



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I DEL MEDI
NATURAL

***Caracterización del contenido y de la composición de
carotenoides en frutos de nuevos híbridos de cítricos***

(2015-2016)

GRAU EN INGENYERIA AGRONÒMICA I DEL MEDI RURAL

TRABAJO FIN DE GRADO

Por Alexandre García-Devès Flores

Tutores : Dr. Lorenzo Zacarías García

Dra. M. Jesús Rodrigo Esteve

Tutor UPV : Francisco José Tarrazó Morell

VALENCIA, 30 DE NOVIEMBRE DE 2015

Título: Caracterización del contenido y de la composición de carotenoides en frutos de nuevos híbridos de cítricos

Resumen: Los frutos cítricos por su elevado consumo tanto en fresco como en zumo, son una de las principales fuentes de nutrientes y componentes bioactivos para la alimentación. En particular, los carotenoides, además, de ser los pigmentos responsables de la coloración de la piel y de la pulpa en estos frutos, son componentes esenciales para la nutrición, ya que algunos de ellos son los precursores de la vitamina A y otros tienen una gran capacidad antioxidante. Por ello, el estudio de los cambios cuantitativos y cualitativos en carotenoides en los frutos cítricos es esencial para conocer su aporte en la alimentación y, además, conocer los procesos metabólicos que conducen a su síntesis y acumulación en los mismos. La obtención de nuevas variedades especialmente ricas o con contenidos elevados en estos componentes es una de las prioridades para la alimentación y en el caso de los frutos cítricos es uno de los objetivos de numerosos programas de mejora en los países y regiones productoras, como la Comunidad Valenciana. El objetivo del presente Trabajo Fin de Grado es estudiar el contenido en carotenoides en la piel y en la pulpa de frutos de cinco híbridos de cítricos resultantes de cruces entre pumelo pink (*Citrus máxima*) y la mandarina Clementina de Nules (*Citrus clementina*). En concreto, para este trabajo se han seleccionado 5 híbridos que presentan una gran variabilidad y gradación en la coloración de la piel y la pulpa, desde amarillo hasta naranja. Los frutos de las variedades híbridas estudiadas, mostraron en la pulpa un perfil claramente diferenciado, los dos híbridos de color naranja, presentaron cantidades importantes de β -criptoxantina, al igual que la mandarina clementina, y de ahí procede su color. Mientras que los dos híbridos más amarillos, parecen haber heredado la capacidad de síntesis del pumelo pink, ya que acumulan sobre todo carotenoides incoloros como fitoeno o fitoflueno. Ninguno de los híbridos parece haber heredado la capacidad del pumelo de acumular licopeno. En la piel de los frutos, la concentración de carotenoides es mucho mayor, pero al igual que en la pulpa, dos híbridos destacan por sus similitudes cromáticas con la clementina, pero curiosamente uno se debe a la acumulación de apocarotenoides C-30, muy abundantes en la clementina, y el otro a la acumulación de β -criptoxantina, la xantofila precursora de los apocarotenoides C-30, lo cual sugiere una alteración en la capacidad de síntesis de estos. Y otros dos que han heredado la capacidad de síntesis sobre todo del pumelo pink, los cuales acumulan sobre todo carotenoides incoloros, destacando en estos la alta concentración de fitoeno. En el caso de la piel existe un híbrido intermedio, que parece haber heredado capacidad de acumulación de carotenoides de ambos parentales.

Palabras clave: Carotenoides, híbridos, cítricos, clementina, pumelo pink

Autor: Alexandre García-Devis Flores

Tutores CSIC: Lorenzo Zacarías García, M. Jesús Rodrigo Esteve

Tutor UPV: Francisco José Tarrazó Morell

Lugar y fecha: Valencia, 30 de Noviembre de 2015.

Abstract: Citric fruits are because its high consumption both fresh and in juice, are a major source of nutrients and biocomponents in food. In particular, carotenoids, a part of be the responsible pigments of the color in the peel and the pulp, are essential components in our nutrition, because some of them are precursors of vitamin A, and some of them have a high antioxidant activity. Therefore, the study of quantitative and qualitative changes in carotenoids in citrus fruits is essential to know its contribution to food and also to identify the metabolic processes that lead to the synthesis and accumulation therein. Obtaining new varieties specially rich in this components is a priority in feeding and in the case of citric fruits, its one of the objectives of many of improvement programs in different countries and producing regions, like Valencia. The objective of this bachelor thesis is to study the content and composition in the peel and the pulp of five hybrid of citrics which have a great variability and gradation in the color of the pulp and the peel, from yellow to orange. The fruits of the studied varieties, show in its peel a carotenoid profile clearly differentiated, the orange color hybrid show a significant quantity of β -cryptoxanthin, like clementine tangerine, hence its color. While the two yellow hybrids seem to have inherited the synthesis capacity from the pink pumelo, because accumulate specially colorless carotenoids as phytoene or phytofluene. None of the hybrid seems to have inherited the ability to accumulate lycopene like the pumelo. In the peel of the fruits, carotenoid concentration is much higher, but as in the pulp, two hybrid stand out for its chromatic similarities with Clementine, but curiously one due to the accumulation of apocarotenoids C-30, very abundant in Clementine, and the other due to the accumulation β -cryptoxantina, xanthophyll precursor of C-30 apocarotenoids, suggesting an impaired ability of the synthesis of these. And two others who have inherited the ability to synthesize from the pink pumelo, which accumulate mainly colorless carotenoids, highlighting these high concentration of phytoene. In the case of peel there is an intermediate hybrid, which seems to have inherited carotenoid accumulation capacity of both parents.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, y como no podría ser de otra manera, quiero agradecer a mis dos tutores del IATA, María Jesús y Lorenzo, que me hayan brindado la oportunidad de realizar este proyecto con ellos. Gracias por enseñarme un mundo, que me era prácticamente desconocido y que me ha encantado conocer. No tengo más que palabras de agradecimiento hacia vosotros. Por vuestra paciencia con mis errores de novato y mi inexperiencia en este tipo de trabajos, por haberme enseñado tantas cosas y estar siempre ahí cuando tenía una duda, que no eran pocas. En fin, muchas gracias por todo, este trabajo es tan vuestro como mío.

También me gustaría agradecer a Pepe, el haber sido mi tutor del trabajo en la UPV. Gracias por ser tan atento y tener siempre las puertas del despacho abiertas para mí, para charlar de temas académicos o no, y no solo durante este trabajo, sino a lo largo de los años que has sido mi profesor.

Importante mención para mis compañeros de laboratorio de postcosecha Fabio, Francisco, Mari Carmen, Selma e Inma. Quiero agradecerlos no solo todo lo que me habéis ayudado en el aprendizaje y en la extracción de carotenoides, de la cual no sabía nada cuando llegué, sino también por lo agradable que habéis hecho trabajar en el laboratorio estos meses. Voy a echar de menos esas charlas después de comer quejándonos del calor estival en Valencia. Gracias, sin vosotros esto no hubiera sido posible.

Y por último, a mis compañeros 'Del Poli' y a mi familia, que aunque no estén directamente relacionados con este trabajo, han estado ahí todos los años de carrera. Gracias.

Índice de contenido

1. INTRUDUCCIÓN.....	8
1.1 Carotenoides. Conceptos generales	8
1.2 Estructura y clasificación	8
1.3 Importancia de los carotenoides.....	10
1.4 Generalidades sobre la composición de y biosíntesis de carotenoides.....	12
1.4 Generalidades sobre la composición de y biosíntesis de carotenoides.....	12
1.5 Carotenoides en cítricos.....	15
1.5.1 Contenido y composición de carotenoides en los frutos cítricos.....	16
1.5.2 Carotenoides en mandarina Clementina.....	18
1.5.3 Carotenoides en pumelo.....	19
2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.....	21
2.1 Objetivos.....	21
2.2 Plan de trabajo.....	21
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	22
3.1 Material vegetal.....	22
3.2 Estimación de índice de color.....	23
3.3 Extracción y cuantificación de carotenoides totales.....	24
3.4 Identificación y cuantificación de carotenoides individuales mediante HPLC.....	25
3.5 Programas informáticos utilizados.....	27
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
4.1 Selección de frutos de los híbridos 'Nulpink'.....	28
4.2 Color de la piel y de la pulpa en frutos maduros de cinco híbridos 'Nulpink' y sus parentales.....	32
4.3 Contenido en carotenoides totales en la piel y de la pulpa de frutos maduros de cinco híbridos 'Nulpink' y sus parentales	34
4.4 Identificación y cuantificación de carotenoides en la piel y de la pulpa de frutos maduros de cinco híbridos 'Nulpink' y sus parentales	36
5. CONCLUSIONES.....	43
6. BIBLIOGRAFÍA.....	45

Índice de figuras:

Figura 1: Estructura de algunos carotenoides

Figura 2: Esquema general de la ruta de biosíntesis de los carotenoides

Figura 3: Morfología y color de los frutos maduros de 'Nulpink' en el árbol

Figura 4: Aspecto y color externo (a) e interno (b) de frutos maduros de los híbridos 'Nulpink'

Figura 5: Morfología y color externo e interno de frutos maduros de la mandarina Clementina de Nules y del pumelo Pink

Figura 6: Comparación del tamaño de los frutos maduros de los híbridos 'Nulpink' 69 y 112 respecto a un fruto maduro de la mandarina Clementina de Nules

Figura 7: Color (Hunter a/b) de la piel y de la pulpa de frutos maduros del Pumelo Pink, mandarina Clementina de Nules y de cinco híbridos Nulpink.

Figura 8: Contenido en carotenoides totales en la piel y la pulpa de frutos maduros del Pumelo Pink, mandarina Clementina de Nules y de cinco híbridos Nulpink.

Figura 9: Cuantificación de carotenoides en la piel de frutos maduros de cinco híbridos 'Nulpink' y sus parentales

Figura 10: Cuantificación de carotenoides en la pulpa de frutos maduros de cinco híbridos 'Nulpink' y sus parentales

Índice de tablas:

Tabla 1: Contenido y principales carotenoides en mandarina clementina y pumelo

Tabla 2: Gradiente de elución utilizado para la separación de carotenoides mediante HPLC

Tabla 3: Gradiente de elución utilizado para la separación de carotenoides mediante HPLC

Tabla 4: Identificación de carotenoides y características espectrales de estos en la piel de frutos maduros de cinco híbridos 'Nulpink' y sus parentales Pumelo Pink y mandarina Clementina de Nules.

Tabla 5: Identificación de carotenoides y características espectrales de estos en la piel de frutos maduros de cinco híbridos 'Nulpink' y sus parentales Pumelo Pink y mandarina Clementina de Nules.

Lista de abreviaturas

β -CHX: β -caroteno hidroxilasa

β -LCY: β -licopeno ciclasa

ϵ -CHX: ϵ -caroteno hidroxilasa

ϵ -LCY: ϵ -licopeno ciclasa

CLM: Clementina

DCM: Diclorometano

GGPP: Geranilgeranil pirofosfato

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

IPP: Isopentil pirofosfato

NSY: Neoxantina sintasa

MEP: Metil-eritritol-pirofosfato

PDA: Detector de fotodiodos

PDS: Fitoeno desaturasa

PF: Peso Fresco

PP : pumelo pink

PSY: Fitoeno sintasa

Tm: Toneladas

VDE: Violaxantina deepoxidasa

ZDS: ϵ -caroteno desaturasa

ZEP: Zeaxantina epoxidasa

1.INTRUDUCCIÓN

1.1 Carotenoides. Conceptos generales

Los carotenoides son pigmentos orgánicos del grupo de los isoprenoides, caracterizados por primera vez a mediados del siglo XIX por Wackenroder (Gross 1987) y que reciben su nombre de su compuesto más representativo, el β -caroteno. Son los responsables en gran medida del color característico de frutos, flores, raíces o tubérculos de numerosas especies vegetales. Los carotenoides se sintetizan en las plantas superiores y en otros organismos fotosintéticos y microorganismos, pero no en los animales a pesar de ser esenciales para su fisiología y nutrición, por lo que deben de ser consumidos en la dieta (Britton 1998).

1.2 Estructura y clasificación

Los carotenoides están formados por ocho unidades de isopreno, que se unen formando un tetraterpeno simétrico de cuarenta átomos de carbono.

Los carotenoides pueden tener varios dobles enlaces en su estructura, lo que le confiere la capacidad de absorber determinadas longitudes de onda, y además pueden ciclarse en los extremos dando lugar a anillos del tipo β - o α -.

