $P < 0.05$, $n=3$).

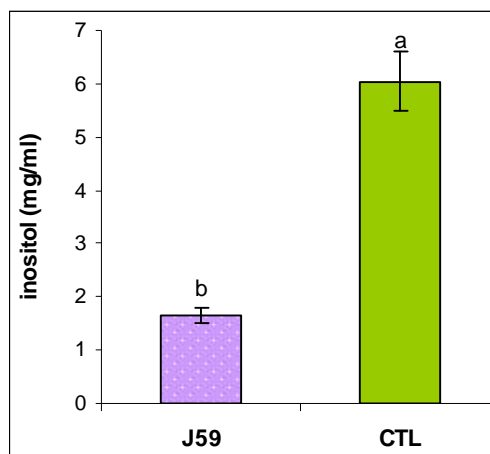


Figura IV-40: Concentración de inositol en zumo del genotipo J59 (■) y su control (■) en noviembre 225 DDA. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\mu \pm E.S.$, $P < 0.05$, $n=3$).

La concentración de fructosa y glucosa en J59 fueron similares a su parental (ver Anexo IX). La expresión del gen que

codifica para inositol 3P-sintasa (EC 5.5.1.4) que cataliza la conversión de α -D-glucosa-6P a 1D-myo-inositol-3P se reprimió en el mutante J59. El menor contenido de inositol en el zumo de J59 respecto a su control (Figura IV-40) resultó coherente con la represión del gen que codifica para inositol 3P-sintasa.

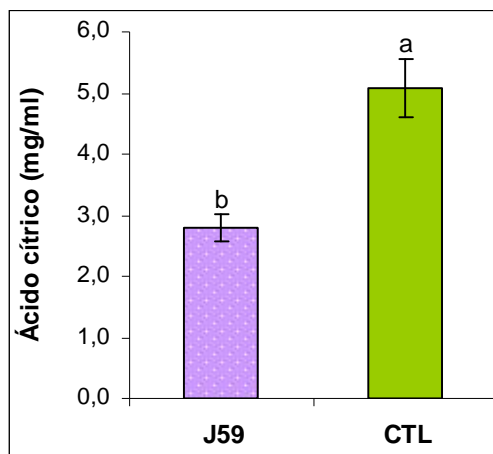


Figura IV-41: Concentración de ácido cítrico en zumo del genotipo J59 (■) y su control (■) en noviembre 225 DDA. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\mu \pm$ E.S., $P < 0.05$, $n=3$).

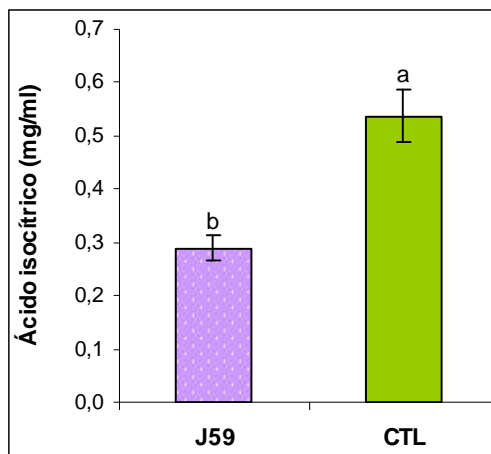


Figura IV-42: Concentración de ácido isocítrico en zumo del genotipo J59 (■) y su control (■) en noviembre 225 DDA. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\mu \pm$ E.S., $P < 0.05$, $n=3$).

El ciclo de los ácidos tricarboxílicos se reprimió en J59. La concentración de ácido cítrico, ácido málico y ácido isocítrico en el mutante J59 fueron respectivamente un 44,91%, 45,99% y 73,55% significativamente inferiores ($P < 0,05$) respecto a su control (Figura IV-41, IV-42 y IV-43).

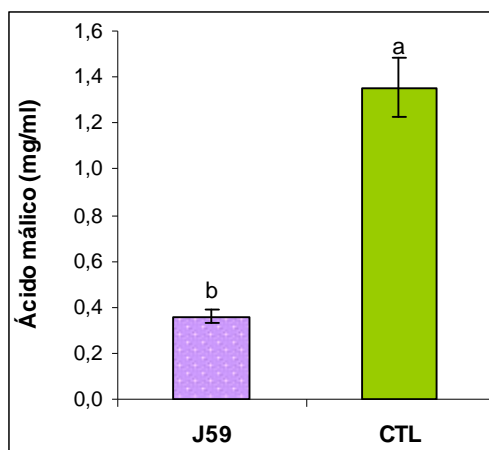


Figura IV-43: Concentración de ácido málico en zumo del genotipo J59 (■) y su control (■) en noviembre 225 DDA. Letras diferentes indican **diferencias significativas** ($\mu \pm$ E.S., $P < 0.05$, $n = 3$).

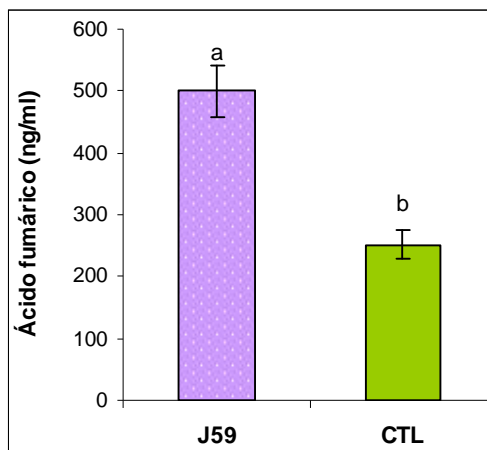


Figura IV-44: Concentración de ácido fumárico en zumo del genotipo J59 (■) y su control (■) en noviembre 225 DDA. Letras diferentes indican **diferencias significativas** ($\mu \pm$ E.S., $P < 0.05$, $n = 3$).

Aunque el contenido en zumo de ácido fumárico y ácido succínico en J59 fue 2 y 8 veces superior al control (Figura IV-44 y IV-45), su contribución a la acidez total fue minoritaria. Así, la suma de los ácidos continuó siendo significativamente inferior ($P < 0,05$) al control resultando coherente con el fenotipo de J59.

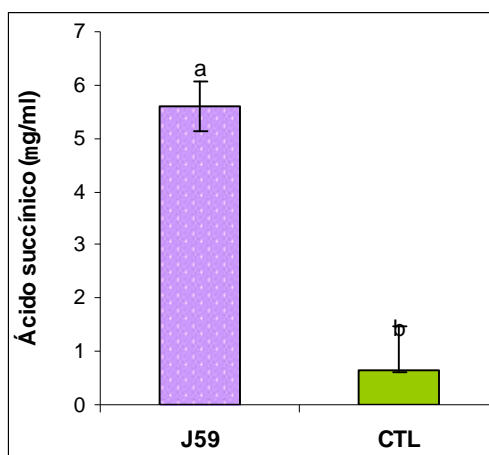


Figura IV-45: Concentración de ácido succínico en zumo del genotipo J59 (■) y su control (■) en noviembre 225 DDA. Letras diferentes indican **diferencias significativas** ($\mu \pm$ E.S., $P < 0.05$, $n = 3$).

La **biosíntesis de flavonoides** estuvo inhibida en J59 así como el primer paso de la **biosíntesis de antocianinas**. El genotipo J59 caracterizado por una menor acidez en el fruto durante su maduración mostró represión de la expresión de ascorbato peroxidasa (EC 1.11.1.11), enzima que se induce como respuesta a estrés. La menor acidez del fruto de J59 seguramente genera un ambiente menos estresante. En el mutante J59 se encontraron reprimidas la expresión de los genes que codifican para ascorbato peroxidasa, la síntesis de flavonoides y la síntesis de antocianinas (Figura IV-46).

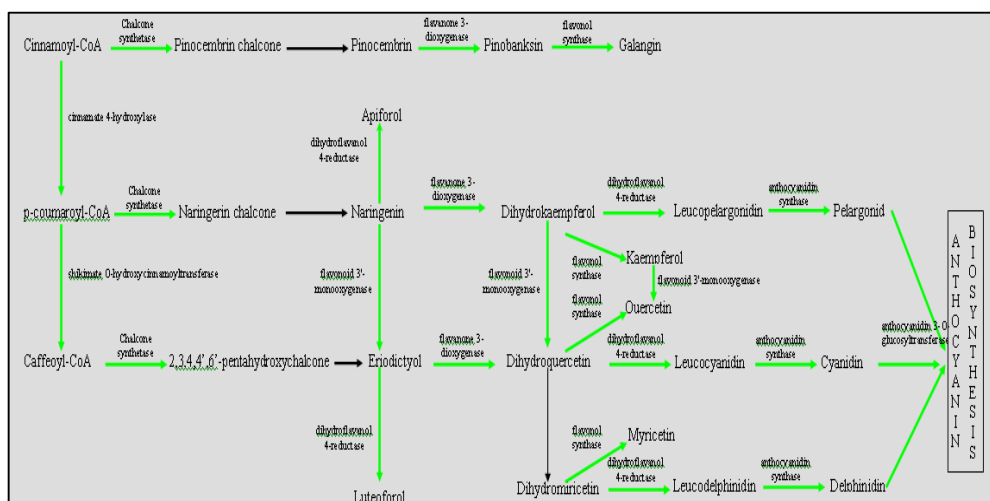


Figura IV-46: Ruta parcial de la biosíntesis de los flavonoides. Flechas en verde indican inhibición de la expresión génica en el genotipo J59 respecto a Clementina de Nules.

En resumen, en el mutante J59 parece tener inhibida la síntesis de ácido cítrico en el **ciclo de los ácidos tricarboxílicos**, **mecanismos antioxidantes** y la **gluconeogénesis**. Los resultados de expresión génica resultan coherentes con la concentración de ácidos y azúcares cuantificados en el zumo de J59. La Figura IV-47 resume la expresión génica del mutante J59 asociado al metabolismo de los ácidos.

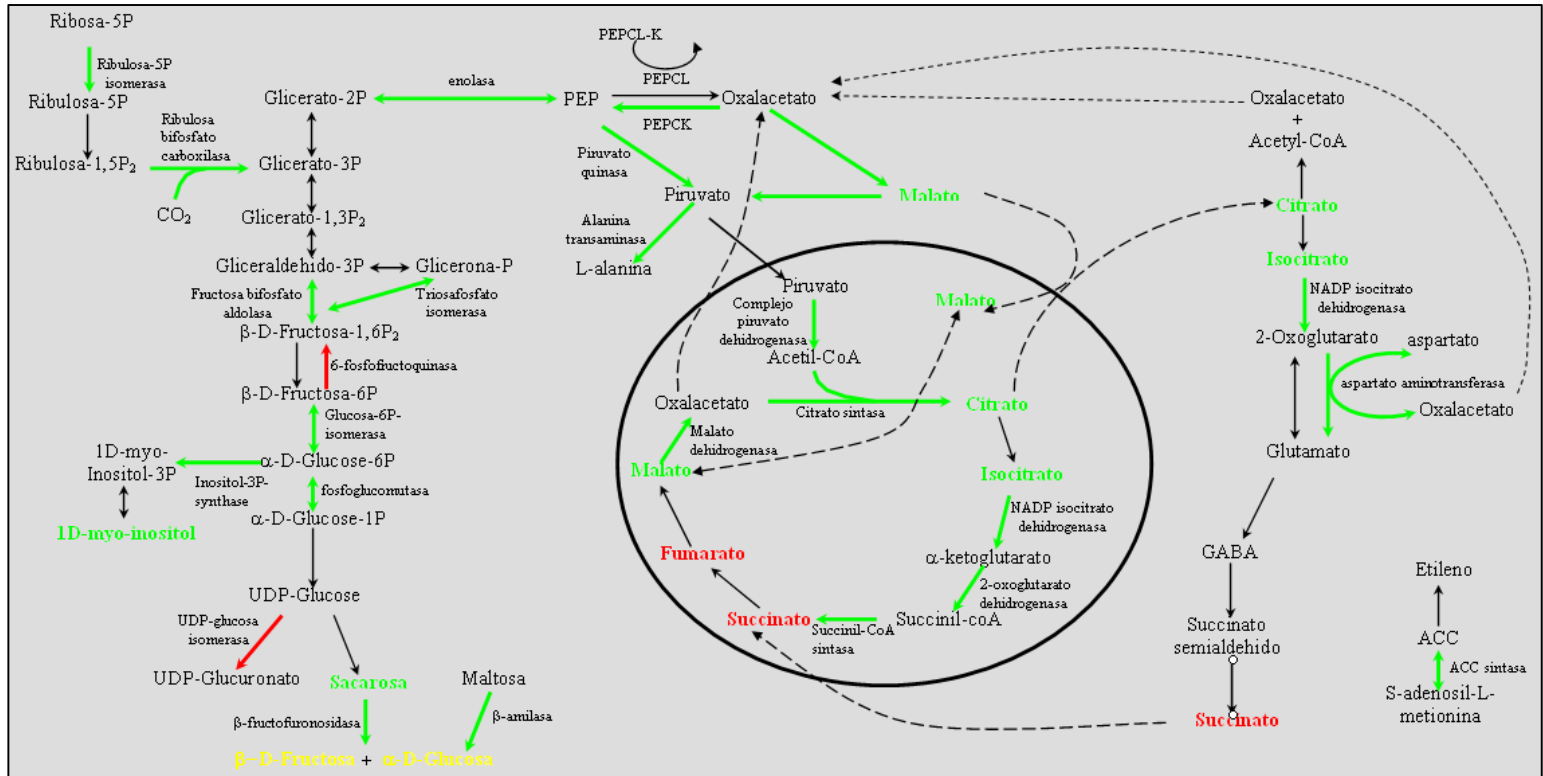


Figura IV-47: Alteraciones de la expresión génica y de algunos metabolitos en el genotipo J59 respecto a Clementina de Nules en noviembre 225 DDA ($P < 0,05$). Verde= expresión génica inhibida/menor concentración de metabolito. Rojo= expresión génica inducida/mayor concentración de metabolito. Amarillo= similar concentración de metabolito.

IV.4. Conclusiones.

- El análisis global de expresión génica y las determinaciones de ácidos y azúcares en 5 genotipos mutantes de Clementina de Nules con la concentración de estos compuestos alterada ha permitido identificar 161 genes correlacionados con los procesos de maduración del fruto.
- El análisis también permite sugerir que durante el periodo de maduración de septiembre a noviembre la síntesis de citrato se reduce. Por otro lado se incrementa el catabolismo del mismo a través de la activación de la ruta GABA y de las interconversiones mitocondriales. En paralelo se activa a su vez la gluconeogénesis y la síntesis de etileno.
- Es interesante señalar que la degradación de cítrico produce oxalacetato, uno de los substratos de fosfoenolpiruvato carboxiquinasa. Esta observación sugiere que se podría redirigir el flujo de carbono hacia la síntesis de azúcares, conectando ambos procesos.
- Las pertinentes comparaciones de cada uno de los 5 mutantes con este esquema anterior sugiere que:
 - a) El mutante Z46 que se caracteriza por una acidez elevada en sus frutos parece presentar una reducción de la ruta de degradación de GABA y una activación mitocondrial de la síntesis de citrato.
 - b) Los mutantes D11 y H03 que están ambos caracterizados por una reducción de la acidez en sus frutos parecen presentar una inhibición general de la síntesis y metabolismo del ácido cítrico.

- c) El mutante I09 que se caracteriza por una acidez elevada en sus frutos parece presentar una reducción de la actividad de la ruta de degradación de GABA.
- d) El mutante J59, también caracterizado por una reducción de la acidez en sus frutos, presenta unas alteraciones en la ruta del ácido cítrico semejantes a las de D11 y H03, aunque se diferencia de ellos por una fuerte represión de la síntesis de flavonoides.

**V. Mapeo de deleciones del genotipo Z46
en el genoma de Clementina mediante
CGH y FISH.**

V. Mapeo de deleciones del genotipo Z46 en el genoma de Clementina mediante aCGH y FISH.

V.1. Introducción:

El genotipo Z46 procede de una irradiación con neutrones rápidos a la dosis de 10 Gy. Los neutrones rápidos son mutágenos físicos que generan deleciones genómicas (Kodym y cols 2003). Por tanto es esperable que el genotipo sea hemicigótico, es decir, que uno de los dos cromosomas homólogos no tenga parte de su secuencia génica. La naturaleza del tipo de daño esperable en el genoma de este mutante condicionó la utilización de determinadas herramientas genómicas para su detección. Mientras que por un lado impidió el uso de métodos de sustracción genómica por otro permitió una estrategia basada en la hibridación con micromatrices. El éxito en la detección de genes mutados depende de la proporción de genoma que cubra la micromatriz, el tamaño de la deleción y lo complejo que sea el genoma hibridado. El método citogénético descrito como Hibridación Genómica Comparativa (CGH) ha sido empleado para analizar el cambio en el número de copias de una secuencia de ADN por una ganancia o pérdida de ésta, debido a deleciones, duplicaciones o amplificaciones que se producen en la formación de tumores (Kallioniemi 1992). Tras la aparición de este método, pronto se hicieron nuevos avances en el estudio del cáncer para conocer su naturaleza. Una de estas consecuencias fue su aplicación en la tecnología de los micromatrices mediante la hibridación de ADN genómico de células tumorosas con ADN control o normal. Como consecuencia, esta técnica se denomina array-CGH (aCGH). Básicamente, esta técnica fue descrita como un método de análisis en la variación del número de copias de ADN de alta resolución en la detección de enfermedades relacionadas con alteraciones genómicas (Pinkel 1998). Hay varios ejemplos que

corroboran esta afirmación, como la comprobación de la dosis génica en el cromosoma X de una región pseudoautosomal mediante la utilización de un micromatriz de ADN para estudiar el síndrome Klinefelter como modelo de anomalía cerebral (Geschwind 1998) u otras enfermedades mentales (Seo EuJu y cols 2010). Pero esta técnica no ha sido únicamente empleada en el campo de la medicina, también ha sido aplicada satisfactoriamente en especies vegetales como *Arabidopsis* y *Oryza* para detectar duplicaciones de genes (Fan 2007) y variaciones en el número de copias (Beló y cols 2010). En cítricos, recientemente ha sido descrito un trabajo con éxito, en el que se han caracterizado largas deleciones hemicingóticas (Rios y cols 2008). Por tanto, este método ha demostrado ser adecuado para estudiar los desequilibrios cromosómicos en plantas y parece ser lo suficientemente preciso para la caracterización molecular de las deleciones genómicas del mutante Z46 procedente de irradiación.

Otro método citogenético descrito como Hibridación Fluorescente *in situ* (FISH) también ha sido empleado en estudios de polimorfismo (Kim y cols 2002; Kang y cols 2008) y en la detección de alteraciones genómicas en plantas (Pagel y cols 2004). En estos estudios, los materiales vegetales empleados preferentemente son los meristemas apicales de los ápices de las raíces (Kim y cols 2002; Moraes y cols 2008). En este caso, este material vegetal no se encontró disponible puesto que los genotipos de la colección proceden de la irradiación de yemas reproducidas vegetativamente mediante injerto y por tanto se recurrió a las yemas axilares como material vegetal. En cuanto a las sondas a utilizar, la más empleada en estudios de polimorfismos son las sondas específicas de ADN ribosómico 45S y más recientemente los clones BACs (*Bacterial Artificial Chromosome*) (Kang y cols 2008; Moraes y cols 2008). Las hibridaciones FISH empleando ADN ribosómico 45S como sonda no

han sido realizadas sobre Clementina de Nules, si bien en otras especies de *Citrus* se ha encontrado un alto grado de polimorfismo (Kang y cols 2008). El éxito de la hibridación con BAC es dependiente, entre otros factores, del tamaño de la misma. En plantas, el menor tamaño de BAC que ha sido empleado fue relativamente pequeño entre 130 kb y 150 kb (Hanson y cols 1995; Kim y cols 2002).

En el presente trabajo se pretende detectar deleciones en el genotipo Z46 mediante aCGH y mapearlas en el genoma de Clementina. Para ello se pondrá a punto la herramienta de FISH empleándose como material vegetal yemas axilares de Clementina y como sonda en primer lugar una sonda específica para la localización cromosómica de la familia multigénica de ADN ribosómico y posteriormente un clon BAC de tamaño relativamente pequeño, 120kb, que contenga una secuencia delecionada de Z46 permitiendo así la identificación del cromosoma sobre el que se encuentre esa deleción.

V.2. Metodología

V.2.1. Material vegetal.

Con el objetivo de disponer de réplicas biológicas independientes del genotipo Z46, éste fue replicado mediante injerto en plancha en otra parcela diferente a la del mutante Z46 original. Tanto para los estudios de CGH como de FISH, se empleó el material vegetal proveniente de tres de estas réplicas biológicas del genotipo Z46 y de su parental Clementina de Nules situado sobre el mismo pie que Z46.

Para el análisis de PCR a tiempo real y cuantificación de ácido indol acético se empleó pulpa de frutos del mutante Z46 y de Clementina de Nules situada sobre el mismo pie que Z46.

Para el CGH y la cuantificación de la dosis génica mediante PCR a tiempo real se emplearon hojas adultas de un año de edad.

Para el FISH se emplearon yemas axilares de Clementina de Nules como control y yemas axilares del genotipo Z46.

V.2.2. Extracción de ADN.

Las hojas fueron trituradas con nitrógeno líquido y conservadas a -80°C . La extracción se realizó empleándose un kit de Qiagen (DNeasy Plant Mini Kit, Cat no. 60104, Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. La calidad del ADN se evaluó mediante espectrofotometría de UV (Nanodrop ND-100) y electroforesis en gel de agarosa (Sambrook y cols 1989).

V.2.3. Hibridación genómica comparativa (CGH).

Se empleó la micromatriz de 20K específica de cítricos generada por el CFGP (Martínez-Godoy y cols 2008). El CGH se realizó en las réplicas biológicas del genotipo Z46. Para paliar el posible sesgo por afinidad de los spots a uno de los fluoróforos se realizaron tres hibridaciones "normales" entendiéndose como tales aquellas en las que el ADN control es marcado con el fluoróforo Alexa-555 y el ADN mutante con Alexa 647 y tres hibridaciones "dye-swap" las que el ADN control es marcado con Alexa 647 y el ADN mutante con Alexa 555.

V.2.3.1. Marcaje con fluoróforos.

Un total de 4 μg de ADN obtenido como se ha descrito en el apartado V.2.2. fue marcado con fluoróforos mediante el kit de Invitrogen (BioPrime Plus Array CGH Indirect Genomic Labeling System, Cat no. 18096-011) siguiendo las instrucciones del fabricante.

V.2.3.2. Hibridación de las micromatrices.

La micromatriz de 20K requirió una prehibridación. Para ello, se sumergió durante 1 hora a 42°C en un tampón de prehibridación (SSC 5X, SDS 0.3%, BSA 1%). A continuación se realizaron 3 lavados con agua de 5 min cada uno a temperatura ambiente (RT) y se centrifugó durante 3 min a 300 rpm para secarlo. Paralelamente, se mezclaron 300 pmol de cada pareja de muestras (mutante y control) para cada micromatriz y se concentraron hasta un volumen de 10 µl. Las muestras se calentaron a 97°C durante 5 min y se les añadió 50 µl de tampón de hibridación (Formamida 50%, SSC 4X, SDS 0.3% y ADN de esperma de salmón 1 µg/ml). La mezcla resultante se depositó sobre la superficie de la micromatriz y se incubó durante 18 h a 42°C en oscuridad. Tras la incubación se realizaron varios lavados: dos lavados con SSC 2X + SDS 0.03% a 42°C durante 5 min; 2 lavados de 5 min con SSC 0.1X + SDS 0.1%; 3 lavados de 2 min con SSC 0.1X y un último lavado de 10 segundos con SSC 0.01X. La micromatriz se secó mediante centrifugación a 300 rpm durante 3 min a temperatura ambiente.

V.2.4. Análisis y adquisición de los datos.

La digitalización y la selección de los spots se llevaron a cabo como se ha descrito en el apartado IV.2.4.3. Los datos obtenidos se analizaron mediante el programa estadístico R. Para la identificación de las sondas con indicación del número de copias alteradas en el genotipo Z46 se empleó el programa Limma (Smith, 2005) usando principalmente la función Quantile (Bolstad y cols 2003; Yang y Thorne 2003). Los P-valores asociados a los estadísticos fueron corregidos por múltiples comparaciones utilizando el procedimiento de Benjamini y Hochberg (Reiner y cols 2003). Se consideraron

diferencias significativas para medir el número de copias de un gen aquellas que tuvieron asociado un P-valor inferior a 0,05 y una M inferior a -0,5 definiendo el parámetro M como: $M = \log_2 (R/G)$, donde R es la intensidad de señal de Z46 y G la intensidad de señal de Clementina de Nules.

V.2.5. Análisis de los cambios en el transcriptoma del genotipo Z46.

Se emplearon los resultados de los cambios en el transcriptoma del mutante Z46 obtenidos en el apartado IV.3.3.2.

V.2.6. Medida de dosis génica mediante PCR a tiempo real.

La concentración de ADN de las muestras se determinó mediante ensayos fluorométricos mediante el kit "Quant-IT PicoGreen dsDNA reagent" (Molecular Probes, Ref. P7589) siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando el fluorímetro Fluostar Galaxy de BMG Labtechnologies (Offenbach, Alemania).

La PCR cuantitativa a tiempo real se realizó con un instrumento LightCycler 2.0 (Roche), usando el kit "LightCycler Fast-Start DNA MasterPLUS SYBR Green I kit (Roche, Ref. 03515885001). Cada reacción individual de PCR contuvo 62.5 ng de ADN, 2 μ l de LC Fast-Start DNA Master PLUS SYBR Green I (Roche, Ref. 03515885001) y 0.5 μ l de cada solución de oligonucleótidos específicos de cada gen a 5 μ M en un volumen total de 10 μ l. El protocolo de amplificación consistió en una preincubación de 10 min a 95°C seguido de 45 ciclos de 20 segundos a 95°C de desnaturalización, 10 segundos a 60°C de alineamiento y 15 segundos a 72°C de extensión. Los valores de intensidad de fluorescencia fueron adquiridos durante los pasos de extensión a 72°C. La especificidad de la reacción se evaluó por

presencia de un pico individual en la curva de disociación después de la amplificación y la estimación del tamaño del producto amplificado.

Las medidas de dosis génica se realizó mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak y Schmittgen, 2001). Básicamente, este análisis relaciona el ratio de la secuencia objetivo en el mutante y en su parental y el ratio de la secuencia control en el mutante y en su parental.

Se diseñaron oligos específicos de las secuencias de los genes delecionados obtenidos mediante aCGH e inhibidos en la pulpa del mutante Z46, empleando el software Primer3 (Rozen y Skaletsky 2000) (frodo.wi.mit.edu/) (Tabla V-1). Los primers de la secuencia control se obtuvieron del EST aKN0AAQ6YB20RM1_c (Spot 040808).

Tabla V-1: Oligonucleótidos utilizados como cebadores para la RT-PCR a tiempo real

Spot micromatriz 20K	Orientación del oligonucleótido	Secuencia del oligonucleótido	Tamaño del amplicón
040808	F	5'-AGCTCGCAGATGGACAGACT-3'	125
	R	5'-AGCTCGCAGATGGACAGACT-3'	
071818	F	5'-TGTAACCATCTCTGGTGCTGA-3'	131
	R	5'-GAACTCCATCCAGCATACCAG-3'	
331816	F	5'-GATTTGGCAAACCAACCAAG-3'	67
	R	5'-TAGGATCTCTCACGCCTGCT-3'	
370512	F	5'-ATGGTGATGCAGCATTGAAC-3'	76
	R	5'-TTCATGGCTCGTCTTGTGTC-3'	
292920	F	5'-TTGGACGCTGATCGAAGAAT-3'	61
	R	5'-ACAATTGAACGGGCGATAGA-3'	
330518	F	5'-ATGAGCAAGCGGTGGTAGTT-3'	113
	R	5'-GGCTCCTTGATGATTCCAAA-3'	

V.2.7. Detección de ácido indol acético (AIA).

La detección de AIA se realizó a partir de 5 gramos de pulpa según el procedimiento descrito por Domingo y cols (2009).

V.2.8. Hibridación fluorescente *in situ* (FISH).

V.2.8.1. Fijación y tinción del material vegetal.

Las yemas axilares fueron sumergidas en 8-hidroxiquinoleína 0,002 M y se incubaron a 10°C durante 20-22h en oscuridad. A continuación se fijaron lavándolas 3 veces en etanol absoluto: ácido acético glacial (3:1) y fueron conservadas a 4°C hasta ser utilizadas. Posteriormente se realizaron dos lavados durante 5 minutos en agua, dos lavados en tampón citrato 1X de 5 minutos y dos lavados con una mezcla enzimática (Celulasa 5%, Pectinasa 2%, Citrato 1X) durante 5 minutos. Se incubaron sumergidas en la mezcla enzimática durante una hora y media a 37°C. Tras la incubación se realizaron dos lavados con citrato 1X de 5 min seguidos de 2 lavados en agua de 5 minutos. De cada yema se seleccionó el tejido meristemático y con acético al 50% se troceó sobre un portaobjetos. La gota acético-tejido se extrajo sobre la superficie del portaobjetos colocado sobre una superficie a 45°C. La fijación se realizó mediante 3 lavados con etanol absoluto: ácido acético glacial (3:1) y posterior inmersión en ácido acético al 60% durante 15 min seguido de una inmersión de 10 segundos en etanol absoluto.

Las preparaciones cromosómicas fueron teñidas con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (2.5 µg/ml) y se incubaron en oscuridad durante 20 minutos lavándose a continuación con agua y secándose posteriormente a temperatura ambiental.

V.2.8.2. Marcaje de la sonda.

Se emplearon dos tipos de sondas: el clon pTa71, conteniendo un fragmento EcoRI de 9Kb que incluye los genes de ARN ribosomal 18S-5,8S-26S y el espaciador intergénico (IGS) de *Triticum aestivum* (Gerlach y Bedbrook 1979) y el BAC CCH3010P17 (bioinfo.ibmcp.upv.es/genomics/cfgpDB/). El marcaje se realizó

empleándose el kit: Nick Translation Mix (Cat no: 11745808910, Roche). Para ello se incubó durante 90 min a 15°C la mezcla de: 1 µg de ADN en 12 µl de agua y 4 µl de Mix 5X dNTPS (2,5 µl de dATP 2.5 mM, 2,5 µl de dCTP 2,5 mM, 2,5 µl de dGTP 2,5mM, 0,25 µl de dTTP 2,5mM, 2,75 µl de Biotin-16-dUTP 1mM y 14,5 µl MQ), deteniéndose la reacción mediante su incubación a 62°C durante 10 min y conservándose la sonda marcada a -20°C hasta su uso. La calidad de la sonda marcada se determinó mediante test Dot-Blot.

V.2.8.3. Hibridación in situ.

A las preparaciones cromosómicas se les realizó dos lavados con 2X SSC durante 5 minutos cada uno. A continuación se deshidrataron mediante tres lavados consecutivos de dos minutos cada uno con etanol 70%, etanol 90% y etanol 100% dejándose secar a temperatura ambiental. Se incubaron a 37°C durante una hora en solución de RNasa 0.0001 ppm en SSC 2X seguido de 3 lavados de cinco minutos en SSC2X. Se incubaron en solución con pepsina (1% de pepsina, en 1M de ácido clorhídrico) a 37°C durante 30 minutos. A continuación se realizaron 3 lavados de 5 minutos en SSC2X y 1 lavado de 10 min en paraformaldehído al 4% seguido de 3 lavados de 5 minutos de SSC2X. Se deshidrataron mediante tres lavados de tres minutos cada uno con etanol al 70%, etanol al 90% y etanol 100% dejándolas secar a temperatura ambiental. La desnaturalización de los cromosomas se realizó a 68°C sumergiéndolos durante dos minutos en formamida al 70% seguido de una deshidratación mediante tres lavados de cinco minutos con etanol 70%, etanol 90% y etanol 100% conservados a -20°C y posteriormente secados a temperatura ambiental. El tampón de hibridación (50% formamida, 20% (v/v) sulfato de dextrano, en 2X SSC, 1 µg de ADN esperma de salmón, 1,25 µl de sonda de BAC marcada y 50X de C0t-1) se preparó

incubándolo 10 min a 100°C, seguido de una incubación a 37°C durante 45 min, parándose la reacción sumergiéndolo en hielo). El C0t-1 fue obtenido a partir de hojas de Clementina de Nules siguiendo el protocolo descrito por Zwick y cols 1997. Las preparaciones cromosómicas se hibridaron adicionándoles 16,50 µl de tampón de hibridación e incubándolas a 37°C durante 16-24 horas en cámara húmeda.

V.2.8.4. Lavados post-hibridatorios de astringencia.

Se realizaron dos lavados de cinco minutos con 2X SSC a temperatura ambiental seguidos de dos lavados de cinco minutos con 2X SSC a 42°C y un lavado de 10 minutos con formamida 50% a 42°C. Posteriormente se realizaron dos lavados de 5 minutos con 2X SSC y un lavado de cinco minutos con 4X SSC+0.2% Tween20. Las preparaciones se sumergieron en la solución de bloqueo 1 (BSA5% en SSC4X con 0.2% de Tween20) durante cinco minutos.

V.2.8.5. Incubación con anticuerpos.

Para amplificar la intensidad de señal se realizó la incubación de anticuerpos mediante el método del "triple sándwich": las preparaciones cromosómicas se incubaron 30 minutos a 37°C con 40 µl de solución de anticuerpos 1 (0,2 µg Fluorescein avidin DCS (Cat no. A-201153967, Vector) en 4X SSC y 0,2% Tween20), seguido de tres lavados de dos minutos con 4X SSC y 0,2% de Tween20 a 37°C. Las preparaciones cromosómicas se incubaron durante 5 minutos con la solución de bloqueo 2 (5% suero de cabra en 4X SSC y 0,2% Tween20). A continuación se incubaron durante 30 min a 37°C con 40 µl de solución de anticuerpos 2 (0,2 µg biotinylated-anti-avidin DC, (Cat no. BA-0300 53986, Vector) en SSC4X y 0,2% de Tween 20) seguido de tres lavados de dos minutos en 4X SSC y 0,2% de Tween 20 a 37°C. Se incubaron de nuevo otros 30 minutos a 37°C con 40 µl

de solución de anticuerpos 1 y se realizaron 3 lavados de dos minutos con 4X SSC y 0,2% de Tween20. En oscuridad las preparaciones cromosómicas fueron contra-teñidas con DAPI (2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante ocho minutos, seguidos de un lavado con agua, secándose al aire y montadas sobre los portas con un medio de montaje que evita el decaimiento de la fluorescencia (Vectashield Cat no. H-1000, Vector)

V.3. Resultados y discusión.

V.3.1. Detección y mapeo de deleciones en el genotipo Z46.

Mediante CGH realizado con el genotipo Z46 frente a su parental, Clementina de Nules, se obtuvieron 118 genes con una M inferior a $-0,50$ y un p -value inferior a $0,05$. Mediante comparación de sus secuencias con el genoma de Clementina (www.phytozome.net) se localizaron: 13 de ellos en el cromosoma 1, 13 en el cromosoma 2, 24 en el cromosoma 3, 7 en el cromosoma 4, 16 en el cromosoma 5, 10 en el cromosoma 6, 13 en el cromosoma 7, 7 en el cromosoma 8 y 13 en el cromosoma 9. A diferencia de lo observado en otros genotipos de cítricos irradiados con neutrones rápidos donde se detectaron largas deleciones (Rios y cols 2008), en el genotipo Z46 los genes delecionados se encontraron dispersos por todo el genoma aunque se observaron algunas zonas más dañadas que otras como el extremo del cromosoma 5 (Figura V-1).

Algunos de los genes que se encontraron en hemicigosis no provocaron un efecto directo sobre su expresión porque su función fue compensada por el cromosoma homólogo. Sin embargo, cabe esperar que la ausencia de algunos de ellos tenga un efecto directo sobre la expresión de dicho gen. Por ello, se cruzó el listado de genes obtenido en el aCGH con el listado de las hibridaciones de transcriptoma obtenido en el apartado IV.3.3.2.

