



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos
Departamento de Tecnología de Alimentos

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos
Departamento de Ciencia de los Alimentos
Laboratorio de Fisiología y Biotecnología de Postcosecha

“Estudio transcriptómico de los mecanismos implicados en la tolerancia inducida por el curado al daño de frío y por el etileno al colapso de la corteza en los frutos cítricos”

Memoria presentada por Beatriz Aurelia Establés Ortiz
para optar al grado de Doctor por la Universidad Politécnica de Valencia

Directores:
M^a Teresa Lafuente Rodríguez
Luis González Candelas

Los doctores, D^a. M^a Teresa Lafuente Rodríguez, Investigador Científico del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) con destino en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA), y D. Luis González Candelas, Científico Titular del citado instituto:

CERTIFICAN que:

D^a. Beatriz Aurelia Establés Ortiz, Licenciada en Biología por la Universidad de Valencia y Licenciada en Ciencia y Tecnología de Alimentos y en Enología por la Universidad Politécnica de Valencia, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo que, con el título **“Estudio transcriptómico de los mecanismos implicados en la tolerancia inducida por el curado al daño de frío y por el etileno al colapso de la corteza en los frutos cítricos”**, presenta para optar al grado de Doctor por la Universidad Politécnica de Valencia.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Burjassot, a __ de _____ del _____.

Dr. Luis González Candelas

Dra. M^a Teresa Lafuente Rodríguez

Los doctora, D^a. Nuria Martínez Navarrete, Catedrático/a de la Universidad Politécnica de Valencia:

CERTIFICA que:

D^a. Beatriz Aurelia Establés Ortiz, Licenciada en Biología por la Universidad de Valencia y Licenciada en Ciencia y Tecnología de Alimentos y en Enología por la Universidad Politécnica de Valencia, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo que, con el título **“Estudio transcriptómico de los mecanismos implicados en la tolerancia inducida por el curado al daño de frío y por el etileno al colapso de la corteza en los frutos cítricos”**, presenta para optar al grado de Doctor por la Universidad Politécnica de Valencia.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Burjassot, a __ de _____ del _____.

Dra. Nuria Martínez Navarrete

AGRADECIMIENTOS

Para mi familia,
Porque estáis a mi lado día a día
llenándome de ilusión y amor

Llegado a este punto final de mi tesis doctoral, y después de mucho pensar, quisiera agradecer en primer lugar a mis directores de tesis, Tere y Luis, el haberme dado la oportunidad de iniciarme en este mundo que llamamos Ciencia y haberme enseñado todo cuanto está en su mano, pero sobretodo, agradezco el haberles conocido ya que no solamente son dos grandes científicos sino también, y en letras mayúsculas, dos grandes Personas, nobles y entusiastas, sin duda alguna. Te agradezco Tere el haberme contagiado ese entusiasmo que te caracteriza y por haberme ayudado en todo momento. Por haberme inculcado desde un principio el gusto por la lectura y por las largas charlas sobre ciencia que nunca olvidaré. Y a ti Luis, en primer lugar por tu ‘enorme’ paciencia, de la cual soy muy consciente, por todo el conocimiento que me has transmitido durante estos años y por tu confianza en mí. A los dos que siempre habéis reconocido mis méritos y me habéis enseñado una forma de trabajar, de pensar y de crear ideas. A los dos, que habéis hecho posible que esta etapa de mi vida sea una de las mejores, os recordaré siempre con gran cariño.

Mis compañeras, mis amigas: Lourdes y Ana. Gracias por haber estado ahí en todo momento, por haberme escuchado durante horas interminables. A vosotras que os tendré a mi lado toda la vida; ¿qué habría hecho yo sin vosotras?...Y, sin olvidar a Berta, Belén, Aurora y Maite, a todas ellas, por los grandes momentos que hemos pasado juntas, ¡inolvidables!, y por tantas otras cosas que hacen la lista interminable. A Santi, mi compañero con quién empecé esta carrera investigadora, una gran persona con quien he compartido muy buenos momentos. Al resto del equipo de becarios, a Yolanda, Aníbal, Jacques, Mario, Alberto y por último, y no menos importante, a Paco, que es todo alegría, poesía y buen humor. A Pilar y a Arancha, las becarias del laboratorio. Y a los que vinieron desde Italia que aunque no estuvieron mucho tiempo con nosotros, nos dejaron un recuerdo muy especial: a Simona, Cristina y especialmente a Ivano.