Los carotenoides se divide en dos grandes grupos: carotenos y xantofilas. Los primeros son hidrocarbonados, solubles en disolventes apolares (ejm. hexano o cloroformo) y los segundos son oxigenados solubles en disolventes polares (ejm. Metanol o acetona). Los carotenoides pueden ser acíclicos, monocíclicos o policíclicos (Gross 1987 ; Britton 1998 ; Fraser y Bramley 2004).

El color de los carotenoides varía desde amarillo pálido hasta rojo intenso y se encuentra directamente relacionado con su estructura química, tanto por el número y posición de dobles enlaces como por otros sustituyentes, lo que determina su espectro de absorción y consecuentemente su color (Britton 1998). Por ejemplo, el fitoeno que posee únicamente tres enlaces dobles conjugados absorbe luz en el rango ultravioleta y por tanto, es incoloro a la visión de los humanos, mientras que el licopeno, compuesto que confiere color rojo al tomate contiene 11 enlaces dobles conjugados. Existen también carotenoides de color naranja intenso (ζ -Caroteno), amarillo (luteína), y naranja pálido (violaxantina). Debido a la existencia de los dobles enlaces conjugados en la estructura de los carotenoides éstos pueden presentar isomería *cis-trans*. En general, para la mayoría de los carotenoides la estructura predominante es la *trans*, aunque hay algunas excepciones como el fitoeno, cuyo isómero habitual es el 15-*cis* (Figura 1) (Britton, 1998).

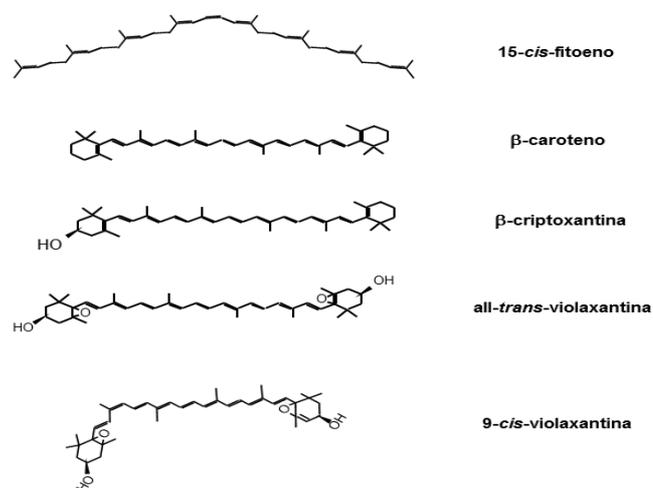


Figura 1. Estructura de algunos carotenoides en las formas *cis*- y *trans*- comúnmente encontrados en la naturaleza.

1.3 Importancia de los carotenoides

En los organismos fotosintéticos los carotenoides son participantes activos de los fotosistemas en los cloroplastos y son capaces de captar energía en determinadas longitudes de onda, transfiriéndola a las clorofilas, y ampliando así el espectro de luz que la planta puede usar para la fotosíntesis. En concreto, en el complejo antena LHCI se ha descrito la presencia de cuatro sitios de unión a cuatro carotenoides, tres de estos carotenoides (dos moléculas de luteína y una de neoxantina) participan en la captación y transferencia de energía, mientras que el cuarto carotenoide (zeaxantina, anteraxantina o violaxantina) juega un papel decisivo en la disipación de la energía excedente y en la detoxificación de las formas reactivas del oxígeno que se forman durante la fotosíntesis (Merchant y Sawaya 2005). Los carotenoides son, además, pigmentos naturales que se acumulan en grandes cantidades en numerosos frutos y flores, y de gran importancia en la función reproductora de las plantas, ya que actúan como pigmentos atrayentes de agentes polinizadores o dispersores de las semillas.

Otra función importante de los carotenoides debida al sistema de dobles enlaces conjugados en su estructura es la capacidad de los carotenoides para desactivar radicales libres altamente agresivos para el organismo y que se originan como subproductos del metabolismo celular. Dichos radicales son muy reactivos y pueden causar daño oxidativo a las diferentes estructuras y moléculas celulares (proteínas, ácidos nucleicos, membranas etc.) afectando de forma importante al metabolismo celular (Alquezar et al 2008). Por tanto, existe un creciente interés en el estudio de la capacidad antioxidante de determinados carotenoides debido a sus potenciales efectos beneficiosos para el metabolismo celular y la prevención del daño oxidativo (Charanjit, 2001). Es interesante mencionar que el comportamiento antioxidante *in vivo* de los carotenoides depende de su estructura, concentración y localización celular y tisular (Maiani, 2009). En este sentido, existe un amplio consenso entre la relación del consumo de carotenoides en la dieta y los efectos protectores o beneficiosos para la salud humana (Rao Rao, 2007).

La propiedad más importante y la primera que se les atribuyó fue la de precursores de la vitamina A. Para que un carotenoide tenga actividad provitamina A debe poseer un anillo β - no sustituido en su estructura unido a una cadena poliénica de once átomos de carbono. Entre los carotenoides se conocen aproximadamente 50 que

cumplen con estos requisitos, pero los que comúnmente se consumen en la dieta son β -caroteno, α -caroteno y β -criptoxantina. En la dieta la vitamina A es proporcionada de dos maneras: como vitamina A preformada a partir de alimentos de origen animal (retinil éster, retinol, retinal, 3-dehidroretinol y ácido retinoico) o como carotenoides (provitamina A) que pueden ser transformados biológicamente en vitamina A y que generalmente provienen de alimentos de origen vegetal. La provitamina A tiene la ventaja de ser convertida en vitamina A sólo cuando el cuerpo lo requiere, evitando de esta manera la toxicidad potencial de una sobredosis de vitamina (van der Berg *et al.* 2000; Melendez Martinez *et al.* 2004; Fraser y Bramley 2004).

Derivada de su actividad pro vitamina A, los carotenoides tienen un importante papel en la prevención de enfermedades oculares como cataratas y la formación y proliferación de epitelios (Snndderly 1995; van der Berg et al 2000; Melendez Martinez et al.2004; Fraser y Bramley 2004).

Los carotenoides disminuyen el riesgo de contraer enfermedades degenerativas como ciertos tipos de cáncer o enfermedades cardiovasculares. Esto se debe a la también combinación con la capacidad antioxidante de los carotenoides, por la que los radicales libres, principalmente el oxígeno singlete (Van der berg et al 2000; Melendez Martinez et al 2004).

Las propiedades físicas y químicas de los carotenoides están altamente influenciadas por otras moléculas dentro del microambiente, particularmente asociadas a proteínas y lípidos de membrana. A su vez los carotenoides pueden influir sobre las propiedades de las estructuras celulares. Las características químicas únicas de cada carotenoide como el tamaño, la forma, hidrofobicidad y polaridad determinan su funcionalidad en las células. Por tanto, la estructura de cada carotenoide determina en gran medida su biodisponibilidad, absorción, circulación, distribución a los tejidos y la capacidad de incorporarse en los componentes subcelulares y afectar a procesos moleculares precisos. La estructura característica de cada uno de los carotenoides puede ser de importancia crítica en el efecto de los mismos en el proceso de enfermedad y salud humana. Por ejemplo el licopeno, por su estructura acíclica, número elevado de dobles enlaces conjugados y extrema hidrofobicidad hace que presente una alta capacidad antioxidante y especialmente activo frente a determinadas especies reactivas de oxígeno (Clinton 1998).

El uso de carotenoides a nivel industrial ha ido creciendo, conforme se han ido describiendo y demostrando los beneficios derivados de su consumo. Se formulan en complejos vitamínicos, suplementos para la dieta, y cada vez se utiliza más como colorante en la industria agroalimentaria para productos cárnicos, huevos, peces, etc; ya que el consumidor exige cada vez más un producto libre de componentes artificiales. También se pueden añadir a otros productos para aumentar su valor como al aceite de oliva, o se incluyen en productos cosméticos como maquillaje y bronceadores.

1.4 Generalidades sobre la composición de y biosíntesis de carotenoides

Los carotenoides son isoprenoides que se sintetizan en los orgánulos celulares denominados plastos, en los cloroplastos en los tejidos fotosintéticos o en los cromoplastos en los tejidos coloreados y que derivan biosintéticamente del IPP (isopentenil pirofosfato) a través de la ruta MEP (metil-eritritol fosfato) (Rodríguez-Concepción y Boronat, 2002). De forma genérica, en la biosíntesis de carotenoides se puede diferenciar dos fases, la síntesis de carotenos y la que conduce a la formación de xantofilas. Esta ruta se bifurca en el licopeno, primero por degradación del fitoeno aparecen los carotenos hasta el licopeno, el cual debido a la ciclación de la molécula por oxidación produce las xantofilas. (figura 2). La primera etapa de la ruta es la formación de fitoeno por acción de la enzima fitoeno sintasa, que sufre dos desaturaciones sucesivas, en las que se forman fitoflueno y ζ -caroteno. Posteriormente, una nueva desaturación conlleva a la formación de licopeno, último caroteno lineal de la ruta con 15 insaturaciones y que proporciona la coloración roja característica de diferentes frutos, como el tomate, la sandía o los pomelos rojos. A partir del licopeno la ruta se bifurca, por un lado en la llamada β -, ϵ - que da lugar a α -caroteno y luteína, y es operativa en los cloroplastos de tejido fotosintético. Durante la maduración de los frutos y la transición de cloroplastos a cromoplastos, se activa la ruta β -, β - a partir del licopeno, que en primer lugar se produce la ciclación que origina β -caroteno y posteriormente hidroxilaciones y epoxidaciones que dan lugar a la zeaxantina, anteraxantina, violaxantina y neoxantina. En el caso de los frutos cítricos a partir del β -caroteno también se puede formar β -criptoxantina, y también se produce la fragmentación de determinadas xantofilas para generar apocarotenoides, como la β -citraurina, o 8'- β -apocarotenal, entre otros (Fraser y Bramley 2004; Rodrigo et al 2013).

Diferentes evidencias experimentales acumuladas a lo largo de los años, indican que la acumulación de carotenoides específicos en los determinados frutos está controlada transcripcionalmente, por un complejo programa de expresión génica, en el que no solamente se controla la biosíntesis de carotenoides sino también la degradación o catabolismo, y la capacidad de acumulación en estructuras celulares y subcelulares especializadas. Así, por ejemplo, en frutos verdes abunda la luteína, el β -caroteno, la violaxantina y la neoxantina. En frutos de color amarillo, predominan la luteína, la violaxantina, el fitoeno y proporciones menores de b-criptoxantina. Los frutos naranjas pueden contener β -caroteno, luteína, violaxantina, fitoeno y criptoxantina. Los frutos rojos son ricos en licopeno y suelen contener una mayor proporción de fitoeno, fitoflueno y β -caroteno.

En general, la biosíntesis de carotenoides es más activa en la piel de los frutos que en la pulpa, de ahí que este tejido tenga mayor concentración (Gross 1987). A continuación, en la Figura 2 se muestra la ruta de biosíntesis de los carotenoides junto con las enzimas responsables de los cambios.