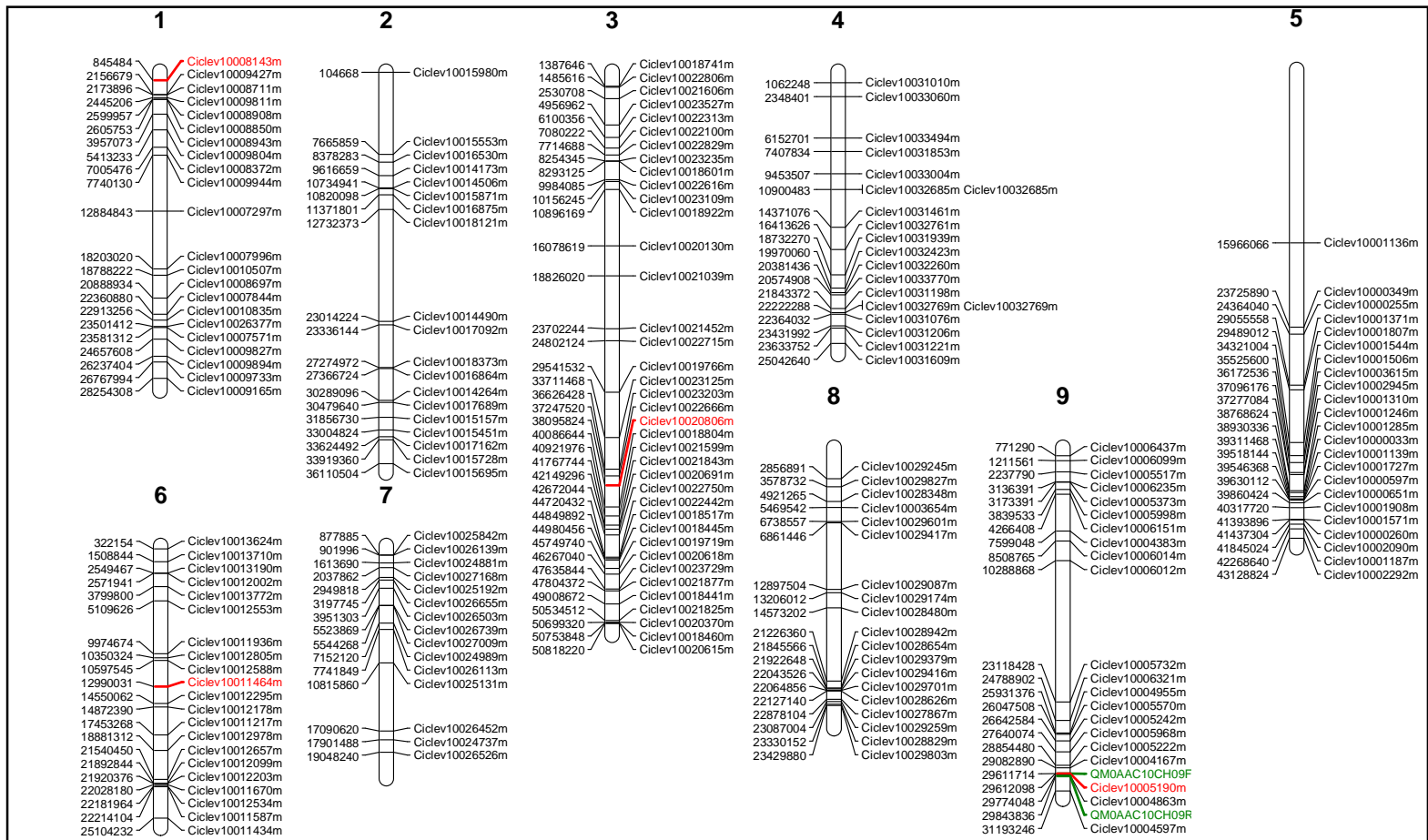


Figura V-1: Mapeo de los genes deletados en Z46 obtenidos mediante CGH sobre el genoma de Clementina de Nules. En rojo se remarcan los genes cuya expresión génica también se encontró inhibida. En verde se remarcan los extremos del clon-BAC CCH3010P17 (www.phytozome.net)

De los 118 genes deletados obtenidos mediante aCGH, 4 mostraron su expresión génica inhibida ($M < -0,5$, $FDR < 0,05$). Posteriormente se comprobó mediante qPCR que en 3 de ellos su dosis génica era la mitad que el parental, indicando por tanto que estos 3 genes estaban deletados en el genotipo Z46 (Tabla V-1).

De los tres genes, uno correspondió al gen SGT1, necesario para que el ácido indol acético (IAA) se degrade (Gray y cols 2003). La concentración en pulpa de IAA en el mutante Z46 sin embargo fue inferior al de Clementina de Nules (datos no mostrados). La aplicación exógena de IAA produce un mayor crecimiento del fruto. Por tanto, el menor contenido de IAA en la pulpa del mutante podría resultar coherente con el menor tamaño del fruto de este genotipo (ver apartado III.3.3.1).

Tabla V-1: Valores de CGH, de expresión génica en pulpa (mRNA) y dosis génica comprobada mediante PCR a tiempo real de genes de Z46. $M = \log_2$ (señal mutante/señal control).

Spot	Anotación	M CGH	M RNA	Dosis génica
071818	ADN binding protein	-0,53	-0,63	0,44
331816	Hipotetical protein	-0,43	-0,52	0,49
370512	SGT1	-0,80	-0,80	0,40
292920	WD-40 repeat protein	-0,61	-0,95	0,99
330518	Predicted protein	-0,51	-0,88	0,80

V.3.2. FISH sobre el genotipo Z46 con sondas BAC.

En los estudios citogenéticos mediante FISH el material vegetal empleado en plantas generalmente son los ápices de raíces (Kim y cols 2002; Moraes y cols 2008). Al proceder el genotipo Z46 de una yema irradiada y encontrarse injertado sobre pie de *Citrange carrizo* no se dispuso de ápices de raíces, teniendo que emplearse yemas axilares para la realización de los estudios de localización cromosómicas de las sondas. El empleo de yemas axilares conllevó

una puesta a punto de la técnica. En primer lugar, se tomaron muestras de yemas axilares en 4 estadios diferentes de desarrollo, desde yemas axilares latentes hasta yemas axilares con brotes de 1 milímetro de longitud (Figura V-2). Se seleccionó el estadio 2 porque fue donde encontramos un mayor número de células en división por preparación al realizar la fijación del material vegetal. En segundo lugar, se realizó una hibridación con sonda de ADN ribosómico 45S para testar las condiciones de la hibridación y por último se hibridó empleando como sonda un clon BAC de 120kb.

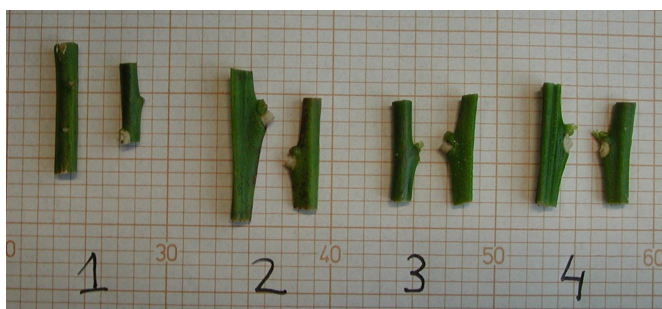


Figura V-2: Explantes de tallo con diferentes estadios de yema de Clementina de Nules.

Al hibridar con sonda de ADN ribosómico 45S en la variedad de mandarina Clementina de Nules se obtuvieron resultados similares en células en interfase y en células en división. Se observaron tres sitios de hibridación de la sonda en tres cromosomas donde hibridó la sonda de ADN ribosómico 45S: una señal en la región pericentromérica de un cromosoma metacéntrico-sub,metacéntrico y dos señales en la región telomérica en dos cromosomas submetacéntricos (Figura V-3). Estos resultados indican que la familia multigénica de ADN ribosómico 45S puede variar su número en el genoma como resultado de la amplificación y transposición a diferentes sitios en el genoma (Schubert y Wobus 1985). Nuestros resultados concuerdan con estudios de FISH con la

sonda de ADN ribosómico 45S en otra variedad de mandarina, la variedad Ponkan que también da lugar a tres zonas de hibridación (Kang y cols 2008).

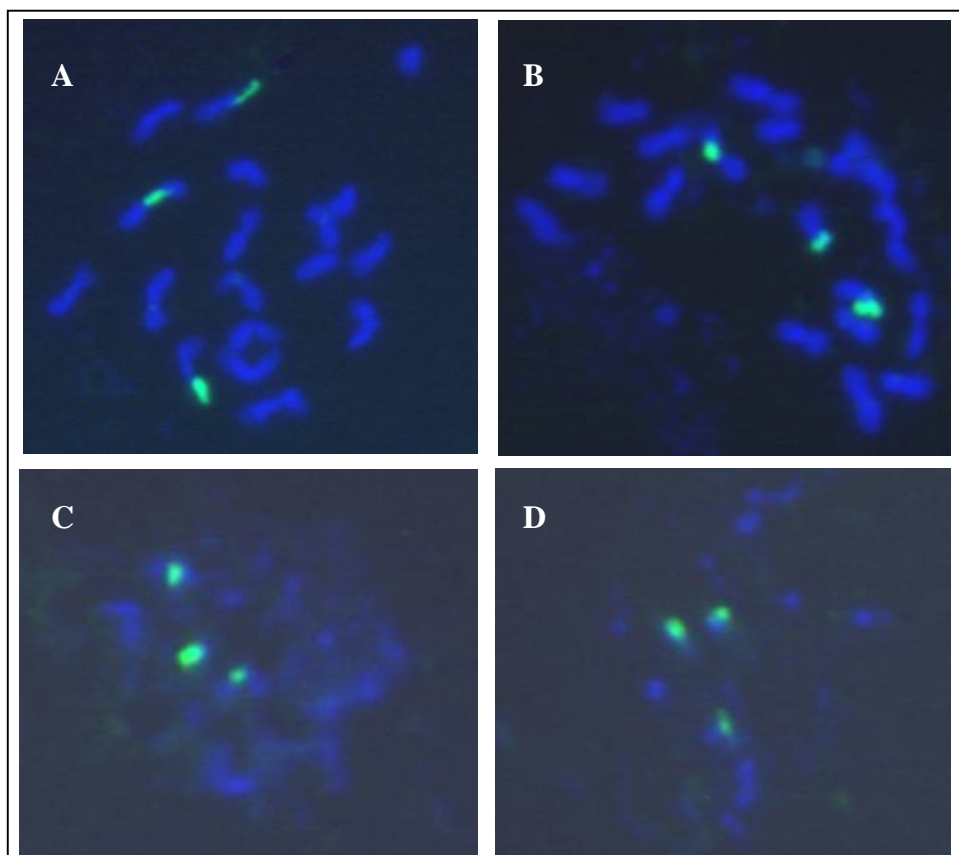


Figura V-3: Hibridación *in situ* de la sonda ADN ribosomal 45S (verde) sobre cromosomas en metafase (A y B) y células en interfase (C y D) de Clementina de Nules contra-teñidas con DAPI (azul).

Una vez puesto a punto el proceso de fijación de las preparaciones cromosómicas y el marcaje, se procedió a realizar un FISH-BAC.

Puesto que la sonda era de tamaño relativamente pequeño se empleó el marcaje de la misma con el método del triple sándwich,

descrito en el apartado V.2.5.5, para aumentar la intensidad de señal. Para ello se seleccionó la secuencia del spot 370512 correspondiente al gen SGT1b. Para incrementar la señal en la hibridación, se eligió como sonda en el FISH el BAC CCH3010P17 que contenía dicho gen (bioinfo.ibmcp.upv.es/genomics/cfgpDB/). Así, la secuencia de este BAC fue empleada como sonda en la hibridación *in situ* de cromosomas tanto del genotipo Z46 como de su parental Clementina de Nules.

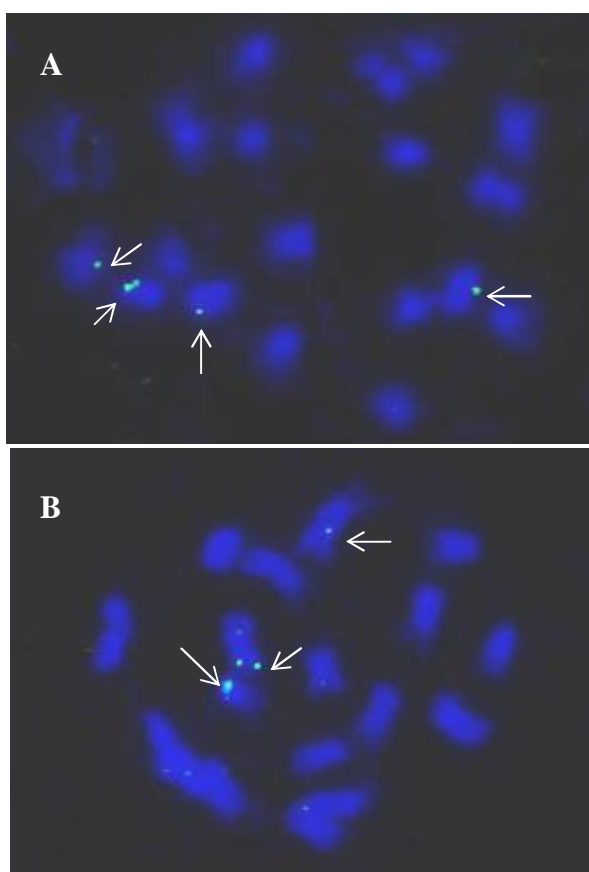


Figura V-4: Hibridación *in situ* de la sonda BAC CCH3010P17 sobre cromosomas contra-teñidos con DAPI de Clementina de Nules (A) y cromosomas de Z46 (B)

Los resultados de la hibridación mostraron 4 puntos de hibridación correspondientes a 4 cromosomas diferentes en Clementina de Nules mientras que en el genotipo Z46 se observaron 3 puntos correspondientes a tres cromosomas diferentes (Figura V-4). Los puntos de hibridación se observaron como señales de fluorescencia simples o dobles dependiendo de si la configuración del cromosoma en la preparación presentaba una o dos cromátidas visibles al observador. Los resultados obtenidos son compatibles con la presunción de que el BAC utilizado como sonda, hibrida con dos parejas de cromosomas con zonas de identidad similar. Así, dos cromosomas con zonas con secuencia semejante a la incluida en la BAC, producirían cuatro señales de hibridación mediante FISH, dos más intensas que las otras dos. En el caso de que las cromátidas se encuentren ligeramente separadas, los cromosomas hibridados se visualizarían como dos puntos paralelos al eje del cromosoma, o con una única señal si no lo están. Por el contrario, si el mutante hubiera perdido un fragmento de cromosoma cabría esperar tres cromosomas con señal de hibridación ya que uno de ellos habría perdido la zona donde se encontraba la secuencia del gen (Figura V-5).

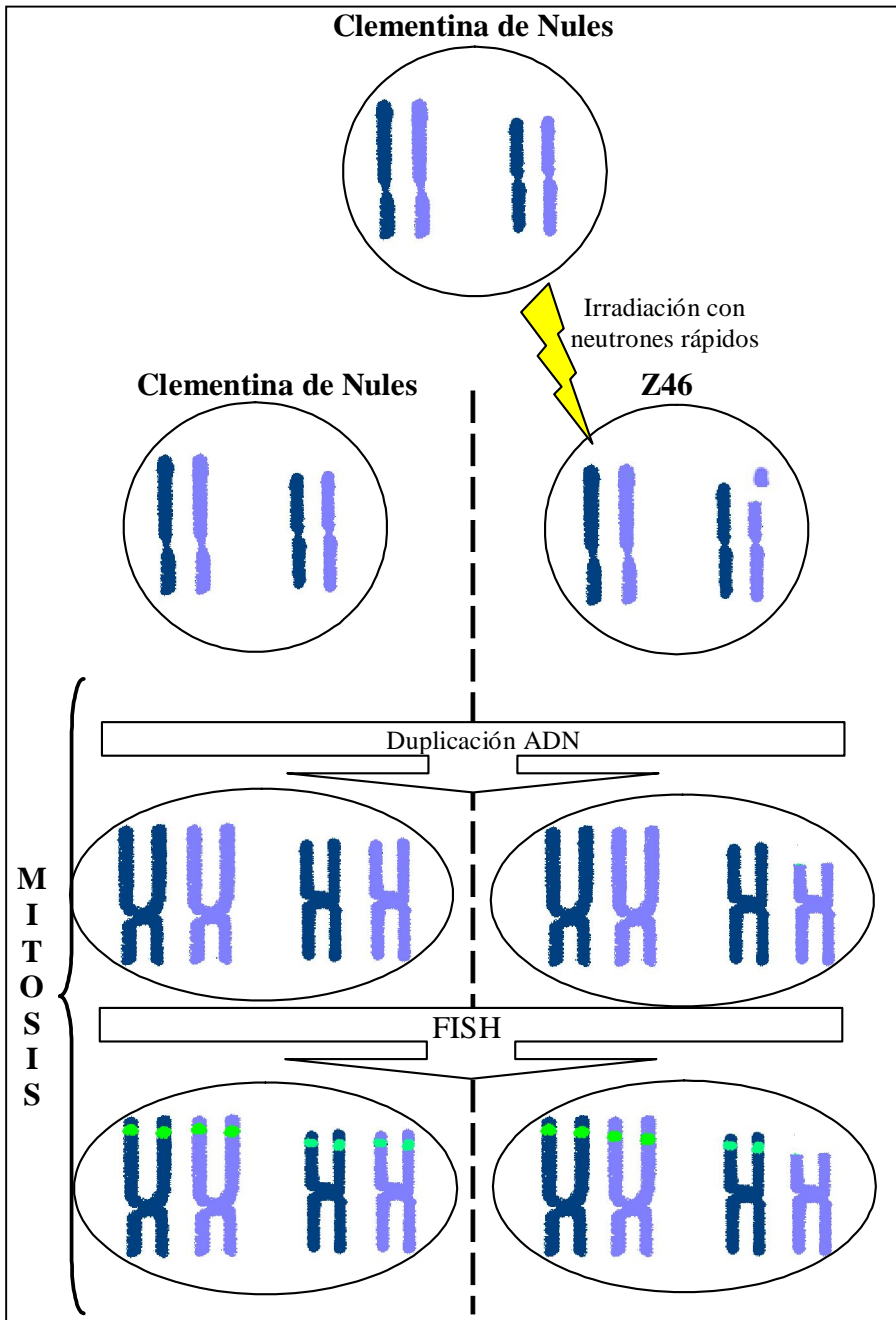


Figura V-5: Esquema de la hibridación *in situ* realizado sobre el genotipo normal de Clementina y el mutante de irradiación Z46. Los resultados obtenidos, 4 cromosomas con marca en Clementina frente a 3 cromosomas en el mutante, son compatibles con la asunción de que el mutante Z46 perdió un fragmento de un cromosoma.

El FISH por tanto mostró señal de hibridación de la secuencia del spot 370512 del análisis CGH que fue mapeado previamente en el extremo de uno de los cromosomas. Esta secuencia de hecho se localizó en el genoma de Clementina en un extremo del cromosoma 9 (Figura V-1).

En la Figura V- 6, se muestra una ampliación de un cromosoma marcado que muestra una señal doble de marca correspondiente a la presencia de dos cromátidas en el extremo del cromosoma. Como se explicó anteriormente, el BAC que se empleó como sonda incluía la secuencia del gen SGT1b. Así, las distintas evidencias presentadas (CGH, PCR y FISH) sugieren que el genotipo Z46 presenta una deleción en el extremo del cromosoma 9.

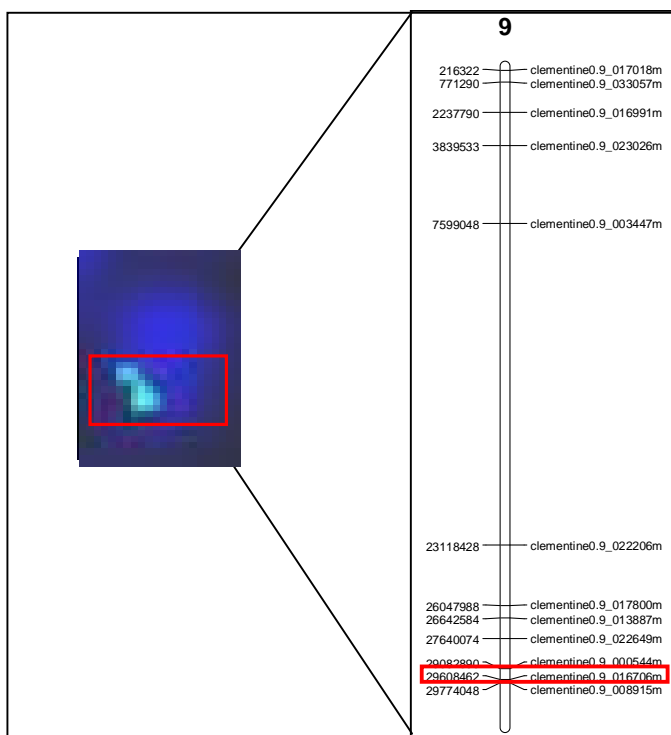


Figura V-6: Hibridación *in situ* del clon BAC CCH3010P17 sobre el cromosoma 9 de Clementina de Nules (izquierda). Esquema del cromosoma 9 (derecha). Remarcado en rojo la posición del gen deleciónado.

V.4. Conclusiones.

- Se han detectado 118 genes delecionados en el mutante Z46 mediante CGH de los cuales, 13 se posicionan en el cromosoma 1, 13 en el cromosoma 2, 24 en el cromosoma 3, 7 en el cromosoma 4, 16 en el cromosoma 5, 10 en el cromosoma 6, 13 en el cromosoma 7, 7 en el cromosoma 8 y 13 en el cromosoma 9. La expresión de tres de los genes delecionados se encontró inhibida en la pulpa del fruto del genotipo Z46.
- El análisis FISH con sonda de ADN ribosómico 45S mostró tres sitios de hibridación en los cromosomas de Clementina de Nules: una señal en la región pericentromérica y dos señales en la región telomérica indicando que la familia multigénica de ADN ribosómico 45S puede variar su número en el genoma como resultado de la amplificación y transposición a diferentes sitios en el genoma.
- El análisis FISH con sonda BAC CCH3010P17, que contiene un gen delecionado en el genotipo Z46, mostró 4 sitios de hibridación correspondientes a 4 cromosomas diferentes en Clementina de Nules mientras que en el genotipo Z46 se observaron 3 sitios correspondientes a tres cromosomas diferentes.

VI. Identificación y expresión del gen fosfoenolpiruvato carboxiquinasa y su implicación en el metabolismo de los ácidos del fruto.

VI. Identificación y expresión del gen fosfoenolpiruvato carboxiquinasa y su implicación en el metabolismo de los ácidos del fruto.

VI.1. Introducción.

El enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) cataliza la decarboxilación de oxalacetato (OAA) generando fosfoenolpiruvato (PEP) según la reacción:



Hay dos tipos de PEPCK en función del nucleosido trifosfato que utilice: adenina (PEPCK-ATP EC 4.1.1.49) o guanina (PEPCK-GTP EC 4.1.1.32) (Utter y Kolenbrander, 1972). PEPCK-GTP está presente en mamíferos, aves, peces, artrópodos, moluscos, nematodos y otras bacterias mientras que PEPCK-ATP está presente en las plantas con flores, ascomicetos, basidomicetos, algas y otras bacterias (Walter y Chen 2002). En plantas, su localización es exclusivamente citosólica (Watanabe y cols 1984) y la cantidad de proteína está estrictamente controlada, necesitando la presencia de Mn^{2+} y Mg^{2+} para su expresión (Chen y cols 2002). Se encuentra presente solo en ciertos tipos de células y su abundancia depende del estado de desarrollo (Leegood y Walker 2003). También está controlada por glucosa, que reprime la síntesis de PEPCK a concentraciones elevadas (Valera y cols 1194; Lea y cols 2001). El aminoácido glutamina puede bloquear el efecto represor de la glucosa (Lavoinne y cols 1996).

En plantas, la reacción que cataliza PEPCK participa en varias rutas metabólicas: en la fotosíntesis, en el metabolismo de algunos aminoácidos como el aspartato, en el metabolismo del glioxilato y del piruvato, en el metabolismo de ácidos orgánicos (ciclo de los ácidos

tricarboxílicos) y en el de los azúcares (glicólisis y/o gluconeogénesis). Estos dos últimos son claves en la maduración de los frutos cítricos.

Pese a participar en varias rutas metabólicas la función de PEPCK parece estar claramente establecida solo en algunos tipos de células. En semillas en germinación, PEPCK cataliza una reacción esencial de conversión de lípidos y amino ácidos en azúcares mediante la gluconeogénesis (Rylott y cols 2003). En hojas, puede funcionar como una descarboxilasa en los mecanismos de fijación de CO₂ (Burnell y Hatch 1988). En otras células y tejidos, hay evidencias de que PEPCK juega un papel en el metabolismo de los compuestos nitrogenados (Leegood y walter 2003; Chen y cols 2004; Delgado-Alvarado y cols 2007) como es la descarboxilación dependiente de aspartato vía PEPCK en hojas de maíz (*Zea mays*) (Wingler y cols 1999) en donde hay anotado un gen de PEPCK (GeneID:541622).

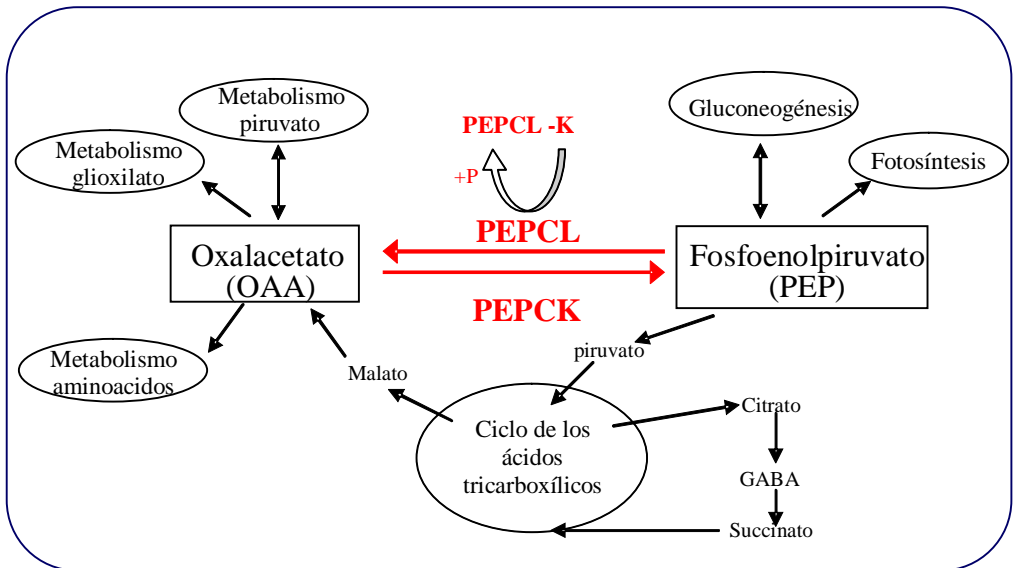


Figura VI-1: Esquema de la reacción donde intervienen PEPCK, PEPCL y PEPCL-K y principales rutas metabólicas en donde el oxalacetato y el fosfoenolpiruvato participan.

De las rutas en las que interviene PEPCK, el metabolismo de los ácidos orgánicos y los azúcares son dos procesos de gran

relevancia en el desarrollo y la maduración de los frutos (Blanke y Lenz 1989; Famiani y cols 2009). En relación al metabolismo de los azúcares, estudios realizados durante la germinación en *Arabidopsis* indican que la expresión de sus dos genes (PCK1 (GeneID:829943) y PCK2 (GeneID:836696) aumenta junto con la producción de azúcares mediante la activación de la ruta de la gluconeogénesis (Rylott y cols 2003). Complementariamente, en estudios de fijación de carbono en hojas transgénicas de arroz, especie de la cual hay anotados dos genes (GeneID:3052217; GeneID:4348268) se demostró una correlación positiva entre la actividad de PEPCCK y la incorporación de carbono marcado a los compuestos malato, oxalacetato y aspartato, resultando un incremento en la sacarosa marcada a partir del malato marcado, corroborando que el carbono decarboxilado por PEPCCK del OAA y sintetizado a partir del malato puede ser transferido a la sacarosa (Suzuki y cols 2000). Esto indica que el malato puede ser transformado en glucosa al activarse PEPCCK mediante la ruta de la gluconeogénesis. La relación entre malato y PEPCCK puede sugerirse de igual modo en el metabolismo de los ácidos orgánicos (Law y Plaxton 1995; Guillet y cols 2002). En estudios con tomate, en donde hay descrito un gen de PEPCCK (GeneID: 543812) frutos con un elevado contenido en ácidos mostraron un incremento en la actividad de PEPCCK durante la maduración del fruto. Resultados similares se observaron en frutos de uva, frambuesa y arándanos donde se incrementa la abundancia de proteína PEPCCK al principio de la maduración, asociándosele un papel en la desasimilación del citrato y/o malato durante la maduración de estos frutos (Famiani y cols 2005 2009). Sin embargo existen discrepancias en estos resultados ya que PEPCCK también se indujo aun cuando no hubo desasimilación de malato o citrato (Famiani y cols 2005). En cultivo de células de *Arabidopsis thaliana*, se han relacionado cambios en el pH con la

expresión PEPCK, observándose que una mayor acidez del medio incrementa la expresión PEPCK y genera una reducción de protones (Zhi-Hui y cols 2008). A la inversa, a valores de pH alto, la expresión de PEPCK disminuye (Chen y cols 2004, 2008). En el caso de la pulpa de los frutos cítricos los valores de pH se sitúan entre 2.0 y 4.0 (Nuray y cols 2003). Por tanto la activación de PEPCK a través de la regulación del pH celular podría formar parte del mecanismo de degradación de la acidez en los frutos cítricos (Cercós y cols 2006). De los ácidos orgánicos presentes en los cítricos durante distintos estados de desarrollo del fruto: ácido cítrico, ácido málico y ácido oxalacético (Ulrich 1971), el ácido cítrico y el málico son los mayoritarios (Karadeniz 2003). Algún estudio en *Escherichia coli* muestra una relación entre la producción del succinato y la inducción de la expresión de PEPCK (Kwon y cols 2008) aunque esta relación no ha sido estudiada en plantas. En conjunto, estos resultados sugieren que en los cítricos, podría existir una relación entre la degradación del ácido cítrico vía GABA que produce succinato y la inducción de PEPCK que podría activar la síntesis de azúcares vía la gluconeogénesis. Esta sugerencia permite relacionar el metabolismo de los ácidos orgánicos y los azúcares, los procesos clave en la maduración interna de los frutos cítricos.

En resumen, PEPCK está presente en distintos tipos de frutos, sin embargo su función es incierta. En este trabajo se ha realizado un estudio de la expresión de PEPCK en cítricos en diferentes órganos, estadios de desarrollo y en la pulpa de variedades de cítricos con el objetivo de estudiar el comportamiento de PEPCK a lo largo de la maduración y su posible relación con el metabolismo de los ácidos orgánicos y los azúcares.

El enzima que cataliza la reacción contraria a PEPCK, fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPCL, EC 4.1.1.31) carboxila

fosfoenolpiruvato para formar oxalacetato (Figura VI-1). Ésta cataliza la primera fijación del CO₂ en las plantas C4 y CAM (O'Leary 1982; Andreo y cols 1987). También una de las enzimas anapleróticas en muchos tejidos de las plantas, permitiendo el reabastecimiento de intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbónicos, como malato en células guarda y semillas. También tiene un papel, al igual que PEPCK, en la regulación del pH durante la asimilación de nitrógeno (Chen y cols 2008). Su actividad se controla mediante fosforilación en un proceso catalizado por fosfoenolpiruvato carboxilasa quinasa (PEPCL-K) (Fukayama y cols 2006). Su expresión se incrementa tanto con la disponibilidad de carbono como con la respuesta a incrementos en el pH celular en *Arabidopsis* (Chen y cols 2008). Por otro lado, PEPCL se inhibe por malato y se activa por glucosa-6P, pero la fosforilación causada por PEPCL-K reduce la sensibilidad al malato y la aumenta hacia la glucosa-6P (Chollet y cols 1996; Vidal y Chollet 1997; Nimmo 2003; Izui y cols 2004; Fera y cols 2008). En relación al papel de PEPCL en la regulación del pH celular hay estudios contradictorios (Nimmo 2003; Izui y cols 2004; Britto y Kronzucker 2005; Chen y cols 2008) señalando que las enzimas claves en la homeostasis del pH celular son fosfoenolpiruvato carboxiquinasa y fosfoenolpiruvato carboxilasa quinasa, más que fosfoenolpiruvato carboxilasa.

La enzima que regula la fosforilación de PEPCL es fosfoenolpiruvato carboxilasa quinasa (PEPCL-K). Esta enzima está menos estudiada que PEPCL o PEPCK tanto a nivel proteico como génico. En plantas, la principal función asociada a ella es la modulación de la actividad de PEPCL haciendo que ésta sea más activa mediante su fosforilación (Nimmo 2003; Shenton y cols 2006; Chen y cols 2008; Meimoun y cols 2009). Esta regulación también ha sido descrita durante los procesos de maduración (Marsh y cols

2003). Pese a que no existen muchos estudios, algunos señalan que la modulación de PEPCL vía PEPCL-K se realiza a nivel posttranscripcional (Nimmno 2003; Izui y cols 2004). Su actividad también puede estar regulada por ciertos metabolitos, inhibiéndose por malato y activándose por glucosa y/o ácido abscísico (Feria y cols 2008). Puesto que su actividad parece clave en la actividad de PEPCL y ésta es la enzima opuesta a PEPCK, se consideró como un gen interesante para ser estudiado por su posible papel en la maduración del fruto. Por tanto, en los cítricos, donde el pH celular del fruto alcanza valores muy bajos, la reacción catalizada por PEPCK y PEPCL podría ser un nexo de unión entre los ácidos orgánicos y los azúcares, los componentes cuya proporción condiciona el índice de madurez de sus frutos.

En el presente capítulo se pretende identificar los miembros de las familias génicas de fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, fosfoenolpiruvato carboxilasa y fosfoenolpiruvato carboxilasa quinasa y estudiar su expresión a lo largo de la maduración del fruto. Por otro lado, se pretende estudiar la posible relación entre la degradación de ácidos, la actividad de PEPCK y la acumulación de los azúcares en los frutos cítricos. Para ello, se han realizado tres experimentos:

a) en el experimento 1 se caracterizó la expresión génica de los genes que codifican para PEPCK, PEPCL y PEPCL-K sobre diferentes variedades de cítricos, escogidas por tener una dinámica de maduración diferente entre si.

b) en el experimento 2 se estudió el efecto del ácido cítrico y el ácido oxalacético sobre la expresión del gen que codifica para PEPCK.

c) en el experimento 3 se analizó el efecto del ácido cítrico en el contenido de ácidos y azúcares del zumo mediante cultivo *in vitro* de vesículas de zumo.

VI.2. Metodología

VI.2.1. Material vegetal.

VI.2.1.1. Expresión génica.

Se empleó la pulpa de los frutos de los genotipos de clementina Z46, I09, H03, D11 y J59, así como de las variedades de naranjas: Washington Navel (*Citrus sinensis* (L.) Osb), Valencia Late (*Citrus sinensis* (L.) Osb), Sucreña (*Citrus sinensis* (L.) Osb), de Limón (*Citrus limón* (L.) Buró.f), de mandarina Fortune (*Citrus clementina* Ex. Hort. Tanaka x *Citrus reticulata*, Blanca) y mandarina Clementina de Nules (*Citrus clementina* hort.ex tan.). Se tomaron muestras de al menos tres frutos en diferentes momentos a lo largo del estadio II y III de la maduración del fruto de estos genotipos. Los frutos fueron tomados al azar a partir de todas las orientaciones del árbol (norte, sur, este y oeste). Los frutos recolectados, fueron pelados y la pulpa resultante se trituró con nitrógeno líquido y se conservó a -80°C hasta su uso. Los muestreos de los frutos tanto de los genotipos de la colección como de las variedades estudiadas fueron realizados en julio (100 DDA), agosto (140 DDA), septiembre (170 DDA), octubre (200 DDA), noviembre (225 DDA), diciembre (275 DDA), febrero (295 DDA) y marzo (360 DDA), considerando el día 0 DDA el 1 abril.

En la variedad Clementina de Nules, las medidas de expresión génica en hojas se realizaron sobre diferentes estados de desarrollo, considerándose hojas jóvenes las provenientes de brotes de menos de 10 cm de longitud, hojas adultas las de 6 meses y hojas viejas las de 1 año de edad. Las hojas se trituraron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su uso. Se realizaron tres réplicas biológicas, considerando como tal una muestra homogénea correspondiente a una mezcla de al menos 30 hojas de cada tipo. Las muestras de raíz se efectuaron sobre raíces secundarias trituradas en nitrógeno líquido y conservadas a -80°C hasta su uso. Se realizaron

tres réplicas biológicas considerándose como tal una muestra homogénea de tres árboles.

VI.2.1.2. Efecto del ácido cítrico y el ácido oxalacético sobre la expresión del gen que codifica para fosfoenolpiruvato carboxiquinasa.

Se emplearon secciones de fruto de la variedad Clementina de Nules a 150 DDA, momento en el que para esta variedad ha alcanzado su máximo de acidez y a partir del cual la acidez del fruto va disminuyendo (Soler 2009). Se tomaron muestras de pulpa de las secciones de fruto de cada ensayo a la hora, a las 6 horas y a las 24 horas, realizando tres réplicas biológicas por ensayo y muestreo, considerándose como tales la mezcla de tres frutos. La pulpa fue triturada con nitrógeno líquido y conservada a -80°C hasta su uso.

VI.2.1.3. Efecto del suplemento de ácido cítrico en el contenido de ácidos y azúcares del zumo.

Se aislaron vesículas de zumo de los frutos procedentes de Clementina (Clementina de Nules) y de Valencia Late ambas con un índice de madurez de 8.0. Se realizaron al menos 3 réplicas biológicas por medio de cultivo testado, considerándose como réplica biológica la mezcla del contenido de unas 50 (\pm 5) vesículas de zumo (Murai y cols 2000) cultivadas en la misma placa petri bajo las mismas condiciones de cultivo.

