

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

Departamento de Producción Vegetal



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

Guillermo Soler Fayos

Valencia, 2009

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

Departamento de Producción Vegetal

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.

MEMORIA PRESENTADA POR:

Guillermo Soler Fayos

Para optar al grado de

DOCTOR INGENIERO AGRÓNOMO

DIRECTORES:

Dr. Manuel Talón Cubillo

Dr. Manuel Cercós Sánchez

Valencia, 2009



INSTITUTO VALENCIANO DE INVESTIGACIONES AGRARIAS

Apartado Oficial 46113 Moncada (Valencia)

D. Manuel Talón Cubillo, Doctor en Ciencias Biológicas, Profesor de Investigación del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) y D. Manuel Cercós Sánchez, Doctor en Ciencias Biológicas, Colaborador Científico Adjunto del IVIA,

INFORMAN que:

D. Guillermo Soler Fayos, Ingeniero Agrónomo, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo que, con el título “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”, presenta para optar al grado de Doctor Ingeniero Agrónomo.

Para que así conste a los efectos oportunos, firman el presente documento en Moncada a 1 de junio de 2009.

Fdo. Dr. Manuel Talón Cubillo

Dr. Manuel Cercós Sánchez

A mi mujer Beatriz y a mi hija Claudia

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría expresar mi agradecimiento a mis directores de tesis, Dr. Manuel Talón y Dr. Manuel Cercós, por su inestimable ayuda a lo largo de estos intensos años de trabajo y por supuesto, al IVIA por su financiación y por permitirme trabajar en sus instalaciones.

También me gustaría agradecerle al Dr. Luis Navarro por la colaboración prestada al poner a mi disposición material vegetal único para realización de nuestros estudios.

Al Dr. Domingo Iglesias por su valiosa ayuda con las técnicas analíticas de espectrofotometría de masas y cromatografía iónica de adsorción.

Además, quiero agradecer la disponibilidad de todas las personas que han compartido sus conocimientos conmigo durante el desarrollo de esta tesis: Rafael Bono, Francisco R. Tadeo, Javier Terol, Miguel Angel Naranjo, Concha Domingo, Carlos Romero, Salvador Zaragoza, Aurelio Buj, Alejandro Medina, Ignacio Trenor, Angel Boix y Batiste Alberola.

Quiero agradecer de una forma especial el apoyo que me han brindado en todo momento Pepita Giner, M^a Ángeles Forner y Juan B. Forner, que para mi son como mi segunda familia.

A Isabel Sanchís, Elena Blazquez, Matilde Sancho, Ana Almenar, Isabel López, Fernando Martínez y Patricia Botella-Pavía su excepcional ayuda en el laboratorio.

Y por su pueto a mis grandes compañeros y mejores amigos, Enri Alos, Javier Agustí, Fernando Andrés y Javi Brumos.

Finalmente, por su apoyo, paciencia, dedicación y amor, les dedico mi mayor agradecimiento a mis padres, Juan y Amparo; mi mujer, Beatriz; mi hija, Claudia y mi hermano, Juan.

ABREVIATURAS

| | |
|-----------------|--|
| 3-PGA | 3-fosfoglicerato |
| Aco | aconitasa |
| ATP | adenosina trifosfato |
| cDNA | DNA complementario |
| CFGP | Proyecto de Genómica Funcional de Cítricos (Citrus Functional Genomics Project) |
| DDA | días después de antesis |
| DEPC | dietilpirocarbonato |
| dNTPs | desoxinucleótidos trifosfato |
| E.S | error estándar |
| ESTs | marcador de secuencia expresada (expressed sequence tags) |
| GC/MS/MS | cromatografía de gases unida a espectrofotometría de masas (gas chromatography tandem mass spectrometry) |
| HPLC | cromatografía líquida de alta eficacia (high performance liquid chromatography) |
| MIPS | Centro de Información de Munich para Secuencias de Proteínas (Munich Information Center for Protein Sequences) |
| mRNA | RNA mensajero |
| pb | pares de bases |
| PCR | reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction) |
| RNA | ácido desoxi-ribonucleico |
| rRNA | RNA ribosómico |
| RT-PCR | retrotranscripción de la reacción en cadena de la polimerasa (retrotranscription-polymerase chain reaction) |
| SDS | dodecil sulfato sódico |
| SOTA | Algoritmo de Autoorganización en Árbol (Self Organising Tree Algorithm) |
| SSC | Na ₃ Citrato 0.15 M pH 7, NaCl 1.5 M |
| Tris | 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol |
| UDP | uridina difosfato |
| UTP | uridina trifosfato |
| UV | ultravioleta |

Parte de los resultados presentados en los capítulos III y IV han sido publicados en el artículo: Global analysis of gene expression during development and ripening of citrus fruit flesh. A proposed mechanism for citric acid utilization. *Plant Mol. Biol.* 62: 513-27 (2006).

Índice

| | |
|---|-----------|
| I. Introducción general | 1 |
| 1.1. Los frutos | 3 |
| 1.1.1. Definición de fruto..... | 3 |
| 1.1.2. La maduración de los frutos..... | 3 |
| 1.2. Los frutos cítricos..... | 5 |
| 1.2.1. Morfología | 5 |
| 1.2.2. Maduración | 6 |
| 1.3. Metabolismo de los ácidos..... | 7 |
| 1.3.1. Respiración | 7 |
| 1.3.2. Degradación del almidón y la sacarosa, y la glicólisis..... | 7 |
| 1.3.3. Síntesis de ácido cítrico | 10 |
| 1.3.4. Derivación del gamma aminobutarato (GABA)..... | 13 |
| 1.4. Calidad interna de los frutos cítricos | 15 |
| 1.5. Producción mundial de cítricos. Relevancia de España | 15 |
| | |
| II. Objetivos | 17 |
| | |
| III. Análisis global de la expresión génica durante el desarrollo y la maduración interna de los frutos de Clementina de Nules (<i>Citrus Clementina</i>)..... | 21 |
| 3.1. Introducción | 23 |
| 3.2. Materiales y métodos..... | 25 |
| 3.2.1. Material vegetal..... | 25 |
| 3.2.2. Cuantificación del contenido en agua y de los metabolitos seleccionados | 26 |
| 3.2.2.1. Contenido en agua..... | 26 |
| 3.2.2.2. Carbohidratos solubles | 26 |
| 3.2.2.3. Clorofilas y carotenoides | 26 |
| 3.2.2.4. Ácido ascórbico..... | 27 |
| 3.2.3. Hibridación de micromatrices de cDNA | 28 |
| 3.2.3.1. Marcaje de las muestras | 28 |
| 3.2.3.2. Hibridación y lavado | 29 |
| 3.2.3.3. Adquisición y análisis de datos..... | 30 |
| 3.3. Resultados y discusión..... | 31 |

| | |
|---|-----------|
| 3.3.1. Identificación y clasificación funcional de genes involucrados en el desarrollo y la maduración de la pulpa de los frutos cítricos..... | 31 |
| 3.3.2. Factores de transcripción y otras proteínas reguladoras | 35 |
| 3.3.3. Regulación metabólica | 38 |
| 3.3.3.1. Descripción general..... | 38 |
| 3.3.3.2. Expansión celular en la fase II..... | 40 |
| 3.3.3.3. Acumulación de agua: genes de acuaporinas | 41 |
| 3.3.3.4. Metabolismo de los carbohidratos | 43 |
| 3.3.3.5. Metabolismo secundario. Sustitución de pigmentos..... | 45 |
| 3.3.3.6. Reducción de los niveles de vitamina C | 47 |
| 3.3.3.7. Reducción de lípidos | 48 |
| IV. Degradación del ácido cítrico durante la maduración | 51 |
| 4.1. Introducción | 53 |
| 4.2. Materiales y métodos..... | 54 |
| 4.2.1. Material vegetal..... | 54 |
| 4.2.2. Cuantificación de los sólidos solubles totales | 55 |
| 4.2.3. Análisis de ácidos..... | 55 |
| 4.2.3.1. Determinación de la acidez total..... | 55 |
| 4.2.3.2. Cuantificación del ácido cítrico mediante cromatografía iónica de adsorción..... | 55 |
| 4.2.4. Cuantificación de gamma aminobutarato (GABA) y glutamato mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas..... | 55 |
| 4.2.5. Análisis Northern blot | 56 |
| 4.2.6. Cuantificación de RNAs mensajeros por RT-PCR en tiempo real..... | 56 |
| 4.2.7. Análisis de la expresión génica global mediante la hibridación de micromatrices de cDNA de cítricos (7K)..... | 58 |
| 4.2.8. Identificación de los genes de aconitasa de cítricos..... | 58 |
| 4.3. Resultados y discusión..... | 59 |
| 4.3.1. Expresión de genes asociados al metabolismo del ácido cítrico..... | 59 |
| 4.3.2. Expresión y caracterización de los genes de la aconitasa | 67 |
| 4.3.2.1. Determinación de ácidos en las variedades Clementina de Nules y Fortune | 68 |

| | |
|---|------------|
| 4.3.2.2. Inducción de la expresión de la aconitasa durante el desarrollo y la maduración del fruto..... | 70 |
| 4.3.2.3. Identificación de la familia génica de la aconitasa de cítricos..... | 71 |
| 4.3.2.4. Perfiles de expresión de los genes Aco-1, Aco-2 y Aco-3 en Clementina de Nules y Fortune | 76 |
| V. Acumulación del ácido cítrico durante el desarrollo del fruto | 79 |
| 5.1. Introducción | 81 |
| 5.2. Materiales y métodos..... | 82 |
| 5.2.1. Material vegetal..... | 82 |
| 5.2.2. Tratamientos con ácido arsánico | 83 |
| 5.2.3. Cuantificación de ácidos y sólidos solubles totales..... | 83 |
| 5.2.4. Análisis de los ácidos cítrico, málico e isocítrico mediante cromatografía iónica de adsorción | 83 |
| 5.2.5. Obtención de un clon de cDNA de la enzima citrato sintasa de clementina | 84 |
| 5.2.6. Hibridación de micromatrices de cDNA de cítricos (7K) | 84 |
| 5.2.7. Cuantificación de RNAs mensajeros por RT-PCR en tiempo real..... | 85 |
| 5.3. Resultados y discusión..... | 85 |
| 5.3.1. Efecto del tratamiento con ácido arsánico sobre la concentración de ácidos..... | 85 |
| 5.3.2. Expresión de los genes de las principales enzimas implicadas en el metabolismo de los ácidos | 88 |
| 5.3.3. Cambios de expresión génica inducida por ácido arsánico..... | 95 |
| 5.3.4. Comparación de la expresión génica en el endocarpio de las variedades Fortune y Clementina de Nules..... | 100 |
| VI. Discusión general | 105 |
| VII. Conclusiones | 117 |
| VIII. Bibliografía..... | 121 |
| IX. Anexos y tablas suplementarias..... | CD |

I. Introducción general

1.1. Los frutos

1.1.1. Definición de fruto

Los frutos pueden ser definidos como ovarios maduros constituidos por tejidos carpelares y, en algunos casos, tejidos florales extracarpelares. La función biológica de los frutos es la de proteger a las semillas durante su desarrollo y facilitar posteriormente su dispersión, asegurando de este modo la reproducción de las plantas (Giovannoni, 2004).

Dentro de los frutos se pueden distinguir dos tipos, los frutos dehiscentes, como por ejemplo, las legumbres o las silicuas (la dehiscencia es el mecanismo mediante el cual el fruto se abre permitiendo la liberación y dispersión de las semillas, revisado en Ferrándiz, 2002) y los frutos indehiscentes o carnosos (por ejemplo, la manzana, el tomate o los cítricos), que no tienen este mecanismo y han ido evolucionado y adquiriendo diversas formas, colores, sabores y aromas con el fin de resultar atractivos a los animales que se encargan de digerirlos y dispersar las semillas (Giovannoni, 2004).

Una particularidad importante del desarrollo de algunos frutos, como por ejemplo los cítricos, es la partenocarpia que consiste en la capacidad de desarrollarse sin la necesidad de producir semillas que, generalmente, son las responsables de producir los estímulos necesarios a partir de los cuales se produce el desarrollo del fruto (Agustí, 2000). Esta capacidad de los frutos partenocárpicos de desarrollarse sin el concurso de las semillas puede ser debida a alteraciones genéticas u hormonales por las que se mimetizan los estímulos producidos por las semillas o, en otros casos, por la presencia de pequeñas semillas con embriones abortados que presentan la capacidad suficiente de producir los estímulos necesarios o por la producción de dichos estímulos por la pared del ovario (Mazzucato, 1998).

1.1.2. La maduración de los frutos

En general, la maduración puede definirse como la fase final del desarrollo de los frutos, tras la cual se dispersan las semillas. En los frutos dehiscentes, este proceso comprende la senescencia del tejido carpelar y la separación de las valvas por una zona de abscisión denominada zona de dehiscencia que se forma entre las valvas y el replum (revisado en Ferrándiz, 2002).

En el caso de los frutos carnosos o indehiscentes, la maduración implica cambios bioquímicos, fisiológicos y estructurales que modifican la apariencia, textura, sabor y aromas. Estos cambios hacen que los frutos maduros sean atractivos para los animales que se

encargan de dispersar las semillas (Giovannoni, 2004). Los frutos indehiscentes pueden ser clasificados respecto al tipo de maduración en climatéricos si durante la maduración presentan un pico en la biosíntesis de etileno y un incremento de la respiración (como por ejemplo el tomate, la manzana o el plátano), o no climatéricos si estos fenómenos no se producen (como por ejemplo, los cítricos, la uva o la fresa, Giovannoni, 2004).

La maduración de los frutos climatéricos va acompañada de una serie de cambios rápidos en su composición química, como la hidrólisis de polisacáridos, hidrólisis de la pared celular, aumento de la permeabilidad de las membranas celulares, cambios en ácidos orgánicos, aumento de aroma, cambios en la pigmentación, etc. Estos cambios también se producen de forma gradual en los frutos no climatéricos, aunque no van acompañados por aumentos respiratorios o de la producción de etileno (Agustí, 2003).

La maduración de los frutos climatéricos ha sido estudiada con profundidad, usando el tomate como planta modelo (Giovannoni, 2004). Sin embargo, los mecanismos de maduración de los frutos no climatéricos (entre los que se incluyen los cítricos) son todavía prácticamente desconocidos, si bien en fresas (frutos no climatéricos) se ha observado que algunos factores de transcripción de la familia de los MADS-box se expresan durante la maduración (White, 2002).

En los frutos no climatéricos se ha observado que a pesar de no presentar el pico de respiración si que responden a las aplicaciones exógenas de etileno induciéndose mRNAs específicos y la pigmentación de la corteza de las naranjas (Alonso, *et al.*, 1995).

El hecho de que cada tipo de fruto presente programas específicos de desarrollo y maduración hace necesario el estudio de estos procesos en las distintas especies. El estudio del desarrollo y maduración de los frutos cítricos resulta de gran interés económico, ya que los cítricos son uno de los principales cultivos frutales del mundo. Además, la posible existencia de mecanismos específicos debidos a genes exclusivos de este género (Forment *et al.*, 2005) tiene un notable interés científico.

Finalmente, resulta interesante destacar que la maduración aporta un gran número de cualidades y características nutricionales que suponen un componente significativo de la dieta humana. Por lo tanto, parece lógico pensar que la comprensión de los puntos clave del control de la regulación de la maduración o de procesos específicos de la maduración como los carotenoides, los flavonoides o los ácidos orgánicos entre otros, nos permitirán manipular características nutricionales o de calidad asociadas con la maduración (Giovannoni, 2004).

1.2. Los frutos cítricos

1.2.1. Morfología

Los frutos cítricos son un tipo especial de baya denominada hesperidio, consistente en un número variable de carpelos unidos radialmente. Filogenéticamente, los carpelos se consideran hojas modificadas orientadas verticalmente con sus márgenes curvados y unidos en un haz central, formando lóculos (segmentos) dentro de los cuales se forman las semillas y las vesículas del zumo.

En los frutos cítricos se pueden distinguir dos partes: el pericarpo o piel y el endocarpo o pulpa, que es la parte comestible del fruto. Dentro del endocarpo se encuentran las vesículas de zumo, que se forman a partir de unas protuberancias redondeadas que aparecen en las membranas de los lóculos debido a la presencia de una masa de tejido meristemático. Las vesículas de zumo adultas son estructuras multicelulares de forma alargada que se orientan hacia el haz central desde la periferia del segmento, al que se unen mediante un pequeño tallo o pedúnculo filiforme (Spiegel-Roy y Goldschmidt, 1996; Tadeo *et al.*, 2003).

El pericarpo, a su vez, comprende el exocarpo o flavedo formado por células parenquimáticas densamente empaquetadas con una fina cutícula en su parte más externa y el mesocarpo o albedo formado también por células parenquimáticas pero débilmente empaquetadas dejando grandes espacios intercelulares que proporcionan a este tejido su apariencia esponjosa característica (Tadeo *et al.*, 2003; **Figura 1.1**).

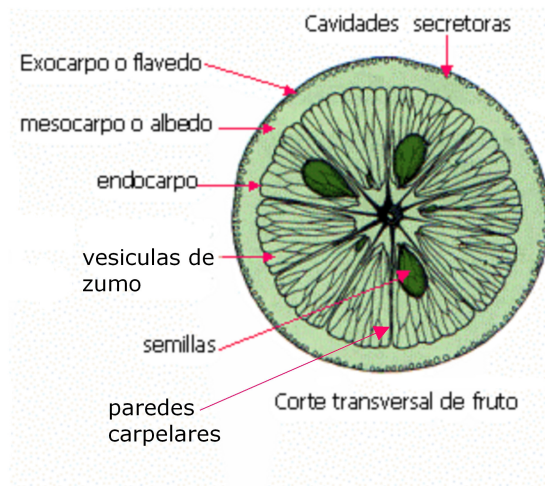


Figura 1.1. Morfología de un hesperidio. Dibujo del corte transversal de un fruto maduro de cítricos. (Fuente: www.biologia.edu.ar/botanica/tema24/24-6fruto.htm)

1.2.2. Maduración

Bain (1958) estudió el crecimiento de la naranja Valencia (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck), dividiendo su desarrollo en tres fases: la fase I de división celular, que incluye la floración y la formación de los diferentes tejidos que darán lugar al fruto; la fase II que se caracteriza por la elongación de las células del fruto; y la fase III, periodo en el cual la tasa de elongación de las células es muy reducido y en el que se producen la mayoría de los cambios internos (principalmente reducción de la acidez y acumulación de azúcares en la pulpa) y externos (fundamentalmente el cambio de color del flavedo) que conforman la maduración de los frutos (**Figura 1.2**).

Los frutos cítricos presentan una alta concentración de ácidos antes de la maduración. El ácido cítrico es el más abundante en la pulpa de la mayoría de los cítricos, seguido por el ácido málico (Sinclair *et al.*, 1945; Clements, 1964). Estos ácidos se sintetizan en el fruto y no son transportados desde las hojas como demostró Koch (1984) al injertar frutos de variedades más ácidas en ramas de variedades menos ácidas y viceversa y comprobar que la acidez de los frutos no variaba. Sinclair y Ramsey (1944) observaron que las naranjas presentan una rápida acumulación de ácido cítrico en los frutos jóvenes, con un máximo alrededor de 100 días después de la polinización. La concentración de ácido cítrico se reduce después notablemente durante las fases II y III del desarrollo del fruto (Bain, 1958). El hecho de que el máximo de acidez se produzca cuando el volumen del fruto es el 50% del volumen final (Erickson, 1968) sugiere que la reducción de la acidez no se debe únicamente a la dilución producida por la acumulación de agua durante la expansión del fruto.

La acumulación de ácidos en los frutos cítricos no es homogénea dentro del árbol, de manera que se produce una mayor acumulación de ácidos en los frutos con orientaciones sureste y suroeste, siendo en el interior de la copa donde los frutos acumulan menos ácidos. Así mismo, se ha observado que la concentración de ácidos es mayor en la parte central del fruto que en las zonas periféricas (Sites y Reitz, 1950). La climatología también afecta a la acumulación de ácidos, pudiéndose destacar que en las zonas áridas y con poca pluviometría se produce una mayor acumulación de ácidos en los frutos que en las zonas húmedas (Erickson, 1968).

Los ácidos son sintetizados en la mitocondria de las células de las vesículas del zumo, acumulándose posteriormente en las vacuolas de estas mismas células tan pronto como aumenta la concentración de ácido en el citosol (Sinclair, 1984; Echeverría y Valich, 1988; Gout, 1993). Probablemente el flujo de ácido cítrico a través del tonoplasto se produce

mediante la difusión de la forma protonada, tal y como ocurre con el ácido málico (Lüttge y Smith, 1984) y su acumulación en la vacuola está determinada por su concentración en el citosol, que se a su vez se debe al balance entre la síntesis y la degradación (Lobit *et al.*, 2003).



Figura 1.2. Frutos, enteros y seccionados, de mandarina de la variedad Clementina de Nules (*Citrus clementina* Hort. ex Tan.) durante las tres fases del desarrollo.

1.3. Metabolismo de los ácidos

1.3.1. Respiración

La respiración permite la síntesis de ácidos a partir de carbohidratos. Las vías metabólicas de la respiración pueden dividirse en cuatro etapas: en la primera se produce la degradación de almidón y sacarosa, para formar fructosa 1,6-bifosfato. En una segunda etapa, la fructosa 1,6-bifosfato se oxida hasta piruvato a través de la vía glicolítica. En una tercera etapa, el piruvato entra en la mitocondria donde se oxida a CO₂, produciéndose la mayor parte del NADH. En esta etapa se produce la síntesis de ácido cítrico. En la cuarta etapa, el NADH es finalmente oxidado por la cadena de transporte electrónico mitocondrial para producir ATP (Ribas-Carbó y González-Meler, 2000; Dennis y Blakeley, 2000).

1.3.2. Degradación de almidón y sacarosa y glicolisis.

El almidón es el carbohidrato de reserva más importante de las plantas. Las enzimas principales encargadas de la degradación del almidón son: α -amilasa, β -amilasa y almidón fosforilasa, que degradan el almidón hasta glucosa o glucosa 1-fosfato.

La sacarosa, compuesta por una molécula de glucosa y una de fructosa, es el producto fotosintético más utilizado para el transporte de carbohidratos a través de la planta y puede ser degradada a glucosa y fructosa mediante la invertasa o UDP-glucosa y fructosa, en el

citosol por medio de la sacarosa sintasa (E.C. 2.4.1.13). Aunque la reacción catalizada por la sacarosa sintasa es reversible se han encontrado concentraciones más altas de esta enzima en tejidos donde se degrada sacarosa que en tejidos donde se sintetiza (Ribas-Carbó y González-Meler, 2000; Dennis y Blakeley, 2000).

Mediante la glicólisis se oxidan las hexosas procedentes de la hidrólisis de la sacarosa para generar ATP y piruvato, aunque esta ruta también puede funcionar al revés generando hexosas a partir de compuestos de bajo peso molecular en un proceso dependiente de energía llamado gluconeogénesis.

Las hexosas son fosforiladas por la hexoquinasa (E.C. 2.7.1.1) y la fructoquinasa (E.C. 2.7.1.4) para ser posteriormente catabolizadas en la glicólisis (**Figura 1.3**). Estas enzimas formarán glucosa 6-fosfato y fructosa 6-fosfato, respectivamente.

La glucosa 6-fosfato se transforma en fructosa 6-fosfato mediante la enzima glucosa 6-fosfato isomerasa (E.C. 5.3.1.9) que cataliza reversiblemente esta reacción. La fructosa 6-fosfato se fosforila a fructosa 1,6-bifosfato por la acción de dos enzimas diferentes: la fosfofructoquinasa (PFK; E.C. 2.4.1.11), enzima que se inhibe en presencia de fosfoenolpiruvato y que cataliza la reacción de manera irreversible y la fosfofructofosfotransferasa (PFP; E.C. 2.4.1.90) cuya acción es reversible (Ribas-Carbó y González-Meler, 2000; Dennis y Blakeley, 2000).

La fructosa 1,6-bifosfato aldolasa (E.C. 4.1.2.13) rompe la fructosa 1,6-bifosfato en dos triosas-fosfato: la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y el gliceraldehído 3-fosfato (GAP), que pueden interconvertirse mediante la triosa-fosfato isomerasa (E.C. 5.3.1.1).

El gliceraldehído 3-fosfato es posteriormente oxidado a glicerato 1,3-bifosfato mediante la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (E.C. 1.2.1.12). El glicerato 1,3-bifosfato pierde un grupo fosfato convirtiéndose en 3-fosfoglicerato (3-PGA) en una reacción reversible catalizada por la 3-fosfoglicerato quinasa (E.C. 2.7.2.3). La fosfoglicerato mutasa (E.C. 5.4.2.1) transforma el 3-fosfoglicerato en 2-fosfoglicerato, el cual se convierte en fosfoenolpiruvato (PEP) por una reacción reversible catalizada por la enolasa (E.C. 4.2.1.11) (Ribas-Carbó y González-Meler, 2000; Dennis y Blakeley, 2000). El fosfoenolpiruvato también puede ser sintetizado mediante la descarboxilación del malato via oxalacetato por acción de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (E.C. 4.1.1.49) (Blanke *et al.*, 1988; Ruffner y Kliewer, 1975). En la reacción de fosforilación catalizada por la enzima piruvato quinasa (E.C. 2.7.1.40) el fosfoenolpiruvato se convierte en piruvato. También se puede convertir el fosfoenolpiruvato en oxalacetato por la acción de la fosfoenolpiruvato carboxilasa (E.C. 4.1.1.31) (**Figura 1.3**).

La enzima malato deshidrogenasa citosólica (E.C. 1.1.1.37) reduce el oxalacetato produciendo malato. Además la enzima málica dependiente de NADP^+ (E.C. 1.1.1.40) ubicada en el citosol cataliza la reacción reversible del malato a piruvato (Wheeler *et al.*, 2008).

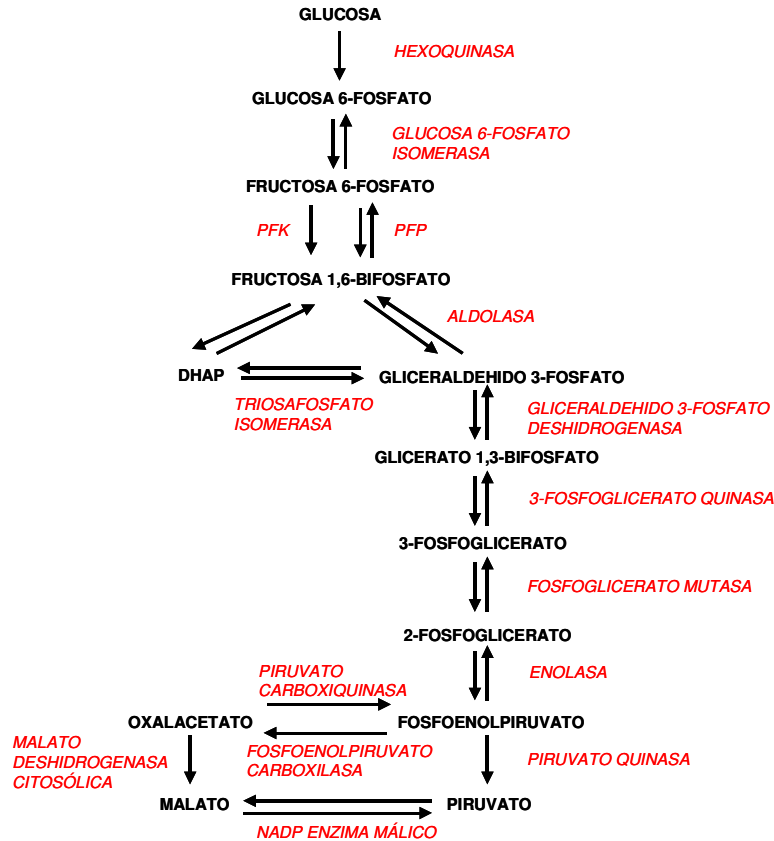


Figura 1.3. Esquema de la ruta de la glicolisis en plantas.

Estudios realizados por Chollet, et al. (1996) y Plaxton (1996) indican que la ruta utilizada por la fosfoenolpiruvato carboxilasa (E.C. 4.1.1.31), la malato deshidrogenasa citosólica (E.C. 1.1.1.37) y la enzima málica dependiente de NADP (E.C. 1.1.1.40) para sintetizar piruvato sin el concurso de la piruvato quinasa (E.C. 2.7.1.40) juega un papel importante en el aporte de intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbóxicos en tejidos no fotosintéticos de plantas C_4 y en raíces de *Pisum sativum* cuando hay escasez de P_i .

Uno de los puntos clave para conocer la regulación metabólica pasa por conocer los enzimas decisivos de la glicolisis, lo cual resulta bastante complicado debido a la existencia de reacciones alternativas, sin embargo algunos estudios demuestran que el control de la glicolisis es ejercido principalmente por las enzimas que catalizan las reacciones implicadas

en la conversión de las hexosas en hexosas fosfato, fructosa 6-fosfato en fructosa 1,6-bifosfato y fosfoenolpiruvato en piruvato (Copeland, 1987).

La vía de las pentosas fosfato está estrechamente relacionada con la vía glicolítica y con la síntesis de nucleótidos, antocianos, ligninas y ácidos grasos. Al mismo tiempo que proporciona intermediarios de la vía glicolítica, como el gliceraldehído 3-fosfato, permite utilizar la glucosa 6-fosfato directamente como fuente de energía (Ribas-Carbó y González-Meler, 2000; Dennis y Blakeley, 2000). Esta vía comprende dos fases, la primera consiste esencialmente en una conversión irreversible de la glucosa 6-fosfato en ribulosa 5-fosfato catalizada por las enzimas glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.49), 6-fosfogluconolactonasa (E.C. 3.1.1.31) y 6-fosfogluconato deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.44), de forma que proporciona poder reductor en la forma NADPH que puede ser utilizados en un amplio número de rutas anabólicas (Dennis, et al. 1997); la segunda consiste en una serie de interconversiones entre azúcares fosforilados de 3, 4, 5, 6 y 7 carbonos catalizados por las enzimas ribosa 5-fosfato isomerasa (E.C. 5.3.1.6), ribulosa 5-fosfato 3-epimerasa (E.C. 5.1.3.1), transaldolasa (E.C. 2.2.1.2) y transquetolasa (E.C. 2.2.1.1). Con la excepción de la transaldolasa todos los demás enzimas son afibólicos, participando a su vez en el ciclo de Calvin (Debman, *et al.*, 1999)

1.3.3. Síntesis del ácido cítrico.

Los ácidos pirúvico y málico son transportados al interior de la mitocondria para ser utilizados en el ciclo de Krebs. La oxidación del piruvato a acetil-coenzima A (acetil-CoA) dentro de la mitocondria es catalizada por el complejo multienzimático piruvato deshidrogenasa (E.C. 1.2.1.51) (complejo que se encuentra también en los cloroplastos), que está compuesto por tres subunidades catalíticas: piruvato deshidrogenasa, dihidrolipoil transacetilasa y dihidrolipoil deshidrogenasa.

El acetil-CoA se condensa con el oxalacetato para producir citrato, en una reacción catalizada irreversiblemente por la citrato sintasa (E.C. 2.3.3.1). En las plantas la mayor parte del citrato producido se exporta al citosol mediante un transportador específico que introduce malato y oxalacetato, en la mitocondria y libera citrato al citosol (Heldt, 2004).

El oxalacetato, necesario para la síntesis de citrato, se produce en el ciclo de Krebs por la acción de la malato deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.37) (Hawker, 1969; Ruffner, 1976; Musrati *et al.*, 1998); sin embargo, debido a la salida de citrato al citosol es necesario alimentar el ciclo con metabolitos intermediarios mediante reacciones anapleróticas. Una de estas reacciones,

catalizada en el citosol por la fosfoenolpiruvato carboxilasa (E.C. 4.1.1.31), transforma el fosfoenolpiruvato en oxalacetato (Janc *et al.*, 1992) de modo que éste puede ser transportado al interior de la mitocondria. Otra reacción anaplerótica es la catalizada, también en el citosol, por la malato deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.37) que transforma el oxalacetato en malato; esta enzima está codificada por una familia multigénica y es dependiente de NAD^+ en mitocondrias, citosol y peroxisomas, y de NADP^+ en cloroplastos.

Una vez en el interior de la mitocondria, la enzima málica mitocondrial (E.C. 1.1.1.38, dependiente de NAD^+) cataliza la descarboxilación oxidativa de malato a piruvato (Deuce, 1985), mientras que la malato deshidrogenasa mitocondrial (E.C. 1.1.1.37) cataliza la síntesis de oxalacetato a partir de malato. De esta forma se puede sintetizar citrato sin el concurso de todos los intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbónicos, produciéndose además una gran cantidad de NADH.

La enzima aconitasa (E.C. 4.2.1.3) cataliza la isomerización reversible del citrato a isocitrato, proceso en el que se produce el compuesto intermediario cis-aconitato. La aconitasa presenta dos isoenzimas, una en la mitocondria y otra en el citosol (Heldt, 2004).

Dentro de la mitocondria el isocitrato se oxida irreversiblemente a α -cetoglutarato mediante la enzima NAD^+ isocitrato deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.41), que es activada por el citrato (Cox y Davies, 1970; Duggleby y Dennis, 1970).

Existen dos isoenzimas de isocitrato deshidrogenasa siendo la dependiente de NAD^+ , situada en la mitocondria, la responsable de la producción de α -cetoglutarato en el ciclo de Krebs y la dependiente de NADP^+ la que cataliza esta reacción en el citosol. Se han encontrado altos niveles de actividad de esta última enzima en el citosol, siendo muy bajos en el cloroplasto y la mitocondria (Mifflin y Lea, 1982; Chen y Gadal, 1990; Cheng, 1998; Gálvez *et al.*, 1994; Gallardo *et al.*, 1995; Kruse *et al.*, 1998; Palomo *et al.*, 1998). El α -cetoglutarato, así obtenido, puede ser transportado al citosol mediante un transportador específico que introduce malato en la mitocondria, simultáneamente.

La oxidación del α -cetoglutarato a succinil-CoA está catalizada por el complejo multienzimático α -cetoglutarato deshidrogenasa (E.C. 1.2.4.2). El tioéster producido, succinil-CoA, es rico en energía, que se libera en forma de ATP en la reacción siguiente catalizada por la enzima succinato-CoA ligasa (E.C. 6.2.1.5) que hidroliza el succinil-CoA para dar succinato. El succinato es oxidado a fumarato por la acción de la succinato deshidrogenasa (E.C. 1.3.99.1), enzima ubicada en la membrana mitocondrial.

El fumarato se hidrata con el concurso de la enzima fumarasa (E.C. 4.2.1.2) para formar malato en una reacción reversible. Finalmente la malato deshidrogenasa dependiente de NAD^+ (E.C. 1.1.1.37) oxida el malato, produciéndose oxalacetato y NADH (Heldt, 2004).

El citrato sintetizado en la mitocondria se exporta al citosol mediante un cotransportador que introduce malato y oxalacetato en la mitocondria al mismo tiempo. Desde el citosol, el citrato se introduce en la vacuola para su almacenamiento. Además, existen dos rutas de catabolización de citrato en el citosol. En la primera, el citrato se isomeriza a isocitrato por la acción de una aconitasa citosólica (Sadka *et al.*, 2000a), y mediante la isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP^+ ubicada en el citosol (E.C. 1.1.1.41) el isocitrato se convierte en α -cetoglutarato (Mifflin y Lea, 1982; Chen y Gadal, 1990; Cheng, 1998).

En la segunda ruta, la enzima ATP citrato liasa (E.C. 2.3.3.8) utiliza al citrato presente en el citosol como precursor para la síntesis de acetil-CoA y oxalacetato, tal y como se ha demostrado en animales, levaduras y hongos (Ratledge y Evans, 1989). En plantas la ATP citrato liasa es una enzima heterodimérica cuya localización ha estado sometida a controversia; mientras que en un principio algunos autores como Fritsch y Beevers (1979), la ubicaron en los plastidios finalmente Kaethner y Rees (1985); Ma *et al.* (2001) y principalmente Fatland *et al.* (2002) demostraron su localización citosólica, no siendo detectable en plastidios, mitocondrias ni peroxisomas.

El acetil-CoA generado en el citosol por la ATP citrato liasa se usa para la biosíntesis de una gran variedad de productos. Se ha comprobado que se emplea para la síntesis de ceras cuticulares y flavonoides en *Arabidopsis thaliana* (Fatland *et al.*, 2000), para la síntesis de lípidos en semillas de *Brassica napus* (Ratledge y Rangasamy, 2000) y para la síntesis de esteroides y otros isoprenoides mediante la ruta del ácido mevalónico, en patata (Takeuchi *et al.*, 1981) (**Figura 1.4**).

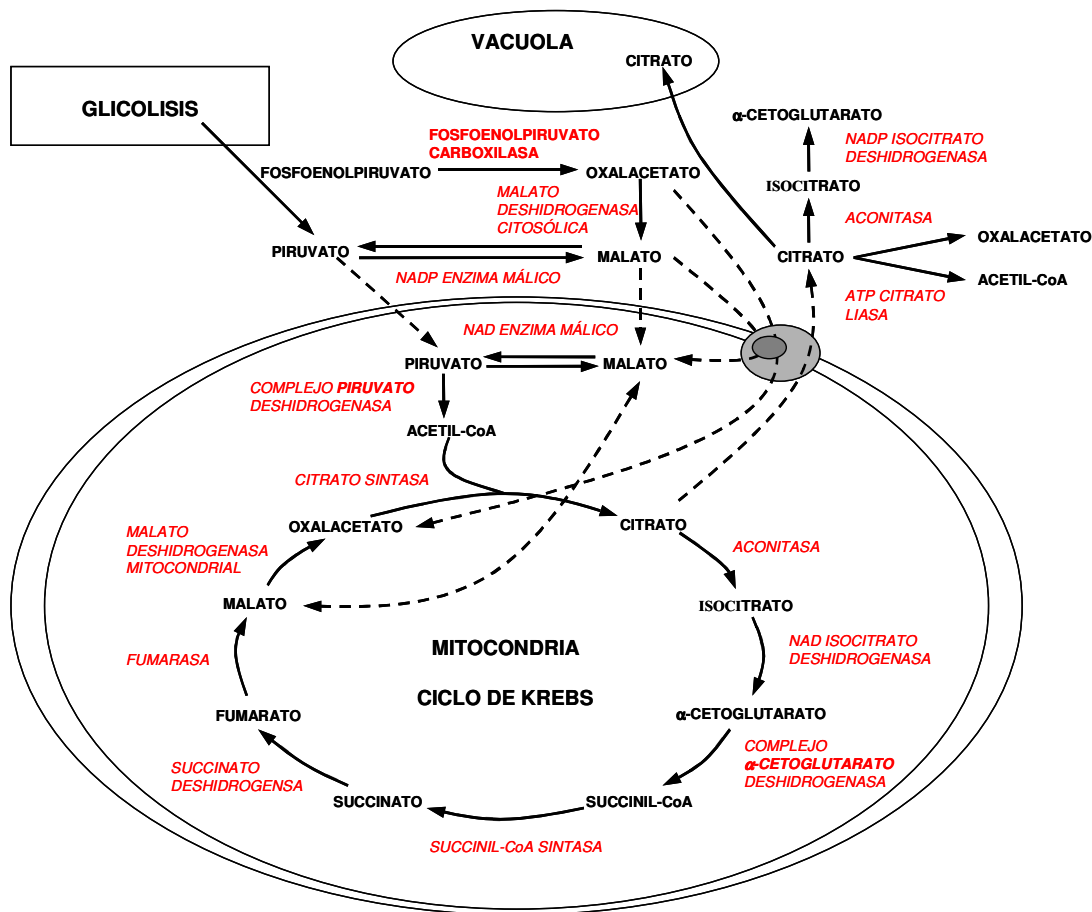


Figura 1.4. Esquema del ciclo de Krebs.

1.3.4. Derivación del gamma aminobutarato (GABA)

La derivación del γ -aminobutarato (GABA) es una ruta por la cual se produce succinato evitando dos pasos del ciclo de los ácidos tricarbónicos. La actividad de esta ruta en las plantas se encuentra altamente intensificada durante la respuesta a estreses bióticos y abióticos (Snedden y Fromm, 1999).

Estudios recientes realizados mediante la utilización de mutantes o plantas con genes antisentido de las enzimas del ciclo de los ácidos tricarbónicos indican que la estructura inherente a la derivación del GABA está íntimamente ligada con el ciclo de los ácidos tricarbónicos, puesto que alteraciones en las enzimas del ciclo de los ácidos tricarbónicos, anteriores a la producción de succinato alteran la actividad de la derivación del GABA (Lemaitre, 2007), mientras que por el contrario, la alteración de las enzimas posteriores no producen ningún efecto en el metabolismo del GABA (Nunes-Nesi, 2005). De igual modo, se observó que plantas transgénicas con una expresión de la succinil-CoA ligasa deficiente se

compensaba mediante la derivación del GABA. Todos estos estudios sugieren que la derivación del GABA debe ser considerada como una parte integral del ciclo de los ácidos tricarbónicos (Fait *et al.*, 2007).

La síntesis de GABA en el citosol a partir del α -cetoglutarato tiene lugar mediante dos reacciones secuenciales: la primera de ellas consiste en la conversión del α -cetoglutarato en glutamato y puede estar catalizada por las enzimas glutamato deshidrogenasa (E.C. 1.4.1.3), aspartato aminotransferasa (E.C. 2.6.1.1) y alanina aminotransferasa (E.C. 2.6.1.2). La segunda está catalizada por la glutamato descarboxilasa (GAD; E.C. 4.1.1.15), que en plantas se encuentra regulada por una Ca^{+2} /calmodulina citosólica. Posteriormente el GABA es transformado por la enzima GABA transaminasa (E.C. 2.6.1.19) en succinato semialdehído, que mediante la acción de la succinato semialdehído deshidrogenasa (SSADH; E.C. 1.2.1.16) es oxidado a succinato (Bown y Shelp, 1997; Bouché *et al.*, 2003).

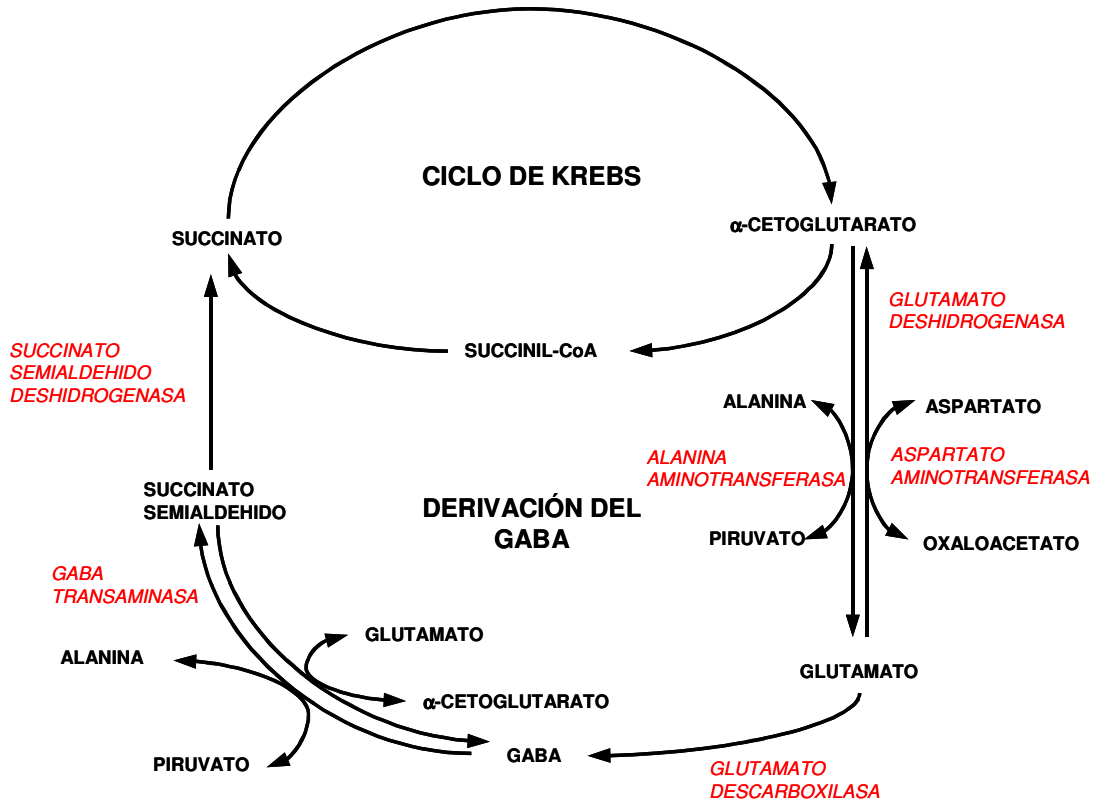


Figura 1.5. Esquema de la derivación del GABA.

Además de la adaptación a los estreses, en las plantas, se le han atribuido otras funciones a esta ruta como el control del pH citosólico o el equilibrio entre el metabolismo del carbono y del nitrógeno (Bown y Shelp, 1997; Snedden y Fromm, 1999; Busch y Fromm, 1999) (Figura 1.5).