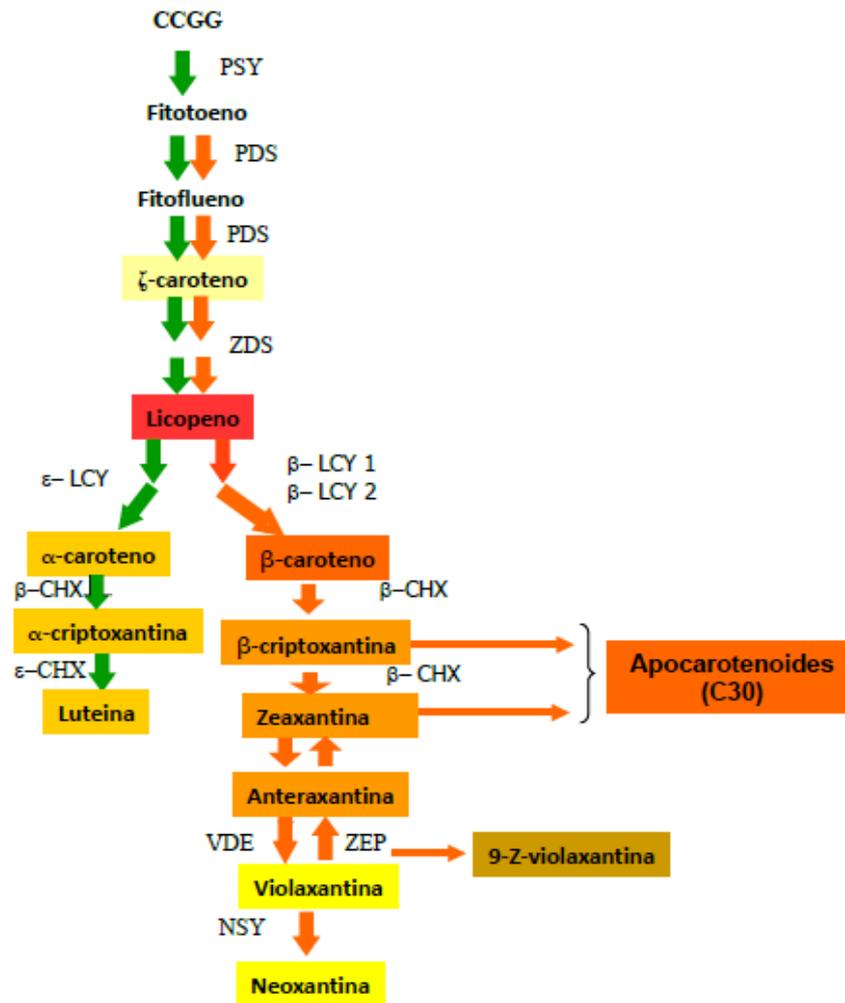


Figura 2. Esquema general de la ruta de biosíntesis de los carotenoides en plantas junto con las enzimas responsables de los cambios. GGPP(geranylgeranyl pirofosfato), PSY (fitoeno sintasa) PDS (fitoeno dasaturasa), ZDS (ζ-caroteno desaturasa), β-LCY (β-licopeno ciclasa), ε-LCY (ε- licopeno ciclasa), β-CHX(β-caroteno hidroxilasa), ε-CHX (ε-caroteno hidroxilasa), ZEP (zeaxantina epoxidasa), VDE (violaxantina de-epoxidasa), NSY (neoxantina sintasa).

1.5 Carotenoides en cítricos

1.5.1 Generalidades

Los cítricos cultivados pertenecen a la familia de la Rutaceas y al género *Citrus*. Es un género amplio que comprende un gran número de especies, unas cultivadas a nivel comercial y para la alimentación, y otras como ornamentales u otros fines. A este género también pertenecen los cítricos cultivados actualmente, cuyas especies ancestrales a partir de las que se han originado el resto de especies y variedades son el pomelo (*Citrus maxima*), la mandarina (*Citrus reticulata*) y el cidro (*Citrus medica*). Evidencias genéticas acumuladas durante los años y corroboradas recientemente por estrategias moleculares y genómicas, indican que el resto de especies cultivadas han sido el resultado de cruces naturales entre las especies ancestrales y sus descendientes a los largo de siglos. Desde la expansión masiva del cultivo de cítricos en los distintos continentes, las nuevas variedades proceden de cruces dirigidos entre especies de interés y, al mismo tiempo, de un largo proceso de domesticación y de selección de mutaciones naturales, en el que se han ido seleccionado variedades por sus características agronómicas particulares, tanto de producción, como de adaptación ambiental, de resistencia a estreses bióticos o abióticos, o por las características de calidad del fruto, entre otras (Wu et al., 2014; Carbonell-Caballero et al., 2015; Ibañez et al., 2015).

Los cítricos son el principal cultivo frutal del mundo, con una producción mundial estimada superior a 120 millones de toneladas en el año 2014. Los principales países productores mundiales son China, USA, Brasil, México, India y España (Faoestat, 2015). España es el sexto país productor de cítricos del mundo, con un tonelaje total en el año 2014 superior a 6 millones de Tm. En la campaña 2014-15, la producción de naranjas superó los 3,5 millones de Tm; 2,2 millones de Tm la de mandarinas, más de 818.000 Tm la de limones y alrededor de 50.000 Tm la de pomelos. Dentro del país, la producción de cítricos se concentra principalmente en la Comunidad Valenciana, que representa el 63% del total, seguida por Andalucía con el 26%, 8% en la región de Murcia y 3% en Cataluña (MAGRAMA). Una de las principales características de la producción de cítricos en España es que la mayor parte se dedica al consumo en fresco, con más del 80% de la producción total, y donde la mayor parte se destina a mercados externos, con un 66% del total (que en el caso de las mandarinas Clementinas representa el 76% y el 62% en

las naranjas). El porcentaje destinado al consumo interno y a la industrialización supone en ambos casos alrededor del 14%, y las pérdidas medias se sitúan entorno al 5% (GENERALITAT VALENCIANA GVA). Esta situación hace que España sea el primer exportador mundial de frutos cítricos para el consumo en fresco, contrariamente a lo que ocurre en dos de los principales países productores como USA o Brasil, donde la producción se destina mayoritariamente a la elaboración de zumo (Faoestat, 2015). Estas características de la producción de cítricos en España, y en la Comunidad Valenciana, hace que la apariencia y presentación externa sean unos de los principales atributos de calidad en la valoración de los frutos cítricos para el consumo en fresco. Así, aspectos como el color (tonalidad e intensidad, uniformidad, etc.) tamaño, ausencia de defectos y lesiones externas, etc. son determinantes en la comercialización y aceptación por los consumidores de los frutos cítricos.

1.5.1 Contenido y composición de carotenoides en los frutos cítricos

El color de la piel y de la pulpa en los frutos cítricos es parámetro importante de calidad , ya que supone la primera percepción que tienen los consumidores y, por ello, es decisiva en la comercialización y adquisición de los mismos . En la comercialización de los frutos para su consumo en fresco generalmente se relaciona el color de la corteza con la calidad interna, aunque es independiente del grado de madurez interna. En los frutos cítricos, la coloración varía desde el amarillo en limones o pomelos, al naranja en mandarinas y naranjas, y al rojo en algunas variedades de pomelos y pumelos. Los factores que determinan e influyen en el color en los frutos cítricos ha sido ampliamente estudiado durante década (Alquezar et al.2008 ;Rodrigo et al 2014). El color está intrínsecamente relacionada con el contenido y composición de carotenoides, cuya distribución varía en cantidad y calidad en función de especies y variedades, tanto durante el largo desarrollo y la maduración del fruto, como en diferentes tejidos dentro del mismo fruto.

La distribución de carotenoides en los cítricos es una de las más complejas y heterogéneas entre los frutos de las diferentes especies, y se han llegado a describir más de 110 carotenoides diferentes, aunque algunos de ellos pueden ser producto de isomerizaciones u otras transformaciones químicas, o artefactos producidos durante la extracción y manipulación en los laboratorios (Stewart y Wheaton 1973; Gross 1987;

Alquézar et al. 2008). El perfil de carotenoides suele ser característico de cada especie, desde perfiles simples con pocos carotenoides como la pulpa de frutos maduros de pumelo, hasta el perfil complejo de las mandarinas, en cuya pulpa se pueden encontrar más de 20 carotenoides distintos. (Gross, 1987). Los frutos cítricos presentan un mayor contenido de carotenoides en el flavedo (capa externa coloreada de la piel del fruto) que es aproximadamente entre 7 y 10 veces más que en la pulpa (Alquézar et al., 2008b), salvo en algunas excepciones como los frutos de pomelo y el pumelo de pulpa roja, en los que se pueden cuantificar un contenido similar de carotenoides en el flavedo y la pulpa (Xu et al., 2006; Alquézar et al., 2008).

La diversidad de colores que poseen los frutos cítricos es la consecuencia de la diferente composición y contenido en carotenoides. El ejemplo mejor estudiado a nivel bioquímico y molecular han sido las naranjas dulces (*Citrus sinensis*) (Kato et al. 2004; Rodrigo et al. 2004). El flavedo de estos frutos se mantiene verde durante el periodo de crecimiento y desarrollo del fruto, iniciando el cambio de color al alcanzar su tamaño final. En ese momento se produce una masiva degradación de clorofilas que es concomitantemente al inicio de la biosíntesis de carotenoides típicos de los cromoplastos (coloreados), alcanzando la máxima concentración de carotenoides en frutos totalmente maduros. En mandarinas tipo Satsuma (*Citrus unshiu*) y tipo Clementinas (*Citrus clementina*) este proceso es muy similar, aunque con diferencias cualitativas y cuantitativas (Kato et al., 2004; Rodrigo et al., 2013). En general, en el flavedo verde de los frutos cítricos (frutos inmaduros o verdes) predominan los carotenoides como la luteína y la *trans*-violaxantina y a medida que avanza el proceso de maduración la concentración de carotenoides tipo cloroplásticos disminuye y se produce una acumulación de β -, β - xantofilas siendo la 9-*cis*-violaxantina el carotenoide que mayor concentración alcanza en el flavedo de naranjas, o la β -criptoxantina en el flavedo de mandarinas. En la pulpa los cambios en el contenido y composición de carotenoides son totalmente independientes del flavedo y siguen un patrón diferente (Rodrigo et al., 2013b) También en pulpa de frutos inmaduros el contenido de carotenoides es prácticamente nulo y aumenta de forma progresiva a lo largo del desarrollo y maduración del fruto, acumulándose siempre los carotenoides del tipo cromoplastose, siendo en naranjas el 9-*cis*-violaxantina también el más abundante y en mandarinas la 9-*cis*-violaxantina y la β -, β -criptoxantina (Gross, 1987).

A nivel molecular se ha comprobado que durante la maduración del fruto de naranjas o mandarinas existe una clara inducción de la fitoeno sintasa (PSY), que parece ser uno de los factores limitantes de entrada de metabolitos a la ruta, y junto con el aumento de expresión de la β -caroteno hidroxilasa (β CHX) activan las síntesis de β,β -xantofilas. El re-direccionamiento de la ruta desde la rama β,ϵ a la β,β está controlado, en parte, por la inhibición de la expresión del gen ϵ -licopeno ciclasa (β LCY), que con la inducción del gen β -licopeno ciclasa (β LCY1) puede explicar el aumento masivo de xantofilas (β -criptoxantina en mandarinas y violaxantina en naranjas) durante la maduración (Kato et al., 2004; Rodrigo et al., 2004). Adicionalmente, se ha identificado un gen que codifica una nueva β -licopeno ciclasa, con expresión específica en tejido cromoplástico (β LCY2), y que se induce de forma masiva durante la maduración y la coloración (Alquézar et al., 2009).

1.5.2 Carotenoides en mandarina Clementina

La mandarina clementina es un fruto cítrico de carácter híbrido, identificada a finales del siglo XIX de forma espontánea en un huerto de Argelia (Ibáñez et al., 2015): Aunque el origen de la mandarina Clementina no es conocido con exactitud, las evidencias genómicas indican que puede tratarse de una hibridación natural entre el mandarino común (*Citrus deliciosa*) actuando como parental femenino y el naranjo dulce (*Citrus sinensis*) como parental masculino. A partir de la mandarina original se han derivado todas las variedades conocidas y cultivadas actualmente, y en el caso de la mandarina Clementina de Nules se trata de una mutación espontánea encontrada en Castellón de la Plana en 1953, como un mutante tardío de la Clementina Fina (Agustí, 2000). Existen diversos estudios previos en la composición y contenido de los carotenoides principales en mandarina clementina (Tabla 1). Los frutos de clementina presentan las tonalidades naranja-rojizas más intensas, que caracterizan esta variedad. Esta mayor coloración se debe mayoritariamente a la acumulación de β -criptoxantina, una xantofila de color naranja intenso presente tanto en flavedo como en pulpa de mandarinas, y a la de apocarotenoides C30 (β -citraurina y 8- β -apocarotenal) en la piel (Gross 1987 ; Kato et al 2004).

En general, en el flavedo verde de las clementinas (frutos inmaduros o verdes) predominan los carotenoides como la luteína y la *trans*-violaxantina y a medida que avanza el proceso de maduración la concentración de carotenoides tipo cloroplásticos disminuye y se produce una acumulación de β,β -xantofilas siendo la β,β -criptoxantina la más abundante en el flavedo de mandarinas. Conforme a la maduración del fruto, la piel de las Clementinas acumula también una importante cantidad de apocarotenoides C-30, en especial la β -citaurina, que puede llegar incluso a ser superior a la de β,β -criptoxantina. La acumulación de uno y otro parecen estar directamente relacionados, ya que se ha demostrado recientemente que la β,β -criptoxantina y/o zeaxantina son los precursores de la β,β -citaurina. Esta relación sugiere que la β -criptoxantina es un precursor de la β -citaurina. En la pulpa, los cambios en el contenido y composición de carotenoides son totalmente independientes a los del flavedo y siguen un patrón diferente (Rodrigo *et al.*, 2013b). A nivel cuantitativo, el contenido de violaxantina puede descender durante la maduración, pero aumenta el de β -criptoxantina y apocarotenoides C-30, y al final del proceso el contenido en violaxantina sigue siendo importante, con cantidades que pueden llegar a los 50 $\mu\text{g/g}$

1.5.3 Carotenoides en pumelo

El pumelo (*Citrus maxima*) es una de las especies ancestrales de cítricos, cuyo origen se sitúa en el sudeste asiático, y está en el origen de otras especies cultivadas actuales, como el pomelo (*Citrus paradisi*), y naranjo amargo (*Citrus aurantium*) y naranjo dulce (*Citrus sinensis*). Sus frutos son los más grandes que existen en los cítricos, normalmente con numerosas semillas, gruesa corteza con un amplio albedo. La piel de los pumelos suele ser de color amarillo-dorado y la pulpa amarilla pálida, aunque existen pumelos con pulpa de color rosado, como el pumelo Pink, por acumulación de licopeno. Son ampliamente cultivados en China, Vietnam, Tailandia y otros países asiáticos, donde tienen un alto valor comercial (Liu et al 2014).