VI.2.2. Extracción de RNA

La extracción de ARN se realizó tal y como se ha descrito en el apartado IV.2.2 a partir de muestras de hoja, raíz o pulpa del material vegetal empleado descrito en el apartado VI.2.1.1. Para las muestras de hoja y raíz se emplearon 0.5 g de material fresco y para

las muestras de pulpa 2 g, modificando el volumen de tampón de extracción en hoja y raíz a 0.5 ml de TCES, 0.5 ml de fenol ácido y 0.010 ml de β -mercaptoetanol.

VI.2.3. Cuantificación de RNAs mensajeros mediante análisis qRT-PCR.

Se efectuó tal y como se ha descrito en el apartado IV.2.3. Los oligonucleótidos fueron diseñados a partir de secuencias disponibles en la base de datos del CFGP empleando el software Primer3 (Rozen y Skaletsky 2000) para su diseño (Tabla VI-1).

Tabla VI-1: Oligonucleótidos utilizados como cebadores para el análisis PCR a tiempo real.

Gen	Orientación del oligonucleótido	Secuencia del oligonucleótido	Tamaño del amplicón
PEPCK1	F	5'-CAAGATTGGCAAGGACAACA-3'	109
PEPCK1	R	5'-TTCCCAAACCCACTCACG-3'	
PEPCK2	F	5'-TAGAGGGAGTGCCCTCAGAA-3'	66
PEPCK2	R	5'-CCTTGTAGGCCTTCATGTCC-3'	
PEPCK3	F	5'-TCACAGAGCCTTCGCCTACT-3'	128
PEPCK3	R	5'-GTTGATGAGCCAGCAGTTTG-3'	
PEPCL1	F	5'-GCTTGATGGTTGAGGTCACA-3'	50
PEPCL1	R	5'-TCCACACAGCCTTTGTCAAG-3'	
PEPCL2	F	5'-AAACACCGGTTAAGGCATCA-3'	52
PEPCL2	R	5'-AGTCGGTTTTGGTGAAAGCA-3'	
PEPCL3	F	5'-ACACCGGTTAAACTGCATGA-3'	92
PEPCL3	R	5'-TCCCGGGCATAACAGTTATTG-3'	
PEPCL-K1	F	5'-GAATCCCGTTTGCGAGACTA-3'	111
PEPCL-K1	R	5'-ACATTCTCCGGCTTCACATC-3'	
PEPCL-K2	F	5'-GTCGAAGCCGATAGTGAAGC-3'	112
PEPCL-K2	R	5'-GGTGTCTCCGACGAGAATA-3'	

VI.2.4. Cultivo *in vitro* de secciones de frutos cítricos.

Emulando el proceso de reducción de acidez desde el momento que Clementina de Nules alcanza su valor máximo (150 DDA) (Soler

2009), secciones de fruto se sumergieron parcialmente (3 mm) en tres soluciones:

- 1) agua desionizada (ADI)
- 2) ácido cítrico a 5000 ppm (CIT)
- 3) ácido oxalacético a 5000 ppm (OAA)

Se emplearon las mismas concentraciones que en el experimento 3. La concentración de cada ácido, tres veces inferior a la acidez de los frutos, se usó para evitar los posibles daños celulares por exceso y además favorecer la entrada de los ácidos empleados por difusión. Las secciones de fruto se mantuvieron en cámara de cultivo a 24°C con un fotoperiodo de 16h y se tomaron muestras de pulpa de las secciones de fruto a la hora, a las 6 horas y a las 24 horas. La pulpa se trituró con nitrógeno líquido y conservó a -80°C hasta su uso.

VI.2.5. Cultivo *in vitro* de vesículas de frutos cítricos.

Se aislaron vesículas de cítricos en cabinas de flujo laminar y se incubaron en placa petri durante 5 días en diferentes medios a 24°C y fotoperiodo de 16 h (Figura VI-2). Con el objetivo de favorecer la entrada de los solutos del medio de cultivo por difusión simple al interior de las vesículas y además evitar los posibles daños celulares por exceso, la concentración de ácido cítrico empleada fue al menos tres veces inferior a la acidez de los frutos empleados. Se realizaron 6 réplicas biológicas considerándose como tales un experimento independiente.

En un primer experimento, se usaron vesículas de Clementina y naranja con dos medios de cultivo:

- 1- El medio 1000 + 0 formado por agua desionizada, agar y 1000 ppm de fucosa
- 2- El medio 1000 + 5000 formado por agua desionizada, agar, 1000 ppm de fucosa y 5000 ppm de ácido cítrico.

Se usó la fucosa como estándar interno. La concentración de fucosa fue 100 veces inferior a la mínima concentración de sacarosa que debe ser adicionada al medio de cultivo para producir acumulación de azúcares en el interior de las vesículas de mandarinos (Harada y cols 2001).

En una segunda etapa, se consideraron dos condiciones:

- 1- El medio control (SIN CIT) formado por agua desionizada y agar.
- 2- El medio citrato (CON CIT) formado por agua desionizada, agar y ácido cítrico a 5000 ppm.

En una tercera etapa, se ensayaron dos medios de cultivo:

- 1- El medio control (CT) formado por agua desionizada y agar.
- 2- El medio citrato marcado (CM) compuesto por agua desionizada, agar y 5000 ppm de ácido cítrico 1,5-¹³C (marcado en el carbono 1 y 5, ISOTEC no. 488607).

Se realizaron 3 réplicas biológicas de cada medio de la tercera etapa. Las vesículas fueron cultivadas *in vitro* a 24°C, fotoperiodo de 16h durante 5 días. Este periodo de ensayo se eligió porque ensayos previos con citrato determinaron que a los 3 y 4 días no se había producido absorción significativa de los metabolitos del medio al interior de las vesículas. La extracción del contenido de las vesículas (Figura VI-2-A) al cabo de 5 días de incubación se realizó individualmente, empleando una aguja. El zumo obtenido fue filtrado por un filtro de 0.22 µM y conservado a -20°C hasta su uso.

En la Figura VI-2-B puede observarse un detalle del proceso de extracción del contenido de las vesículas.

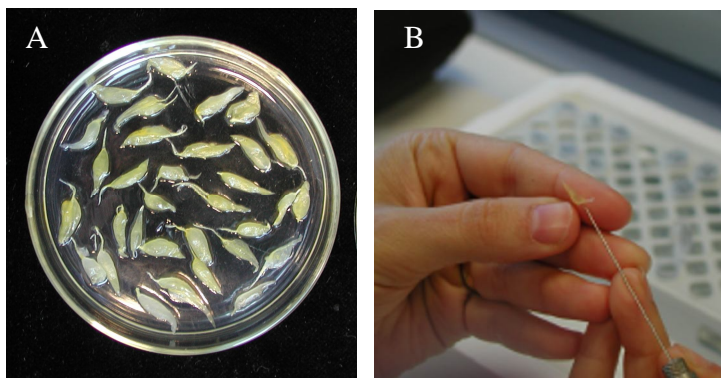


Figura VI-2: Vesículas de frutos de Clementina a los 5 días de incubación a 24°C y con fotoperiodo de 16 horas en medio control (A). Detalle del proceso de extracción del contenido de las vesículas (B).

VI.2.6. Cuantificación de azúcares y ácidos orgánicos.

La cuantificación tanto de los azúcares mayoritarios (fructosa, glucosa y sacarosa) como la de los ácidos se realizó empleando un espectrómetro de gases (Varian Star 300 CB) acoplado a un espectrómetro de masas (Varian Saturn 3) tal y como se ha descrito en el apartado IV.2.5.

VI.2.7. Tratamiento estadístico de los datos.

Los paquetes informáticos empleados en el tratamiento de los datos estudiados fueron:

- Statgraphics Centurion XVI (versión de evaluación).
- MEGA4: Molecular Evolutionary y Genetics Análisis (Tamura y cols 2007) (libre disposición).
- CAP3: Sequence Assembly Program (Huang y Madan 1999) (libre disposición).
- NTSYS 2.02.

Los niveles de mARN se normalizaron frente a la concentración de ARN total determinada mediante fluorimetría con RiboGreen

(Molecular Probes) (Bustin 2002; Hashimoto y cols 2004). Todos los datos fueron estadísticamente analizados con Anova considerándose al menos tres réplicas y las medias fueron comparadas usando el test de Duncan's (Duncan 1955; Lihong y cols 2004; De Nicolas-Santiago y cols 2006; Mahbood y cols 2010) fijando diferencias estadísticamente significativas a un nivel de confianza de al menos el 95%.

La historia evolutiva fue inferida empleando el método de UPGMA (Sneath y Sokal 1973). El porcentaje de réplicas de árboles con cada grupo creado se realizó mediante el test de bootstrap con 1000 réplicas (Felsenstein 1985). Las distancias evolutivas fueron calculadas usando el método de Maximum Composite Likelihood (Tamura y Kumar 2004) empleando para ello el programa MEGA4 (Tamura y cols 2007).

La identificación de los miembros de las familias génicas se realizó a partir de las secuencias de ESTs anotadas como PEPCK, PEPCL o PEPCL-K en la base de datos del CFGP (bioinfo.ibmcp.upv.es/genomics/cfgpDB/), alineándolas y ensamblándolas mediante el software CAP3.

El análisis multivariante mediante funciones discriminantes se realizó empleando el software Statgraphics Centurion XVI tomando como variables los valores de expresión de *PEPCK1*, *PEPCK2*, *PEPCK3*, *PEPCL1*, *PEPCL2*, *PEPCL3*, *PEPCL-K1* y *PEPCL-K2* en 3 fechas de muestreo independientes entre los meses de septiembre y abril para cada una de las 6 variedades estudiadas: Clementina de Nules, Fortune, Limón, Washington Navel, Valencia Late y Sucreña sin tener en cuenta el efecto de la variable variedad. Para cada época y variedad se realizaron tres réplicas biológicas.

El análisis multivariante de agrupamiento cluster se realizó empleando el software NTSYS 2.02 tomando como variables las media

de las medidas de expresión de *PEPCK1*, *PEPCK2*, *PEPCK3*, *PEPCL1*, *PEPCL2*, *PEPCL3*, *PEPCL-K1* y *PEPCL-K2* en las variedades: Clementina de Nules, Fortune, Limón, Washington Navel, Valencia Late y Sucreña. La medida de similitud empleada fue el coseno y el algoritmo de aglomeración fue UPGMA. Se realizó una correlación el test de Mantel (Mantel 1967) entre la matriz de distancia previa al agrupamiento y la matriz cofenética, aplicándole el test de Mantel (Mantel 1967) para evaluar la congruencia del agrupamiento.

VI.3. Resultados y discusión.

VI.3.1. Identificación y expresión del gen fosfoenolpiruvato carboxiquinasa en cítricos.

En el capítulo IV se mostró que la expresión de PEPCCK obtenida mediante hibridaciones con micromatrices correlacionó fuertemente con la acidez de un conjunto de mutantes de Clementina de Nules (Z46, I09, H03, D11 y J59) con alteraciones en la acidez. En el presente capítulo se estudió la expresión génica de PEPCCK en mandarina Fortune, caracterizada por un elevado contenido en ácidos; variedades de naranja, Washington Navel y Valencia Late y en variedades con valores extremos de acidez como limón, con valores muy altos y la variedad de naranja sucreña que contiene valores muy bajos.

Del listado de genes obtenido en el capítulo IV, uno de los genes cuya correlación con los parámetros fenotípicos mostraron la misma tendencia al analizar las dos micromatrices (método 7k-20k) fue fosfoenolpiruvato carboxiquinasa que fue seleccionado por codificar una enzima que cataliza una reacción implicada en el metabolismo de los ácidos y los carbohidratos.

En la hibridación con la micromatriz de cDNA de 7k se obtuvo una correlación negativa significativa ($P < 0.05$, $n = 10$) entre la expresión del gen y el parámetro agronómico de la acidez. Con la micromatriz de cDNA de 20K también se obtuvo una correlación negativa ($r = -0.76$, $P < 0.02$, $n = 9$) con la acidez y la expresión del ARN de fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (Figura VI-3).

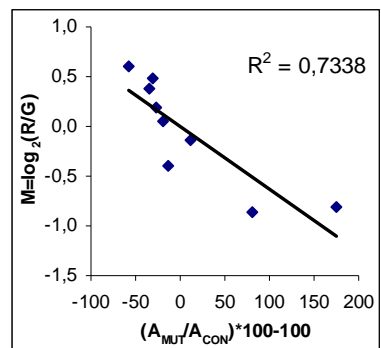


Figura VI-3: Correlación entre la expresión génica de PEPCCK (M) y la variación en la acidez ((A_{MUT}/A_{CON})*100-100).

A partir de los 33 ESTs (expressed sequence tags) identificados como fosfoenolpiruvato carboxiquinasa mediante alineamiento multiple de secuencias (blastX, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y disponibles en la base de datos del Proyecto de Genómica Funcional de Cítricos (Forment y cols 2005; Terol y cols 2007) se ensamblaron en 5 contigs empleando el software CAP3 (Huang y Madan 1999). Las secuencias de los contigs obtenidos, no alcanzaron la cola Poli (A) (Figura VI-4) y estas se completaron hasta llegar a la cola Poli (A) mediante secuenciación.

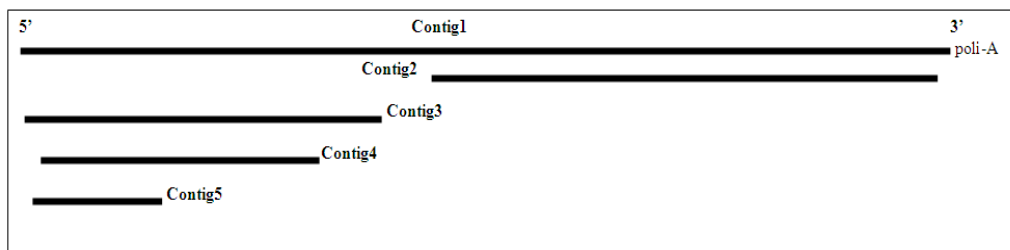


Figura VI-4: Representación del alineamiento de las secuencias del género *Citrus* obtenidas mediante BlastX de fosfoenolpiruvato carboxiquinasa de los 5 contigs generados con el software CAP3, con identidad significativa ($P < 10^{-6}$).

Una vez completas, un nuevo ensamblaje con CAP3, identificó 3 genes que fueron *PEPCK1*, *PEPCK2* y *PEPCK3* (Figura VI-5). Esto sugiere que el genoma de los cítricos contiene al menos tres genes diferentes que codifican para fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (ver secuencias en Anexo X). Las secuencias proteicas de los 3 genes comparten el mismo motivo conservado: PEPCK_ATP PS00532 (<http://prosite.expasy.org/>). *PEPCK1* tiene el motivo LIGDDEHcWsDnGVsN, *PEPCK2* el LIGDDEHcWgDnGVsN y *PEPCK3* el LIGDDEHvWaDtGVfN, lo cual sugiere que pertenecen a la misma familia.

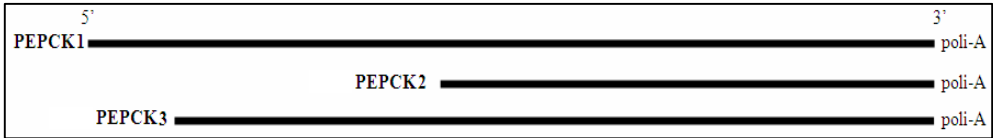


Figura VI-5: Representación del alineamiento de las secuencias de los genes *PEPCK1*, *PEPCK2* y *PEPCK3*.

Se realizó un árbol filogenético a partir de las 11 secuencias de mRNA identificadas como fosfoenolpiruvato carboxiquinasa de las especies de plantas existentes en www.ncbi.nlm.nih.gov y las 3 secuencias obtenidas de cítricos, *PEPCK1*, *PEPCK2* y *PEPCK3*.

El porcentaje de identidad entre *PEPCK1* y las demás secuencias fue superior al 74% ($P < 0.001$), siendo el orden de similitud de mayor a menor: ricino > vid > chopo > tomate > *Arabidopsis* > arroz > maíz. Para *PEPCK2*, la identidad mínima encontrada fue del 68% y sus similitudes de secuencia nucleica de mayor a menor fueron similares a *PEPCK1*: ricino > chopo > tomate > vid > maíz > arroz > *Arabidopsis*. La identidad de *PEPCK3* fue menor respecto a las de *PEPCK1* y *PEPCK2*, estando entre el 64% y el 68%. Estas identidades, junto con el estudio del árbol filogenético de las secuencias nucleicas (Figura VI-6-A), indican que la secuencia de *PEPCK1* es más parecida a las secuencias que codifican para PEPCK de especies leñosas como el ricino, la vid y el chopo que a especies como *Arabidopsis*, el arroz o el maíz, todas herbáceas.

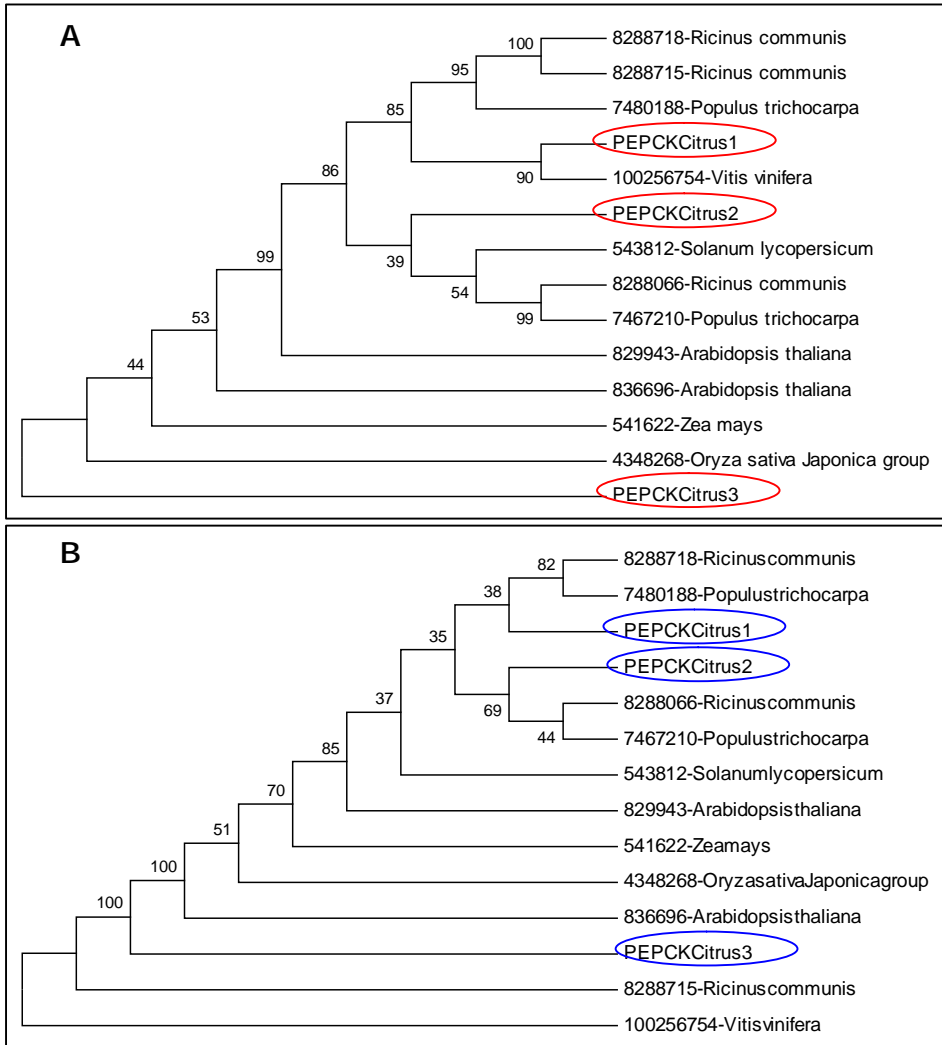


Figura VI-6: Árbol filogenético de las secuencias nucleicas (A) y proteicas (B) de los genes de PEPCK en plantas (GeneID-especie) mediante MEGA4. Bootstrap (N=100).

Por otro lado, se compararon las 3 secuencias de PEPCK con la base de datos del melocotón (*Prunus persica*) cuyo genoma ha sido secuenciado recientemente. Se obtuvo una identidad con secuencias no posicionados en cromosomas (scaffold) del 95%, 87% y del 87% para el gen 1, el gen 2 y el gen 3 respectivamente. Estas identidades son mayores que las encontradas para las demás secuencias

anotadas de PEPCK, lo que indicó una mayor similitud entre en las secuencias de los genes que codifican para PEPCK del género *Citrus* con las del género *Prunus*.

Al estudiar la identidad entre las secuencias proteicas, las identidades de *PEPCK1* y *PEPCK2* fueron similares a las encontradas para su secuencia nucleica, con rangos entre el 53% en vid al 85% en *Populus* para *PEPCK1* y de 21% en vid al 84% en *Ricinus* y *Populus* para *PEPCK2*. Algunas identidades fueron menores: la identidad de *PEPCK1* con vid pasó de un 83% en su secuencia nucleica a un 53% en su secuencia proteica y para *PEPCK2* su identidad también en Vid pasó del 82% en su secuencia nucleica a un 21% en su secuencia proteica. Los cambios de nucleótidos sufridos en vid, probablemente conformaron una proteína muy diferente a las que se generaron en las demás especies estudiadas, alejándose filogenéticamente de las mismas (Figura VI-6-B).

Los resultados anteriores indican que tanto en la secuencia nucleica como proteica, *PEPCK1* y *PEPCK2*, están filogenéticamente alejados de *PEPCK3*. La similitud entre las secuencias así como su estudio filogenético sugieren que *PEPCK1* y *PEPCK2*, están más cercanas filogenéticamente a especies leñosas como melocotón, chopo o ricino que a especies herbáceas.

VI.3.1.1. Expresión génica de PEPCK en diferentes órganos, estadios de desarrollo y tejidos del fruto.

DIFERENCIAS ENTRE ÓRGANOS:

En Clementina de Nules, la expresión génica relativa del gen *PEPCK1* fue significativamente mayor ($P < 0.05$) que la expresión de *PEPCK2* y la de *PEPCK3*, en pulpa, en hoja y en raíz. (Figura VI-7).

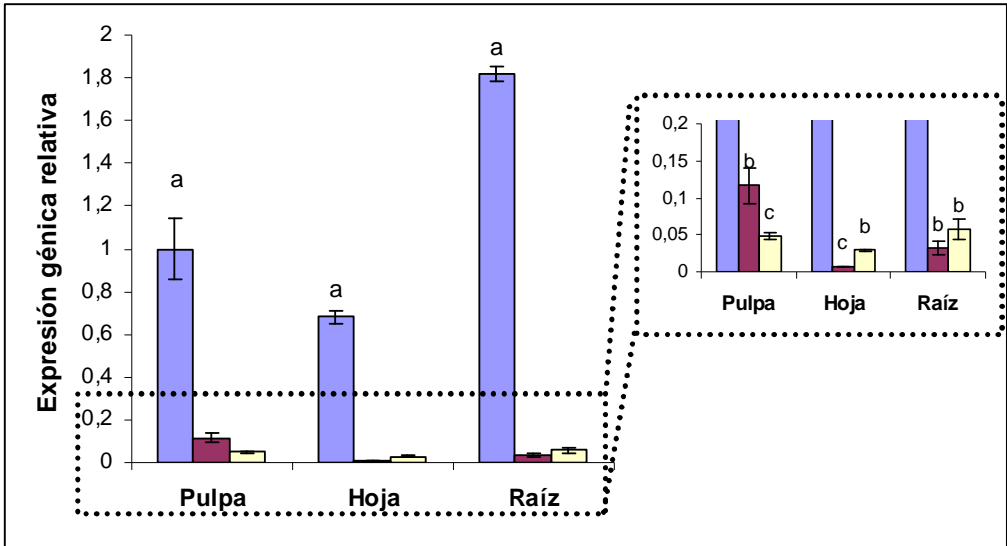


Figura VI-7: Expresión génica relativa de *PEPCK1* (■), *PEPCK2* (■) y *PEPCK3* (■) en pulpa, hoja y raíz respecto a la expresión de *PEPCK1* en pulpa. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\mu \pm E.S.$, $P < 0.05$, $n \geq 3$) entre órganos.

Los resultados obtenidos en hoja y raíz de cítricos, indican que la expresión de *PEPCK1* es muy superior a la de *PEPCK2* o la de *PEPCK3*, resultados que difieren en *Arabidopsis*, donde en hojas solo se expresa el gen 1, mientras que en cítricos se expresan los tres. En la raíz de *Arabidopsis* la expresión del gen *PCK1* y el gen *PCK2* es similar entre sí (Rylott y cols 2003), mientras que en cítricos, la expresión de *PEPCK1* es muy superior a los otros dos genes. Por tanto, se puede concluir que, en los diferentes órganos estudiados de cítricos, *PEPCK1* es el gen que presenta una mayor expresión

DIFERENCIAS ENTRE ESTADIOS DE DESARROLLO:

En los tres estadios de desarrollo estudiados: hoja joven, hoja adulta y hoja vieja, la expresión génica de los tres genes no mostró diferencias significativas ($P < 0.05$). Al igual que en raíz y pulpa, la expresión de *PEPCK1* fue mayor que la expresión de *PEPCK2* y ésta a su vez superior a la de *PEPCK3* ($P < 0.01$) (Figura VI-8).

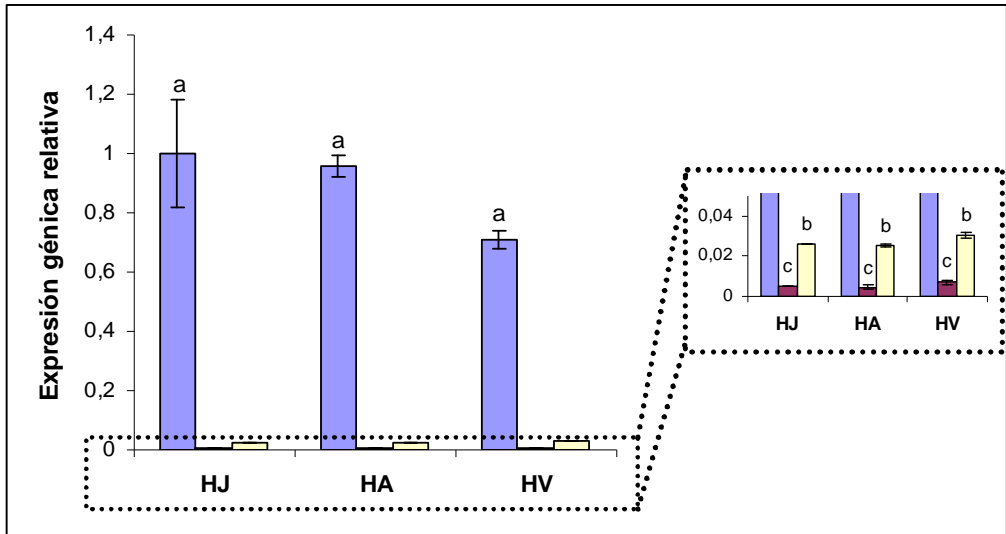


Figura VI-8: Expresión génica relativa de *PEPCK1* (■), *PEPCK2* (■) y *PEPCK3* (■) en hoja joven (HJ), hoja adulta (HA) y hoja vieja (HV) respecto a la expresión de *PEPCK1* en HJ. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\mu \pm E.S$, $P < 0.05$, $n \geq 3$)

En plantas con flores, la cantidad de PEPCK está presente solo en ciertos tipos de células y su abundancia depende la mayoría de las veces del estado de desarrollo (Walker y cols 1999; Bahrami y cols 2001). En *Arabidopsis*, la abundancia de PEPCK es mucho mayor en hojas jóvenes que en hojas viejas (Malone y cols 2007) discrepando con los resultados obtenidos en cítricos, donde no existen diferencias de expresión significativa de ninguno de los tres genes entre los diferentes estadios de desarrollo vegetativo.

DIFERENCIAS ENTRE TEJIDOS DEL FRUTO.

Dado que los resultados obtenidos en las micromatrices, mostraron una correlación negativa significativa ($P < 0.02$) entre la expresión génica y la acidez, se procedió a discernir su comportamiento espacial dentro del fruto.

Se diferenciaron dos tipos de tejidos: las vesículas y el albedo del fruto, considerando este último, el tejido que recubre a los gajos que contienen las vesículas y situado entre éstos y el flavedo del fruto. En las vesículas de las dos variedades de mandarina, Fortune y Clementina de Nules, la expresión de *PEPCK1* fue significativamente mayor ($P < 0.05$) que la de *PEPCK2* y la de *PEPCK3*, cuyas expresiones fueron similares entre sí. En el albedo de Clementina de Nules, la expresión de los tres genes fue similar a las obtenidas en sus vesículas (Figura VI-9-A). En el albedo de Fortune, *PEPCK1* no se encontró inducido a los niveles encontrados en sus vesículas, presentando los tres genes, expresiones sin diferencias significativas ($P < 0.05$) entre sí (Figura VI-9-B). En la naranja Washington Navel, la expresión de *PEPCK1*, *PEPCK2* y *PEPCK3* no mostró diferencias significativas en el tejido de vesículas. La expresión de *PEPCK1* fue significativamente mayor a la expresión de *PEPCK3* y ésta a su vez a la de *PEPCK2* en el albedo (Figura VI-9-C).

Los resultados anteriores indican que existen diferencias significativas ($P < 0.05$) en la expresión de *PEPCK1* en el albedo entre dos variedades de Mandarina: Fortune y Clementina de Nules. La expresión de *PEPCK1* en el albedo y las vesículas de Clementina de Nules es superior a la de *PEPCK2* y *PEPCK3*. En el albedo de Fortune no se encontraron diferencias significativas entre los tres genes. En las vesículas de ambas variedades la expresión de *PEPCK1* fue significativamente mayor ($P < 0.05$) a la de los otros dos genes, manteniéndose la expresión de *PEPCK2* y *PEPCK3* similares entre sí. En las vesículas de la naranja estudiada, a diferencia de lo observado en las mandarinas, la expresión de *PEPCK1* son similares a los de *PEPCK2* o a la de *PEPCK3* ($P < 0.05$). En el albedo de naranja, pese a que la expresión de *PEPCK1* fue superior a la de *PEPCK2* o a la de *PEPCK3*, como ocurría en Clementina de Nules, los niveles de expresión fueron significativamente menores ($P < 0.05$).

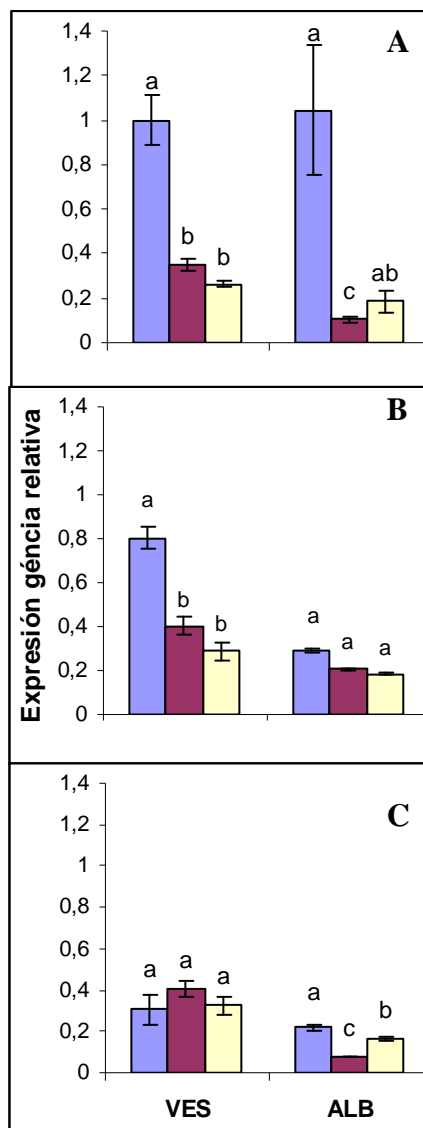


Figura VI-9: Expresión génica de *PEPCK1* (■), *PEPCK2* (■) y *PEPCK3* (■) en albedo y vesículas de fruto: (A) Clementina de Nules 16 de Octubre, (B) Fortune y (C) W. Navel 17 de abril respecto a la expresión de *PEPCK1* en las vesículas de Clementina de Nules. Letras diferentes indican diferencias significativas. ($\mu \pm E.S.$, $P < 0.05$, $n \geq 3$).

VI.3.1.2. Expresión génica de PEPCK durante la maduración del fruto.

A continuación se escogieron varias variedades de cítricos con diferentes índices de maduración (4.4 en Valencia Late, 6.5 en Fortune, 11.8 en Washington Navel y 24.0 en Clementina de Nules) en una misma fecha de muestreo. Se estudió la relación entre la expresión de *PEPCK1* y la acidez, los SST (°Brix) y el índice de madurez interna (IM) (Figura VI-10).

La correlación entre la expresión del gen que codifica para *PEPCK1* y el IM (Figura VI-10-A) obtuvo un coeficiente de correlación $r=0.97$ significativo ($P<0.01$, $n=4$). Los sólidos solubles totales no correlacionaron con la expresión de *PEPCK1* (Figura VI-10-B). La acidez si correlacionó con la expresión génica de *PEPCK1* ($r=-0.84$; $P<0.10$) (Figura VI-10-C) indicando una relación inversa entre la acidez y la expresión de *PEPCK1*.

Esta observación apoya la correlación obtenida entre la expresión génica de fosfoenolpiruvato carboxiquinasa y el parámetro agronómico de acidez en las hibridaciones realizadas con micromatrices de cDNA de los 5 genotipos seleccionados en el capítulo III.

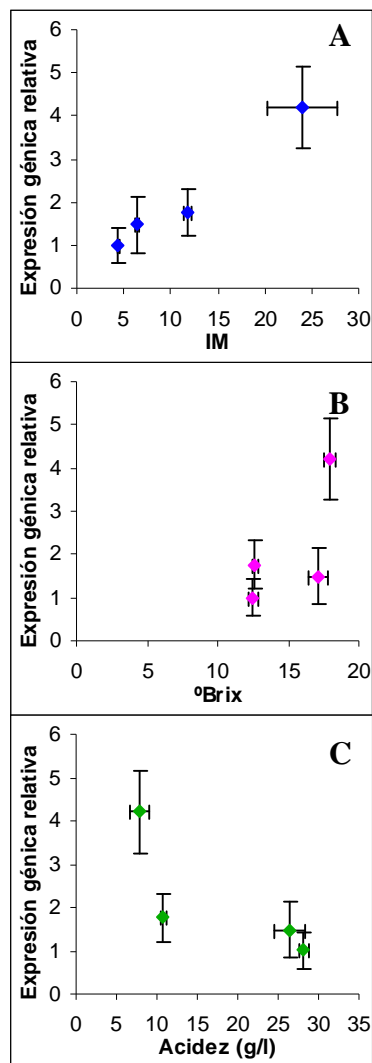


Figura VI-10: Correlación entre la expresión de *PEPCK1* respecto a la expresión de *PEPCK1* en Valencia Latey el IM (A), SST (B) y Acidez (C) en frutos de Valencia Late, Fortune, Washington Navel y Clementina de Nules.

Una vez obtenida esta relación entre la expresión de fosfoenolpiruvato carboxiquinasa y la acidez del zumo se procedió a realizar un estudio más exhaustivo de la expresión de *PEPCK1*, *PEPCK2* y *PEPCK3* a lo largo de la fase II y III de la maduración de diferentes variedades de cítricos: Clementina de Nules, Fortune, Valencia Late, Washington Navel, Sucreña y Limón. Se escogió Clementina de Nules por ser el genotipo a partir del cual se obtuvo correlación de PEPCK con la acidez. La variedad Fortune se escogió por ser una mandarina ácida y se seleccionaron varias naranjas (Valencia Late y Washington Navel) para estudiar si el patrón de expresión es idéntico entre especies. Finalmente, las variedades Limón y Sucreña se seleccionaron por ser, dentro de los frutos cítricos, dos variedades con valores extremos en la acidez tanto superior como inferior. Se observaron dos comportamientos diferentes. El primero es una inducción de la expresión de *PEPCK1* a lo largo de la maduración de los frutos, manteniéndose los niveles de *PEPCK2* y *PEPCK3* sin variaciones acusadas. En el segundo no se produce esta inducción de *PEPCK1* permaneciendo los valores de expresión a niveles en general sin cambios a lo largo del periodo de maduración de los frutos.

A) Inducción durante la maduración del fruto en mandarinas y limones.

MANDARINAS:

En Clementina de Nules, entre septiembre y noviembre, se produce un descenso acusado estadísticamente significativo ($P < 0.05$) en la acidez, pasando de 39.54 g/l a 10.22 g/l respectivamente. En una segunda etapa, la acidez sigue disminuyendo, pero éste descenso tiende a una asíntota horizontal. El ácido cítrico y el ácido málico fueron los ácidos mayoritarios, tal y como se ha estudiado en otra variedades de cítricos (Karadeniz 2003). La proporción entre ellos varió a lo largo de la maduración: entre septiembre y noviembre, donde se produce el mayor descenso en la acidez total, el porcentaje de ácido cítrico y de ácido málico fue del 70.25% y del 27.27% en septiembre y del 41.40% y del 58.48% en noviembre, indicando un mayor descenso de concentración de ácido cítrico (90.5%) que de ácido málico (70.25%). Los sólidos solubles totales incrementaron su concentración progresivamente de manera significativa ($P < 0.05$) entre los meses de noviembre a marzo, siendo de 11.78 °Brix en septiembre, 12.23 °Brix en noviembre, 14.32 °Brix en diciembre, 14.90 °Brix en febrero y 17.93 °Brix en marzo (Figura VI-11).