1.4. Calidad interna en los frutos cítricos

La mejora de la calidad de los frutos debe constituir la principal arma para aumentar la comercialización de los cítricos españoles en los cada vez más competitivos mercados internacionales. Dentro de las características de calidad que debe reunir una variedad de cítricos para el consumo en fresco destacan los aspectos relacionados con las cualidades organolépticas de los frutos.

La calidad interna de los frutos cítricos se encuentra altamente influenciada por la acumulación de ácidos orgánicos durante el desarrollo, hasta el punto de que la recolección de los frutos viene condicionada por su acidez. El momento en el que se recolectan los frutos viene determinado por el índice de madurez, que se define como la relación entre los sólidos solubles y los ácidos totales (Davies *et al.*, 1994, Marsh *et al.*, 2000).

Uno de los problemas más importantes que presenta en la actualidad el cultivo de mandarinas clementinas (*Citrus clementina* Hort. ex Tan.) es la estacionalidad de la producción, que se concentra en el periodo de septiembre a enero. Entre las demandas principales de los citricultores españoles se encuentra la obtención de nuevas variedades que permitan ampliar dicho periodo comercial.

Para que una variedad de mandarina clementina admita una recolección tardía debe poseer tres particularidades: dos de ellas están asociadas al comportamiento del pericarpo y son el retraso en el cambio de la coloración externa y una escasa tendencia al bufado y al colapso de la corteza; la tercera está relacionada con la maduración interna y consistente en el mantenimiento de niveles aceptables de acidez hasta el momento de la recolección.

Así pues, el conocimiento de los mecanismos moleculares involucrados en la maduración interna de los frutos cítricos resulta necesario para poder diseñar herramientas agronómicas o biotecnológicas que actúen sobre este proceso.

1.5. Producción mundial de cítricos. Relevancia de España

Los cítricos constituyen el primer cultivo frutal del mundo, con una producción mundial de 108 millones de toneladas anuales y una superficie cultivada de 7,4 millones de hectáreas en 2004 (FAO, 2005). El 64 % de la producción anual mundial de frutos cítricos se produce en los seis primeros países productores, que son, por orden cuantitativo Brasil, Estados Unidos, China, España, México e India.

La producción mundial de naranjas se distribuye de forma similar, llegándose a recolectar entre los seis primeros productores mundiales (Brasil, Estados Unidos, China, México, India

y España) un 65 % del total anual. En cuanto a la producción de mandarinas China y España producen el 53 % del mundial anual.

En España los cítricos constituyen el primer cultivo frutal, con una producción de 6,2 millones de toneladas y una superficie cultivada de unas 300.000 hectáreas. Aproximadamente el 45 % de la producción es de naranjas dulces, el 42 % de mandarinas y el 13 % de limones.

España también tiene una gran relevancia mundial como potencia exportadora de frutos cítricos en fresco. Actualmente es el primer país exportador de frutos cítricos, exportando alrededor del 30 % del total anual mundial. También es la primera exportadora de los subgrupos cítricos naranja, mandarina y limón, de forma independiente, con el 28 %, 52 % y 26 % del total mundial exportado, respectivamente (FAO, 2005).

Las regiones Españolas más importantes en relación con la producción de cítricos son la Comunidad Valenciana con el 56,71 % de la superficie de cultivo, Andalucía con el 24,98 % y la Región de Murcia con el 13,56 % (MAPA. 2008).

Los datos anteriores demuestran la importancia del sector cítrico Español a nivel mundial, destacando su papel como productor de mandarinas y como exportador.

Las variedades pertenecientes al grupo de las mandarinas clementinas (*Citrus clementina* Hort. ex Tan.) se adaptan mejor al clima mediterráneo que a los climas húmedos tropicales o subtropicales (Davies y Albrigo, 1994). Además, los frutos de estas variedades son generalmente fáciles de pelar, presentan un elevado contenido en zumo y no tienen semillas (Agustí, 2003). Estos factores favorecen que de la producción total de mandarinos en España, las clementinas constituyan casi el 65,9 %, siendo la Comunidad Valenciana la principal productora de mandarinas de este grupo con el 81,4 % de la producción (Anuario 2006).

Dentro del grupo de mandarinas clementinas la variedad Clementina de Nules destaca sobre el resto al constituir aproximadamente el 57% de la producción total de clementinas en la Comunidad Valenciana (Balance de la cosecha de cítricos. Campaña 2005/2006).

II. Objetivos

El objetivo general de este trabajo es revelar por primera vez los cambios en la expresión génica que se producen durante el desarrollo y la maduración de la pulpa de los frutos cítricos, y en particular aquellos asociados a los mecanismos de regulación de la acidez. En este trabajo también pretendemos identificar el conjunto de genes inducidos y reprimidos que regulan la síntesis y la degradación del ácido cítrico durante la maduración interna de los frutos cítricos. Desde un punto de vista metabólico se estudiará la evolución de los principales ácidos de los frutos en cuatro variedades que presentan diferencias en su periodo de maduración, con la intención de determinar los correspondientes patrones de acumulación y degradación. Atendiendo a la expresión de los principales genes implicados en el metabolismo de los ácidos se incidirá sobre los mecanismos de regulación de su síntesis durante las fases I y II del desarrollo del fruto, y de su degradación en las fases II y III de maduración del fruto.

Así, los objetivos concretos de este trabajo son:

1. Estudiar los cambios en la expresión génica y los cambios metabólicos principales que tienen lugar durante el desarrollo y maduración del endocarpo del fruto.

Para ello se identificarán los cambios de expresión génica mediante hibridación de micromatrices de cDNA de cítricos (7K) con muestras de RNA de pulpa de frutos de Clementina de Nules en diferentes estadios de maduración. Los principales cambios metabólicos predichos por los estudios globales de expresión génica se confirmarán mediante cuantificación de metabolitos seleccionados.

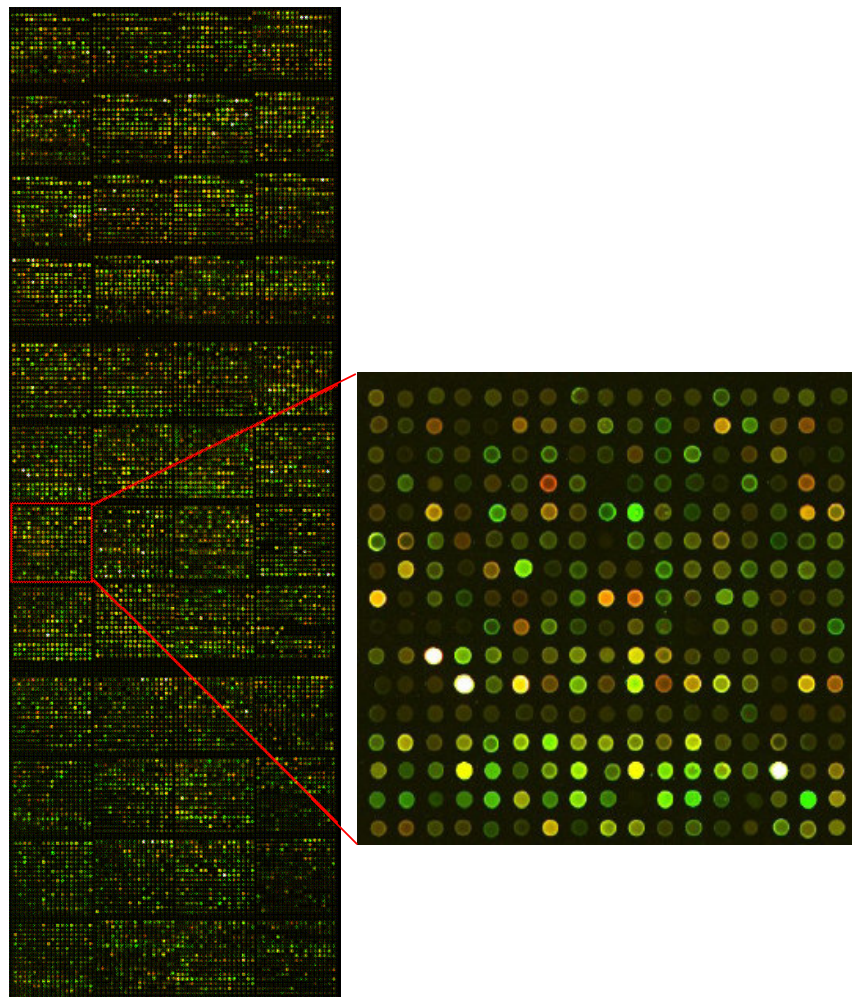
2. Estudiar la expresión de los genes que codifican las principales enzimas implicadas en la reducción de la acidez de los frutos. Y proponer un modelo que explique este mecanismo.

Para ello se analizarán mediante micromatrices de cDNA, RT-PCR en tiempo real y northern-blot la expresión de los genes que codifican las principales enzimas implicadas en la degradación de los frutos. Con la información generada se intentará proponer un modelo de eliminación de los ácidos.

3. Identificar los procesos metabólicos determinantes de la acumulación de ácidos y estudiar la expresión de los genes asociados a dichos procesos.

Para ello se utilizarán dos variedades que se diferencian en su contenido en ácidos (Clementina de Nules y Fortune) y se estudiarán los efectos del tratamiento con ácido arsánico, un agente reductor de la acidez. Se analizarán el contenido en ácidos y la expresión de los genes mediante micromatrices de cDNA de cítricos (7K) y RT-PCR en tiempo real.

III. Análisis global de la expresión génica durante el desarrollo y la maduración interna de los frutos de Clementina de Nules.



3.1. Introducción

Los estudios realizados sobre la composición de los frutos cítricos indican que durante las últimas fases de su desarrollo éstos presentan un alto porcentaje de agua, además de otros compuestos como carbohidratos, ácidos orgánicos, vitamina C y carotenoides (Seymour *et al.*, 1993; Davies y Albrigo, 1994). Durante las fases II y III de su desarrollo se producen alteraciones fisiológicas y bioquímicas que afectan a procesos relacionados con la expansión celular, la acumulación de agua, la acumulación de sacarosa, la reducción de la acidez, la sustitución de pigmentos, el descenso de vitamina C y la reducción de lípidos (Baldwin, 1993; Davies y Albrigo, 1994).

Hasta el momento, casi todos los esfuerzos se han enfocado a la realización de estudios descriptivos de tipo fisiológico y bioquímico (Baldwin, 1993) pero poco se sabe acerca de la regulación de la expresión génica, por lo que existen grandes incógnitas con respecto a los mecanismos que controlan el desarrollo y la maduración interna de los frutos.

En los últimos años se ha producido un extraordinario desarrollo de las tecnologías para la secuenciación de DNA que ha permitido la acumulación de gran número de secuencias de organismos modelo tales como *Homo sapiens*, *Escherichia coli*, *Arabidopsis thaliana*, y *Oryza sativa*. La información disponible tanto de secuencias genómicas como de secuencias parciales de genes expresados (expressed sequence tags, ESTs), de diversos organismos ha hecho posible la comparación de secuencias entre especies y la identificación de genes basándose en su homología. El conocimiento de las secuencias génicas ha constituido la base para la construcción de micromatrices de oligonucleótidos o de cDNA. Éstas últimas, se construyen a partir de clones de cDNA secuenciados por su extremo 5' y amplificados por PCR.

Las micromatrices permiten el estudio de la expresión de miles de genes a la vez en un solo experimento y resultan de extrema utilidad a la hora de evaluar las diferencias de la expresión génica global entre distintos tejidos, diferentes estadios del desarrollo, mutantes frente al genotipo silvestre, etc. La importancia de la tecnología de las micromatrices para aproximaciones en la descripción del transcriptoma en genómica funcional se está incrementando de manera exponencial en prácticamente todas las plantas y, en particular, en muchos cultivos agrícolas.

El estudio de la expresión de los genes que regulan la maduración de los frutos no climatéricos ha sido abordado en muy pocas especies como: piña (Moyle *et al.*, 2004), uva (da Silva *et al.*, 2005) y sandía (Levi *et al.*, 2006). Aunque algunos estudios como los

realizados en fresas por Aharoni, *et al.* (2002) mostraron que durante la maduración se inducían proteínas relacionadas con el metabolismo primario como las relacionadas con la modificación de la pared celular y la pigmentación, lo cual presumiblemente reflejaba cambios en el sabor, aroma, textura y color. Además, Marín-Rodríguez *et al.* (2002) observaron que durante la maduración tanto de frutos climatéricos como no climatéricos se inducía la expresión de enzimas como la pectato liasa, la pectin esterasa y las poligalacturonasas, las cuales deben jugar un papel significativo en la textura del fruto.

Recientemente, se han realizado algunos estudios en cítricos sobre la expresión de múltiples genes pertenecientes a diferentes rutas biosintéticas. Entre ellos se puede destacar un proyecto de secuenciación a pequeña escala en el que se aislaron 297 ESTs, identificándose un 20 % de ellos como codificantes de la proteína metalotioneína (Moriguchi *et al.*, 1998), un estudio realizado mediante la utilización de una micromatriz de cDNA con 2213 genes independientes, con la que se determinó la diferencia de expresión de los genes presentes en la micromatriz en dos tejidos diferentes (Shimada *et al.*, 2005) y un estudio de identificación de genes con respuesta a etileno mediante la utilización de una matriz de oligonucleótidos de 22 K (Fujii *et al.*, 2007). Sin embargo, no se ha profundizado en ninguno de estos casos, en los procesos bioquímicos o las rutas metabólicas relacionadas con la acidez en los frutos cítricos.

En el marco del Consorcio español de genómica funcional de cítricos (Citrus Functional Genomics Project, CFGP) se ha construido una colección de ESTs de cítricos mediante secuenciación de clones extraídos al azar de genotecas de cDNA de distintos tejidos, estadios de desarrollo y condiciones de estrés. A partir de esta colección de ESTs se ha desarrollado una micromatriz de cDNA con 12.672 sondas que corresponden a 6875 unigenes putativos (Forment *et al.*, 2005).

En este capítulo se describen los cambios de expresión génica durante el desarrollo y la maduración (fases I, II y III) de la pulpa de frutos de la variedad Clementina de Nules. Los resultados han contribuido a dilucidar los principales procesos y rutas metabólicas implicadas en la maduración del endocarpo de los frutos cítricos.

3.2. Materiales y métodos

3.2.1. Material vegetal

En el presente estudio se emplearon frutos de la variedad Clementina de Nules, (*Citrus clementina* Hort. ex Tan.) injertada sobre el patrón citrange Carrizo (*Citrus sinensis* (L.) Osb. x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.), que es un híbrido del naranjo dulce Washington Navel y el naranjo trifoliado (Ortiz, 1985). Los frutos utilizados procedían de tres árboles cultivados bajo prácticas normales, en una parcela homogénea situada en el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA, Moncada, Valencia). El suelo de cultivo se caracterizaba por ser franco arenoso, con pH neutro-alcalino, pobre en materia orgánica y con muy bajo contenido en carbonatos. Las condiciones climáticas de la zona de cultivo no interferieron en la época de maduración, siendo escaso el riesgo de heladas. En el cultivo, se emplearon herbicidas y riego localizado, no se realizó ningún tratamiento que tendiese a favorecer el aumento de tamaño del fruto, el cuajado, o el mantenimiento del fruto en el árbol, pero sí se realizaron los pertinentes tratamientos de control de plagas para permitir un crecimiento vegetativo normal.

Las muestras de frutos para la hibridación de micromatrices fueron recolectadas durante las tres fases del desarrollo durante la campaña 2003/2004. Las fechas de muestreo se indican en la tabla **Tabla 3.1**. Los frutos fueron tomados al azar a partir de todas las orientaciones del árbol (norte, sur, este y oeste), y agrupados en grupos correspondientes a cada uno de los tres árboles. Una vez en el laboratorio, los frutos fueron pelados y tras eliminar las semillas y las columnelas la pulpa se congeló en nitrógeno líquido y se conservó congelada a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tabla 3.1. Fechas de muestreo con su equivalente en días después de antesis (DDA). Se ha tomado como día de antesis el 30 de abril.

| Fecha | DDA |
|------------------|-----|
| 27 de mayo | 27 |
| 28 de julio | 89 |
| 14 de septiembre | 137 |
| 21 de octubre | 174 |
| 27 de diciembre | 241 |

3.2.2. Cuantificación del contenido en agua y de los metabolitos seleccionados

3.2.2.1. Contenido en agua

El contenido en agua de los frutos se determinó mediante pesaje de los mismos antes y después de ser desecados en estufa de aire caliente a 65 °C durante 72 horas.

3.2.2.2. Carbohidratos solubles

La extracción de carbohidratos se realizó siguiendo el protocolo descrito por Mehouchi *et al.* (1995). Se añadió 1 ml de etanol 80 % a 100 mg de tejido, se agitó durante 10 minutos, posteriormente se centrifugó 10 minutos y se recogió el sobrenadante. Este proceso de extracción se realizó 3 veces. A continuación se purificó el extracto mediante columnas de intercambio catiónico y aniónico y seguidamente mediante cartuchos C18. Se analizaron los contenidos en sacarosa, glucosa y fructosa mediante un equipo HPLC (Waters) equipado con una columna para carbohidratos (4,6 X 256 mm, Waters) y un refractómetro diferencial 2410 (Waters).

3.2.2.3. Clorofilas y carotenoides

Las extracciones de clorofilas y carotenoides se realizó siguiendo el método descrito por Rodrigo *et al.* (2003). Se añadieron 2 ml de metanol y 1,5 ml de Tris-HCl (50mM pH 7,5) a 0,5 g de flavedo congelado y se agitó durante 5 minutos. Posteriormente, se añadieron 4 ml de cloroformo, se agitó durante 5 minutos, se centrifugó a 4.500 r.p.m. 5 minutos y se recuperó la fase inferior (cloroformo). Este proceso se repitió hasta que la fase inferior fue incolora (3 a 5 veces). A continuación, se evaporó a sequedad en rotavapor. El sedimento resultante se resuspendió en 200 µl de acetona y seguidamente se añadieron 2,8 ml de solución A (éter de petróleo 40-60°: éter etílico 9:1 v/v). Las concentraciones de clorofila a, clorofila b y clorofila total (a+b) se calcularon a partir de las medidas de absorbancia a 644 y 662 nm (A_{644} y A_{662}) aplicando las ecuaciones de Smith y Benítez (1955):

$$\text{Clorofila a } (\mu\text{g/g}) = [(10,05 \cdot A_{662}) - (0,76 \cdot A_{644})] \cdot V / P$$

$$\text{Clorofila b } (\mu\text{g/g}) = [(16,37 \cdot A_{644}) - (3,14 \cdot A_{662})] \cdot V / P$$

$$\text{Clorofila total} = \text{clorofila a} + \text{clorofila b}$$

Siendo V = volumen del extracto (ml); P = Peso de la muestra (g)

Tras la cuantificación de clorofilas, se secaron los extractos en rotavapor y se saponificaron con 1,8 ml de metanol y 200 µl de KOH 60% durante 12 horas. Para re-extraer los carotenoides se añadieron 2 ml de agua y 6 ml de solución A, se recogió la fase superior (éter) y se reextrajo con 3 ml de solución A hasta que la fase inferior quedó incolora. Se tomó una alícuota para la cuantificación de los carotenoides totales. Para ello se midió la absorbancia a 450 nm y se utilizó el coeficiente de extinción del β-caroteno (Davies, 1976).

La fórmula utilizada fue la siguiente:

$$\text{Carotenoides totales (equivalentes } \beta\text{-caroteno / g tejido)} = [A_{450} \cdot V] / [\epsilon^{1\%} \cdot 100 \cdot P]$$

Siendo $\epsilon^{1\%}$ = coeficiente de extinción del β-caroteno = 2,500;

P = peso de la muestra (g);

V = volumen de la muestra (ml).

Todas las manipulaciones se realizaron manteniendo las muestras en hielo y con luz tenue a fin de evitar fotodegradación, isomerizaciones y cambios estructurales en los carotenoides. Se realizaron 3 extracciones independientes de cada muestra.

3.2.2.4. Ácido ascórbico

Se utilizó un cromatógrafo iónico ICS-2000 (Dionex) equipado con inyector automático AS40 (Dionex) conectado a una columna de detección de aniones AS11-HC (IonPac) con una columna supresora incorporada que funciona según la metodología de supresión química (Skoog y Leary. 1994).

La muestra utilizada para el análisis fue zumo centrifugado a 13.000 rpm (Beckman J2-21, rotor JA-14) para eliminar las paredes de las vesículas. El eluido se filtró con un filtro de nylon de 0,22 µm (Cameo). Se tomaron 0,75 ml y se diluyeron en 3,25 ml de agua, filtrándose nuevamente con un filtro de nylon de 0,22 µm (Cameo).

El flujo de inyección fue de 1 ml/minuto. La identificación de los ácidos y aniones se realizó tras la inyección de estándares de los ácidos a identificar (ácido ascórbico). Una vez identificados se realizan curvas de calibrado con un estándar. La cuantificación se realizó con el programa Chromeleon (Dionex). Se analizaron tres alícuotas por muestra.

3.2.3. Hibridación de micromatrices de cDNA

3.2.3.1. Marcaje de las muestras

La extracción del RNA de la pulpa de los frutos fue realizada mediante el método descrito por Sambrook *et al.* (1989) con algunas modificaciones. A un gramo de material vegetal, congelado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y triturado, se le añadió 1 ml del tampón de extracción (Tris-HCl 0,2 M pH 8, NaCl 0,2 M, EDTA 50 mM y SDS 2 %), 1 ml de fenol y 0,02 ml de β -mercaptoetanol, la mezcla se incubó a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos. Se centrifugó a $3.600 \times g$ durante 15 minutos. El sobrenadante se lavó con cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). El RNA se precipitó con 0,5 volúmenes de LiCl 6 M durante 2 días a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. El precipitado se lavó con etanol 70 %, dejándolo secar a temperatura ambiente y se resuspendió en agua tratada con dietilpiricarbonato (DEPC) según el protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989). Los restos de DNA se eliminaron mediante digestión con DNasa A a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 45 minutos. Se realizaron tres extracciones independientes de RNA y se procesaron y se marcaron independientemente e hibridaron en tres micromatrices diferentes.

El RNA total extraído a partir de cada muestra fue amplificado para sintetizar cRNA antisentido según el método de Eberwine (Van Gelder *et al.*, 1990), consistente en la síntesis de cDNA de doble cadena que lleva en su extremo 3' el promotor del fago T7 seguida de transcripción *in vitro* con la RNA polimerasa del fago T7. Durante la etapa de transcripción *in vitro* se realizó el marcaje indirecto del RNA mediante incorporación de aminoalil-UTP para la posterior conjugación química con los NHS-ésteres de los fluoróforos Cy3 y Cy5, básicamente siguiendo las condiciones descritas por Wellmer *et al.* (2004).

Para la síntesis del cDNA, 5 μg de RNA total fueron retrotranscritos durante 2 horas a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ con 200 unidades de transcriptasa reversa SuperScript II (Invitrogen), 0.1 μg de T7-oligo(dT) 24 (Ambion), 0,5 μg de proteína del gen 32 del fago T4 (Amersham) y 40 unidades de inhibidor de RNasas (RNaseOUT, Invitrogen) en un volumen total de 20 μl . La síntesis de la segunda cadena de cDNA se realizó añadiendo a la mezcla de la primera cadena 40 unidades de DNA polimerasa I de *E. Coli* (New England Biolabs), 2 unidades de RNasa H (Invitrogen) y agua tratada con DEPC hasta alcanzar un volumen de 150 μl e incubando 2 horas a $16\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para obtener extremos romos en el cDNA se añadieron 3 unidades de DNA polimerasa del fago T4 (New England Biolabs) y se incubó a $16\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 minutos y a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min. Los cDNAs de doble cadena resultantes, que contenían el promotor del fago T7 en el

extremo 3', se purificaron con el QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la transcripción *in vitro* se utilizó el kit MEGAscript T7 (Ambion) siguiendo las instrucciones del fabricante, a excepción del tiempo de incubación que fue de 4 horas, y la adición de 1 µl de UTP 75 mM y 2 µl de aminoalil-UTP 50 mM (Ambion). Los cRNA resultantes se purificaron utilizando columnas RNeasy (Qiagen). El rendimiento y pureza de los cRNAs se evaluó por espectrofotometría UV (Sambrook *et al.*, 1989). Mediante electroforesis en gel de agarosa se determinó el rango de tamaños de los cRNAs marcados. Se obtuvo un smear comprendido entre 1000 y 4000 pb con un tamaño medio de 1500-2000 pb.

Para la reacción química de acople con los fluoróforos, se tomaron 3 µg de cRNA y se llevaron a sequedad en speed-vac, se disolvieron en 4 µl de tampón carbonato sódico 0,1 M, pH 8,5, y se mezclaron con 4 µl de los NHS-ésteres de los fluoróforos Cy3 y Cy5, básicamente siguiendo las condiciones descritas por Wellmer *et al.* (2004). Se incubó a temperatura ambiente en oscuridad durante una hora y se purificaron los cRNA marcados con columnas RNeasy (Qiagen). El porcentaje de incorporación de los fluoróforos y la concentración del cRNA recuperado se determinó mediante espectrofotometría (Bittner *et al.*, 2003).

El RNA total extraído a partir de cada muestra se utilizó para sintetizar cRNA antisentido marcado con Cy5 que fue hibridado junto con cRNA antisentido marcado con Cy3 sintetizado a partir de una muestra de referencia formada por una mezcla que contenía las mismas cantidades de cada una de las muestras utilizadas para el experimento. A fin de evitar artefactos debidos a los fluoróforos, se utilizó siempre Cy5 para marcar las muestras y Cy3 para la referencia.

3.2.3.2. Hibridación y lavados

Para la hibridación de las micromatrices, las mezclas de cRNA de la muestra y la referencia conteniendo 60 pmol de cada fluoróforo, se hidrolizaron parcialmente hasta generar fragmentos de 150-200 pb con el RNA Fragmentation Reagent (Ambion). Posteriormente se desnaturalizaron durante 2 minutos a 80 °C, se mezclaron con 50 µl de tampón de hibridación precalentado (SSC 5X, formamida 50%, SDS 0,1% y DNA de esperma de salmón 0,1 mg/ml) y se aplicaron sobre la micromatriz previamente pre-hibridada con SSC 5X, SDS 0,1%, BSA 1%.

La hibridación se realizó en una cámara humedecida con SSC 2X durante 20 horas a 42 °C. Tras la hibridación, se realizaron los siguientes lavados: 2 lavados de 5 minutos a 42 °C con SSC 2X, SDS 0,1%, 2 lavados de 5 minutos a temperatura ambiente con SSC 0,1X, SDS 0,1%, 5 lavados de 1 minuto a temperatura ambiente con SSC 0,1X y un breve lavado con SSC 0,01X. Tras los lavados, las micromatrices se secaron mediante centrifugación a 300 rpm durante 3 minutos.

A partir de cada muestra se realizaron 3 extracciones independientes de RNA, que se retrotranscribieron, amplificaron, marcaron e hibridaron independientemente en 3 micromatrices diferentes.

3.2.3.3. Adquisición y análisis de los datos

Las micromatrices hibridadas se escanearon con un lector GenePix 4000B utilizando el programa de análisis de imagen GenePix Pro 4.1 (Axon Instruments). Los valores de ganancia de los fotomultiplicadores se ajustaron de manera que la relación entre las intensidades totales de los dos canales fuese aproximadamente igual a 1 y el porcentaje de spots saturados alrededor del 1 %. El barrido se realizó con una resolución de 10 μm , promediando dos lecturas por línea.

Los datos que se utilizaron en los análisis posteriores fueron las medianas de las intensidades de los píxeles de los spots y del fondo para cada uno de los canales. Se eliminaron del análisis los spots no detectados por el lector, los que tenían defectos en la hibridación, los spots saturados y también aquellos en los que el cociente entre la señal y el fondo era menor que 2. Únicamente se utilizaron para los análisis posteriores los datos de hibridación de las sondas formadas por productos de PCR que habían dado una banda única e intensa en geles de agarosa (Forment et al., 2005).

A fin de compensar las diferencias debidas al marcaje de las muestras y a otras fuentes de variabilidad no biológica se normalizaron los datos mediante el método de estabilización de la varianza (vs_n; Huber et al., 2002). La identificación de las sondas que presentaron diferencias de expresión estadísticamente significativas entre las distintas muestras se realizó utilizando el programa LIMMA (linear models in microarrays, Smith, 2004) perteneciente al paquete informático Bioconductor (Gentleman et al., 2004). Se consideraron diferencias significativas aquellas que tenían asociado un valor de P inferior a 0,001 y una inducción o represión de al menos 2 veces.

3.3. Resultados y discusión

3.3.1. Identificación y clasificación funcional de genes involucrados en el desarrollo y la maduración de la pulpa de los frutos cítricos

Mediante análisis de micromatrices de cDNA se ha comparado la expresión génica durante el desarrollo (fases I y II) y la maduración (fases II y III) de la pulpa de los frutos de Clementina de Nules. Las muestras de la fase II correspondientes a los días 137 y 174 después de antesis y la muestra de la fase III del día 241, se compararon con la muestra del día 89 después de antesis (fase II).

El resultado de estos análisis indicó que 3588 sondas de la micromatriz, que se corresponden con 2243 posibles unigenes (el 33 % de los genes representados en la micromatriz), mostraron cambios significativos de expresión ($P < 0,001$) iguales o mayores a dos veces en al menos uno de los contrastes. Además, 393 de estos genes (6 %) manifestaron cambios de expresión de más de 5 veces. Shimada *et al.* (2005), con este mismo nivel umbral obtuvieron un porcentaje similar en un análisis con un conjunto menor de genes de cítricos.

Los perfiles de expresión de las 3588 sondas significativas fueron agrupados en base a la similitud de tendencias usando el algoritmo SOTA (Herrero *et al.* 2001); para ello se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson como función de distancia. El análisis indicó que los cambios de expresión asociados con el desarrollo y la maduración interna de la pulpa de los frutos cítricos se ajustaba a cinco patrones diferentes (**Figura 3.1**; **Tabla 3.2**).

Del total de sondas significativas, 1955 presentaron inducción durante el desarrollo y la maduración del fruto. El cluster 1, compuesto por 1088 sondas, presentó un incremento continuo de los niveles de transcritos, mientras que las 867 sondas incluidas en el cluster 2 se indujeron transitoriamente durante la fase II. Los 1633 genes que se reprimieron se distribuyeron de la siguiente forma: 1253 sondas (cluster 3) experimentaron una reducción progresiva durante el desarrollo y la maduración de los frutos, 256 mostraron un rápido descenso de los niveles de transcrito, manteniéndose bajos posteriormente (cluster 4) y las restantes 124 sondas se reprimieron temporalmente, alcanzando los niveles de expresión iniciales durante la fase de maduración (cluster 5).

La clasificación funcional de los genes se llevó a cabo mediante comparación con la base de datos MIPS (Munich Information Center for Protein Sequences). Previamente, las sondas habían sido clasificadas asignándoles categorías funcionales a partir de sus ortólogos de *Arabidopsis* (Forment *et al.*, 2005). De las 3588 sondas significativas, 2647 tenían asignado

un ortólogo en *Arabidopsis* (**Tabla 3.2**). El análisis de la distribución de los genes significativos en las categorías funcionales MIPS, indicó que la reprogramación transcripcional durante el desarrollo y la maduración del fruto de los cítricos comprendía genes de todas las categorías funcionales principales (**Tabla 3.2**).

La comparación de la distribución de los genes en categorías funcionales entre el conjunto de todas las sondas significativas y cada cluster individual reveló enriquecimientos significativos en las siguientes categorías: i) destino proteico y degradación proteolítica (cluster 1), ii) interacción con el medioambiente y proteínas virales y plasmídicas (clusters 3, 4 y 5), y iii) transcripción y mecanismos de transducción de señales (cluster 2).

El enriquecimiento del cluster 1 en genes implicados en destino proteico y degradación proteolítica (principalmente proteasas de cisteína y proteínas implicadas en la ruta de proteólisis mediada por ubiquitina) puede estar relacionado con la iniciación del proceso de senescencia de los frutos (Thomas *et al.*, 2003), debido a que estos dos sistemas proteolíticos juegan papeles importantes en la degradación de las proteínas y el reciclado durante la senescencia (Gepstein *et al.*, 2003).

Para abordar con precisión el enriquecimiento de los clusters 3, 4 y 5, en genes que pertenecen a las categorías de interacción con el medioambiente y proteínas virales y plasmídicas, serían necesarios estudios adicionales que no entran dentro de los objetivos de esta tesis.

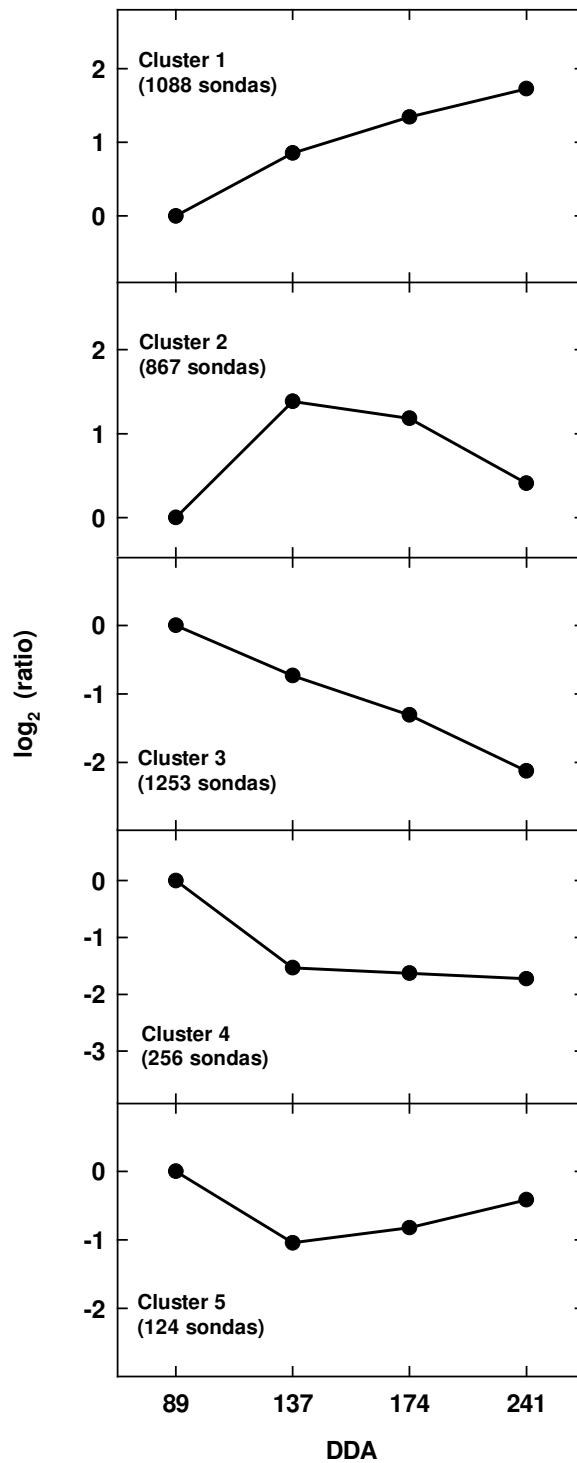


Figura 3.1. Agrupamiento por tendencias de los perfiles de expresión de los genes durante el desarrollo y la maduración de la pulpa de los frutos de Clementina de Nules. Las muestras recogidas el día 89 después de antesis se compararon con las muestras de 137, 174 y 241 DDA. Para el agrupamiento con el algoritmo SOTA se utilizaron todas las sondas que mostraron cambios significativos de la expresión en al menos uno de los contrastes. Los datos son el resultado de los valores medios de expresión \pm el error estándar (barras de error menores que el símbolo). Se indica el número de sondas significativas en cada cluster.

Tabla 3.2. Distribución en categorías funcionales MIPS de los genes que mostraron cambios significativos de expresión durante el desarrollo y la maduración de la pulpa de Clementina de Nules.

| Categoría funcional | Total | Cluster 1 | Cluster 2 | Cluster 3 | Cluster 4 | Cluster 5 |
|--|----------------|-------------------|--------------------|------------------|------------------|------------------|
| | % ^a | | | | | |
| Metabolismo | 16.32 | 15.62 (221) | 15.03 (171) | 17.02 (328) | 19.32 (80) | 15.63 (30) |
| Energía | 5.01 | 4.73 (67) | 4.13 (47) | 6.38 (123) | 1.45 (6) | 6.25 (12) |
| Ciclo celular y procesamiento de DNA | 4.36 | 4.66 (66) | 4.39 (50) | 3.84 (74) | 5.80 (24) | 4.17 (8) |
| Transcripción | 5.17 | 4.81 (68) | 7.47 (85) | 4.00 (77) | 5.07 (21) | 6.25 (12) |
| Síntesis de proteínas | 5.76 | 3.04 (43) | 3.34 (38) | 8.20 (158) | 8.70 (36) | 9.38 (18) |
| Plegamiento, modificación y destino de proteínas | 6.21 | 8.20 (116) | 7.47 (85) | 4.51 (87) | 4.59 (19) | 4.69 (9) |
| Degradación de proteínas | 3.07 | 5.23 (74) | 3.43 (39) | 1.45 (28) | 2.66 (11) | 2.08 (4) |
| Transporte celular y mecanismos de transporte | 8.67 | 8.34 (118) | 7.21 (82) | 10.28 (198) | 6.04 (25) | 9.38 (18) |
| Comunicación celular / Mecanismos de transducción de señales | 6.74 | 7.63 (108) | 10.19 (116) | 4.51 (87) | 6.04 (25) | 3.65 (7) |
| Defensa | 7.24 | 7.35 (104) | 8.26 (94) | 7.42 (143) | 4.59 (19) | 4.17 (8) |
| Regulación sistémica / interacción con el medioambiente | 2.36 | 1.41 (20) | 1.67 (19) | 2.18 (42) | 6.76 (28) | 5.73 (11) |
| Desarrollo (Sistémico) | 4.29 | 3.82 (54) | 4.75 (54) | 4.41 (85) | 4.59 (19) | 3.13 (6) |
| Elementos transponibles, proteínas virales y plasmídicas | 1.36 | 0.28 (4) | 0.53 (6) | 2.80 (54) | 0.72 (3) | 1.04 (2) |
| Control de la organización celular | 0.59 | 0.49 (7) | 0.35 (4) | 0.57 (11) | 0.97 (4) | 2.08 (4) |
| Diferenciación celular | 4.05 | 3.11 (44) | 3.87 (44) | 4.36 (84) | 5.80 (24) | 5.21 (10) |
| Localización subcelular | 6.55 | 5.65 (80) | 5.62 (64) | 7.11 (137) | 7.97 (33) | 9.90 (19) |
| Proteínas no clasificadas | 5.37 | 6.86 (97) | 6.85 (78) | 3.94 (76) | 3.86 (16) | 3.13 (6) |
| Sin clasificación MIPS del ortólogo de Arabidopsis | 6.88 | 8.76 (124) | 5.45 (62) | 7.01 (135) | 5.07 (21) | 4.17 (8) |

^a Frecuencia de las sondas de las micromatrices que tienen ortólogos de *Arabidopsis* (Forment *et al.*, 2005). El número total de sondas se encuentra entre paréntesis. Los números en negrita indican un enriquecimiento significativo de la categoría en un grupo particular en comparación con el conjunto de datos total. (P < 0,01 después de la corrección de Bonferroni para tests múltiples).

3.3.2. Factores de transcripción y otras proteínas reguladoras

Más del 10 % del conjunto de sondas significativas correspondió a genes incluidos en las categorías de transcripción, transducción de señales y mecanismos de comunicación celular (**Tabla 3.2**). La micromatriz de cDNA utilizada contenía 197 sondas correspondientes a ortólogos de factores de transcripción de *Arabidopsis*. Estos ESTs pertenecían a 30 de las 42 familias de factores de transcripción incluidas en el “*Arabidopsis* Gene Regulatory Information Server” (AGRIS; Davuluri *et al.*, 2003). El conjunto de datos significativos incluía 61 sondas que se correspondían con 55 genes de factores de transcripción distribuidos en 22 de dichas familias (**Tabla 3.3**).

Tabla 3.3. Número de factores de transcripción por familia que muestran cambios significativos en la expresión, basados en análisis de micromatrices durante el desarrollo y la maduración de la pulpa de frutos de la mandarina Clementina de Nules.

| Familia | Inducidos (clusters 1, 2) | Reprimidos (clusters 3, 4, 5) |
|--------------|------------------------------|----------------------------------|
| NAC | 9 | - |
| CCAAT-HAP5 | 1 | - |
| WRKY | 1 | - |
| C2C2-YABBY | 1 | - |
| C2H2 | 1 | - |
| TUB | 1 | - |
| ABI3VP1 | 1 | - |
| HSF | 1 | - |
| VOZ-9 | 1 | - |
| ARF | - | 2 |
| bZIP | - | 1 |
| C2C2-CO-like | - | 1 |
| TCP | - | 1 |
| C2C2-Gata | - | 1 |
| MADS | 5 | 2 |
| MYB | 5 | 2 |
| C3H | 4 | 2 |
| BHLH | 3 | 2 |
| HB | 2 | 4 |
| GRAS | 2 | 1 |
| AP2-EREBP | 1 | 1 |
| MYB-related | 1 | 1 |

Nueve de estas familias (NAC, CCAAT-HAP5, WRKY, C2C2-YABBY, C2H2, TUB, ABI3VP1, HSF y VOZ-9) contenían solamente factores de transcripción inducidos (clusters 1 y 2) mientras que cinco (ARF, bZIP, C2C2-CO-like, TCP y C2C2-Gata) incluían solamente genes reprimidos (clusters 3, 4 y 5). Finalmente, ocho familias (MYB, MADS, C3H, BHLH, HB, GRAS, AP2-EREBP y MYB-related) poseían genes, inducidos y reprimidos. No se observaron cambios significativos en la expresión de los genes de las restantes ocho familias representadas en el chip (G2-like, GRF, C2C2-Dof, CAMTA, SBP, Alfin-like, CCAAT-DR1, y EIL), presumiblemente debido a su participación en funciones celulares de housekeeping.

La familia más abundante de factores de transcripción inducidos fue la familia NAC (**Tabla 3.3**) que constituye una familia amplia de factores de transcripción específicos de plantas y caracterizados por poseer un dominio N-terminal conservado (Aida *et al.*, 1997; Olsen *et al.*, 2005). No se conocen las funciones de los factores NAC aunque se ha descrito que esta familia se encuentra relacionada con un amplio espectro de procesos biológicos (revisado en Ooka *et al.*, 2003 y Olsen *et al.*, 2005). Su relación con la maduración de los frutos ha sido sugerida especialmente para el factor SENU5, que se induce durante la maduración del fruto de tomate (John *et al.*, 1997). Resulta interesante que las nueve sondas de la micromatriz que representan siete genes NAC de cítricos se indujeron durante el desarrollo y la maduración de la pulpa de los frutos. Tres de estos factores NAC inducidos eran ortólogos de los genes de *Arabidopsis* AtNAC2, NAP y At3g04070 que habían sido previamente relacionados con procesos vegetativos (Takada *et al.*, 2001) y reproductivos del desarrollo (**Tabla 3.4**). Por ejemplo, Sablowski y Meyerowitz (1998) demostraron que NAP está implicado en la transición de la división celular a la expansión celular durante el desarrollo de los órganos florales de *Arabidopsis*. Nuestros resultados sugieren que estos genes pueden jugar también un papel durante el desarrollo del fruto, puesto que en los cítricos se produce una transición más gradual pero equivalente entre la fase I y la fase II (Bain, 1958). De igual forma, otros dos factores NAC de cítricos eran ortólogos de los genes ATAF1 y ATAF2 de *Arabidopsis*, que habían sido previamente implicados en la respuesta frente a heridas y ataques por patógenos basándose en la expresión en sus ortólogos de patata (Collinge y Boller, 2001). Además, se ha descrito que muchos genes implicados en la respuesta a heridas, patógenos e insectos se inducen durante el desarrollo de los frutos (Shimada *et al.*, 2005). Dado que los frutos cítricos se cultivan en explotaciones al aire libre y por lo tanto están permanentemente expuestos a heridas o al ataque de los insectos, resulta razonable pensar que la expresión de los dos factores ATAF podrían estar relacionados con estas condiciones. Las condiciones de

sequía del verano en las zonas del mediterráneo cuando se produce la expansión celular de los frutos cítricos (fase II) puede ser la razón por la que se produce la inducción de otros factores NAC de cítricos ortólogos de RD26 (**Tabla 3.4**), un gen inducido por sequía, estrés salino y ácido abscísico (Fujita *et al.*, 2004).