Son numerosos los estudios en el contenido y composición de carotenoides en pumelo (Tabla 1), pero ninguno referente al pumelo pink. El contenido de carotenoides en el flavedo de las variedades de pumelo amarillas varía entre 5 y 15 $\mu\text{g/g}$ PF, acumulando sobre todo carotenoides incoloros, lo que explica su poca coloración. En el

caso de variedades de pulpa roja el contenido de licopeno les proporciona color rosado o rojizo (Xu et al 2006). Un estudio de los cambios cuantitativos y cualitativos de carotenoides en el pumelo Yuhuan y el Pumelo Red reveló la existencia de hasta 12 carotenoides diferentes. En la pulpa del pumelo Yuhan, los carotenoides son prácticamente inexistentes, mientras que en el flavedo la concentración fue cerca de 250 superior, siendo los más abundantes el fitoeno, el fitoflueno y la luteína. El mutante Red, sin embargo, tiene la capacidad de acumular mayores concentraciones de carotenoides en la pulpa, principalmente licopeno, llegando a niveles aproximados de 16 $\mu\text{g/g}$, y también de β -caroteno (Xu et al ., 2006 JAFc)

Tabla 1 . Contenido y principales carotenoides en mandarina clementina y pumelo (Alquézar et al 2008).

Cultivo (Especie) Variedad		$\mu\text{g/g}$ PF	Principales carotenoides	Referencia
<i>Mandarina (C. reticulata)</i>				
	Piel	74.60	32% β -citaurina; 16% β -citaurineno	(Gross 1987)
Clementina	Pulpa	24.96 \pm 1.16	36% β -criptoxantina; 35% violaxantina	(Fanciullino et al. 2006)
<i>Pumelo (C. grandis)</i>				
	Piel	19.30	32% luteína; 22% violaxantina	(Gross 1987)
Chandler	Pulpa	2.16-13.20	1-37% violaxantina; 23-90% licopeno	(Gross 1987; Fanciullino et al. 2006)
Chuzhou	Piel	4.80	31% fitoeno; 25% fitoflueno	(Xu et al. 2006)
Red	Pulpa	5.28	51% licopeno; 20% β -caroteno	(Xu et al. 2006)
Early Red	Piel		31% fitoeno; 25% fitoflueno	(Xu et al. 2006)
	Piel	5.00	67% fitoflueno	(Gross y Timberg 1983)
Goliath	Pulpa	0.4	23% luteína; 19% fitoflueno; 12% β -caroteno	(Gross y Timberg 1983)
Deep red	Pulpa	2.69 \pm 0.09	57% licopeno; 35% β -caroteno	(Fanciullino et al. 2006)
Seedless	Pulpa	0.91 \pm 0.18	36% β -caroteno; 32% licopeno	(Fanciullino et al. 2006)
Yuhuan	Piel	15.50	55% fitoeno; 13% fitoflueno	(Xu et al. 2006)
	Pulpa	0.03	35% fitoeno; 35% luteína	(Xu et al. 2006)

2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

2.1 Objetivos

El objetivo principal de este estudio es la caracterización del contenido y la composición de carotenoides en la pulpa y el flavedo de cinco frutos de cinco nuevos híbridos provenientes de un cruce interespecífico entre Pumelo Pink y mandarina Clementina (*Citrus clementina* x *Citrus maxima*) (trault et al., 2012) denominados Nulpink, de Clementina de Nules y del pumelo pink. Esta población presenta una diversidad de color muy diversa e interesante, con el color de los frutos va desde naranja intenso similar a las mandarinas a amarillo-pálido como los pumelos, lo que sugiere una diferenciación en la acumulación de carotenoides. De esta población se han seleccionado 5 híbridos, en base a su color externo e interno, para el estudio detallado de la carotenogénesis (Figura 4).

Una de las características que justifica este estudio es la gran diferencia en el contenido de β -criptoxantina entre los dos parentales, muy elevado en los frutos de Clementina y nulo en los de pumelo, cuyo carácter parece haberse segregado en la población de híbridos. Dado los importantes efectos beneficiosos de esta xantofila para la salud humana y que los mecanismos que controlan su acumulación en los frutos cítricos no son bien conocidos, el estudio y la caracterización del perfil de carotenoides en estos híbridos y la comparación respecto a sus parentales pueden proporcionar información relevante sobre las bases bioquímicas y moleculares implicadas en la síntesis de este carotenoide, lo que ha constituye el objetivo del presente trabajo fin de grado

2.2 Plan de trabajo

Para la consecución de estos objetivos se ha desarrollado las siguientes actividades:

- Selección de los frutos más adecuados en base a las diferencias de color de la piel y de la pulpa, abarcando desde pigmentación más extrema tanto naranja como amarilla y tonalidades intermedias, a partir de la de la población de segregantes disponibles en el Banco de Germoplasma y la colección de variedades del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA).
- Determinación de los parámetros de color en la piel y la pulpa.
- Extracción y cuantificación carotenoides totales en la piel y pulpa de los frutos de las cinco nuevos híbridos y sus respectivos parentales.
- Identificación y cuantificación mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a detector de fotodiodos (HPLC-PDA), de los carotenoides individuales en la piel y pulpa de los frutos de los cinco nuevos híbridos y en sus respectivos parentales.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Para realizar el trabajo se han utilizado muestras de frutos maduros de las siguientes especies y variedades:

Híbridos Nulpink: Como se ha mencionado en el apartado anterior, en el programa de mejora genética del IVIA se realizaron cruces entre la mandarina Clementina de Nules (*Citrus clementina*) como parental femenino y pumelo Pink (*Citrus maxima*) como masculino. De la población de 134 segregantes híbridos que se regeneraron (Ollitrault et al. 2012), se seleccionaron frutos de 5 híbridos por la diversidad de color del flavedo, desde amarillo a naranja intenso, pasando por diferentes tonalidades intermedias (Fig. 4). Los híbridos seleccionados fueron: Nulpink 40, 69, 77, 112 y 134. Las características morfológicas, de tamaño y color de los híbridos se describen en el apartado siguiente 4.1.

Pumelo Pink (*Citrus maxima*) : Se recolectaron frutos maduros del parental masculino, crecidos en las parcelas experimentales del IVIA.

Mandarina Clementina (*citrus clementina*) : Se utilizaron frutos maduros de esta mandarina, también conocida como Clemenules, procedentes como en el caso anterior de las parcelas experimentales del IVIA.

Se recolectaron frutos maduros el 19 de Febrero del 2015, en el caso de los híbridos de árboles creciendo bajo malla. En el caso del pumelo y de la mandarina se recolectaron frutos maduros de árboles adultos cultivados en la parcela del banco de Germoplasma del IVIA. En todos los casos se recolectaron frutos al azar, alrededor de todo el árbol. Dado que los árboles de algunos híbridos tenían un reducido número de frutos, por tratarse de injertos jóvenes y los frutos ser de gran tamaño, se recolectaron entre 6-10 frutos, homogéneos en tamaño y coloración. Para los pumelos y mandarinas se recolectaron 30 frutos de cada variedad, similar en tamaño y color, y exentos de defectos y lesiones. Los frutos se transportaron al laboratorio, donde se determinó el color externo e interno, y posteriormente se separó el flavedo y la pulpa con ayuda de un bisturí. Ambos tejidos se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se homogeneizaron a un polvo fino con la ayuda de un molinillo en congelación. Finalmente las muestras se almacenaron a -80°C hasta el momento del análisis.

3.2 Estimación de índice de color

Para la determinación del color externo e interno de los frutos se utilizó un colorímetro Minolta CR-330. Se determinaron las coordenadas de color Hunter L , a y b en tres localizaciones distintas alrededor del eje ecuatorial de los frutos en el caso del flavedo y para la pulpa se realizaron tres medidas en cada una de las dos secciones en las que se dividió cada fruto. Se utilizaron al menos 6 frutos para cada variedad. La coordenada Hunter a determina la tonalidades de color desde el verde (valor negativo) hasta rojo (positivo), mientras que la b miden las variaciones en el color desde el azul (negativo) hasta el amarillo (positivo). Los valores de color se expresan como el cociente a/b , que es una de las formas más tradicionales y reconocidas internacionalmente para

expresar el color de los frutos cítricos (Rodrigo et al., 2003). Cuando esta relación es negativa refleja color verde, y conforme aumenta el valor indica cambios hacia colores amarillos y anaranjados, así para frutos en el momento del cambio de color la relación a/b es alrededor de 0 y positiva para frutos de color naranja (Stewart y Wheaton, 1972). Para la determinación del color de los frutos en mandarina Clemenules y pomelo Pink se utilizaron 30 frutos de cada especie. Dado el menor número de frutos disponibles en el caso de los híbridas Nulpink, se utilizaron entre 6-10 frutos para cada híbrido.

3.3 Extracción y cuantificación de carotenoides totales

La extracción de carotenoides se llevó a cabo a partir de 0,5 g de flavedo y 1,5 g de pulpa, siguiendo el método descrito por Rodrigo et al (2003; 2004) con las modificaciones que se detallan a continuación.

Detalles del proceso:

El material vegetal, previamente triturado y congelado, se introdujo en tubos de centrifuga tipo Sarsted de 15 ml y se mantuvieron en hielo hasta la adición de 3 ml de mezcla de extracción (MeOH:Acetona:Diclorometano, 25:25:50, v/v/v) (pureza HPLC, Scharlau) y 2 ml de solución Tris- HCl (50 Mm, pH 7,5)NaCl 1 M. A continuación se pasó la mezcla por un vórtex para homogeneizarla y se sonicó en un baño de ultrasonidos 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación se centrifugó a 4°C durante otros 5 minutos a 4000 rpm y se recuperó la fase orgánica en un matraz de fondo redondo . Se volvió a reextraer el extracto acuoso añadiendo solo 2,5 ml de DCM (diclorometano) y se repitió el proceso hasta que la fase orgánica fue incolora. La fase orgánica recuperada en el matraz de balón se evaporó completamente a 40 °C en un evaporador rotatorio (Buchi R-210). Posteriormente, el extracto seco se resuspendió en 1 ml de diclorometano y se saponificó mediante la adición de 5 ml de hidróxido potásico al 60 %. Se adicionó corriente de nitrógeno para desplazar el aire de la muestra, ya que los carotenoides son susceptibles de oxidarse en presencia de oxígeno. La reacción tuvo lugar durante aproximadamente 16 h a temperatura ambiente. Tras la saponificación se recuperaron los carotenoides libres en un tubo de 15 ml mediante lavados con diclorometano. Después de este proceso se añadieron 3 ml de diclorometano y 3 ml de solución salina al 5 % con tampón Tris-HCl (50 mM, pH 7,5), se agitó la muestra con

vortex durante unos segundos y se centrifugó a 4000 rpm a 4 °C para separar las fases acuosa y la orgánica. Se descartó la fase acuosa, y este proceso se repitió hasta que el pH la fase acuosa descartada fuese próximo a la neutralidad (entre 8 y 7,5).

Para medir los carotenoides totales en espectrofotómetro, se llevó el extracto a sequedad bajo corriente de nitrógeno y se resuspendió en un volumen conocido de solución de éter de petróleo (40-60 °C): éter etílico, 9:1, v/v (aproximadamente 4 ml) . Se determinó la concentración de carotenoides del extracto midiendo la absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro Multiskan Spectrum, (Thermo Electron Corporation). La concentración de carotenoides se calculó aplicando la fórmula de Davies (1976) y expresando el resultado como µg de equivalentes de β-caroteno por gramo de peso fresco de tejido.

$$\text{g de carotenoides (equivalentes de } \beta\text{-caroteno)} = (E \cdot y) / (E_{1\text{cm}}^{1\%} \cdot 100)$$

(Fórmula de Davies)

E, absorbancia a 450 nm; y, mL de disolución; $E_{1\text{cm}}^{1\%}$, 2500 (coeficiente de extinción del β-caroteno de una solución al 1%, medida en una cubeta con 1 cm de paso de luz).

