

---

# Índice

---



## ÍNDICE

<b>Resúmenes</b> .....	IX
<b>Resumen</b> .....	XI
<b>Resum</b> .....	XIII
<b>Abstract</b> .....	XV
<b>I. <u>Introducción general</u></b> .....	1
<b>I.1. <u>Los cítricos</u></b> .....	3
I.1.1. Origen y expansión.....	3
I.1.2. Clasificación botánica .....	3
I.1.3. Importancia económica. ....	4
<b>I.2. <u>Los frutos cítricos</u></b> .....	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
<b>II. <u>Objetivos</u></b> .....	17
<b>III. <u>Selección y descripción de cinco nuevos genotipos de Clementina con alteraciones en la maduración interna</u></b> ....	21
<b>III.1. <u>Introducción</u></b> .....	23
<b>III.2. <u>Metodología</u></b> .....	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
<b>III.3. <u>Resultados y discusión</u></b> .....	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
<b>III.4. Conclusiones.....</b>	<b>79</b>

<b>IV. <u>Análisis de los cambios en el transcriptoma de cinco nuevos genotipos de Clementina durante la maduración interna del fruto</u> .....</b>	<b>81</b>
<b>IV.1. <u>Introducción</u> .....</b>	<b>83</b>
<b>IV.2. <u>Metodología</u>.....</b>	<b>85</b>
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
<b>IV.3. <u>Resultados y discusión</u>.....</b>	<b>95</b>
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
<b>IV.4. Conclusiones</b> .....	151

<b>V. <u>Mapeo de deleciones del genotipo Z46 en el genoma de Clementina mediante CGH y FISH</u></b> .....	153
<b>V.1. <u>Introducción</u></b> .....	155
<b>V.2. <u>Metodología</u></b> .....	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
<b>V.3. Resultados y discusión.</b> .....	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
<b>V.4. Conclusiones.</b> .....	175
<b>VI. <u>Identificación y expresión del gen fosfoenolpiruvato carboxiquinasa y su implicación en el metabolismo de los ácidos del fruto.</u></b> .....	177
<b>VI.1. <u>Introducción</u></b> .....	179
<b>VI.2. <u>Metodología</u></b> .....	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
<b>VI.3. Resultados y discusión</b> .....	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
<b>VI.4. <u>Conclusiones</u></b> .....	260
<b>VII. <u>Conclusiones generales.</u></b> .....	261
<b>VIII. <u>Referencias bibliográficas.</u></b> .....	267
<b>IX. <u>Anexos y tablas suplementarias.</u></b> .....	(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.