La expresión de *PEPCK1* en julio, agosto y septiembre no se modificó significativamente ($P < 0.05$). De septiembre a octubre y de octubre a noviembre la expresión de *PEPCK1* aumentó significativamente mientras que de noviembre a marzo los niveles de expresión fueron similares ($P < 0.05$). La expresión de *PEPCK2* se mantuvo sin cambios significativos a lo largo de todos los meses de estudio a excepción de diciembre, siendo su expresión similar a *PEPCK1* en julio, agosto y septiembre. Las medias de la expresión de *PEPCK3* fueron menores respecto a la expresión de *PEPCK1* y a la de *PEPCK2* ($P < 0,05$) (Figura VI-12).

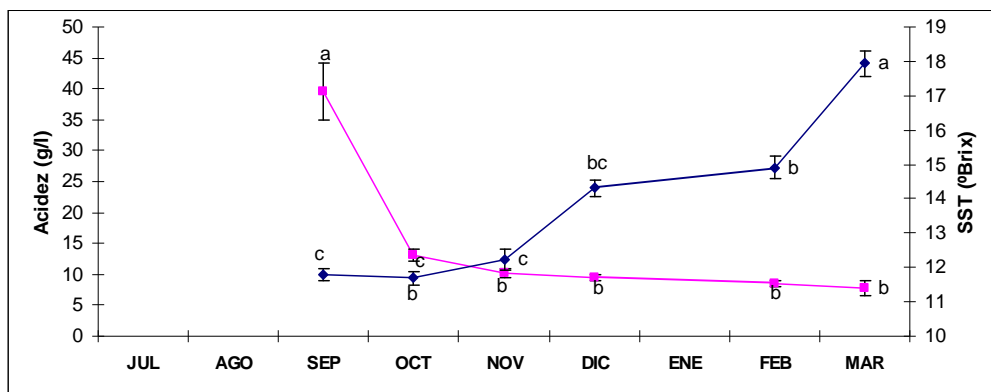


Figura VI-11: Acidez (g/l) (—■—) y °Brix (—◆—) del zumo de Clementina de Nules en: 18 de septiembre (SEP), 14 de noviembre (NOV), 12 de diciembre (DIC), 2 de febrero (FEB) y 13 de marzo (MAR). Letras diferentes indican diferencias significativas por parámetro ($\mu \pm E.S$, $P < 0.05$, $n \geq 3$).

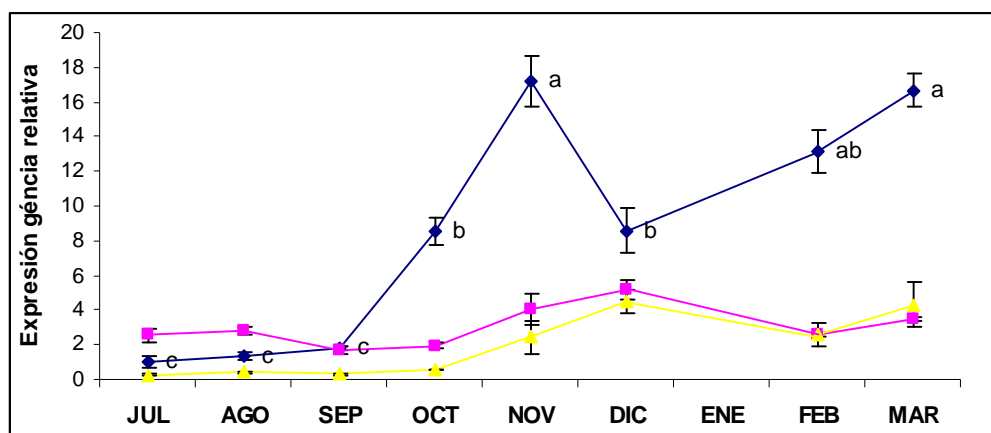


Figura VI-12: Expresión de *PEPCK1* (—■—), *PEPCK2* (—◆—) y *PEPCK3* (—▲—) en pulpa de Clementina de Nules en julio (JUL), agosto (AGO), septiembre (SEP), octubre (OCT), noviembre (NOV), diciembre (DIC), febrero (FEB) y marzo (MAR) respecto a la expresión de *PEPCK1* en Julio. Letras diferentes indican diferencias significativas entre fechas para *PEPCK1* ($\mu \pm E.S$, $P < 0.05$, $n \geq 3$).

Por tanto, se puede concluir que en Clementina de Nules, se produce una inducción de la expresión de *PEPCK1* entre septiembre y noviembre, coincidiendo con una reducción en la acidez y un aumento en los sólidos solubles totales del mismo. La expresión de *PEPCK2* y de *PEPCK3* se mantuvo a niveles prácticamente constantes

a lo largo de todo el periodo siendo inferiores a la de *PEPCK1* a partir de su inducción de septiembre a noviembre.

Complementariamente se procedió a estudiar la expresión de los tres genes de PEPCK en la pulpa de los frutos de los genotipos: D11, H03, J59, I09 y Z46, caracterizados por presentar el parámetro de acidez diferente a su parental, Clementina de Nules (capítulo III). En los tres genotipos caracterizados por tener un contenido de ácidos menor respecto a Clementina de Nules, la expresión de los tres genes fue similar a la de su parental. La expresión de *PEPCK1* se incrementó paralelamente al descenso en la acidez.

Así, en el genotipo D11, caracterizado por una menor acidez en zumo se observó que entre los muestreos realizados en julio y agosto, la expresión de los 3 genes no varió significativamente ($P < 0.05$), siendo la expresión de *PEPCK1* y *PEPCK2* superior a *PEPCK3*. Entre septiembre, octubre y noviembre, ni la expresión de *PEPCK2* ni la de *PEPCK3* modificaron su nivel y siempre mostraron valores de expresión génica por debajo de *PEPCK1*, el cual la incrementó significativamente ($P < 0.05$) de septiembre a octubre y de octubre a noviembre. Este incremento en la expresión de *PEPCK1*, fue paralelo con un descenso en la acidez del zumo, de 17.7 g/l en septiembre a 10.73 g/l en octubre y 8.36 g/l en noviembre (Figura VI-13-A).

El genotipo H03, la expresión de *PEPCK1* se incrementó significativamente ($P < 0.05$) de septiembre a noviembre. Este incremento fue paralelo a un descenso en la acidez del zumo de 18.42 g/l en septiembre a 7.85 g/l en noviembre. El genotipo H03 no mostró diferencias significativas en la expresión de *PEPCK2* ni *PEPCK3* entre los muestreos realizados en septiembre y noviembre, siendo los niveles de ambos similares en ambas fechas y significativamente menores a *PEPCK1* (Figura VI-13-B).

En el genotipo J59, seleccionado tener una menor acidez del zumo, la expresión de *PEPCK1* se incrementó significativamente ($P<0.05$) de octubre a noviembre paralelamente al descenso significativo en la acidez del zumo en octubre con 11.61 g/l a 6.70 g/l en noviembre. En las dos fechas, tanto la expresión de *PEPCK2* como la de *PEPCK3*, fue significativamente menor ($P<0.05$) respecto a *PEPCK1* (Figura VI-13-C). No se observó diferencias en la expresión de *PEPCK2* entre octubre y noviembre y se produjo un aumento significativo en la expresión de *PEPCK3* de octubre a noviembre. El nivel de expresión de *PEPCK1* en noviembre para el genotipo J59, fue un 129% superior al mostrado en Clementina de Nules. Esta mayor expresión de *PEPCK1* en el genotipo J59 pudo ser causante, en parte, del menor contenido en ácidos del zumo en este genotipo, situación que sería compatible con la inducción de PEPCK observada en frutos de arándanos, frambuesa y grosella en estadios donde existe desasimilación de citrato y/o malato (Famiani y cols 2005).

En los dos genotipos seleccionados por tener al menos el contenido de acidez alto en el zumo comparándolos con Clementina de Nules (I09 y Z46), el patrón de expresión de PEPCK en relación con la acidez fue similar a la observada en Clementina de Nules de septiembre a noviembre.

Así, en el genotipo I09, la expresión de *PEPCK3* fue significativamente menor ($P<0.05$) tanto en septiembre como en octubre comparándolo con la expresión de *PEPCK1* o la de *PEPCK2* ($P<0.05$). Sin embargo, la expresión de *PEPCK1* se incrementó de forma significativa ($P<0.05$) de septiembre a octubre paralelamente al descenso significativo ($P<0.05$) de la acidez de septiembre con 45.47 g/l a 19.72 g/l en octubre (Figura VI-13-D).

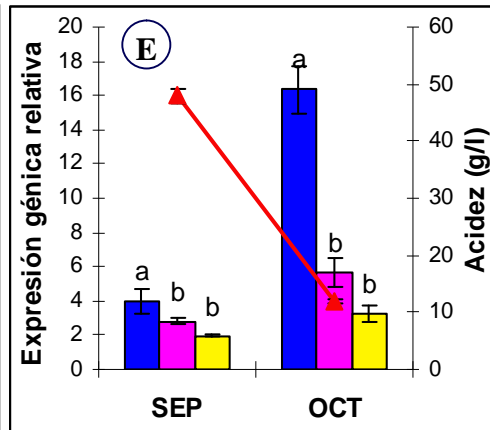
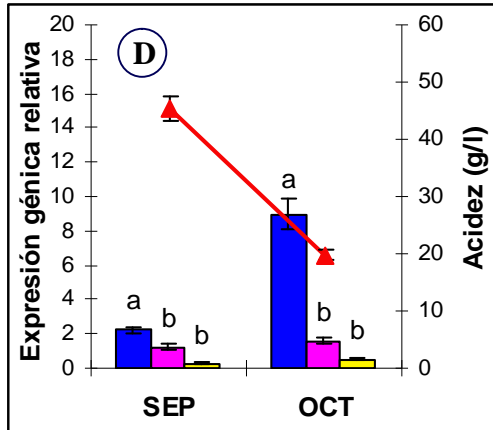
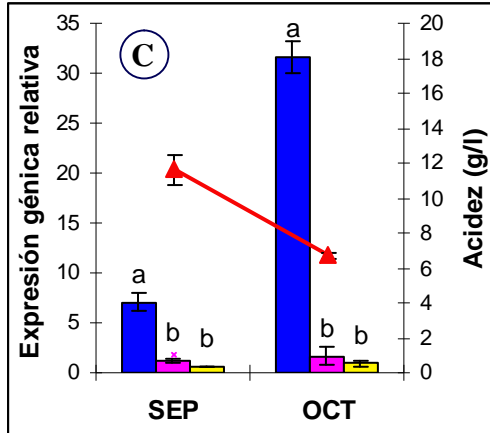
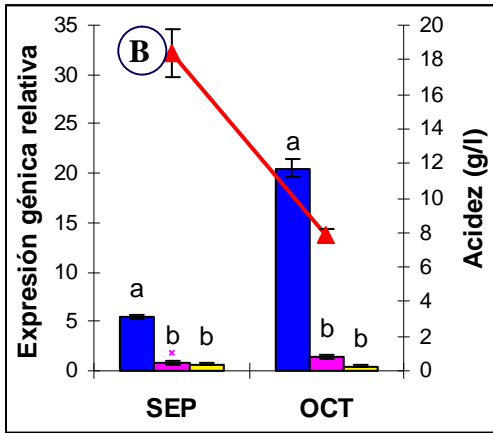
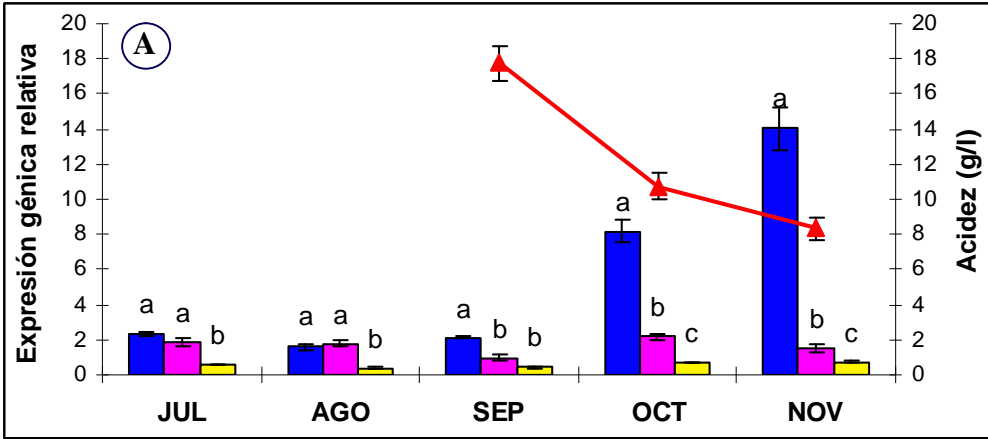


Figura VI-13: En Expresión de *PEPCK1* (■), *PEPCK2* (■), y *PEPCK3* (■) en pulpa respecto a la expresión de *PEPCK1* de Clementina de Nules a los 100 DDA y acidez (g/l) (—■) del zumo de los mutantes de acidez baja: (A)-D11, (B)-H03, (C)-J59 y de los mutantes de acidez alta: (D)-I09, (E)- Z46, a los 100 DDA (JUL), 140 DDA (AGO), 170 DDA (SEP), 200 DDA (OCT) y 225 DDA (NOV). Letras diferentes indican diferencias significativas por fecha ($\mu \pm E.S.$, $P < 0.05$, $n \geq 3$).

En el genotipo Z46, la expresión de *PEPCK1*, *PEPCK2* y *PEPCK3* se incrementaron de octubre a noviembre, siendo la expresión de *PEPCK1* superior a la de *PEPCK2* y ésta a su vez a la de *PEPCK3*, para cada fecha estudiada con una probabilidad superior al 98%. El incremento de la expresión de *PEPCK1* de octubre a noviembre, se acompañó de un descenso de la acidez del zumo pasando de 47.96 g/l a 11.98 g/l (Figura VI-13-E).

De los resultados anteriores se puede concluir que la expresión de *PEPCK1* en la variedad Clementina de Nules se mantiene a niveles constantes durante los meses de julio, agosto y septiembre y parejo al descenso de la acidez del zumo y al aumento en los sólidos solubles totales en octubre y noviembre, su expresión se incrementa significativamente ($P < 0.05$). Este comportamiento se repite en los 5 genotipos seleccionados de la colección, confirmando la relación de inducción entre *PEPCK1* y la acidez. En arándanos, frambuesa y grosella, *PEPCK* se incrementa durante la maduración, coincidiendo con estadios de desasimilación de los ácidos malato y/o citrato. Esta relación, no fue encontrada en todos los estadios de estos frutos, ya que *PEPCK* también se detectó igualmente en estadios donde no hubo desasimilación de ácidos asumiendo que *PEPCK* debe tener otras funciones en esos frutos (Famiani y cols 2005). Una situación similar parece tener lugar en los cítricos.

Otra variedad perteneciente al grupo de las mandarinas que a continuación se estudió, es la variedad Fortune. Esta variedad es un híbrido de mandarina caracterizado por presentar una acidez del zumo alta y una dinámica de acumulación de azúcares similares comparandola con Clementina de Nules.

La acidez del zumo de los frutos del mandarino híbrido Fortune disminuye a lo largo de su maduración, pero de una manera menos acusada que en Clementina de Nules ($P < 0.05$, 75.96 g/l en

septiembre; 37.52 g/l en noviembre; 27.27 g/l en diciembre; 22.15 g/l en febrero y 19.22 g/l en marzo). Al igual que lo observado en Clementina de Nules, el ácido cítrico y el ácido málico son los mayoritarios del zumo y de nuevo se produjo un cambio en los porcentajes de los mismos, pasando el citrato y el malato del 50.71% y 48.80% en septiembre al 67.63% y 30.27% en diciembre respectivamente. El contenido de los dos ácidos disminuyó al igual que en Clementina de Nules, aunque en Fortune fue su contenido en malato el que disminuyó en mayor proporción. Este descenso en la acidez fue acompañado del aumento significativo ($P<0.05$) en sólidos solubles totales de zumo de los frutos (10.63 °Brix en septiembre; 11.10 °Brix en noviembre; 12.15 °Brix en diciembre; 13.93 °Brix en febrero y 15.97 °Brix en marzo; Figura VI-14).

En Fortune, la expresión de *PEPCK1* fue significativamente mayor ($P<0.05$) que la de *PEPCK2* y ésta a su vez que la de *PEPCK3* en todo el periodo de maduración estudiado, de septiembre a marzo. En noviembre, la expresión de *PEPCK1* aumentó significativamente ($P<0.05$) respecto a septiembre. Durante los meses de diciembre y febrero, no se encontraron diferencias significativas en las medias. En el mes de marzo, momento en que alcanzó el índice de madurez interna mínimo para su consumo, la expresión de *PEPCK1* disminuyó significativamente respecto a los anteriores meses, pero continuando siendo superior a la de septiembre. La expresión de *PEPCK2* aumentó significativamente de septiembre a noviembre, manteniéndose sin diferencias en los muestreos siguientes. *PEPCK3* se expresó diferencialmente en marzo, donde aumentó significativamente respecto a los muestreos anteriores (Figura VI-15). Estos resultados son similares a los observados en las demás variedades de mandarina estudiadas y confirman la inducción de *PEPCK1* a lo largo del periodo de maduración de Fortune.

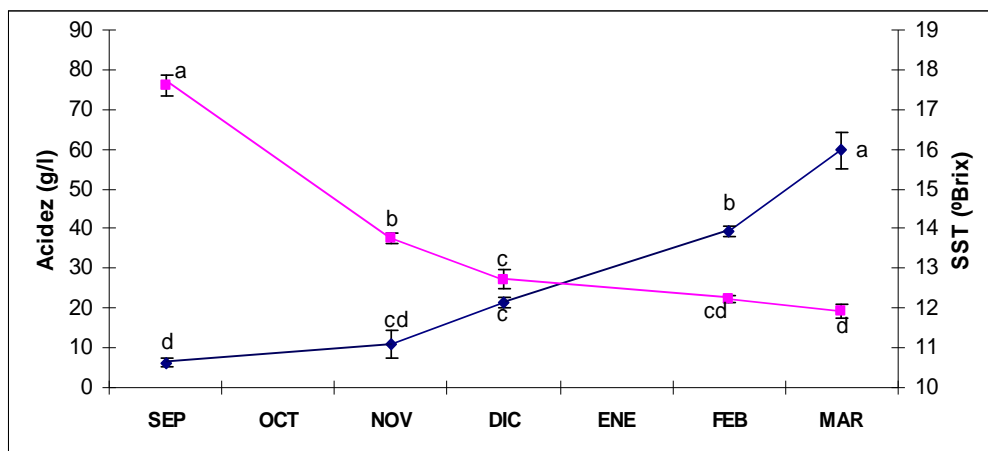


Figura VI-14: Acidez g/l (—■—) y °Brix (—◆—) de la variedad Fortune en septiembre (SEP), noviembre (NOV), diciembre (DIC), febrero (FEB) y marzo (MAR). Letras diferentes indican diferencias significativas por parámetro ($\mu \pm E.S.$, $P < 0.05$, $n \geq 3$).

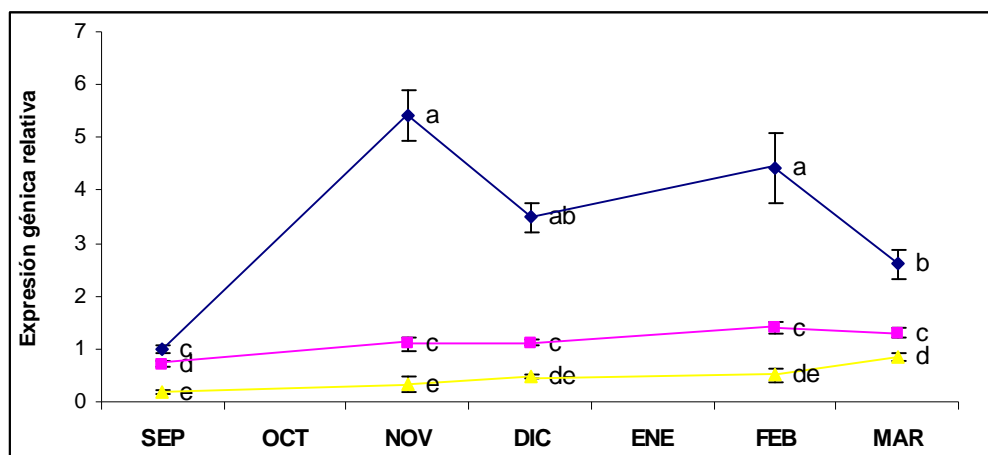


Figura VI-15: Expresión de *PEPCK1* (—◆—), *PEPCK2* (—■—), y *PEPCK3* (—▲—) en pulpa de Fortune en septiembre (SEP), octubre (OCT), noviembre (NOV), diciembre (DIC), febrero (FEB) y marzo (MAR) respecto a la expresión de *PEPCK1* en septiembre. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\mu \pm E.S.$, $P < 0.05$, $n = 6$).

Del estudio de la expresión de fosfoenolpiruvato carboxiquinasa en la variedad Fortune, se puede concluir que el patrón de expresión de *PEPCK1*, *PEPCK2* y *PEPCK3* fue similar al observado en Clementina de Nules y los 5 genotipos estudiados. De nuevo, la expresión de *PEPCK2* y *PEPCK3* se mantuvo constante a lo

largo de la maduración, y fue la expresión de *PEPCK1* la que se incrementó significativamente ($P<0.05$) de septiembre a noviembre, momento donde se produce un descenso significativo ($P<0.05$) de la acidez y una acumulación de los sólidos solubles totales del zumo.

LIMÓN.

El limón Eureka tiene varias floraciones al año; por tanto es posible encontrar en el mismo árbol, en un momento dado frutos en distintos estadios de maduración. Para estudiar la evolución de la maduración del fruto y la expresión de fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, se realizó un muestreo de frutos, clasificándolos en base a su índice de color externo, el cual variaba de -9.40 (verde) a 3.90 (amarillo), siendo el cero el valor de transición según la escala de color de Hunter Lab (Hunter 1967).

La acidez del zumo se incrementó significativamente ($P<0.05$) del estadio más verde con ICC de -9.40 al estadio con ICC de -5.17. A partir de este estadio, la concentración de ácidos se mantuvo sin diferencias significativas entre frutos con ICC de -5.17 a frutos con ICC de 3.90. La acidez fue de 70 g/l aproximadamente en todos ellos. El ácido mayoritario fue el ácido cítrico, seguido del ácido málico pero a una proporción superior a las mandarinas (95.40% de ácido cítrico y un 4.60% de ácido málico en los frutos amarillos, con ICC de 3.90). Los sólidos solubles totales disminuyeron significativamente ($P<0.05$) de los estadios verdes, con ICC de -9.40, -5.17 y -2.36 a los estadios amarillos con ICC de 2.62, 3.10, 3.89 y 3.90 (Figura VI-16). En términos absolutos la variación en los SST del limón a lo largo de la maduración fue bastante inferior a la observada en Clementina de Nules. Por tanto el limón es un cítrico caracterizado principalmente por presentar un elevado contenido ácidos en el fruto desde que éste se encuentra verde.

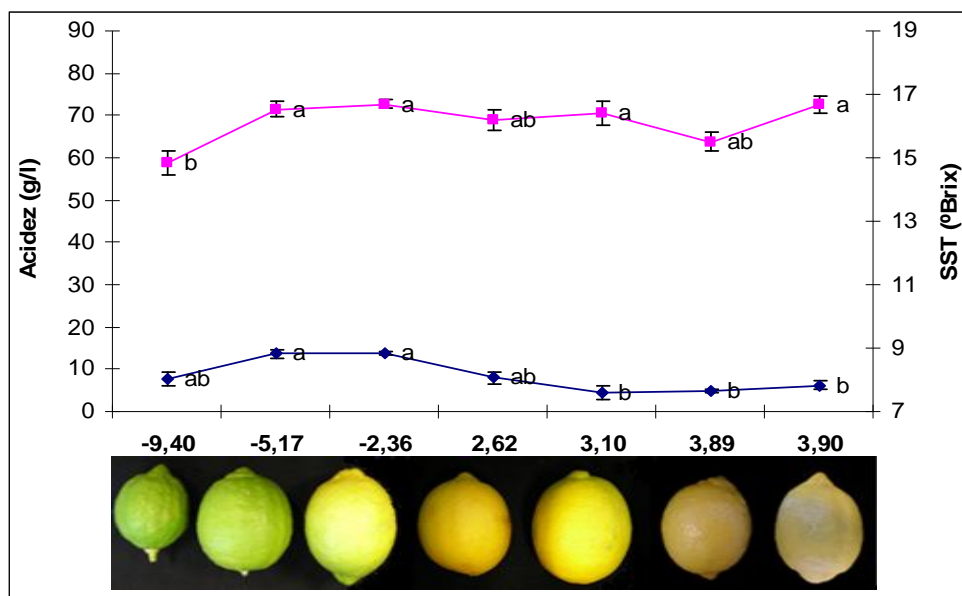


Figura VI-16: Acidez g/l (—■—) y °Brix (—◆—) el limón Eureka en diferentes estadios de maduración del fruto, clasificados según su índice de color (ICC). Letras diferentes indican diferencias significativas por parámetro ($\mu \pm E.S.$, $P < 0.05$, $n \geq 3$).

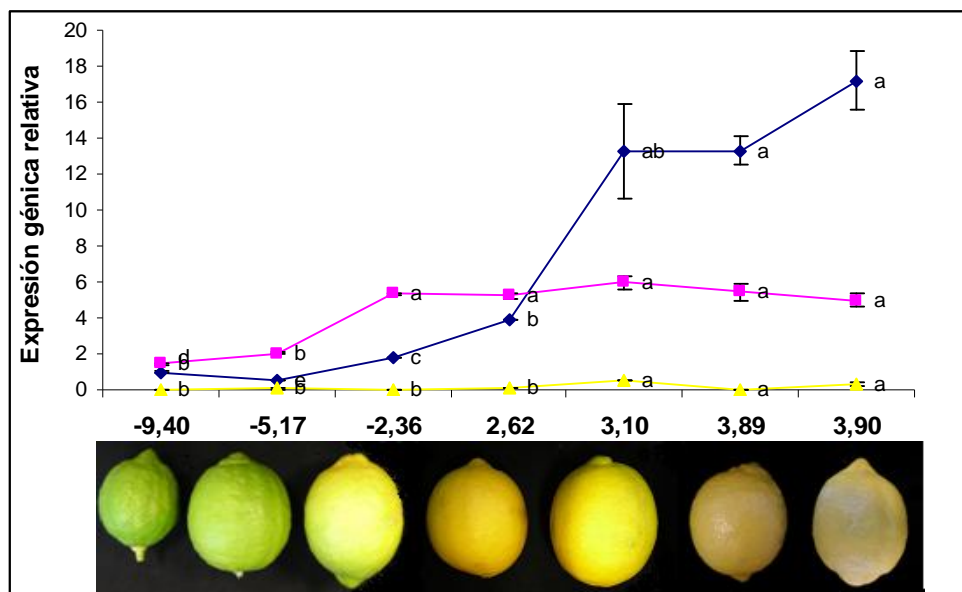


Figura VI-17: Expresión de *PEPCK1* (—◆—), *PEPCK2* (—■—), y *PEPCK3* (—▲—) respecto a la expresión de *PEPCK1* en el estado con ICC=-9,40 en pulpa de limón Eureka de frutos con diferentes Índices de color (ICC). Letras diferentes indican diferencias significativas por gen ($\mu \pm E.S.$, $P < 0.05$, $n \geq 3$).

La expresión de *PEPCK1* se incrementó significativamente a lo largo de los diferentes estadios de color, de los frutos verdes con ICC de -9.40 a los frutos amarillos con ICC de 2.62, 3.10, sin variar entre los frutos amarillos con ICC superior a 3.10 (Figura VI-17). La expresión de *PEPCK2* se incrementó significativamente ($P<0.05$) de los dos primeros estadios de verde al estadio de ICC -2.36 y se mantuvo constante durante todos los estadios amarillos. La expresión de *PEPCK2* fue superior a *PEPCK1* en los estadios verdes e inferior en los estadios amarillos. La expresión de *PEPCK3* fue significativamente menor ($P<0,05$) a la de *PEPCK1* y a la de *PEPCK2* en todos los estadios.

En limón, la expresión de *PEPCK1* tuvo un comportamiento similar a las mandarinas, es decir, se incrementó a lo largo de la maduración del fruto de los estadios verdes con ICC negativo a los estadios amarillos con ICC positivo. Sin embargo, la inducción de la expresión de *PEPCK1* no fue coincidente con una disminución del contenido de ácidos o un aumento en los SST (Figura VI-16 y VI-17).

Los resultados obtenidos en las variedades de mandarina indican que PEPCK parece tener una función en el catabolismo de los ácidos como previamente se propuso para uva (Ruffner y Kliewer 1975) y tomate (Bahrami y cols 2001) relacionándose la inducción de PEPCK a los estadios donde se producía desasimilación de citrato y/o malato (Famiani y cols 2005). Además, PEPCK debe tener otras funciones ya que en los mismos estudios también se detectó en estadios donde no se producía catabolismo de ácidos como en el caso de la fresa (Famiani y cols 2005) una situación ligeramente diferente a la observada en limón, donde existe inducción de *PEPCK1* sin disminuir el contenido de ácidos ni incrementar los °Brix en el fruto (Figura VI-16 y VI-17). En estudios anteriores, la homeostasis del pH

celular es uno de las posibles funciones que se le atribuye a *PEPCK* en los estadios donde no se observaba desasimilación de citrato y/o malato (Leegood y Walter 2003; Famiani y cols 2005). En limón *PEPCK1* se activa tardíamente en un estadio donde no existe degradación de ácido cítrico. En el limón no existe reducción de ácidos ni inducción inicial de *PEPCK1*. También es interesante señalar que el limón no muestra incremento de sólidos solubles totales. Esta observación parece ligar la reducción de ácidos, la inducción de *PEPCK1* y el incremento de sólidos solubles totales. La explicación sugiere que el ácido acumulado en la vacuola puede estar siendo paulatinamente liberado al citosol, mediante un transportador vacuolar de citrato localizado en la células de las vesículas de zumo (Shimada y cols 2006) existiendo así una síntesis y degradación continua de ácidos como ocurre en otras especies con frutos ácidos como la uva (Diakou y cols 2000; Terrier y Romieu 2001) manteniéndose un nivel constante de ácidos y activa la expresión de *PEPCK1* al menos durante las fases tardías de maduración.

De los resultados obtenidos anteriormente al estudiar mandarinas y limón, se puede concluir que la expresión de *PEPCK1*, *PEPCK2* y *PEPCK3* es similar entre las variedades de mandarina: Clementina de nules, Fortune, J59, I09, D11, H03 y Z46. En el limón, al aumentar la expresión de *PEPCK1*, no se produce un descenso en la acidez del fruto ni una acumulación de SST.

B) Inducción durante la maduración del fruto en naranjas.

La acidez del zumo de los frutos de Valencia Late significativamente disminuyó ($P < 0.05$) de septiembre a abril de forma gradual; (45.96 g/l en septiembre, 32.80 g/l en noviembre, 24.00 en diciembre, 22.05 g/l en febrero y 16.58 g/l en abril) (Figura VI-18).

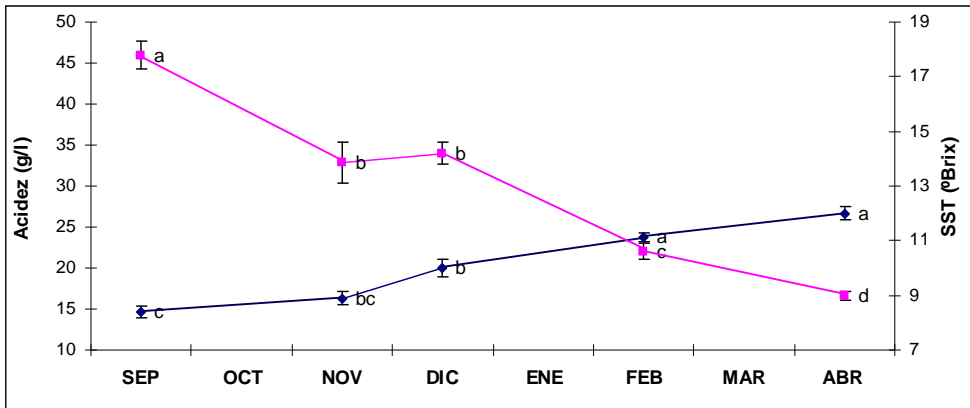


Figura VI-18: Acidez g/l (—■—) y °Brix (—◆—) de la variedad Valencia late en septiembre (SEP), noviembre (NOV), diciembre (DIC), febrero (FEB) y marzo (MAR). Letras diferentes indican diferencias significativas por parámetro ($\mu \pm E.S.$, $P < 0.05$, $n \geq 3$).

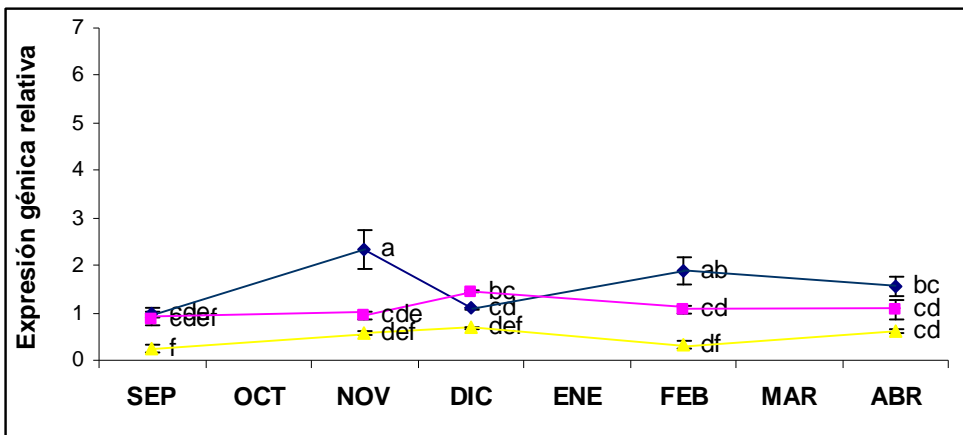


Figura VI-19: Expresión de *PEPCK1* (—◆—), *PEPCK2* (—■—), y *PEPCK3* (—▲—) en pulpa de Valencia Late en septiembre (SEP), octubre (OCT), noviembre (NOV), diciembre (DIC), febrero (FEB), marzo (MAR) y abril (ABR) respecto a la expresión de *PEPCK1* en septiembre. Letras diferentes indican diferencias significativas por gen ($\mu \pm E.S.$, $P < 0.05$, $n = 6$).

Al igual que en las variedades de mandarina y limón, en Valencia Late, el ácido cítrico y el ácido málico son los mayoritarios. El descenso en la acidez total entre septiembre y febrero se confirmó por un descenso del 70.95% de citrato y un 64.46% de malato, sin variar significativamente ($P<0.05$) su proporción en el zumo (66.80% y 32.86% en septiembre; 65.44% y 34.48% en febrero). Los sólidos solubles totales se incrementaron de manera significativa ($P<0.05$) durante la maduración del fruto (8.42 °Brix en septiembre; 8.90 °Brix en noviembre; 10.00 °Brix en diciembre; 11.13 °Brix en febrero y 12.00 °Brix en abril) (Figura VI-18).

La expresión de *PEPCK1* en Valencia Late aumentó significativamente ($P<0.05$) entre los meses de septiembre a noviembre. La expresión de *PEPCK1* fue muy similar ($P<0.05$) a la de *PEPCK2* a partir de diciembre. La expresión de *PEPCK3* fue significativamente menor ($P<0.05$) a la de *PEPCK2* (65% en septiembre; 38% en noviembre; 52% en diciembre; 66% en febrero y 42% en abril) (Figura VI-19).

Finalmente se puede decir que en Valencia Late la dinámica de ácidos y azúcares en el fruto es similar aunque con algunas diferencias a las mandarinas, existiendo degradación de ácidos y acumulación de azúcares a lo largo de la maduración. En este caso la inducción de *PEPCK1* también se produce en los meses iniciales y luego su expresión se mantiene constante a lo largo de su maduración.

En la variedad Washington Navel, la dinámica de acumulación/degradación de los ácidos y los azúcares del zumo fue diferente de la anterior naranja estudiada, Valencia Late. La acidez del zumo disminuyó significativamente ($P<0.05$) de septiembre a abril (30.97 g/l en septiembre; 23.60 g/l en noviembre, 21.50 g/l en diciembre; 20.80g/l en febrero y 8.35 g/l en abril) (Figura VI-20). De septiembre a febrero el citrato disminuyó un 89.64%, mientras que el

malato no varió significativamente ($P < 0.05$) (4.88 g/l en septiembre; 7.07 g/l en febrero). Por tanto parece que la degradación del ácido cítrico es la principal causante del descenso de la acidez del zumo en Washington Navel. Los SST no variaron significativamente (Figura VI-20).