Los extractos se llevaron a sequedad mediante corriente de nitrógeno y se almacenaron a -20 °C, en oscuridad y atmósfera de nitrógeno en un vial de 1,5 ml hasta el momento de su análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Todas las muestras fueron extraídas al menos por duplicado y todo el proceso se ha realizado en ausencia de luz directa para evitar la degradación de carotenoides.

3.4 Identificación y cuantificación de carotenoides individuales mediante HPLC

La identificación y cuantificación de los carotenoides individuales en los extractos se realizó por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de fotodiodos (HPLC-PDA). Los análisis se llevan a cabo en un sistema de cromatografía líquida Waters™, equipada con una bomba 600E y un detector de fotodiodos modelo 2998, utilizando una precolumna C30 (20 mm x 4.0 mm x 5 µm) y una columna C30 (250

mm x 4.6 mm x 5 μ m) (YMC Europa GMBH). Los datos se adquirieron y procesaron con el paquete informático Empower Waters. La separación de los carotenoides se realizó utilizando un gradiente ternario de elución compuesto por metanol (MeOH, Scharlau), agua bidestilada filtrada y metil t-butil éter (MTBE, Scharlau) en combinaciones detalladas en la Tabla 2.

Tabla 2: Gradiente de elución utilizado para la separación de carotenoides mediante HPLC

Tiempo (min)	0	12	20	30	50	70	75
MTBE	5	5	14	25	50	75	5
H₂O	5	0	0	0	0	0	5
MeOH	90	95	86	75	50	25	90

El detector de fotodiodos se programó para registrar las absorbancias cada 1 nm en el intervalo 250-540 nm durante toda la elución. Para cada muestra se obtuvo un cromatograma en el que se representa el tiempo frente a la absorbancia máxima en el rango de longitudes de onda registradas. Las muestras a analizar se prepararon mediante disolución del extracto seco de carotenoides obtenido previamente en un volumen variable de cloroformo:metanol:acetona (pureza HPLC) en una proporción 3:2:1. El volumen de muestra inyectado fue de 20 μ L y el flujo de inyección en la columna fue de 1 mL/min a temperatura ambiente. Para cada muestra se obtuvo un cromatograma en el que se representó el tiempo frente a la absorbancia máxima en el rango de longitudes de onda registradas (cromatograma MaxPlot). La identificación de carotenoides se hizo por comparación de el tiempo de retención de los estándares disponibles con el espectro de cada uno de ellos o con los datos obtenidos en estudios similares descritos en la literatura (Rouseff et al., 1996; Meléndez-Martínez et al., 2003; Rodrigo et al., 2004) . De cada una de las muestras se obtuvo un cromatograma 'Maxplot' (Anexo) que representa el tiempo frente a la absorbancia máxima en el rango de longitudes de onda registradas. Los picos cromatográficos correspondientes a cada carotenoide se integraron en su longitud de onda máxima y el contenido de cada

carotenoide se interpoló el área de los picos con diferentes curvas de calibrado. Se disponían de curvas de calibrado de β -apo-8'-carotenal (Hoffman-LaRoche) para cuantificar apocarotenoides C30, el β -caroteno (Sigma) para α - y β -caroteno, la β -cryptoxantina (Extrasynthese) para β -cryptoxantina, la luteína (Sigma) para luteína, y violaxantina, el licopeno (Sigma) para licopeno, y la zeaxantina (Extrasynthese) para zeaxantina y anteraxantina. Los estándares de fitoeno, fitoflueno y ζ -caroteno habían sido purificados en el laboratorio previamente a partir de extractos de frutos (Tabla 3) (Rodrigo et al., 2003).

Tabla 3: Límites de detección y ecuaciones de las rectas obtenidas para la cuantificación de distintos carotenoides.

Carotenoide	Límite de detección (ng)	Recta de calibrado
Luteína	7	$\mu\text{g}=8.24810 \cdot 10^{-8}$
β-Apo-8'carotenal	32	$\mu\text{g}=3.24695 \cdot 10^{-8}$
Zeaxantina	10	$\mu\text{g}=1.13798 \cdot 10^{-7}$
Fitoeno	20	$\mu\text{g}=3.73158 \cdot 10^{-7}$
Fitoflueno	8	$\mu\text{g}=1.79116 \cdot 10^{-7}$
β-Criptoxantina	11	$\mu\text{g}=1.21613 \cdot 10^{-7}$
β-Caroteno	9	$\mu\text{g}=8.34097 \cdot 10^{-8}$
Licopeno	5	$\mu\text{g}=8.99645 \cdot 10^{-8}$

3.5 Programas informáticos utilizados

Durante el desarrollo de este trabajo se utilizaron los siguientes programas informáticos:

- Empower (WatersTM): Programa para la adquisición y tratamiento de datos del sistema cromatográfico HPLC-PDA
- Microsoft Excel 2010: elaboración de gráficos y tratamiento estadístico
- Microsoft Word 2010: Procesamiento de texto
- Multiskan Spectrum: programa para la adquisición y el tratamiento de datos del espectrofotómetro.
- Microsoft Power Point : realización de figuras e imágenes.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Selección de frutos de los híbridos 'Nulpink'

Color de la piel y de la pulpa en frutos maduros de cinco híbridos 'Nulpink' y sus parentales.

Como se ha indicado en las secciones anteriores, se seleccionaron frutos de 5 híbridos, denominados "Nulpink", de la población 140 segregantes del cruce interespecífico entre la mandarina Clementina de Nules (CMN, parental femenino) y al pomelo Pink (PP, parental masculino) (Ollitrault et al., 2012). Esta población de híbridos se propagaron y desarrollaron primero en invernadero y posteriormente se injertaron sobre el patrón Citrange carrizo (*Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata*) en parcelas bajo malla, ambas instalaciones pertenecientes y localizadas en el IVIA (Ollitrault et al., 2012) (Fig. 3).



Figura 3. Morfología y color de los frutos maduros de 'Nulpink' 69 (derecha) y 112 (izquierda) cultivado en los correspondientes árboles localizados en una parcela bajo malla del IVIA.

La observación visual del fenotipo de los frutos de la amplia colección propagada reveló diferencias en la coloración, desde color amarillo, similar al del parental masculino, hasta piel de color naranja característica de los frutos de mandarina (como los de Clementina de Nules), pasando por una amplia gradación de tonalidades entre estos dos colores extremos. Para la realización de este trabajo se seleccionaron frutos maduros de 5 híbridos, denominados "Nulpink" 40, 69, 77, 112, 134 atendiendo

principalmente a la gradación de coloración del flavedo y al hecho de que en las observaciones de campo se había comprobado que el color externo se correspondía en la mayoría de casos con la tonalidad de la pulpa (Figs.4a y 4b).



Figura 4. Aspecto y color externo (a) e interno (b) de frutos maduros de los híbridos 'Nulpink' 112, 13, 77, 69 y 40. Los frutos se han organizado en las dos fotos en función de la gradación de color de la piel, desde amarillo a naranja.

Los frutos de los cinco híbridos seleccionados tenían una morfología y tamaño similares entre sí, ligeramente achatados por los extremos del cáliz y estilar (diámetro longitudinal comprendido entre 8-12 cm) y un diámetro ecuatorial aproximadamente entre 14-18 cm, y sin otras características morfológicas apreciables que pudieran indicar otra fuente de variabilidad. La morfología y el color externo e interno de los frutos parentales se muestran en la Fig. 5, donde se puede observar el menor tamaño y la coloración naranja intensa de los frutos de la mandarina Clemenules, frente al gran tamaño (en ocasiones puede alcanzar hasta 20-25 cm de diámetro ecuatorial) y color amarillo del flavedo de los frutos del pumelo Pink. La pulpa de la mandarina presentaba igualmente una coloración naranja intensa (Fig. 5), mientras que en los frutos de pumelo es ligeramente amarilla con tonalidades rosadas localizadas principalmente en las zonas de las membranas intercarpelares (Fig. 5). En la Fig. 6 se muestra una foto comparativa del tamaño de los frutos maduros de los híbridos Nulpink 69 y 112 frente a un fruto representativo de la mandarina Clementina de Nules, donde se aprecia que el tamaño de los dos híbridos es similar, y muy superior al del parental Clementina, mientras que el color de la piel es prácticamente igual entre Nulpink 69 y la mandarina. Dado que los frutos de los híbridos de Nulpink se cultivaron en la misma experimental del IVIA y estuvieron, por tanto, sometidos a las mismas condiciones ambientales, nutricionales y de cultivo, se puede descartar el efecto de otros factores exógenos en las diferencias fenotípicas del color.



Figura 5. Morfología y color externo e interno de frutos maduros de la mandarina Clementina de Nules (derecha) y del pumelo Pink (izquierda), que se utilizaron como parentales en el cruce interespecífico que dio origen a los frutos de los híbridos ‘Nulpink’ utilizados en este estudio.



Figura 6. Comparación del tamaño de los frutos maduros de los híbridos ‘Nulpink’ 69 (izquierda) y 112 (derecha) respecto a un fruto maduro de la mandarina Clementina de Nules recolectados en la misma fecha (febrero) de las parcelas experimentales del IVIA.

4.2 Color de la piel y de la pulpa en frutos maduros de cinco híbridos 'Nulpink' y sus parentales

La coloración de la piel y la pulpa en los frutos maduros de los 5 híbridos y en sus parentales, se ha representado como la relación entre las coordenadas Hunter a/b , donde valores positivos tienden hacia el naranja-rojizo, mientras que los negativos corresponden a color verde, y los valores próximos a 0 a color amarillo. En la Fig. 7a se representan los valores a/b del flavedo de los frutos de los cinco híbridos de Nulpink y de frutos maduros de los dos parentales. Los valores negativos, correspondientes a frutos de piel amarilla correspondieron en primer lugar al pumelo Pink (PP), seguido de Nulpink 112. El híbrido 134 presentó valores ligeramente positivos que reflejan una ligera tonalidad anaranjada, mientras que la piel del resto de híbridos mostraron valores progresivamente más positivos, hasta alcanzar en el caso de Nulpink 40 valores de a/b ligeramente superiores a 0,6 (Fig. 7a). Como era de prever por el intenso color de la piel en la mandarina Clementina de Nules (CLM), el flavedo presentó una relación a/b alrededor de 0,8. Por lo tanto, estos datos indican una creciente gradación en la coloración de la piel, desde amarillo a naranja, en el orden indicado en la Figura 4a, y que se ha mantenido en la presentación del resto de resultados para una mejor comparación de los mismos.

En el caso del color de la pulpa, el PP presentó igualmente los valores más negativos, seguido de los híbridos 112, 134 y 77, mientras que en el 69 se alteró este orden, con una relación a/b cercana a 0, en consonancia con el color más intenso de su pulpa (Fig. 3 b). El híbrido 40 también tenía valores negativos de color de pulpa y solamente la pulpa de los frutos de CLN presentó valores positivos, pero de menor magnitud que los de la piel (Fig. 7b). Estos resultados indican que el híbrido Nulpink 69 manifiesta una anomalía o descoordinación entre el color de la piel y de la pulpa respecto al resto de híbridos, ya que mientras en el color de la piel existe en buena progresión en el conjunto de los híbridos, la pulpa tiene valores superiores en el orden de coloración de los cinco híbridos seleccionados. Al mismo tiempo, estos datos

también parecen indicar que se ha podido heredar o introgresar progresivamente las características cromáticas del flavedo de la mandarina, especialmente en los híbridos Nulpink 40 y 69, mientras que en la pulpa esta relación parece estar invertida. El caso del híbrido Nulpink 112 parece ser el más acusado en el que se han mantenido las características de color del PP, con escasa o muy poca influencia de la mandarina.