A Lorenzo, que conocí en la carrera siendo su alumna, y fue la primera persona, junto con M^a Jesús, en ofrecerme la posibilidad de trabajar en su equipo. A los dos, les agradezco el haber contado conmigo y por haber confiado en mí. A José, por habernos cuidado tan bien en el congreso de Pamplona. A Fernando, uno de mis autores favoritos, al que por fin he tenido la suerte de conocer. Al equipo técnico, a M^a José y Amparo, pero sobretodo a Ana, quien me enseñó a hacer Northernns, y a Lolita, que me ayudó con los experimentos de campo, y que es la alegría de mi laboratorio y una bellísima persona.

A Carlos Benito, al que debemos todos los que hemos realizado la tesis en el IATA, nuestro agradecimiento por su labor científica, y particularmente, por su apoyo incondicional y por esas largas conversaciones; inolvidables.

A Pepe, M^a Angeles y a Javier que han contribuido con su trabajo a la realización de esta tesis doctoral. Y en general, a todo el equipo del CFGP, que me ofrecieron la posibilidad de ser un miembro más de éste.

A Elvira Costell, mi tutora en la fase de docencia; y a Ajo y Nuria, mis tutoras en la fase de tesis. Al IATA. Al Ministerio de Ciencia y Tecnología por haber financiado esta tesis. A la empresa de recogida de frutos Buropa y a Jose Luis Navarro. Al todo el equipo del laboratorio de bacteriología e higiene microbiana del hospital de Rangueil en Toulouse, por haberme iniciado en el campo de la biología molecular, particularmente al profesor Chabannon, Corinne y especialmente, a Lulu Doutré.

Agradecer inmensamente también a mis amigas tecnólogas, Laustraliana, Nayra, Eva y Cris, y a mis amigos biólogos, Laura, Ana, Josema y Marcos, por su apoyo, por sus buenos consejos y su amor incondicional.

Y por último, a las personas que ‘casi’ han realizado esta tesis conmigo, mis padres y Jorge, y que han soportado en silencio mis idas y venidas. A ellos, que me han escuchado y apoyado. A Rebeca y Andrea, que también han sufrido mis conversaciones monotema en este último año. A Negrito, que me ha acompañado en esta última fase de escritura. A mi familia, gracias por todo.

RESUMEN

Muchos productos hortofrutícolas desarrollan ‘daños de frío’ durante la conservación a temperaturas inferiores a 12-15 °C. El tratamiento de ‘curado’ (3 días 37 °C) previene la aparición de esta alteración en los frutos cítricos cuando se conservan a 2 °C. En la mandarina ‘Fortune’, muy susceptible al frío, los daños se manifiestan como un picado y áreas de color pardo en la parte más externa de la corteza (flavedo). Otra de las alteraciones frecuentes en la postcosecha de los frutos cítricos es el ‘colapso de la corteza’, que se produce a temperaturas superiores a las que causan ‘daños de frío’ y cuyos síntomas se caracterizan por la aparición de depresiones en la piel. El acondicionamiento de frutos de ‘Navelate’ durante 4 días con 10 $\mu\text{L L}^{-1}$ de etileno a 22 °C y 90-95% de humedad relativa (HR) redujo notablemente la incidencia de esta alteración, mientras que la aplicación de 1 $\mu\text{L L}^{-1}$ de 1-metilciclopropeno (1-MCP), un inhibidor de la percepción de etileno, la potenció.