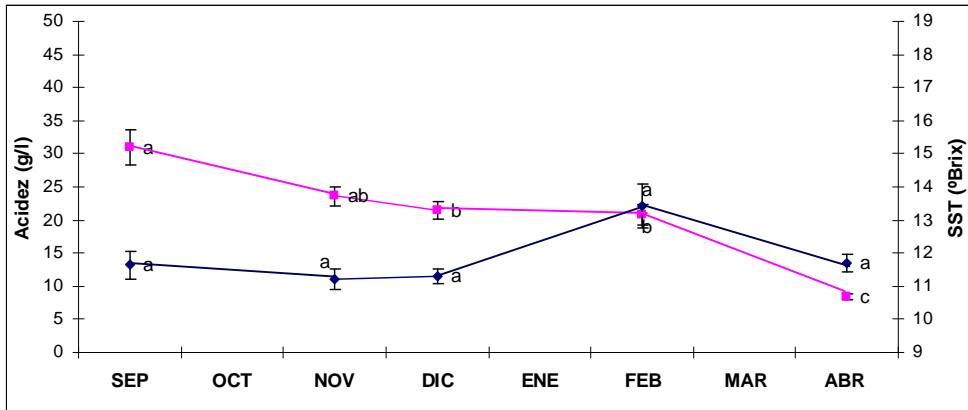


Figura VI-20: Acidez g/l (—■—) y °Brix (—◆—) del zumo de la variedad Washington Navel en septiembre (SEP), noviembre (NOV), diciembre (DIC), febrero (FEB) y marzo (MAR). Letras diferentes indican diferencias significativas por parámetro ($\mu \pm E.S.$, $P < 0.05$, $n \geq 3$).

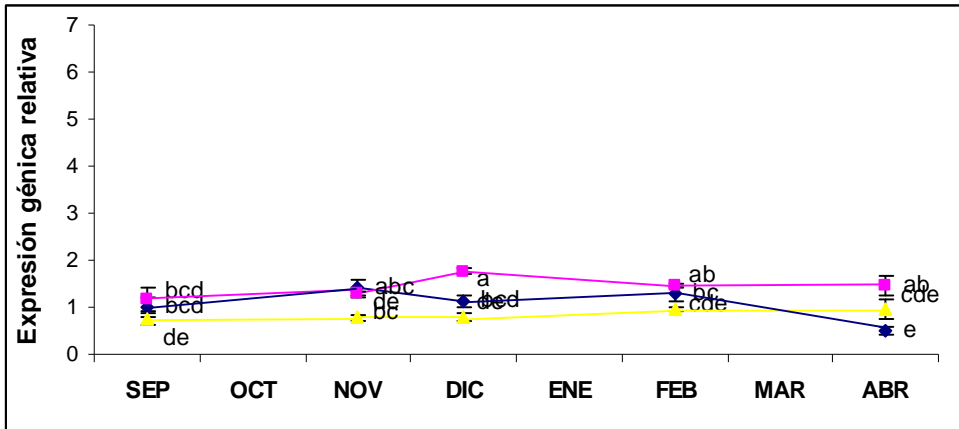


Figura VI-21: Expresión de *PEPCK1* (—◆—), *PEPCK2* (—■—), y *PEPCK3* (—▲—) en pulpa de Washington Navel en septiembre (SEP), noviembre (NOV), diciembre (DIC), febrero (FEB) y abril (ABR) respecto a la expresión de *PEPCK1* en septiembre. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\mu \pm E.S.$, $P < 0.05$, $n = 6$).

La expresión de *PEPCK1* en Washington Navel no varió significativamente ($P < 0.05$) de septiembre a abril. La expresión de *PEPCK1* fue similar a la de *PEPCK2* a excepción del muestreo realizado en diciembre. La expresión de *PEPCK3* fue también constante y significativamente inferior ($P < 0,05$) a la de *PEPCK1* y a la de *PEPCK2* (Figura VI-21).

A continuación se estudió otra naranja del grupo de las blancas, la variedad Sucreña. Los sólidos solubles totales fueron relativamente similares ($P < 0.05$) a las otras variedades de naranja estudiadas, Washington Navel y Valencia Late. Sucreña se caracteriza por un nivel prácticamente basal de acidez en el zumo del fruto a lo largo de la fase II y III de la maduración del fruto (Figura VI-22). La acidez fluctuó de 0.76 g/l a 1.77 g/l, siendo muy inferior a la acidez del zumo de las otras variedades de cítricos estudiadas. Esta característica fue decisiva en la elección de esta variedad para estudiar la expresión de PEPCK. En Sucreña, la expresión de *PEPCK1* fue significativamente superior a la de *PEPCK2* y *PEPCK3*. La expresión de *PEPCK1* en septiembre y noviembre fue mayor significativamente a diciembre o febrero (Figura VI-23). Posteriormente, los valores de expresión de *PEPCK1* a lo largo de los muestreos realizados en Sucreña fueron similares a los observados en las otras variedades de naranja, sin mostrar un incremento en la expresión significativo como se vió que ocurría en las variedades de mandarina y limón. La expresión de *PEPCK2* y la de *PEPCK3* fueron constantes y bajas (Figura VI-23).

De los resultados obtenidos en Sucreña se puede decir que su máximo de acidez es al menos un 75% inferior a la menor acidez de las demás variedades estudiadas. Los sólidos solubles totales no varían a lo largo de su maduración. La expresión de *PEPCK1* es

superior a la de *PEPCK2* y a la de *PEPCK3* en los primeros muestreos, siendo similares entre si en las demás fechas. En estudios realizados sobre otros frutos señalan que PEPCK se induce en algunos casos sin existir degradación de citrato y/o malato pero generalmente lo hace en estadios posteriores a la acumulación de citrato y/o malato (Famiani y cols 2005), resultados que sugieren que PEPCK es inducida por la acidez.

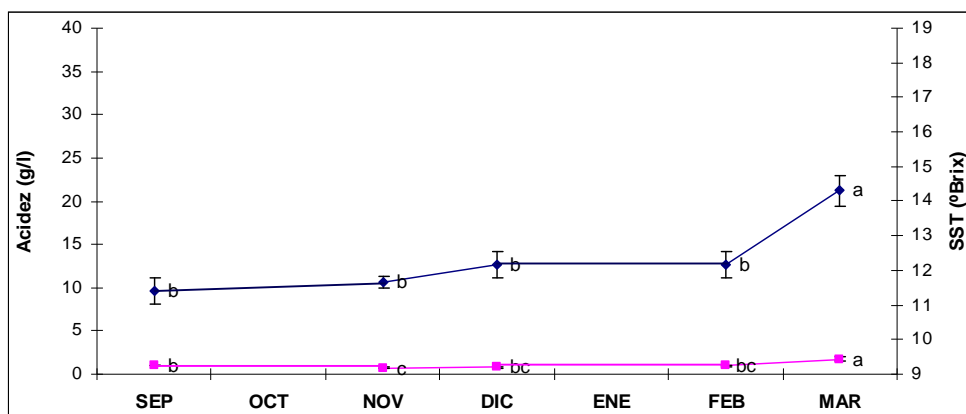


Figura VI-22: Acidez g/l (—■—) y SST (°Brix) (—◆—) de Sucreña en septiembre (SEP), noviembre (NOV), diciembre (DIC), febrero (FEB) y marzo (MAR). Letras diferentes indican diferencias significativas po parámetro ($\mu \pm E.S.$, $P < 0.05$, $n \geq 3$).

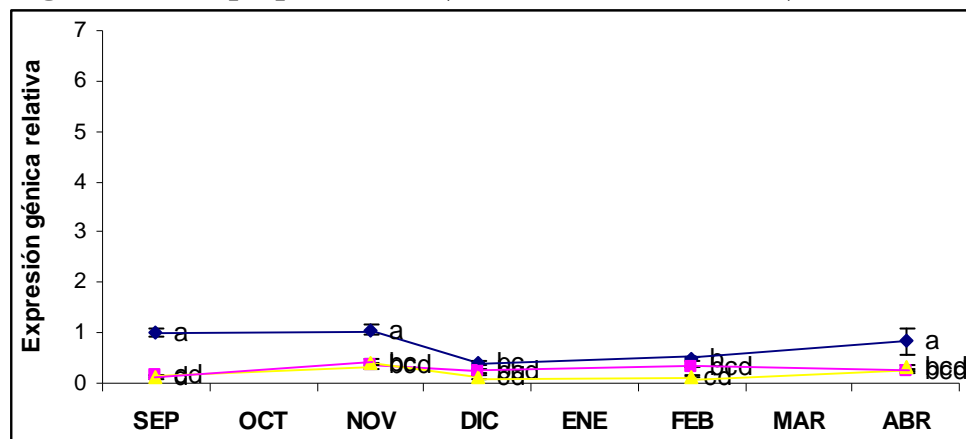


Figura VI-23: Expresión de *PEPCK1* (—◆—), *PEPCK2* (—■—), y *PEPCK3* (—▲—) en pulpa de Sucreña en septiembre (SEP), noviembre (NOV), diciembre (DIC), febrero (FEB) y marzo (MAR). Letras diferentes indican diferencias significativas ($\mu \pm E.S.$, $P < 0.05$, $n = 6$).

Tabla VI-2: Cuadro resumen de la reducción de ácidos, incremento de SST e inducción de la expresión de *PEPCK1* en Clementina (Clementina de Nules, Z46, D11, H03, I09 y J59), Fortune, Limón, Valencia Late, Washington Navel y Sucreña.

	Reducción de ácidos	Incremento de SST	Inducción <i>PEPCK1</i>	
			1ª fase (sep-nov)	2ª fase (nov-abril)
Clementina	SI	SI	SI	SI
Fortune	SI	SI	SI	NO
Limón	NO	NO	SI	SI
Valencia Late	SI	SI	SI	SI
Washington Navel	SI	NO	NO	NO
Sucreña	NO	SI débil	NO	NO

Como conclusiones finales de este apartado se puede decir que al menos, para las variedades estudiadas de mandarinas y limón *PEPCK1* se induce en las primeras fases de maduración, de septiembre a noviembre (Tabla VI-2). Aunque *PEPCK* no está presente en todos los frutos que acumulan ácidos (Chen y cols 2004) se incrementa de los estadios verdes a los maduros (Famiani y Walter 2009). En mandarina y limón la inducción de *PEPCK* en sus frutos se produce durante la reducción de ácido y el aumento simultáneo o posterior de azúcares durante la primera fase de maduración (septiembre a noviembre). Esto sugiere que *PEPCK* participa en la desasimilación de los ácidos orgánicos durante la maduración de los frutos cítricos tal y como se ha visto que ocurre en otras especies (Bashrami y cols 2001; Famiani y cols 2005, 2009). El incremento en la expresión de *PEPCK* puede ser debido a un mayor aporte de su sustrato, el ácido oxalacético, procedente del catabolismo de los ácidos. Además, como cataliza uno de los primeros pasos de la gluconeogénesis, el incremento de SST puede que sea debido, en

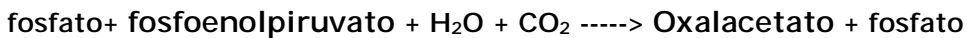
parte, a la síntesis de fructosa y glucosa por la activación de esta ruta. Sin embargo, la inducción de *PEPCK1* durante fases posteriores de la maduración no está relacionada con la reducción de ácidos ni el incremento de azúcares. Por tanto, deben existir otras funciones asociadas a PEPCK. Entre estas funciones podría estar su uso como carboxilasa (Ruffner y Kliewer 1975). En limón puede que el ácido cítrico acumulado en la vacuola sea paulatinamente liberado al citosol mediante un transportador vacuolar (Shimada y cols 2006) manteniéndose así un nivel constante de ácidos y de expresión de *PEPCK1*.

Las diferencias observadas entre las variedades de naranja y mandarina o limón, parecen indicar diferencias entre especies presentando así una relación taxonómica, que podría ser debido a una mutación en *PEPCK1* o en los mecanismos de su regulación. Entre estas diferencias estaría que, en términos absolutos, la expresión de *PEPCK1* en las mandarinas es superior a las naranjas.

En conclusión, la inducción de *PEPCK1* se produce durante la reducción de ácidos y el aumento simultáneo o posterior de azúcares durante la primera fase de maduración del fruto (septiembre a noviembre). En fases posteriores de la maduración, la inducción de *PEPCK1* no está relacionada ni con la reducción de ácidos ni con el incremento de azúcares.

VI.3.2. Identificación y expresión del gen que codifica para fosfoenolpiruvato decarboxilasa (PEPCL) en variedades de cítricos.

Tras seleccionar y estudiar la expresión de fosfoenolpiruvato carboxiquinasa en variedades de cítricos y observar diferentes comportamientos, se procedió a realizar un estudio similar con fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPCL) (EC 4.1.1.31) enzima que cataliza la reacción inversa a PEPCK, transformando fosfoenolpiruvato en oxalacetato:



A diferencia de PEPCK, la expresión de PEPCL obtuvo correlación con los °Brix (Figura VI-24) y no con la acidez ni con el IM, observación que apoya los estudios realizados en otras especies donde es sabido que la glucosa activa la expresión de PEPCL (Izui y cols 2004).

El estudio de la expresión de PEPCL resulta también interesante puesto que se le ha asociado funciones relacionadas con el metabolismo de los ácidos: el abastecimiento de intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbónicos y un papel en la regulación del pH celular (Chen y cols 2008).

Las 10 secuencias de ESTs correspondientes a la fosfoenolpiruvato carboxilasa disponibles en la base de datos del Proyecto de Genómica Funcional de Cítricos (Forment y cols 2005; Terol y cols 2007) se ensamblaron en 3 contigs cuyas secuencias

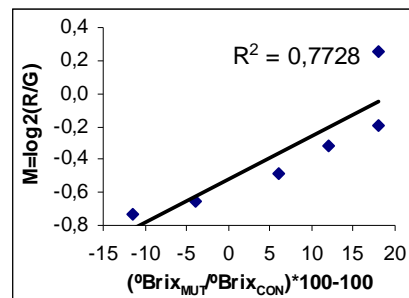


Figura VI-24: Correlación entre la expresión génica (M) y la variación en los °Brix ((Brix_{MUT}/Brix_{CON})*100-100).

llegaban a la cola Poli (A). Cada contig se designó como *PEPCL1*, *PEPCL2* y *PEPCL3* (secuencias en Anexo X).

Se realizó un árbol filogenético con las secuencias de *PEPCL1*, *PEPCL2*, *PEPCL3* y las 23 secuencias génicas identificadas como fosfoenolpiruvato carboxilasa en las especies de plantas existentes en www.ncbi.nlm.nih.gov (Figura VI-25-A y VI-25-B). Comparando las secuencias nucleicas entre si se observó que el porcentaje de identidad de *PEPCL1* fue del 68% con Vid al 82% con *Arabidopsis*. El orden de identidad de mayor a menor fue: *Arabidopsis* > Arroz > Maíz > Loto > Trigo > Soja > Ricino > Vid. La identidad de *PEPCL2* fue al menos del 71%, siendo la mayor identidad encontrada con Ricino y Vid y la menor con Loto y *Arabidopsis*, al contrario que con *PEPCL1*. Las identidades observadas de mayor a menor fueron: Ricino > Vid > Arroz > Soja > Maíz > Trigo > *Arabidopsis* > Loto. La identidad de *PEPCK3* fue muy similar con las demás secuencias, siendo la menor un 70% con *Arabidopsis* y la mayor un 82% con Loto. Estas identidades, junto con el estudio del árbol filogenético (Figura VI-25-A) sugirieron que *PEPCL1* es más similar a los genes que codifican para PEPCL de *Arabidopsis* que a las demás especies estudiadas. La secuencia de *PEPCL2* se parece más a las secuencias de los genes que codifican para PEPCL en Vid y la secuencia de *PEPCL3* a las de Ricino o Vid. Paralelamente, se compararon las 3 secuencias de PEPCL con el melocotón (*Prunus persica*) y se obtuvo una similitud con secuencias no posicionadas del 84%, 90% y 94% con *PEPCL1*, *PEPCL2* y *PEPCL3* respectivamente. Estas identidades fueron mayores que las encontradas con las demás secuencias anotadas de PEPCL.

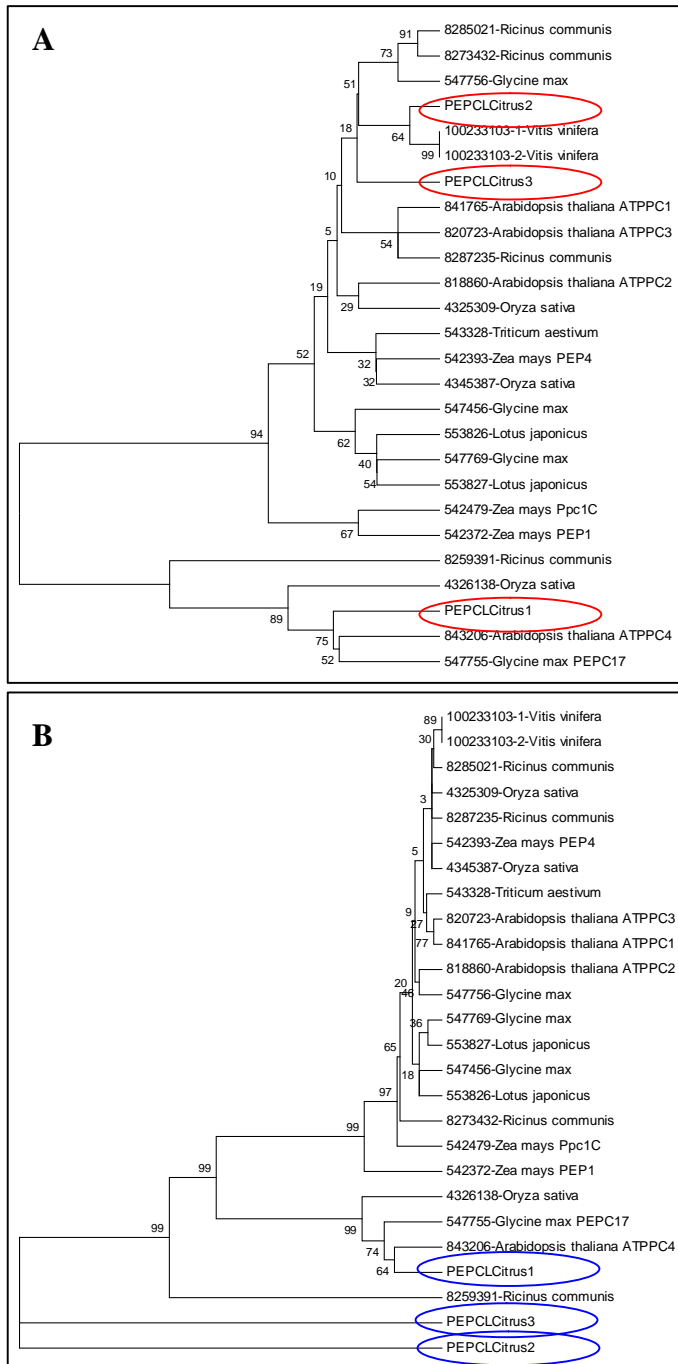


Figura VI-25: Árbol filogenético de las secuencias nucleicas (A) y proteicas (B) de los genes de PEPCL en plantas (Gene ID-especie) mediante MEGA4. Bootstrap (N=100).

El estudio de secuencias proteicas destacó que *PEPCL1* tuvo identidades entre el 87% y el 93% a excepción del 57% con la secuencia de trigo. El orden de identidad de mayor a menor fue: arroz > maíz > ricino > vid = soja = loto = *arabidopsis* > trigo. Sin embargo, las similitudes de secuencia proteicas de *PEPCL2* y *PEPCL3* fueron inferiores a *PEPCL1* con una identidad máxima del 26% y del 40% respectivamente.

Resumiendo, el estudio indica que las similitudes de las secuencias proteicas de PEPCL (Figura VI-25-B), son parecidas a la de las secuencias nucleicas, siendo la secuencia de *PEPCL1* más parecida a las de *Arabidopsis* que a especies leñosas como Vid. Las secuencias proteicas de *PEPCL2* y *PEPCL3* están separadas filogenéticamente del resto de las secuencias estudiadas. Los resultados anteriores indican que los cambios en las secuencias nucleótidas de *PEPCL2* y *PEPCL3* en cítricos produjeron cambios en sus secuencias proteicas lo suficientemente acusados como para separarse de las demás secuencias estudiadas.

V.3.2.1. Inducción de PEPCL durante la maduración del fruto en mandarinas y naranjas.

A) MANDARINAS

En Clementina de Nules, la expresión de *PEPCL1* y de *PEPCL2* aumentaron significativamente ($P < 0.05$) un 45% y un 65% de septiembre a noviembre respectivamente mientras que la expresión de *PEPCL3* no varió (Figura VI-26-A). En Fortune, la expresión de *PEPCL1* aumentó más del doble de septiembre a diciembre mientras que la expresión de *PEPCL2* y la de *PEPCL3* no variaron significativamente ($P < 0.05$) (Figura VI-26-B). Es de observar que la expresión de *PEPCL* se incrementó paralelamente al incremento en la expresión de *PEPCK1*.

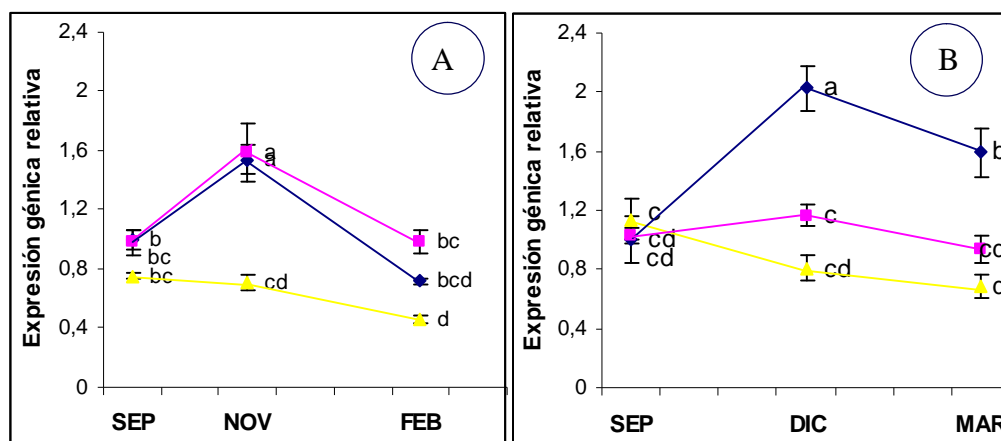


Figura VI- 26: Expresión de *PEPCL1* (◆), *PEPCL2* (■), y *PEPCL3* (▲) en pulpa de: Clementina de Nules (A), Fortune (B) respecto a la expresión de *PEPCL1* en septiembre. Letras diferentes indican diferencia significativas ($\mu \pm E.S.$, $P < 0.05$, $n \geq 3$).

Como conclusión, los genes *PEPCL* y *PEPCK* parece que se encuentran inducidos durante la maduración, como ocurre en otras especies (Chen y cols 2008; Famiani y cols 2005, 2009). La expresión de *PEPCL* se incrementa durante la maduración siendo la expresión de *PEPCL1*, *PEPCL2* y *PEPCL3* similar en Clementina de Nules y en Fortune.

B) NARANJAS

En Valencia Late, la expresión de *PEPCL1*, *PEPCL2* y *PEPCL3* se incrementó significativamente ($P < 0.05$) más del doble de septiembre a febrero (Figura VI-27-A).

En Sucreña, la expresión de *PEPCL2* aumentó un 85% de septiembre a diciembre manteniéndose la expresión de *PEPCL1* y *PEPCL3* sin cambios significativos ($P < 0.05$) (Figura VI-27-B).

En Washington Navel, la expresión de *PEPCL1* aumentó significativamente ($P < 0.05$) de septiembre a febrero manteniéndose la expresión de *PEPCL2* y la de *PEPCL3* sin cambios significativos ($P < 0.05$) (Figura VI-27-C). El incremento en la expresión de *PEPCL1* en Washington Navel fue del 75%, porcentaje menor respecto al 276% de Valencia Late y al 85% de Sucreña.

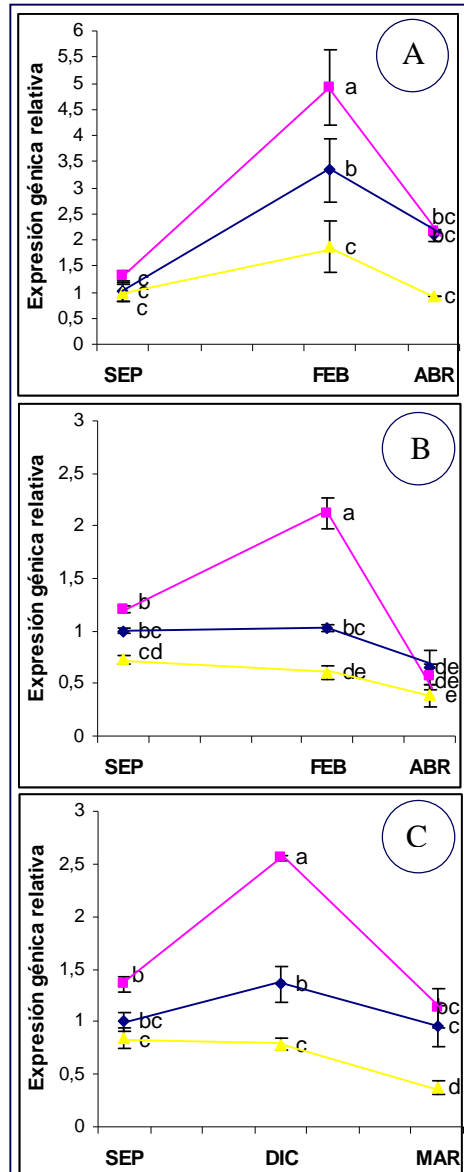


Figura VI-27: Expresión de *PEPCL1* (◆), *PEPCL2* (■), y *PEPCL3* (▲) en pulpa de Valencia late (A), Sucreña (B) y W.Navel (C) respecto a la expresión de *PEPCL1* en septiembre. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\mu \pm E.S.$, $P < 0.05$, $n \geq 3$).

Los resultados muestran que en las mandarinas y en las naranjas se produce un aumento en la expresión de PEPCL al principio de la maduración seguido de una disminución al final. La expresión de PEPCL no correlacionó con la acidez. Esto es consistente con los resultados obtenidos en otras especies como el melocotón (Moing y cols 2000), piña (Saradhuldhat y Paull 2007), loquat (Chen y cols 2009) o melón (Mi Tang y cols 2010) donde la expresión de PEPCL no correlaciona con la concentración de ácido cítrico.

V.3.2.2. Inducción de PEPCL durante la maduración del fruto en limones.

En el limón, entre los estadios verdes (ICC=-2,36) a los amarillos (ICC=3.1) la expresión de *PEPCK1* aumentó significativamente (Figura VI-17) mientras que no se observaron diferencias significativas ni en la expresión de *PEPCL1*, ni en la de *PEPCL2* ni en la de *PEPCL3* (Figura VI-28), siendo sus expresiones similares a las observadas en las mandarinas (Figuras VI-12, VI-13 y VI-14).

El nivel constante de expresión del gen que codifica para PEPCL fue similar al observado en frutos de fresón (Famiani y cols 2005) que a semejanza con el limón, también su concentración de citrato aumenta durante su maduración, permaneciendo elevada en los estadios muy maduros. Este nivel constante de PEPCL podría ser responsable, al menos en parte, del alto contenido en ácidos del fruto puesto que contribuiría al suministro de oxalacetato, intermediario del ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

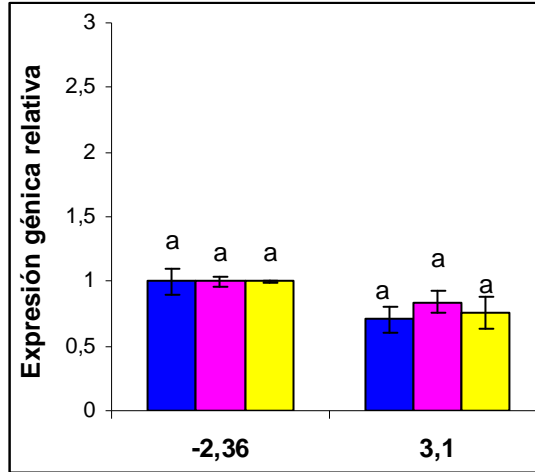


Figura VI-28: Expresión de *PEPCL1* (■), *PEPCL2* (■) y *PEPCL3* (■) en pulpa de Limón en un estadio verde (ICC=-2.36) y un estadio amarillo (ICC=3.1) respecto al estadio verde. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\mu \pm E.S.$, $P < 0.05$, $n \geq 3$).

En plantas, PEPCL se activa por glucosa (Izui y cols 2004). Sin embargo, los estudios realizados sobre algunos frutos muestran que la expresión de PEPCL se incrementa al principio de la maduración y luego disminuye paralelamente al incremento progresivo de los azúcares (Chen y cols 2009; Mi Tang y cols 2010). En las mandarinas y en las naranjas la expresión de PEPCL fue similar a la descripción de estos estudios ya que se incrementa al principio y disminuye al final de la maduración, inversamente a los azúcares del fruto que van aumentando progresivamente durante su maduración.

Tabla VI-3: Cuadro resumen de la reducción de ácidos, incremento de SST e inducción de la expresión de *PEPCL1* y *PEPCL2* en Clementina de Nules, Fortune, Limón, Valencia Late, Washington Navel y Sucreña.

	Reducción de ácidos	Incremento de SST	Inducción <i>PEPCL1</i>	Inducción <i>PEPCL2</i>
Clementina de Nules	SI	SI	SI	SI
Fortune	SI	SI	SI	NO
Limón	NO	NO	NO	NO
Valencia Late	SI	SI	SI	SI
Washington Navel	SI	NO claro	NO	SI
Sucreña	NO	SI débil	NO	SI

En variedades donde el ácido málico y no el cítrico es el mayoritario del zumo como el albaricoque (Chen MeiXia y cols 2009) y la manzana (Yao y cols 2009), PEPCL se induce durante el desarrollo del fruto, paralelamente al aumento en la concentración de ácido málico. Estos resultados son contrarios a los trabajos realizados de inhibición de PEPCL por el malato (Chollet y cols 1996; Vidal y Chollet 1997; Nimmo 2003; Izui y cols 2004; Fera y cols 2006). Estos estudios en conjunto apuntan que, en los frutos, otros factores además de la acidez deben modular la expresión de PEPCL. Los resultados obtenidos en clementinas y naranjas indican que la expresión de *PEPCL1* se induce tanto cuando hay un descenso en la acidez (Clementina de Nules, Fortune y Valencia Late pero no en Washington Navel) como cuando el contenido en ácidos es muy bajo (Sucreña) y tampoco se induce cuando la acidez es muy alta (Limón). Por tanto, parece que la acidez no modula exactamente la expresión de *PEPCL1* en los cítricos. La inducción de la expresión de *PEPCL2* en clementinas y naranjas se produce tanto cuando existe reducción de

ácidos (Clementina de Nules, Valencia Late y Washington Navel) como cuando ésta no se produce (Fortune y Sucreña) (Tabla VI-3).

Como conclusión del apartado V.3.3. se puede sugerir que aunque la expresión global de PEPCL de micromatrices correlacionó con el aumento de los sólidos solubles totales, los resultados individuales de cada gen muestran que no existe un efecto inequívoco de la reducción de ácidos o la acumulación de SSTs sobre la inducción de *PEPCL1* o *PEPCL2*.

VI.3.3. Identificación y expresión del gen fosfoenolpiruvato carboxilasa quinasa (PEPCL-K) en variedades de cítricos.

El gen que codifica la proteína fosfoenolpiruvato carboxilasa quinasa (PEPCL-K) tanto a nivel proteico como génico está menos estudiado que PEPCL o que PEPCK. La principal función asociada a la proteína es la modulación de la actividad de PEPCL en plantas, haciendo que ésta sea más activa mediante fosforilación (Nimmo 2003, Shenton y cols 2006, Chen y cols 2008, Meimoun y cols 2009). Pese a que no existen muchos estudios sobre ella, algunos señalan que la modulación de PEPCL vía PEPCL-K se realiza a nivel posttranscripcional (Vidal y Chollet 1997; Nimmo 2003; Izui y cols 2004). También es conocido que su actividad está inhibida por malato y activada por la presencia de glucosa y/o ácido abscísico (Feria y cols 2008) (Figura VI-29).

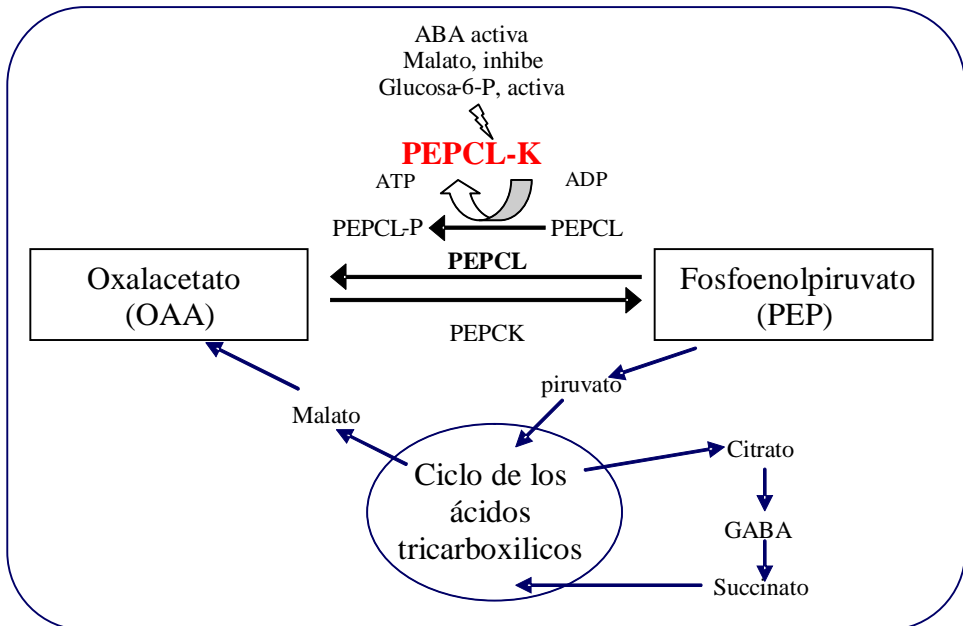


Figura VI-29: Esquema de la reacción donde intervienen PEPCK, PEPCL y PEPCL-K, las principales rutas metabólicas del oxalacetato, fosfoenolpiruvato y los metabolitos que modulan la actividad de PEPCL-K.

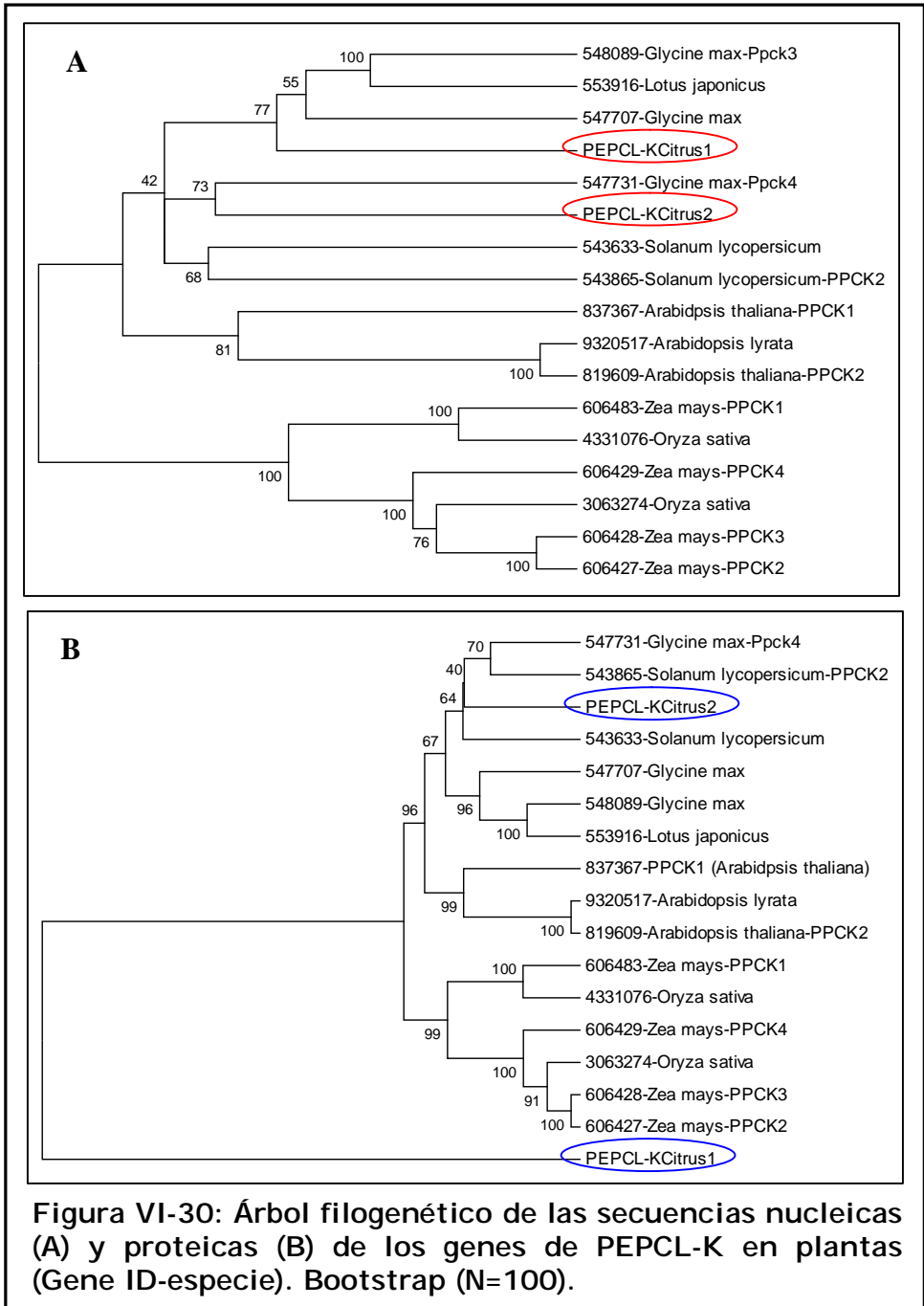
Las 21 secuencias de ESTs correspondientes a fosfoenolpiruvato carboxilasa quinasa disponibles en la base de datos del Proyecto de Genómica Funcional de Cítricos (Forment y cols 2005; Terol y cols 2007) se ensamblaron en 2 contigs, designados como *PEPCL-K1* y *PEPCL-K2* (secuencias en Anexo X).