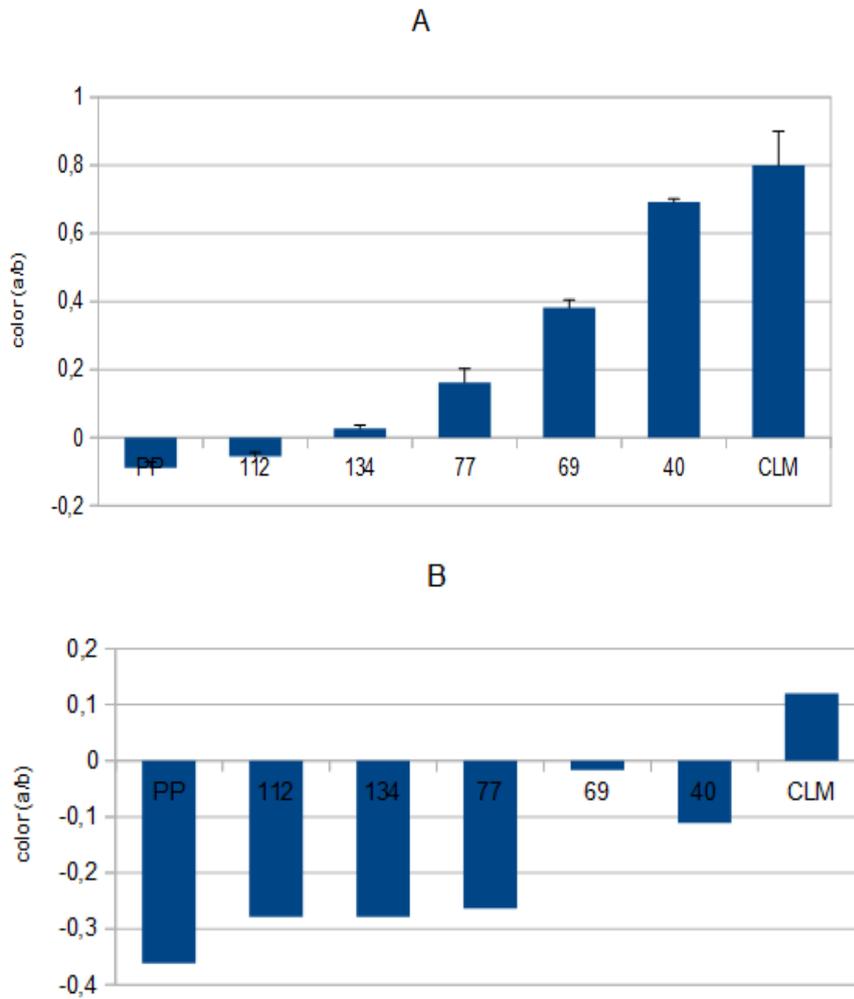


Fig. 7. Color (Hunter *a/b*) de la piel (A) y de la pulpa (B) de frutos maduros del Pumelo Pink (PP), mandarina Clementina de Nules (CLM) y de cinco híbridos Nulpink. Los valores representan la media \pm DE, de 30 lecturas para los frutos de pomelo y mandarina, y al menos 10 para los frutos 'Nulpink'

4.3 Contenido en carotenoides totales en la piel y de la pulpa de frutos maduros de cinco híbridos 'Nulpink' y sus parentales

La cuantificación de los carotenoides totales en el flavedo y la pulpa de los híbridos Nulpink y sus respectivos parentales se realizó mediante la suma de los distintos carotenoides individuales identificados y cuantificados por HPLC-PDA. En numerosos estudios, la cuantificación de los carotenoides totales en extractos vegetales se realiza espectrofotométricamente determinando la absorbancia a 450 nm, y se refiere como equivalentes de β -caroteno, ya que es el principal carotenoide que absorbe en esta longitud de onda (ver fórmula en apartado correspondiente de Material y Métodos). Sin embargo, el análisis por HPLC-PDA de los extractos de carotenoides de los frutos de Nulpink y del parental PP reveló la presencia de cantidades importantes de carotenoides incoloros, como el fitoeno, que no absorben a 450 nm, por lo que la determinación de los carotenoides totales utilizando dicha fórmula conllevaría a una infraestimación de la concentración de carotenoides. Por ello, se decidió presentar los resultados de carotenoides totales como la suma de los identificados y cuantificados por HPLC-PDA, ya que reflejan con exactitud la concentración real de carotenoides en los tejidos de los frutos analizados.

El mayor contenido en carotenoides totales en el flavedo se detectó en los extractos de frutos del híbrido 69 y el pomelo Pink, con valores próximos a 120 $\mu\text{g/g}$ PF (peso fresco) (Fig. 8 a), a pesar de las notables diferencias en la coloración de la piel (Fig. 4 a). La concentración de carotenoides se redujo sensiblemente en el resto de híbridos y en la mandarina Clementina. Así, los valores más bajos, comprendidos entre 20-25 $\mu\text{g/g}$ PF, se contabilizaron en los híbridos 112 y 134, seguidos de Nulpink 40 y 77, con contenidos medios cerca del doble (alrededor de 50 $\mu\text{g/g}$ PF) que los anteriores. En el flavedo de la mandarina Clementina la concentración de carotenoides totales fue muy similar a la de los híbridos 77 y 40, a pesar de las notables diferencias en la tonalidad anaranjada de la piel entre las mismas (Fig. 8 a).

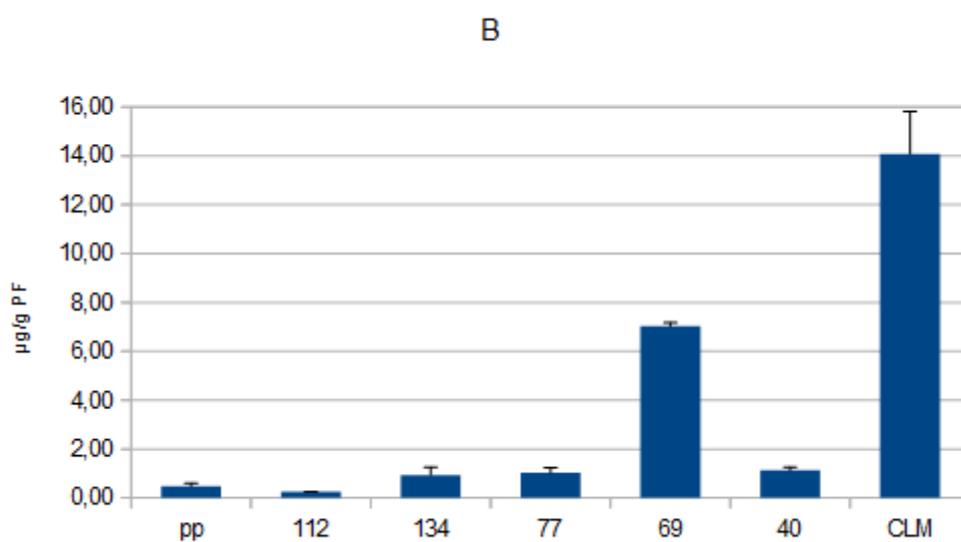
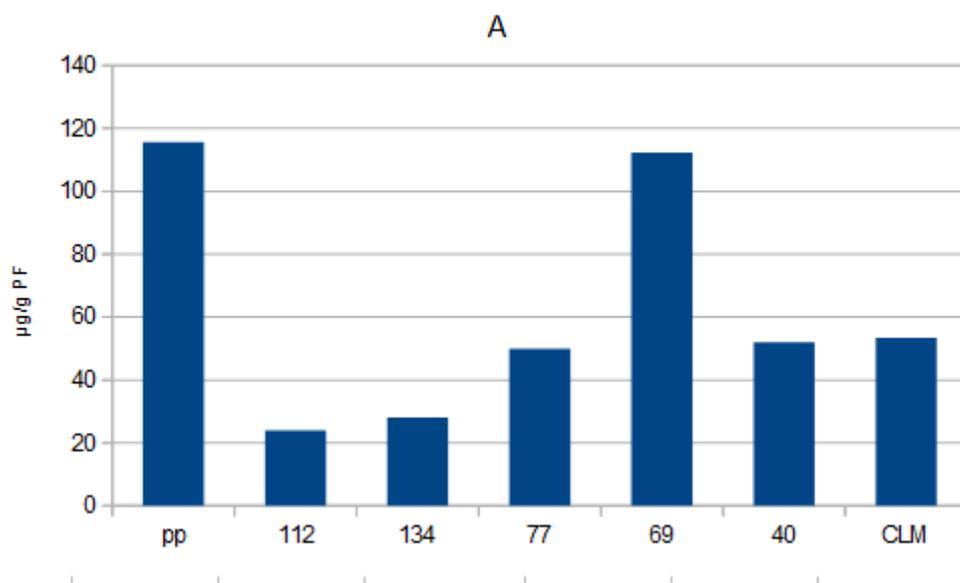


Figura 8 . Contenido en carotenoides totales en la piel (A) y la pulpa (B) de frutos maduros del Pomelo Pink (PP), mandarina Clementina de Nules (CLM) y de cinco híbridos Nulpink.

En pulpa, las concentraciones de carotenoides totales fueron muy inferiores a las de flavedo y las diferencias entre variedades no se correspondieron con las encontradas en el flavedo. La pulpa de la mandarina Clemenules fue la que contenía niveles superiores de carotenoides (próximos a 14 µg/g PF), seguida de la del híbrido Nulpink 69 (8 µg/g PF) (Fig. 8 b). La pulpa del resto de variedades analizadas presentó una baja concentración de carotenoides totales, con niveles comprendidos entre 2 µg/g PF en Nulpink 40 y 1 µg/g PF en los híbridos 77 y 134, y menos de 0,5 µg/g PF en el híbrido más amarillo Nulpink 112 (Fig. 8 b).

4.4 Identificación y cuantificación de carotenoides en la piel y de la pulpa de frutos maduros de cinco híbridos 'Nulpink' y sus parentales

Mediante HPLC-PDA se identificaron los principales carotenoides en los extractos de flavedo y de pulpa de los frutos maduros de los cinco híbridos Nulpink, así como en los dos parentales Clemenules y pumelo Pink. Como cabía esperar por la distinta coloración de la piel y de la pulpa, el perfil de carotenoides y las cantidades relativas de cada uno de ellos fueron diferentes entre los cinco híbridos y en los dos tejidos de un mismo híbrido. En las Tablas 4 y 5 se muestran las características espectrales, así como su presencia, de los distintos carotenoides identificados en el flavedo y la pulpa, respectivamente, en los distintos genotipos analizados. Los carotenoides identificados representados en las tablas 4 (flavedo) y 5 (pulpa) son similares, exceptuando algunos que son característicos de cada tejido. Los apocarotenoides C30 β-citruarina y 8-β-apocarotenal están presentes solo en la piel de los frutos algunos de los frutos. Estos son en gran medida responsables de color naranja de los híbridos 'Nulpink' 77, 69, 40 y mandarina clementina. En la pulpa del pumelo pink hay presencia de licopeno, la presencia del cual se manifiesta en forma de betas de color rojizo y es en este estudio exclusiva de la pulpa de este.

Tabla 4. Identificación de carotenoides y características espectrales de estos en la piel de frutos maduros de cinco híbridos ‘Nulpink’ y sus parentales Pumelo Pink y mandarina Clementina de Nules.

COMPUESTO	CAROTENOIDE	ESPECTRO	CLM	40	69	77	112	134	PP
1	s-429-457	s-429-454	x	x	x	x	x	x	
2	s-412-433,8-s	s-412-433,8-s		x		x			
3	apo 440	apo 441	x	x					
4	T-violaxantina	414-442-472	x	x	x	x	x	x	x
5	397,6-420,5-447,2	397,6-420,5-447,3	x	x	x	x		x	
6	β-Citraurina	Apo-456	x		x	x			
7	9-Cis-violaxantina	Cis(326)-416-440-465	x	x	x	x	x	x	x
8	s-417-447	s-417-447	x	x	x	x		x	
9	Luteina	421-445-474	x	x	x	x			
10	ζ-caroteno	437-462-494	x		x	x			x
11	neoxantina	412-434-464			x				
12	zeaxantina	428-450-478	x	x	x				
13	8-β-apocarotenal		x	x		x		x	
14	Anteraxantina	422-444-472	x	x	x	x	x	x	
15	s-446-473	s-446-472			x				
16	Fitoeno	276-286-297	x	x	x	x	x	x	x
17	Fitoflueno	331-348-367	x	x	x	x	x	x	x
18	β-criptoxantina	428-450-478	x	x	x	x		x	
19	α-caroteno	422-445-473		x					
20	β-caroteno	425-450-477		x					

Tabla 5. Identificación de carotenoides y características espectrales de estos en la pulpa de frutos maduros de cinco híbridos ‘Nulpink’ y sus parentales Pumelo Pink y mandarina Clementina de Nules.