Para entender los mecanismos asociados al efecto beneficioso del curado reduciendo el ‘daño de frío’ y del etileno frente al ‘colapso de la corteza’, se han evaluado cambios globales en la expresión génica en el flavedo de frutos de mandarina ‘Fortune’ almacenados a 2 °C, directamente o después del curado, y en el flavedo y albedo de frutos de naranja ‘Navelate’ almacenados a 22 °C y 90-95% de HR después de ser tratados con etileno o 1-MCP. Para ello se han empleado dos micromatrices de cDNA generadas en el Consorcio de Genómica Funcional de Cítricos (CFGP).

La eficacia del curado reduciendo la incidencia de ‘daños de frío’ parece estar más relacionada con su efecto evitando la inducción de genes implicados en la degradación de lípidos durante el almacenamiento en frío, que con cambios en la expresión de genes del metabolismo de ácidos grasos que afectan al grado de insaturación de los mismos o a la síntesis de ceras. Además, la expresión de genes del metabolismo de fenilpropanoides, y de otros que codifican proteínas PR, aumentó en respuesta a la combinación de calor y frío, mientras que el frío ‘per se’ favoreció la inducción de otros que codifican proteínas de pared celular, CYP79A2, transportadores ABC y de genes *cor15* y *LEA5*. La inducción de genes que previenen o reducen la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en los frutos acondicionados expuestos posteriormente al frío sugiere la implicación del estrés oxidativo en esta fisiopatía. La expresión de factores de transcripción aumentó en respuesta a la combinación de calor y frío. Entre los más expresados se encontraron factores NAM/NAC, WRKY, MYB/MYC y otros de respuesta a etileno; mientras que los que codifican miembros de las familias HSF, MADS-box y YABBY lo hicieron en frutos almacenados directamente en frío.

Los resultados del análisis de ontologías génicas indican que el tratamiento con etileno, que reduce el ‘colapso de la corteza’, favorece el metabolismo de derivados de aminoácidos, incluyendo el de fenilpropanoides, y de transporte electrónico en el albedo y en el flavedo. Además, el etileno indujo procesos biológicos relacionados con la síntesis de ácido jasmónico, y de aminoácidos aromáticos en el flavedo; mientras que en el albedo, se observó una sobre-representación de genes implicados en la síntesis de etileno. Dicho análisis puso además de manifiesto que el tratamiento con etileno y con 1-MCP indujo la expresión de genes que codifican proteínas que participan en la eliminación de ROS, reforzando la idea de la implicación del estrés oxidativo en el ‘colapso de la corteza’. El desarrollo de daños en los frutos tratados con 1-MCP en el albedo se relacionó con la inducción de genes que participan en procesos de degradación de proteínas y lípidos, y de otros relacionados con procesos de respuesta de defensa a hongos patógenos.

Aunque el curado induce protección cruzada frente al ‘daño de frío’ y el etileno frente al ‘colapso de la corteza’, y que tanto durante el tratamiento de curado como durante el almacenamiento en frío se favorece la biosíntesis de etileno, los mecanismos inducidos por estos tratamientos son en su mayoría diferentes. Ambos tratamientos tuvieron un efecto marcado en la inducción de procesos del metabolismo de fenilpropanoides y en la activación de respuestas de defensa al estrés oxidativo, aunque los genes implicados en estos procesos fueron diferentes.

ABSTRACT

Many fruits and vegetables develop chilling injury (CI) when stored at temperatures below 12-15 °C. Conditioning 'Fortune' mandarin fruit, a hybrid very sensitive to this physiological disorder, for 3 days at high temperature (37 °C) prevents cold-induced damage during storage at 2 °C. Symptoms of CI are manifested in this cultivar as pitting and brown depressed areas in the outer coloured part of the peel (flavedo). Another physiological disorder that often occurs during postharvest storage at non-chilling temperatures in citrus fruit is non-chilling peel pitting, which is manifested by the appearance of sunken areas affecting both the flavedo and the albedo. Conditioning mature 'Navelate' oranges for 4 days with 10 µL L⁻¹ ethylene reduced this physiological disorder during fruit storage at 22 °C and 90-95% RH, while treating the fruit with 1 µL L⁻¹ 1-methylcyclopropane (1-MCP), an inhibitor of ethylene action, enhanced it.