Tabla 3.4. Factores de transcripción NAC inducidos durante el desarrollo y la maduración de la pulpa de frutos de mandarina Clementina de Nules.

| Cluster | Número de acceso del EST de cítricos | Ortólogo de <i>Arabidopsis</i> | Nombre del gen | Proceso biológico | Referencias |
|---------|--------------------------------------|--------------------------------|----------------|---------------------------------|---|
| 1 | CX289558 | At3g15510 | AtNAC2 | Desarrollo del meristemo apical | Takada et al., 2001 Sablowski y Meyerowitz, 1998 |
| 1 | CX291911 | At1g69490 | NAP | Desarrollo de la flor | |
| 1 | CX292873 | At3g04070 | | Desarrollo ^a | |
| 1 | CX292958 | At3g04070 | | Desarrollo ^a | |
| 1 | CX290892 | At4g27410 | RD26 | Señalización por estrés | Fujita et al., 2004 |
| 1 | CX306190 | At4g27410 | RD26 | Señalización por estrés | Fujita et al., 2004 |
| 2 | CX292209 | At1g01720 | ATAF1 | Respuesta a patógenos y heridas | Collinge y Boller, 2001 |
| 2 | CX292637 | At5g08790 | ATAF2 | Respuesta a patógenos y heridas | Collinge y Boller, 2001 |
| 2 | CX289140 | At4g35580 | | Desconocidos | |

^a Sin evidencia experimental, proceso biológico deducido a partir de la similitud estructural o de secuencia (<http://www.tigr.org>)

También se encontraron otras familias de factores de transcripción aparentemente implicadas en el desarrollo y la maduración de los frutos (**Tabla 3.3**). Aunque una discusión detallada de su significado fisiológico o función durante el desarrollo de los frutos se encuentra fuera de los objetivos de este estudio, merece la pena destacar que, por ejemplo, al menos cinco y dos genes MADS-Box, se indujeron y reprimieron respectivamente durante el desarrollo y la maduración de la pulpa de los frutos cítricos. Esta familia se ha relacionado frecuentemente con el desarrollo y la maduración de diferentes especies de frutos, incluidas las manzanas y las fresas (revisado en Giovannoni, 2001).

Además de los factores de transcripción se encontraron también numerosas sondas de genes que codificaban proteínas implicadas en mecanismos de transducción de señales (**Tabla 3.2**). Entre éstas, se incluían tres proteín-fosfatasa, seis proteínas de unión a GTP de la familia Ras y dieciséis proteín-quinasa, de las cuales diez correspondían a serina/treonina quinasa, sugiriendo una posible activación de esta ruta de señalización durante el desarrollo y la maduración de los frutos.

El mayor enriquecimiento de genes de proteínas reguladoras se detectó en el cluster 2 (**Tabla 3.2**), formado por genes que se inducen aproximadamente en la mitad de la fase de crecimiento rápido del fruto (**Figura 3.1**). Esto sugiere que los frutos en esta fase están reprogramando la maquinaria celular para afrontar las complejas modificaciones implicadas en la transición de la fase II a la fase III.

3.3.3. Regulación metabólica

3.3.3.1. Descripción general

Dentro del conjunto total de sondas que mostraron resultados significativos se detectó un gran número de genes que codificaban enzimas implicadas en procesos metabólicos. A pesar de ello, no se observó ningún enriquecimiento significativo de los genes del metabolismo en ninguno de los clusters. Los resultados observados pueden ser explicados, por el hecho de que los perfiles de expresión de los genes implicados en redes complejas que comparten múltiples rutas metabólicas muestran patrones de expresión “compensatorios” con cambios simultáneos en direcciones opuestas, tal y como se describe en Ruuska *et al.* (2002).

Para analizar los cambios en la expresión de los genes asociados a rutas metabólicas, los resultados de expresión de las sondas que resultaron significativas se representaron gráficamente sobre las rutas metabólicas de *Arabidopsis* utilizando la herramienta AraCyc Omics Viewer (Mueller *et al.*, 2003). El total de los datos obtenidos con este análisis se encuentra representado en la **figura suplementaria 1**, mientras que la **Tabla 3.5** resume los resultados de las rutas metabólicas principales.

Es interesante destacar que, aunque la micomatriz de cDNA utilizada contiene pocos unigenes aislados de los tejidos de la pulpa (Forment *et al.*, 2005), los resultados obtenidos incluyen genes que forman parte de los procesos fisiológicos principales que tienen lugar durante el desarrollo de la pulpa. Esto confirma que dichos procesos pueden ser estudiados mediante el abordaje aquí descrito.

Tabla 3.5. Rutas metabólicas inducidas y reprimidas durante el desarrollo y la maduración de la pulpa de Clementina de Nules basado en el análisis de micromatrices.

| Inducidos | Reprimidos |
|-------------------------------------|--------------------------------|
| Síntesis de celulosa | Hidrólisis de sacarosa |
| Oxidación de ácidos grasos | Biosíntesis de almidón |
| Biosíntesis de carotenoides | Glicolisis |
| Hidrólisis de conjugados de auxinas | Ruta de las pentosas fosfato |
| | Ciclo de Calvin |
| | Biosíntesis de ácidos grasos |
| | Biosíntesis de ácido ascórbico |
| | Biosíntesis de lignina |
| | Biosíntesis de suberina |
| | Biosíntesis de antocianina |
| | Biosíntesis de flavonoides |
| | Biosíntesis de clorofila |

Las relaciones existentes entre la expresión génica, los niveles de los metabolitos y los principales procesos fisiológicos que se producen en los frutos cítricos, tales como: la expansión celular, la acumulación de agua, el incremento del contenido de carbohidratos, la reducción del ácido cítrico y los procesos del metabolismo secundario como: el intercambio de pigmentos, la reducción de la vitamina C y el descenso del contenido de lípidos; se describen a continuación, con la excepción de la reducción de la concentración del ácido cítrico que se describe de manera más detallada en el capítulo siguiente.

La **Tabla 3.6** muestra el contenido en agua, carbohidratos solubles y ácido ascórbico (vitamina C) en frutos de la variedad Clementina de Nules recolectados los días 89 y 241 después de la antesis.

Tabla 3.6. Contenido de agua y niveles de los metabolitos seleccionados en la pulpa de la mandarina Clementina Nules durante la acumulación (89 DDA) y después del descenso de la acidez (241 DDA). Los datos son medias (\pm ES, $n \geq 3$) de un set de resultados típico.

| Metabolitos | 89 DDA | 241 DDA |
|---|------------------|-----------------|
| Agua (mg /g Peso fresco) | 767.5 \pm 12.5 | 855.0 \pm 5.0 |
| Carbohidratos solubles (mg/g Peso fresco) | | |
| Sacarosa | 5.7 \pm 0.6 | 32.1 \pm 1.7 |
| Glucosa | 1.7 \pm 0.4 | 15.7 \pm 1.6 |
| Fructosa | 1.9 \pm 0.4 | 17.3 \pm 1.4 |
| Ácido ascórbico (vitamina C) (mg/ml extracto de zumo) | 0.6 \pm 0.07 | 0.3 \pm 0.04 |

3.3.3.2. Expansión celular en la fase II

El crecimiento que se produce durante la fase II del desarrollo de los frutos es debido principalmente a la expansión celular (Bain, 1958), lo que requiere de la síntesis de componentes de la pared celular. Los resultados obtenidos indican que se produce un incremento pronunciado en la expresión del gen de la celulosa sintasa (**Figura 3.2**), la enzima responsable de la síntesis de celulosa que es el principal constituyente de la pared celular de las plantas. Sin embargo, la biosíntesis de componentes de la pared secundaria como la lignina y la suberina se encuentra reprimida (**Tabla 3.5**), puesto que la expresión de la enzima fenilalanina amonio liasa, enzima que cataliza el primer paso de las dos rutas anteriores, se reduce (**Figura 3.2**). La lignina es abundante en los haces vasculares, y actúa aumentando la resistencia y firmeza de las paredes celulares, mientras que la suberina les confiere hidrofobicidad. A pesar de que no existen datos específicos de las proporciones de los distintos componentes de las paredes celulares en los frutos cítricos, la maduración implica un cierto reblandecimiento de las membranas de los segmentos y de los haces vasculares de la pulpa (Saunt, 1990), consecuencia probablemente de la selección dirigida, ya que mejora la comestibilidad de la fruta. Además, se produce un incremento en la expresión de la indol-3-acetil-alanina hidrolasa (**Figura 3.2**), que presumiblemente interviene en la hidrólisis de los conjugados de las auxinas (**Tabla 3.5**). Dado que las auxinas son factores hormonales limitantes en el control de la expansión celular durante la fase II (Takahashi *et al.*, 1965; Agustí *et al.*, 2002) esta observación sugiere que la liberación de auxinas a partir de formas conjugadas es un proceso activo para aumentar la disponibilidad de estas hormonas durante el desarrollo de la pulpa.

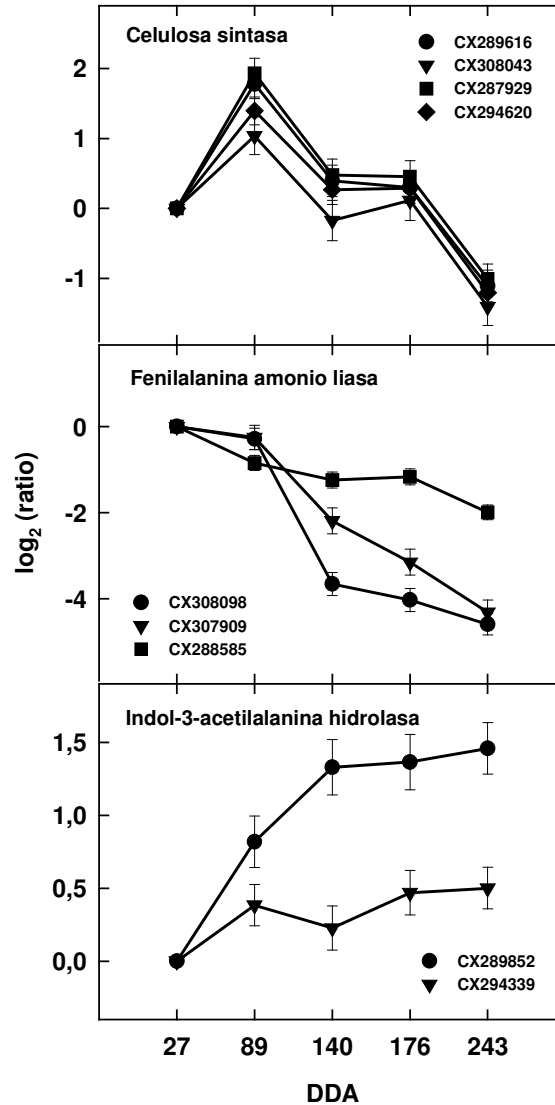


Figura 3.2. Perfiles de expresión génica de proteínas implicadas en la expansión celular que presentaron cambios significativos a lo largo de la maduración del endocarpio de la Clementina de Nules. El número de acceso del GenBank de cada EST se indica en la leyenda. Los datos son media \pm E.S de 3 réplicas.

3.3.3.3. Acumulación de agua: genes de acuaporinas

Dentro del conjunto de datos significativos se detectaron siete sondas correspondientes a cuatro genes de acuaporinas de cítricos. Uno de ellos, que se encontraba inducido durante el desarrollo de la pulpa de los frutos, era el ortólogo de la acuaporina gamma-TIP (Tonoplast-Intrinsic Protein) de *Arabidopsis*, que se localiza en el tonoplasto. Los otros tres se

encontraban reprimidos y se correspondían con una acuaporina delta-TIP del tonoplasto y dos acuaporinas de la membrana plasmática (**Tabla 3.7**).

Tabla 3.7. Acuaporinas con cambios significativos de expresión durante el desarrollo y la maduración de la pulpa de frutos de la mandarina Clementina de Nules. Datos basados en el análisis de micromatrices.

| Grupo | Número de acceso del EST de <i>Citrus</i> | Ortólogo de <i>Arabidopsis</i> | Nombre del gen | Localización | Referencias |
|-------|---|--------------------------------|--------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| 1 | CX293832 | At2g36830 | Gamma-TIP | Tonoplasto | Saito <i>et al.</i> , 2002 |
| 1 | CX288750 | At2g36830 | Gamma-TIP | Tonoplasto | Saito <i>et al.</i> , 2002 |
| 3 | CX299889 | At3g16240 | Delta TIP | Tonoplasto | Daniels <i>et al.</i> , 1996 |
| 3 | CX289173 | At4g00430 | TMP-C | Membrana plasmática | Johanson <i>et al.</i> , 2001 |
| 3 | CX300866 | At4g23400 | MIP family protein | Membrana plasmática ^a | |
| 3 | CX291733 | At4g23400 | MIP family protein | Membrana plasmática ^a | |
| 3 | CX288560 | At4g23400 | MIP family protein | Membrana plasmática ^a | |

^a Sin evidencia experimental pero con localización inferida a partir de similitudes estructurales o de secuencia (<http://www.tigr.org>)

Dado que durante el crecimiento del fruto se produce un incremento pronunciado del contenido en agua (**Tabla 3.6**), estos resultados sugieren que existe un importante transporte simplástico de agua en los frutos maduros. Jauh *et al.* (1999), observaron que las vacuolas con funciones diferentes contenían diferentes clases de proteínas intrínsecas del tonoplasto. De este modo, las vacuolas que almacenan pigmentos y proteínas vegetativas contienen acuaporinas delta-TIP, mientras que las vacuolas en las que predominan las funciones líticas contienen acuaporinas gamma-TIP. En los cítricos, el cambio progresivo que se produce durante el desarrollo de los frutos de la forma delta-TIP (crecimiento temprano del fruto) a la forma gamma-TIP (final del crecimiento del fruto) parece reflejar un cambio en la función vacuolar. Por otro lado, el descenso en la expresión de las acuaporinas de la membrana plasmática sugiere que en los frutos maduros predomina el transporte simplástico de agua.

3.3.3.4. Metabolismo de los carbohidratos

Durante el desarrollo de los frutos cítricos, existen dos comportamientos claramente diferenciados en relación con el metabolismo de los carbohidratos. En una primera etapa, coincidiendo con la fase de división celular, los frutos actúan como sumideros de utilización de carbohidratos, mientras que a partir del periodo de alargamiento celular, pasan a ser de sumideros de almacenamiento (Mehouachi *et al.*, 1995; Gómez-Cadenas *et al.*, 2000). En los frutos maduros, tanto la sacarosa (el carbohidrato normalmente transportado) como la glucosa y la fructosa (las principales hexosas de los frutos) se acumulan en gran cantidad (Tabla 3.6). Esta actividad sumidero de los frutos cítricos se correlaciona con los datos obtenidos de la micomatriz, que indican que la síntesis de carbohidratos a través del ciclo de Calvin se reprime a lo largo del desarrollo (Tabla 3.5), mientras que la expresión de un posible transportador de azúcares (el ortólogo del gen At2g48020 de *Arabidopsis*) se induce significativamente (Figura 3.3).

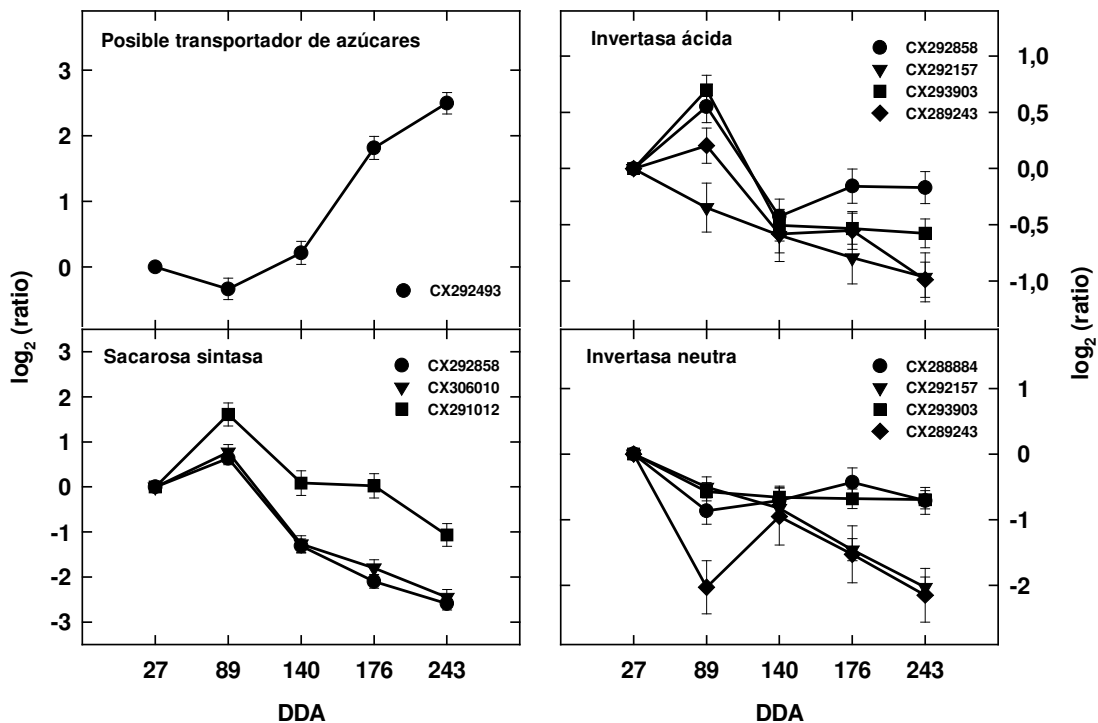


Figura 3.3. Perfiles de expresión génica de proteínas del metabolismo de los carbohidratos que presentaron cambios significativos a lo largo de la maduración del endocarpio de la Clementina de Nules. El número de acceso del GenBank de cada EST se indica en la leyenda. Los datos son media \pm E.S de 3 réplicas.

En consonancia con la observación de que los niveles de sacarosa, glucosa y fructosa en los frutos maduros alcanzan una ratio de 2:1:1 (**Tabla 3.6**) se encuentra el resultado de que la expresión de los genes que intervienen en el catabolismo de la sacarosa, la sacarosa sintasa y las invertasas neutras y ácidas, disminuye (**Figura 3.3**) de manera importante en los frutos maduros.

Esta reducción coincide con la represión de la biosíntesis de almidón (glucosa-6-fosfato isomerasa), la inducción de la gluconeogénesis (fosfoglucomutasa) (**Figura 3.4**) y la utilización de la glucosa-6-fosfato a través de la ruta de las pentosas fosfato (**Tabla 3.5**). Además, se observa que los enzimas relacionados con la ruta glicolítica, en general, se reprimen durante la maduración, aunque no todos los enzimas glicolíticos presentan una regulación similar, tal y como se describe en otros sistemas (Hening *et al.*, 2004; Ruuska *et al.*, 2002). Todos estos datos de expresión génica se correlacionan con el aumento de sacarosa y hexosas que se produce durante el desarrollo de la pulpa (**Tabla 3.6**).

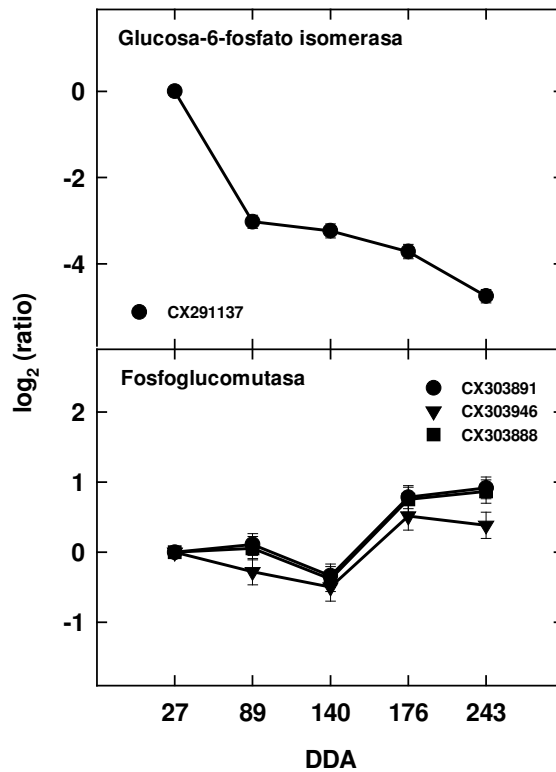


Figura 3.4. Perfiles de expresión génica de proteínas de la biosíntesis de almidón que presentaron cambios significativos a lo largo de la maduración del endocarpio de la Clementina de Nules. El número de acceso del GenBank de cada EST se indica en la leyenda. Los datos son media \pm E.S de 3 réplicas.

3.3.3.5. Metabolismo secundario. Sustitución de pigmentos

Entre los cambios de expresión génica que se producen en las rutas del metabolismo secundario se puede destacar la inducción de la expresión del gen de la fitoeno sintasa (**Figura 3.5**), enzima clave de la ruta de la biosíntesis de los carotenoides (**Figura 3.6**), y la represión de la enzima protoclorofilida reductasa (**Figura 3.5**), implicada en la biosíntesis de clorofilas.

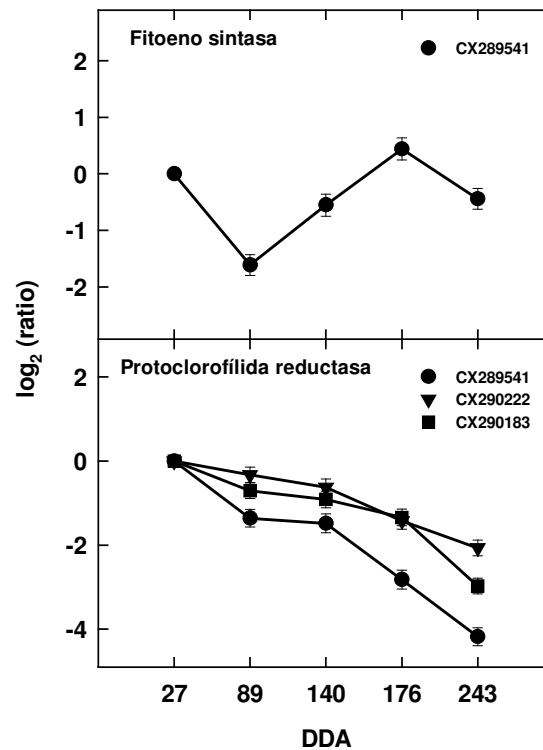


Figura 3.5. Perfiles de expresión génica de proteínas del metabolismo de los pigmentos que presentaron cambios significativos a lo largo de la maduración del endocarpio de la Clementina de Nules. El número de acceso del GenBank de cada EST se indica en la leyenda. Los datos son media \pm E.S de 3 réplicas.

Estos resultados son compatibles con las determinaciones de clorofilas y carotenoides (**Figura 3.6**) que indican que en los frutos maduros se produce una acumulación de carotenoides (25 veces) acompañada de una pérdida de clorofila (80 %).

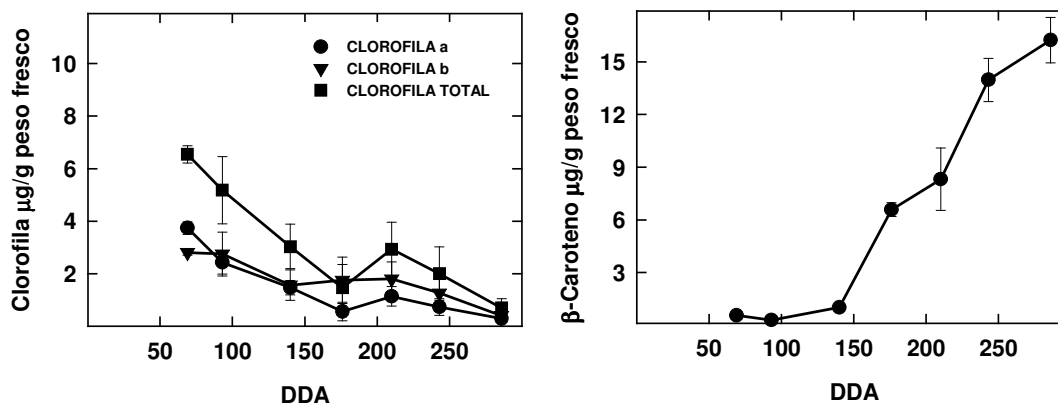


Figura 3.6. Evolución de la concentración de clorofilas y β -caroteno en la pulpa de la variedad Clementina de Nules en función del tiempo (días después de la antesis).

Por otro lado la reducción observada en la expresión de los genes de la chalcona sintasa, chalcona isomerasa y flavonoide 3'-monooxigenasa (**Figura 3.7**) indica una reducción de las rutas de síntesis de flavonoides y antocianos (**Tabla 3.5**). Los flavonoides generalmente son muy abundantes en los frutos jóvenes en desarrollo (más del 50 % del total de los sólidos solubles) mientras que están en pequeña proporción en los frutos cítricos maduros (Baldwin, 1993).

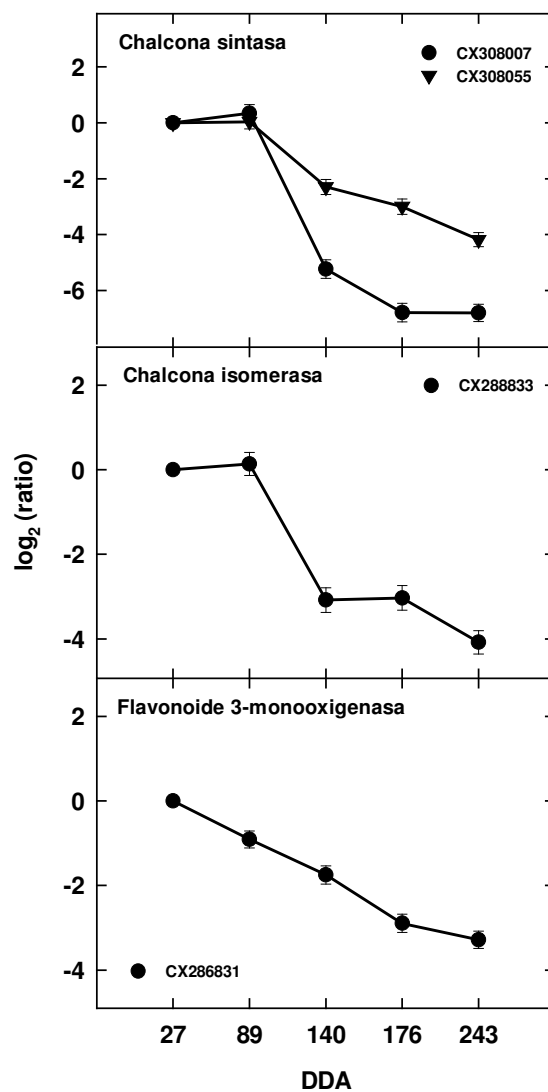


Figura 3.7. Perfiles de expresión génica de, chalcona sintasa, chalcona isomerasa y flavonoide 3-monooxigenasa. El número de acceso del GenBank de cada EST se indica en la leyenda. Los datos son media \pm E.S de 3 réplicas.

3.3.3.6. Reducción de los niveles de vitamina C

Los datos obtenidos muestran un descenso significativo en la expresión de algunos enzimas implicados en la biosíntesis del ácido ascórbico (vitamina C) como la glucosa-6-fosfato isomerasa (**Figura 3.4**), la fosfomanomutasa y la GDP-manosa 3,5-epimerasa (**Figura 3.8**). Este descenso de los niveles de transcritos está acompañado por una reducción de alrededor del 50 % en el nivel de ácido ascórbico que se produce entre los frutos jóvenes y maduros (**Tabla 3.6**).

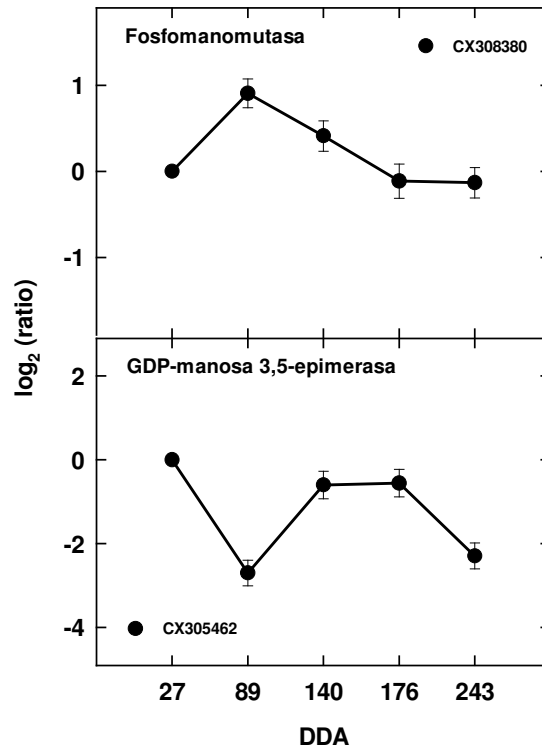


Figura 3.8. Perfiles de expresión génica de proteínas del metabolismo de la vitamina C que presentaron cambios significativos a lo largo de la maduración del endocarpio de la Clementina de Nules. El número de acceso del GenBank de cada EST se indica en la leyenda. Los datos son media \pm E.S de 3 réplicas.

3.3.3.7. Reducción de lípidos

Nagy y Nordby (1971) observaron que los ácidos grasos, como el palmítico y el palmitoleico son abundantes en las vesículas de zumo de los frutos jóvenes de cítricos, reduciéndose durante su crecimiento. Los resultados obtenidos del análisis de las micromatrices coinciden con las observaciones anteriores, ya que algunos genes que codifican enzimas de la biosíntesis de ácidos grasos como la 3-oxoacil ACP sintasa y la enoil ACP reductasa (ACP = acil carrier protein) (**Figura 3.9**), se reprimieron, mientras que se indujeron, enzimas encargadas de la oxidación como la acetil-CoA C-aciltransferasa y la enoil-CoA hidratasa (**Figura 3.9**).

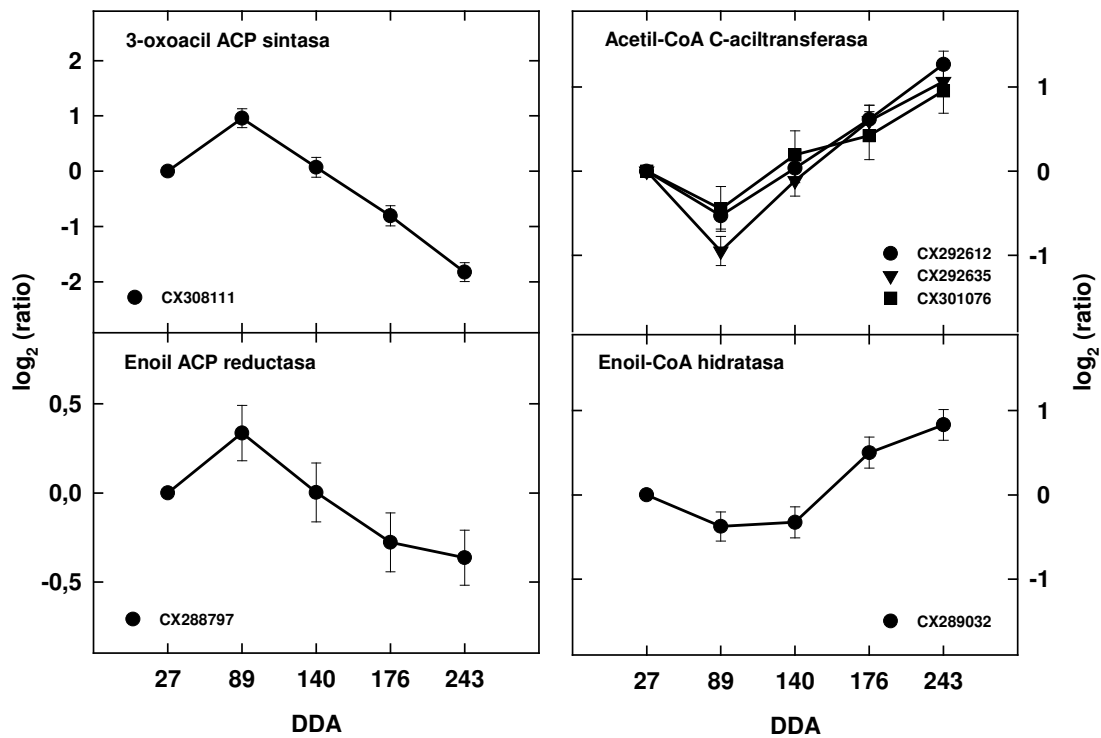
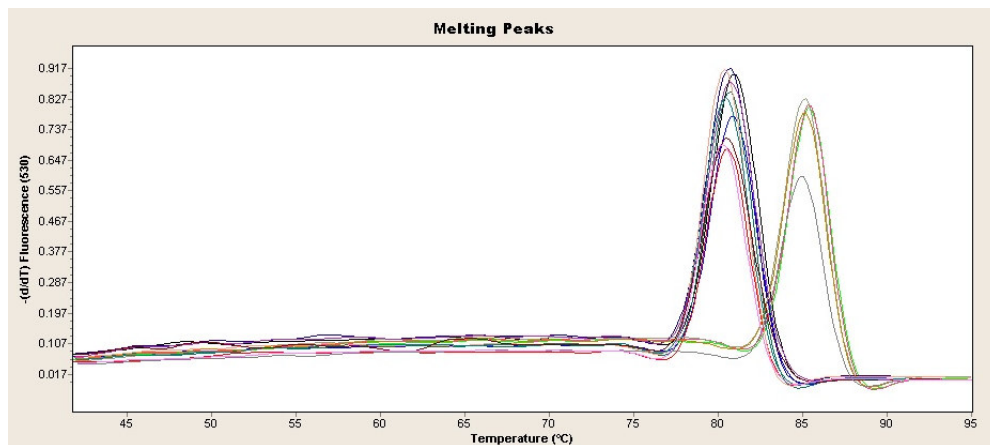
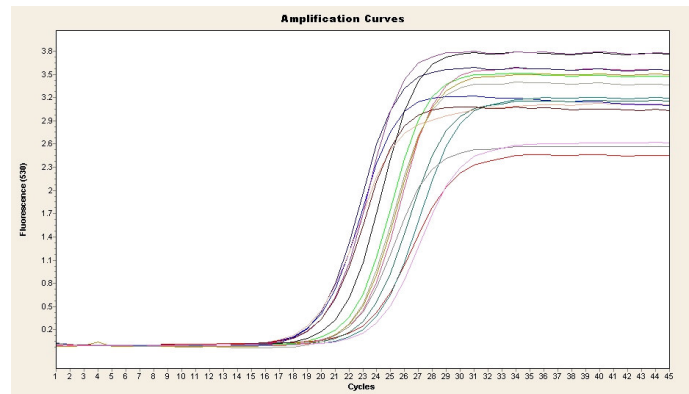


Figura 3.9. Perfiles de expresión génica de proteínas del metabolismo de los ácidos lipídicos que presentaron cambios significativos a lo largo de la maduración del endocarpio de la Clementina de Nules. El número de acceso del GenBank de cada EST se indica en la leyenda. Los datos son media \pm E.S de 3 réplicas.

IV. Degradación del ácido cítrico durante la maduración.



4.1. Introducción

La maduración interna en la mayoría de los frutos cítricos se caracteriza por la acumulación de azúcares y la degradación de ácidos (Bain, 1958; Erickson, 1968; Davies y Albrigo, 1994). En ocasiones, hay un cierto desfase entre la maduración interna y la externa (Spiegel-Roy y Goldschmidt, 1996), como sucede por ejemplo con las variedades de clementina Clementard y Hernandina (Soler, 1999). Esta característica indica que la maduración interna y la maduración externa son dos procesos fisiológicos aparentemente independientes, y nos permite enfocar su estudio de forma separada.

En las mandarinas del grupo clementinas, y en particular en la Clementina de Nules, la degradación de los ácidos supone un inconveniente cuando por motivos del mercado se pretende retrasar su recolección, puesto que este marcado descenso de la acidez de los frutos disminuye en gran medida su calidad organoléptica, hasta el punto de tornarse inaceptables para el consumo.

La mayoría de los estudios sobre la maduración interna de los frutos cítricos que se han realizado hasta el momento (Sinclair y Ramsey, 1944; Bain, 1958; Erickson, 1968; Davies y Albrigo, 1994), se han enfocado hacia la determinación de los principales metabolitos que componen el zumo de los frutos y su variación durante las últimas fases de la maduración, cuando comienza a aumentar la concentración de azúcares y a disminuir la de los ácidos.

En los frutos cítricos los ácidos se encuentran almacenados en la vacuola de las células del endocarpio (Mehouachi *et al.*, 1995; Lobit *et al.*, 2003), sin embargo, poco se conoce respecto a los mecanismos de utilización de esos ácidos, principalmente del ácido cítrico.

Estudios realizados por Sadka *et al.* (2000a) sugieren que el ácido cítrico almacenado en la vacuola es transportado al citosol donde es catabolizado por medio de la acción de la aconitasa citosólica, de esta forma el citrato es utilizado para la síntesis de aminoácidos.

Los últimos estudios llevados a cabo mediante análisis proteómicos indican que durante la reducción de la acidez que se produce en los frutos cítricos durante las últimas fases de su desarrollo, el citrato es utilizado, además de en la síntesis de aminoácidos, en la producción de azúcares y en el metabolismo del acetil-CoA (Katz, *et al.* 2007).

En este capítulo se han identificado los genes responsables de la metabolización del ácido cítrico durante la maduración de los frutos cítricos y se propone un modelo de su degradación. También se han identificado tres genes de aconitasa presentes en los frutos, a los que se les atribuye un efecto sobre la degradación del ácido cítrico y no sobre la acumulación.

4.2. Materiales y métodos

4.2.1. Material vegetal

En el presente estudio se emplearon frutos partenocárpicos de cítricos procedentes de árboles, cultivados bajo prácticas normales en una parcela homogénea del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA, Moncada, Valencia).

Los frutos fueron recolectados durante las tres fases del desarrollo y la maduración (**Tabla 4.1**). Las muestras de la campaña 2002/2003 se utilizaron para cuantificar los parámetros de calidad (sólidos solubles, ácidos, contenido en zumo y diámetro) de los frutos de las cuatro variedades; las de las campañas 2003/2004 y 2004/2005 para la cuantificación del mRNA de aconitasa mediante análisis Northern blot, para la caracterización fisiológica de la variedad Clementina de Nules y para los análisis de expresión de los genes de aconitasa de Clementina de Nules y Fortune.

Tanto el proceso de muestreo como el tratamiento posterior de las muestras se realizó como se describe en el apartado 3.2.1.

Tabla 4.1. Fechas de muestreo con su equivalente en días después de anthesis (DDA). Se ha considerado como día de anthesis el 30 de abril en todos los años.

| 2002-2003 | | 2003-2004 | | 2004-2005 | |
|------------------|-----|------------------|-----|------------------|-----|
| Fecha | DDA | Fecha | DDA | Fecha | DDA |
| | | 27 de mayo | 27 | | |
| | | 24 de junio | 55 | | |
| 7 de agosto | 99 | 28 de julio | 89 | 20 de julio | 81 |
| 2 de septiembre | 125 | 21 de agosto | 113 | 30 de agosto | 122 |
| 20 de septiembre | 143 | 14 de septiembre | 137 | 30 de septiembre | 153 |
| 19 de octubre | 172 | 21 de octubre | 174 | 29 de octubre | 182 |
| 5 de noviembre | 189 | 26 de noviembre | 210 | 30 de noviembre | 214 |
| 30 de noviembre | 214 | 27 de diciembre | 241 | 3 de enero | 248 |
| 25 de enero | 270 | 10 de febrero | 286 | | |

Las variedades utilizadas fueron las clementinas Clementina de Nules, Marisol y Hernandina (*Citrus clementina* Hort. ex Tan.) y el híbrido Fortune (*Citrus clemntina* Hort. ex Tan. x *Citrus tangerina* Hort. ex Tan.), todas ellas injertadas sobre el patrón citrange Carrizo (*Citrus sinensis* (L.) Osb. x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.; Ortiz, 1985). Se utilizaron tres árboles de cada variedad.

Además, se muestrearon al azar hojas jóvenes de la brotación de primavera de tres árboles de la variedad Clementina de Nules.

4.2.2. Cuantificación de los sólidos solubles totales (SST)

Para la cuantificación de los sólidos solubles se utilizó 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).

4.2.3. Análisis de ácidos

4.2.3.1. Determinación de la acidez total

La acidez de los zumos se determinó mediante valoración de alícuotas de 5 ml con NaOH 0,1 N, usando fenoftaleína como indicador. Dado que el ácido cítrico es el mayoritario de los frutos cítricos (Sinclair *et al.*, 1945; Clements, 1964) el contenido total de ácidos en el zumo se expresó como equivalentes de ácido cítrico.

4.2.3.2. Cuantificación del ácido cítrico mediante cromatografía líquida de adsorción

El análisis de la concentración de ácido cítrico en zumo se realizó con un sistema de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) (Waters 600) equipado con un detector de absorbancia (Waters 2487). Para la detección se monitorizó la absorbancia a 220 nm.

El zumo se centrifugó a 13.000 rpm (en una centrífuga Beckman J2-21, rotor JA-14) y se filtró con un filtro de nylon de 0,45 μm (Cameo) y otro de 0,22 μm C18 (Cameo).

El sobrenadante (50 μl) se inyectó en el HPLC utilizando como eluyente agua desgasificada con un desgasificador In-Line Degasser (Waters), haciéndolo circular con un flujo de 0,6 ml/minuto a través de una columna PL Hi-Plex 300x7,7mm monodispersa de estireno sulfonado/copolimero divinilbenceno (Polymer Laboratories) calentada a 65 °C. La columna había sido lavada previamente con acetonitrilo 30% circulando con un flujo de 1 ml/minuto durante 10 minutos.

4.2.4. Cuantificación de gamma aminobutarato (GABA) y glutamato mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

Se tomaron 15 μl de una muestra de zumo y se evaporaron a sequedad realizando una trimetilsililación al mismo tiempo. El glutamato y el gamma aminobutirato (GABA) se analizaron utilizando un cromatógrafo de gases (Varian Star 3400 CX) acoplado a un espectrómetro de masas (Varian Saturn). Muestras de 1-2 μl se inyectaron a través de una

válvula estanca, la presión de entrada de helio fue de 85 KPa, siendo las temperaturas del inyector, la zona media y el espectrómetro de masas de 250, 250 y 200 °C, respectivamente. Se inyectaron estándares de GABA (Sigma) y glutamato (Sigma) y, posteriormente, las muestras se analizaron según el modo de medición completo mediante GC/MS y GC/MS/MS para su identificación. La cuantificación del GABA y el glutamato se realizó capturando simultáneamente los iones 304 y 292 m/z, respectivamente. La medida se obtuvo tras el análisis de tres medidas por muestra.

4.2.5. Análisis Northern

Se precipitaron 30 µg de RNA total con 0,1 volúmenes de acetato sódico 3M y 2,5 volúmenes de etanol 100% y se resuspendieron en 30 µl de MSE 10X pH 7 (MOPS 1x, EDTA 10 mM y NaAc 0,1 M, formaldehído 18,5 %, formamida desionizada 50 %, 0,5 µl de BrEt 0,5 µg / µl y 4 µl de tampón de carga 6 X (250 µl / ml de BBP 1 %, 650 µl / ml de glicerol 50 % y 150 µl de agua). La muestra se desnaturalizó calentando durante 15 minutos a 65 °C, se enfrió en hielo y se cargó en un gel de agarosa al 1,4% en MSE 1X y 25 ml de formaldehído. Se desarrolló la electroforesis utilizando como tampón MSE 1X. El RNA se transfirió a una membrana de nylon Hybond N (Amersham) según el protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989) y fue fijado a la membrana por irradiación UV con un “GS GeneLinker” (Bio-Rad). La membrana se hibridó una noche a 48 °C según el método de Church y Gilbert (1984). Como sonda se utilizó el cDNA completo de la aconitasa de limón (Sadka *et al.*, 2000a) marcado con α [³²P]dCTP por random priming con el kit Decaprimer II (Ambion).

4.2.6. Cuantificación de RNAs mensajeros por RT-PCR en tiempo real

La extracción y purificación de RNA total de flavedo se llevó a cabo utilizando el RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). El DNA contaminante se eliminó por tratamiento con DNasa I (Qiagen) en la columna de purificación siguiendo las instrucciones del fabricante. La calidad del RNA se evaluó por espectrofotometría UV (Nanodrop) y electroforesis en gel de agarosa (Sambrook *et al.*, 1989).

Para las RT-PCR cuantitativas en tiempo real se utilizó un termociclador (LightCycler 2.0. Roche). La RT-PCR se realizó en un solo paso, para ello se mezclaron 25 ng de RNA total, 2,5 unidades de MultiScribe Reverse Transcriptase (Applied Biosystems), 1 unidad de RNase

Inhibitor (Applied Biosystems), 2 µl de LC FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I (Roche) y 1,2 µl de soluciones 5 µM de los oligonucleótidos específicos de cada gen (**Tabla 4.2**) en un volumen total de 10 µl. Las condiciones de reacción fueron 48 °C 30 minutos, 95 °C 10 minutos y 40 ciclos de 95 °C 20 segundos, 58 °C 10 segundos y 72 °C 15 segundos. Los valores de intensidad de fluorescencia fueron adquiridos durante los pasos de extensión a 72 °C. Los oligonucleótidos fueron diseñados a partir de las secuencias de cítricos disponibles en el Gene Bank mediante el programa Primer express (Applied Biosystems).