COMPUESTO	CAROTENOIDE	ESPECTRO	CLM	40	69	77	112	134	PP
1	400-421-448	400-421-447	x	x	x	x		x	
2	Apo-452	Apo-451				x			
3	s-411-435	s-411-434		x	x				
4	s-401-425	s-401-424		x	x	x		x	
5	s-429-458	s-429-457	x		x		x		
6	T-violaxantina	414-442-472	x			x			x
7	Neoxantina	414-442-471	x						
8	s-420-442	s-420-441		x	x	x		x	
9	9-cis-violaxantina	Cis(326)-416-440-465	x	x	x	x	x	x	x
10	Mutatoxantina			x	x	x	x	x	
11	s-417-443	s-417-442	x	x					
12	apo447	apo448	x						
13	Luteina	421-445-474	x						x
14	Zeaxantina	428-450-478	x	x	x	x	x	x	x
15	Anteraxantina	422-444-472	x	x	x	x	x	x	x
16	s-444-472	s-444-471	x		x			x	x
17	fitoeno	276-286-297	x	x	x	x	x	x	x
18	fitoflueno	331-348-367	x	x	x	x	x		
19	β-criptoxantina	428-450-478	x	x	x	x	x	x	
20	450-s	451-s	x					x	
21	α-caroteno	422-445-473			x				
22	ζ-caroteno	437-462-494	x	x	x	x			
23	β-caroteno	425-450-477			x				x
24	Licopeno	444-470-502							x

En flavedo, los carotenoides comunes a todos los híbridos y sus parentales fueron *trans*-violaxantina, *9-cis*-violaxantina y los carotenoides lineales fitoeno y fitoflueno. La cuantificación de los distintos carotenoides en el flavedo reveló importantes y significativas diferencias entre los cinco híbridos y sus parentales. Así, el fitoeno fue el carotenoide mayoritario en el parental masculino, con concentraciones superiores a 100 µg/g PF, seguido de cantidades menores de fitoflueno (Fig. 9). En el flavedo del parental femenino, Clemenules, el carotenoide mayoritario fue la violaxantina, con concentraciones próximas a 30 µg/g PF, destacando igualmente la presencia de elevadas concentraciones de apocarotenoides C30 (11 µg/g PF). Los apocarotenoides C30 identificados fueron β-citraurina y 8' β-apocarotenal, y dado que puede haber interconversión entre ambos, en la Fig. 9 se han cuantificado conjuntamente ambos compuestos para evitar confusiones. Es de destacar la presencia de una xantofila con máximos de absorción en su espectro de 405, 428 y 456 nm, que muy probablemente podría tratarse de mutatoxantina, una xantofila artefactual derivada de la violaxantina, pero dado de su identificación no es inequívoca, se decidió no asignarle una signatura específica. También se detectaron cantidades menores de otras xantofilas como β-criptoxantina, zeaxantina y anteraxantina (Fig. 9).

La cuantificación de los carotenoides individuales en el flavedo de los híbridos reveló importantes características. En Nulpink 69 destaca la presencia de altas concentraciones de fitoeno y especialmente fitoflueno, y sobre todo de β-criptoxantina, con cantidades muy superiores a ninguna otra variedad (11 µg/g PF). AL mismo tiempo, este híbrido también contenía altas concentraciones de anteraxantina y de violaxantina, prácticamente similares a las de la mandarina Clemenules. Sin embargo, las concentraciones de apocarotenoides C30 fueron extremadamente bajas (Fig. 9). Este patrón de carotenoides puede ser indicativo de una situación en la que se ha bloqueado o está muy reducida la capacidad de síntesis de apocarotenoides C30 desde las xantofilas y, consecuentemente, se produce la acumulación de la xantofila precursora β-criptoxantina y otros intermediarios anteriores, como el fitoflueno, sin alterarse la formación de las xantofilas posteriores como la violaxantina. Esta acumulación particular de carotenoides puede explicar la coloración anaranjada del

flavado de este híbrido, pero sin la intensidad del híbrido 40 o la mandarina Clemenules, por la ausencia de apocarotenoides C30.

En el flavado del híbrido 40 presentó la particularidad de acumular concentraciones de apocarotenoides C30 prácticamente idénticas a las de la piel de la mandarina Clemenules (Fig. 9). Esta característica puede explicar el color naranja intenso de la piel de Nulpink 40 (Fig. 4 a). Este híbrido también contiene niveles de β -criptoxantina similares a los de la mandarina, pero más cantidades de zeaxantina y anteraxantina y menor concentración de violaxantina. Los niveles de la xantofila no identificada también fueron relativamente altos. Estos resultados podrían interpretarse como que en este híbrido se ha heredado la capacidad de formación de apocarotenoides C30, similar a la de la mandarina, pero sigue teniendo capacidad para la formación de las xantofilas posteriores en la ruta de biosíntesis. Finalmente, los híbridos 112, 134 y 77 tuvieron concentraciones de carotenoides y xantofilas relativamente similares entre si y, en general, mucho más bajas que el resto de variedades. Sin embargo, en Nulpink 77 destacó una baja cantidad de apocarotenoides C30 que no tenían los otros dos, lo que puede justificar la tonalidad anaranjada que presenta su piel en comparación con los otros dos híbridos (Fig. 9).

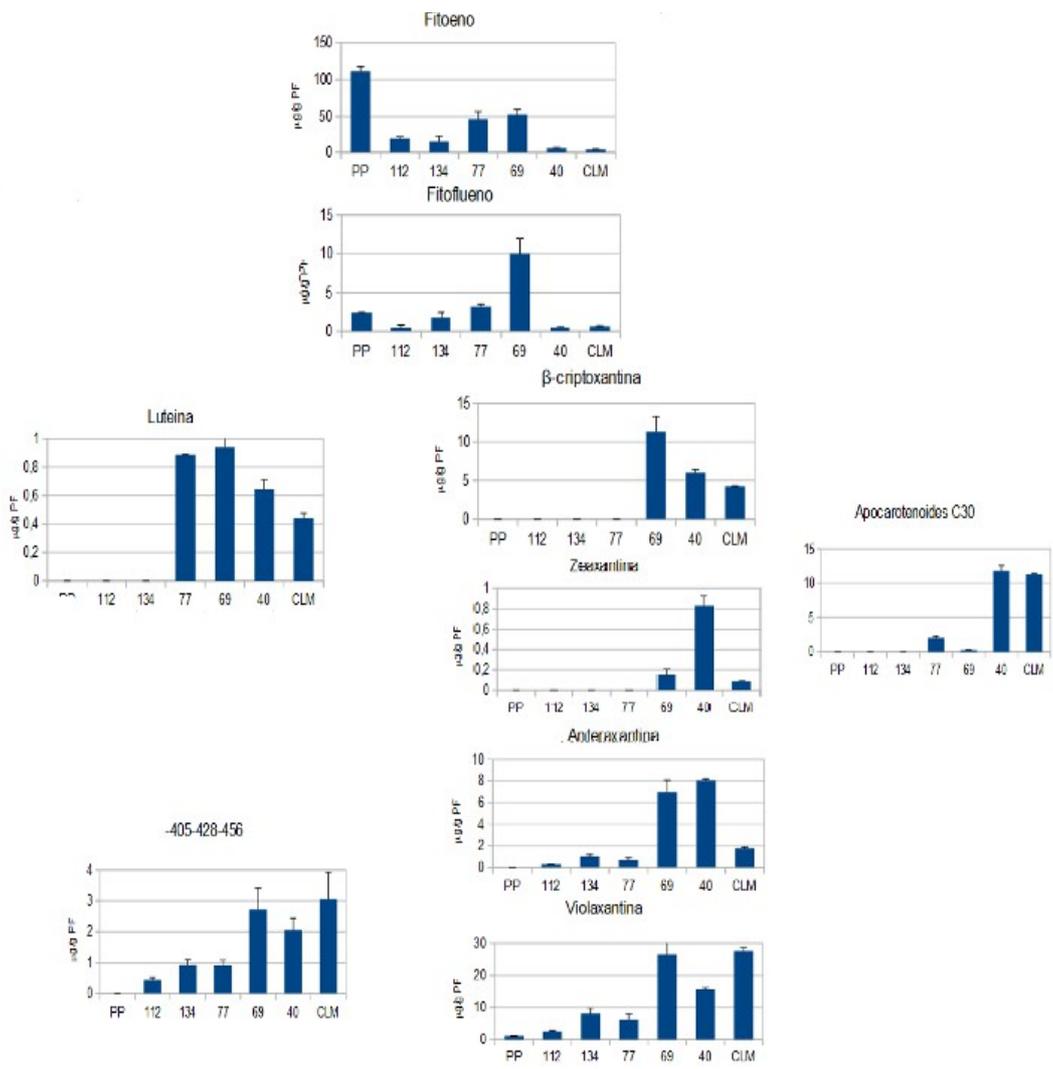


Figura 9. Cuantificación de carotenoides en la piel de frutos maduros de cinco híbridos ‘Nulpink’ y sus parentales

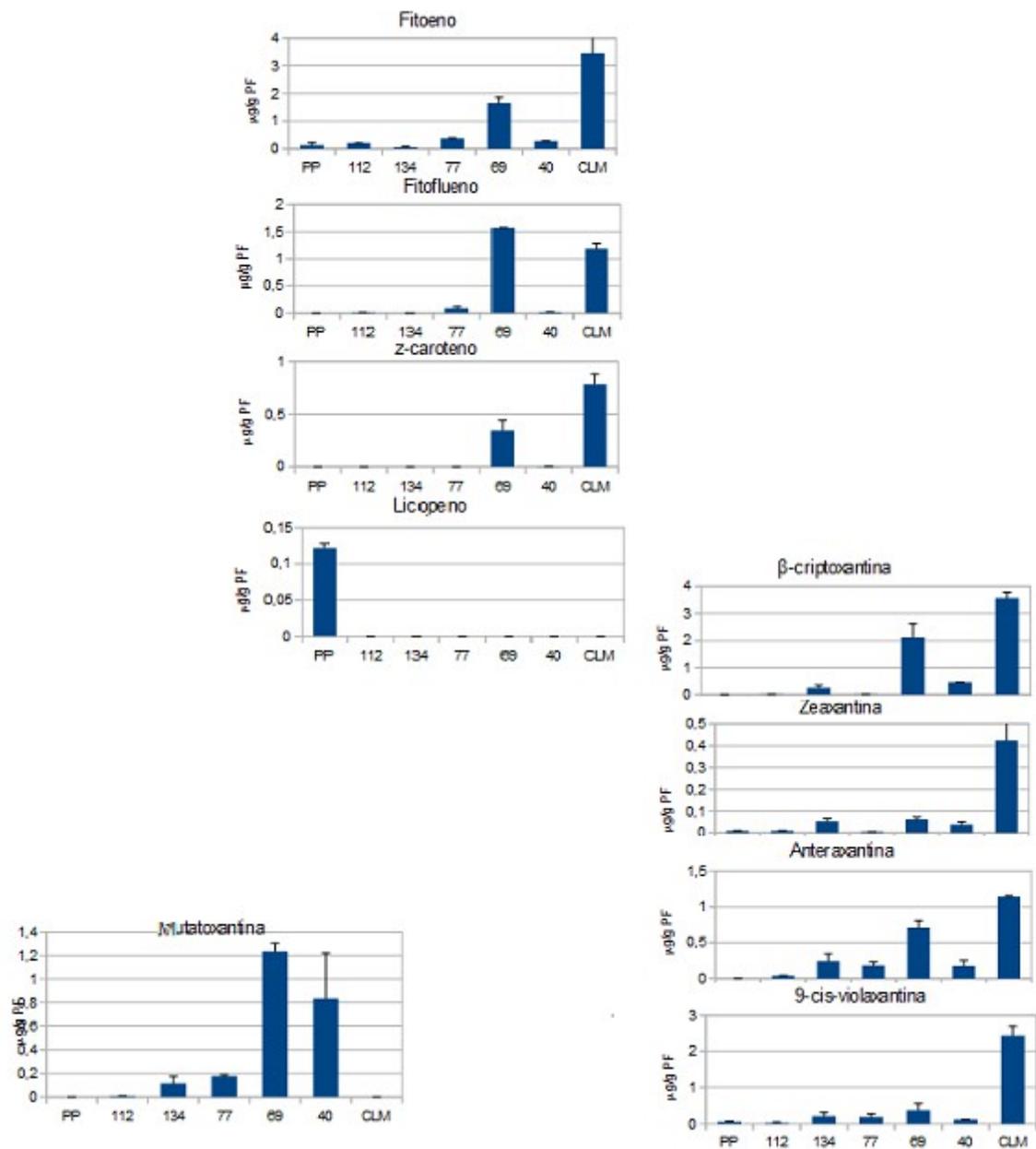


Figura 10. Cuantificación de carotenoides en la pulpa de frutos maduros de cinco híbridos 'Nulpink' y sus parentales.