To gather a general insight into the mechanisms underlying the heat-induced chilling tolerance and the ethylene-induced tolerance to postharvest non-chilling peel pitting, global changes in gene expression occurring in the flavedo of heat-conditioned and non-conditioned 'Fortune' mandarins stored at 2 °C and in the flavedo and the albedo of 'Navelate' oranges stored at 22 °C and 90-95% RH, after being treated with ethylene or 1-MCP, were studied. To that end, two cDNA microarrays generated by the Spanish 'Citrus Functional Genomics Project' were used.

The results showed that the heat-induced chilling tolerance appears to be more related to the avoidance of induction of genes implicated in lipid degradation during cold storage than to changes in the expression of genes encoding enzymes involved in the fatty acids' unsaturation or in wax biosynthesis. Moreover, the expression of genes involved in either phenylpropanoids metabolism or PR protein synthesis increased in response to the combination of heat and cold, whereas cold storage of non-conditioned fruits favoured the induction of genes encoding cell wall proteins, CYP79A2, ABC transporters and cor15 and LEA5 genes. The up-regulation of genes preventing the formation of reactive oxygen species (ROS), or encoding enzymes scavenging them, in heat-conditioned fruits stored at 2 °C supports the idea that oxidative stress is involved in chilling-induced damage in citrus fruit. The expression of transcription factors was favoured by the combination of heat and cold. Among the most induced transcription factors, several NAM/NAC, WRKY, MYB/MYC and others that responded to ethylene were found; whereas others members of the HSTF, MADS-box and YABBY families were more expressed in non-conditioned fruits stored at 2 °C.

Gene ontology analysis revealed that ethylene treatment, which reduced the incidence of non-chilling peel pitting, induced the metabolism of amino acid derivatives, including phenylpropanoids, and the electron transport system in the albedo as well as in the flavedo. Furthermore, biological processes related to jasmonic acid biosynthesis and the metabolism of aromatic amino acids were also induced by ethylene in the flavedo, whereas an over-expression of genes involved in ethylene biosynthesis was found in the albedo. Furthermore, this analysis indicated that both ethylene and 1-MCP up-regulated the expression of genes encoding ROS scavenging enzymes, reinforcing the idea that oxidative stress is involved in the development of non-chilling peel pitting. On the other hand, the severe peel damage in the 1-MCP treated fruit was accompanied by the up-regulation of genes participating in the degradation of proteins and lipids and of others involved in the defence response against pathogenic fungi.

Although heat and ethylene-conditioning treatments induced cross-protection against CI and non-chilling peel pitting, respectively, and bearing in mind that ethylene biosynthesis increases during citrus fruit exposure to either heat or cold, the mechanisms induced by these two treatments are mostly different. Both of them had a marked effect on inducing processes related to phenylpropanoid metabolism and on activating defence responses against oxidative stress. Nevertheless, both treatments induced different sets of genes.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	I
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE TABLAS	XI
ABREVIATURAS	XVII
INTRODUCCIÓN	1
1. Daños de frío	4
1.1. Causas y morfología	4
1.2. Métodos que reducen la incidencia de ‘daños de frío’	5
2. ‘Colapso de la corteza’	8
2.1. Causas y morfología	8
2.2. Métodos que reducen la incidencia del ‘colapso de la corteza’	10
3. Susceptibilidad de los frutos cítricos al frío y tolerancia inducida por los tratamientos de acondicionamiento térmico	11
3.1. Bases fisiológicas y bioquímicas	11
3.2. Bases Moleculares de los ‘daños de frío’ y del efecto beneficioso del tratamiento de curado que reduce dicha alteración fisiológica	17
4. Mecanismos relacionados con el desarrollo del ‘colapso de la corteza’ y con el efecto beneficioso del tratamiento con etileno reduciendo la alteración	26
4.1. Bases fisiológicas y bioquímicas	26
4.2. Bases moleculares	29
5. Situación actual y perspectivas futuras en el estudio transcriptómico del genoma de cítricos en España	31
OBJETIVOS	33
MATERIALES Y MÉTODOS	37
1. Material vegetal	39
2. Tratamientos	39
2.1. Condiciones de almacenamiento y tratamiento de acondicionamiento térmico en frutos de mandarina ‘Fortune’	39
2.2. Estudio del efecto de tratamientos con metales divalentes en la incidencia de ‘daños de frío’ en frutos de mandarina ‘Fortune’	40
2.3. Estudio de la respuesta a estrés por herida mecánica en frutos de mandarina ‘Fortune’	43
2.4. Estudio de la tolerancia al ‘colapso de la corteza’ inducida por el acondicionamiento con etileno en naranjas ‘Navelate’	43
3. Métodos	45
3.1. Estimación de daños en la piel	45
3.2. Medida de la concentración de CO ₂ y etileno	46
3.3. Extracción de RNA	46
3.4. Construcción de una biblioteca de cDNA y análisis de secuencias	47
3.5. Análisis Northern	48
3.6. Análisis de la expresión génica diferencial mediante el empleo de micromatrices de cDNA	49