Tabla 4.2. Oligonucleótidos utilizados como cebadores para la RT-PCR en tiempo real.

| Gen | Orientación del oligonucleótido | Secuencia del oligonucleótido ^a | Tamaño del amplicón |
|--|---------------------------------|--|---------------------|
| <i>NADP Isocitrato deshidrogenasa</i> | F | 5'-GGCTTATTCCAGGCTGGACAA-3' | 103 pb |
| | R | 5'-CATGGACAATGCAACTCCACC-3' | |
| <i>Aspartato aminotransferasa</i> | F | 5'-GCTGTCCACATGATGATGCAG-3' | 104 pb |
| | R | 5'-TCCCACCATGGAGAGCAATT -3' | |
| <i>Alanina aminotransferasa</i> | F | 5'-TTCACGGTGCCTCTATTGTGG-3' | 113 pb |
| | R | 5'-CATGCTTATAATCCGGTCAGCC-3' | |
| <i>Glutamato sintasa citosólica</i> | F | 5'-CAGGTCGACATGAAACTGCAGA-3' | 111 pb |
| | R | 5'-AAGCTGGCCTCCTGTCTCAA-3' | |
| <i>Glutamato descarboxilasa</i> | F | 5'-TGGATGGAGCCTGAATGTGAC-3' | 101 pb |
| | R | 5'-CATCGATTCTGAAGCTCGGTG-3' | |
| <i>GABA aminotransferasa</i> | F | 5'-CGCAAAGGCCCTTTCTTCA-3' | 101 pb |
| | R | 5'-ACAGGAAACAGGATGCCCAGA-3' | |
| <i>Succinato semialdehido deshidrogenasa</i> | F | 5'-ATGACGTTGAGTGGAGTGGCA-3' | 113 pb |
| | R | 5'-ATCTGGCGAGAGAAAGCAGGA-3' | |
| <i>Aco-1</i> | F | 5'-GGCAATGATGAAGTGATGGCT-3' | 106 pb |
| | R | 5'-GTTGGAACATGGACCGTCTTT-3' | |
| <i>Aco-2</i> | F | 5'-TGCAGCAATGAGGTACAAGGC-3' | 115 pb |
| | R | 5'-TCACACCCAGAAGAAGCATTGGAC-3' | |
| <i>Aco-3</i> | F | 5'-GGCAAGTCATTACATGCGTT-3' | 108 pb |
| | R | 5'-TGAAGAAGTAGACCCCGTTGA-3' | |

^a El diseño de los oligonucleótidos se realizó mediante el programa Primer express (Applied Biosystems).

Para evaluar la especificidad de la reacción se realizaron curvas de desnaturalización tras la amplificación y se secuenciaron los productos de las amplificaciones. Para convertir las medidas de intensidad de fluorescencia en niveles relativos de mRNA se prepararon curvas de calibrado utilizando diluciones decimales seriadas de una de las muestras de RNA. La normalización de los niveles de mRNA se realizó de dos maneras diferentes. Inicialmente, se usó para normalizar la abundancia de rRNA 18S. Sin embargo, este método introdujo gran variabilidad en las medidas, dando lugar a resultados poco reproducibles debido a los elevados factores de dilución necesarios ($1/10^8$) para ajustar la elevada concentración de 18S rRNA al rango dinámico del análisis, una limitación técnica previamente descrita (Bustin, 2000, Hashimoto *et al.*, 2004). Se obtuvieron datos altamente reproducibles cuando se realizó la normalización frente a la concentración de RNA total (Bustin 2000, Hashimoto *et al.*,

2004) medida en un ensayo fluorimétrico con RiboGreen (Molecular Probes). Se realizaron 3 extracciones independientes de cada muestra.

Se asignó arbitrariamente el valor de inducción 1 a la muestra tomada a el día 123 después de antesis.

4.2.7. Análisis de la expresión génica global mediante la hibridación de micromatrices de cDNA de cítricos (7K)

Las muestras utilizadas, las extracciones y el procesamiento del RNA, el marcaje, la hibridación de las micromatrices, los lavados y la adquisición de los datos se realizó siguiendo el protocolo que se ha descrito en el 3.2.2. Se realizaron tres extracciones independientes de RNA y se procesaron y se marcaron independientemente e hibridaron en tres micromatrices diferentes.

4.2.8. Identificación de los genes de aconitasa de cítricos

Se seleccionaron todos los ESTs (expressed sequence tags) correspondientes a la enzima aconitasa de cítricos, y anotados como tal, disponibles en la base de datos del Proyecto de Genómica Funcional de Cítricos (Forment *et al.* 2005). Posteriormente se utilizó la herramienta informática STADEN (Staden, 1996) para ensamblar dichos ESTs los cuales se agruparon en tres contigs diferentes. Las condiciones de ensamblaje utilizadas fueron las indicadas por Staden (1996).

A partir de una genoteca de clones completos, elaborada con material de diferentes órganos procedentes de árboles de cítricos en todas las fases del desarrollo (Terol *et al.*, 2007), se aislaron diferentes clones representativos pertenecientes a los tres contigs previamente identificados. Mediante secuenciación y ensamblaje de fragmentos del cDNA solapados de los clones seleccionados de la genoteca se obtuvieron las secuencias completas de las otras dos isoenzimas de cítricos identificadas. Las secuencias completas de cDNA de las tres isoenzimas de aconitasa de cítricos se alinearon, mediante el programa informático CLUSTAL X (Thompson *et al.*, 1997)

Para distinguir las posibles diferencias de expresión existentes entre las tres isoenzimas se diseñó un par de oligonucleótidos para cada isoenzima, de manera que, la secuencia del oligonucleótido directo se diferenciara en al menos el último nucleótido con respecto a las secuencias de las otras dos aconitasas.

4.3. Resultados y discusión

4.3.1. Expresión de genes asociados al metabolismo del ácido cítrico

Uno de los cambios más notables que se producen durante la maduración de los frutos cítricos es la reducción del contenido en ácidos de la pulpa. La acidez total en los frutos de la variedad Clementina de Nules se encuentra en niveles basales durante la fase I (**Figura 4.1 A**), tal y como sucede en otros frutos cítricos (Sinclair y Ramsey, 1944; Erickson, 1968), alcanzando el máximo durante la fase II y descendiendo posteriormente (**Figura 4.1 A**; Sinclair *et al.*, 1945; Bain, 1958; Clements, 1964; Erickson, 1968; Génard *et al.*, 1994, 1999). La acidez de los frutos se debe mayoritariamente a la concentración de ácido cítrico, que representa alrededor del 50% de la acidez total cuando la acidez de los frutos es máxima y cerca del 95% al final de la fase III (**Figura 4.1 B**).

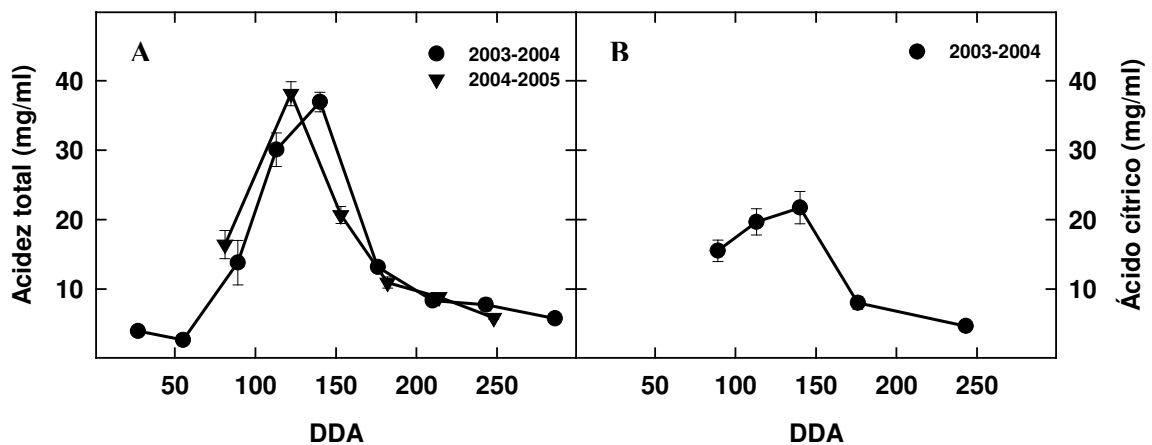


Figura 4.1. Acidez total (A) y concentración de ácido cítrico (B) en el zumo de la variedad Clementina de Nules (DDA, días después de antesis). Las barras verticales representan los errores estándar ($n \geq 3$).

La variedad Clementina de Nules, en las dos campañas analizadas (2003/2004 y 2004/2005) alcanzó la acidez máxima entre los días 120 y 150 después de antesis (**Figura 4.1**), es decir, cuando los frutos se encuentran, aproximadamente, al 60% del tamaño final y tienen un porcentaje de zumo de cercano al 30% del máximo (**Figura 4.2**). El aumento de la acidez de los frutos durante la fase II unido al incremento que se produce en el porcentaje de zumo indica que la disminución posterior de la acidez no se puede correlacionar exclusivamente con un efecto de dilución.

La hipótesis existente sobre la reducción del ácido cítrico sostiene que el citrato se acumula en la vacuola siendo liberado posteriormente al citosol donde se metaboliza a isocitrato por medio de la aconitasa citosólica y a 2-oxoglutarato mediante la isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP⁺ (Sadka *et al.*, 2000 a, b) y que según Shimada *et al.* (2006) podría estar regulado por un gen que codifica un cotransportador citrato/H⁺ de la membrana vacuolar.

A pesar de la importancia de este proceso para la industria cítrica, ya que la acidez de la pulpa contribuye de manera altamente significativa a la calidad de la fruta, no se ha estudiado el mecanismo de utilización del 2-oxoglutarato formado a partir del citrato.

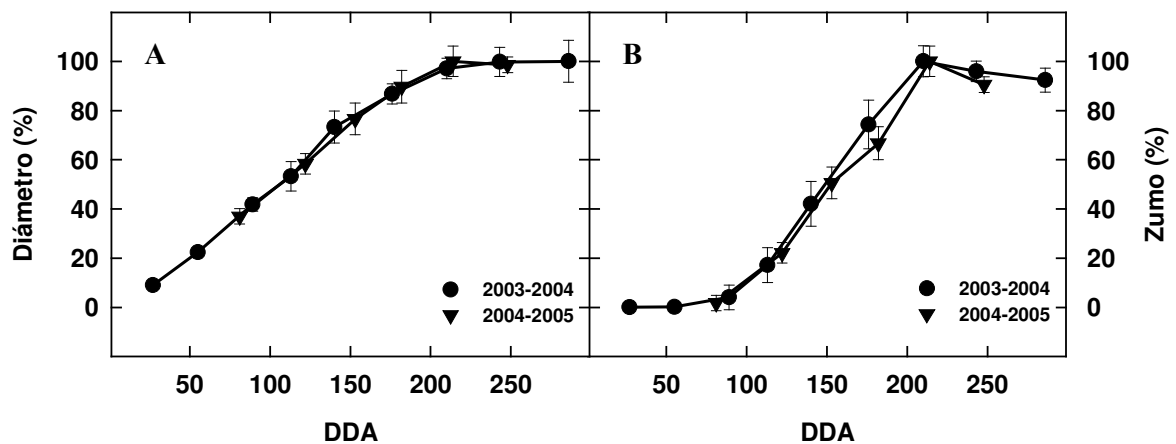


Figura 4.2. Crecimiento y acumulación de zumo en los frutos de Clementina de Nules. (A) Diámetro del fruto expresado como porcentaje del diámetro máximo. Porcentaje de zumo con respecto al máximo DDA, días después de anthesis. Las barras verticales representan los errores estándar (n ≥ 3).

Los análisis de hibridación de micromatrices mostraron la presencia de tres patrones diferentes de expresión de la enzima aconitasa (**Figura 4.3 A**), indicando que en el genoma de los cítricos existen al menos tres genes de aconitasa, puesto que según Ideker *et al.* (2003) y Xu *et al.* (2001) las restrictivas condiciones de hibridación utilizadas en este estudio son capaces de reducir la hibridación cruzada entre genes de una misma familia con una gran similitud de secuencia. En este mismo análisis se observó que una de las tres enzimas de aconitasa se inducía durante la degradación del ácido cítrico (**Figura 4.3 A**). Por otro lado, se vio que el nivel de mRNA del gen que codifica la ATP citrato liasa, enzima que disocia el citrato en oxalacetato y acetil-CoA, se reduce (**Figura 4.3 B**), lo cual indica que de las dos enzimas capaces de catabolizar el ácido cítrico en el citosol, aconitasa y ATP citrato liasa

(Fatland *et al.*, 2002), únicamente la aconitasa aumenta durante el desarrollo y la maduración de los frutos.

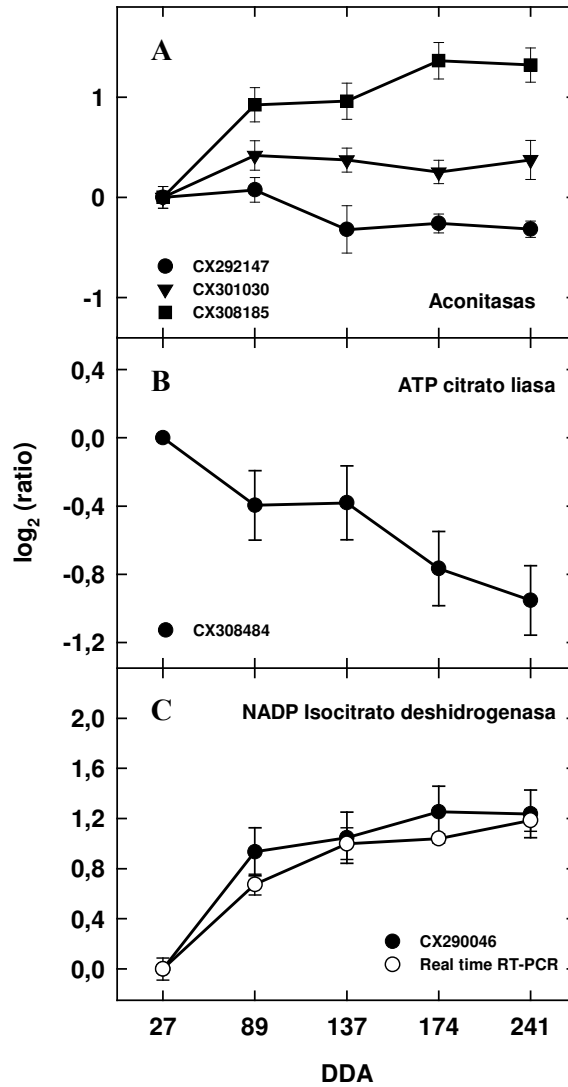


Figura 4.3. Perfiles de expresión de los genes que codifican las aconitasas (A), la ATP citrato liasa (B) y la NADP⁺ isocitrato deshidrogenasa (C) de la pulpa de la mandarina Clementina de Nules durante el desarrollo y la maduración de los frutos. La expresión génica fue determinada mediante análisis de micromatrices (símbolos rellenos) y mediante real time RT-PCR (símbolos en blanco). Se asignó arbitrariamente el valor de expresión 1 a la muestra de 27 DDA. Se representan las medias \pm ES ($n \geq 3$) de los logaritmos en base 2 de los ratios respecto a 27 DDA. Se indican, además, los número de acceso del GenBank de las sondas de la micromatriz.

En un segundo paso, el isocitrato es oxidado a 2-oxoglutarato mediante la enzima isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP⁺ (Chen, 1998). Los datos obtenidos de la micromatriz y de la RT-PCR en tiempo real mostraron un incremento del nivel del mRNA de la enzima

isocitrato deshidrogenasa dependiente de la NADP^+ (**Figura 4.3 C**), lo que sugiere su participación en el metabolismo del citrato, tal y como proponen Sadka *et al.* (2000b).

En las plantas, se han propuesto varias rutas para la utilización del 2-oxoglutarato, como la acumulación de glutamato en los frutos maduros de tomate (Gallardo *et al.*, 1995; Boggio *et al.*, 2000) y la reasimilación de amonio durante la senescencia de la hoja (Hodges, 2002), observándose que en el proceso de maduración de los frutos de tomate las aminotransferasas y la glutamato deshidrogenasa contribuyen a la síntesis de glutamato (Boggio *et al.*, 2000; Bortolotti *et al.*, 2003).

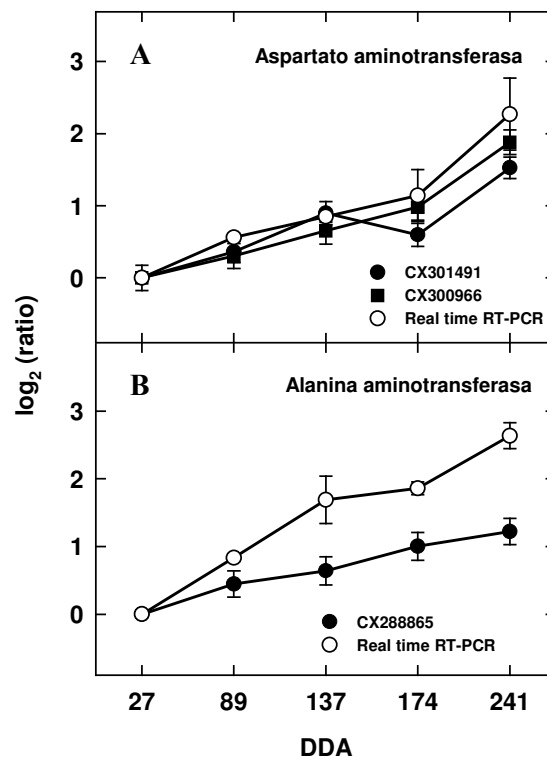


Figura 4.4. Perfiles de expresión de los genes que codifican la aspartato aminotransferasa (A) y la alanina aminotransferasa (B) de la pulpa de la mandarina Clementina de Nules durante el desarrollo y la maduración de los frutos. La expresión génica fue determinada mediante análisis de micromatrices (símbolos rellenos) y mediante real time RT-PCR (símbolos en blanco). Se asignó arbitrariamente el valor de expresión 1 a la muestra de 27 DDA. Se representan las medias \pm ES ($n \geq 3$) de los logaritmos en base 2 de los ratios respecto a 27 DDA. Se indican, además, los número de acceso del GenBank de las sondas de la micromatriz.

Los resultados obtenidos mediante análisis de micromatrices y RT-PCR en tiempo real indicaron que en los frutos cítricos la expresión de los genes de la aspartato aminotransferasa y la alanina aminotransferasa (**Figura 4.4 A y B**) aumentan durante el desarrollo y la maduración, mientras que la glutamato deshidrogenasa no presenta cambios significativos (datos no mostrados), lo que sugiere la participación de estas aminotransferasas en la síntesis de glutamato a partir del 2-oxoglutarato

La expresión de la glutamina sintetasa citosólica (**Figura 4.5 A**) aumentó en paralelo a la isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP⁺ (**Figura 4.3 C**), lo que sugiere un aumento de la síntesis de glutamina que podría ser utilizada para producir el anillo de aminometilpirimidina necesario para la biosíntesis de tiamina, lo que concuerda con la inducción del gen *c-thi 1* (**Figura 4.5 B**) que codifica una enzima biosintética del tiazol (Jacob-Wilk, *et al.* 1997).

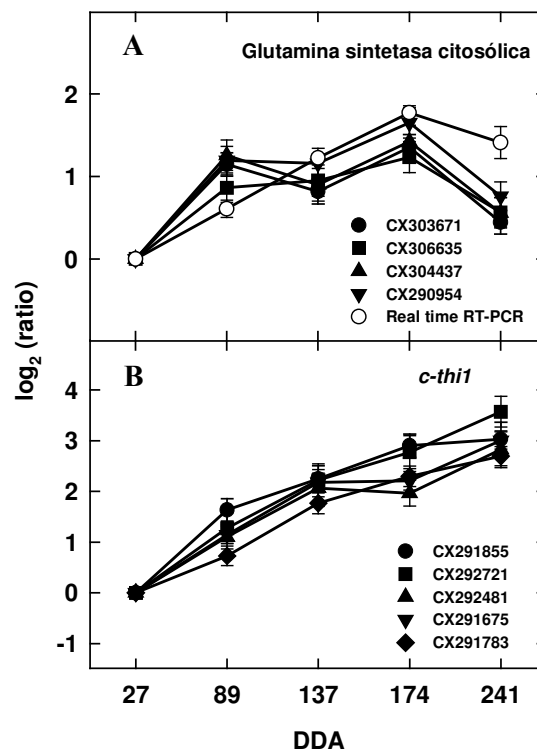


Figura 4.5. Perfiles de expresión de los genes que codifican la glutamina sintetasa citosólica (A) y del gen *c-thi1* (B) de la pulpa de la mandarina Clementina de Nules durante el desarrollo y la maduración de los frutos. La expresión génica fue determinada mediante análisis de micromatrices (símbolos rellenos) y mediante real time RT-PCR (símbolos en blanco). Se asignó arbitrariamente el valor de expresión 1 a la muestra de 27 DDA. Se

representan las medias \pm ES ($n \geq 3$) de los logaritmos en base 2 de los ratios respecto a 27 DDA. Se indican, además, los número de acceso del GenBank de las sondas de la micromatriz.

Otra de las rutas del metabolismo del glutamato descrita en plantas es la derivación del γ -aminobutirato (GABA). Esta ruta incluye tres reacciones catalizadas por las enzimas glutamato descarboxilasa, GABA aminotransferasa y succinato semialdehido deshidrogenasa, que transforman el glutamato en succinato, el cual puede entrar en la mitocondria y ser utilizado en el ciclo de Krebs (Bown y Shelp, 1997). La glutamato descarboxilasa (que produce GABA a partir de glutamato; **Figura 4.6 A**) y la GABA aminotransferasa (que cataliza la conversión de GABA a succinato semialdehido; **Figura 4.6 B**) presentaron niveles máximos durante el periodo de reducción de la acidez (posterior a los 137 días después de la antesis).

La succinato semialdehido deshidrogenasa, encargada de la síntesis de succinato, se indujo durante la maduración de los frutos (**Figura 4.6 C**).

Otras rutas alternativas de utilización del glutamato no parecen estar inducidas durante la maduración de los frutos, puesto que no se observaron cambios significativos en la expresión de los genes de aminoacilasa, ornitina aminotransferasa y pirrolina-5-carboxilato reductasa (**Anexo 1**).

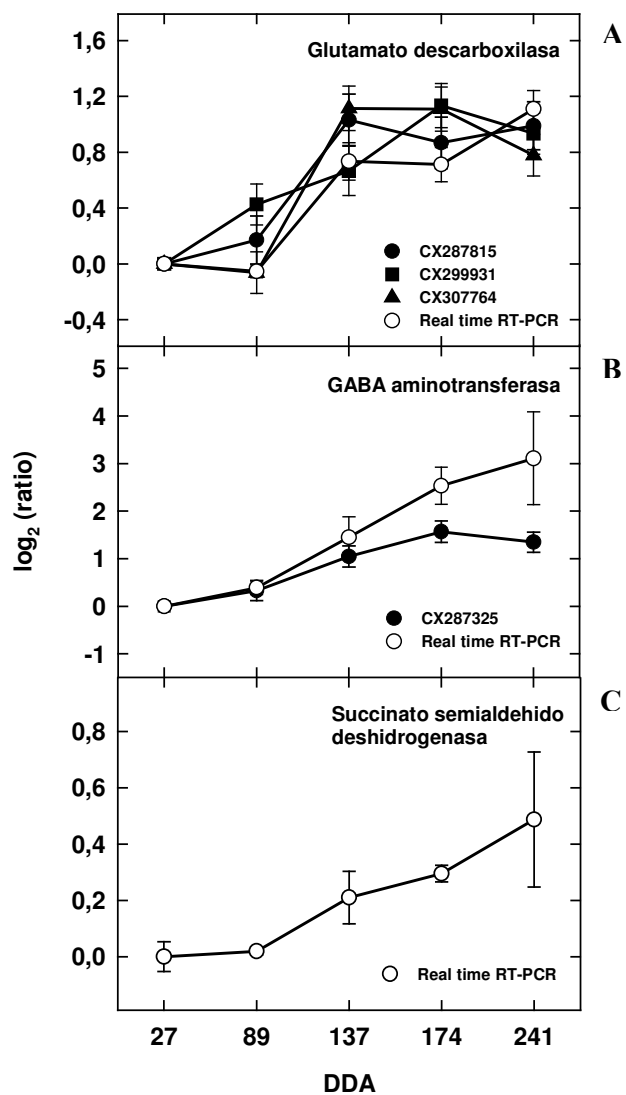


Figura 4.6. Perfiles de expresión de los genes que codifican los genes de glutamato descarboxilasa (A), GABA aminotransferasa (B) y succinato semialdehido deshidrogenasa (C) de la pulpa de la mandarina Clementina de Nules durante el desarrollo y la maduración de los frutos. La expresión génica fue determinada mediante análisis de micromatrices (símbolos rellenos) y mediante real time RT-PCR (símbolos en blanco). Se asignó arbitrariamente el valor de expresión 1 a la muestra de 27 DDA. Se representan las medias \pm ES ($n \geq 3$) de los logaritmos en base 2 de los ratios respecto a 27 DDA. Se indican, además, los número de acceso del GenBank de las sondas de la micromatriz.

El conjunto de resultados obtenidos han permitido proponer un modelo para la utilización del citrato durante la maduración interna del fruto de los cítricos. Según este modelo, el citrato acumulado en los frutos verdes es metabolizado de forma secuencial a isocitrato, 2-oxoglutarato (Sadka *et al.*, 2000a,b) y glutamato, a partir del cual se inducen dos rutas alternativas para su utilización: la conversión a glutamina y la derivación del GABA (**Figura 4.7**).

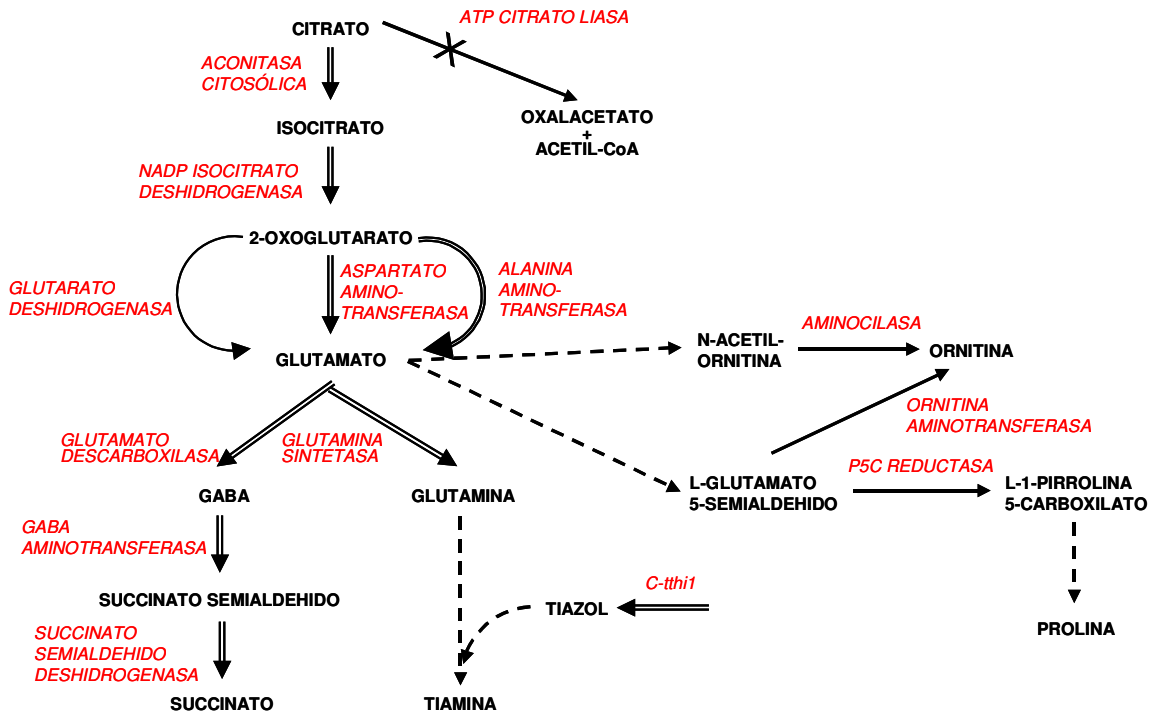


Figura 4.7. Mecanismo propuesto para la utilización del citrato durante el desarrollo y la maduración de la pulpa de frutos de la mandarina Clementina de Nules basado en análisis de la expresión génica mediante micromatrices y RT-PCR en tiempo real. Las flechas dobles entre metabolitos indican inducción génica, la X indica represión de la ATP citrato liasa. Las flechas simples indican que no se producen cambios significativos en la expresión de los correspondientes genes. Las flechas discontinuas indican los genes que no se encuentran representados en la micromatriz.

La determinación de los niveles de glutamato en muestras de frutos recolectados antes y después del pico de máxima acidez (89 y 241 DDA respectivamente) no mostró cambios significativos (**Tabla 4.3**; Aristoy *et al.*, 1989) a pesar del incremento de la expresión experimentado en los genes implicados en la síntesis de glutamato (**Figura 4.4 A y B**), lo que sugiere que la producción de glutamato debe estar compensada por su utilización. Además, la reducción en la cantidad de GABA (42%) observada durante la maduración (**Tabla 4.3**)

concuerta con la idea de que la ruta de la derivación del GABA está más activa durante la maduración de los frutos.

Tabla 4.3. Contenido de los aminoácidos glutamato y GABA en la pulpa de la mandarina Clementina Nules durante la acumulación (89 DDA) y después del descenso de la acidez (241 DDA). Los datos son medias (\pm ES, $n \geq 3$).

| Metabolitos | 89 DDA | 241 DDA |
|---|----------------|----------------|
| Amino ácidos (μg / ml extracto de zumo) | | |
| Glutamato | 74,0 \pm 3,8 | 67,7 \pm 9,1 |
| GABA (gamma aminobutirato) | 72,0 \pm 8,3 | 41,8 \pm 7,4 |

En los últimos años se han acumulado distintos tipos de evidencias que sugieren una relación entre la acumulación de GABA y la acidez citoplasmática. Se sabe que en las plantas superiores el GABA se sintetiza mediante la reacción catalizada por la glutamato descarboxilasa, que consume un protón (Bown y Shelp, 1997) y que la glutamato descarboxilasa se activa cuando aumenta la concentración de H^+ en el citosol, como se ha visto en suspensiones celulares de zanahoria (Carroll *et al.*, 1994) y en frutos maduros de tomate (Rothan *et al.*, 1997). Aunque los estudios realizados indican que la descarboxilación del glutamato interviene en la regulación del pH citoplasmático a corto plazo, estos estudios se han centrado en los efectos sobre las rutas del metabolismo del nitrógeno. En el presente trabajo se amplía este concepto destacando el papel central de la derivación del GABA en la regulación del nivel de acidez durante la maduración de los frutos. La acidificación citoplasmática tras la liberación de citrato desde la vacuola induce la glutamato descarboxilasa y, por tanto, la reducción de la acidez citosólica. En este contexto, la derivación del GABA actúa como un mecanismo realmente eficaz en la reducción de la acidez de los frutos cítricos durante el desarrollo y la maduración.

4.3.2. Expresión y caracterización molecular de los genes de la aconitasa

Los datos de la **Figura 4.3 A** indican que en los cítricos existen al menos tres genes para la aconitasa. Por otra parte, el hecho de que la aconitasa catalice el primer paso del proceso de eliminación del ácido cítrico sugiere que la regulación de este proceso podría ejercerse sobre la transcripción de alguno de estos genes. Con el fin de caracterizar los mecanismos que controlan la eliminación del ácido cítrico durante la maduración interna, se han determinado por RT-PCR en tiempo real los patrones de expresión individual de cada uno de los genes de

aconitasa. Además, se ha incluido en el estudio otra variedad de mandarina con un patrón de acidez diferente al de la Clementina de Nules.

En plantas se han descrito dos posibles localizaciones de la aconitasa: la mitocondria y el citosol (Brouquisse *et al.*, 1987; Verniquet *et al.*, 1991; De Bellis *et al.*, 1993,1994,1995; Hayashi *et al.*, 1995; Peyret *et al.*, 1995). Aunque en animales es fácil identificar la localización subcelular de las aconitasas en base a su secuencia (Eanes y Kun, 1971), las aconitasas de plantas no poseen ninguna secuencia señal que indique su ubicación (Millar *et al.*, 2001). En el caso de los cítricos, hasta el momento sólo se ha clonado un gen de aconitasa de limón (Sadka *et al.*, 2000a) y comparando su perfil de expresión con la evolución de las actividades enzimáticas, se ha sugerido que corresponde a la forma citosólica (Sadka *et al.*, 2000a).

4.3.2.1 Determinación de ácidos en las variedades Clementina de Nules y Fortune

Con la intención de profundizar en los mecanismos que controlan la acidez se decidió incluir en el estudio otra variedad de mandarina que se diferenciase de la Clementina de Nules en la evolución de la acidez durante el desarrollo y la maduración de los frutos. Para seleccionar dicha variedad se analizó el patrón de evolución de los ácidos y azúcares en tres variedades de mandarina que se diferencian de la Clementina de Nules en su fecha de recolección: las clementinas Marisol y Clementard (*Citrus clementina* Hort. ex Tan.) y el híbrido Fortune (*Citrus clementina* Hort. ex Tan. x *Citrus tangerina* Hort. ex Tan.). Las variedades Clementina de Nules y Marisol se clasifican como de media estación y extratemprana, respectivamente, mientras que Clementard y Fortune son tardías (Bono *et al.*, 1985; Bono *et al.*, 1994).

Se cuantificó la acidez total y el contenido en sólidos solubles totales (SST) que son los dos parámetros determinantes de la madurez interna de los frutos cítricos. El cociente entre ambos (SST/acidez) recibe el nombre de índice de madurez. Mientras el contenido en ácidos experimentaba variaciones considerables entre las distintas variedades, la concentración de sólidos solubles fue similar en las cuatro variedades estudiadas (**Figura 4.8 A y B**). Esto indica que las diferencias observadas en el índice de madurez reflejan, principalmente, diferencias en el contenido en ácidos, lo que sugiere que el metabolismo de los ácidos y el almacenamiento de carbohidratos son procesos controlados de forma independiente.

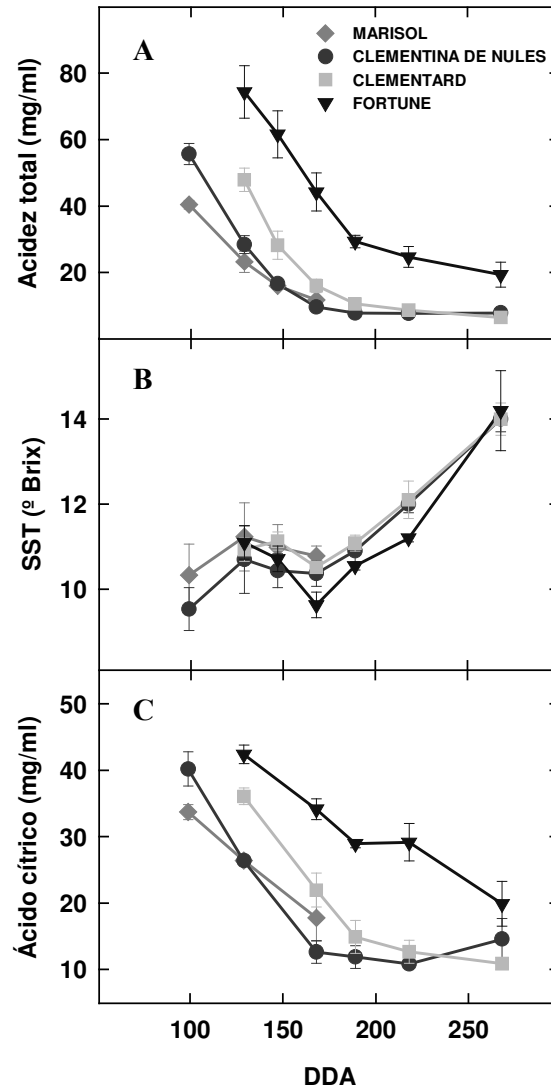


Figura 4.8. Parámetros de calidad interna de los frutos cítricos, acidez total (A), sólidos solubles totales (SST) (B) y concentración de ácido cítrico (C). (DDA, días después de anthesis). Se representan las medias \pm ES ($n \geq 3$).

La variedad Fortune fue la única que presentó diferencias significativas con las demás, tanto en el contenido en ácidos totales (**Figura 4.8 A**) como en el contenido en ácido cítrico (**Figura 4.8 C**) al final de la maduración, por lo que se eligió esta variedad para comparar con la Clementina de Nules en los estudios posteriores.

Para determinar la evolución de la acidez total y el ácido cítrico durante el desarrollo del fruto en la variedad Fortune, se estudió la evolución de estos dos parámetros durante las tres fases del desarrollo y la maduración de los frutos, a partir muestras de zumo de dos campañas diferentes (**Figura 4.9**).

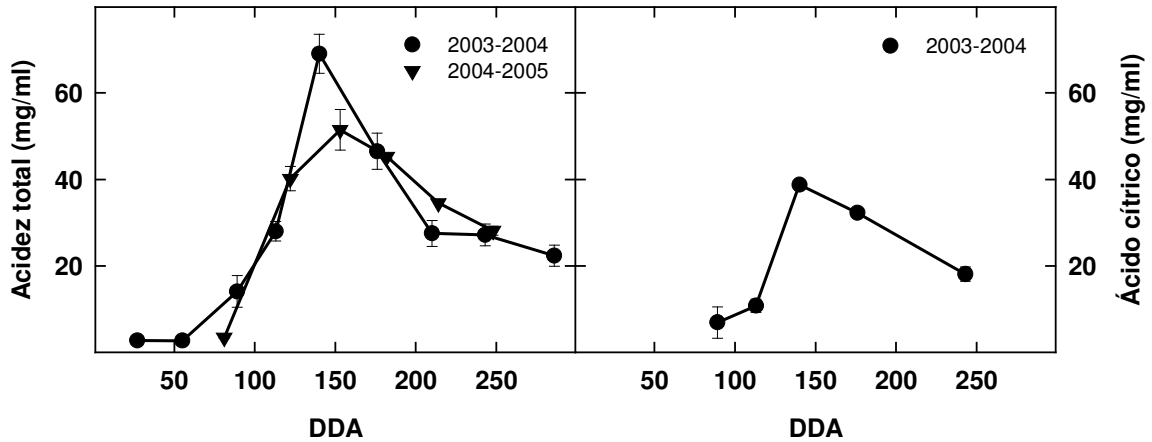


Figura 4.9. Acidez total (A) y concentración de ácido cítrico (B) en el zumo de la variedad Fortune (DDA, días después de antesis). Las barras verticales representan los errores estándar ($n \geq 3$).

4.3.2.2. Inducción de la expresión de la aconitasa durante el desarrollo y la maduración del fruto

Utilizando como sonda, el clon de cDNA de aconitasa de limón (AF073507; Sadka *et al.*, 2000a), se determinó mediante análisis Northern blot el nivel de mRNA de aconitasa en muestras de pulpa de las variedades Clementina de Nules y Fortune, observándose un incremento del nivel de transcrito (**Figura 4.10**), posterior al pico de acidez máxima de los frutos en ambas variedades (**Figuras 4.1 y 4.9**).

Utilizando esta misma sonda, Sadka *et al.* (2000a) comprobaron que en frutos de limón y de lima dulce, a pesar de producirse un incremento de la actividad enzimática durante la maduración, los niveles de mRNA de la aconitasa citosólica se mantenían constantes, mientras que en los frutos de mandarina se produjo un aumento en el nivel de transcritos de la aconitasa citosólica al iniciarse la reducción de la acidez, lo que concuerda con los datos obtenidos mediante análisis de micromatrices (**Figura 4.3 A**).

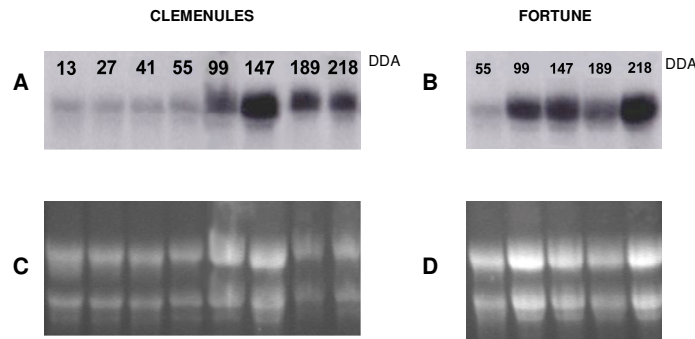


Figura 4.10. Análisis Northern blot de los niveles de transcrito de aconitasa en muestras de vesículas de zumo de las variedades Clementina de Nules (A) y Fortune (B) tomadas durante el desarrollo y la maduración del fruto. DDA: días después de la antesis. C y D: bandas correspondientes a los RNA ribosomales visualizados por tinción con bromuro de etidio de los geles antes de la transferencia a membranas de nylon.

4.3.2.3. Identificación de la familia génica de la aconitasa de cítricos

Los resultados del análisis de micromatrices (**Figura 4.3 A**) y del análisis Northern blot (**Figura 4.10**) indicaban que en el genoma de los cítricos hay al menos tres genes que codifican la enzima aconitasa y que al menos uno de ellos se induce durante la maduración del fruto. Para precisar mejor estos resultados era necesario determinar cuantos genes de aconitasas hay en el genoma de los cítricos, la posible localización subcelular de las proteínas codificadas por ellos y los patrones temporales de expresión de cada uno de ellos.

Para ello, los 28 ESTs (expressed sequence tags) correspondientes a la aconitasa disponibles en la base de datos del Proyecto de Genómica Funcional de Cítricos (Forment *et al.*, 2005; Terol *et al.*, 2007; **Anexo 2**) fueron ensamblados utilizando programa STADEN (Staden, 1996).

Los ESTs seleccionados se agruparon en tres contigs diferentes, sugiriendo que el genoma de los cítricos contienen tres genes diferentes que codifican la aconitasa, tal y como sucede en *Arabidopsis thaliana* donde el número de contigs de aconitasa obtenidos coincide con el número de genes que codifican la enzima (Moeder *et al.*, 2006). Estos genes fueron designados como Aco-1, Aco-2 y Aco-3. La alineación de las secuencias de los cDNAs de Aco-1, Aco-2 y Aco-3 con el cDNA de aconitasa de limón (AF073507; Sadka *et al.*, 2000a) mediante el programa CLUSTAL X (Thompson *et al.*, 1997) indicó que este último se corresponde con el gen Aco-2, mostrando un 97 % de identidad de secuencia a nivel de cDNA entre Clementina de Nules y limón (**Figura 4.11**).