Respecto a los carotenoides identificados y cuantificados en las pulpas, los carotenoides comunes a todos los híbridos y sus parentales fueron 9-*cis*-violaxantina, zeaxantina, anteraxantina y el fitoeno. Otros dos carotenoides muy comunes que aparecen en todos excepto en el pumelo Pink fueron la mutatoxantina y la β -criptoxantina. Es destacable la presencia de licopeno en el pumelo Pink, que no se detectó en ninguna de las otras variedades caracterizadas, y que le proporciona el ligero tono rosado a algunos sectores de la pulpa. Las características más reseñables entre las distintas variedades fueron que la pulpa de la mandarina Clemenules y del Nulpink 69 tenían los niveles más altos de casi todos los carotenoides (Fig. 10). Es de destacar que el contenido de β -criptoxantina fue similar entre ambos genotipos, pero los de otras xantofilas fueron mucho menores, y en el caso de la violaxantina cerca de 8 veces más baja. En este híbrido destaca también la presencia de mutatoxantina, que fue inexistente en la pulpa de mandarina (Figura 10). Por lo tanto, la presencia de β -criptoxantina y de mutatoxantina puede explicar la coloración de la pulpa (Fig. 4b) en el híbrido 69, a pesar de no contener apenas violaxantina. En la caso de Nulpink 40 se detectaron cantidades más apreciables mutatoxantina, y menores concentraciones de β -criptoxantina, anteraxantina y violaxantina. El resto de híbridos tuvieron niveles muy bajos de los diferentes carotenoides identificados (Fig. 10).

5. CONCLUSIONES

Del conjunto de resultados obtenidos en este trabajo se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. Se han seleccionado cinco híbridos provenientes de un cruce interespecífico entre el Pumelo Pink (*Citrus maxima*) y la mandarina Clementina (*Citrus clementina*) denominados 'Nulpink' 112, 134, 77, 69 y 40, por la diversidad en la coloración externa e interna de sus frutos, que va desde naranja intenso similar a las mandarinas al amarillo-pálido como los pumelos. Atendiendo al índice de color (Hunter, a/b) externo, los frutos se pueden ordenar de la siguiente manera: 112<134< 77 <69< 40, presentando los frutos de Nulpink 40 un color naranja intenso y los 69 y 77 tonalidades anaranjadas, mientras que los 112 y 134 fueron amarillos. En base al color (Hunter, a/b) de la pulpa se ordenan del siguiente modo: 112<134<77<40<69, presentando los frutos 112, 134 y 77 pulpa amarilla, mientras que los híbridos 40 y 69 mostraron pulpa naranja.
2. La análisis de los carotenoides totales en el flavedo y la pulpa de los híbridos Nulpink y sus respectivos parentales (la suma de los distintos carotenoides individuales determinados por HPLC-PDA) mostró que el flavedo del híbrido 69 y del pumelo Pink tenían el mayor contenido en carotenoides totales. En el flavedo de Clemenules, la concentración de carotenoides totales fue muy similar a la de los híbridos 77 y 40, y los valores más bajos se determinaron en el flavedo de los híbridos 112 y 134. La pulpa la mandarina Clemenules presentó los mayores contenidos de carotenoides, seguida de la del híbrido 69. En la pulpa del resto de frutos la concentración fue muy baja, siendo mínima en el pumelo Pink e el híbrido 112.
3. Mediante HPLC-PDA se identificaron un total de 20 carotenoides en el flavedo y 23 en la pulpa de los frutos de los híbridos y sus parentales. En el flavedo, los carotenoides comunes a todos los frutos fueron fitoeno, fitoflueno, *trans*-violaxantina, *9-cis*-violaxantina, con diferencias significativas en su contenido entre los cinco híbridos y sus parentales. El fitoeno fue el carotenoide mayoritario en el pumelo Pink, mientras que en Clemenules fue la violaxantina. Destaca la presencia de apocarotenoides C30, que proporcionan tonalidad naranja intensa, en el flavedo de la mandarina y en los híbridos 40 y 77. En las pulpas, los carotenoides comunes a todos los frutos fueron la *9-cis*-violaxantina, zeaxantina,

anteraxantina y el fitoeno. La β -criptoxantina se identificó en todos los frutos excepto en el pumelo Pink, mientras para el licopeno ocurrió la situación contraria.

4. El flavedo del híbrido Nulpink 40 parece haber heredado gran parte de las características cromáticas y de composición de carotenoides de la mandarina. El color naranja intenso de este híbrido, similar al parental, parece estar determinado principalmente por las elevadas concentraciones de apocarotenoides C30.
5. La composición de carotenoides en el flavedo del híbrido 69 sugiere una alteración en la síntesis de apocarotenoides C30, ya que la concentración de estos compuestos es prácticamente nula, mientras que acumula un elevado contenido de la xantofila precursora β -criptoxantina. Esta composición de carotenoides explica el tono naranja del flavedo de este genotipo, menos intenso que el del híbrido 40 y el parental Clementina. Es interesante destacar la alta concentración de fitoeno que ha heredado de su parental el pumelo Pink.
6. En general, el color naranja de la pulpa de los híbridos se explica por la concentración β -criptoxantina. El híbrido 69, con un contenido de esta xantofila similar a la de la mandarina parental, presenta un tono anaranjado de pulpa. El color naranja menos intenso del híbrido 40 es debido a una menor concentración de β -criptoxantina. El resto de híbridos con valores muy bajos de β -criptoxantina muestran tonalidades amarillentas e índices de color más bajos.
7. La elevada concentración de fitoeno, y en menor medida fitoflueno, en el flavedo del pumelo Pink y algunos híbridos, no repercute en su coloración, ya que son incoloros.
8. La composición y contenido de carotenoides en los híbridos 112 y 134 sugiere que han heredado mayoritariamente la capacidad de síntesis de carotenoides del parental pumelo Pink, mientras que los híbridos 69 y 40 la han heredado de la mandarina. El híbrido 77 presenta un carácter intermedio entre ambos.
9. Ninguno de los híbridos ha heredado la característica distintiva del pumelo Pink de acumular licopeno en la pulpa.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Agustí, M (2000).** Citricultura. Barcelona : Mundi-Prensa
- Alquézar B, Rodrigo MJ, Zacarías L. (2008a).** Regulation of carotenoid biosynthesis during fruit maturation in the red-fleshed orange mutant 'Cara Cara'. *Phytochemistry* 69, 1997-2007.
- Alquézar B, Rodrigo MJ, Zacarías L. (2008b).** Carotenoid biosynthesis and their regulation in citrus fruits. *Tree and Forestry Science and Biotechnology* 2: 23–35.
- Alquézar B, Zacarías L, Rodrigo MJ. (2009).** Molecular and functional characterization of a novel chromoplast-specific lycopene β -cyclase from citrus and its relation to lycopene accumulation. *Journal of Experimental Botany* 60: 1783–1719.
- Britton, G. (1998).** Overview of carotenoid biosynthesis. En: G. Britton, S. Liaaen Jensen, y H. Pfander (Eds.), *Biosynthesis and Metabolism*: 13-148. Basel: Birkhäuser Verlag.
- Carbonell-Caballero J, Alonso R, Ibañez V, Terol J, Talón M y Dopazo J. (2015).** A phylogenetic analysis of 34 chloroplast genomes elucidates the relationships between wild and domestic species within the genus Citrus. *Mol Biol Evol.* 32(8): 2015–2035
- Charanjit K, Harish C. K. (2001).** Antioxidants in fruits and vegetables – the millenium's health. *International Journal of Food Science and Technology.* 36: 703-725.
- Clinton S. K. (1998).** Lycopene: Chemistry, biology and implications for human health and disease. *Nutr Rev,* 56: 35-51.
- Faoestat (2015).** <http://faostat.fao.org/>
- Fraser P. D, Bramley P. M. (2004).** The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog Lipid Res.* 43: 228-65.
- Gross, J. (1987).** Pigments in fruits. London: Academic Press.
- Ibañez V, Garcia-Usach A, Carbonell-Caballero J, Alonso R, Terol J, Dopazo J y Talón M. (2015).** El origen de las especies cultivadas de cítricos. *Levante Agrícola* 426: 1-4

- Instituto Valenciano de Competitividad Empresarial.** Cítricos de la comunidad valenciana. Generalitat Valenciana. Boletín Julio 2015.
- Kato M, Matsumoto H, Ikoma Y, Okuda H, y Yano, M.** (2006). The role of carotenoid cleavage dioxygenases in the regulation of carotenoid biosynthetic genes during maturation in citrus fruit. *J.Exp.Bot.*, **57**(10): 2153-2164.
- Liu Q, Xu J, Liu Y, Zhao X, Deng X, Guo L, Gu J.** (2007). A novel bud mutation that confers abnormal patterns of lycopene accumulation in sweet orange fruit (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *J Exp Bot*, **58**:4161-71.
- Maiani G, Periago M. J, Catasta G, Toti E, Cambrodón I. G, Bysted A, Granado-Lorencio F, Olmedilla B, Knuthsen P, Valoti M, Böhm V, Mayer E, Behnlian D, y Schlemmer U.** (2009) Carotenoids: Actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. *Mol.Nutr.Food* **53**: S194-S218
- Melendes Martinez, A. J, Vicario, I. M, y Heredia, F. J.** (2004). Importancia nutricional de los pigmentos carotenoides. *Arch.Lationoam.Nutr.*, **54**(2): 149-155.
- Merchant, S y Sawaya, M. R.** (2005). The light reactions: A guide to recent acquisitions for the picture gallery. *Plant Cell*, **17**(3): 648-663
- Ministerio de Agricultura, alimentación y medio ambiente.** (2015). Anuario de Estadística Avance 2014. NIPO: 280-15-063-O.Madrid.
- Pons et al (2014).** Metabolic engineering of b-carotene in orange fruit increases its in vivo antioxidant properties. *Plant Biotech. J.* **12**(1):17-27
- Rao A. V, Rao L. G.** (2007) Carotenoids and human health. *Pharmacol Res*, **55**: 207-216.
- Rodrigo M. J, Marcos J. F, 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.
- Rodrigo M. J, Marcos J. F, Zacarías L.** (2004). Biochemical and molecular analysis of carotenoid biosynthesis in flavedo of orange (*Citrus sinensis* L.) during fruit development and maturation. *J Agric Food Chem* **52**: 6724-6731.

- Rodrigo M. J., Alquézar B., Alós E., Medina V., Carmona L., Bruno M., Al-Babili S., Zacarías L.**, (2013a) A novel carotenoid cleavage activity involved in the biosynthesis of *Citrus* fruit-specific apocarotenoid pigments. *J Exp Bot*, **64**(14): 4461-4478.
- Rodrigo M. J., Alquézar B., Alós E., Lado J., Zacarías L.** (2013b) Biochemical bases and molecular regulation of pigmentation in the peel of Citrus fruit. *Sci.Hort.* Article in press.
- Rodríguez Concepción M, y Boronat A.** (2002). Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiol.*, **130**(3): 1079-1089.
- Rouseff R. L , Ralay L , Hofsommer H. J.** (1996) . Application of diode array detection with a C-30 reversed phase column for the separation and identification of saponified orange juice carotenoids. *J. Agric. Food Chem* ; 44: 2167-2181
- Stewart I, y Wheaton T. A.** (1973). Carotenoids in citrus – Their accumulation induced by ethylene. *J.Agric. Food Chem.*, **20**(2): 448-449.
- van der Berg H, Faulks R, Granado H. F , Hirschberg J, Olmedilla B, Sandmann G, Southon S, y Stahl W.** (2000). The potential for the improvement of carotenoid levels in food and the likely systemic effects. *J.Sci.Food Agric*, **80**(7): 880-912
- Xu C. J, Fraser P. D, Wang W. J, y Bramley P.** (2006). Differences in the carotenoid content of ordinary citrus and lycopene-accumulating mutants. *J.Agric.Food Chem.*, **54**(15): 5474-5481.
- Ollitrault P, Terol J, Chen C, Federici C, Lotfy S, Hippolyte I, Ollitrault F, Bérard A, Chauveau A, Cuenca J, Costantino C, Kacar Y, Mu L, Garcia-Lor A, Froelicher Y, Aleza P, Billot C Navarro P, Luro F, Roose M, Gmitter, F Talon3 y Brunel D .** (2012). A reference genetic map of *C. Clementina hort.ex Tan.*; citrus evolution interferences from comparative mapping. *BMC Genomics*. **13**: 1471-2169
- Wu G.A, Prochnik S. et al** (2014). Sequencing of diverse mandarin, pummelo and orange genomes reveals complex history of admixture during citrus domestication. *Nature Biotech* 32: 656-662.