RESULTADOS	55
1. Estudio transcriptómico de los mecanismos implicados en la tolerancia al frío inducida por el acondicionamiento térmico a altas temperaturas en frutos de mandarina ‘Fortune’	57
1.1. Efecto del tratamiento de curado en los ‘daños de frío’	57
1.2. Construcción de una biblioteca de cDNA y análisis de secuencias	57
1.3. Estudio de los cambios en la expresión génica asociados a la adquisición de tolerancia al frío mediante empleo de micromatrices de cDNA	61
1.4. Efecto del tratamiento con sales de metales divalentes en el estudio de los ‘daños de frío’ en mandarinas de la variedad ‘Fortune’	105
2. Estudio transcriptómico de los mecanismos implicados en la tolerancia al ‘colapso de la corteza’ inducida por el acondicionamiento con etileno en frutos de naranja ‘Navelate’	115
2.1. Efecto del etileno en la disminución de la incidencia del ‘colapso de la corteza’ en naranjas ‘Navelate’	115
2.2. Estudio de los cambios de expresión génica mediante empleo de micromatrices de cDNA asociados al efecto protector del etileno reduciendo la incidencia del ‘colapso de la corteza’	116
2.3. Análisis comparativo de los cambios de expresión génica en el flavedo y el albedo de frutos de ‘Navelate’ tratados con etileno o con 1-MCP mediante empleo de micromatrices de cDNA	160
3. Análisis de la expresión de factores de transcripción en respuesta a diferentes situaciones de estrés en la postcosecha de los frutos cítricos por análisis Northern	164
3.1. Selección de factores de transcripción	164
3.2. Estudio de la expresión de factores de transcripción en respuesta a los tratamientos de acondicionamiento térmico que previenen la aparición de ‘daños de frío’ en frutos de mandarina de la variedad ‘Fortune’	168
3.3. Estudio de la expresión de factores de transcripción en respuesta a estrés por herida mecánica en frutos de mandarina de la variedad ‘Fortune’	175
3.4. Estudio de la expresión de factores de transcripción en respuesta al tratamiento de etileno y a la aplicación de 1-MCP en relación al ‘colapso de la corteza’ en naranjas ‘Navelate’	178
DISCUSIÓN	187
1. Estudio transcriptómico de los mecanismos implicados en la tolerancia al frío inducida por el acondicionamiento térmico a altas temperaturas en frutos de mandarina ‘Fortune’	189
1.1. Metabolismo de lípidos	192
1.2. Estrés oxidativo	197
1.3. Metabolismo de fenilpropanoides y otras proteínas de respuesta a estrés	201
1.4. Proteínas implicadas en procesos de traducción, transducción de señal y regulación de la transcripción	205
1.5. Metabolismo de carbohidratos	210
2. Estudio transcriptómico de los mecanismos implicados en la tolerancia al ‘colapso de la corteza’ inducida por el acondicionamiento con etileno en frutos de naranja ‘Navelate’	211
2.1. Señalización mediada por ácido jasmónico	213