C.limon CTATTGCTTGCTCAATTTTGGTGACAGTATTACTACCGATCATACTCTCCGGCAGGAAG 2520
Aco-2 -----GATCACATCTCTCCGGCAGGAAG 23
Aco-1 -----GATCACATTTCTCCGGCAGGAAG 23
Aco-3 -----GATCACATCTCACAGCTGGTAG 23

C.limon TATCCACAAGGACAGCCCTGCTGCAAAATATCTGCTTGAGCGTGGAGTGGATCGCAAGGA 2580
Aco-2 TATCCACAAGGACAGCCCTGCTGCAAAATATCTGCTTGAGCGTGGGTGGATCGCAAGGA 83
Aco-1 TATCCACAAGGACAGTCCCACTGCAAAATACCTGCTAGAGCGTGGTGTGGAACGCAAGGA 83
Aco-3 TATCCACAAGATAGTCTGAGCCAAATATCTTATGGAACGTGGGGTTGATAGAAGAGA 83

C.limon CTTCAATTCCTTATGGTAGTCGTAGGGGTAATGATGAAGTATGGCAAGGGGTACCTTTGC 2640
Aco-2 CTTCAATTCCTTATGGTAGTCGTAGGGGTAATGATGAAGTATGGCAAGGGGTACCTTTGC 143
Aco-1 CTTCAATTCCTTATGGTAGTCGTGGGCAATGATGAAGTATGGCAAGGGTACCTTTGC 143
Aco-3 TTTCAACTCTTATGGAACTGCTGCTGGTAAATGATGAGATTATGGCAAGGGGTACCTTTGC 143

C.limon CAATATTCGCATTGTTAAACAAGCTCTTGAATGGAGAAGTTGGCCAAAAACAGTTTCATAT 2700
Aco-2 CAATATTCGCATTGTTAAACAAGCTCTTGAATGGAGAAGTTGGCCAAAAACAGTTTCATAT 203
Aco-1 AAATAATCCGCTTGTAAACAAGCTCTTGAATGGGAAGTGGGTCCAAAGACGGTCCATGT 203
Aco-3 CAATATTCGGCTTGTAAACAATTTGTTGAACGGAGAAGTTGGCCAAAAACATTCACAT 203

C.limon TCCAACAGGAGAGAAGCTTTATGTTTTTGTGTCAGCAATGAGGTACAAGGCTGCTGGCCA 2760
Aco-2 TCCAACAGGAGAGAAGCTTTATGTTTTTGTGTCAGCAATGAGGTACAAGGCTGCTGGCCA 263
Aco-1 TCCAACAGGGGAGAACTCTCTGTGTTTTGTGTCAGCAATGAAATACAAGAGTGTGGTCA 263
Aco-3 TCCTACTGGGAGAACTCTCTGTGTTTTGTGCTGCTATGAGGTACAAGAAATGAGGGGCA 263

C.limon TGATACCAATTGTCCTAGCTGGAGCAGAGTATGGAAGTGGCAGTTCTCGTATTGGGCTGC 2820
Aco-2 TGAGACCATTGTCCTAGCTGGAGCAGAGTATGGAAGTGGCAGTTCTCGTATTGGGCTGC 323
Aco-1 TGGTACAATTAATCTTGGCTGGAGCTGAATATGGAAGTGGAAAGTTCCCGTATTGGGCTGC 323
Aco-3 CGATACTGTTATTTTAGCTGGTGTGATGAGTATGGCAGTGGAAAGTTCTCGTATTGGGCTGC 323

C.limon TAAGGGTCCAATGCTTCTGGGTGTGAAAGCAGTATTGCCAAGAGCTTTGAGAGAATTCA 2880
Aco-2 TAAGGGTCCAATGCTTCTGGGTGTGAAAGCAGTATTGCCAAGAGCTTTGAGAGAATTCA 383
Aco-1 CAAGGGTCCAATGTTGTTGGGAGTTAAAGCAGTATCGCCAAAAGTTTTGAAAGAATTCA 383
Aco-3 TAAGGGTCCAATGTTGCTGGGTGTGAAAGCAGTATTGCCAAGAGCTTTGAGCGAATTCA 383

C.limon TCGTAGTAATCTTGTGGTATGGGCATCATTCTCTTTGCTTCAAGCCTGGGGAGGATGC 2940
Aco-2 TCGTAGTAATCTTGTGGTATGGGCATCATTCTCTTTGCTTCAAGCCTGGGGAGGATGC 443
Aco-1 TCGCAGTAATTTGGTTGGAAATGGGTATCATTCTCTCTGTTTCAAGGCTGGTGGAGATGC 443
Aco-3 CCGTAGTAATTTGGTGGGATGGGCATAATCCCGTTGTTTTCAAGCCTGGTGGAGATGC 443

C.limon AGACACACTGGGGTTAGCTGGTTCATGAGCGCTACACAATCAACTTACCAATAAAGTCAG 3000
Aco-2 AGACACACTGGGGTTAGCTGGTTCATGAGCGCTACACAATCAACTTACCAATAAAGTCAG 503
Aco-1 AGACTCATTGGGTTTACTGGTTCATGAGAGATTTAGTATTGATCTCCCAAGTAAGATCAG 503
Aco-3 CGAGACTCATTGGGTTGACTGGCCATGAACGCTACACCAATTGACCTTCCAAACAGTGTGAG 503

C.limon TGAGATAAGGCCTGGCCAAGACATTACTGTACAAACCGACACTGGGAAATCCTTTCATG 3060
Aco-2 TGAGATAAGGCCTGGCCAAGACATTACTGTACAAACCGACACTGGGAAATCCTTTCATG 563
Aco-1 TGAAATAAGACCTGGCCAAGATGTGACTGTACCCTGACAGTGGAAATCCTTTACTG 563
Aco-3 TGAAATAGACCTGGTCAGGATGTCAGAGTGGTACAGACAGTGGCAAGTCAATTTCATG 563

C.limon TACAGTACGCTTTGATACGGAGGTGGAACCTGGCATATTTTCGACCATGGGGCATTCTTCC 3120
Aco-2 TACAGTACGCTTTGATACGGAGGTGGAACCTGGCATATTTTCGACCATGGGGCATTCTTCC 623
Aco-1 CACAGTCCGTTTTCGACACAGAGGTAGAAATGGCTTACTTTGATCATGGAGGCATCCTTCC 623
Aco-3 CGTTATAAGATTTGATACAGAGGTGGAAATGGCTTACTTTGATCATGGAGGCATCTGCA 623

C.limon ATATGTTATCCGGAATCTGATTAA-----ACAGTAAATAACTGAGCTT 3163
Aco-2 ATATGTTATCCGGAATCTGATTAA-----ACAGTAAATAACTGAGCTC 666
Aco-1 GTTTGTCAATTCGCAACCTGATTAA-----GCAGTAAATAACTGCATCA 666
Aco-3 ATATGTCATAAGAAACTTGATCAATGTGAGACAATGATTCCGCAAGAACCAACTGGTGT 683

C.limon TTGATTACAGGGCATGGGGCATGA--GGCATGAGGCATGAG--GGTTCATAATAAGACCA 3219
Aco-2 TTGATTACAGGGCATGGGGCATGA--GGCATGA-----G--GATTTCATAAAAAAGATCA 715
Aco-1 TTTCTACTAGGCGGACTTGCTTCA--TCCAAAGAAACTTAC--GGTT--GTAAAAATG--TG 719
Aco-3 CTTCAAAGGGGCTTACTTCTTCAATGCTTTAACGCTTTAGCAGATTACAGCCGACGTCCA 743

C.limon AAAAGGAAATA-GATTTTTTGTTCGTTAAC----TTCTTCCAATAGGATTAGCGTTTCA 3274
Aco-2 GAAAGGAAATA-TATTTTTTGTTCGTTAAC----TTCTTCCAATAGGATTAGCGTTTCA 770
Aco-1 AGAGTTGAATA-AAGTTCAATAATGTAAGAAAGATCCCTTTGATGGGACTTGAGTCTTT 778
Aco-3 TGAAATAAATTACGGAACTAAGTTTAGAAATTTCTGTTTTTGCAGTCAATTTGAAATTACA 803

C.limon TTCTT---TC---ACTTTT-----CTGTAGTTTTTCACT---TCATTCGCTTTTTGGCC 3318
Aco-2 TTCTT---TC---ACTTTT-----CTGTAGTTTTTCACT---TCATTTTTCTTTTGGCC 814
Aco-1 TTTTC---TGGGAACAATT-----CAAAAGGT--CGAT----ATCTTTGTCTGTGAAC 823
Aco-3 TTTTTATATCGAGAGCTTTGATAAACAATAGGACACGCCCTAGACATGAAATTCGCCGAA 863

```

C.limon      AACGTTGTTTATT--TAAATTTGAAAAAAAAACAAGAGGCTGGAGATATTGCAACTTTAA 3376
Aco-2       AAAGTTGTTTATT--TAAATTAATAAAAAAAAAAAGAGGCTGGAGATATT----- 861
Aco-1       GAAG--AATTAT----- 833
Aco-3       TAAGAGATAATTATTGAAATTTTGTAAATTTCCACATTGATCATGATTGCAATTTAT 923

C.limon      AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA----- 3401
Aco-2       -----
Aco-1       -----
Aco-3       TTTTTCGTTGGCTCAACCGAAGAACACAGTAAGGATAATGGATTTTAAAAGTGTGATGT 983

C.limon      -----
Aco-2       -----
Aco-1       -----
Aco-3       AATAGAAACAATCTACGATATGCTGATTCCTAATTTATATAAATCTACCATATGCTGATT 1043

C.limon      -----
Aco-2       -----
Aco-1       -----
Aco-3       CTTAATTTATAGG 1056

```

Figura 4.11. Alineamiento de las secuencias de cDNA de las tres aconitasas de Clementina de Nules (Aco-1, Aco-2 y Aco-3) y el cDNA de limón, mediante la herramienta informática CLUSTAL X. Los oligonucleótidos específicos para cada una de las secuencias utilizados para las Real Time RT-PCR se encuentran subrayados.

Para verificar que Aco-1, Aco-2 y Aco-3 no correspondían a variantes alélicas, sino a tres genes distintos, se diseñaron oligonucleótidos específicos de cada una de las tres secuencias (**Figura 4.11**) que se utilizaron para realizar una RT-PCR en tiempo real sobre RNA total obtenido de una planta haploide de Clementina de Nules (cedida por D. Luis Navarro director del departamento de Protección Vegetal del IVIA). Se obtuvieron productos de amplificación a partir de los tres pares de oligonucleótidos (**Figura 4.12 y 4.13**), indicando que al menos existen tres loci en el genoma de los cítricos para la aconitasa.

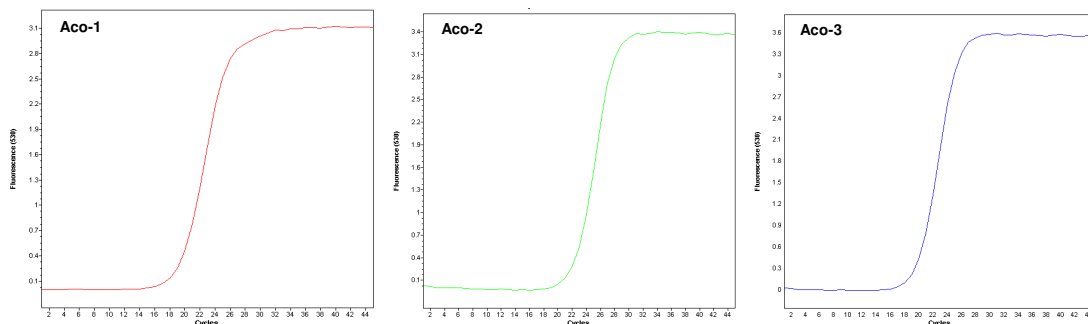


Figura 4.12. Curvas de amplificación obtenidas mediante RT-PCR en tiempo real de RNA total de una planta haploide de Clementina de Nules usando pares de oligonucleótidos específicos para cada uno de los tres genes de aconitasa.

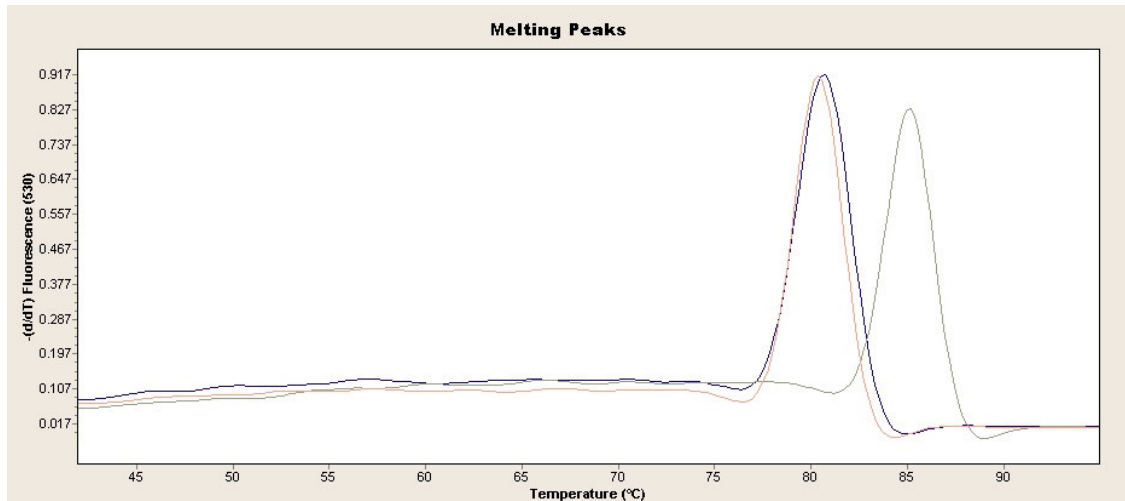


Figura 4.13. Curvas de separación obtenidas mediante RT-PCR en tiempo real de RNA total de una planta haploide de Clementina de Nules usando pares de oligonucleótidos específicos para cada uno de los tres genes de aconitasa.

Las secuencias de las proteínas deducidas de los cDNAs de Aco-1, Aco-2 y Aco-3 fueron también alineadas con el programa CLUSTAL X (Thompson *et al.*, 1997), observándose un alto grado de similitud entre ellas (**Figura 4.14**).

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
(Aco1) -----MYITTTSTAASSLLRASSRSRFVSSLSFFMAA
(Aco2) -----MAP
(Aco3) -----MAT

      100      110      120      130      140      150      160      170      180
(Aco1) EHPFKEILTALPKPG--GGEFGKFYSLPALNDPRIEKLPYSIRILLESAIRNCDNFQVKKEDIKIIDWENSAPKQVEIPFKPARVLLQDF
(Aco2) ENAFKGIILTSLPKPG--GGEFGKFFSLPALNDPRIDRLPYSIRILLESAIRNCDNFQVTKDDVEKIIDWENTSPKQVEIPFKPARVLLQDF
(Aco3) ENPFKSIKLTLQRPD--GGEFGKYISLPALNDPRIGKLPYSIKILLESAIRNCDNFQVKSVDVEKIIDWETTSPKQVEIPFKPARVLLQDF

      190      200      210      220      230      240      280      290      300
(Aco1) TGVPAVVDLACMRDAMNKLNSDPKINLPLVPVDLVVDHSVQVDVTRSENAVKANMEFEFQRNKERFAPFLKWGSSAFHNMLVPPGSGIVH
(Aco2) TGVPAVVDLACMRDAMNKLNSDPKINLPLVPVDLVVDHSVQVDVTRSENAVQANMEFEFQRNQERFAPFLKWGSSAFHNMPVPPGSGIVH
(Aco3) TGVPAVVDLACMRDAMNKLGGDSNKINLPLVPVDLVVDHSVQVDVTRSENAVQANMEFEFRNKERFAPFLKWGSSAFHNMLVPPGSGIVH

      250      260      270      310      320      330      340      350      360
(Aco1) QVNLEYLGRVVFNTNGMLYPDSVVGTDSSHMTMIDGLGVAGWVGVEAEAAAMLGQPMVMVLPVGVGFKLSGKLRHNGVTATDLVLTVTQML
(Aco2) QVNLEYLGRVVFNTDGIYPDSVVGTDSSHMTMIDGLGVAGWVGVEAEAAAMLGQPMVMVLPVGVGFKLTGKLRDGVATDLVLTVTQML
(Aco3) QVNLEYLGRVVFNTNGMLYPDSVVGTDSSHMTMIDGLGVAGWVGVEAEAAAMLGQPMVMVLPVGVGFKLSGKLRDGVATDLVLTVTQML

      370      380      390      400      410      420      460      470      480
(Aco1) RKHGVVGFVEFHGDMGELS LADRATIANMSPEYGATMGFFPVDHVTLQYLKLTGRSDETLAMVEGYLRANKMFVDYNEPQQRVYSSY
(Aco2) RKHGVVGFVEFYEGMGQLP LADRATIANMSPEYGATMGFFPVDHVTLQYLKLTGRSDETVSMIEEYLRANKMFVDYKPKQERSYSSY
(Aco3) RKHGVVGMFVEFYEGMSELS LADRATIANMSPEYGATMGFFPVDHVTLQYLKLTGRSDDTVSMIESYLRANKMFVDYSEPPSERVYSSY

      430      440      450      490      500      510      520      530      540
(Aco1) LELNLADVEPCISGPKRPHDRVPLKEMKADWHSCLDNKVGFKGFVAVPKETQEKVVKFSFHGQPAELKHGSVVIAAITSTCNTSNPVMVLG
(Aco2) LQLDLADVEPCISGPKRPHDRVPLKDMKADWHACLENQVGFKGFVAVPKQEQDKVAKFSFHGQPAELKHGSVVIAAITSTCNTSNPVMVLG
(Aco3) LELNLEEVPVCSGPKRPHDRVPLNEMKADWHACLDNRVGFKGFVAVPKKEYQSKVAEFNFHGTQALRHGDVVIAAITSTCNTSNPVMVLG

      550      560      570      580      590      600      640      650      660
(Aco1) AGLVAKKACELGLQVKPWVKTSLAPGSGVVTKYLQSSGLQKYLNEQGFHIVGYGCTTCIGNSGDLDESVAIAITDNDIVAAAVLSGNNRF
(Aco2) AGLVAKKACELGLEVKPWVKTSLAPGSGVVTKYLQSSGLQKYLNEQGFHIVGYGCTTCIGNSGDLDESVAIAITENDIVAAAVLSGNNRF
(Aco3) AALVAKKACELGLEVKPWIKTSLAPGSGVVTKYLQSSGLQKYLNEHGFHIVGYGCTTCIGNSGDIDDAVAIAITENDIVAAAVLSGNNRF

      610      620      630      670      680      690      700      710      720
(Aco1) EGRVHPLTRANYLASPPLVVAYALAGTVDIDFDEKPEIGTTKDGKGSVYFKDIWPTTEEIAEIVVQSSVLPDMFKSTYEAITKGNPTWNQLSV
(Aco2) EGRVHPLTRANYLASPPLVVAYALAGTVDIDFEKEPIGTGKDGKGVYFKDIWPSNEEIAEIVVQSSVLPDMFKSTYEAITKGNPMWNQLSV
(Aco3) EGRVHPLTRANYLASPPLVVAYALAGSVNIDFETEPVGVGKDGKIFLRDIWPSSEEVAHVQKSVLPDMFKATYEAITKGNPMWNQLSV

```

```

      730      740      750      760      770      780      820      830      840
(Aco1) PASKLYSWDPNSTYIHEPPYFKDMTMDPPG--AHGVKDAYCLLNFGDSITTDHISPAGSIHKDSPTAKYLLERGVERRDFNSYGSRRGND
(Aco2) PTSMLYSWDPNSAYIHEPPYFKNMTMEPPG--PHGVKDAYCLLNFGDSITTDHISPAGSIHKDSPPAAKYLLERGVDRKDFNSYGSRRGND
(Aco3) PSGTLYAWDPKSTYIHEPPYFKDMTMSPPG--PHGVKGAYCLLNFGDSITTDHISPAGSIHKDSPPAAKYLMEERGVDRRDFNSYGSRRGND

      790      800      810      850      860      870      880      890      900
(Aco1) EVMARGTFANIRLVNKLLNG----EVGPKTVHVPTEKLSVFDAAMKYKSAGHTIILAGAEYGSSSRDWAAKGPMLLGVKAVIAKSFE
(Aco2) EVMARGTFANIRLVNKLLNG----EVGPKTVHIPTGEKLYVFDAAMRYKAAGHETIVLAGAEYGSSSRDWAAKGPMLLGVKAVIAKSFE
(Aco3) EIMARGTFANIRLVNKLLNG----EVGPKTIHIPTGEKLSVFDAAMRYKNEGHDTVILAGAEYGSSSRDWAAKGPMLLGVKAVIAKSFE