Se realizó un árbol filogenético con las secuencias de *PEPCL-K1*, *PEPCL-K2* y las 15 secuencias identificadas como fosfoenolpiruvato carboxilasa quinasa en las especies de plantas recogidas en el (www.ncbi.nlm.nih.gov) (Figura VI-30-A y VI-30-B).

El máximo porcentaje de identidad entre *PEPCL-K1* y las demás secuencias nucleicas estudiadas fue del 68% ($P < 0.001$) siendo el orden de mayor a menor similitud: *Arabidopsis* > Loto > Soja > Arroz > Tomate > Maíz, valores inferiores a los obtenidos para *PEPCL-K2*, con una identidad máxima del 84% en Soja, siendo las similitudes de mayor a menor orden: Soja > Tomate > Loto > Arroz > Maíz > *Arabidopsis*. Las identidades de ambas fueron inferiores a las obtenidas con PEPCK o PEPCL.

Las secuencias de *PEPCL-K1* y *PEPCL-K2* resultaron bastante separadas del resto de secuencias, siendo la soja y el tomate las más similares a ellas. Las similitudes de secuencias con el melocotón fueron mayores (80% con *PEPCL-K1* y 81% con *PEPCL-K2*). De manera similar a PEPCK y PEPCL, PEPCL-K señala una mayor similitud entre el género *Prunus* y *Citrus*. La máxima identidad entre las secuencias proteicas con *PEPCL-K1* fue del 24% con Loto. *PEPCL-K1* está separada filogenéticamente del resto de secuencias, indicando que los cambios producidos en su secuencia nucleica han generado cambios lo suficientemente grandes en la secuencia proteica para separarlo del resto. Por el contrario, *PEPCL-K2* presentó una identidad de secuencia proteica entre el 85% y el 88%, siendo más

similar a la secuencia de tomate que al resto de especies. (Figura VI-30-B).



VI.3.3.1. Estudio de la expresión génica.

En Clementina de Nules, la expresión de *PEPCL-K2* se incrementó de septiembre a noviembre, mientras que *PEPCL-K1* no varió significativamente ($P < 0.05$). De noviembre a febrero, tanto la expresión de *PEPCL-K1* como la de *PEPCL-K2* disminuyeron significativamente (Figura VI-31). En Fortune, la expresión de *PEPCL-K1* y de *PEPCL-K2* disminuyeron significativamente de septiembre a marzo (Figura VI-32).

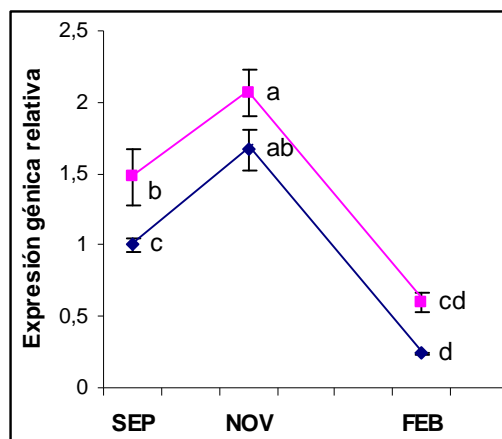


Figura VI-31: Expresión de *PEPCL-K1* (—♦—), *PEPCL-K2* (—■—), en pulpa de Clementina de Nules en septiembre (SEP), noviembre (NOV) y febrero (FEB) respecto a la expresión de *PEPCL-K1* en septiembre. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\mu \pm E.S.$, $P < 0.05$, $n \geq 3$).

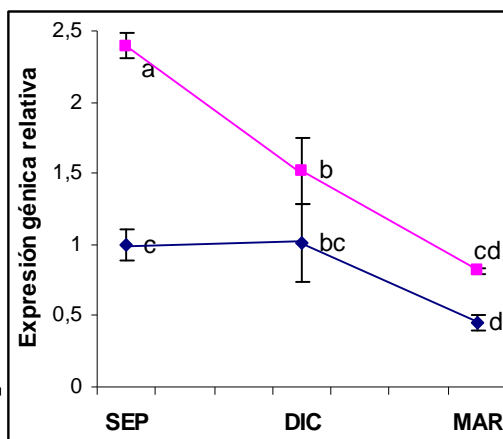


Figura VI-32: Expresión de *PEPCL-K1* (—♦—), *PEPCL-K2* (—■—), en pulpa de Fortune en septiembre (SEP), diciembre (DIC) y marzo (MAR) respecto a la expresión de *PEPCL-K1* en septiembre. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\mu \pm E.S.$, $P < 0.05$, $n \geq 3$).

En Valencia Late y Washington Navel la expresión génica de *PEPCL-K1* y la de *PEPCL-K2* disminuyó significativamente ($P < 0.05$) de septiembre a febrero, manteniéndose de febrero a abril sin cambios significativos (Figuras VI-36 y VI-37). Tanto en W.Navel como en Valencia Late, la expresión de *PEPCL-K* no fue paralela a la de *PEPCL*

indicando que PEPCL-K no parece modificar inequívocamente la actividad de PEPCL.

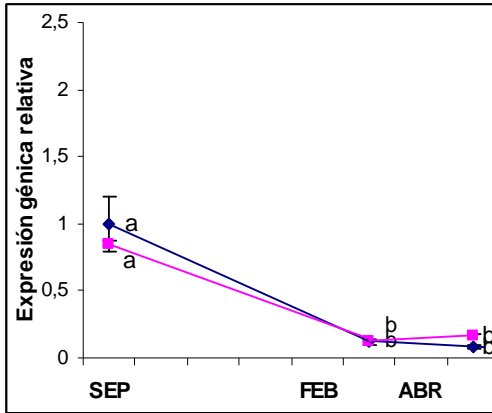


Figura VI-36: Expresión de PEPCL-K1 (◆), PEPCL-K2 (■), en pulpa de Valencia late en septiembre (SEP), febrero (FEB) y abril (ABR) respecto a la expresión de PEPCL-K1 en septiembre. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\mu \pm E.S.$, $P < 0.05$, $n \geq 3$).

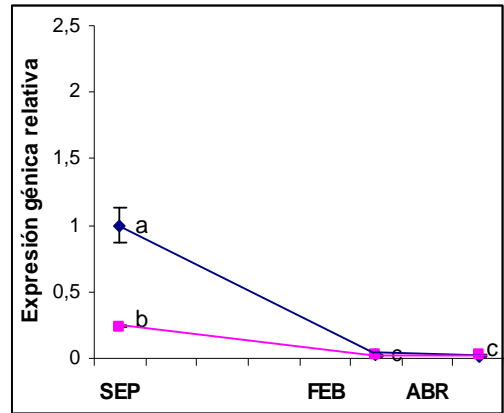


Figura VI-37: Expresión de PEPCL-K1 (◆), PEPCL-K2 (■), en pulpa de Washington Navel en septiembre (SEP), febrero (FEB) y abril (ABR) respecto a la expresión de PEPCL-K1 en septiembre. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\mu \pm E.S.$, $P < 0.05$, $n \geq 3$).

La expresión de PEPCL-K modula la actividad de PEPCL en plantas (Nimmo 2003; Shenton y cols 2006; Chen y cols 2008; Meimoun y cols 2009) y se incrementa a lo largo de la maduración (Marsh y cols 2003) aunque en algunas especies como Arabidopsis esta coordinación entre PEPCL-K y PEPCL no está presente (Chen y cols 2008). Los resultados obtenidos de la expresión génica de PEPCL-K y PEPCL indican que en las mandarinas y las naranjas, PEPCL-K probablemente no modula la actividad de PEPCL.

En relación a cambios de pH en el citosol y la expresión de PEPCL-K hay realizados pocos estudios y ninguno en frutos. Concretamente en Arabidopsis los dos genes existentes de PEPCL-K aumentan su expresión a mayor pH si bien el rango de pH estudiado está entre 4 y 8, rango superior al existente en los zumos de los frutos cítricos (Chen y cols 2008). En este trabajo se estudió la expresión de PEPCL-K en dos variedades con valores extremos en la acidez: limón y Sucreña. En el limón entre dos estadios de maduración diferentes: uno verde (ICC de -2.36; pH = 1.95) y uno amarillo (ICC de +3.1; pH = 1.84) con diferencias en el ICC pero no en el pH, la expresión de PEPCL-k no mostró diferencias significativas ($P < 0.05$) entre sí (Figura VI-33).

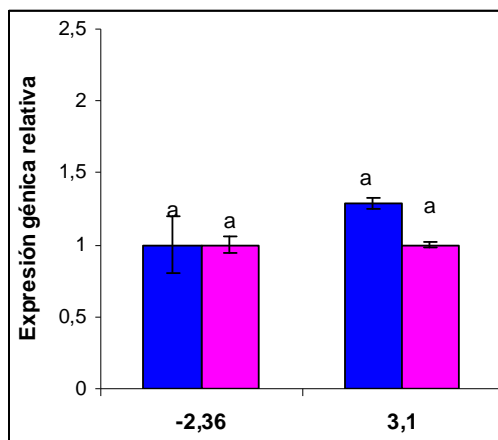


Figura VI-33: Expresión de PEPCL-K1 (■), PEPCL-K2 (■), en pulpa de Limón en un estadio verde (ICC=-2.36) y un estadio amarillo (ICC=3.1) respecto al estadio verde. Letras diferentes indican **diferencias significativas** ($\mu \pm$ E.S., $P < 0.05$, $n \geq 3$).

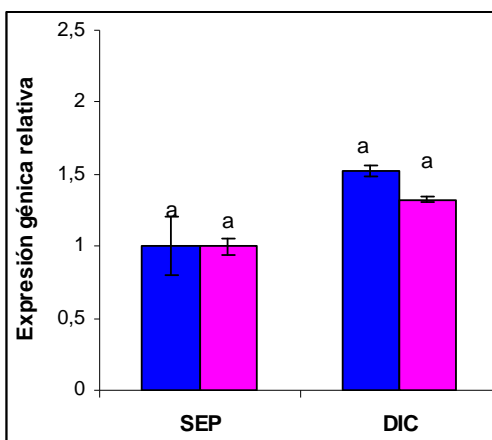


Figura VI-34: Expresión de PEPCL-K1 (■), PEPCL-K2 (■), en pulpa de Sucreña en Septiembre (SEP) y Diciembre (DIC) respecto a septiembre. Letras diferentes indican **diferencias significativas** ($\mu \pm$ E.S., $P < 0.05$, $n \geq 3$).

En Sucreña entre dos fechas alejadas tampoco sin diferencias significativas en el pH (pH=5,28 en septiembre; pH= 4,59

en diciembre) tampoco se observaron diferencias significativas en la expresión de *PEPCL-K1* ni en la de *PEPCL-K2* (Figura VI-34). Sin embargo, al comparar los valores de expresión de *PEPCL-K* entre Sucreña y Limón, se observó que una variación en el pH de 2,6 veces significó un incremento en la expresión de *PEPCL-K1* y de *PEPCL-K2* 2.9 veces y 3.5 veces significativamente mayor ($P < 0.05$) en Sucreña respecto a Limón.

Al estudiar expresión de *PEPCL-K* entre variedades con acidez intermedias entre el Limón y Sucreña en estadios maduros de las mismas, incluyendo la variedad Fortune y la variedad Clementina de Nules se observó una tendencia de la expresión de *PEPCL-K* a aumentar conforme aumentó el pH del zumo (Figura VI-35). Por tanto parece existir una relación entre la expresión de *PEPCL-K* y el pH, expresándose más en la pulpa de los frutos con menor contenido en ácidos y viceversa.

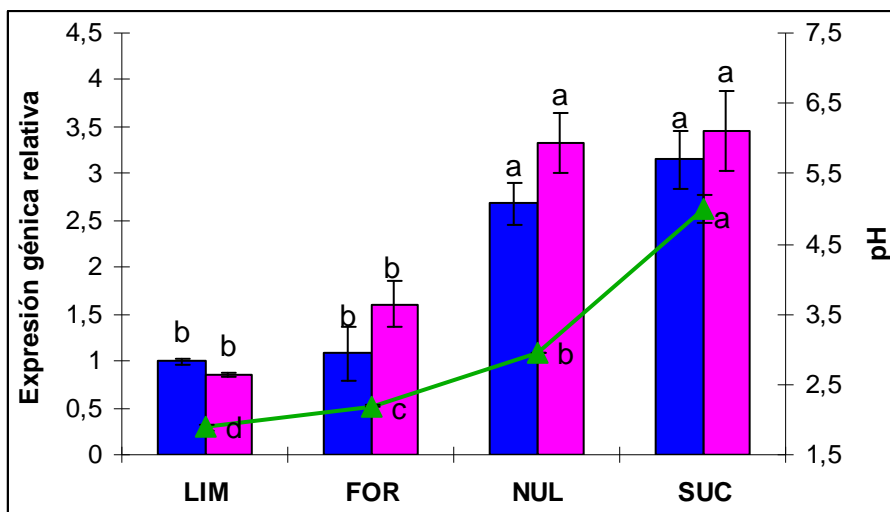


Figura VI-35: Expresión de *PEPCL-K1* (■), *PEPCL-K2* (■) en pulpa y pH del zumo (—▲) de: Limón amarillo (LIM), Fortune en diciembre (FOR), Clementina de Nules en noviembre (NOV) y Sucreña en diciembre (SUC) respecto a la expresión de *PEPCL-K1* en Limón. Letras diferentes indican diferencias significativas por parámetro ($\mu \pm E.S$, $P < 0.05$, $n \geq 3$).

En plantas, tanto la expresión de PEPCL-K como de los genes que responden a la sacarosa son inducidos por la disponibilidad de fosfato (Fukayama 2006; Franco-Zorrilla y cols 2005; Chen y cols 2007; Karthikeyan y cols 2007) y sus expresiones aumentan con la disponibilidad de fuentes de carbono, como la sacarosa, o por un aumento del pH citosólico (Chen y cols 2008). A excepción de Washington Navel, tanto en Clementina de Nules como en Fortune o en Valencia Late, variedades que durante su maduración acumularon azúcares (SST) y aumentaron su pH (descendió la acidez), la expresión de PEPCL-K no aumentó significativamente ($P < 0,05$). Por tanto, la expresión de PEPCL-K parece depender del nivel de ácidos como se muestra en las distintas variedades, pero en una misma variedad la reducción de la acidez no parece inducir la expresión de este gen. Por otro lado, algunos trabajos indican que la actividad de PEPCL aumenta por su fosforilación, proceso modulado a nivel posttranscripcional por PEPCL-K (Nimmo 2003; Izui y cols 2004; Fukayama y cols 2006; Bailey y cols 2007; Chen y cols 2007) aunque recientes estudios señalan que no siempre ocurre así (Chen y cols 2008). Tanto en mandarinas como en naranjas, la expresión de PEPCL no parece estar regulada por la expresión de PEPCL-K pudiendo tener un tipo de control a nivel posttranscripcional como ocurre en otras especies (Nimmo 2003; Izui y cols 2004).

Como conclusiones de los resultados anteriores, se puede decir que tanto en mandarinas como en naranjas, la expresión de PEPCL-K no está regulada por la acumulación de SST o el descenso de la acidez. La expresión de PEPCL-K no regula la expresión de PEPCL.

VI.3.4. Análisis multivariante del comportamiento de PEPCK, PEPCL, PEPCL-K en las variedades de cítricos estudiadas.

Dado que parecen existir diferencias en el agrupamiento entre los grupos taxonómicos de las variedades estudiadas en función de los diferentes comportamientos de la expresión génica de PEPCK, PEPCL y PEPCL-K, se realizó un enfoque global de la expresión de los tres genes. En un primer lugar se realizó un análisis multivariante mediante funciones discriminantes tomando como variables todas las fechas de los muestreos realizados entre los meses de septiembre a abril para las 6 variedades: Clementina de Nules, Fortune, Limón, Washington Navel, Valencia Late y Sucreña sin tener en cuenta el efecto de la variable variedad.

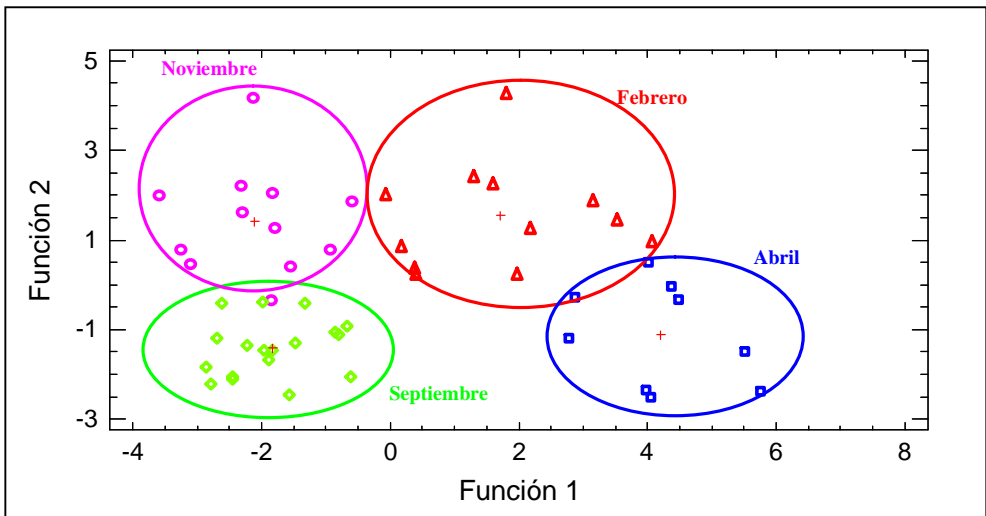


Figura VI-38: Gráfico de funciones discriminantes de las variedades Clementina de Nules, Fortune, Limón, Valencia Late, Washington Navel y Sucreña tomando como variables la expresión génica de PEPCK, PEPCL, PEPCL-K en 4 épocas de muestreo (septiembre, noviembre, febrero y abril) durante el periodo de maduración comprendido entre septiembre y abril. Variabilidad contemplada del modelo con la función 1 y la función 2 del 95,76%.

Este estudio mostró un agrupamiento en función del mes analizado, diferenciándose cuatro grupos según si el estudio se realizaba en septiembre, en noviembre, en febrero o en abril. Las dos funciones discriminantes fueron estadísticamente significativas al 95% de nivel de confianza y recogen el 95,76% de la variabilidad de los datos. De este primer análisis se concluyó que la época es una variable de gran peso para explicar el comportamiento de la expresión de PEPCK, PEPCL y PEPCL-K (Figura VI-38).

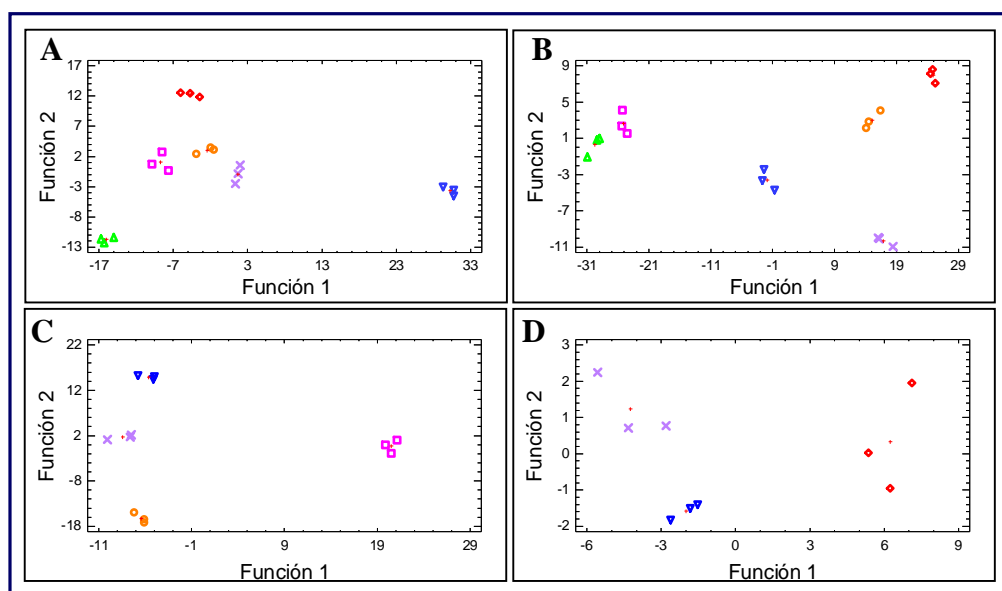


Figura VI-39: Gráfico de funciones discriminantes en las variedades Clementina de Nules (○), Fortune (□), Limón (△), Valencia Late (×), Washington Navel (▽) y Sucreña (◇) tomando como variables la expresión génica de PEPCK, PEPCL, PEPCL-K en 4 épocas de muestreo: (A) septiembre, (B) noviembre, (C) febrero y (D) abril.

Al realizar el análisis de funciones discriminantes por fecha, se observó que la expresión de PEPCK, la de PEPCL y la de PEPCL-K no mostraba similitudes taxonómicas (Figura VI-39), lo cual resultó razonable puesto que son variedades con periodos de maduración muy diferente entre si. Por ello, se escogió el muestreo de noviembre

para realizar un estudio multivariante de agrupamiento de las variedades en función del patrón de comportamiento de PEPCK, PEPCL y PEPCL-K (Figura VI-40).

El coeficiente cofenético obtenido tras su normalización por el estadístico de Mantel entre la matriz de distancia y la matriz cofenética fue de $r= 0.84158$ ($P<0.002$) indicando que el cluster obtenido representó más de un 84% de la variabilidad contenida en la población estudiada con una probabilidad superior al 99.8% mostrando así un árbol robusto de agrupamiento.

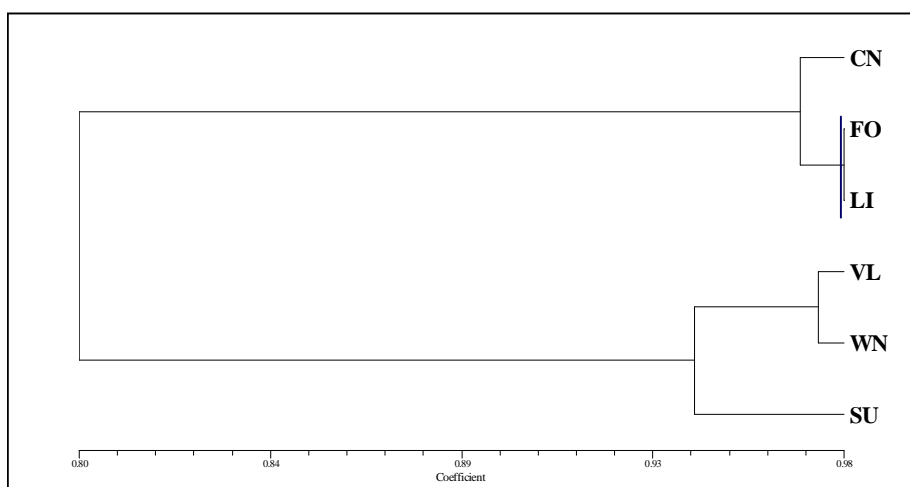


Figura VI-40: Agrupamiento cluster de las variedades Clementina de Nules (CN), Fortune (FO), Limón (LI), Valencia Late (VL), Washington Navel (WN) y Sucreña (SU) tomando como variables la expresión génica de PEPCK, PEPCL, PEPCL-K en estadios de maduración. Distancia coseno. Algoritmo agrupación UPGMA. Mantel ($r= 0.84158$, $P<0.002$).

Los resultados obtenidos del agrupamiento señalaron que las variedades de mandarina: Clementina de Nules y Fortune se encuentran más cercanas entre sí y a su vez al Limón que a las variedades de naranja. De éstas, Valencia Late y Washington Navel son más similares entre sí que a Sucreña (Figura VI-40). Los agrupamientos de estos dos grandes grupos son coherentes con los

dos patrones de comportamiento encontrados al estudiar la expresión de PEPCK. Al observar con detalle el grupo de naranjas, la similitud entre Valencia Late y Washington Navel respecto a Sucreña concuerda con los resultados obtenidos del estudio de PEPCL-K.

Además se procedió a discernir qué gen o genes son más relevantes en la regulación de la reacción que cataliza la conversión de oxalacetato a fosfoenolpiruvato (Figura VI-41) mediante un análisis multivariante de agrupamiento.

Para ello se emplearon los datos de la expresión de *PEPCK1*, *PEPCK2*, *PEPCK3*, *PEPCL1*, *PEPCL2*, *PEPCL3*, *PEPCL-K1* y *PEPCL-K2* en tres fechas de muestreo independiente para cada una de las 6 variedades estudiadas.

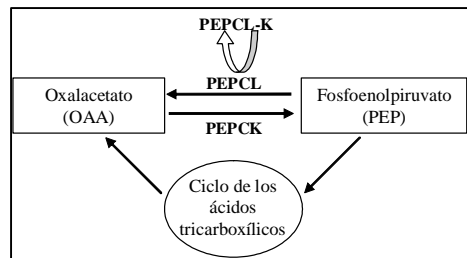


Figura VI-41: Esquema de la reacción donde intervienen PEPCK, PEPCL y PEPCL-K.

El análisis de agrupamiento englobó los genes en tres grupos (Figura VI-42). El primero formado únicamente por *PEPCK1*, indicó que la expresión de este gen presentó una diferencia de similitud en su expresión claramente diferente a los demás, pudiendo ser considerado como el gen más relevante respecto a los otros considerados en la reacción estudiada. Este resultado es coherente con los resultados de expresión realizados en el apartado VI.3.1. El segundo grupo estuvo formado por *PEPCL1* y *PEPCL2*, los cuales en términos absolutos se expresaban en mayor medida que los pertenecientes al tercer grupo formado por *PEPCK3*, *PEPCL3*, *PEPCL-K1* y *PEPCL-K2*, los cuales su expresión no presentaron grandes diferencias en su expresión a lo largo de la maduración, como se vio en el apartado VI.3.2 y VI.3.3.

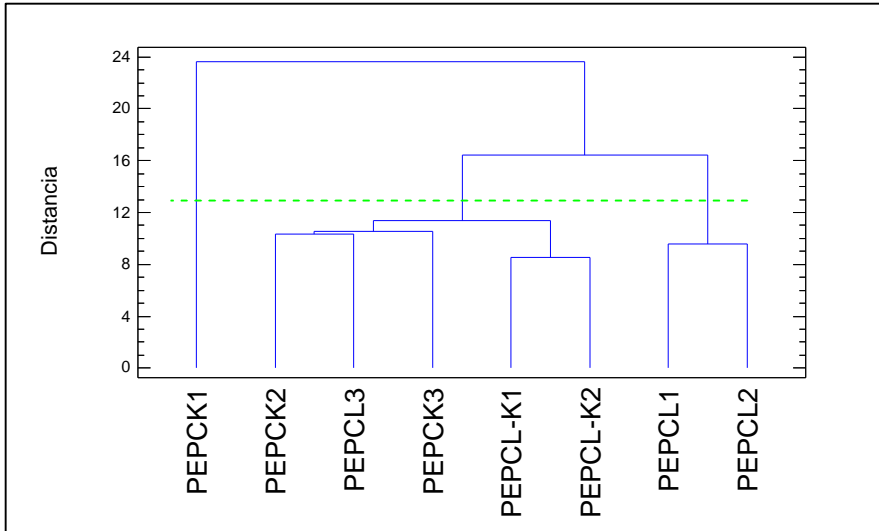


Figura VI-42: Agrupamiento de *PEPCK1*, *PEPCK2*, *PEPCK3*, *PEPCL1*, *PEPCL2*, *PEPCL3*, *PEPCL-K1* y *PEPCL-K2*. Distancia euclídea cuadrado. Algoritmo agrupación UPGMA. Test de Mantel ($n= 48$. $r=0.998$. $P<0.004$).

En resumen, los resultados de los análisis multivariante sugieren que la expresión de PEPCK, PEPCL y PEPCL-K resulta dependiente del estado de maduración de cada variedad. El agrupamiento por comportamiento establecido en el estudio de expresión (apartados VI.3.1, VI.3.2 y VI.3.3) es coherente con los resultados del análisis multivariante de agrupamiento. Ambos indican que las variedades de mandarina: Clementina de Nules y Fortune son más similares entre sí y a su vez al Limón que a las variedades de naranjas, de las cuales a su vez, Valencia Late y Washington Navel son más similares entre sí que a Sucreña. Además se ha determinado que no parece existir relación de inducción o represión entre PEPCK, PEPCL o PEPCL-K ya que no se observó similitud de expresión entre sí, destacándose a *PEPCK1* como el gen probablemente más relevante en la reacción de conversión del oxalacetato a fosfoenolpiruvato.

VI.3.5. Efecto del ácido cítrico y el ácido oxalacético sobre la expresión del gen que codifica para la proteína PEPCK.

En los frutos cítricos, durante la fase II del crecimiento del fruto, se produce una síntesis y acumulación de ácidos, principalmente ácido cítrico y ácido málico hasta alcanzar un máximo aproximadamente a los 150 días después de antesis (Soler 2009). A partir de este momento, el fruto sigue aumentando de tamaño y como consecuencia (en parte) de la entrada de agua se diluyen los ácidos. Para simular este proceso, se emplearon secciones de fruto de Clementina de Nules, a los 150 DDA y se sumergieron parcialmente (3 mm) en tres soluciones: agua desionizada (ADI), citrato 5000 ppm (CIT) y oxalacetato 5000 ppm (OAA). Siendo el citrato el ácido mayoritario en la pulpa de los frutos cítricos y el oxalacetato el sustrato de PEPCK se emplearon soluciones de estos dos ácidos para detener la reducción de acidez y observar el comportamiento de la expresión de *PEPCK1*. La hipótesis de partida era que la disminución de la acidez en el fruto induce la expresión de PEPCK1 (apartado VI.3.1) pareja al aumento de azúcares del mismo.

En el ensayo ADI, se observó un comportamiento similar al de los frutos *in vivo* tanto para la acidez como para la expresión de *PEPCK1*. A las 6 horas de sumergir las secciones de frutos en agua la expresión génica de *PEPCK1* aumentó significativamente ($P < 0.05$) 10.8 veces a la vez que la acidez disminuyó significativamente un 11.07%. A las 24 horas, la expresión de *PEPCK1* aumentó significativamente ($P < 0.05$) 23.5 veces y la acidez disminuyó un 21.22% respecto al estado inicial, relacionándose la inducción de *PEPCK1* con la reducción de la acidez (Figura VI-43-A).

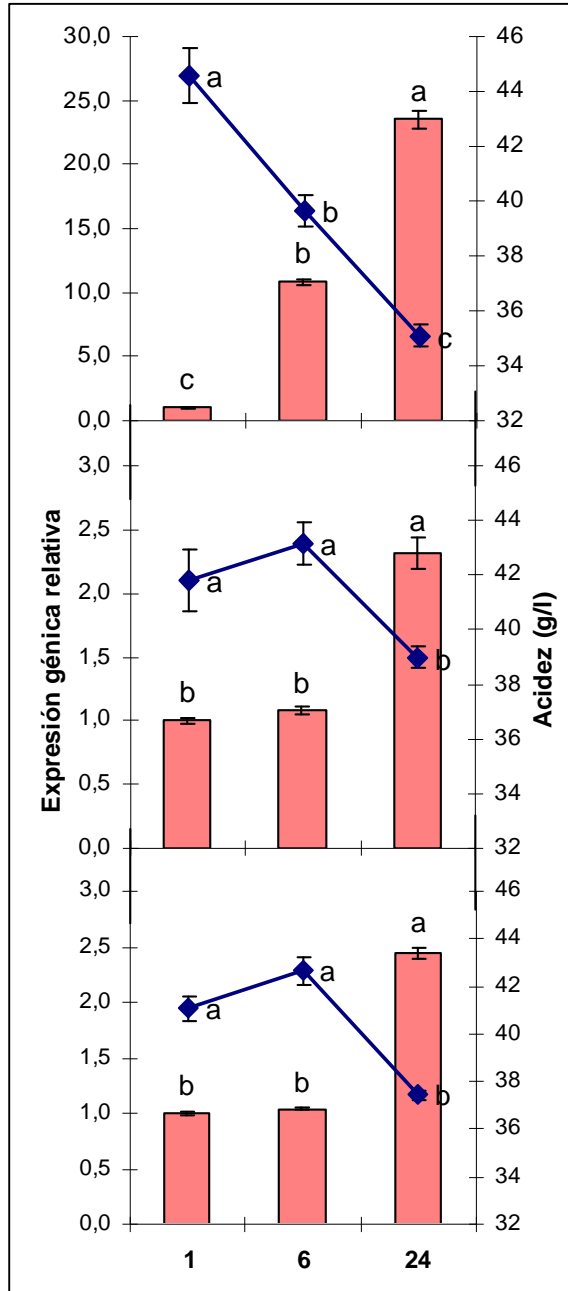


Figura VI-43: Expresión de *PEPCK1* (■) respecto al estadio de 1 h en respuesta a los cambios en la acidez (g/l) (—◆—) *in vitro*. Se utilizó la pulpa de secciones de fruto de Clementina de Nules de 150 DDA, sumergidos parcialmente en agua desionizada (A), ácido cítrico a 5000 ppm (B) o ácido oxalacético a 5000 ppm (C), durante 1, 6 y 24 horas. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\mu \pm$ E.S. $P < 0.05$, $n = 3$).

En otros sistemas se ha determinado que la expresión de PEPCK es inducida por pH ácido (Liu y cols 2005) y que PEPCK disminuye con la reducción en el pH en hojas aunque estos estudios fueron realizados siempre a valores de pH superiores a 6 (Chen y cols 2008). Contrariamente, los resultados obtenidos aquí indicaron que el gen *PEPCK1* incrementó su expresión paralelamente al descenso de la acidez en las vesículas de Clementina de Nules a los 150 DDA, bajo condiciones *in vitro* de reducción de acidez. En este caso, los valores de pH estudiados fueron inferiores a 4. Los otros dos ensayos con CIT y OAA mostraron que cuando la reducción en la acidez se detuvo mediante el aporte en el medio de ácido cítrico y málico a las 6 horas, el aumento en la expresión de *PEPCK1* no se produjo (Figura VI-43-B, VI-43-C). Al disminuir la acidez de nuevo, como se muestra a las 24 horas en el ensayo, la expresión del gen volvió a incrementarse (Figura VI-43-A). Los resultados obtenidos del medio CIT y el medio OAA fueron similares.

Los resultados anteriores sugieren que la expresión de *PEPCK1* parece estar relacionada con el descenso en la acidez o el aumento del pH.

VI.3.6. Efecto del ácido cítrico en el contenido de ácidos y azúcares del zumo.

La expresión de *PEPCK1* fue paralela al descenso del contenido en ácidos del fruto y al aumento de los azúcares en las variedades de mandarina estudiadas (apartado VI.3.1). Además, existen evidencias de que la gluconeogénesis a partir de malato ocurre en la pulpa durante la maduración de frutos de uva y tomate (Ruffner 1982; Halinska y Frenkel 1991). Los resultados obtenidos parecen indicar que las primeras etapas de la ruta de la gluconeogénesis se activan durante la fase II en paralelo al catabolismo de los ácidos en los cítricos. Esta observación sugiere que en principio el catabolismo del ácido cítrico contribuiría al incremento en azúcares. Estos procesos tienen lugar en el interior de las vesículas de zumo. Estudios previos con vesículas de zumo de frutos maduros de cítricos han demostrado que éstas contienen y mantienen activa la maquinaria enzimática necesaria para metabolizar los azúcares solubles bajo condiciones de cultivo *in vitro* (Goren y cols 2000; Harada y cols 2001). En este apartado, se realizó un ensayo *in vitro* con vesículas de cítricos a las que se les suministró al medio de cultivo citrato, para determinar si su adición contribuye al aumento de contenido de fructosa, glucosa o sacarosa en el zumo.