2.2. Estrés oxidativo	215
2.3. Biosíntesis de carotenoides	216
2.4. Biosíntesis de etileno	217
2.5. Metabolismo de aminoácidos aromáticos. Fenilpropanoides	218
2.6. Procesos de transporte de electrones	219
2.7. Degradación de componentes celulares y sistemas de transporte	220
2.8. Metabolismo de carbohidratos	221
2.9. Respuestas de defensa a hongos	222
2.10. Procesos de traducción, transducción de señal y regulación de la transcripción	223
3. Comparación de los mecanismos asociados al efecto del calor, el frío o la combinación de calor y frío en frutos de mandarina 'Fortune' y al efecto del tratamiento con etileno y 1-MCP en frutos de naranja 'Navelate'	229
CONCLUSIONES	235
BIBLIOGRAFÍA	239
ANEXOS	277
ANEXO I: Proyecto de Genómica Funcional de Cítricos (CFGP)	279
ANEXO II: Estudio transcriptómico de los mecanismos implicados en la tolerancia al frío inducida por el acondicionamiento térmico a altas temperaturas en frutos de mandarina 'Fortune'	283
ANEXO III: Estudio transcriptómico de los mecanismos implicados en la tolerancia al 'colapso de la corteza' inducida por el acondicionamiento con etileno en naranjas 'Navelate'	289
ANEXO IV: Comparación de los mecanismos implicados en la tolerancia inducida por el curado a los 'daños de frío' y por el etileno al 'colapso de la corteza'	316

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1: Síntomas de ‘daños de frío’ en diferentes especies de frutos cítricos. 5
- Figura 2: ‘Colapso de la corteza’. A) naranjas ‘Navelate’. B) naranjas ‘Pinalate’. C) Pomelo ‘Marsh’. 9
- Figura 3: Contribución en unigenes (%) de las bibliotecas de cDNA reunidas en el Consorcio Español de Genómica Funcional de Cítricos (CEFGP). Bibliotecas utilizadas para la construcción de la micromatriz 7K y 12K. 32
- Figura 4: Condiciones de almacenamiento y tratamiento de acondicionamiento térmico a altas temperaturas en frutos de mandarina de la variedad ‘Fortune’. 40
- Figura 5: Tratamientos con sales de metales divalentes y de inducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en frutos de mandarina ‘Fortune’. 41
- Figura 6: Tratamiento con sales de metales divalentes y de inducción de ROS en frutos de mandarina ‘Fortune’ acondicionados posteriormente a altas temperaturas y almacenados a 2 °C, almacenados directamente en frío y almacenados a 12 °C (control). 42
- Figura 7: Diseño experimental de los tratamientos con etileno y/o 1-MCP para estudiar la incidencia del ‘colapso de la corteza’ en naranjas ‘Navelate’. 44
- Figura 8: Escala visual de evaluación de ‘daños de frío’ en frutos de mandarina ‘Fortune’. 45
- Figura 9: Escala visual de la severidad del ‘colapso de la corteza’ en naranjas ‘Navelate’. 46
- Figura 10: Cambios en el IDF de frutos de mandarinas ‘Fortune’ procedentes de 3 campañas diferentes almacenadas a 2 °C inmediatamente después de ser cosechadas (■) (■) (■), o después de ser acondicionadas durante 3 días a 37 °C (□) (□) (□). 57
- Figura 11: Características de la biblioteca FlavCurFr1. A) Muestras utilizadas para su construcción; B) Número de secuencias pertenecientes a ‘singletons’ o ‘contigs’; C) Distribución de ‘contigs’ por número de representantes; D) Análisis funcional por ontologías génicas (FatiGO+) de los unigenes con homólogo en *A. thaliana* en relación a procesos biológicos. 59
- Figura 12: Análisis FatiGO+ de los procesos biológicos en el conjunto de unigenes que presentan homología con genes de *A. thaliana* incluidos en la micromatriz ‘7K’. 61
- Figura 13: Diseño experimental del análisis de la expresión génica mediante el empleo de la micromatriz ‘7K’. 62
- Figura 14: Diagramas de Venn que muestran el número de genes con cambios de expresión estadísticamente significativos en respuesta al calor, al frío y a la combinación de ambos estímulos, respecto al nivel de expresión de frutos recién cosechados en la micromatriz ‘7K’. 63
- Figura 15: Representación gráfica (Aracyc) del estudio de la influencia del tratamiento de curado en la expresión de los genes de la ruta de biosíntesis de etileno en el flavedo de los frutos de mandarina ‘Fortune’ almacenados en frío. 78
- Figura 16: Representación gráfica (Aracyc) del estudio de la influencia del tratamiento de curado en la expresión de los genes de la ruta del mevalonato y la ruta MEP que conducen a la biosíntesis de isopentenil PP, precursor en la biosíntesis de geranil geranil PP, en el flavedo de los frutos de mandarina ‘Fortune’ almacenados en frío. 79
- Figura 17: Representación gráfica (Aracyc) del estudio de la influencia del tratamiento de curado en la expresión de los genes de la ruta de biosíntesis de carotenoides y ABA, en el flavedo de los frutos de mandarina ‘Fortune’ almacenados en frío. 80