      910      920      930      940      950      960      970      980      990
(Aco1) RIHRSNLVGMGIIPLCFKAGEDADSLGLTGHERFSIDLPSKI SEIRPGQDVTVTDD--SGKSFTC--TVRFDTEVELAYFDHGGILPYVI
(Aco2) RIHRSNLVGMGIIPLCFKPGEDADTLGLAGHERYTINLPNKVSEIRPGQDITVTDD--TGKSFTC--TLRFDTEVELAYFNHGGILPYVI
(Aco3) RIHRSNLVGMGIIPLCFKPGEDAETHGLTGHERYTIDLPSVSEIRPGQDVRVVTDD--SGKSFTC--TLRFDTEVELAYFDHGGILQYVI

```

Figura 4.14. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las tres aconitasas de Clementina de Nules (Aco-1, Aco-2 y Aco-3), mediante la herramienta informática CLUSTAL X.

Dado que las aconitasas de plantas no presentan ninguna secuencia señal que indique su localización subcelular (Millar *et al.*, 2001), para predecir la localización de las aconitasas de cítricos se utilizaron los programas TargetP (Emanuelsson *et al.*, 2000) y PSORT (Nakai y Kanehisa, 1992), basados en la homología de secuencia con proteínas de localización subcelular conocida. Para el análisis de las secuencias con TargetP se utilizó la base de datos SwissProt de secuencias de proteínas de organismos animales, donde las aconitasas mitocondriales y citosólicas están claramente identificadas (Eanes y Kun, 1971), y se ha comprobado que están codificadas por genes diferentes (Povey *et al.*, 1976; Slaughter *et al.*, 1978).

Los resultados del análisis sugirieron la localización mitocondrial de Aco-1 y la localización citosólica de Aco-2 y Aco-3 (**Tabla 4.4**). El análisis con PSORT dio los mismos resultados (no mostrados)

Tabla 4.4. Predicción de la localización subcelular de las aconitasas de cítricos utilizando el programa TargetP. En la columna Loc “M” indica que la proteína presenta una mayor similitud con proteínas de localización mitocondrial, mientras que el guión indica cualquier localización distinta al cloroplasto (C) o de las rutas secretoras (S). RC (reliability class) muestra la fuerza de la predicción, siendo mayor cuanto menor es su nivel, mTP (mitochondrial target peptide) indica el contenido en péptidos blanco de la mitocondria.

| Nombre | Long. | mTP | Otros péptidos | Loc | RC |
|--------|-------|--------------|----------------|-----|----|
| Aco-3 | 900 | 0.123 | 0.834 | - | 2 |
| Aco-2 | 898 | 0.118 | 0.792 | - | 2 |
| Aco-1 | 927 | 0.912 | 0.106 | M | 1 |

4.3.2.4. Perfiles de expresión de los genes Aco-1, Aco-2 y Aco-3 en Clementina de Nules y Fortune

Utilizando los pares de oligonucleótidos específicos diseñados para cada uno de los genes de aconitasa (**Figura 4.12**) se determinó mediante RT-PCR en tiempo real la evolución temporal de los niveles de transcrito de cada gen durante el desarrollo y la maduración del fruto.

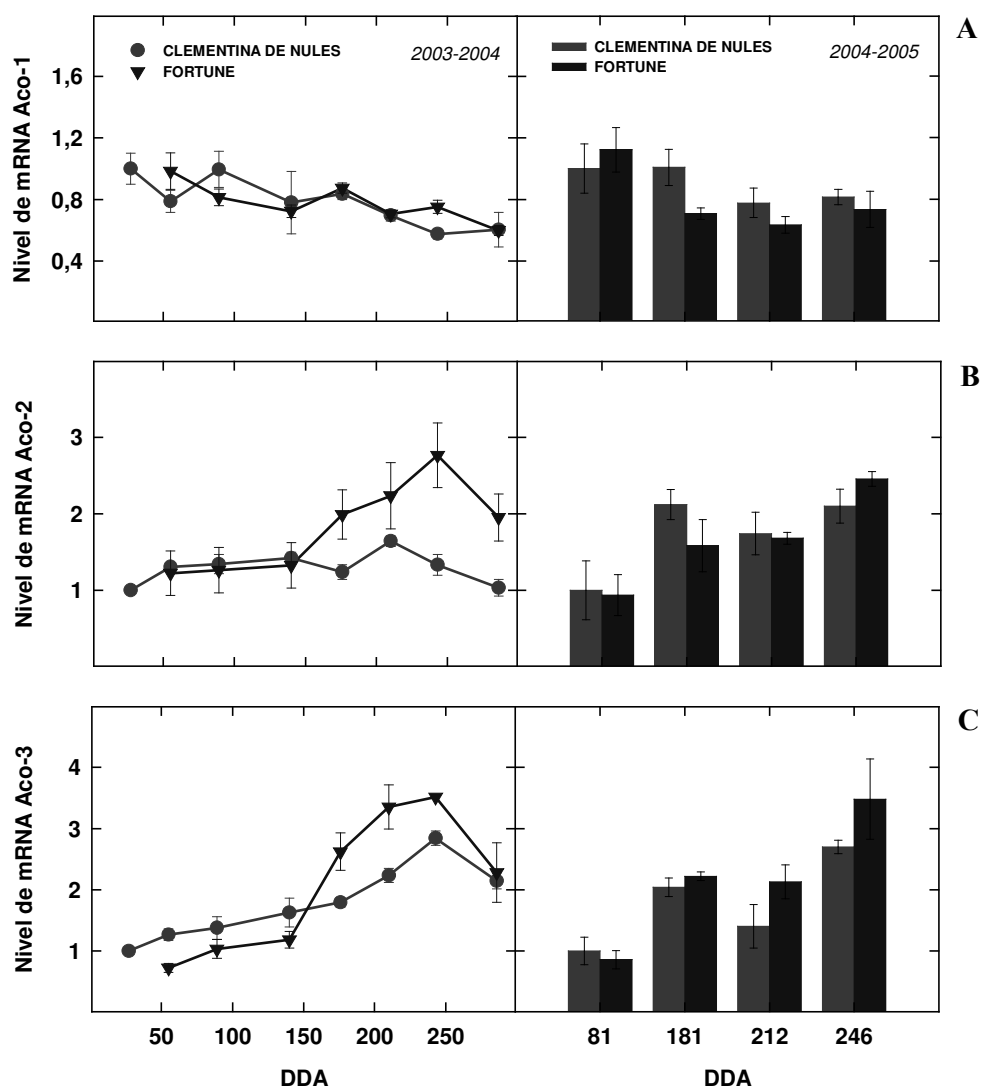


Figura 4.15. Patrones de expresión de los tres genes que codifican las aconitasas Aco-1 (A), Aco-2 (B) y Aco-3 (C) en la pulpa de Clementina de Nules y Fortune, durante las temporadas 2003-2004 y 2004-2005. Se asignó arbitrariamente el valor de expresión 1 a la primera muestra de la variedad Clementina de Nules de cada temporada. DDA, días después de antesis. Las barras verticales representan los errores estándar ($n \geq 3$).

Para ello se utilizaron muestras Clementina de Nules y Fortune de las campañas 2003/2004 y 2004/2005. Se observó que la aconitasa-1 (Aco-1) presentaba niveles de expresión prácticamente constantes a lo largo de todo el desarrollo del fruto, siendo reproducible durante los dos años ensayados (**Figura 4.15 A**).

La aconitasa-2 (Aco-2) mostró un nivel de mRNA prácticamente constante en Clementina de Nules, y ascendente durante la maduración en Fortune, mientras que el patrón de expresión de la aconitasa-3 (Aco-3) resultó ser ascendente en ambas variedades (**Figura 4.15 B y C**). La inducción de Aco-2 y Aco-3 durante la maduración de los frutos y la expresión constitutiva de Aco-1 son compatibles con la localización subcelular predicha a partir del análisis de secuencias (**Tabla 4.4**). Por otra parte, los perfiles de expresión de Aco-1, Aco-2 y Aco-3 en Clementina de Nules son muy similares a los observados mediante hibridación de micromatrices para las sondas CX292147, CX301030 y CX308185 respectivamente (**Figura 4.3 A**).

Se ha sugerido que las diferencias de acidez entre diferentes variedades podrían estar relacionadas con diferencias en la actividad aconitasa mitocondrial. Así, Bogin y Wallace (1966) comprobaron que la concentración de citramalato, un inhibidor competitivo de la actividad aconitasa, era mayor en frutos de limón que en frutos de lima dulce y posteriormente, Sadka *et al.* (2000a) demostraron que la actividad aconitasa mitocondrial era mayor en los frutos de lima dulce durante la fase de acumulación de citrato y propusieron que la acumulación de ácido cítrico sería facilitada por una inhibición de la actividad aconitasa mitocondrial.

Para comparar los niveles de expresión de los genes de aconitasas en frutos, con los niveles de los mismos genes en órganos vegetativos en los que no se produce una acumulación de citrato, se cuantificaron mediante RT-PCR en tiempo real los niveles de transcritos de Aco-1, Aco-2 y Aco-3 en pulpa de frutos de Clementina de Nules en las primeras etapas del desarrollo (27, 55, 69 y 140 DDA) y en hojas de la brotación de primavera.

Los niveles de mRNA de los tres genes de aconitasa durante la fase I y el principio de la fase II del desarrollo de los frutos fueron similares a los observados en hojas (**Figura 4.16**), indicando que la acumulación de ácido cítrico en los frutos no se debe a la represión de la expresión de ninguno de los genes de aconitasa, y que durante la fase de eliminación de ácidos se induce la expresión de los genes Aco-2 y Aco-3. Estos resultados apoyan la localización subcelular propuesta para las proteínas codificadas por los genes Aco-1, Aco-2 y Aco-3 (Apartado 4.3.2.3).

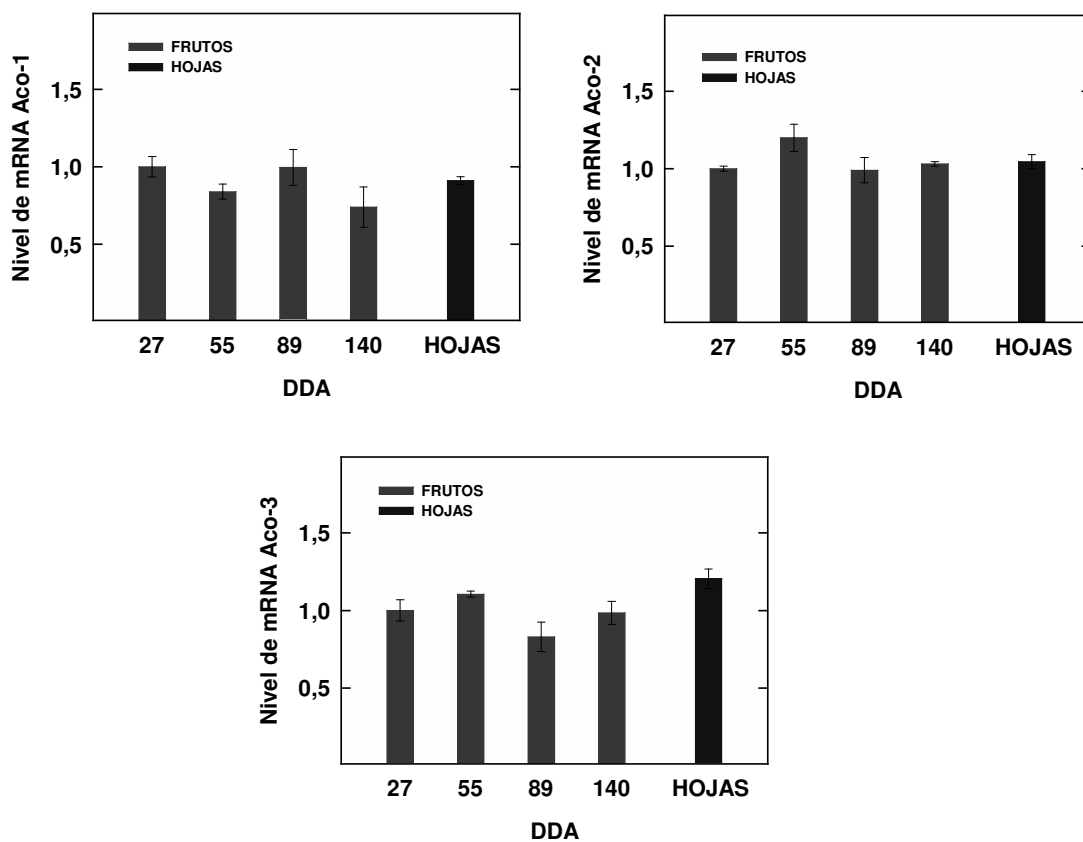
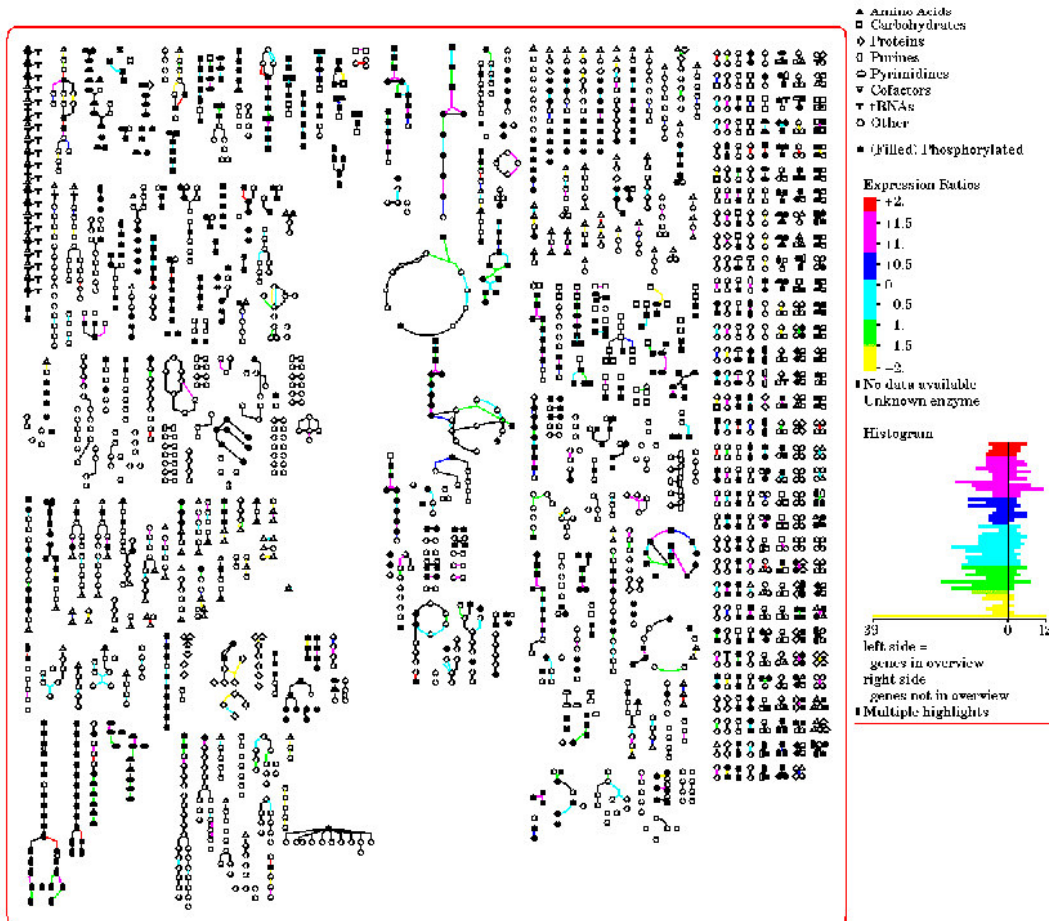


Figura 4.16. Expresión relativa de los genes Aco-1, Aco-2 y Aco-3 en cuatro muestras de vesículas de zumo de Clementina de Nules anteriores al pico de máxima acidez y en una muestra de hojas. DDA, días después de antesis. Las barras verticales representan los errores estándar ($n \geq 3$).

En conclusión, en el presente trabajo se ha demostrado por primera vez que el genoma de los cítricos contiene al menos tres genes de aconitasa y se ha analizado de forma independiente la expresión de estos genes durante el desarrollo y maduración de los frutos. Los análisis sugirieron que uno de los tres genes codifica una aconitasa mitocondrial de expresión constitutiva, mientras que los otros dos codifican aconitasas citosólicas que se inducen durante la maduración y participan en la eliminación del ácido cítrico acumulado en el fruto. Además, el análisis del transcriptoma mediante micromatrices de cDNA junto con la cuantificación de metabolitos seleccionados ha permitido proponer un modelo para explicar cómo se produce la reducción de la acidez durante la maduración.

V. Acumulación del ácido cítrico durante el desarrollo del fruto.



5.1. Introducción

La acidez de los frutos juega un papel importante en la percepción de la calidad de la fruta. De hecho, la acidez también afecta al dulzor de los frutos, puesto que enmascara el sabor de los azúcares (Lobit *et al.*, 2003). De acuerdo con Moreau-Rio *et al.* (1995), la apreciación total del consumidor está más relacionada con la relación acidez total/índice de refracción que con el contenido de azúcares.

A pesar de la ya mencionada importancia del metabolismo de los ácidos en los frutos cítricos (apartado 4.1), apenas existen estudios sobre los genes que regulan la acumulación del ácido cítrico. Las investigaciones realizadas sobre la regulación de los genes del metabolismo de los ácidos no han permitido, hasta el momento, la comprensión completa de este proceso esencial. Sin embargo, existen evidencias considerables obtenidas mediante la comparación de variedades ácidas y sin acidez, de que la expresión y la actividad de la citrato sintasa no es la responsable de dichas diferencias en el contenido en ácidos (Sadka *et al.*, 2001). Al mismo tiempo, recientemente se ha publicado la existencia de un transportador de citrato que codifica un nuevo simportador de citrato vacuolar que es capaz de mediar en el flujo vacuolar de citrato a través de un cotransporte electroneuro de H^+ e iones citrato (Shimada *et al.*, 2006)

En otro de los estudios del metabolismo de los ácidos realizado por Sadka *et al.* (2000a) se propone que la acumulación de ácido cítrico es consecuencia de la disminución de la actividad enzimática de la aconitasa mitocondrial. Por otra parte, la mayoría de los estudios realizados sobre la expresión de genes relacionados con el metabolismo de ácidos en frutos, se han realizado sobre frutos que acumulan mayoritariamente ácido málico, como por ejemplo melocotón (Etienne *et al.*, 2002; Moing *et al.*, 2000), manzana (Beruter, 2004) y uva (Diakou *et al.*, 2000; Or *et al.*, 2000).

El estudio de la expresión de los genes de aconitasas (capítulo IV) sugirió que las aconitasas Aco-2 y Aco-3 tienen un importante papel en la degradación del ácido cítrico durante la maduración, mientras que la aconitasa Aco, localizada probablemente en la mitocondria, mantiene niveles de expresión prácticamente constantes a lo largo de todo el desarrollo de la pulpa (**Figura 4.14**). Aunque estos resultados no contradicen la hipótesis de Sadka *et al.* (2000a), parece lógico suponer la participación de más genes en la síntesis y acumulación de ácido cítrico durante el desarrollo del fruto.

Por este motivo, en el presente capítulo se aborda el estudio de la expresión de genes determinantes de la acumulación de ácidos en los frutos cítricos tanto de manera individual

como global, mediante el análisis de micromatrices.

Al mismo tiempo, se ha estudiado el efecto del tratamiento con ácido arsánico (ácido 4-aminofenil arsónico), un conocido reductor de la acidez de los frutos que se ha utilizado con frecuencia para reducir la acidez de los pomelos mediante aplicaciones realizadas poco después de la floración (Wilson, 1987).

5.2. Materiales y métodos

5.2.1. Material vegetal

Para la cuantificación de los ácidos cítrico, málico e isocítrico se utilizaron las muestras descritas en el apartado 4.2.1. Para la hibridación de micromatrices de cDNA y RT-PCR en tiempo real se utilizaron las muestras de la pulpa de la variedad Clementina de Nules descritas en el apartado 3.2.1.

Las muestras de pulpa de frutos de la variedad Fortune utilizadas para la hibridación de las micromatrices y las RT-PCR en tiempo real fueron las descritas en el apartado 4.2.1.

Durante la campaña 2003/2004 se recolectaron muestras de dos variedades de limón (*Citrus limon* (L.) BURM. f.) con diferente contenido en ácidos: Fino, de acidez normal, y Dulce, de baja acidez. Se recogieron tres muestras de limón Fino los días 18 de julio (79 DDA), 24 de agosto (116 DDA) y 21 de octubre (174 DDA). Los frutos se escogieron al azar a partir de tres árboles cultivados en campo en una parcela situada en el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA, Moncada, Valencia) en las condiciones descritas en el apartado 3.2.1. En el caso del limón Dulce, sólo se disponía de un árbol cultivado en maceta bajo malla antipulgón con frutos en diferentes estadios de desarrollo debidos a varias floraciones, por lo que los frutos se agruparon en función de su diámetro y se recolectaron tres muestras equivalentes en tamaño y en color a las de limón Fino (**Tabla 5.1**).

Tabla 5.1. Diámetros (media \pm error estándar) de los frutos de limón Fino y limón Dulce.

| DDA (limón Fino) | 79 | 116 | 174 |
|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Limón Fino | 36,78 \pm 0,47 | 43,5 \pm 0,66 | 54,76 \pm 0,54 |
| Limón Dulce | 37,8 \pm 1,8 | 47,68 \pm 1,83 | 57,15 \pm 2,29 |

Una vez en el laboratorio, los frutos fueron pelados y tras eliminar las semillas y las columnelas, la pulpa se congeló en nitrógeno líquido y se conservó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.2.2. Tratamientos con ácido arsenílico

Los tratamientos con ácido arsenílico se realizaron sobre árboles adultos de las variedades Clementina de Nules (*Citrus clementina* Hort. ex Tan.) y el híbrido Fortune (*Citrus clemntina* Hort. ex Tan. x *Citrus tangerina* Hort. ex Tan.), dejando en el mismo árbol ramas sin tratar para la obtención de muestras control. Por cada muestra de frutos no tratados tomada durante las campañas 2003/2004 y 2004/2005 (apartado 4.2.1) se tomó otra muestra de frutos tratados.

La aplicación se llevó a cabo mediante pulverización de una solución en agua de ácido arsenílico a la concentración de 3.000 ppm. El tratamiento se realizó los días 23/06/03, durante la campaña 2003/2004(día 54 después de antesis), y el 17/06/04, durante la campaña 2004/2005 (día 61 después de antesis). El material vegetal tratado fue procesado de igual forma que el resto de las muestras (apartado 4.2.1).

5.2.3. Cuantificación de ácidos y de sólidos solubles totales

Se utilizaron los protocolos descritos en el apartado 4.2.

5.2.4. Análisis de los ácidos cítrico, málico e isocítrico mediante cromatografía iónica de adsorción

Se utilizó un cromatógrafo iónico ICS-2000 (Dionex) equipado con inyector automático AS40 (Dionex) conectado a una columna de detección de aniones AS11-HC (IonPac) con una columna supresora incorporada que funciona según la metodología de supresión química (Skoog y Leary. 1994).

La muestra utilizada para el análisis fue zumo centrifugado a 13.000 rpm (Beckman J2-21, rotor JA-14) para eliminar las paredes de las vesículas. El eluido se filtró con un filtro de nylon de $0,22\text{ }\mu\text{m}$ (Cameo). Se tomaron 0,75 ml y se diluyeron en 3,25 ml de agua, filtrándose nuevamente con un filtro de nylon de $0,22\text{ }\mu\text{m}$ (Cameo).

El flujo de inyección fue de 1 ml/minuto. La identificación de los ácidos y aniones se realizó tras la inyección de estándares de los ácidos a identificar (cítrico, málico e isocítrico). Una vez identificados se realizan curvas de calibrado con los estándares de cada uno de ellos. La

cuantificación se realizó con el programa Chromeleon (Dionex). Se analizaron tres alicuotas por muestra.

5.2.5. Obtención de un clon de cDNA de la enzima citrato sintasa de clementina

Se diseñaron oligonucleótidos de la enzima citrato sintasa a partir de las zonas conservadas de diferentes especies, usando el programa informático ClustalW (BCM Search Launcher Multiple Sequence Alignments, <http://www.searchlauncher.bcm.tmc.edu/multi-align/multi-align.html>). Los oligonucleótidos diseñados fueron CS-F1 AAATGTCAGTGCTCACACC y CS-R1 TTCTACACAAATCTCCATCC, oligo directo y reverso respectivamente, con temperaturas óptimas de alineamiento de 54,3 °C y 52,5 °C. El tamaño de la secuencia del mRNA comprendido entre los dos oligonucleótidos fue de 650 pb.

A partir de RNA total de vesículas de zumo se realizó una RT-PCR (retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa) (Saiki *et al.*, 1988), usando los oligos CS-F1 y CS-R1 con lo que se obtuvieron bandas únicas del tamaño esperado (650 pb) en un gel de agarosa, que se purificaron con el kit CONCERTTM Matriz Gel Extraction System (Gibco). Se clonaron en el vector pGEM-T (Promega) que fue usado para transformar células XL1-Blue de *Escherichia coli*, de las cuales se realizaron minipreps según Sambrook *et al.* (1989), secuenciándolas posteriormente y denominando a este clon de citrato sintasa, CS-130.

5.2.6. Hibridación de micromatrices de cDNA de cítricos (7K)

Se siguieron los protocolos descritos en el apartado 3.2.2.

5.2.7. Cuantificación de RNAs mensajeros por RT-PCR en tiempo real

Se siguió el protocolo descrito en el apartado 4.2.6, utilizando como cebadores los oligonucleótidos descritos en la **Tabla 5.2**.

Tabla 5.2. Oligonucleótidos utilizados como cebadores para la RT-PCR en tiempo real

| Gen | Orientación del oligonucleótido | Secuencia del oligonucleótido | Tamaño del amplicón |
|---------------------------|---------------------------------|-------------------------------|---------------------|
| <i>Fosfoenolpiruvato</i> | F | 5'-CGTGTTCGTCAGCTATTAGCCC-3' | 118 pb |
| <i>carboxilasa (PEPC)</i> | R | 5'-CCGCAAGAGCAGAGTGACCTAT-3' | |
| <i>NADP enzima málico</i> | F | 5'-TGAAGGAGATGAGAGACGGAGC-3' | 145 pb |
| | R | 5'-TATCCACTGGCAACGGAGATG-3' | |
| <i>NAD enzima málico</i> | F | 5'-TTGGCGATCTTGAGTTCAGG-3' | 114 pb |
| | R | 5'-TCCCGACGTCAAGCATAACTG-3' | |
| <i>Citrato sintasa</i> | F | 5'-AAACCCCTGGCCAAATGTT-3' | 141 pb |
| | R | 5'-AGAGCTCGGTCCCATATCAACT-3' | |
| <i>ATP citrato liasa</i> | F | 5'-AATTATTGCCGAAGGTGTGCC-3' | 121 pb |
| | R | 5'-GCTCCAGCTTGAATCCTCCA-3' | |

5.3. Resultados y discusión

5.3.1. Efecto del tratamiento con ácido arsánico sobre la concentración de ácidos

Las aplicaciones de derivados de arsénico poco después de la floración han sido utilizadas de forma habitual en los Estados Unidos de América para reducir la acidez de los pomelos, observándose un efecto significativo al final de la maduración (Wilson, 1987). El ácido arsánico (ácido 4-aminofenil arsónico) es un conocido inhibidor de la acidez de los frutos cítricos que presumiblemente inhibe los complejos multienzimáticos piruvato deshidrogenasa y α -cetoglutarato deshidrogenasa (Hu *et al.*, 1998; Lenartowicz *et al.*, 1990; Lopez *et al.*, 1990; Crafts, 1977). Con el propósito de determinar el efecto del ácido arsánico sobre el metabolismo de los ácidos se analizó el contenido de ácidos totales de frutos de Clementina de Nules y Fortune recogidos así como el contenido en los ácidos cítrico, málico e isocítrico. La acidez de los frutos tratados con ácido arsánico siguió una evolución temporal paralela a la de los frutos no tratados (**Figura 5.1**), aunque la concentración de ácidos fue menor a partir del tratamiento.

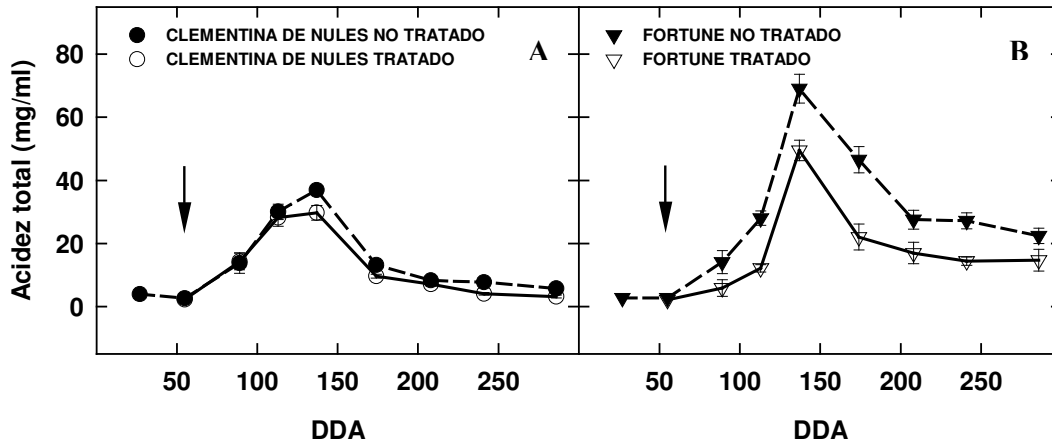


Figura 5.1. Evolución temporal de la concentración de ácidos en frutos de las variedades Clementina de Nules (A) y Fortune (B) tratados con ácido arsenílico y no tratados correspondientes a la campañas 2003/2004. Los tratamientos fueron realizados los días 54 y 61 después de antesis (flechas). Las barras verticales representan los errores estándar ($n \geq 3$).

Estos resultados indican que una reducción en el nivel de ácidos durante el periodo de acumulación de los mismos es suficiente para que la acidez se mantenga reducida durante todo el proceso de desarrollo y maduración de los frutos, lo que indica que el contenido en ácidos de los frutos cítricos depende, mayoritariamente, de su síntesis y acumulación durante las primeras fases del desarrollo.

La cuantificación mediante cromatografía iónica del contenido en ácido málico, ácido cítrico y ácido isocítrico indicó que la concentración de los ácidos málico y cítrico (**Figura 5.2**) disminuye poco después de realizado el tratamiento con ácido arsenílico, aunque se mantiene el mismo perfil que en los frutos no tratados.

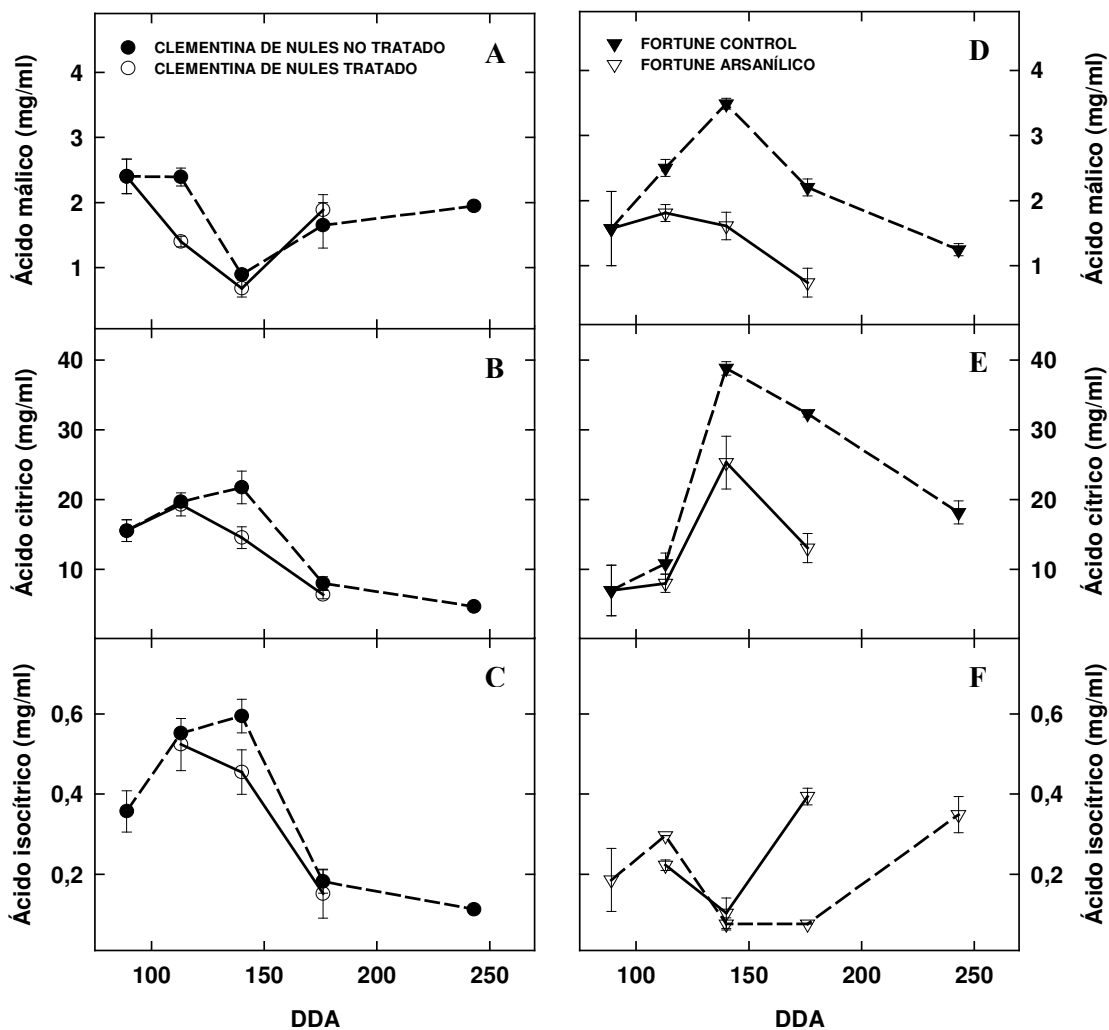


Figura 5.2. Concentración de los ácidos málico (A y D), cítrico (B y E) e isocítrico (C y F) en el zumo de frutos de las variedades Clementina de Nules (A, B y C) y Fortune (D, E y F) tratados con ácido arsánico y no tratados. Los tratamientos fueron realizados a los 54 y 61 después de antesis. (DDA). Las barras verticales representan los errores estándar ($n \geq 3$).

Aunque la acidez de los frutos cítricos es mayoritariamente consecuencia de la concentración de ácido cítrico (Sinclair *et al.*, 1945; Clements, 1964), los resultados de la cuantificación del ácido málico muestran un perfil diferente en las dos variedades estudiadas, de manera que en la variedad Fortune la máxima concentración de este ácido se produce simultáneamente con el pico de acidez del ácido cítrico (**Figura 5.2 D y E**), mientras que en la variedad Clementina de Nules el pico de ácido málico y el ácido cítrico mostraron perfiles diferentes (**Figura 5.2 A y B**).

De hecho, de las cuatro variedades de mandarina utilizadas en este trabajo (Marisol, Clementard, Clementina de Nules y Fortune) únicamente la variedad Fortune presentó una evolución diferente de los niveles de ácido málico (**Figura 5.3**).

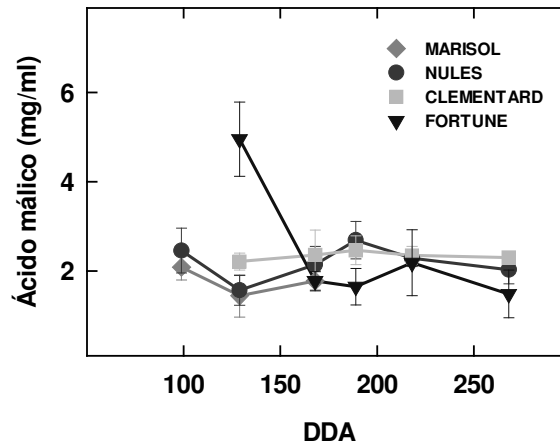


Figura 5.3. Concentración de ácido málico en el zumo de las variedades Marisol, Clementina de Nules, Clementard y Fortune analizada mediante cromatografía líquida de adsorción. Muestras de la campaña 2001/2002. El eje de abscisas muestra el tiempo, expresado en días después de anthesis (DDA). Las barras verticales representan los errores estándar ($n \geq 3$).

5.3.2. Expresión de los genes de las principales enzimas implicadas en el metabolismo de los ácidos

El análisis de la expresión de la enzima citrato sintasa que sintetiza el ácido cítrico mediante la condensación de una molécula de acetil-CoA con otra de oxalacetato, indicó que los niveles de transcrito no cambian significativamente durante la maduración y el desarrollo del fruto en ambas variedades (**Figura 5.4**), aunque son ligeramente más altos en la mandarina Clementina de Nules que en el híbrido Fortune, sugiriendo que la enzima citrato sintasa no se encuentra directamente relacionada con la concentración de ácidos en los frutos cítricos (Sadka *et al.*, 2000a,b; Canel *et al.*, 1996). Por otro lado se observó que en los frutos tratados con ácido arsánico se produjo un descenso en el nivel de expresión de esta enzima que coincidió con la reducción en la concentración de ácido cítrico.

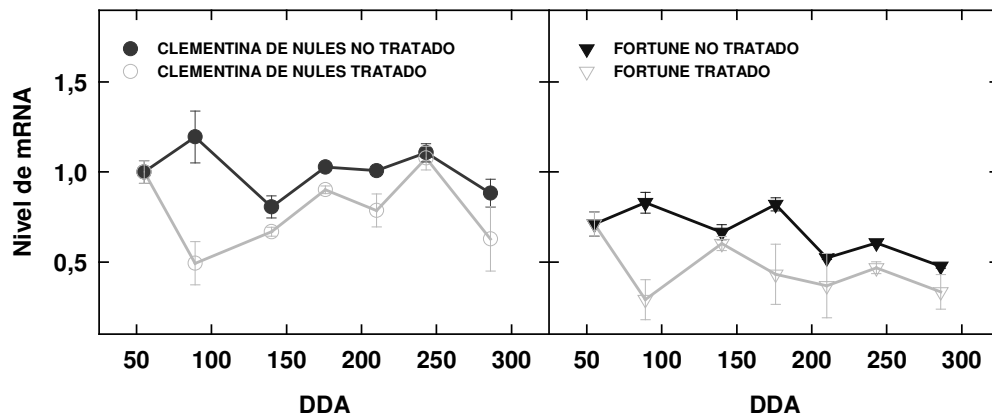


Figura 5.4. Niveles de mRNA de la enzima citrato sintasa en la pulpa de frutos tratados con ácido arsánico y no tratados de las variedades Clementina de Nules y Fortune. Los análisis se realizaron mediante RT-PCR en tiempo real asignándose arbitrariamente el valor de expresión 1 a la primera muestra de la variedad Clementina de Nules. (DDA, días después de antesis). Las barras verticales representan los errores estándar (n ≥ 3).

Puesto que no se observó una correlación entre la acumulación de citrato en los frutos cítricos y la expresión de la citrato sintasa en los frutos de Clementina de Nules y Fortune, se estudió el patrón de expresión de la fosfoenolpiruvato carboxilasa, que transforma el fosfoenolpiruvato en oxalacetato y que está implicada en una ruta anaplerótica de incorporación de carbono al ciclo de Krebs (**Figuras 1.3 y 1.4**).

Las dos variedades mostraron un perfil de expresión de fosfoenolpiruvato carboxilasa similar y bastante uniforme a lo largo del desarrollo y la maduración de los frutos (**Figura 5.5**). Además se observó que, las muestras de los frutos tratados con ácido arsánico, experimentaron una subida más lenta del nivel de transcrito después de la realización del tratamiento.

Los resultados obtenidos fueron verificados con muestras de la campaña siguiente, 2004/2005 (datos no mostrados).

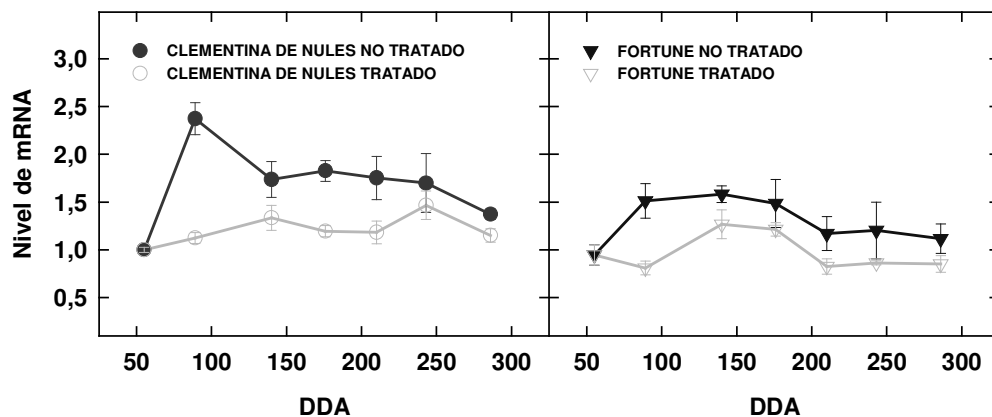


Figura 5.5. Niveles de mRNA de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa en la pulpa de frutos tratados con ácido arsánico y no tratados de las variedades Clementina de Nules y Fortune. Los análisis se realizaron mediante RT-PCR en tiempo real asignándose arbitrariamente el valor de expresión 1 a la primera muestra de la variedad Clementina de Nules. (DDA, días después de anthesis). Las barras verticales representan los errores estándar ($n \geq 3$).

Además del piruvato y el oxalacetato, el malato del citosol supone otra fuente de carbono capaz de atravesar la membrana mitocondrial (**Figura 1.4**). Aunque es bien conocida la capacidad de la enzima málica dependiente de NADP^+ de catalizar la reacción de descarboxilación oxidativa de malato a piruvato, Wheeler *et al.* (2008) observaron que las cuatro isoenzimas de la enzima málica dependiente de NADP^+ presentes en *Arabidopsis thaliana* eran capaces de catalizar la reacción reversa con un máximo de actividad cercano al de la reacción directa.

El análisis mediante RT-PCR en tiempo real de la enzima málica dependiente de NADP^+ mostró que en la variedad Clementina de Nules durante el periodo de acumulación de ácido cítrico, en el que simultáneamente se produce un descenso en la concentración del ácido málico (**Figura 5.2 A y B**), el nivel de transcrito permanece constante, mientras que en la variedad Fortune se produce un incremento de su expresión que coincide con un aumento en la concentración de ácido málico (**Figuras 5.6, 5.2 y 5.3**). De manera que la variedad Fortune, durante la etapa de acumulación de ácidos podría transformar en el citosol parte de piruvato procedente de la glicolisis en malato, que podría ser acumulado en la vacuola. De esta forma, la enzima málica dependiente de NADP^+ , además de participar en la descarboxilación del malato estaría contribuyendo en la acumulación de ácidos en los frutos, tal y como sugieren Wheeler *et al.* (2008) que sucede en *Arabidopsis thaliana* donde dicha

enzima parece estar implicada en la síntesis de ácidos orgánicos en determinados tejidos o en particulares situaciones metabólicas.

Además, se observó que poco después de realizar el tratamiento con ácido arsenílico los frutos de Fortune experimentaron una ralentización en la subida del nivel de transcrito de la enzima málica dependiente de NADP^+ y lo de Clementina de Nules una bajada en la expresión de esta enzima que coincidió en ambas variedades con una menor acumulación de ácido málico.

Los resultados obtenidos fueron verificados con muestras de la campaña siguiente, 2004/2005 (datos no mostrados).

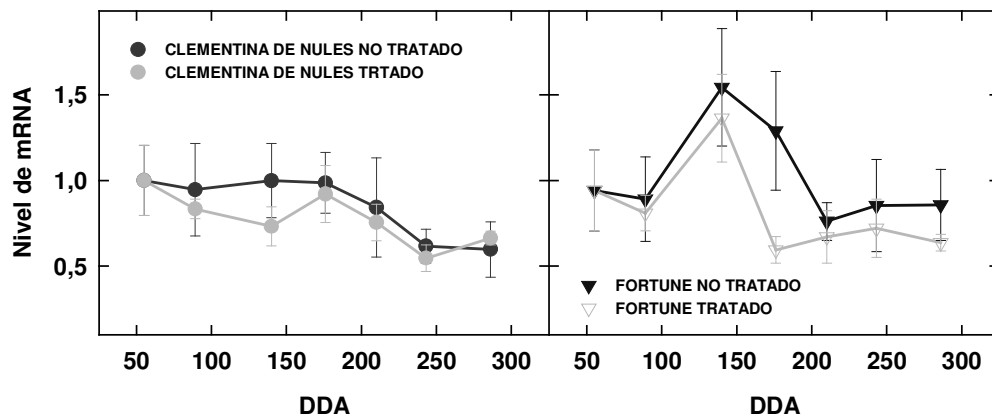


Figura 5.6. Niveles de mRNA de la enzima málica dependiente de NADP^+ en la pulpa de frutos tratados con ácido arsenílico y no tratados de las variedades Clementina de Nules y Fortune. Los análisis se realizaron mediante RT-PCR en tiempo real asignándose arbitrariamente el valor de expresión 1 a la primera muestra de la variedad Clementina de Nules. (DDA, días después de antesis). Las barras verticales representan los errores estándar ($n \geq 3$).

Dentro de la mitocondria, el malato puede ser transformado en oxalacetato por la acción de la malato deshidrogenasa u oxidarse a piruvato mediante una reacción anaplerótica reversible catalizada por la enzima málica dependiente de NAD^+ (Deuce, 1985).

Se midió el nivel de mRNA de la enzima málica dependiente de NAD^+ en muestras de frutos de Clementina de Nules y Fortune tratados con ácido arsenílico y no tratados, observándose que los niveles de mRNA de la enzima málica dependiente de NAD^+ fueron altos al principio del desarrollo de los frutos (89 DDA) descendiendo seguidamente hasta el momento en el que la concentración de ácidos en los frutos es máxima (entre el día 125 y 155 DDA; **Figura 5.7**).

Los patrones de expresión observados fueron verificados sobre muestras de la campaña siguiente, 2004/2005 (datos no mostrados).

Al igual que en el citosol, según Wheeler *et al.* (2008) la enzima málica dependiente de NADP^+ podría estar produciendo malato a partir de piruvato, podría suceder en la reacción reversible catalizada por la enzima málica dependiente de NAD^+ durante la acumulación de ácidos. De manera que, en el interior de la mitocondria se estaría produciendo un exceso de malato que regeneraría mediante la incorporación de oxalacetato los carbonos perdidos en el ciclo de los ácidos tricarbónicos como consecuencia del transporte de citrato al citosol..

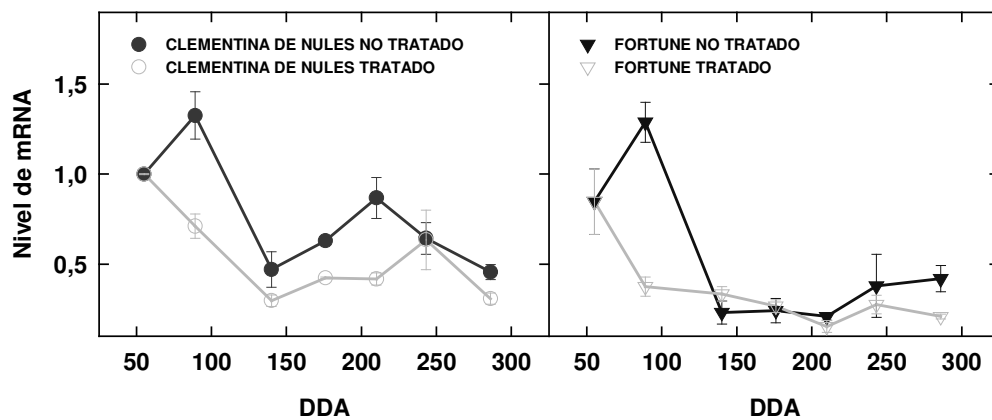


Figura 5.7. Nivel de mRNA de la enzima málica dependiente de NAD^+ en la pulpa de frutos tratados con ácido arsánico y no tratados de las variedades Clementina de Nules y Fortune. Los análisis se realizaron mediante RT-PCR en tiempo real asignándose arbitrariamente el valor de expresión 1 a la primera muestra de la variedad Clementina de Nules. (DDA, días después de antesis). Las barras verticales representan los errores estándar ($n \geq 3$).

En los frutos tratados con ácido arsánico se produce una disminución en el nivel de mRNA de la enzima málica dependiente de NAD^+ después de realizar el tratamiento, observándose que la reducción del aporte de carbono por esta vía produce una disminución de la síntesis de ácidos.

El piruvato es oxidado por el complejo enzimático piruvato deshidrogenasa para dar lugar a acetil-CoA, CO_2 y NADH. El acetil-CoA se fusiona con el oxalacetato, proceso catalizado por la enzima citrato sintasa que producirá una molécula de ácido cítrico que puede ser exportado al citosol (Ribas-Carbó y González-Meler, 2000).

Una vez en el citosol, la ATP citrato liasa, que es una enzima heteromérica compuesta por dos unidades distintas (ACLA y ACLB) ubicadas en el citosol y que no poseen ningún tipo

de péptido señal, utiliza el ácido cítrico para producir oxalacetato y acetyl-CoA que posteriormente servirá para sintetizar la cadena fitol de las clorofilas, los carotenoides, esteroides y giberelinas (Fatland *et al.*, 2000; Fatland *et al.*, 2002).

Se observó que la expresión del gen que codifica la subunidad B de la enzima ATP citrato liasa (**Figura 5.8**) fue alta al principio del desarrollo del fruto, disminuyendo progresivamente hasta el momento de mayor acumulación de ácidos. Un descenso en la expresión de este gen produciría una disminución en la utilización del citrato, que quedaría disponible para ser acumulado en la vacuola. También se observó que la expresión de la ATP citrato liasa es mayor en la variedad de mandarina Clementina de Nules que en el híbrido Fortune durante las primeras fases del desarrollo, lo cual se correlaciona con la diferencia de acidez observada entre estas dos variedades (**Figura 5.1 y 5.2**).

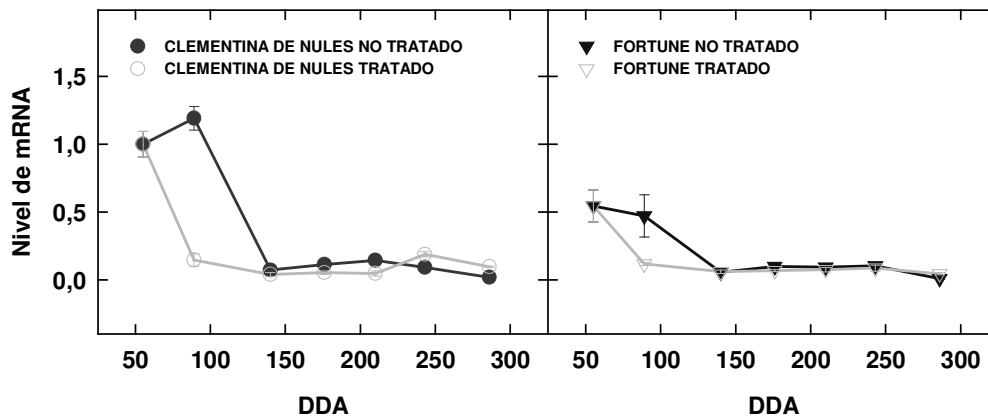


Figura 5.8. Nivel de mRNA de la enzima ATP citrato liasa en la pulpa de frutos tratados con ácido arsenílico y no tratados de las variedades Clementina de Nules y Fortune. Muestras de la temporada 2003/2004. Los análisis se realizaron mediante RT-PCR en tiempo real asignándose arbitrariamente el valor de expresión 1 a la primera muestra de la variedad Clementina de Nules. (DDA, días después de anthesis). Las barras verticales representan los errores estándar ($n \geq 3$).

Los frutos tratados con ácido arsenílico experimentaron un descenso del nivel de transcrito de la subunidad B ATP citrato liasa después de realizar el tratamiento en ambas variedades, sin embargo no se detectó ningún aumento en la concentración de ácido cítrico, probablemente como consecuencia de la reducción en la expresión que se produce en la enzima málica dependiente de NAD^+ durante la fase de acumulación de ácidos (**Figura 5.7**). Para corroborar la correlación de esta enzima con la diferencia de acidez observada entre la variedad Clementina de Nules y el híbrido Fortune se analizó la expresión de este gen en dos

variedades de limón, una de acidez alta, limón Fino, y otra de acidez muy baja, limón Dulce. El limón Dulce presentó altos niveles de transcrito de la ATP citrato liasa al principio del desarrollo que disminuyeron con la maduración (**Figura 5.9**), mientras que su concentración de ácidos totales no sufrió variación alguna (**Tabla 5.3**).

Tabla 5.3. Concentración de ácidos totales en la pulpa de los limones Fino, de acidez normal, y Dulce, de baja acidez. Los datos son medias (\pm ES, $n \geq 3$) de un set de resultados típico.

| Ácidos totales (mg / ml extracto de zumo) | Diámetro mm | | |
|---|------------------|-----------------|------------------|
| | 35-40 | 41-52 | 53-61 |
| Limón Fino | 38,83 \pm 2,77 | 75,3 \pm 0,65 | 85,37 \pm 1,18 |
| Limón Dulce | 5,5 \pm 0,35 | 4,61 \pm 0,67 | 4,46 \pm 0,55 |

El limón Fino presentó niveles de transcrito muy bajos en todas las muestras analizadas (**Figura 5.9**), siendo prácticamente inapreciable en comparación con el observado en el limón Dulce.

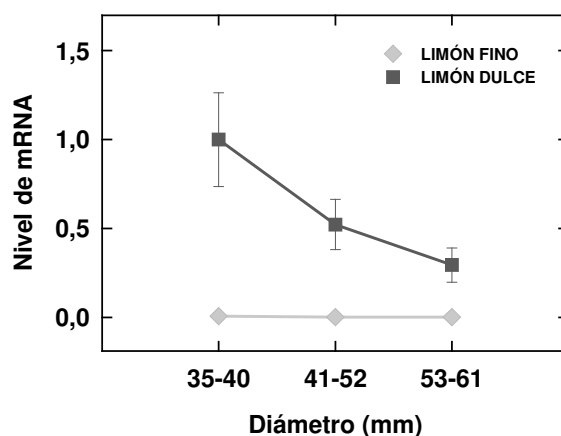


Figura 5.9. Niveles de mRNA de la enzima ATP citrato liasa en la pulpa de frutos de dos variedades de limón: Fino, de acidez alta, y Dulce, de baja acidez. Los análisis se realizaron mediante RT-PCR en tiempo real asignándose arbitrariamente el valor de expresión 1 a la primera muestra del limón Fino. (DDA, días después de antesis). Las barras verticales representan los errores estándar ($n \geq 3$).

Estos resultados apoyan la hipótesis de que valores de expresión bajos de la ATP citrato liasa se correlacionan con una mayor acumulación de ácido cítrico en los frutos. El descenso en el nivel de transcrito de esta enzima observado en el limón dulce durante su desarrollo no se

correspondió con un aumento de su acidez, lo que podría ser explicado como consecuencia de una disminución de la enzima málica dependiente de NAD^+ , tal y como se pudo observar que sucedía en los frutos de Clementina de Nules y Fortune tratados con ácido arsánico.

5.3.3. Cambios en la expresión génica inducida por ácido arsánico

Los resultados del análisis de expresión mediante RT-PCR en tiempo real de las enzimas implicadas en la síntesis de ácidos en los frutos tratados con ácido arsánico, mostraron una disminución del nivel de transcrito de todos los genes estudiados (citrato sintasa, fosfoenolpiruvato carboxilasa, enzima málica dependiente de NADP^+ , enzima málica dependiente de NAD^+ y ATP citrato liasa). Queda por esclarecer si la reducción en la acumulación de ácidos observada en los frutos tratados se debe a un efecto directo sobre las enzimas implicadas en la respiración o si por el contrario se debe a un efecto fitotóxico inespecífico de este compuesto.

Mediante análisis de micromatrices de cDNA se han identificado los cambios en la expresión génica producidos por el tratamiento con ácido arsánico de los frutos de la Clementina de Nules. Para ello, muestras de 89 días después de anéctis de la variedad Clementina de Nules tratadas con ácido arsánico frente a muestras no tratadas.

De manera que, 1359 sondas mostraron cambios significativos, de las cuales 1070, que se corresponden con 914 posibles unigenes (13,4 %) siendo 391 contigs y 523 sigletons, presentaron una inducción significativa del nivel de transcripción. Al mismo tiempo 289 sondas, que se corresponden con 221 posibles unigenes (3,2 %) siendo 145 contigs y 76 singletons, se reprimieron de forma significativa (**Anexo 3**).

Agrupando las sondas de la micromatriz que mostraron diferencias significativas según sus correspondientes rutas metabólicas, se observó que el ciclo de Calvin y la glicolisis se encontraban reprimidas, puesto que se reprimieron la gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa, la 3-fosfoglicerato quinasa (ambas presentes en las dos rutas) y la transcetolasa. Esto sugiere una reducción, tanto de la fijación de carbono como de su suministro al ciclo de los ácidos tricarbóxicos. Al mismo tiempo se observó una reducción en la expresión de la fructosa bifosfato aldolasa que cataliza la transformación de las triosas fosfato presentes en el citosol procedentes del ciclo de Calvin (cloroplasto) en fructosa-1,6 bifosfato. Finalmente, se puede destacar la represión observada en la enzima málica dependiente de NAD^+ y la aconitasa mitocondrial. El resto de las principales rutas metabólicas relacionadas con la respiración y la captación de carbono, y por tanto con la

síntesis de ácidos orgánicos en los frutos cítricos, como son: la ruta de síntesis de sacarosa en el citosol, la ruta de degradación de la sacarosa, la ruta de las pentosas fosfato y la fosforilación oxidativa no mostraron alteraciones significativas.

El total de los datos obtenidos con este análisis se encuentra representado en la **Figura 5.10** y en la **Tabla suplementaria 1**.

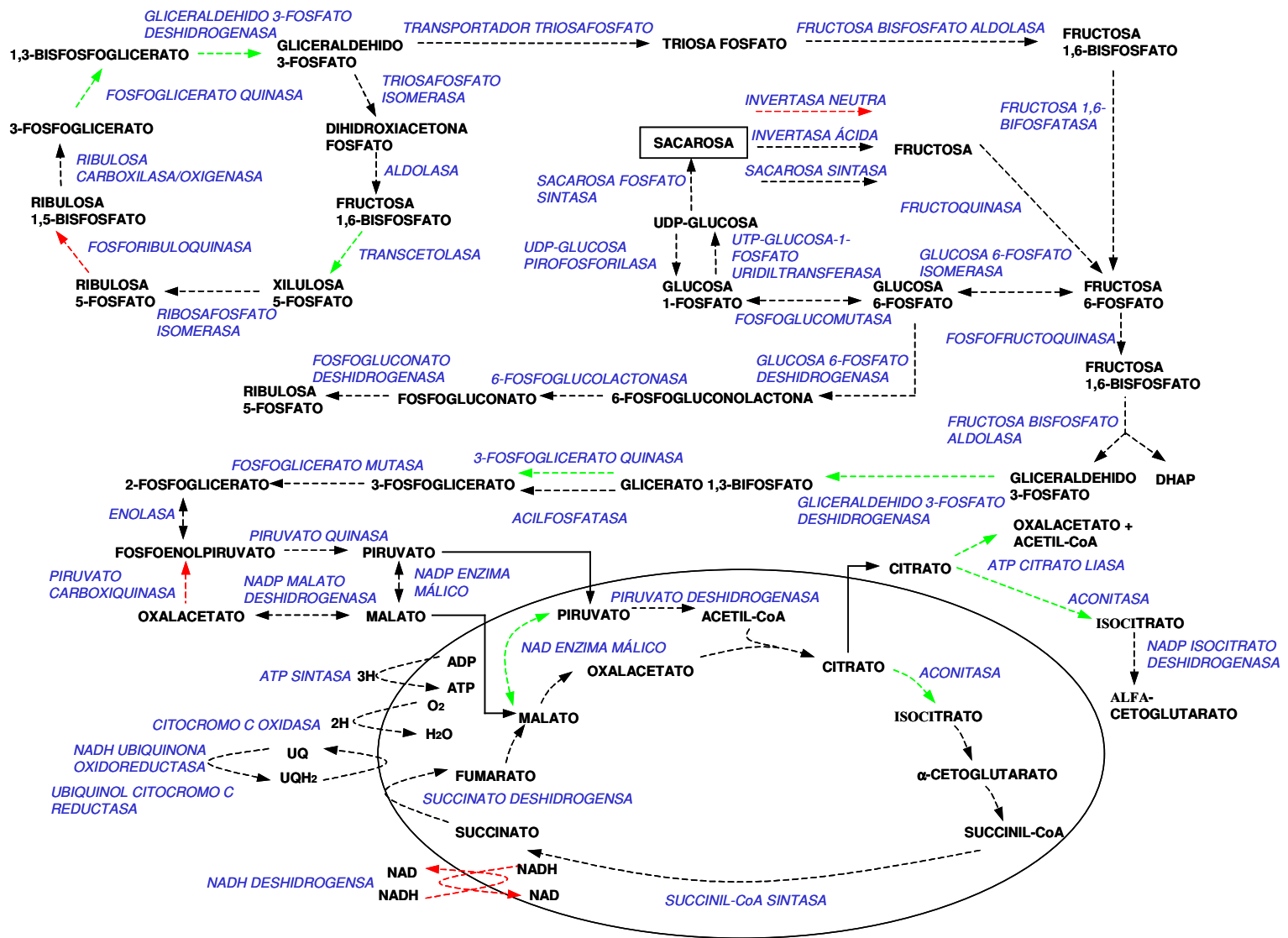


Figura 5.10. Principales rutas metabólicas relacionadas con la síntesis de ácidos orgánicos que se inducen (rojo) o se reprimen (verde) en frutos de Clementina de Nules tratados con ácido arsenílico.

Los resultados obtenidos de las micromatrices de frutos de Clementina de Nules tratados con ácido arsánico mostraron que dicho compuesto no producía un efecto específico sobre las enzimas de la respiración, puesto que también reducía el nivel de transcrito de enzimas pertenecientes al ciclo de Calvin y de la glicolisis. Además, atendiendo a la forma de actuación del arsenato en el interior de las células, Ullrich-Eberius *et al.*, (1989) observaron que se comporta como un análogo del fosfato, transportándose a través de la membrana plasmática mediante un sistema de cotransporte de fosfato. Una vez en el interior de la célula podría actuar de dos modos diferentes: en el primero estaría compitiendo con el fosfato, por ejemplo reemplazando el fosfato de las moléculas de ATP y formándose ADP-As interrumpiendo los canales de energía (Meharg y Hartley-Whitaker, 2002) mientras que en el segundo estaría reduciendo el arsenato a arsenito el cual reacciona con los grupos sulfhidrilos (-SH) de los enzimas y de las proteínas de los tejidos (Ullrich-Eberius *et al.*, 1989).

En las plantas, el ion arsenato se transforma en arsenito mediante la acción de antioxidantes enzimáticos como la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión-S-transferasa; además de antioxidantes no enzimáticos como el glutatión y el ascorbato (Meharg y Hartley-Whitaker, 2002).

Los resultados sugirieron que en los frutos cítricos, el arsenato procedente del ácido arsánico no es transformado en arsenito, puesto que los frutos tratados presentaron niveles de mRNA de superóxido dismutasa, catalasa y glutatión-S-transferasa menores que en los frutos no tratados (**Tabla 5.4**). De tal modo, que el efecto del ácido arsánico en los frutos cítricos podría estar más relacionado con la competencia entre el arsénico y el ion fosfato en las moléculas de ATP.

Tabla 5.4. Sondas con diferencias significativas de expresión en el endocarpio de frutos de Clementina de Nules tratados con ácido arsánico frente a no tratados (89 DDA). Se consideraron diferencias significativas cuando las ratios de inducción o represión fueron ≥ 2 veces y el valor de $P \leq 0,001$. Los datos son media \pm E.S de 3 réplicas.

| Nº de acceso del EST de cítricos | tBLASTX (mejor hit) | Identidad ^a | Ortólogo de <i>Arabidopsis</i> | Estadio MG Log ₂ ratio ^b |
|----------------------------------|---|------------------------|--------------------------------|--|
| CX301645 | Superóxido dismutasa [<i>Hevea brasiliensis</i>] | 80% | - | -1,31 \pm 0,21 |