Para evaluar la absorción de sustancias del medio de cultivo por parte de las vesículas en este sistema de cultivo *in vitro*, se realizaron dos ensayos, uno con vesículas de Clementina y otro con vesículas de Naranja. Los medios de cultivo contenían fucosa como estándar interno, empleando una concentración de fucosa 100 veces inferior a la mínima concentración de sacarosa que debe ser adicionada al medio de cultivo para producir acumulación de azúcares en el interior de las vesículas de mandarinos (Harada y cols 2001). Al cabo de 5 días, la concentración de fucosa en el interior de

las vesículas sin adición de ácido cítrico y adicionándole ácido cítrico fue similar ($P < 0.05$, $n = 3$). Estos resultados indicaron que el sistema de cultivo permitió la absorción de sustancias al interior de las vesículas y que el ácido cítrico no modificó la absorción de un azúcar procedente del medio de cultivo en un sistema de cultivo *in vitro* de vesículas de cítricos.

En las vesículas donde se les añadió ácido cítrico al medio de cultivo (CON CIT), se observó un aumento de la concentración de ácido cítrico 4.95 veces superior (Figura VI-44) respecto al medio sin adición de citrato (SIN CIT). También se observó un incremento significativo ($P < 0.05$) del 57.2% en fructosa, un 22.67% en glucosa y un 55.72% en sacarosa (Figura VI-45). Estos resultados sugieren que al menos, una parte del citrato añadido fue catabolizado en azúcares.

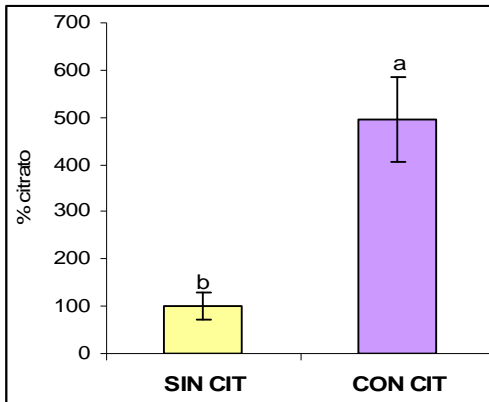


Figura VI-44: Porcentaje de ácido cítrico en el zumo de vesículas después de 5 días de incubación en medio sin citrato (SIN CIT) y con citrato (5000 ppm, CON CIT). Letras diferentes indican diferencias significativas ($\mu \pm E.S.$, $P < 0.05$, $n = 6$).

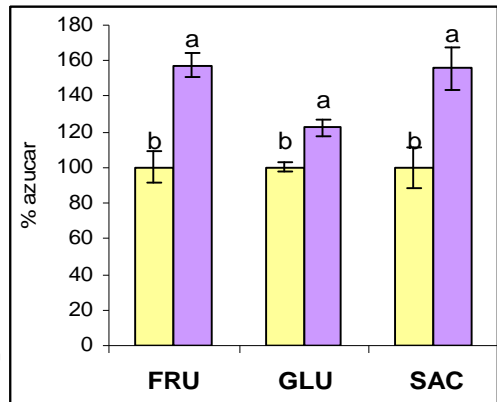


Figura VI-45: Porcentaje de fructosa, glucosa y sacarosa en el zumo de vesículas después de 5 días de incubación en medio sin citrato (SIN CIT) y en medio con citrato (5000 ppm, CON CIT). Letras diferentes indican diferencias significativas ($\mu \pm E.S.$, $P < 0.05$, $n = 6$).

En general, el ácido cítrico sintetizado en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos es exportado al citosol mediante un cotransportador mitocondrial que intercambia citrato por malato y/o oxalacetato. En el citosol, el citrato se acumula en la vacuola. Por otro lado, existen dos rutas de catabolismo de citrato en el citosol. En la primera, la enzima ATP citrato liasa (EC 2.3.3.8) utiliza el citrato presente en el citosol como precursor para la síntesis de acetil-CoA y oxalacetato, aunque esta ruta se ha visto que se encuentra inhibida durante la maduración de los frutos cítricos (Cercós y cols 2006; Soler 2009). En la segunda ruta, el citrato es isomerizado a isocitrato por la acción de una aconitasa citosólica (Sadka y cols 2000). El isocitrato se transforma mediante la isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP⁺ (EC 1.1.1.41) en α -cetoglutarato que posteriormente es transformado en glutamato y éste en 4-aminobutírico (GABA). Se ha demostrado que los genes implicados en la ruta de degradación del ácido cítrico vía GABA se encuentran activos en la pulpa de los frutos cítricos durante su maduración generándose, a partir del citrato, glutamato y succinato (Cercós y cols 2006). En *Arabidopsis* se ha identificado un translocador de succinato desde el citosol a la matriz mitocondrial que intercambia fumarato (Catoni y cols 2003)

En un experimento posterior se adicionó citrato marcado con ¹³C en los carbonos 1 y 5, al medio de cultivo de vesículas de cítricos para estudiar las pautas de degradación del citrato y obtener evidencias de la degradación de citrato a través de la ruta GABA. En la Figura VI-46 se muestra la ruta hipotética de degradación del ácido cítrico marcado.

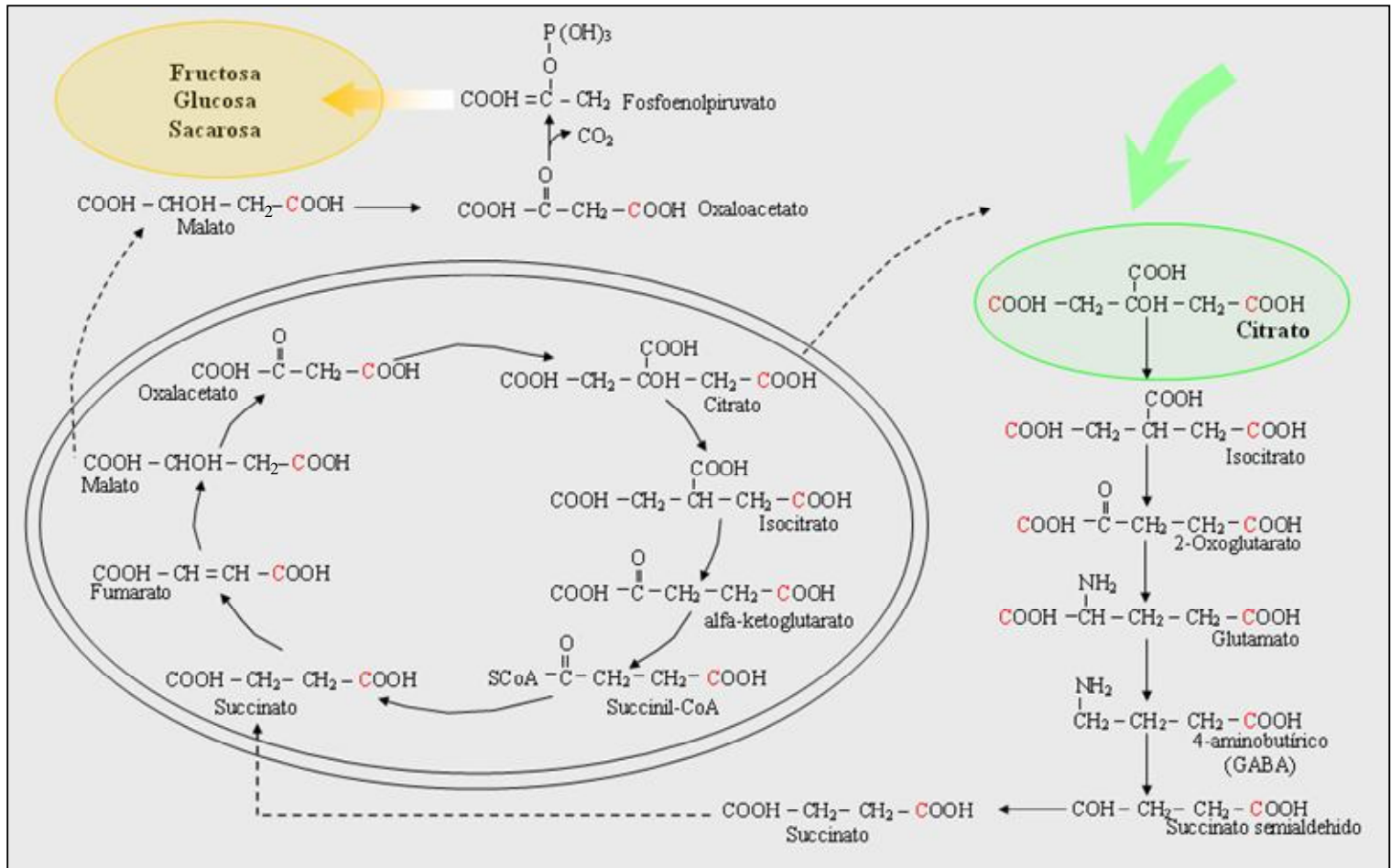
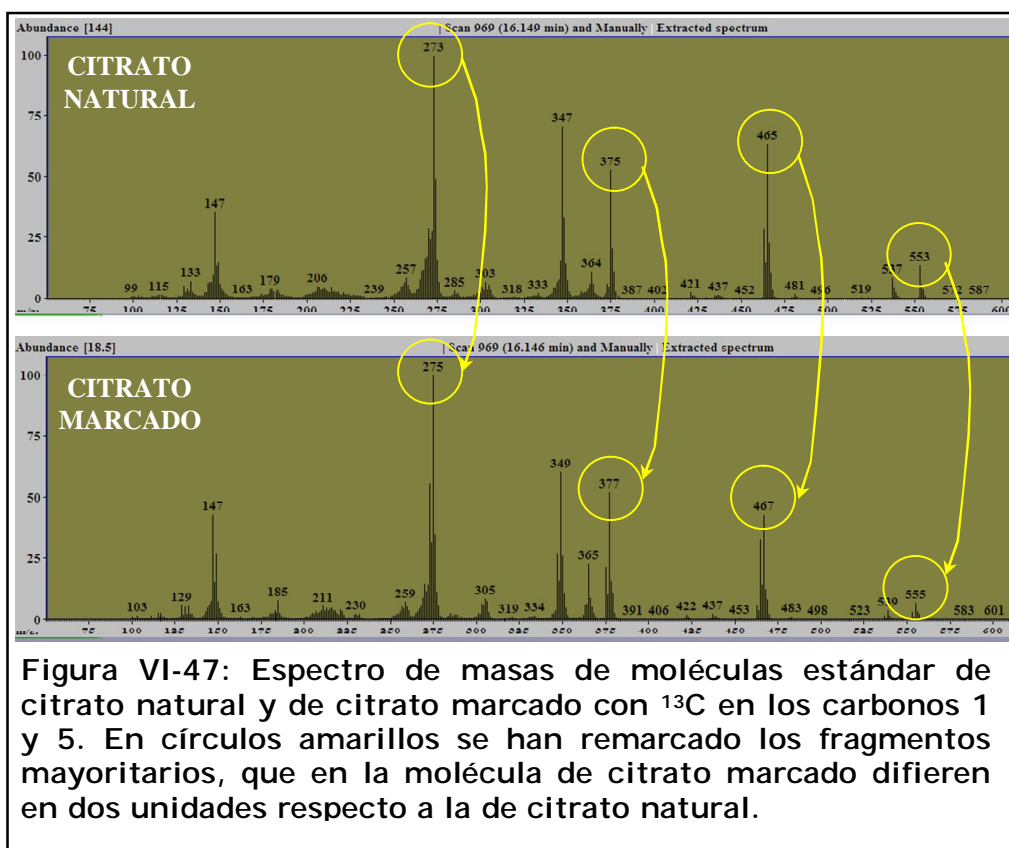


Figura VI-46: Ruta hipotética de degradación de ácido cítrico marcado con 1,5-¹³C-ácido cítrico. Los carbonos marcados se indican en color rojo.

Básicamente la hipótesis predice que uno de los carbonos marcados en el citrato se perdería en la reducción de glutamato a GABA, mientras que el otro se perdería en la transformación de oxalacetato a fosfoenolpiruvato. El marcaje de los ácidos fue determinado mediante CG/MS. Los resultados muestran que ambos tipos de moléculas, las marcadas y las no marcadas se diferencian en dos unidades de masa en los fragmentos principales de su espectro de masas (Figura VI-47).



En el zumo de las vesículas con citrato marcado, la concentración de este compuesto se incrementó más de 17 veces, confirmando la incorporación del citrato marcado al contenido del interior de las vesículas cultivadas *in vitro* (Figura VI-48).

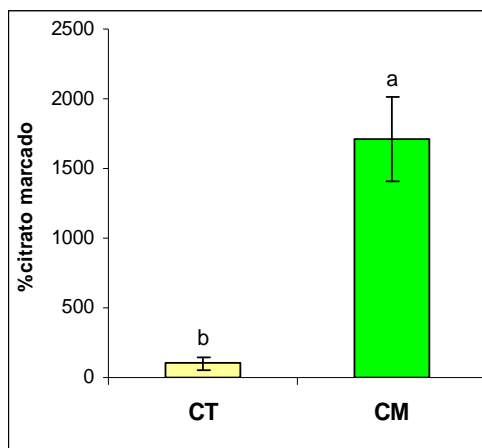


Figura VI-48: Porcentaje de citrato marcado con ^{13}C en el zumo de vesículas del medio suplementado con 5000 ppm de $1,5\text{-}^{13}\text{C}$ -ácido cítrico (CM) respecto al medio sin adición de citrato marcado (CT). Letras diferentes indican **diferencias significativas** ($\mu \pm \text{E.S.}$, $P < 0.01$, $n \geq 6$).

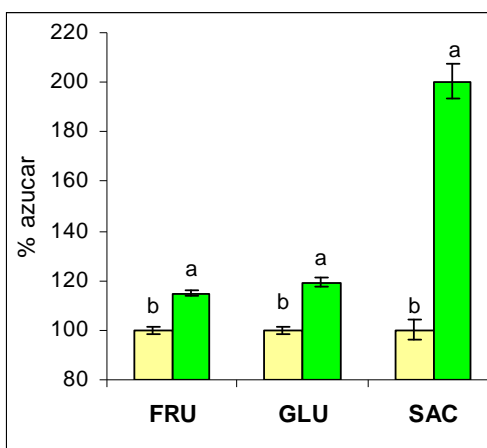


Figura VI-49: Porcentaje de fructosa (FRU), glucosa (GLU) y sacarosa (SAC) en el zumo de vesículas después de 5 días de incubación en medio sin adición de citrato (■) y en medio suplementado con 5000 ppm de $1,5\text{-}^{13}\text{C}$ -ácido cítrico (■). Letras diferentes indican **diferencias significativas por azúcar** ($\mu \pm \text{E.S.}$, $P < 0.05$, $n = 6$).

La concentración de los azúcares, fructosa, glucosa y sacarosa en el zumo de las vesículas significativamente aumentó ($P < 0.05$, $n = 6$) en el medio suplementado con 5000 ppm de $1,5\text{-}^{13}\text{C}$ -ácido cítrico (CM) respecto al control (Figura VI-49). Otro azúcar, el inositol, cuya síntesis no procede a través de la gluconeogénesis (como si lo están la glucosa y la fructosa), no mostró diferencias significativas ($P < 0.05$, $n = 6$) (Tabla VI-3). La fructosa aumentó un 14.8%, la glucosa un 19.3% y la sacarosa prácticamente el doble (Figura VI-49).

En las vesículas cultivadas *in vitro* en medio sin citrato exógeno CT, el porcentaje del ion 555 m/z, en relación con el ión molecular 553 m/z del citrato resultó significativamente menor ($P < 0.001$) un 28.92% respecto al 96.62% del medio suplementado con 5000 ppm de

1,5-¹³C-ácido cítrico (CM) (Figura VI-50) confirmando la incorporación del citrato marcado con dos átomos de carbono del medio de cultivo al interior de las vesículas.

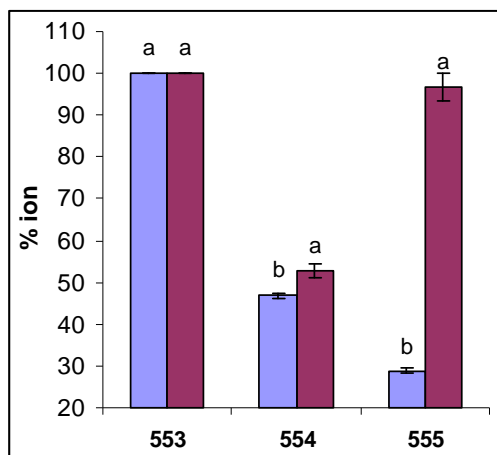


Figura VI-50: Distribución isotópica del ión molecular 553 m/z del derivado trimetilsililado del ácido cítrico en vesículas cultivadas *in vitro* en medio suplementado con 5000 ppm de ácido cítrico (■) y en medio suplementado con 5000 ppm de 1,5-¹³C-ácido cítrico (■). Letras diferentes indican diferencias significativas por ion ($\mu \pm$ E.S., $P < 0.05$, $n \geq 6$).

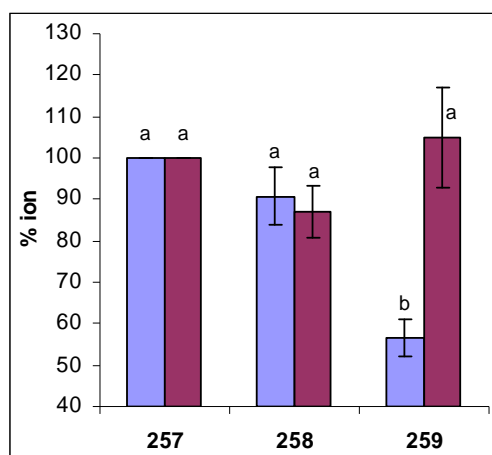


Figura VI-51: Distribución isotópica del ión molecular 257 m/z del derivado trimetilsililado del glutamato en vesículas cultivadas *in vitro* en medio suplementado con 5000 ppm de ácido cítrico (■) y en medio suplementado con 5000 ppm de 1,5-¹³C-ácido cítrico (■). Letras diferentes indican diferencias significativas por ion ($\mu \pm$ E.S., $P < 0.05$, $n \geq 6$).

En la degradación del citrato a través de la ruta del GABA, éste es transformado en glutamato (Cercós y cols 2006). Uno de los fragmentos mayoritarios del glutamato natural tiene una relación masa/carga de 257. El porcentaje del ión 259 m/z fue significativamente mayor ($P < 0.05$) en el medio CM respecto al medio CT, pasando de 56.50% en CT a 104.95% en CM (Figura VI-51),

confirmando la presencia en el glutamato de los dos átomos de carbono marcados en el citrato y por tanto la transformación de citrato en glutamato.

En la ruta del GABA el glutamato es transformado en succinato, reacción en la cual se pierde uno de los carbonos marcados. El espectro de masas del succinato natural produce un fragmento mayoritario cuya relación masa/carga es 409. En vesículas cultivadas en medio suplementado con 5000 ppm de 1,5-¹³C-ácido cítrico (CM) se obtuvo un porcentaje de ión 410 m/z ($P < 0.001$) del 123.87% mientras que fue solo del 9.95% en el citrato natural (Figura VI-52). Esto indica que el succinato resultante procede de una ruta que conserva un carbono marcado del citrato.

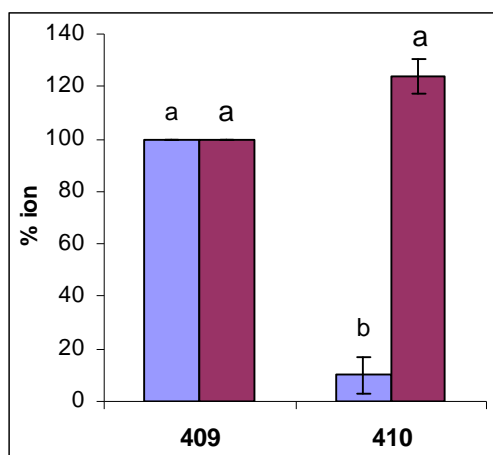


Figura VI-52: Distribución isotópica del ión molecular 409 m/z del derivado trimetilsililado del succinato en vesículas cultivadas *in vitro* en medio suplementado con 5000 ppm de ácido cítrico (■) y en medio suplementado con 5000 ppm de 1,5-¹³C-ácido cítrico (■). Letras diferentes indican diferencias significativas por ion ($\mu \pm \text{E.S.}$, $P < 0.05$, $n \geq 3$).

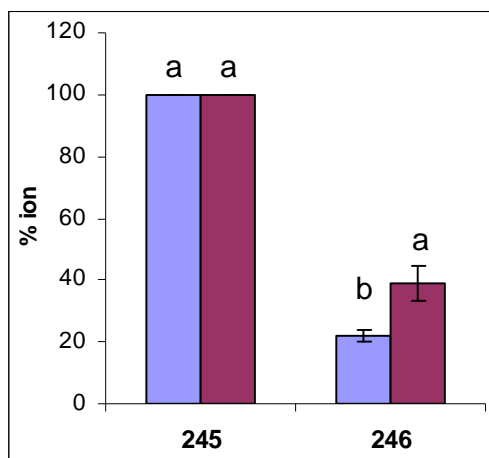


Figura VI-53: Distribución isotópica del ión molecular 245 m/z del derivado trimetilsililado del fumarato en vesículas cultivadas *in vitro* en medio suplementado con 5000 ppm de ácido cítrico (■) y en medio suplementado con 5000 ppm de 1,5-¹³C-ácido cítrico (■). Letras diferentes indican diferencias significativas por ion ($\mu \pm \text{E.S.}$, $P < 0.05$, $n = 6$).

Asimismo, el succinato producido por la degradación del citrato en la ruta vía GABA podría ser traslocado al interior de la mitocondria y transformado en fumarato integrándose en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Como en el caso anterior, el ión 246 m/z del espectro del fumarato proveniente de la extracción realizada a partir del medio suplementado con citrato marcado con 1,5-¹³C-ácido cítrico fue mayor (39,15%) ($P < 0,05$) que el porcentaje (22,07%) de este ión obtenido con el medio suplementado con citrato natural (Figura VI-53).

El análisis mediante espectrometría de masas también pudo confirmar que el malato presente en el medio suplementado con citrato marcado contenía una proporción significativa de malato marcado.

La Figura VI-54 muestra, por ejemplo, que el porcentaje del ión molecular +1, 425 m/z es mayor en los espectros del malato procedente del cultivo suplementado con 5000 ppm de 1,5-¹³C-ácido cítrico (40,2%) que en los espectros del malato procedentes del otro medio (36,77%) ($P < 0,01$).

El malato, mediante un transportador de membrana (Hanning y cols 1999) probablemente pasa al citosol donde es transformado en oxalacetato, mediante malato deshidrogenasa (EC 1.1.1.37), que a su vez se transforma en fosfoenolpiruvato mediante la acción de fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (EC 4.1.1.49).

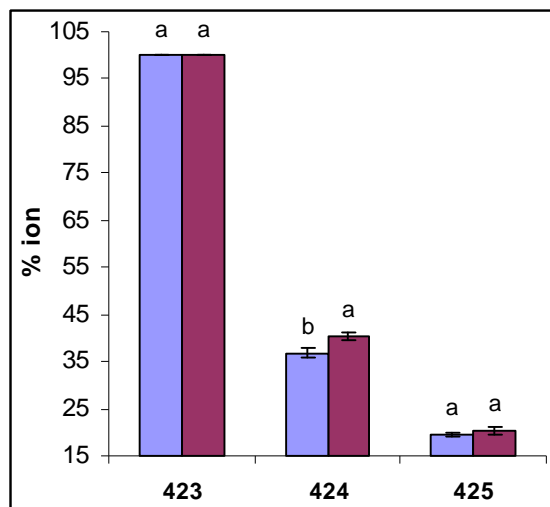


Figura VI-54: Distribución isotópica del ión molecular 423 m/z del derivado trimetilsililado del malato en vesículas cultivadas *in vitro* en medio suplementado con 5000 ppm de ácido cítrico (■) y en medio suplementado con 5000 ppm de 1,5-¹³C-ácido cítrico (■). Letras diferentes indican diferencias **significativas por ion** ($\mu \pm \text{E.S.}$, $P < 0.05$, $n \geq 6$).

La expresión de PEPCCK se incrementa paralelamente a un descenso en el contenido de los ácidos (apartado VI.3.1 y VI.3.5), activándose la ruta de gluconeogénesis que genera fructosa y glucosa. Al analizar mediante GC-MS la fructosa, la glucosa y la sacarosa presente en el contenido de las vesículas cultivadas en medio CM y CT, no se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) en el porcentaje de los iones mayoritarios (datos no mostrados). Esta circunstancia era esperable puesto que la transformación de oxalacetato a piruvato requiere de una descarboxilación adicional que elimina el carbono marcado restante.

Tabla VI-2: Porcentaje de fructosa, glucosa, sacarosa, inositol, citrato marcado (1,5-¹³C-ácido cítrico), malato, fumarato y succinato en el interior de vesículas cultivadas *in vitro* en medio suplementado con 5000 ppm de 1,5-¹³C-ácido cítrico (CM) respecto al medio sin adición de citrato (CT). Comparación de medias para cada compuesto (n=6).

	CM/CT $\mu \pm \sigma_{n-1}$	sig
Fructosa	114.85 ± 0.99	**
Glucosa	119.26 ± 1.87	***
Sacarosa	200.44 ± 7.30	***
<i>myo</i> -inositol	123.18 ± 10.46	no dif
Citrato marcado	1709.49 ± 304.3	***
Malato	108.19 ± 20.56	no dif
Fumarato	83.94 ± 26.43	no dif
Succinato	76.80 ± 23.54	no dif

Los resultados también indican que al añadir citrato al medio de cultivo, la fructosa, la glucosa y la sacarosa incrementan su concentración significativamente ($P < 0.05$) en el interior de las vesículas cultivadas *in vitro* un 14.8%, 19.3% y 100.4% respectivamente (Figura VI-45). El incremento de los azúcares debe ser consecuencia del único compuesto adicionado al medio de cultivo, el ácido cítrico. El suplemento de ácido cítrico, aunque fuera marcado, incrementó así mismo la cantidad de fructosa, glucosa y sacarosa (Tabla VI-2). Este incremento no afecta a la concentración de inositol, que no participa de la gluconeogénesis. Aunque las evidencias presentadas anteriormente sugieren que la ruta de degradación de ácido cítrico exógeno se produce a través de la vía GABA, las cantidades de ácidos incrementadas a raíz del suministro de ácido cítrico marcado no difieren significativamente ($P < 0,05$) de aquellas determinadas en los cultivos sin suplemento de citrato. Solamente los compuestos finales, los azúcares aparecen incrementados en su concentración.

VI.4. Conclusiones.

- En cítricos, se han identificado 3 genes que presumiblemente codifican para fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, denominados *PEPCK1*, *PEPCK2* y *PEPCK3*, 3 genes que codifican presumiblemente para fosfoenolpiruvato carboxilasa, denominados *PEPCL1*, *PEPCL2* y *PEPCL3*, y 2 genes que codifican para fosfoenolpiruvato carboxilasa quinasa, denominados *PEPCL-K1* y *PEPCL-K2*. Estos genes, por lo tanto, forman 3 pequeñas familias de unos pocos miembros.
- *PEPCK1* se expresa más que *PEPCK2* y *PEPCK3* tanto en pulpa, como en hoja y raíz; en el fruto la expresión de *PEPCK1* varía en función del estado de maduración.
- En el fruto, la inducción inicial de *PEPCK1* se produce en septiembre-noviembre durante la fase de reducción rápida de la acidez y el incremento de azúcares. Otras inducciones posteriores no parecen relacionadas con estos dos procesos.
- Los resultados obtenidos en los experimentos de adición de ácido cítrico marcado indican que la degradación de ácido cítrico durante la maduración se produce por la ruta de GABA y no a través de ATP citrato liasa.
- En conjunto los datos presentados sugieren que el flujo de carbono proveniente de la degradación de los ácidos es utilizado en la gluconeogénesis para la síntesis de azúcares y el elemento que conecta y coordina ambos procesos es la activación de fosfoenolpiruvato carboxiquinasa.

VII. Conclusiones generales.

VII. Conclusiones generales.

En esta tesis se seleccionaron inicialmente 5 genotipos mutantes de Clementina que mostraban alteraciones en la maduración del fruto. El análisis conjunto mediante el cruzamiento de los datos y las posteriores correlaciones obtenidas a partir del estudio de sus transcriptomas permitió identificar 161 genes implicados en los procesos de maduración. Entre estos genes, el papel de fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, se estudió con atención particular, puesto que este gen representa un "cruce de caminos" entre los procesos de acumulación de azúcares y reducción de ácidos.

Por último, se utilizaron técnicas de CGH, PCR cuantitativa y FISH para tratar de identificar fragmentos de ADN mutados en el genotipo Z46.

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral se pueden recapitular en las siguientes conclusiones:

1. Se han caracterizado cinco genotipos de Clementina con los códigos Z46, H03, I09, D11 y J59 con alteraciones en la maduración:
 - 1.1. El fruto del mutante Z46 es más redondo, más firme en época de sobremaduración, tiene más SST, más acidez y mayor IM. Presenta una reducción de la ruta de degradación de GABA y una activación mitocondrial de la síntesis de citrato.
 - 1.2. El fruto del mutante H03 tiene menos SST, menos acidez y parece presentar una inhibición general de la síntesis y metabolismo de ácido cítrico.
 - 1.3. El fruto del mutante I09 presenta más acidez, menor IM y parece presentar una reducción de la activación de la ruta de degradación de GABA.

- 1.4. El fruto del mutante D11 tiene menos acidez y al igual que H03 parece presentar una reducción de la actividad de la ruta de degradación de GABA.
 - 1.5. El mutante J59 tiene menos acidez y presenta alteraciones en la ruta del ácido cítrico semejantes a las de D11 y H03 aunque se diferencia de ellos por una fuerte represión de la síntesis de flavonoides.
2. El análisis conjunto de la expresión génica en el fruto y de los parámetros más importantes de la maduración ha permitido identificar 161 genes implicados en la maduración. Los datos indican que durante la reducción del contenido de los ácidos, el ácido cítrico se cataboliza mediante la activación de la ruta GABA, proceso paralelo a la inducción de la gluconeogénesis.
3. El estudio de los transcriptomas de los frutos de estos 5 mutantes también ha revelado un esquema general que sugiere que la acumulación de ácido cítrico se relaciona con la inhibición de la ruta GABA, como en los mutantes Z46 e I09, mientras que la reducción en acidez depende de la inhibición de la síntesis y metabolismo de citrato como en los mutantes D11, H03 y J59. Estos dos procesos son por tanto clave en aplicaciones biotecnológicas o agrícolas que pretendan la modificación de la acidez de los frutos.
4. En relación con el genotipo Z46, se han detectado y mapeado 118 genes presumiblemente deletados en este mutante.

5. Mediante CGH, micromatrices de expresión, PCR cuantitativa y FISH se han obtenido evidencias de que el mutante Z46 posee un fragmento de DNA deleciónado en su genoma ubicado en la región telomérica, en el extremo del cromosoma 9.

6. Los resultados obtenidos mediante el suplemento de ácido cítrico frío y marcado con ^{13}C y el análisis GC-MS sugieren que el citrato se cataboliza a través de la ruta GABA, y que en esta época y en paralelo a la activación de la ruta GABA tiene lugar también una activación de la conversión de oxalacetato a piruvato mediante la inducción de fosfoenolpiruvato carboxiquinasa.

7. En su conjunto, los datos presentados en este trabajo sugieren que la degradación de ácido cítrico se produce por la ruta de GABA. En este contexto, el flujo de carbono proveniente de la degradación de los ácidos parece ser utilizado en la gluconeogénesis para la síntesis de azúcares. La activación de fosfoenolpiruvato carboxiquinasa es el elemento que conecta y coordina ambos procesos.

VIII. Referencias bibliográficas.

VIII. Referencias bibliográficas.

- **Agustí J, Merelo P, Cercós M, Tadeo FR, Talón M. 2008.** Ethylene-induced differential gene expression during abscission of *citrus* leaves. *Exp Bot.* 59: 2717-33.
- **Agustí J, Merelo P, Cercós M, Tadeo FR, Talón M. 2009.** Comparative transcriptional survey between laser-microdissected cells from laminar abscission zone and petiolar cortical tissue during ethylene-promoted abscission in *citrus* leaves. *BMC Plant Biol* 9:127.
- **Agusti M. 2003.** Citricultura. ED. Mundi-prensa. 2ª Edición.
- **Ahloowalia B S, Maluszynski M, Nichterlein K. 2004.** Global impact of mutation-derived varieties. *Euphytica* 135: 187-204.
- **Alós E, Roca M, Iglesias DJ, Minués-Mosquera MI, Damasceno CM, Thannhauser TW, Rose JK, Talón M, Cercós M. 2008.** An evaluation of the basis and consequences of a stay green mutation in the navel negra *citrus* mutant using transcriptomic and proteomic profiling and metabolite analysis. *Plant Physiol.* Jul; 147: 1300-15.
- **Amorós M. 2003.** Producción de agrios. 3ª Edición. Editorial Mundi-Prensa.
- **Andreo CS, Gonzalez DH, Iglesias AA. 1987.** Higher plant phosphoenolpyruvate carboxylase: structure and regulation. *FEBS Lett* 213: 1-8.
- **Asins MJ, Juárez J, Pina JA, Puchades J, Carbonell EA, Navarro L. 2002.** Una nueva clementina, de baja fertilidad, llamada Nulessín. *Vida Rural* .157:50-52.
- **Bahrami AR, Chen ZH, Walker RP, Leegood RC, Gray JE. 2001.** Ripening-related occurrence of phosphoenolpyruvate carboxykinase in tomato fruit. *Plant Mol Biol.* Nov 47:499-506.

- **Bailey KJ, Gray JE, Walker RP, Leegood RC. 2007.** Coordinate regulation of Phosphoenolpyruvate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxykinase by light and CO₂ during C₄ photosynthesis. *Plant Physiology*, May 2007:479-486.
- **Bain JM. 1958.** Morphological, anatomical and physiological changes in the developing fruit of the Valencia orange, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. *Australian Tour.Bot.*6:1-24.
- **Batista R, Saibo N, Lourenço T, Margarida M. 2008.** Microarray analysis reveal that plant mutagenesis may induce more transcriptomic changes than transgene insertion. *PNAS* March 4, 105: 3640-3645.
- **Beló A, Beatty MK, Hondred D, Fengler KA, Li BL, Rafalski A. 2010.** Allelic genome structural variations in maize detected by array comparative genome hybridization. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 120:355-367.
- **Blanke MM y Lenz F. 1989.** Fruit photosynthesis. *Plant Cell Environ.* 12:31-46.
- **Boggio SB, Palatnik JF, Heldt HW, Valle EM. 2000.** *Plant Science* Oct 16; 159:125-133. "Changes in amino acid composition and nitrogen metabolizing enzymes in ripening fruits of *Lycopersicum esculentum* Mill."
- **Bolstad B M, Irizarry R A, Astrand M, Speed T P. 2003.** A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on bias and variance. *Bioinformatics* 19: 185-193.
- **Bourdenx B, Bernard A, Domergue F, Pascal S, Léger A, Roby D, Pervent M, Vile D, Haslam RP, Napier JA., Lessire R, Joubes J. 2011.** Overexpression of *Arabidopsis* CER1 promotes wax VLC-alkane biosynthesis and influences plant response to

biotic and abiotic stresses. *Plant Physiology*. March 2011: 111.172320.

- **Britto DT y Kronzucker HJ 2005.** Nitrogen acquisition, PEP carboxylase, and cellular pH homeostasis: new views on old paradigms. *Plant Cell & Environment* 28: 1396-1409.
- **Brumos J, Colmenero-Flores JM, Conesa A, Izquierdo P, Sánchez G, Iglesias DJ, López-Climent MF, Gómez-Cadenas A, Talón M. 2009.** Membrane transporters and carbon metabolism implicated in chloride homeostasis differentiate salt stress responses in tolerant and sensitive Citrus rootstocks. *Funct Integr Genomics*. Aug 9:293-309.
- **Burnell JN, Hatch MD. 1988.** Photosynthesis in phosphoenolpyruvate carboxykinase-type C4 plantas: pathways of C4 acid decarboxylation in bundle sheath cells of *Urochloa panicoides*. *Arch Biochem Biophys* 260:187-199.
- **Bustin SA. 2002.** Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology*. 29:23-39.
- **Canel C, Bailey-Serres JN, Roose ML, 1996.** *In vitro* [14C] citrate uptake by tonoplast vesicles of acidless *citrus* juice cells. *J Am Soc Hort Sci* 120:510-514.
- **Catoni E, Schwab R, Hilpert M, Desimone M, Schwacke R, Függe UI, Schumacher K, Frommer WB. 2003** Identification of an *Arabidopsis* mitochondrial succinate-fumarate translocator. *FEBS Lett*, 2003 Jan 16; 534:87-92.
- **Cercos M, Soler G, Iglesias DJ, Gadea J, Forment J, Talón M. 2006.** Global análisis of gene expresión during development and ripening of *citrus* fruit flash. A proponed mechanism for citric acid utilization. *Plant Mol Biol Nov*; 62: 513-27.