- Figura 18: Diagramas de Venn que muestran el número de genes de la micromatriz '12K' con expresión diferencial en respuesta al calor (C), al frío (F) y/o a la combinación de ambos estímulos (C+F), respecto al nivel de expresión de los frutos recién cosechados (RTC). 86
- Figura 19: Representación gráfica (Aracyc) del estudio de la influencia del tratamiento de curado en la expresión de los genes de la ruta de biosíntesis de etileno en el flavedo de los frutos de mandarina 'Fortune' almacenados en frío. 97
- Figura 20: Representación gráfica (Aracyc) del estudio de la influencia del tratamiento de curado en la expresión de los genes de la ruta de mevalonato y la ruta MEP que conducen a la biosíntesis de isopentenil PP, precursor en la biosíntesis de geranil geranil PP, en el flavedo de los frutos de mandarina 'Fortune' almacenados en frío. 98
- Figura 21: Representación gráfica (Aracyc) del estudio de la influencia del tratamiento de curado en la expresión de los genes de la ruta de biosíntesis de carotenoides y ABA en el flavedo de los frutos de mandarina 'Fortune' almacenados en frío. 99
- Figura 22: Estudio del efecto de la aplicación de FeSO_4 en la incidencia de daños en la piel en frutos de mandarina 'Fortune' almacenados, inmediatamente después de ser cosechados, 30 días a 2 y 12 °C, y en frutos curados (3 días 37 °C) y almacenados en frío durante el mismo periodo de tiempo. 106
- Figura 23: Estudio del efecto de la aplicación de CuSO_4 en la incidencia de daños en la piel en frutos de mandarina 'Fortune' almacenados, inmediatamente después de ser cosechados, durante 30 días a 2 y 12 °C, y en frutos curados (3 días 37 °C) y almacenados en frío durante el mismo periodo de tiempo. 107
- Figura 24: Efecto de la aplicación de CuSO_4 0,1 mM en la incidencia de 'daños de frío' en frutos de mandarina 'Fortune' almacenados, inmediatamente después de ser cosechados, durante 30 días a 2 °C. 108
- Figura 25: Estudio del efecto de la aplicación de DETC en la incidencia: A) de 'daños de frío' en frutos de mandarina 'Fortune' almacenados, inmediatamente después de ser cosechados, durante 30 días a 2 °C; B) de daños en la piel en frutos de mandarina 'Fortune' curados (3 días 37 °C) y almacenados durante 30 días a 2 °C, y en frutos recién cosechados almacenados a 12 °C durante igual periodo de tiempo (frutos control). 109
- Figura 26: Estudio del efecto de la aplicación de ZnSO_4 , MnSO_4 y MgSO_4 100 mM en la incidencia de daños en la piel en frutos de mandarina 'Fortune' almacenados, inmediatamente después de ser cosechados, durante 30 días a 2 (●) y 12 °C (◆), y en frutos curados (3 días 37 °C) y almacenados en frío durante igual periodo de tiempo (○). 110
- Figura 27: Efecto de la aplicación de una mezcla de paracuat (par) 1 mM + H_2O_2 1 mM + Fe^{2+} 0,1 mM (◆ ◆) en la susceptibilidad al frío de frutos de mandarina 'Fortune'. 111
- Figura 28: Efecto del tratamiento con la mezcla paracuat 1 mM + H_2O_2 1 mM + Fe^{2+} 0,1 mM (●) en el parámetro a/b de medida del color en frutos de mandarina 'Fortune' almacenados a 2 y 12 °C, inmediatamente después de ser cosechados, y en mandarinas almacenadas a 2 °C después de ser acondicionadas durante 3 días a 37 °C. 112
- Figura 29: Efecto de la aplicación de un tratamiento que favorece la inducción de especies activas de oxígeno (ROS) en la incidencia de 'daños de frío' en frutos de mandarina 'Fortune' almacenados 60 días a 2 °C. 113
- Figura 30 Detalle de la sintomatología de los daños en la piel en frutos de mandarina 'Fortune'. (A) Frutos tratados con paracuat 1 mM + H_2O_2 1 mM + Fe^{2+} 0,1 mM almacenados 50 días a 2 °C; (B) Frutos tratados con paracuat 1 mM + H_2O_2 1 mM + Fe^{2+} 0,1 mM a lo largo del tratamiento de acondicionamiento térmico, y almacenados 50 días a 2 °C después del curado. 114