| CX300714 | Catalasa [<i>Vitis vinifera</i>] | 82% | - | -1,36 \pm 0,28 |
| CX293983 | Glutathione-S-transferasa [<i>Arabidopsis thaliana</i>] | 70% | At1g10370 | -1,04 \pm 0,18 |

^a Identidad a nivel de aminoácidos. ^b Los valores de inducción o represión se expresaron como las transformaciones logarítmicas de las medias de los ratios de expresión Clementina de Nules tratada con ácido arsánico/Clementina de Nules no tratada.

5.3.4. Comparación de la expresión génica en el endocarpo de las variedades Clementina de Nules y Fortune

Los resultados del análisis de expresión realizados mediante RT-PCR en tiempo real de enzimas implicadas en la síntesis de ácidos en frutos de la variedad Fortune mostraron una menor expresión de la ATP citrato liasa, lo que daría lugar a una menor utilización del citrato exportado al citosol y por tanto permitiría una mayor acumulación en la vacuola. Además, se observó que en la variedad Fortune se produce un aumento de expresión de la enzima málica dependiente de NADP⁺ que coincide con la acumulación de ácido málico en la pulpa de los frutos. Aunque estos resultados podrían justificar las diferencias en la acumulación de los ácidos orgánicos observadas entre las dos variedades, sería interesante conocer si el resto de enzimas implicadas en el metabolismo de los ácidos presenta también diferencias de expresión entre las dos variedades.

Mediante análisis de micromatrices de cDNA se han identificado las diferencias globales en la expresión génica entre los frutos de Clementina de Nules y Fortune. Para ello, se han comparado muestras de 89 días después de anthesis de las variedades Clementina de Nules y Fortune.

De manera que, 2368 sondas mostraron cambios significativos de expresión, de las cuales 1338 se indujeron más de dos veces. Las sondas inducidas significativamente se correspondían con 1090 unigenes distribuidos en 487 contigs y 603 singletons. Al mismo tiempo, se reprimieron significativamente 1030 sondas, que conformaban 695 unigenes divididos en 443 contigs y 252 singletons (**Anexo 4**).

En la **Tabla 5.7** se resumen los cambios observados en rutas metabólicas que guardan cierta relación con la acumulación de ácidos aunque no esten directamente implicadas, y que se han obtenido mediante la identificación de las sondas que mostraron cambios significativos en el contraste de micromatrices realizado entre la variedad Fortune y la Clementina de Nules. El total de los datos obtenidos con este análisis se encuentra representado en la **Tabla suplementaria 2**.

Tabla 5.5. Rutas metabólicas con expresión diferencial entre frutos de las variedades Fortune y Clementina de Nules (89 DDA), basado en el análisis de micromatrices.

| Más activas en Fortune | Menos activas en Fortune |
|----------------------------|--------------------------------------|
| Ciclo de Calvin | Síntesis de sacarosa |
| Glicólisis | Ruta de las pentosas fosfato |
| Degradación de la sacarosa | Fosforilación oxidativa |
| | Degradación de citrato en el citosol |

Los contrastes indicaron que en la variedad Fortune había una expresión significativamente mayor de las enzimas del ciclo de Calvin como ribosa-5-fosfato isomerasa, transcetolasa (ambas presentes también en la ruta de las pentosas fosfato) fosforibuloquinasa y gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (esta última presente también en la glicolisis).

Dado que las vesículas de la pulpa de los frutos cítricos presentan una alta capacidad de fijación de carbono como un posible sistema de compensar las pérdidas producidas por la acumulación de ácidos (Bean y Todd, 1960), el aumento en la expresión de las enzimas del ciclo de Calvin durante la acumulación de ácidos de la variedad Fortune, supone una mayor disponibilidad de carbohidratos para reponer las pérdidas producidas por la síntesis de ácidos.

Las triosas fosfato sintetizadas en el ciclo de Calvin son cotransportadas al citosol junto al fosfato inorgánico (Medrano y Flexas, 2000) utilizándose allí para la síntesis de fructosa-1,6 bifosfato por la acción de la fructosa bifosfato aldolasa, enzima que se expresó más en la variedad Fortune. No se observaron cambios en el paso inverso catalizado por la fructosa-1,6-bifosfatasa.

La menor expresión observada en los genes de las enzimas UDP-glucosa pirofosforilasa (síntesis de sacarosa), 6-fosfogluconolactonasa y fosfogluconato deshidrogenasa (las dos últimas pertenecientes a la ruta de las pentosas fosfato) en la variedad Fortune supone una limitación en la utilización de la fructosa-6-fosfato tanto en la síntesis de sacarosa como en la ruta de las pentosas fosfato. De manera que, todos los carbonos fijados en el ciclo de Calvin podrán ser utilizados en la glicolisis.

Los resultados obtenidos con las micromatrices muestran que, en la variedad Fortune, de las tres enzimas principales implicadas en el metabolismo de la sacarosa, la sacarosa sintasa y la invertasa neutra presentaban una mayor expresión, mientras que la invertasa ácida se expresaba menos, lo que coincide con los resultados del análisis de la actividad obtenidos por Lowell *et al.* (1989) donde la actividad de la sacarosa sintasa, que se correlaciona con la

utilización de los carbohidratos importados (Gross y Pharr, 1982; Lowell *et al.*, 1989), y la invertasa neutra aumentaban durante el periodo de expansión de las vesículas del fruto (fase II), mientras que la actividad de la invertasa ácida, relacionada con la acumulación de carbohidratos principalmente sacarosa (Lingle, y Dunlap, 1987; Lowell *et al.*, 1989), aumentaba durante la fase III. Resulta interesante destacar que en la variedad Fortune es significativamente mayor la expresión de un transportador de sacarosa, lo que podría implicar un mayor aporte de carbono a la glicolisis por parte de los órganos fuente de carbohidratos. Además se observó que en la degradación de la sacarosa de la variedad Fortune es la menor expresión de la UTP-glucosa-1-fosfato uridiltransferasa, que transforma la UDP-glucosa procedente de la degradación de la sacarosa por la sacarosa sintasa en glucosa-1-fosfato, que puede ser utilizada tanto en la ruta de las pentosas fosfato como en la glicolisis. Por lo que los carbonos de la sacarosa podrán ser suministrados a la glicolisis o ser utilizados para la síntesis de celulosa, lo cual coincide con lo observado durante la maduración de los frutos (**Tabla 3.5**).

También se observó una mayor expresión de la fructosa bifosfato aldolasa, la gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa, la acilfosfatasa, la piruvato quinasa y la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, implicadas en el aporte de sustratos para la respiración.

Al mismo tiempo, la mayoría de las enzimas pertenecientes a la ruta de la fosforilación oxidativa presentaron niveles de expresión menores. Esta menor expresión de la ruta de la fosforilación oxidativa se produce cuando la cadena respiratoria se encuentra altamente reducida y/o cuando los metabolitos de la mitocondria se encuentran en exceso. En estos casos, las mitocondrias de las plantas tienen mecanismos que les permiten oxidar el exceso de NADH produciendo calor sin que se produzca la síntesis de ATP, que inhibe la actividad de la fosfofructoquinasa y por tanto de la glicólisis (Heldt, 2005; Ribas-Carbó y González-Meler, 2000). De esta manera, la mayor expresión de los genes de la glicolisis y del ciclo de Calvin unida a la menor expresión de la ATP citrato liasa podrían estar generando un exceso de metabolitos mitocondriales en la variedad Fortune.

En la **Figura 5.11** se representa de forma esquemática el contraste de las micromatrices de Fortune control frente a la Clementina de Nules control (89 DDA).

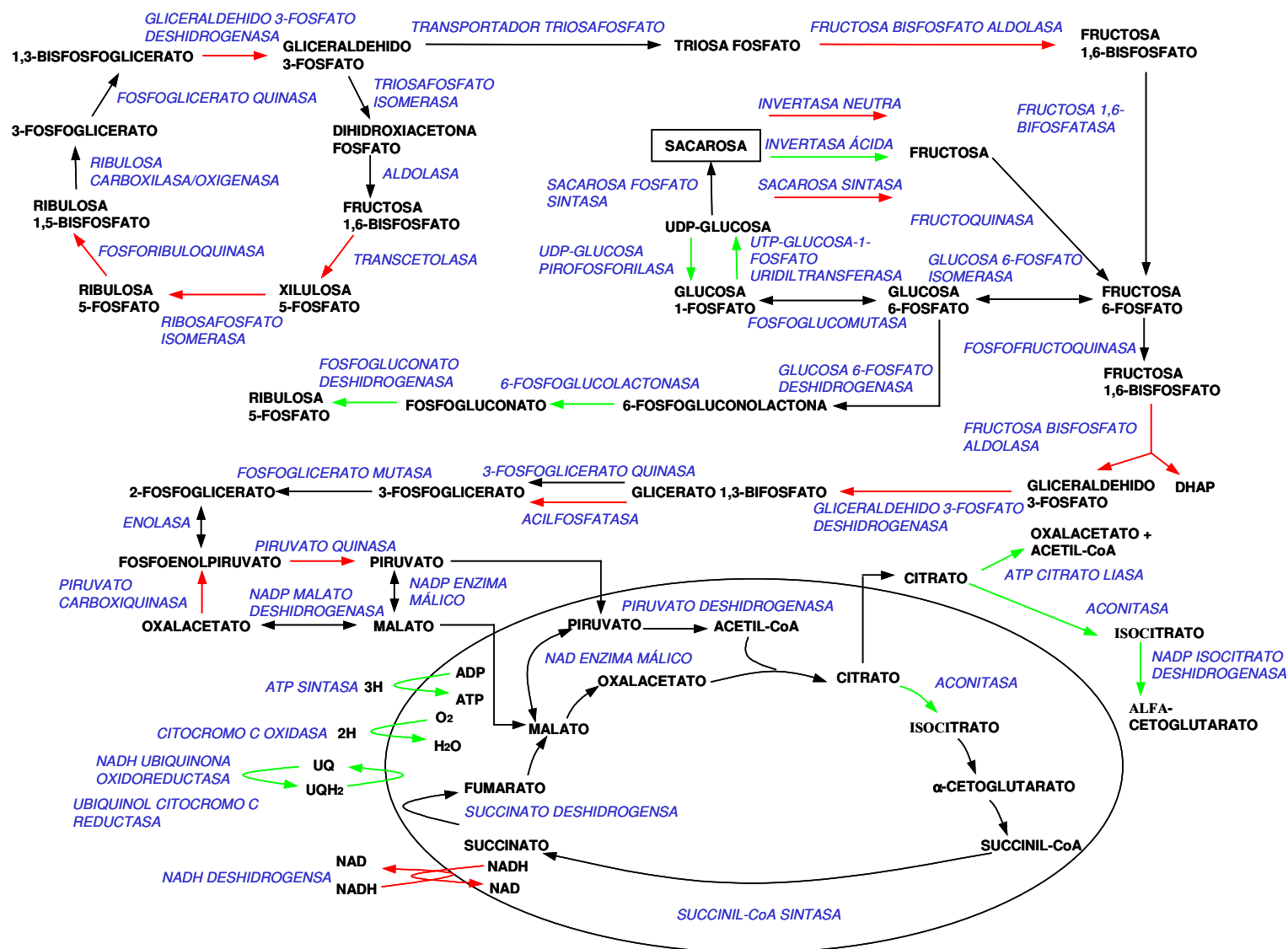


Figura 5.11. Principales rutas metabólicas relacionadas con la síntesis de ácidos orgánicos presentes en la micromatriz, que se inducen (rojo) o se reprimen (verde) en los contratos de Fortune / Clementina de Nules (89 DDA).

De los datos obtenidos mediante micromatrices se puede concluir de forma convincente los motivos por los que la variedad Fortune presenta un mayor contenido en ácidos que la variedad Clementina de Nules. De hecho, en la variedad Fortune se observó una mayor expresión de los genes del ciclo de Calvin, la degradación de la sacarosa y la glicolisis; mientras que los genes de la síntesis de sacarosa, síntesis de almidón, la respiración y la degradación del citrato en el citosol presentaron una menor expresión (**Figura 5.12**). Al mismo tiempo los genes del ciclo de Calvin y la glicolisis de los frutos de Clementina de Nules tratados con ácido arsánico se expresaron menos que los de los frutos no tratados, por lo que se deduce que estas dos rutas deben ser decisivas para la acumulación de ácidos.

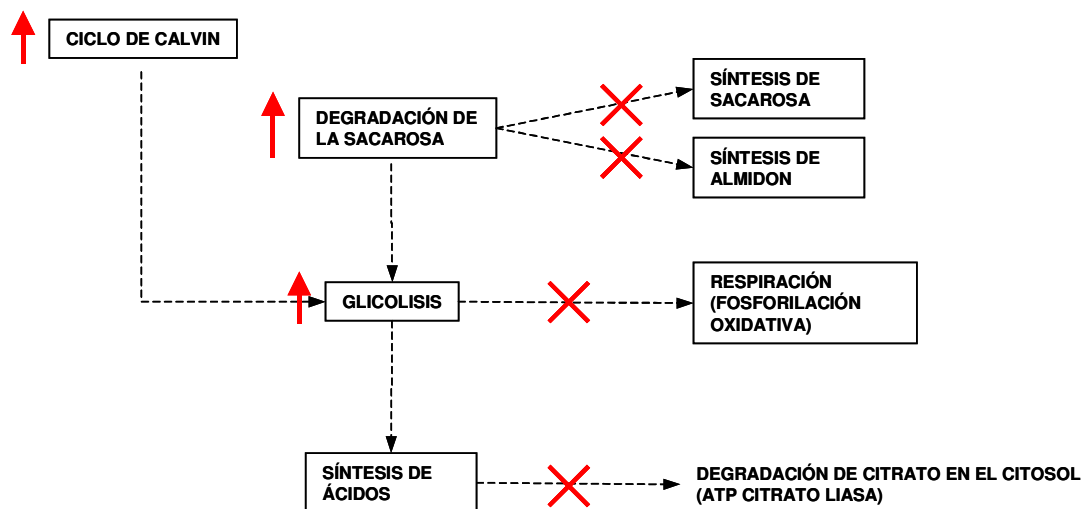


Figura 5.12. Esquema de las rutas que presentaron mayor y menor expresión (flechas con línea continua y X, respectivamente) en la variedad Fortune que en la variedad Clementina de Nules.

VI. Discusión general

Uno de los objetivos clásicos de la mejora de cítricos y de la propia investigación cítrica consiste en prolongar o retrasar el periodo de maduración de los frutos, lo cual, reportaría importantes repercusiones económicas al ampliar su periodo de comercialización. La maduración de los frutos cítricos puede dividirse en dos grandes procesos: por un lado, la maduración interna o de la pulpa, caracterizada fundamentalmente por la acumulación de azúcares y la degradación de ácidos, y por otro lado, la maduración externa, en la que se produce el cambio de color. Aunque ambos procesos se producen generalmente a la vez, existen excepciones a esta regla que indican que éstos deben poseer algunos mecanismos reguladores diferentes (Spiegel-Roy y Goldschmidt, 1996). Los avances en el conocimiento de las rutas o procesos implicados en la maduración de los frutos cítricos puede ayudar a alcanzar este objetivo y proporcionar herramientas agronómicas y biotecnológicas útiles para su manipulación.

En este trabajo nos hemos centrado en el estudio de procesos relacionados con la maduración interna del fruto, especialmente en el metabolismo de la acidez, tanto síntesis como degradación, que se producen durante su desarrollo y maduración. Básicamente, el trabajo que aquí se presenta ofrece el primer estudio global sobre la expresión génica asociada al proceso de maduración interna en cítricos. La herramienta que ha hecho posible este estudio es la micromatriz de 7K generada por el CFGP (Forment *et al.*, 2005).

En cítricos, la realización de estudios en los que se utilice la expresión de múltiples genes pertenecientes a rutas biosintéticas diferentes se está incrementando considerablemente, Moriguchi *et al.* (1998) aislaron 297 ESTs de los que se identificaron un 20 % que codificaban la molécula de metalotionina, Shimada *et al.* (2005) determinaron la diferencia de expresión de 2213 genes presentes en una micromatriz de cDNA, Forment *et al.* (2005) desarrollaron una micromatriz de cDNA que contenía 12.672 ensayos que correspondían a 6875 posibles unigenes, Gandía *et al.* (2007) analizaron la repuesta transcripcional de la lima Mejicana infectada por el virus de la tristeza, Terol *et al.* (2007) analizaron y anotaron 54.000 ESTs procedentes de varias genotecas de cítricos, Martínez-Godoy *et al.* (2008) diseñaron y construyeron una micromatriz de cDNA con 21.081 posibles unigenes de cítricos, Terol *et al.* (2008) caracterizaron tres librerías BAC de clementina analizando 46.000 BAC end sequences (secuencias finales de los BAC), Ríos *et al.* (2008) utilizaron una micromatriz-CGH (array-based Comparative Genomic Hybridization) para identificar los genes incluidos en una delección hemizigótica inducida mediante irradiación con neutrones rápidos, Alos *et al.* (2008) analizaron los cambios de expresión en un mutante de naranjo que no cambiaba de color utilizando una micromatriz de cDNA.

Los estudios de la expresión génica global presentados en este trabajo indicaron que más del 10% de todo el conjunto de cambios de expresión significativos corresponden a genes reguladores incluidos en las categorías de transcripción y transducción de señales y de comunicación celular (**Tabla 3.2**).

Dentro de la categoría correspondiente a factores de transcripción se encontraron 22 familias que mostraban cambios significativos durante el desarrollo y la maduración de los frutos. De estas 22 familias, se inducían significativamente 9, siendo la más abundante la familia NAC, implicada en múltiples procesos, como la transición de la división celular a la expansión celular, en la respuesta a heridas y patógenos y en la respuesta a estrés hídrico y salino (Sablowski y Meyerowitz, 1998; Collinge y Boller, 2001; Fujita *et al.*, 2004; Shimada *et al.*, 2005). De las 8 familias que contenían genes inducidos y reprimidos, destacan los genes MADS-Box relacionados con el desarrollo y la maduración de diversas especies de frutos (revisado en Giovannoni, 2001). La categoría correspondiente a los genes de transducción de señal mostró cambios significativos en 25 proteínas, de las que destacan diez serina/treonina quinasa, lo que sugiere una activación de esta ruta de señalización durante el desarrollo y la maduración de los frutos.

Dentro de la categoría de metabolismo se observó que se inducía la síntesis de celulosa (**Tabla 3.5**), principal componente de la pared celular y la hidrólisis de los conjugados de auxinas, lo cual se ajusta al crecimiento observado en los frutos y a la disponibilidad de hormonas durante la fase II, respectivamente. Por otro lado se encontraba reducida la síntesis de lignina y suberina, lo que es compatible con el reblandecimiento de las paredes de los haces vasculares y de las membranas de los segmentos que se produce durante la maduración. También se reprimen el ciclo de Calvin, la hidrólisis de la sacarosa, la biosíntesis de almidón, la ruta de las pentosas fosfato y la glicólisis. Estos datos son compatibles con el aumento de los niveles de sacarosa y hexosas que se produce durante el desarrollo de la pulpa. Además, se observaron cambios significativos en cinco rutas diferentes del metabolismo secundario. De modo que coincidiendo con el cambio de color que se produce en el endocarpio de los frutos, se detectó una disminución del nivel de transcrito en la biosíntesis de clorofila, flavonoides y antocianos, y la inducción de la biosíntesis de carotenoides. Al mismo tiempo, tanto el descenso en la concentración de ácido ascórbico como el de los ácidos palmítico y palmitoleico (Nagy y Nordby, 1971) que se produce durante la maduración de los frutos cítricos se encontraba acompañado por una reducción de la biosíntesis de la vitamina C y de los ácidos grasos, y la inducción de la oxidación de los ácidos grasos.

En la categoría referente al transporte, de los cuatro genes de acuaporinas que presentaron cambios significativos, se observó inducción en una acuaporina del tipo Gamma-TIP, reduciéndose la expresión de una acuaporina Delta-TIP y de dos acuaporinas de la membrana plasmática. Este cambio en la expresión de las acuaporinas se relaciona con el cambio de la función vacuolar que se produce durante la maduración, donde las vacuolas de almacenamiento de pigmentos se transforman en vacuolas con funciones líticas (**Figura 6.1; Anexo1**).

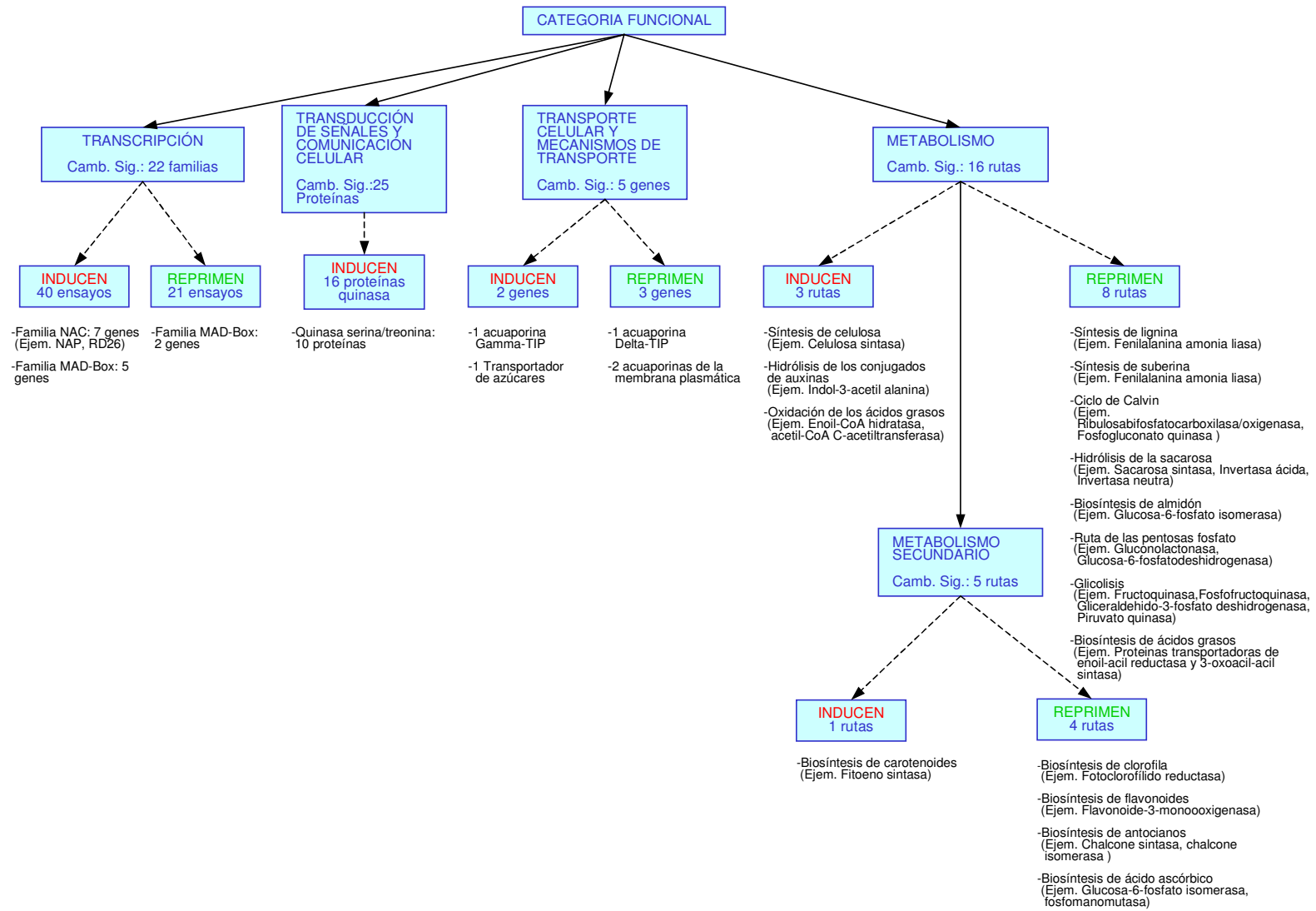


Figura 6.1. Esquema simplificado de los cambios más significativos que se producen en el endocarpio de los frutos de la variedad Clementina de Nules durante el desarrollo y la maduración.

La degradación de los ácidos en el endocarpio de los frutos cítricos durante la maduración es un proceso de interés para la industria cítrica, puesto que una ralentización de la velocidad de degradación ampliaría el periodo comercialización de los frutos.

Los conocimientos de los que se dispone hasta el momento indican que el citrato se acumula en la vacuola, siendo liberado posteriormente al citosol donde se metaboliza a isocitrato por medio de la aconitasa citosólica y a 2-oxoglutarato mediante la isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP^+ , por lo que tradicionalmente la aconitasa se ha considerado como un regulador de la acidez de los frutos cítricos. Estudios realizados con anterioridad parecen indicar que un nivel bajo en la actividad de esta enzima durante las primeras fases del desarrollo de los frutos produce un aumento de la concentración de ácidos, aumentando su nivel de transcrito conforme avanza la maduración, contribuyendo así, a la metabolización del ácido cítrico que es exportado al citosol. De tal forma que la enzima aconitasa estaría implicada tanto en la acumulación como en la degradación del ácido cítrico en los frutos (Sadka *et al.*, 2000 a, b).

Los análisis con micromatrices revelaron la existencia de tres isoenzimas de aconitasa que tras aislarlos se comprobó que correspondían a tres loci diferentes, de las cuales, una se encontraba, posiblemente, ubicada en la mitocondria y las otras dos en el citosol. De las tres aconitasas identificadas, ninguna mostró represión durante el desarrollo y la maduración de los frutos, mientras que la de posible localización citosólica se indujo durante la maduración. Por lo tanto, las enzimas aconitasas intervienen en la degradación del ácido cítrico presente en el citosol durante las últimas fases del desarrollo y la maduración de los frutos.

Los análisis con micromatrices indicaron que al mismo tiempo que aumentaba la expresión de la aconitasa citosólica y la isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP^+ se reducía la expresión de la ATP citrato liasa, lo que sugiere que el citrato presente en el citosol se transforma en 2-oxoglutarato, tal y como observaron Gallardo *et al.* (1995) y Boggio *et al.* (2000) en la maduración del tomate donde el 2-oxoglutarato se transforma en glutamato, lo que supone una vía de metabolización del 2-oxoglutarato.

Los análisis de metabolitos realizados en este estudio no mostraron diferencias en la concentración de glutamato entre los frutos jóvenes y maduros, pero si de GABA. Esto se corresponde con el aumento de expresión observado tanto de las enzimas que sintetizan el glutamato y el GABA (aspartato aminotransferasa y alanina aminotransferasa, que catalizan la reacción de 2-oxoglutamato a glutamato y glutamato descarboxilasa, que transforma el glutamato en GABA) como de las que lo catabolizan (GABA aminotransferasa, que convierte el GABA en succinato semialdehído y succinato simialdehído deshidrogenasa, que

cataliza la reacción de succinato semialdehído a succinato). Por lo que se deduce que la derivación del GABA constituye una vía eficaz de metabolización del ácido cítrico durante la maduración de los frutos. Al mismo tiempo se observó un aumento de la glutamina sintetasa, lo que sugiere que aumentará el nivel de glutamina que, a su vez, puede ser utilizado para producir el anillo de aminometilpirimidina necesario para la biosíntesis de tiamina, lo que concuerda con la inducción del gen *c-thi 1* que codifica una enzima biosintética del tiazol. En la **Figura 6.2** se representan las principales enzimas que se inducen durante la degradación del ácido cítrico en los frutos de Clementina de Nules.

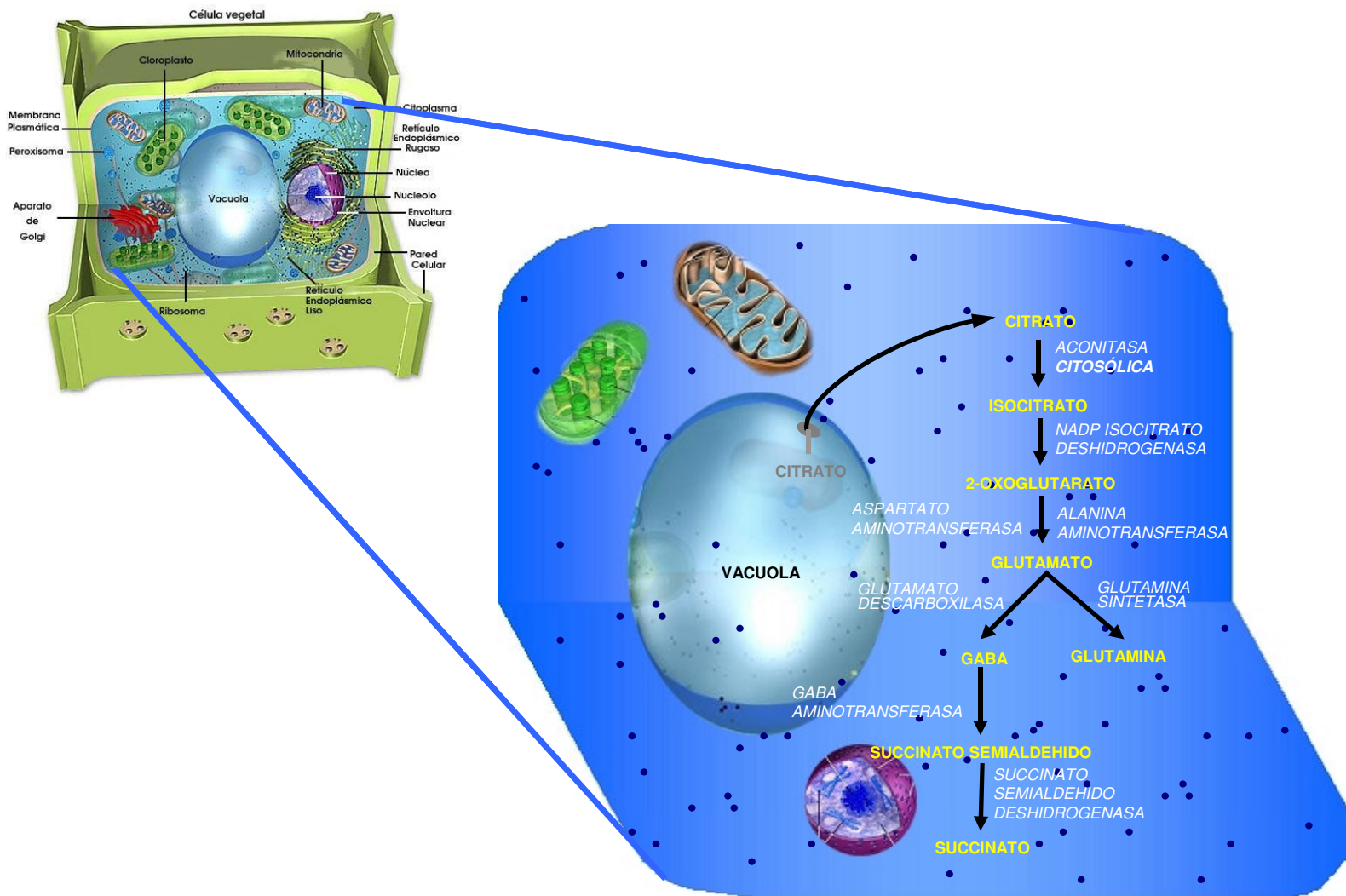


Figura 6.2. Principales enzimas que se inducen durante la degradación de los ácidos orgánicos en la pulpa de frutos de la variedad Clementina de Nules.

Aunque el proceso de acumulación de ácidos en los frutos supone un factor fundamental para la determinación de la madurez, la mayoría de los estudios realizados se basan en análisis de expresión de unos pocos genes con resultados diversos en las diferentes especies estudiadas. Estudios realizados en melocotón indicaron cierta implicación de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa en la acumulación de ácidos (Moing *et al.*, 2000), sin embargo no se advirtió relación alguna entre el contenido en ácidos de los frutos y las enzimas citrato sintasa, malato deshidrogenasa dependiente de NAD⁺ y malato deshidrogenasa dependiente de NADP⁺ (Etienne *et al.*, 2002). En manzanas, se relacionó la actividad de la enzima piruvato quinasa con frutos que presentaban una mayor concentración de malato, mientras que la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa se incrementaba en los frutos con menor acidez, por lo que se relacionó con la gluconeogénesis, no observándose correspondencia alguna entre las enzimas fosfoenolpiruvato carboxilasa, malato deshidrogenasa y la enzima málica dependiente de NADP⁺ con el contenido en ácidos de los frutos (Berüter, 2004). En uva, la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa se relacionó con la acumulación del ácido málico en los frutos aunque dejaba sin explicar las diferencias observadas entre frutos con diferente contenido en ácidos (Diakou *et al.*, 2000; Or *et al.*, 2000). En tomate, la expresión de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa se relacionó con la acumulación de los ácidos cítrico y málico durante las primeras fases de la maduración (Guillet *et al.*, 2002). En arándano, frambuesa, grosella y fresa la expresión de la fosfoenolpiruvato caboxiquinasa se relacionó con una reducción del malato y el citrato en la pulpa de los frutos durante la fase de disminución del contenido de ácidos en los frutos (Famiani *et al.*, 2005). Estudios realizados sobre los mecanismos reguladores de la acidez en los cítricos apuntaban a una represión de la enzima aconitasa como responsable de la acumulación de ácidos (Sadka *et al.*, 2000a,b), mientras que no se encontró relación alguna entre la enzima citrato sintasa y la acumulación de ácidos (Canel *et al.*, 1996).

Por otro lado, los análisis del nivel de mRNA mediante RT-PCR en tiempo real obtenidos en el presente estudio en la variedad Clementina de Nules no mostraron cambios significativos durante el desarrollo y la maduración de los frutos en las enzimas fosfoenolpiruvato carboxilasa y citrato sintasa. Los análisis con micomatrices de la evolución en la expresión de los genes relacionados con el metabolismo de los ácidos en los frutos de Clementina de Nules mostraron una represión en la expresión de las rutas de la glicolisis, la hidrólisis de la sacarosa y el ciclo de Calvin (**Tabla 3.5**) al final de la fase II y durante la fase III, lo que indica que dichas rutas están más expresadas al principio del desarrollo de los frutos, cuando se produce la acumulación de ácidos. Además, coincidiendo con el momento de acumulación

del ácido cítrico en los frutos, se observó una reducción del nivel de transcrito de la ATP citrato liasa y de la enzima málica dependiente de NAD^+ .

En el caso de la variedad Fortune los valores de mRNA de la ATP citrato liasa fueron menores que los observados en la Clementina de Nules lo que concuerda con la mayor concentración de ácido cítrico de esta variedad. También presentaron importantes diferencias de expresión dos variedades de limón que se caracterizaban por su diferente contenido en ácidos, siendo los niveles de transcrito mucho más bajos en la variedad de acidez alta.

Los estudios comparativos realizados mediante micromatrices de muestras de frutos durante la fase de acumulación de ácidos de las variedades Clementina de Nules y Fortune, mostraron en esta última variedad una mayor expresión en un transportador de sacarosa a la mitocondria y en las enzimas pertenecientes a las rutas del ciclo de Calvin, la hidrólisis de la sacarosa y la glicolisis, lo que supone que en Fortune durante la acumulación de ácidos se produce una mayor captación y un mayor aporte de carbono al ciclo de los ácidos tricarbónicos, lo que coincide con la observación realizada por Sites y Reitz (1950) en la que los frutos más soledados, y por tanto con mayor capacidad fotosintética, presentaban un mayor contenido en ácidos. Esto unido a la menor utilización del citrato por parte de la ATP citrato liasa genera un exceso de metabolitos intermedios que podrían desplazar el equilibrio de la enzima málica dependiente de NADP^+ hacia la carboxilación reductiva del piruvato a malato, tal y como sugieren Wheeler *et al.* (2008), quedando más cantidad de malato en el citosol que puede ser almacenado en la vacuola o transportado a la mitocondria donde serviría como fuente de regeneración de carbono sin el concurso de todo el ciclo de Krebs, al ser transformado en oxalacetato por acción de la malato deshidrogenasa.

Los tratamientos realizados con ácido arsánico durante el proceso de acumulación de ácidos en las dos variedades de mandarina estudiadas, produjeron una reducción de su concentración después de realizado el tratamiento, que se mantuvo durante el resto del desarrollo y la maduración de los frutos pero sin alterar su patrón normal de acumulación y degradación de ácidos. Por lo que se deduce que una ralentización del metabolismo de síntesis de ácido cítrico reduce su concentración final. Los análisis tanto con micromatrices como mediante RT-PCR en tiempo real de los frutos tratados con ácido arsánico mostraron al mismo tiempo una menor expresión del nivel de mRNA tanto de las enzimas de rutas relacionadas con la síntesis de ácidos (ciclo de Calvin, la glicólisis y rutas anapleróticas) como de las encargadas de la metabolización de dichos ácidos (aconitasa y ATP citrato liasa), lo que genera una menor síntesis y acumulación de ácidos orgánicos.

En la **Figura 6.3** se resumen los principales cambios observados durante la acumulación de ácidos, en frutos de Clementina de Nules sin tratar, en frutos de Clementina de Nules tratados con ácido arsánico frente a no tratados y en frutos no tratados de Fortune frente a Clementina de Nules.

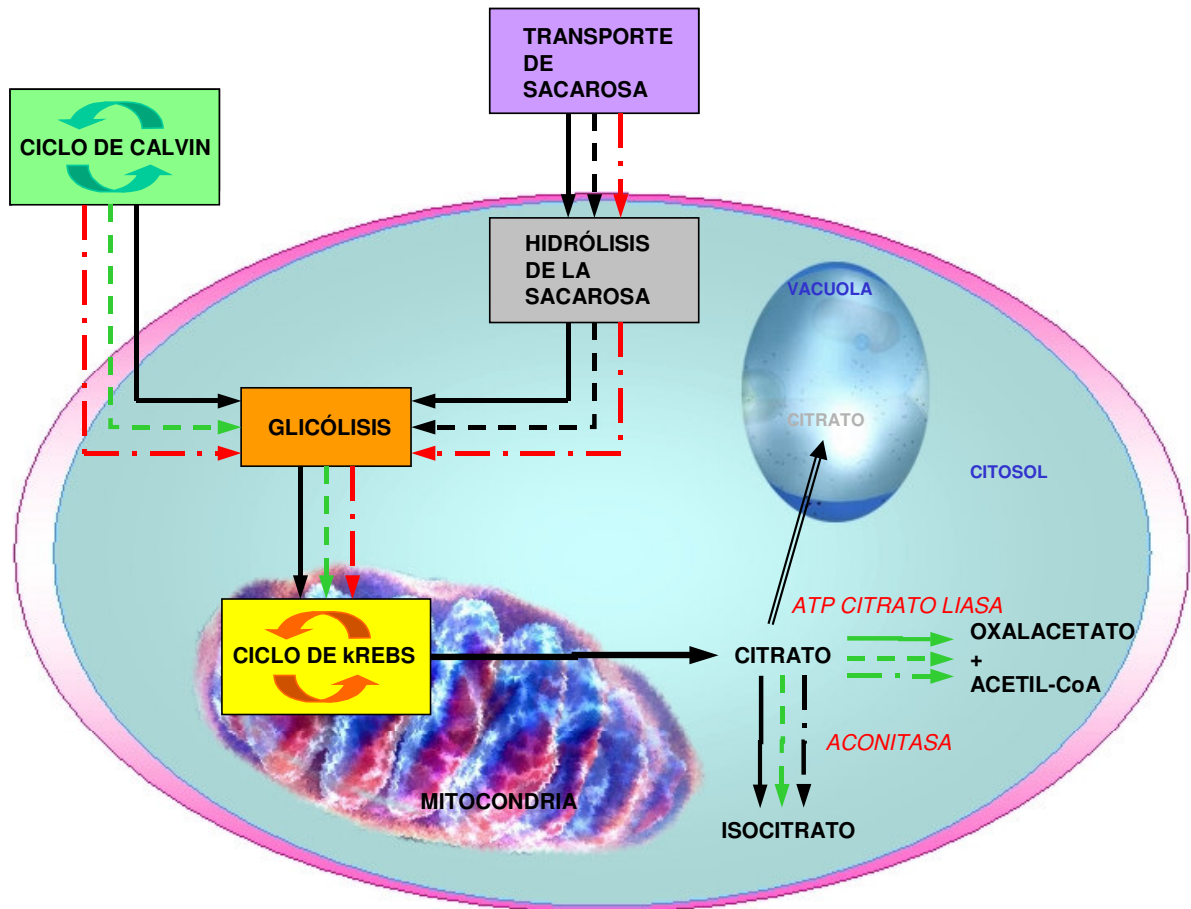


Figura 6.3. Esquema simplificado de los cambios más significativos que se producen en el endocarpio de los frutos estudiados durante la acumulación de ácidos. Las flechas en línea continua corresponden a frutos de la variedad Clementina de Nules sin tratar, la línea discontinua a frutos de Clementina de Nules tratados con arsánico y la línea discontinua con puntos a frutos de la variedad Fortune. El color negro indica que no se producen variaciones significativas en el nivel de expresión de los genes de los frutos de Clementina de Nules sin tratar durante el periodo de acumulación de ácidos o entre los de los frutos de Clementina de Nules tratados y Fortune respecto a los primeros. El color verde indica represión de los genes de Clementina de Nules sin tratar durante el periodo de acumulación de ácidos o una menor expresión de los genes, respecto a los primeros, de los frutos de Clementina de Nules tratados y Fortune. El color rojo indica inducción en los genes de Clementina de Nules sin tratar durante el periodo de acumulación de ácidos o una mayor expresión de los genes, respecto a los primeros, en los frutos de Clementina de Nules tratados y Fortune.

VII. Conclusiones

1. El presente trabajo constituye la primera descripción a nivel global de los cambios de expresión génica asociados a la maduración del endocarpio del fruto de los cítricos. Los principales procesos fisiológicos reprimidos son:

- la síntesis de lignina y suberina,
- el ciclo de Calvin,
- la hidrólisis de la sacarosa,
- la biosíntesis de almidón,
- la ruta de las pentosas fosfato,
- la glucólisis,
- la biosíntesis de clorofilas,
- la biosíntesis de flavonoides,
- la biosíntesis de antocianos,
- la biosíntesis de ácido ascórbico y
- la biosíntesis de ácidos grasos.

Paralelamente se inducen:

- la síntesis de celulosa,
- la hidrólisis de los conjugados de auxinas,
- la biosíntesis de los carotenoides y
- la oxidación de los ácidos grasos.

2. En los cítricos existen al menos tres genes que codifican tres enzimas de aconitasa, de los cuales se localiza una, posiblemente, en la mitocondria y las otras dos en el citosol. La aconitasa ubicada en la mitocondria presenta un nivel de expresión constante durante el desarrollo y la maduración de los frutos, mientras que al menos una de las aconitasas localizadas en el citosol se induce durante la maduración.

3. De acuerdo con los datos de las micromatrices y el análisis paralelo de metabolitos el ácido cítrico se metaboliza vía 2-oxoglutarato a glutamina y a succinato, en la ruta de derivación del GABA. Esta ruta parece ser una vía prioritaria de catabolismo del ácido cítrico.

4. La acumulación de ácido cítrico en los frutos se encuentra directamente relacionada con una disminución del nivel de transcrito de la ATP citrato liasa, de manera que disminuye la degradación de citrato en el citosol, quedando más cantidad de citrato disponible para ser almacenado en la vacuola.
5. El análisis comparativo de la expresión génica entre las variedades Clementina de Nules (menos ácida) y Fortune (más ácida) indicó diferencias significativas de expresión en genes asociados con los siguientes procesos:

Mayor expresión en Fortune

- el ciclo de Calvin,
- la hidrólisis de la sacarosa y
- la glicolisis.

Menor expresión en Fortune

- el ciclo de las pentosas fosfato y
- la fosforilación oxidativa.

6. El tratamiento con ácido arsánico reprime la glicolisis y el ciclo de Calvin. Esto sugiere que estas dos rutas son necesarias para la canalización del carbono hacia la síntesis de ácidos.

VIII. Bibliografía

- Agustí, M. 2000 (a). Citricultura. Ediciones Mundiprensa.
- Agustí, M. 2000 (b). Crecimiento y maduración del fruto, en: Azcon-Bieto, J. y Talón, M (eds). Fundamentos de fisiología vegetal. 2ª Edición. McGraw-Hill. Interamericana de España. Barcelona, España. pp. 419-433.
- Agustí, M., Zaragoza, S., Iglesias, D.J., Almela, V., Primo-Millo, E., Talón, M. 2002. The synthetic auxin 3,5,6-TPA stimulates carbohydrate accumulation and growth in citrus fruit. *Plant Growth Regulation* 36: 141-147.
- Aharoni, A., O'Connell, A.P. 2002. Gene expression analysis of strawberry achene and receptacle maturation using DNA microarrays. *J. Exp. Bot.* 53: 2073-87.
- Aida, M., Ishida, T., Fukaki, H., Fujisawa, H. y Tasaka, M. 1997. Genes involved in organ separation in *Arabidopsis*: an analysis of the cup-shaped cotyledon mutant. *Plant Cell* 9: 841-857.
- Adams, M.D., Ringli, C y Ruperti, B. 1991. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science*. 252: 1651-56.
- Almeida, D.P.F. y Huber, D.J. 1999. Apoplastic pH and inorganic ion levels in tomato fruit: A potential means for regulation of cell wall metabolism during ripening. *Physiologia Plantarum* 105: 506-512.
- Alonso, J.M., Chamaro, J., Granell, A. 1995. Evidence for the involvement of ethylene in the expresión of specific RNAs during maturation of the orange, a non-climateric fruti. *Plant Mol. Biol.* 29:385-90.
- Alós, E., Roca, M., Iglesias, D.J., Mínguez-Mosquera, M.I., Damasceno, C.M., Thannhauser, T.W., Rose, J.K., 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.* 147(3):1300-15.
- Anuario 2003. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. <http://www.mapa.es>.
- Aristoy, M.C., Orlando, L., Navarro, J.L., Sendra, J.M., Izquierdo, L. 1989. Characterization of spanish orange juice for variables used in purity control. *J. Agric. Food Chem.* 37: 596-600.
- Bain, J.M. 1958. Morphological, anatomical, and physiological changes in the developing fruit of the Valencia orange, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. *Australian Jour. Bot.* 6: 1-24.
- Balance de la cosecha de cítricos. Campaña 2005/2006. Comunidad Valenciana. Conselleria d'agricultura pesca i alimentació. <http://www.gva.es>.

- Baldwin, E.A. 1993. Citrus fruit. In: Seymour, G.B., Taylor, J.E., Tucker, G.A. (Eds.), Biochemistry of fruit ripening. Chapman & Hall, London, pp. 107-149.
- Bean, R.C. y Todd, G.W. 1960. Photosynthesis and respiration in developing fruits. I. C¹⁴O₂ uptake by young oranges in light and dark. *Plant Physiol.* 35: 425-29.
- Berüter, J. 2004. Carbohydrate metabolism in two apple genotypes that differ in malate accumulation. *J. Plant Physiol.* 161: 1011-1029.
- Bittner, M., Butow, R., DeRisi J., Diehn, M., Eberwine, J., Epstein, C.B., Glynne, R., Grimmond, S., Ideker, T., Kacharina, J.E., Katsabanis, S., Khan, J., Lee, J., Liu, C.L., Marciano, P., Marincola, F.M., McIntosh, T., Monte, D., Pollack, J.R., Rhodius, V., Somerville, S., Tom, E., Wang, E., Wei, J.S., Willhite, D. e Ybarra, S. 2003. Expression analysis of RNA. En: DNA microarrays: A molecular cloning manual. Ed. D. Bowtell, J. Sambrook. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. NY, USA, pp 101-288.
- Blanke, M.M., Hucklesbey, D.P. y Norton, B.A. 1988. Phosphoenolpyruvate carboxykinase in aubergine, kiwi and apple fruit. *J. Plant Physiol.* 129: 319-325.
- Boggio, S.B., Palatnik, J.F., Heldt, H.W. y Valle, E.M. 2000. Changes in amino acid composition and nitrogen metabolizing enzymes in ripening fruits of *Lycopersicon esculentum*. *Mill. Plant Sci.* 119: 384-391.
- Bono, R., Soler, J. y Fernández, L. 1985. Variedades de agrios cultivadas en España.- Generalidad Valenciana.
- Bono, R. 1994. Características de nuevas variedades de agrios. *Phytoma España* 58.
- Bortolotti, S., Boggio, S.B., Delgado, L., Orellano, E.G. y Valle, E.M. 2003. Different induction patterns of glutamate metabolizing enzymes in ripening fruits of the tomato mutant green flesh. *Physiol. Plant.* 119: 384-391.
- Botella-Pavía, P., Besumbes, O., Phillips, M.A., Carretero-Paulet, L., Boronat, A. y Rodríguez-Concepción, M. 2004. Regulation of carotenoid biosynthesis in plants: evidence for a key role of hydroxymethylbutenyl diphosphate reductase in controlling the supply of plastidial isoprenoid precursors. *The Plant Journal.* 40: 188-99.
- Bouché, N., Fait, A., Bouchez, D., Moller, S.G. y Fromm, H. 2003. Mitochondrial siccinic-semialdehyde dehydrogenase of the γ -aminobutyrate shunt is required to restrict levels of reactive oxygen intermediates in plants. *PNAS.* 100 (11): 6843-48.
- Bown, A.W. y Shelp, B.J. 1997. The metabolism and functions of γ -aminobutyric acid. *Plant Physiol.* 119: 384-91.

- Brouquise, R., Nishimura, M., Gaillard, J. y Douce, R. 1987. Characterization of a cytosolic aconitase in higher plants cells. *Plant Physiol.* 84: 1402-7.
- Busch, K.B. y Fromm, H. 1999. Plant succinic semialdehyde dehydrogenase. Cloning, Purification, localization in mitochondria, and regulation by adenine nucleotides. *Plant Physiol.* 121: 589-97.
- Bustin, S.A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology.*
- Bustin, S.A. 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.* 29: 23-39.
- Canel, C., Bailey-Serres, J.N. y Roose, M.L. 1995. In vitro [¹⁴C] citrate uptake by tonoplast vesicles of acidless *Citrus* juice cells. *J. Amer. Hort. Sci.* 120(3): 510-14.
- Canel, C., Bailey-Serres, J.N. y Roose, M.L. 1996. Molecular characterization of the mitochondrial citrate synthase gene of acidless pummelo (*Citrus maxima*). *Plant Mol. Biol.* 31 (1): 143-147.
- Carrari, F., Nunes-Nesi, A., Gibon, Y., Lytovchenko, A., Loureiro, M.E. y Fernie, A.R. 2003. Reduced expression of aconitase results in an enhanced rate of photosynthesis and shifts in carbon partitioning in illuminated leaves of wild species tomato. *Plant Physiol.* 133: 1-14.
- Carroll, A.D., Fox, G.G., Laurie, S., Phillips, R., Ratcliff, R.G. y Stewart, G.R. 1994. Ammonium assimilation and the role of γ -aminobutyric acid in pH homeostasis in carrot cell suspensions. *Plant Physiol.* 106: 513-520.
- Chamarro, J., Alonso, J.M. y García-Martínez, J.L. 1991. Enzymes in citrus fruits. In: Fox, P.F. (ed) *Food Enzymology*, Vol. 2. Elsevier Applied Science, London, pp. 599-624.
- Chen, R.D. 1998. Plant NADP-dependent isocitrate dehydrogenases are predominantly localized in the cytosol. *Planta.* 207: 280-85.
- Chen, R.D. y Gadal, P. 1990. Structure, functions and regulation of NAD and NADP dependent isocitrate dehydrogenases in higher plants and in other organisms. *Plant Physiol. Biochem.* 28: 411-27.
- Chollet, R., Vidal, J., O'Leary, M.H. 1996. Phosphoenolpyruvate carboxylase: a ubiquitous, highly regulated enzyme in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47:273-97.
- Clements, R.L. 1964. Organic acids in citrus fruits. I. Varietal differences. *Jour. Food Sci.* 29: 276-280.

- Coker, J.S., Jones, D. y Davies, E. 2003. Identification, conservation, and relative expression of V-ATPase cDNAs in tomato plants. *Plant Mol. Biol. Rep.* 21: 145-58.
- Collinge, M. y Boller, T. 2001. Differential induction of two potato genes, *Stprx2* and *StNAC*, in response to infection by *Phytophthora infestans* and to wounding. *Plant Mol Biol* 46: 521-529.
- Cook, S.A., Takashi, M., Ling, L. y Rosenzweig, A. 2002. Transcriptional effects of chronic akt activation in the heart. *The journal biological chemistry*. Vol. 277, No. 25, pp. 22528-22533.
- Copeland, L. Turner, J.F. 1987. The regulation of glycolysis and the pentose phosphate pathway. In: *Biochemistry of Plants*. Ed. PK Stuumpf. San Diego.
- Cox, G.F. y Davies, D.D. 1970. The effect of pH on the characteristics of the binding of nicotinamide-adenine dinucleotide by nicotinamide-adenine dinucleotide specific isocitrate dehydrogenase from pea mitochondria. *Biochem. Journal*. 116: 819-24.
- Crafts, A.S. 1977: «Biologic effects of arsenic on plants and animals». *Committee on Medical and Biologic Effects of Enviromental Pollutants* (eds). Arsenic. pp. 117-136.
- Crawford, L.A., Bown, A.W., Breitkreuz, K.E. y Guinel, F.C. 1994. The synthesis of gamma-aminobutyric acid in response to treatments reducing cytosolic pH. *Plant Physiol.* 104: 865-871.
- da Silva, F.G., Iandolino, A., Al-Kayal, F., Bohlmann, M.C., Cushman, M.A., Lim, H., Ergul, A., Figueroa, R., Kabuloglu, E.K., Osborne, C., Rowe, J., Tattersall, E., Leslie, A., Xu, J., Baek, J., Cramer, G.R., Cushman, J.C. y Cook, D.R. 2005. Characterizing the grape transcriptome. Analysis of expressed sequence tags from multiple *Vitis* species and development of a compendium of gene expression during berry development. *Plant Physiol.* 139 (2): 574-97.
- Daniels, M.J., Chaumont, F., Mirkov, T.E. y Chrispeels, M.J. 1996. Characterization of a new vacuolar membrane aquaporin sensitive to mercury at a unique site. *Plant Cell* 8: 587-599.
- Davies, B.H. 1976. Carotenoids. In: *Chemistry and biochemistry of plant pigments*. Goodwin, T.W. Eds.; Academic Press: New York. pp. 38-165.
- Davies, F.S. y Albrigo, L.G. 1994. *Citrus*. Cab Internacional. pp 254.