- **Cervera M, Pina JA, Juarez J, Navarro L, Peña L. 2000.** A broad exploration of a transgenic population of citrus: stability on gene expression and phenotype. *Theoretical and Applied Genetics*.100:670-677.
- **Chen FX, Liu XH, Chen LS. 2009.** Developmental changes in pulp organic acid concentration and activities of acid-metabolising enzymes during the fruit development of two loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl) cultivars differing in fruit acidity. *Food Chem.* 114: 657-664.
- **Chen MeiXia, Zhao CongKai, Chen XueSen, Hao HuiJun, Zhang XianSheng. 2009.** Relationship between accumulation of organic acid and organic acid-metabolizing enzymes during apricot fruit development. *Journal of Fruit Science* 2009 Vol. 26: 471-474.
- **Chen ZH, Jenking GI, Nimmo GG. 2007.** BHLH32 modulates several biochemical and morphological processes that respond to Pi starvation in *Arabidopsis*. *Biochemical Journal* 405:191-198.
- **Chen ZH, Garteh JI, Hugh NG. 2008.** pH and Carbon supply control the expression of phosphoenolpyruvate carboxylase kinase genes in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Cell and Environment*, 31: 1844-1850.
- **Chen ZH, Walker RP, Acheson RM, Leegoo RC. 2002.** Phosphoenolpyruvate carboxykinase assayed at physiological concentrations of metal ions has a high affinity for CO₂. *Plant Physiol* 128:160-164.
- **Chen ZH, Walker RP, Tecsí LI, Lea PJ, Leegood RC. 2004.** Phosphoenolpyruvate carboxykinase in cucumber plants is increased both by ammonium and by acidification, and is present in the phloem. *Planta* 219: 48-58.

- **Chollet R, Vidal J, O’Leary MH. 1996.** Phosphoenolpyruvate carboxylase: a ubiquitous, highly regulated enzyme in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47:273-298.
- **Crawford LA, Bown AW, Breitskreuz KE, Guinel FC. 1994.** The synthesis of gamma-aminobutyric acid in response to treatments reducing cytosolic pH. *Plant Physiol.* 104:865-871.
- **Cullen PJ, Cozier GE, Banting G, Mellor H. 2001.** Modular phosphoinositide-binding domains–Their role in signalling and membrane trafficking. *Curr. Biol.* 11: 882–893.
- **Degu Asfaw, Hatew Bayissa, Nunes-Nesi Adriano, Shlizerman Luzmila, Zur Naftali, Katz Ehud, Fernie Alisdair R., Blumwald Eduardo, Sadka Avi. 2011.** Inhibition of aconitase in *citrus* fruit callus results in a metabolic shift towards amino acid biosynthesis. *Planta*. DOI 10.1007/s00425-011-1411-2. Publisher online: 28 April 2011.
- **Delgado-Alvarado A, Walker RP, Leegood RC. 2007.** Phosphoenolpyruvate carboxykinase in developing pea seeds is associated with tissues involved in soluble transport and is nitrogen-responsive. *Plant Cell Environ.* Feb, 30:225-35.
- **Diakou P, Svanella L, Raymond P, Gaudillère J-P, Moing A. 2000.** Phosphoenolpyruvate carboxylase during grape berry development: protein level, enzyme activity and regulation. *Australian Journal of Plant Physiology* 27: 221-229.
- **Domingo C, Andrés F, Tharreau D, Iglesias DJ, Talón M. 2009.** Constitutive expression of *OsgH3.1* reduces auxin content and enhances defense response and resistance to a fungal pathogen in rice. *The American Phytopathological Society*. Vol 22: 201-210.

- **Dominguez A, Guerri J, Cambra M, Navarro L, Moreno P, Peña L. 2000.** Efficient production of transgenic citrus plants expressing the coat protein gene of citrus tristeza virus. *Plant Cell Reports*.19:427-433.
- **Duncan DB. 1955.** Multiple range and multiple F tests. *Biometrics* 11: 1-41.
- **Endo T, Shimada T, Fujii H, Kobayashi Y, Araki T, Omura M. 2005.** Ectopic expression of an FT homolog from Citrus confers an early flowering phenotype on trifoliolate orange (*Poncirus trifoliolate* L.Raf.). *Transgenic Res.* 14:703-712.
- **Famiani F, Cultrera NG, Battistelli A, Casulli V, Proietti P, Standardi A, Chen ZH, Leegood RC, Walker RP. 2005.** Phosphoenolpyruvate carboxykinase and its potential role in the catabolism of organic acids in the flesh of soft fruit during ripening. *J.Exp Bot.* Nov: 56:2959-69.
- **Famiani Franco and Walker Robert P. 2009.** Changes in abundance of enzymes involved in Organic acid, amino acid and sugar metabolism, and photosynthesis during the ripening of Blackberry fruit. *J.Amer. Soc. Hort. Sci.* 134:167-175.
- **Fan CZ, Vibranovski MD, Chen Y, Long MY. 2007.** A microarray based genomic hybridization method for identification of new genes in plants: Case analyses of Arabidopsis and Oryza. *J Integr Plant Biol.*49:915-926.
- **FAO, 2010.** <http://www.fao.org>.
- **Felsenstein J. 1985** Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- **Feria AB, Alvarez R, Cochereau L, Vidal J, García-Mauriño S, Echevarría C. 2008.** Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase phosphorylation by metabolites and abscisic acid

during the development and germination of barley seeds. *Plant Physiol.* Oct; 148:761-74.

- **Firpo Inés Teresa, Rotondo Rosana, Drincovich Fabiana, Chaves Alicia, López Anido Fernando, Country Enrique, Garcís Stella Maris. 2007.** Caracterización de aspectos de calidad a cosecha de cinco híbridos de espárrago, bajo dos sistemas de manejo. *Revista de investigaciones de la facultad de Ciencias Agrarias.* N° XI.
- **Forment J, Gadea J, Huerta L, Abizanda L, Agusti J, Alamar S, Alos E, Andres F, Arribas R, Beltran JP, Berbel A, Blazquez MA, Brumos J, Canas LA, Cercos M, Colmenero-Flores JM, Conesa A, Estables B, Gandia M, García Martínez JL, Gimeno J, Gisbert A, Gomez G, González-Candelas L, Granell A, Guerri J, Lafuente MT, Madueno F, Marcos JF, Marques MC, Martinez F, Martinez-Godoy MA, Miralles S, Moreno P, Navarro L, Pallas V, Perez-Amador MA, Perez-Valle J, Pons C, Rodrigo I, Rodriguez PL, Royo C, Serrano R, Soler G, Tadeo F, Talon M, Terol J, Trenor M, Vaello L, Vicente O, Vidal Ch, Zacarias L, Conejero V. 2005.** Development of a citrus genome-wide EST collection and cDNA *microarray* as resources for genomic studies. *Plant Molecular Biology* 57:375-391
- **Franco-Zorrilla JM, Martín AC, Leyva A, Pax-Ares J. 2005.** Interaction between phosphate-starvation, sugar, and cytokinin signalling in *Arabidopsis* and the roles of cytokinin receptors CRE1/AHK4 and AHK3. *Plant Physiology* 138: 847-857.
- **Froneman IJ, Breedts HJ, Koekemoer PJJ, Van Rensburg PJJ. 1996.** Producing seedless *citrus* cultivars with gamma irradiation. *Proc. Int. Soc. Citriculture* 1: 159-163. Sudáfrica.

- **Fuentes JL, Santiago L, Valdés Y, Guerra M, Ramírez LL, Prieto EF, Rodríguez NN, Velázquez B. 2004.** Mutation induction in zygotic embryos of avocado (*Persea americana* Mill). *Biotecnología aplicada*; 21:82-84.
- **Fukayama H, tamai T, Tamiguchi Y, Sullivan S, Miyao M, Nimmo GG. 2006.** Characterization and functional análisis of phosphoenolpyruvate carboxylase kinase genes in rice. *The Plant Journal* 47: 258-268.
- **Gerlach WL y Bedbrook JR. 1979.** Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. *Nucleic Acids Research* 7:1869-1885.
- **Geschwind DH, Gregg J, Boone K, Karrim J, Pawlikowska-Haddal A, Rao E, Ellison J, Ciccodiola A, D'Urso M, Woods R, Rappold GA, Swedloff R, Nelson SF. 1998.** Klinefelter's syndrome as a model of anomalous cerebral laterality: testing gene dosage in the X chromosome pseudoautosomal region using a DNA microarray. *Dev Genet* 23:215-229.
- **Gill SS, Tuteja N. 2010.** Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem*, Dec, 48:909-30.
- **Goren Raphael, Huberman Moshe, Zehavi Uri, Chen-Zion Malka, Echeverria Ed. 2000.** Sugar utilization by Citrus juice cells as determined by [14C].sucrose and [14C]-fructose feeding analyses. *Plant Physiology and Biochemistry*, June 28: 507-515.
- **Gout E, Bligny R, Pascal N, Douce R. 1993.** 13C nuclear magnetic resonante studies of malate and citrate síntesis and compartmentation in higher plants cells. *J.Biol.Chem.* 268:1986-92.

- **Gray WM, Muskett PR, Chuang HW, Parker JE. 2003.** Arabidopsis SGT1b is required for SCF (TIR1)-mediated auxin response. *Plant Cell Jun*; 15:1310-9.
- **Guillet C, Just D, Bénard N, Destrac-irvine A, Baldet P, Hernould M, Causse M, Raymond P, Rothan C. 2002.** A fruit-specific phosphoenolpyruvate carboxylase is related to rapid growth of tomato fruit. *Planta* 214: 717-726.
- **Hackam Yael, Matityahu Ifat1, Schuster Gadi, Amir Rachel 2008.** Overexpression of mutated forms of aspartate kinase and cystathionine γ -synthase in tobacco leaves resulted in the high accumulation of methionine and threonine. *The Plant Journal*, 54:260-271.
- **Halinska A, Frenkel C. 1991.** Acetaldehyde stimulation of net gluconeogenic carbon movement from applied malic acid in tomato fruit pericarp tissue. *Plant Physiology* 95, 954-960.
- **Hanning II, Baumgarten K, Schott K, Heldt HN. 1999.** Oxalacetate transport into plant mitochondria. *Plant physiology*. Mar; 119: 1025-32.
- **Hanson RE, Zwick MD; Choe S, Islam-Faridi MN, McKnight TD, Wing RA, Price HJ, Stelly DM. 1995.** Fluorescent in situ hybridization of a bacterial artificial chromosome. *Genome* 38:646-652.
- **Harada Hisashi, Mukai Hiroo, Takasi Toshihiko 2001.** Effects of explant age, growth regulators and carbohydrate on sugar accumulation in Citrus juice vesicles cultured *in Vitro*. *Scientia Horticulturae* 90: 109-119.
- **Hashimoto J, Beadles-Bohling AS and Wiren CM. 2004.** Comparison of Ribogreen and 18 rRNA quantitation for

normalizing real-time RT-PCR expression analysis. *Biotechniques*. 36:64-60.

- **Havaux Michel, Krishna K. 1999.** The violaxanthin cycle protects plants from photooxidative damage by more than one mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA Plant Biology*. July 1999: 8762-8767.
- **He TF. 1999.** Citrus (in chinese). Beijing: China Agricultural Press. 130-142.
- **Heldt HW. 2004.** *Plant Biochemistry*. Elsevier, Academic Press. Göttingen, Germany: 630.
- **Hernould M, Joubès J, Decendit A, Mars M, Barrieu F, Hamdi S, Delrot S. 2009.** Overexpression of a grapevine R2R3-MYB factor in tomato affects vegetative development, flower morphology and flavonoid and terpenoid metabolism. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47: 551-561.
- **Huang X and Madan A. 1999.** CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res.*, 9: 868-877.
- **Hunter RS. 1967.** Development of the Citrus colorimeter. *Food Technol.* 21: 906-911.
- **Iglesias DJ, Ibáñez V, Usach A, Talón M. 2006.** Dos nuevos registros de Clementina: Clemenverd y Nero. *Revista Agraria* Agosto.
- **Iglesias D, Tadeo FR, Primo-Millo E, Talón M. 2003.** Fruit set dependence on carbohydrate availability in citrus tress. *Tree Physiol* .23 :199-204
- **Iglesias DJ, Usach A, Boix A, Almenar A, Blázquez E, López E, Sanchis I, Ibáñez V, Ortega AH, Buj A, Brumós J, Cercós M, Merelo P, Tadeo FR, Terol J, Bono R, Talón M. 2009.** Maduración, perdurabilidad y conservación en árbol de una

variedad de clementina de marzo. Levante Agrícola, primer trimestre del 2009.

- **Irvine RF, Schell MJ. 2001.** Back in the water: The return of the inositol phosphates. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2: 327–338.
- **Izui K, Matsumura H, Furumoto T, Kai Y. 2004.** Phosphoenolpyruvate carboxylase: a new era of structural biology. *Annu Rev Plant Biol* 55:69-84.
- **Jaillon O y cols 2007.** The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature.* Sep 27;449(7161):463-7. Epub 2007 Aug 26.
- **Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Walkman F, Pincel D. 1992.** Comparative Genomic Hybridization for Molecular Cytogenetic Analysis of Solid Tumors. *Science.* 258:818-821.
- **Kang Sung-Ku, Lee Dong-Hoon, An Hyun-Ju, Park Jae-Ho, Yun Su-Hyun, Moon Young-eel, Bang Jae-Wook, Hur Yoonkang, Koo Dai-Hoe. 2008.** Extensive chromosomal polymorphism revealed by ribosomal DNA and satellite DNA loci in 13 Citrus species. *Molecules and cells.* 26: 319-322, September 30.
- **Karadeniz Feryal. 2003.** Main Organic Acid Distribution of Authentic Citrus Juices in Turkey. *Turk J Agric For* 28: 267-271.
- **Karthikeyan A S, Varadarajan DK, Jain A, Held MA, Carpita NC and Raghothama KG. 2007.** Phosphate starvation responses are mediated by sugar signaling in Arabidopsis. *Planta* 225: 907-918.
- **Kharkwal MC y Shu WY. 2009.** The role of induced mutations in World food security. *Induced plant mutations in the genomics*

era. Food and agricultura organization of the United Nations. Rome 200: 39-43.

- **Kim JS, Childs K L, Nurul Islam-faridi M, Menz M A, Klein RR Klein P E, Price H J, Mullet JE y Stelly D M. 2002.** Integrated karyotyping of sorghum by in situ hybridization of landed BACs. *Genome* 45:402-412.
- **Koch Karen E. 1984.** Translocation of phostosynthetic products from source leaves to aligned juice segments in citrus fruits. *HortScience* 19: 260-261.
- **Kodym A, Afza R. 2003.** Physical and Chemicals mutagénesis, 236: 189-203.
- **Kurt David Kausch. 1997.** Molecular cloning of a ripening-specific lipoxygenase and its expression during wild-type and mutant tomato fruit development. *Plant physiology* April 1997. 113: 1041-1050.
- **Kwon Yeong-Deok, Lee Sang Yup, Kim Pil. 2008.** A physiology study of *Escherichia coli* overexpressing phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72: 1138-1141.
- **Lavoinnie A, Husson A, Quillard M, Chédeville A, Fairand A 1996.** Glutamine inhibits the lowering effect of glucose on the level of phosphoenolpyruvate carboxykinase mRNA in isolated rat hepatocytes. *Eur J Biochem* 242:537-543.
- **Law RD, Plaxton WC. 1995.** Purification and characterization of a novel phosphoenolpyruvate carboxylase from banana fruit. *Biochemical Journal* 307: 807-816.
- **Lea PJ, Azevedo RA. 2006.** Nitrogen use efficiency. 1. Uptake of nitrogen from the soil. *Annals of Applied Biology*. 149:243-247.

- **Lea PJ, Chen ZH, Leegood RC, Walker RP. 2001.** Does phosphoenolpyruvate carboxykinase have a role in both amino acid and carbohydrate metabolism?. *Amino Acids*. 20:225-41.
- **Leegood RC y Walker RP. 2003.** Regulation and roles of phosphoenolpyruvate carboxykinase in plants. *Archives of Biochemistry and biophysics* 414, 204-210.
- **Lemaitre T, Urbanczyk-Wochniak E, Flesch V, Bismuth E, Fernie AR, Hodges M. 2007.** NAD-dependent isocitrate dehydrogenase mutants of *Arabidopsis* suggest the enzyme is not limiting for nitrogen assimilation. *Plant Physiology* 144:1546–1558
- **Leone Antonella, Bleve-Zacheo Teresa, Gerardi Carmela, Melillo Marita T, Leo Lucia, Xacheo Giuseppe. 2006.** Lipoxygenase involvement in ripening strawberry. *J.Agric.Food Che.* 2006, 54: 6835-6844.
- **Lihong Xue, Wixing Cao, Wihong Luo, Tingbo Dai, Yan Zhu. 2004.** Monitoring leaf nitrogen status in rice with Canopo spectral reflectance. *Agronomy Journal* Vol 96. January-February: 135-142.
- **Lima da Silva A y Doazan JP, 1995.** Gamma ray-mutagenesis on grapevine rootstocks cultivated *in vitro*. *J.Int.Sci. de la Vigne et du Vin.* 29:1-9.
- **Liu P, Wood D y W.Nester E. 2005.** Phosphoenolpyruvate carboxykinase is an acid-induced, chromosomally encoded virulence factor in *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology*, September, 187: 6039-6045.
- **Livak Kenneth y Schmittgen Thomas D. 2001.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods* 25: 402-408.

- **Lobit P, Génard M, Wu BH, Soing P, Habib R. 2003.** Modelling citrate metabolism in fruits: responses to growth and temperature. *Journal of Experimental Botany*. 54:2489-2501.
- **Loewus FA. 1973.** Biogenesis of Plant Cell Wall Polysaccharides. (New York: Academic Press).
- **López J. 1995.** La naranja, composición y cualidades de sus zumos y esencias. Generalitat Valenciana. Conselleria de Agricultura y Medio Ambiente. 24-28.
- **Louie GV, Bowman ME, Tu Y, Mouradov A, Spangenberg G, Noel JP. 2010.** Structure-function analysis of a caffeic acid O-methyltransferase from perennial ryegrass reveal the molecular basis for substrate preference. *Plant Cell Dec*; 22:4114-27.
- **Lynch M, Walsh B. 1998.** Genetics and análisis of quantitative traits. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 980p.
- **Mahbood Ali Sial, M Umar Dahot, Khalil Ahmed Laghari, M Afzal Arain, Sher M Mangrio y AJ Pirzada. 2010.** Agronomic performance of semi-dwarf and dwarf wheat genotypes. *World Applied Sciences Journal* 8 (Special Issue of biotechnology and Genetic Engineering): 30-33.
- **Mantel N. 1967.** The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, 27: 209-220.
- **Marsh Justin T, Sullivan Stuart, Hartwell James, Nimmo Hugo G. 2003.** Structure and Expresión of phosphoenolpyruvate carboxylase kinase genes in *Solanaceae*. A novel gene exhibits alternative splicing. *Plant Physiology*, Diciembre 2003, 133: 2021-2028.
- **Martinez-Godoy MA, Mauri N, Juarez J, Marques MC, Santiago J, Forment J, Gadea J. 2008.** A genome-wide 20 K

citrus microarray for gene expression analysis. BMC Genomics. Jul 3; 9:318.

- **Matsumoto T y cols 2005.** The map-based sequence of the rice genome. Nature 436: 793-800.
- **Meimoun Patrice, Gousset-Dupont Aurélie, Lebouteiller Bénédicte, Ambard-Bretteville Françoise, Besin Evelyne, Lelarge Carolina, Maule Carolina, Hodges Michael, Vidal Jean. 2009.** The impact of PEPC phosphorylation on growth and development of *Arabidopsis thaliana*: molecular and physiological characterization of PEPC kinase mutants.
- **Mi Tang, Zhi-long Bie, Ming-zhu Wu, Hong-ping Yi, Jong-xin FENA. 2010.** Changes in organic acids and acid metabolism enzymes in melon fruit during development. Scientia Horiticulturae 123: 360-365.
- **Miflin B. 2000.** Crop improvement in the 21st century. Journal of Experimental Botany 51:1-8.
- **Milton JS. 2007.** Estadística para biología y ciencias de la salud. Madrid: Interamericana McGraw Hill, 2007 (3ª ed.amp).
- **Moing A, Rothan C, Svanella L, Just D, Diakou P, Raymond P, Gaudillere J, Monet R. 2000.** Role of phosphoenolpyruvate carboxylase in organic acid accumulation during peach fruit development. Physiol. Plant 2008: 1-10.
- **Moraes AP, Mirkow TE, Guerra M. 2008.** Mapping the chromosomes of *Poncirus trifoliata* Raf. By BAC-FISH. Cytogenet Genome Res. 121:277-81.
- **Mukai Hiroo, Takagi Toshihiko, Harada Hishashi y Murai Yasuhiro. 2000.** Sugar accumulation by *in vitro* cultured juice vesicles of Satsuma mandarin. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 69: 57-59.

- **Müller-Moulé Patricia, Conklin Patricia L, Niyogi Krighnak. 2002.** Ascorbate peroxidase can limit violaxanthin de-epoxidase activity *in vivo*. *Plant Physiology* March 2002,128: 970-977.
- **Nanjo T, Fujita M, Seki M, Kato T, Tabata S, Shinozaki K. 2003.** Toxicity of free proline revealed in an *Arabidopsis* T-DNA-tagged mutant deficient in proline dehydrogenase. *Plant Cell Physiology*, 44: 541–548.
- **Nimmo HG. 2003.** Control of the phosphorylation of phosphoenolpyruvate carboxylase in higher plants. *Arch Biochem Biophys* 414: 189-196.
- **Nunes-Nesi A, Carrari F, Lytovchenko A, Smith AM, Loureiro ME, Ratcliffe RG, Sweetlove LJ, Fernie AR. 2005.** Enhanced photosynthetic performance and growth as a consequence of decreasing mitochondrial malate dehydrogenase activity in transgenic tomato plants. *Plant Physiology* 137:611–622.
- **Nuray Koca, Hande Selen Burdurlu, Feryal Karadeniz. 2003.** Kinetics of nonenzymatic Browning reaction in Citrus Juice concentrates during storage. *Turk J Agric For* 27: 353-360.
- **O’Leary MH 1982.** Phosphoenolpyruvate carboxylase: an enzymologist’s carboxylase in higher plants. *Arch. Biochem Biophys* 414: 189-196.
- **Pagel Janice, Walling Jason G, Young nevin D, Shoemaker Randy C and Jackson Scott A. 2004.** Segmental duplications within the Glycine max genome revealed by fluorescent *in situ* hybridization of bacterial artificial chromosomes.
- **Parry Martín AJ, Madgwick Pippa J, Bayon Carlos, Teerall kattie, Hernández-Lopez Antonio, Baudo Marcela, Rakszegi Mariann, Hamada Walid, Al-Yassin Adnan, Ouabbou Hassan, Labhilili Mustapha, Phillips Andrew L. 2009.** Mutation

Discovery for crop improvement. *Journal of Experimental Botany*, 60: 2817-2825.

- **Patterson AH y cols 2009.** The Sorghum bicolor genome and the diversification of grasses. *Nature* 457: 551-556.
- **Patterson BD y Graham D. 1987.** Temperature and metabolism. In: (DD Davied ed) *The Biochemistry of Plants*. Academic Press. 2:153-199.
- **Peña L and A Séguin. 2001.** Recent advances in the genetic transformation of trees. *Trends Biotechnol.* 19:500-506.
- **Pietta PG. 2000.** Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.*63: 1035-1042.
- **Pinet-Leblay C, Turpin FX, Chevreau E. 1992.** Effect of gamma and ultraviolet irradiation on adventitious regeneration from *in vitro* cultured pear leaves. *Euphytica* 62:225-233.
- **Pinkel D, Segraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, Collins C, Kuo WL, Chen C, Zhai Y, Dairkee SH, Ljung BM, Gray JW, Albertson DG. 1998.** High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet.* 20:207-211.
- **Predieri S and Fasolo F. 1989.** High-frequency shoot regeneration from leaves of the apple rootstock M26 (*Malus pumila* Mill). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 17: 133-142.
- **Predieri Stefano. 2001.** Mutation induction and tissue culture in improving fruits. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 64:185-210.
- **Ramakrishnan CV. 1971.** Citric acid metabolism in the fruit tissues of Citrus acida. *Curr Sci* 21:97-100.
- **Ratcliffe RG. 1995.** Metabolic aspects of the anoxic response in plant tissue. In: (N Smirnoff ed) *Environment and Plant*

Metabolism: Flexibility and Acclimation. Bios Scientific, Oxford:111-127.

- **Reiner A, Yekutieli D, Benjamini Y. 2003.** Identifying differentially expressed genes using false discovery rate controlling procedures. *Bioinformatics* 19:368-375.
- **Reynolds M, Foulkes MJ, Slafer GA, Berry P, Parry MAJ, Snape JW, Angus WJ. 2009.** Raising yield potential in wheat. *Journal of Experimental Botany* 60:1899-1918.
- **Richards RA. 2000.** Selectable traits to increase crop photosynthesis and yield of grain crops. *Journal of Experimental Botany*. 51:447-458.
- **Rios G, Iglesias DJ, Ibáñez V, Usach A, Talón M. 2007** Nuevos genotipos de Clementino con retraso de color. Publicado en la revista *Levante Agrícola*, segundo trimestre.
- **Rios G, Naranjo MA, Iglesias DJ, Ruiz-Rivero O, Geraud M, Usach A, Talón M. 2008.** Characterization of hemizygous deletions in citrus using array-comparative genomic hybridization and microsynteny comparisons with the poplar genome. *BMC Genomics*. Aug 9; 9:381.
- **Rios G, Naranjo MA, Rodrigo MJ, Alós E, Zacarias L, Cercós M, Talón M. 2010.** Identification of a GCC transcription factor responding to fruit colour change events in *Citrus* through the transcriptomic análisis of two mutants. *BMC Plant Biol*. Dec 15; 10:276.
- **Rodrigo Maria J, Zacarias Lorenzo. 2007.** Effect of postharvest ethylene treatment on carotenoid accumulation and the expression of carotenoid biosynthetic genes in the flavedo of orange (*Citrus sinensis* L.Osbeck) fruit. *Post harvest biology and technology*. 43:14-22.

- **Rodríguez G, Pratta G, Zorxxoli R y Picardi LA. 2005.** Caracterización de la generación segregante de un híbrido de tomate con genes *nor* y silvestres. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, 40: 41-46.
- **Rozen S and Skaletsky HJ. 2000.** Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ:365-386.
- **Ruffner HP, Kliwer MW. 1975.** Phosphoenolpyruvate carboxykinase activity in grape berries. *Plant physiology* 56: 67-71.
- **Ruffner HP. 1982.** Metabolism of tartaric and malic acid in *Vitis*: a review-Part B. *Vitis* 21: 346-358.
- **Rylott Elizabeth L, Gilday Alison D, Graham Ian A. 2003.** The gluconeogenic enzyme phosphoenolpyruvate carboxykinase in *Arabidopsis* is essential for seedling establishment. *Plant Physiology*, April, 131:1834-1842.
- **Sadka A, Dahan E, Cohen L, Marsh KB. 2000.** Aconitase activity and expression during the development of lemon fruit. *Physiologia Plantarum* 108:255-262.
- **Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T. 1989.** *Molecular cloning: A laboratory manual*. Col Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- **Sammarcelli-Olliraut F y Legave JM. 1991** *In vitro* irradiation of the cultivar Haywar. *Acta Hort.* 297:115-122.
- **Sánchez Arsenio Celorrio. 2003.** Pruebas de hipótesis no paramétricas de Kolmogorov-Smirnov para una y dos muestras. www.revistaciencias.com Código ISPN de la Publicación: EpyAVkuZVkBkoEjEU.

- **Saradhuldhat Parson, Paull Robert E. 2007.** Pineapple organic acid metabolism and accumulation during fruit development. *Scientia Horticulturae* 112: 297-303.
- **Schubert I y Wobus U. 1985.** In situ hybridization confirms jumping nucleolus organizing regions in *Allium*. *Chromosoma* 92: 143-148.
- **Seo EuJu, Jun KyungRan, Yoo HanWook, Yoo H.K., Lee JinOk. 2010.** Identification of a novel deletion region in 3q29 microdeletion síndrome by oligonucleotide *array* comparative genomic hybridization.
- **Shenton Matt, Fontaine Veronique, Hartwell James, Marsh Justin T, Jenkins Gareth I, Nimmo Hugh G. 2006.** Distinct patterns of control and expresión amongst members of the PEP carboxylase kinase gene family in C4 plants. *The Plant Journal* 48:45-53.
- **Shimada T, Nakano R, Shulaev V, Sadka A, Blumwald E. 2006.** Vacuolar citrate/H⁺ symporter of citrus juice cells. *Planta* Jul; 224: 472-280.
- **Skopelitis D, Paranychianakis N, Paschalidis K, Pliakonis E, Delis I, Yakoumakis D, Kouvarakis A, Papadakis A, Stephanou E, Roubelakis-Angelakis K. 2006.** Abiotic stress generates ROS that signal expression of anionic glutamate dehydrogenase to form glutamate for proline synthesis in tobacco and grapevine. *The plant cell*, 18: 2767-2781.
- **Smith GK. 2005.** Limma: Linear models for microarray data. In: Gentleman R, Carey V, Huber W, Irizarry R, Duboit S (eds). *Bioinformatics and computational biology solutions using R and bioconductor*. Springer, Berlin: 397-420.

- **Sneath PHA y Sokal RR. 1973.** Numerical Taxonomy. Freeman, San Francisco.
- **Snedden WA y Fromm H. 1999.** In Plant Responses to Environmental Stresses: From Phytohormones to Genome Reorganization, ed. Lerner, H., R. Dekker, New Cork: 549-574.
- **Soler Aznar J. 1999.** Reconocimiento de variedades de cítricos en campo. Serie de Divulgación científica. Consejería de Agricultura Pesca y Alimentación. Dirección general de investigación, desarrollo tecnológico y sanidad vegetal.
- **Soler Fayos G. 2009.** Cambios en la expresión génica asociados a la maduración interna del fruto de los cítricos: identificación de rutas metabólicas implicadas en la acumulación y eliminación de ácidos. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. Departamento de producción vegetal, Valencia 2009.
- **Soule J and W Grierson. 1986.** Maturity and grade standards. In: Fresh Citrus Fruits. W.F. Wardowski, S. Nagy, and W. Grierson (eds) AVI Pub. Co., CT: 23-48.
- **Suzuki S, Murai N, Burnell JN, Arai M. 2000.** Changes in photosynthetic carbon flow in transgenic rice plants that express C4-type phosphoenolpyruvate carboxykinase from *Urochloa panicoides*. Plant Physiol. Sep, 124:163-72.
- **Swingle WT. 1967.** The Botán of *Citrus* and its wild relatives. En: The *Citrus* Industry, vol I, W.Reuther, L.D. Batchelor y H.J. Webber (eds.), Univ. Calif., Div. Agr.Sci., California, EE.UU.
- **Tadeo FR, Moya JL, Iglesias DJ, Talón M, Primo-Millo E. 2003.** Histología y citología de cítricos. Serie de divulgación técnica. Generalitat Valenciana. Conselleria de Agricultura Pesca y Alimentación.

- **Talon M y Gmitter Fred G. 2008.** Citrus Genomics. International Journal of Plant Genomics. Volume 2008. Article ID 528361.
- **Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S. 2007.** MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution 24:1596-1599.
- **Tamura K, Nei M and Kumar S. 2004.** Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA) 101:11030-11035.
- **Terol J, Conesa A, Colmenero JM, Cercos M, Tadeo F, Agusti J, Alos E, Andres F, Soler G, Brumos J, Iglesias DJ, Gotz S, Legaz F, Argout X, Courtois B, Ollitré P, Dossat C, Wincker P, Morillon R, Talon M. 2007.** Analysis of 13000 unique Citrus clusters associated with fruit quality, production and salinity tolerance. BMC Genomics. Jan 25, 8:31.
- **Terrier N, Romieu C. 2001.** Grape berry acidity. In: Roubelakis-Angelakis KA. Ed. Molecular biology and biotechnology of the grapevine. Dordrecht: Kluwer, 35-57.
- **Tewari JC, Dixit V, Cho BK, Malik KA. 2008.** Determination of origin and sugars of citrus fruits using genetic algorithm, correspondence analysis and partial least square combined with fiber optic NIR spectroscopy. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc. Dec 1;71:1119-27.
- **Tomlekova N, Todorova V, Petkova V, Yancheva S, Nikolova V, Panchev I, Penchev E. 2009.** Creation and evaluation of induced mutants and valuable tools for pepper breeding programmes. Q.Y.Shu (ed), Induced plant mutations in the

genomics era. Food and agricultura organization of the united nations, Rome: 187-190.

- **Tuskan GA, DiFazio S, y cols 2006.** The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr & Gray). Science, 313:1596-1604.
- **Ulrich 1971.** Organic acids. In: Hulme AC, ed. The biochemistry of fruits and their products, Vol. 1. London, New York: Academic Press: 89-118.
- **Utter MF y Kolenbrander HM. 1972.**The Enzymes, 3rd Ed. Vo. 6,P.Boyer, Academic Press, NY, 117.
- **Valera A, Pujol A, Pelegrin M, Bosch F. 1994.** Transgenic mice overexpressing phosphoenolpyruvate carboxykinase in cotyledons of *Cucurbita pepo* L. Planta 196:653-658.
- **Vidal J y Chollet R. 1997.** Regulatory phosphorylation of C4 PEP carboxylase. Trend Plant Sci.2,230-237.
- **Walker RP, Chen ZH, Técsi LI, Famiani F, Lea PJ, Leegood RC. 1999.** Planta 210: 9-18.
- **Walker RP, Chen ZH. 2002.** Phosphoenolpyruvate carboxykinase: structure, function and regulation. Advances in Botanical Research 38: 93-189.
- **Walther F y Sauer A. 1985.** Analysis of radiosensitivity: a basic requirement for in vitro somatic mutagenesis. I. Prunus avium L. Acta Hort. 169:97-104.
- **Watanabe M, Ohnishi J, Kanai R. 1984.** Intracellular localization of Phosphoenolpyruvate Carboxykinase in Bundle Sheath Cells of C4 Plants. Plant Cell Physiol 25:69-76.
- **Wingler A, Walker RP, Chen ZH, Leegood RC. 1999.** Phosphoenolpyruvate carboxykinase is involved in the

decarboxylation of aspartate in the bundle sheath of maize. *Plant Physiol.* Jun;120:539-46.

- **Yan Feng, Timothy J Mitchison, Andreas Bender, Daniel W, Young A Tallarico. 2009.** Multi-parameter phenotypic profiling: using cellular effects to characterize small-molecule compounds. *Nature reviews Drug Discovery* 8: 567-578.
- **Yang YH, Dudoit S, Luu P, Lin DM, Peng V, Ngai J, Speed TP. 2002.** Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Research*, 30:15.
- **Yang, YH., y Thorne, NP. 2003.** Normalization for two-color cDNA microarray data. In: D. R. Goldstein (ed.), *Science and Statistics: A Festschrift for Terry Speed*, IMS Lecture Notes - Monograph Series, 40: 403-418.
- **Yao YuXin, Li Ming, Liu Zhi, You ChunXiang, Wang DongMei, Zhai Heng, Hao YuJin. 2009.** Molecular cloning of three malic acid related genes MdPEPC, MdVHA-A, MdcyME and their expression analysis in apple fruits. *Scientia Horticulturae*, 122: 404-408.
- **Yao LH, Jiang YM, Shi J, Tomas-Barberan FA, Datta N, Singanusong R, Chen SS. 2004.** Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Foods Hum Nutr.* 59: 113–122.
- **Yathaputanon C, Kumsueb B, Malipan A, Srisombun S, Bunyarut J. 2009.** Protein content in high-protein soybean mutants in Thailand. Q.Y.Shu (ed), *Induced plant mutations in the genomics era*. Food and agriculture organization of the united nations, Rome: 195-196.

- **Yost HT, Cummings J, Blakeslee AF. 1954.** The effects of fast-neutron radiation from a nuclear detonation on chromosome aberration in datura. Proc Natl Acad Sci USA. Jun:40:447-51.
- **Zaragoza S. 1993.** Pasado y presente de la citricultura española. Generalitat Valenciana, Conselleria d'Agricultura, Pesca i Alimentació. Serie de divulgación técnica N°8. Valencia.
- **Zhang WC, Shao ZY, Lo JH, Deng CH, Deng SS, Wang F. 1988.** Investigation and utilization of citrus varietal resources in China. In: Proc. 6th Int. Citrus Cong., 1: 291-4.
- **Ziliotto F, Begheldo M, Rasori A, Bonghi C, Ramina A, Tonutti P. 2005.** Molecular and genetic aspects of ripening and qualitative traits in peach and nectarine fruits. Journal article; Conference paper Acta Horticulturae: 237-245.
- **Zwick Michael S, Hanson Robert E, McKnight Thomas D, Islam-Faridi Hurul M, Stella David M, Wing A, Price James H. 1997.** A rapid procedure for the isolation of C0t-1 DNA from plants. Genome 40: 138-142.