- Davies, J.N. y Hobson, G.E. 1981. The constituents of tomato fruit – the influence of the enviroment, nutrition, and genotype. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutri.* 15: 205-80.

- Davuluri, R.V., Sun, H., Palaniswamy, S.K., Matthews, N., Molina, C., Kurtz, M. y Grotewold, E. 2003. AGRIS: *Arabidopsis* Gene Regulatory Information Server, an information resource of Arabidopsis cis-regulatory elements and transcription factors. BMC Bioinformatics. 4: 25.
- Day, D.A., Neuberger, M. y Douce, R. 1984. Activation of NAD-linked malic enzyme in intact mitochondria by exogenous CoA. Arch Biochem Biophys. 231:233-34.
- De Bellis, L., Tsugeki, R., Alpi, A. Y Nishimura, M. 1993. Purification and characterization of aconitase isoforms in pumpkin cotyledons. Physiol. Plant. 88: 485-492.
- De Bellis, L., Hayashi, M., Biagi, P. P., Hara-Nishimura, I., Alpi, A. y Nishimura, M. 1994. Immunological analysis of aconitase in pumpkin cotyledons: The absence of aconitase in glyoxisomes. Physiol. Plant. 90: 757-762.
- De Bellis, L., Hayashi, M., Nishimura, M. y Alpi, A. 1995. Subcelular and developmental changes in distribution of aconitase isoforms in pumpkin cotyledons. Planta 196: 464-468.
- Debnam, P.M. y Emes, M.J.1999. Subcellular distribution of the oxidative pentose phosphate pathway in root and leaf tissues. J. Exp. Bot. 50 (340): 1653-61.
- de la Fuente, J.M., Ramírez-Rodriguez, V., Cabrera-Ponce, J.L. y Herrera-Estrella, L. 1997. Aluminum tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthesis. Science. 276: 1566-68.
- Delhaize, E., Hebb, D.M. y Ryan, P.R. 2001. Expression of a pseudomonas aeruginosa citrate synthase gene in tobacco is not associated with either enhanced citrate accumulation or efflux. Plant Physiol. 125: 2059-67.
- Delhaize, E., Ryan, P.R., Hocking, P.J. y Richardson, A.E. 2003. Effects of altered citrate synthase and isocitrate dehydrogenase expression on internal citrate concentrations and citrate efflux from tobacco. Plant and Soli. 248(1-2): 137-44.
- Dennis, D.T., Huang, Y., Negm, F.B. 1997. Glycolysis, the pentose phosphate pathway and anaerobic respiration. In: Dennis, D.T., Turpin, D.H., Lefebvre, D.D., Layzell, D.B. Plant Metabolism. Ed. Harlow. Longman.
- Dennis, D.T. y Blakeley, S.D. 2000. Carbohydrate metabolism, in: Buchanan, B.B., Gruissem, W. and Jones, R. Biochemistry and molecular biology of plants. Ed. American Society of Plant Physiologists. Rockville, Maryland. pp. 630-75.

- Diakou, P., Svanella, L., Raymond, P., Gaudillère, J.P. y Moing, A. 2000. Phosphoenolpyruvate carboxylase during grape berry development: protein level, enzyme activity and regulation. *Aust. J. Plant Physiol.* 27: 221-29.
- Douce, R. 1985. *Mitochondria in higher plants*. Academic Press Inc. New York.
- Duggleby, R.G. y Dennis, D.T. 1970. The effect of reduced nicotinamide adenine dinucleotide and mixtures of citrate and isocitrate. *Jour. Biol. Chem.* 245: 3751-54.
- Dupont, F. y Morrissey, P.J. 1992. Subunit composition and Ca²⁺-ATPase activity of the vacuolar ATPase from barley roots. *Arch. Biochem. Biophys.* 294: 341-46.
- Eanes, R.Z. y Kun, E. 1971. Separation and characterization of aconitate hydratase isoenzymes from pig tissues. *Biochim Biophys Acta.* 227(1):204-10.
- Echeverria, E., Brune, A. y González, P. 2000. Citrate uptake into tonoplast vesicles from acid lime juice cells. *Proc. Intl. Soc. Citricult. IX Congr.* 649-53.
- Echevarria, E. y Valich, J. 1988. Carbohydrate and enzyme distribution in protoplast from Valencia orange juice sacs. *Phytochemistry.* 27: 73-76.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S. y von Heijne, G. 2000. Predicting subcellular localization of protein based on their N-terminal amino acid sequence. *J. Mol. Biol.* 300: 1005-1016.
- Emmerlich, V., Linka, N., Reinhold, T., Hurth, M.A., Traub, M., Martinoia, E. y Neuhaus, E. 2003. The plant homolog to the human sodium/dicarboxylic cotransporter is the vacuolar malate carrier. *Proceedings of National Academy of Science.* 100(9):11122-6.
- Erickson, L.C. 1968. The general physiology of citrus, in: Reuther, W., Batchelor, L.D., Webber, H.J. (Eds.), *The citrus industry*, vol 2, University of California, Oakland, CA. pp. 86-126.
- Etienne, C., Moing, A., Dirlewanger, E., Raymond, P., Monet, R. y Rothan, C. 2002. Isolation and characterization of six peach cDNAs encoding key proteins in organic acid metabolism and solute accumulation: involvement in regulating peach fruit acidity. *Physiol. Plantarum.* 114: 259-70.
- Fait, A., Fromm, H., Walter, D., Galili, G. y Fernie, R. 2007. Highway or byway: the metabolic role of the GABA shunt in plants. *Trends in Plant Science.* 13 (1): 14-19.
- Famiani, F., Cultrera, N.G.M., Battistelli, A., Casulli, V., Proietti, P., Standardi, A., Chen, Z., Leegood, R.C y Walker, R.P. 2005. Phosphoenolpyruvate carboxykinase and its potential role in the catabolism of organic acids in the flesh of soft fruit during ripening. *Journal of Experimental Botany.* 56 (421): 2959-69.

- FAO. 2005. <http://www.fao.org>.
- Fatland, B., Aderson, M., Nikolau, B.J. y Wurtele, E.S. 2000. Molecular biology of cytosolic acetyl-CoA generation. *Biochemical Society Transactions*. 28 (6): 593-95.
- Fatland, B., Ke, J., Aderson, M., Mentzen, W., Cui, L.W., Allred, C., Johnstone, J., Nikolau, B.J. y Wurtele, E.S. 2002. Molecular characterization of a heteromeric ATP-citrate lyase that generates cytosolic acetyl-coenzyme A in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 130: 740-56.
- Ferrándiz, C. 2002. Regulation of fruit dehiscence in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 53: 2031-2038.
- Forment, J., Gadea, J, Huerta, L., Abizanda, L., Agustí, J., Alamar, S., Alós, E. Andrés, F., Arribas, R., Beltrán, J.P., Berbell, A., Blázquez, M.A., Brumós, J., Cañas, L.A., Cercós, M., Colmenero-Flores, J.M., Conesa, A., Estables, B., Gandía, M., García-Martínez, J.L., Gimeno, J., Gisbert, A., Gómez, G., González-Candelas, L., Granell, A., Guerri, J., Lafuente, M.T., Madueño, F., Marcos, J.F., Marqués, M.C., Martínez, F., Martínez-Godoy, M.A., Miralles, S., Moreno, P., Navarro, L., Pallás, V., Pérez-Amador, M.A., Pérez-Valle, J., Pons, C., Rodrigo, I., Rodríguez, P.L., Royo, C., Serrano, R., Soler, G., Tadeo, F., Talón, M., Terol, J., Trenor, M., Vaello, L., Vicente, O., Vidal, C., Zacarías, L. y Conejero, V. 2005. Development of a citrus genome-wide EST collection and cDNA microarray as resources for genomic studies. *Plant Mol Biol* 57: 375-91.
- Fritsch, H. y Beevers, H. 1979. ATP-citrate lyase from germinating castor bean endosperm: localization and some properties. *Plant Physiol*. 63: 687-91.
- Fujii, H., Shimada, T., Sugiyama, A., Nishikawa, F., Endo, T., Nakano, M., Ikoma, T. y Omura, M. 2007. Profiling ethylene-responsive genes in mature mandarin fruit using a citrus 22 K oligoarray. *Plant Science* 173: 340-48.
- Fujita, M., Fujita, Y., Maruyama, K., Seki, M., Hiratsu, K., Ohme-Takagi, M., Tran, LSP., Yamaguchi-Shinozaki, K. y Shinozaki, K. 2004. A dehydration-induced NAC protein, RD26, is involved in a novel ABA-dependent stress-signaling pathway. *Plant J* 39: 863-876.
- Futai M y Omote H. 1996. Conformational transmission in ATP synthase during catalysis: search for large structural changes. *J Bioenerg Biomembr*. 28(5):409-14.
- Gallardo, F., Gálvez, S., Gadal, P. y Canovas, F.M. 1995. Changes in NADP-linked isocitrate dehydrogenase during fruit ripening. Characterization of the predominant cytosolic enzyme from green and ripe pericarp. *Planta*. 196: 148-54.

- Gandía, M., Conesa, A., Ancillo, G., Gadea, J., Forment, J., Pallás, V., Flores, R., Duran-Vila, N., Moreno, P., Guerri, J. 2008. Transcriptional response of *Citrus aurantifolia* to infection by *Citrus tristeza virus*. *Virology* 367(2): 298-306.
- Gálvez, S., Bismuth, E., Sarda, C. y Gadal, P. 1994. Purification and characterization of chloroplast NADP-isocitrate dehydrogenase from mixotrophic tobacco cells. Comparison with the cytosolic isoenzyme. *Plant Physiol.* 105: 593-600.
- Génard, M., Souty, M., Holmes, S., Reich, M. y Breuils, L. 1994. Correlations among quality parameters of peach fruit. *Jour. Sci. Food Agri.* 66: 241-45.
- Génard, M., Reich, M., Lobit, P. y Basset, J. 1999. Correlations between sugar and acid content and peach growth. *Jour. Hort. Sci. Biotech.* 74: 772-76.
- Gentleman, R.C., Carey, V.J., Bates, D.M., Bolstad, B., Dettling, M., Dudoit, S., Ellis, B., Gautier, L., Ge, Y., Gentry, J., Hornik, K., Hothorn, T., Huber, W., Iacus, S., Irizarry, R., Leisch, F., Li, C., Maechler, M., Rossini, A.J., Sawitzki, G., Smith, C., Smyth, G., Tierney, L., Yang, J.Y.H. y Zhang, J. 2004. Bioconductor: Open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biology* 5: R80.
- Gepstein, S., Sabehi, G., Carp, M.J., Hajouj, T., Nesher, M.F.O., Yariv, I., Dor, C. y Bassani, M. 2003. Large-scale identification of leaf senescence-associated genes. *Plant J.* 36: 629-642.
- Giovannoni, J. 2001. Molecular biology of fruit maturation and ripening. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52:725-749.
- Giovannoni, J. 2004. Genetic regulation of fruit development and ripening. *Plant Cell.* 16: 170-180.
- Gómez-Cadenas, A., Mehouchi, J., Tadeo, F.R., Primo-Millo, E. y Talón, M. 2000. Hormonal regulation of fruitlet abscisión induced by carbohydrate shortage in citrus. *Planta* 210: 636-643.
- Gottlob-McHugh, S.G., Sangwan, R.S., Blakeley, S.D., Vanlerberghe, G.C., Ko, K., Turpin, D.H., Plaxton, W.C., Miki, B.L. y Dennis, D.T. 1992. Normal Growth of Transgenic Tobacco Plants in the Absence of Cytosolic Pyruvate Kinase. *Plant Physiol.* 100 (2): 820-825.
- Gout, E., Bligny, R., Pascal, N. y Douce, R. 1993. ¹³C nuclear magnetic resonance studies of malate and citrate synthesis and compartmentation in higher plants cells. *J. Biol. Chem.* 268 (6): 3986-92.

- Grissom, C.B., Canellas, P.F. y Wedding, R.T. 1983. Allosteric regulation of the NAD malic enzyme from cauliflower: activation by fumarate and coenzyme A. *Arch Biochem Biophys.* 220:133-44.
- Gross, K.C. y Pharr, D.M. 1982. Apotential pathway for galactose metabolism in *Cucumis sativus* L., a stachyose transporting species. *Plant Physiol.* 69: 117-121.
- Guillet, C., Just, D., Bénard, N., Destrac-Ivine, A., Baldet, P., Hernould, M., Causse, M., Raymond, P. y Rothan, C. 2002. A fruit-specific phosphoenolpyruvate carboxylase is related to rapid growth of tomato fruit. *Planta.* 214: 717-26.
- Hashimoto, J., Beadles-Bohling, A.S. y Wren, C.M. 2004. Comparison of Ribogreen and 18S rRNA quantitation for normalizing real-time RT-PCR expression analysis. *Biotechniques.* 36: 54-60.
- Herrero, J., Valencia, A. y Dopazo, J. 2001. A hierarchical unsupervised growing neural network for clustering gene expression patterns. *Bioinformatics.* 17: 16-136.
- Hirai, M. y Ueno, I. 1977. Development of citrus fruits: fruit development and enzymatic changes in juice vesicles tissue. *Plant and Cell Physiol.* 18: 791-99.
- Hawker, J.S. 1969. Changes in the activities of malic enzyme, malate dehydrogenase, phosphopyruvate carboxylase and pyruvate decarboxylase during the development of a non-climateric fruit (The grape). *Phytochem.* 8: 19-23.
- Hayashi, M., De Bellis, L., Alpi, A. y Nishimura, M. 1995. Cytosolic aconitase participate in the glyoxilate cycle in etiolated pumpkin cotyledons. *Plant Cell Physiology* 103: 1147-1154.
- Hearn, C.J. 1986. Development of seedless orange and grapefruit cultivars through seed irradiation. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 111: 304-306.
- Heldt, H.W. 2004. *Plant Biochemistry.* Elsevier, Academic Press. Göttingen, Germany. pp. 630.
- Hening, L., Gruissem, W., Grossniklaus, U. y Köhler, C. 2004. Transcriptional programs of early reproductive stages in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 135: 1765-1775.
- Hensz, R.A. 1971. Star Ruby a new deep red fleshed grapefruit variety with distinct tree characteristics. *J. Rio Grande Valley Hort. Sci.* 25: 54-58.
- Herrero, J., Valencia, A. y Dopazo, J. 2001. A hierarchical unsupervised growing neural network for clustering gene expression patterns. *Bioinformatics* 17: 126-136.
- Hirai, M. y Ueno, I. 1977. Development of citrus fruits: fruit development and enzymatic changes in juice vesicles tissue. *Plant and Cell Physiol.* 18: 791-99.

- Hodges, M. 2002. Enzyme redundancy and the importance of 2-oxoglutarate in plant ammonium assimilation. *J. Exp. Bot.* 53:905-916.
- Hu, H., Su, L. y Snow, E. T. 1998. Arsenic toxicity is enzyme specific and its effects on ligation are not caused by the direct inhibition of DNA repair. *Mutation Res.* 408: 203-218.
- Huber, W., Heydebreck, A.V., Sültmann, H., Poustka, A. y Vingron, M. 2002. Variance stabilization applied to microarray data calibration and to the quantification of differential expression. *Bioinformatics* 18: S96-S104.
- Ideker, T., Ybarra, S. y Grimmond, S. 2003. Hybridization and posthybridization washing. In: Bowtell, D., Sambrook, J. (Eds), *DNA microarrays: A molecular cloning manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. Pp. 228-239.
- Jacob-Wilk, D., Goldschmidt, E.E., Riov, J., Sadka, A. y Holland, D. 1997. Induction of a citrus gene highly homologous to plant and yeast *thi* genes involved in thiamine biosynthesis during natural and ethylene-induced fruit maturation. *Plant Mol. Biol.* 35: 661-666
- Janc, J.W., Urbauer, J.L., O’Leary, M.H. y Cleland, W.W. 1992. Mechanistic studies of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Zea mays* with (Z)-and (E)-3-fluorophosphoenolpyruvate as substrates. *Biochem.* 31(28): 6432-40.
- Jauh, G.Y., Phillips, T.E. y Rogers, J.C. 1999. Tonoplast intrinsic protein isoforms as markers for vacuolar functions. *Plant Cell* 11: 1867-1882.
- Jenner, H.L., Winning, B.M., Millar, A.H., Tomlinson, K.L., Leaver, C.J. y Hill, S.A. 2001. NAD malic enzyme and the control of carbohydrate metabolism in potato tubers. *Plant Physiol.* 126(3): 1139-49.
- Johanson, U., Karlsson, M., Johansson, I., Gustavsson, S., Sjövall, S., Fraysse, L., Weig, A.R. y Kjellbom, P. 2001. The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in *Arabidopsis* provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants. *Plant Physiol* 126: 1358-1369.
- John, I., Hackett, R., Cooper, W., Drake, R., Farrell, A. y Grierson, D. 1997. Cloning and characterization of tomato leaf senescence-related cDNAs. *Plant Mol Biol* 33: 641-651.
- Kaethner, T.M. y Rees, T. 1985. Intracellular loacation of ATP-citrate lyase in leaves of *Pisum sativum* L. *Planta.* 163: 290-294.
- Katz, E., Fon, M., Lee, Y.J., Phinney, B.S., Sadka, A. y Blumwald, E. 2007. The citrus fruit proteome: insights into citrus fruit metabolism. *Planta.* 226: 989-1005.

- Kawamura, Y., Arakawa, K., Maeshima, M. y Yoshida, S. 2000. Tissue specificity of E subunit isoforms of plant vacuolar H⁺-ATPase and existence of isotype enzymes. *J. Biol. Chem.* 275: 6515-22.
- Kihara, T., Wada, T., Suzuki, Y., Hara, T. y Koyama, H. 2003. Alteration of citrate metabolism in cluster roots of white lupin. *Plant Cell Physiol.* 44(9): 901-08.
- Kluge, C., Lahr, J., Hanitzsch, M., Bolte, S., Gollack, D. y Dietz, K.J. 2003. New insight into the structure and regulation of the plant vacuolar H⁺-ATPase. *J. Bioenerg. Biomembr.* 35: 377-88.
- Koch, K.E. 1984. Translocation of photosynthetic products from source leaves to aligned juice segments in citrus fruits. *HortScience* 19: 260-261.
- Kothapalli, R., Yoder, S.J., Mane, S. y Loughran, T.P. 2002. Microarray results: how accurate are they?. *BMC Bioinformatics.* 3: 22-32.
- Kruse, A., Fieuw, S., Heineke, D. y Müller-Röber, B. 1998. Antisense inhibition of cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase in transgenic potato plants. *Planta.* 205: 82-91.
- Kumar, S., Tamura, K. y Nei, M. 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform.* 5(2):150-163.
- Langlade, N.B., Messerli, G., Weisskopf, L., Plaza, S., Tomasi, N., Smutny, J., Neumann, G., Martinoia, E. y Massonneau, A. 2002. ATP citrate lyase: cloning, heterologous expression and possible implication in root organic acid metabolism and excretion. *Plant Cell Env.* 25: 1561-69.
- Lapins, K.O. 1983. Mutation breeding, en.: Moore, M.J. y Janick, J. (Eds.), *Methods in fruit breeding.* Purdue University Press, West Lafayette, Indiana. pp. 94-99.
- Leclerc, G.J., Leclerc, G.M. y Barredo, J.C. 2002. Real-time RT-PCR analysis of mRNA decay: half time of Beta-actin mRNA in human leukemia CCRF-CEM and Nalm-6 cell lines. *Cancer Cell International*, 2.
- Lemaitre, T., Urbanczyk-Wochniak, E., Flesch, V., Bismuth, E., Fernie, A.R. y Hodges, M. 2007. NAD-Dependent Isocitrate Dehydrogenase Mutants of Arabidopsis Suggest the Enzyme Is Not Limiting for Nitrogen Assimilation. *Plant Physiol.* 144:1546-58.
- Lenartowicz, L. 1990. A complex effect of arsenite on the formation of α -ketoglutarate in rat liver mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 283: 388-396.

- Levi, A., Davis, A., Hernandez, A., Wechter, P., Thimmapuram, J., Trebitsh, T., Tadmor, Y., Katzir, N., Portnoy, V. y King, S. 2006. Genes expressed during the development and ripening of watermelon fruit. *Plant Cell Rep.* 25 (11): 1233-45.
- Li, X.F., Ma, J.F. y Matsumoto, H. 2000. Pattern of Al-induced secretion of organic acids differs between rye and wheat. *Plant Physiology.* 123: 1537-43.
- Lingle, S.E. y Dunlap, J.R. 1987. Sucrose metabolism in netted muskmelon fruit during development. *Plant Physiol.* 84: 386-389.
- Lobit, P., Génard, M., Wu, B.H., Soing, P. y Habib, R. 2003. Modelling citrate metabolism in fruits: responses to growth and temperature. *Journal of Experimental Botany.* 54(392): 2489-2501.
- Lockhart, D.J., Hadfield, K.A. y Lavabitch, J.M. 1996. Expression monitoring by hybridisation to high-density oligonucleotide arrays. *Nature Biotech.* 14: 1675-80.
- López, J. 1995. La naranja, composición y cualidades de sus zumos y esencias. Generalitat Valenciana. Conselleria de Agricultura y Medio Ambiente. pp. 24-28.
- López, S., Miyashita, Y. y Simons, J. S. S. 1990. Structurally based selective interaction of arsenite with steroid receptor. *J. Biol. Chem.* 265: 16039-16042.
- Lowell, C.A., Tomlinson, P.T. y Koch, K.E. 1989. Sucrose-metabolizing enzymes in transport tissues and adjacent sink structures in developing citrus fruit. *Plant Physiol.* 90: 1394-1402.
- Lüttge, U. y Smith, J.A. 1984. Mechanism of passive malic-acid efflux from vacuoles of the CAM plant *Kalanchoë daigremontiana*. *Journal of Food Science.* 58: 177-81.
- Ma, Y., Jakowitsch, J., Maier, T.L., Bayer, M.G., Muller, N.E., Schenck, H.E. y Löffelhardt, W. 2001. ATP citrate lyase in the glaucocystophyte alga *Cyanophora paradoxa* is a cytosolic enzyme: characterization of the gene for the large subunit at the cDNA and genomic levels. *Mol. Genet. Genom.* 266: 231-38.
- MAPA.2008.<http://www.mapa.es/estadistica/pags/encuestacultivos/2008/ESPANAYCCAA.pdf>
- Margolles-Clark, E., Tenney, K., Bowman, E.J. y Bowman, B.J. 1999. The structure of the vacuolar ATPase in *Neurospora crassa*. *J. Biogen. Biomem.* 31(1): 29-37.
- Marín-Rodríguez, M.C., Orchard, J., Seymour, G.B. 2002. Pectate lyases, cell wall degradation and fruit softening. *J. Exp. Bot.* 53: 2115-19.

- Martinez-Godoy, M.A., Mauri, N., Juarez, J., Marques, M.C., Santiago, J., Forment, J., Gadea, J. 2008. A genome-wide 20 K citrus microarray for gene expression analysis. *BMC Genomics* Jul. 3, 9: 318.
- Marsh, K. B., Richardson, A. C. y Erner, Y. 2000. Effect of environmental conditions and horticultural practices on citric acid content. *Proc. Int. Soc. Citriculture. IX Congr.* 640-643.
- Mazzucato, A., Taddei, A.R., Soressi, G.P. 1998. The parthenocarpic fruit (pat) mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) sets seedless fruits and has aberrant anther and ovule development. *Development*. 125: 107-114.
- Medrano, H. and Flexas, J. 2000. Fotorrespiración y mecanismos del dióxido de carbono, en: Azcon-Bieto, J. y Talón, M (Eds). *Fundamentos de fisiología vegetal*. 2ª Edición. McGraw-Hill. Interamericana de España. Barcelona, España. pp. 419-433.
- Meharg, A.A. y Hartley-Whitaker, J. 2002. Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species. *New Phytologist*. 154: 29-43.
- Mehouchi, J., Serna, D., Zaragoza, S., Agusti, M., Talón, M. y Primo-Millo, E. 1995. Defoliation increases fruit abscission and reduces carbohydrate levels in developing fruits and wood tissues of *Citrus unshiu*. *Plant Science* 107: 189-197.
- Mifflin, B.J. y Lea, P.J. 1982. Ammonia assimilation and amino acid metabolism, en: Boulter, D., Parthier, B. (eds). *Encyclopedia of Plant Physiology*. Springer, A. New York. 14: 5-64.
- Millar, A.H., Sweetlove, L.J., Giegé, P. y Leaver, C.J. 2001. Analysis of the Arabidopsis mitochondrial proteome. *Plant Physiol*. 127: 1711-1727.
- Moeder, W., Del Pozo, O., Navarre, D.A., Martín, G.B. y Klessig, D.F. 2006. Aconitase plays a role in regulating resistance to oxidative stress and cell death in Arabidopsis and *Nicotiana benthamiana*. *Plant Mol. Biol.* 63(2):273-87.
- Moing, A. Rothan, C., Svanella, L., Just, D., Diakou, P., Raymond, P., Gaudillere, J.P. y Monet, R. 2000. Role of phosphoenolpyruvate carboxylase in organic acid accumulation during peach fruit development. *Plant Physiol*. 108: 1-10.
- Moing, A., Svanella, L., Gaudillère, M., Gaudillère, J.P. y Monet, R. 1999. Organic acid concentration is little controlled by phosphoenolpyruvate carboxylase activity in peach fruit. *Aus. Jour. Plant Physiol*. 26: 579-85.
- Moriguchi, T., Kita, M., Hisada, S., Endo-Inagaki, T. Y Omura, M. 1998. Characterization of gene repertoires at mature estage of citrus fruits through random

- sequencing and analysis of redundant metallothionein-like genes expressed during fruit development. *Gene*, 211: 221-227.
- Moreau-Rio, M.A., Scandella, D. y Vénien, S. 1995. Pêches et nectarines. Image et perception de la qualité, analyse sensorielle. *Infos-Ctifl*. 108: 12-17.
 - Moyle, R., Fairbairn, D.J., Ripi, J., Crowe, M. y Botella, J.R. 2004. Developing pineapple fruit has a small transcriptome dominated by metallothionein. *J. Exp. Bot.* 56 (409): 101-12.
 - Mueller, L.A., Zhang, P. y Rhee, S.Y. 2003. AraCyc: a biochemical pathway database for *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 132: 453-460.
 - Müller, M.L., Irkens-Kiesecker, U., Rubinstein, B. y Taiz, L. 1996. On the mechanism of hyperacidification in lemon, comparison of the vacuolar H-ATPase activities of fruits and epicotyls. *J. Biol. Chem.* 271(4):1916-24.
 - Müller, M.L., Irkens-Kiesecker, U., Kramer, D. y Taiz, L. 1997. Purification and reconstitution of the vacuolar H⁺-ATPases from lemon fruits and epicotyls. *The Amer. Soc. Bioch. Mol. Biol.* 272(19):12762-70.
 - Müller, M.L., Jensen, M. y Taiz, L. 1999. The vacuolar H⁺-ATPase of lemon is regulated by variable H⁺-ATPase coupling and slip. *J. Biol. Chem.* 274(16):10706-16.
 - Musrati, R.A., Kollarova, M., Mernik, N. y Mikulasova, D. 1998. Malate dehydrogenase: distribution, function and properties. *Gen Physiol. Biophys.* 17(3): 193-210.
 - Nagy, S. y Nordby, H.E. 1971. Distribución of free and conjugated sterols in orange and tangerine juice sacs. *Lipids* 6: 826-830.
 - Nakai, K y Kanehisa, M. 1992. A knowledge base for predicting protein localization sites in eukaryotic cells. *Genomics*. 14: 897-911.
 - Navarro, L., Aleza, P. y Juárez, J. 2006. Mejora de la calidad de los cítricos. En: *Mejora genética de la calidad en plantas*. Llácer, G., Díez, M.J., Carrillo, J.M. y Badenes, M.L. (Eds.). Universidad Politécnica de Valencia. Valencia. pp. 579-96.
 - Neumann, G., Massonneau, A., Martinoia, E. y Röheld, A. 1999. Physiological adaptations to phosphorus deficiency during proteoid root development in white lupin. *Planta* 208: 373-82.
 - Nunes-Nesi, A., Carrari, F., Lytovchenko, A., Smith, A.M.O., Loureiro, M.E., Ratcliffe, R.G., Sweetlove, L.J. y Fernie, A.R. 2005. Enhanced Photosynthetic Performance and Growth as a Consequence of Decreasing Mitochondrial Malate Dehydrogenase Activity in Transgenic Tomato Plants. *Plant Physiol.* 137:611-22.

- Olsen, A.N., Ernst, H.A., Leggio, L.L. y Skriver, K. 2005. NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. *Trends in Plant Science* 10: 79-87.
- Ooka, H., Satoh, K., Doi, K., Nagata, T., Otomo, Y., Murakami, K., Matsubara, K., Osato, N., Kawai, J., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Suzuki, K., Kojima, K., Takahara, Y., Yamamoto, K. y Kikuchi, S. 2003. Comprehensive analysis of NAC family genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*. *DNA Research* 10: 239-247.
- Or, E., Baybik, J., Sadka, A. y Saks, Y. 2000. Isolation of mitochondrial malate and phosphoenolpyruvate carboxylase cDNA clones from grape berries and analysis of their expression pattern throughout berry development. *J. Plant Physiol.* 157: 527-34.
- Palomo, J., Gallardo, F., Suárez, M.F. y Canovas, F.M. 1998. Purification and characterization of NADP-linked isocitrate dehydrogenase from Scots pine. Evidence for different physiological roles of the enzyme in primary development. *Plant Physiol.* 118: 617-26.
- Patterson, B.D. y Graham, D. 1987. Temperature and metabolism. In: (DD Davies ed) *The Biochemistry of Plants*. Academic Press. Vol. 2, pp. 153-199.
- Peyret, P., Pérez, P. y Alric, M. 1995. Structure, genomic organization, and expression of the *Arabidopsis thaliana* aconitase gene. Plant aconitase show significant homology with mammalian iron-responsive element-binding protein. *J. Biol. Chem.* 270: 8131-8137.
- Piñol, M.T., Palazón, J. y Cusidó, R.M. 2000. Introducción al metabolismo secundario, en: Azcon-Bieto, J. y Talón, M. (eds). *Fundamentos de fisiología vegetal*. 2ª Edición. Ed. McGraw-Hill. Interamericana de España. Barcelona, España. pp. 217-233.
- Pfaffl, M.W., Lange, I.G. y Meyer, H.H.D. 2003. The gastrointestinal tract as target of steroid hormone action: Quantification of steroid receptor mRNA expression (aR, Er α , Er β and PR) in 10 bovine gastrointestinal tract compartments by kinetic RT-PCR. *Journal of Steroid. Biochemistry and Molecular Biology*, 84: 159-166.
- Plaxton, W.C. 1996. The organization and regulation of plant glycolysis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47:185-214.
- Povey, S., Slaughter, C.A., Wilson, D.E., Gormley, I.P., Buckton, K.E., Perry, P. y Bobrow, M. 1976. Evidence for the assignment of the loci AK1, AK3 and ACONs to chromosome 9 in man. *Ann Hum Genet.* 39(4): 413-422.
- Quick, P. y Schaffer, A.A. 1996. Sucrose metabolism in sinks and sources. En: *Photoassimilate distribution in plants and crops, source-sink relationships*. Zamski, E., Schaffer, A.A. (eds). New York, Marcel Dekker. p. 115-156.

- Ramakrishnan, C.V. 1971. Citric acid metabolism in the fruit tissues of *Citrus acida*. *Curr. Sci.* 5: 97-100.
- Ratajczak, R., Lüttege, U., González, P. y Etxeberria, E. 2003. Malate and malate-chanel antibodies inhibit electrogenic and ATP-dependent citrate transport across the tonoplast of citrus juice cells. *J. Plant Physiol.* 160: 1313-17.
- Ratcliffe, R.G. 1995. Metabolic aspects of the anoxic response in plant tissue. In: (N Smirnov ed) *Environment and Plant Metabolism: Flexibility and Acclimation*. Bios Scientific, Oxford, pp. 111-127.
- Ratledge, C. y Evans, C.T. 1989. Lipids and their metabolism. In Rose, A.H., Harrison, J.S. *The Yeasts*, Ed 2, Vol. 3. Academic Press, London, pp 368-446.
- Ratledge, C. y Rangasamy, D. 2000. Compartmentation of ATP: citrate lyase in plants. *Plant Physiology* 122: 1225-30.
- Reuveni, M y Sadka, A. 2000. Isolation of vacuolar H⁺-ATPase subunit E cDNA from juice sacs of citrus limon (Accession No. AF165939). *Plant Physiol.* 122:291.
- Ribas-Carbó, M. y González-Meler, M.A. 2000. Fisiología de la respiración de las plantas, en: Azcon-Bieto, J. y Talón, M. 2000. *Fundamentos de fisiología vegetal*. 2ª Edición. Ed. McGraw-Hill. Interamericana de España. Barcelona, España. pp. 217-233.
- Ríos, G., Naranjo, M.A., Iglesias, D.J., 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.
- Rodrigo, M.J.; Marcos, J.; Alférez, F.; Mallent, M.D.; Zacarías, L. 2003. Characterization of Pinalate, a novel *Citrus sinensis* mutant with a fruit-specific alteration that results in yellow pigmentation and decreased ABA content. *J. Exp. Bot.* 54: 727-738.
- Rothan, C., Duret, S., Chevalier, C. y Raymond, P. 1997. Suppression of ripening-associated gene expression in tomato fruits subjected to a high CO₂ concentration. *Plant Physiol.* 114: 255-263.
- Ruffner, H.P., Hawker, J.S. y Hale, C.R. 1976. Temperature and enzymatic control of malate metabolism in berries of *Vitis vinifera*. *Phytochem.* 15: 1877-80.
- Ruffner, H.P. y Kliewer, W.M. 1975. Phosphoenolpyruvate carboxykinase activity in grape berries. *Plant Physiol.* 56: 67-71.
- Ruuska, S.A., Girke, T., Benning, C. y Ohlrogge, J.B. 2002. Contrapuntal networks of gene expression during *Arabidopsis* seed filling. *Plan Cell.* 14: 1191-1206.

- Sablowski, R.W.M., y Meyerowitz, E.M. 1998. A homolog of no apical meristem is an immediate target of the floral homeotic genes *APETALA3/PISTILLATA*. *Cell* 92: 93-103.
- Sadka, A., Dahan, E., Cohen, L. y Marsh, K. B. 2000a. Aconitase activity and expression during the development of lemon fruit. *Physiologia Plantarum* 108: 255-262.
- Sadka, A., Dahan, E., Or, E. y Cohen, L. 2000b. NADP⁺-isocitrate dehydrogenase gene expression and isozyme activity during citrus fruit development. *Plant Sci.* 158: 173-181.
- Sadka, A., Dahan, E., Or, E., Roose, M.L., Marsh, K. B. y Cohen, L.,. 2001. Comparative analysis of mitochondrial citrate synthase gene structure transcript level and enzymatic activity in acidless and acid-containing *Citrus* varieties. *Aust. J. Plant Physiol.* 28: 383-90.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. y Erlich, H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239(4839): 487-91.
- Saitou, N. y Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4(4): 406-425.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Col Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Sánchez, R. y Cejudo, F.J. 2003. Identificación and expresión análisis of a gene encoding a bacterial-type phosphoenolpyruvate carboxylase from *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiol.* 132: 949-57.
- Saunt, J. 1990. *Citrus varieties of the world*. Sinclair Int Ltd, Norwich, UK.
- Scharrenberger, C. y Martin, W. 2002. Evolution of the enzymes of the citric acid cycle and the glyoxilate cycle of higher plants. *European J. Biochem.* 269 (3): 868-883.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W. y Brown, P.O. 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science.* 270: 467-70.
- Seymour, G.B., Taylor, J.E. y Tucker, G.A. 1993. *Biochemistry of fruit ripening*. Chapman and Hall. London. pp. 107-151.
- Shimada, T., Fuiiii, H., Endo, T., Yazaki, J., Kishimoto, N., Shimbo, K., Kikuchi, S. y Omura, M. 2005. Toward comprehensive expression profiling by microarray analysis in citrus: monitoring the expression profiles of 2213 genes during fruit development. *Plant Science*, 168: 1383-1385.
- Shimada, T., Nakano, R., Shualev, V., Sadka, A. and Blumwald, E. 2006. Vacuolar citrate/H⁺ symporter of citrus juice cells. *Planta* 224: 472-80.

- Siedow, J.N. y Day, D.A. 2000. Respiration and photorespiration, in: Buchanan, B.B., Gruissem, W. and Jones, R. Biochemistry and molecular biology of plants. Ed. American Society of Plant Physiologists. Rockville, Maryland. pp. 630-75.
- Sinclair, W.B. y Ramsey, R.C. 1944. Changes in the organic-acid content of Valencia oranges during development. Bot. Gaz. 106: 140-48.
- Sinclair, W.B., Bartholomew, E.T. y Ramsey, R.C. 1945. Analysis of the organic acids of orange juice. Plant Physiology. 20: 3-18.
- Sinclair, W.B. 1984. The biochemistry and physiology of the lemon and other citrus fruits. University of California, Oakland, CA.
- Sites, J.W. y Reitz, H.J. 1950. The variation in individual Valencia oranges from different locations of the tree as a guide to sampling and spot-picking for quality. Part I. Titratable acid and soluble solids / titratable acid ratio of the juice. Proc. Amer. SOC. Hort. Sci. 55: 73-80.
- Slaughter, C.A., Povey, S., Carritt, B., Solomon, E. y Bobrow, M. 1978. Assignment of the locus ACONM to chromosome 22. Cytogenet Cell Genet. 22(1-6):223-225.
- Smith, G.K. 2004. Linear models and empirical Bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology 3, No. 1, Article 3
- Smith, J.H.C. y Benitez, A. 1955. Chlorophylls. In: Modern methods of plant analyses. Peach, K., Tracey, M.V. Eds.; Springer: Berlin. Pp 142-146.
- Snedden, W., A. y Fromm, H. 1999. In Plant Responses to Environmental Stresses: From Phytohormones to Genome Reorganization, ed. Lerner, H., R. Dekker, New York. pp. 549–574.
- Soler, J. 1999. Reconocimiento de variedades de cítricos en campo.- Generalidad Valenciana. Conselleria de Agricultura Pesca y Alimentación.
- Soler, J. y Soler, G. 2006. Cítricos. Variedades y técnicas de cultivo. Mundi Prensa. Valencia. pp. 242.
- Spiegel-Roy, P. y Goldschmidt, E.E. 1996. Biology of citrus. Cambridge University Press. pp. 230.
- Staden, R. 1996. The Staden sequence analysis package. Mol. Biotechnol. 5(3): 233-241.
- Strompen, G., Dettmer, J., Stierhof, Y.D., Schumacher, K., Jürgens, G. y Mayer, U. 2005. Arabidopsis vacuolar H⁺-ATPase subunit E isoform 1 is required for golgi organization and vacuole function in embryogenesis. The Plant Journal 41: 125-32.

- Swingle, L.C. 1968. The botany of citrus, in: Reuther, W., Batchelor, L.D., Webber, H.J. (Eds.), The citrus industry, vol 1, University of California, Oakland, CA. pp. 86-126.
- Sze, H., Li, X. y Palmgren, G. 1999. Energization of plant cell membranes by H⁺-pumping ATPases: regulation and biosynthesis. *The Plant Cell* 11: 677-89.
- Tadeo, F.R., Moya, J.L., Iglesias, D.J., Talón, M. y Primo-Millo, E. 2003. Histología y citología de cítricos. Serie de divulgació técnica. Generalitat Valenciana. Conselleria de Agricultura Pesca y Alimentación.
- Takada, S., Hibara, K., Ishida, T. y Tasaka, M. 2001. The *CUP-SHAPED COTYLEDON1* gene of *Arabidopsis* regulates shoot apical meristem formation. *Development* 128: 1127-1135.
- Takahashi, N., Yamaguchi, I., Kono, T., Igoshi, M. y Hirose, K. 1965. Characterization of plant growth substance in Citrus unshiu and their change in fruti development. *Plant Cell Physiol* 16: 101-111.
- Takeuchi, A., Yamaguchi, M. y Uritani, I. 1981. ATP: citrate lyase from opomea potatoes root tissue infected with *Ceratocystis fimbriata*. *Phytochemistry*. 20: 1235-39.
- Tamaki, S. y Frankenberger, W.T. 1992. Environmental biochemistry of arsenic. *Rev. Env. Cont. Tox.* 124: 79-110.
- Terol, J., Conesa, A., Colmenero, J.M., Cercos, M., Tadeo, F., Agusti, J., Alos, E., Andres, F., Soler, G., Brumos, J., Iglesias, D.J., Gotz, S., Legaz, F., Argout, X., Courtois, B., Ollitrault, P., Dossat, C., Wincker, P., Morillon, R. y Talon, M. 2007. Analysis of 13000 unique Citrus clusters associated with fruit quality, production and salinity tolerance. *BMC Genomics*. Jan 25, 8: 31.
- Terol, J., Naranjo, M.A., Ollitrault, P., Talon, M. 2008. Development of genomic resources for Citrus clementina: characterization of three deep-coverage BAC libraries and analysis of 46,000 BAC end sequences. *BMC Genomics*. Sep 18, 9: 423
- Terrier, N., Sauvage, F.X., Ageorges, A. y Romieu. 2001. Changes in acidity and in proton transport at the tonoplast of grape berries during development. *Planta* 213: 20-28.
- Tesfaye, M., Temple, S.J., Allan, D.L., Vance, C.P. y Samac, D.A. 2001. Overexpression of malate dehydrogenase in transgenic alfalfa enhances organic acid synthesis and confers tolerance to aluminium. *Plant Physiol*. 127: 1836-44.
- Thomas, H., Oughman, H.J., Wagstaff, C. y Stead, A.D. 2003. Defining senescence and death. *J. Exp. Bot.* 54:1127-1132.

- Tomasheck, J.J., Sonnenburg, J.L., Artimovich, J.M. y Klyonsky, D.J. 1996. Resolution of subunits interaction and cytoplasmic subcomplexes of yeast vacuolar proton-translocating ATPase. *J. Biol. Chem.* 271:10397-10404.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. y Higgins, D.G. 1997. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acid Res.* 25(24): 4876-4882.
- Ullrich-Eberius, C.L, Sanz, A. y Novacky, A.J. 1989. Evaluation of arsenic and vanadate-associated changes of electrical membrane potential and phosphate transport in *Lemna gibba*. *J. Exp. Bot.* 40: 119-28.
- Van Gelder, R.N., Von Zastrow, M.E., Yool, A., Dement, W.C., Barchas J.D. y Eberwine, J.H. 1990. Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 1663-67.
- Verniquet, F., Gallard, J., Neuburger, M. y Douce, R. 1991. Rapid inactivation of plant aconitase by hydrogen peroxide. *Biochem. J.* 276: 643-648.
- Ward, J.M. y Sze, H. 1992. Subunit composition and organization of the vacuolar H⁺-ATPase. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 13: 779-808.
- Wedding, R.T. 1989. Malic enzymes of higher plants. Characteristic, regulation, and physiological function. *Plant Physiol.* 90: 367-371.
- Wellmer, F., Riechmann, J.L., Alves-Ferreira, M. y Meyerowitz, E.M. 2004. Genome-Wide Analysis of Spatial Gene Expression in *Arabidopsis* Flowers. *Plant Cell.* 16, 1314-26.
- Wheeler, M.C.G., Arias, C.L., Tronconi, M.A., Maurino, V.G., Andreo, C.S. y Drincovich, M.F. 2008. *Arabidopsis thaliana* NADP-malic enzyme isoforms: high degree of identity but clearly distinct properties. *Plant Mol. Biol.* 67: 231-42.
- White, P.J. 2002. Recent advances in fruit development and ripening: an overview. *J. Exp. Bot.* 53 (377): 1995-2000.
- Wilson, W.C. 1987. Results of experiments using arsanilic acid to reduce acidity grapefruit in Florida. *Proc. Plant Growth Reg. Soc. Ame.* 14: 490-502.
- Xu, W., Back, S., Decker, A., Paquette, S.M. Feyereisen, R. y Galbraith, D.W. 2001. Microarray-based analysis of gene expression in very large gene families: the cytochrome P450 gene superfamily of *Arabidopsis thaliana*. *Gene.* 272: 61-74.

- Yang, Z.M., Nian, H., Sivaguru, M., Tanakamaru, S. y Matsumoto, H. 2001. Characterization of aluminium-induced citrate secretion in aluminium-tolerant soybean (*Glycine max* L.) plants. *Physiol. Plant.* 113: 64-71.
- Zhang, J.W., Parra, K.J., Liu, J. y Kane, P.M. 1998. Characterization of a temperature-sensitive yeast vacuolar ATPase mutant with defects in actin distribution and bud morphology. *J. Biol. Chem.* 273:18470-80.