- Figura 31: Evolución del ‘colapso de la corteza’ en naranjas ‘Navelate’ cosechadas a principios de marzo y almacenadas 1) continuamente en aire (○); 2) tratadas 4 días con 10 $\mu\text{L L}^{-1}$ de etileno a 22 °C y posteriormente transferidas a aire a la misma temperatura (□); 3) tratadas 14 h con 1-MCP (1 $\mu\text{L L}^{-1}$) a 22 °C y transferidas inmediatamente a aire a la misma temperatura (●); 4) tratadas 14 h con 1-MCP (1 $\mu\text{L L}^{-1}$) a 22 °C, luego 4 días con 10 $\mu\text{L L}^{-1}$ de etileno a 22 °C y por último transferidas a aire a la misma temperatura (■). 115
- Figura 32: Diseño Experimental del análisis de los cambios de expresión mediante el empleo de la micromatriz ‘12K’. 116
- Figura 33: Diagramas de Venn que muestran el número de genes con expresión diferencial significativa (SAM, FDR < 1%) en el flavedo y albedo de frutos de naranja ‘Navelate’ almacenados 1) directamente en aire (Aire); 2) acondicionados 4 días con 10 $\mu\text{L L}^{-1}$ de etileno (4d Etileno) y posteriormente almacenados 10 días en aire (4d Etileno + 10 d Aire); 3) tratados durante 14 h con 1 $\mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP y almacenados posteriormente en aire (14h MCP + 4d Aire ó 14d Aire). 118
- Figura 34: Estudio temporal del número de genes que mostraron cambios significativos de expresión (SAM, FDR<1%) en el flavedo y albedo de frutos de naranja ‘Navelate’ sometidos a diversas condiciones de almacenamiento. En las áreas de intersección de los diagramas de Venn se indica el número de genes inducidos (●) o reprimidos (●) a los 4 días en respuesta al etileno, a aire y a la combinación de 1-MCP y aire cuya expresión no varió durante el resto del almacenamiento en aire. 119
- Figura 35: Representación gráfica (Aracyc) del estudio del efecto del tratamiento de etileno y 1-MCP en la expresión de los genes de la ruta de biosíntesis de fosfolípidos y glicolípidos, y de degradación de éstos por acción de enzimas fosfolipasas, en muestras de flavedo (F) y albedo (A) de naranjas ‘Navelate’. Además, se representa la ruta de biosíntesis de ácido jasmónico. 140
- Figura 36: Representación gráfica (Aracyc) del estudio del efecto del tratamiento de etileno y 1-MCP en la expresión de los genes de la ruta de biosíntesis de etileno en muestras de flavedo (F) y albedo (A) de naranjas ‘Navelate’. 141
- Figura 37: Representación gráfica (Aracyc) del estudio del efecto del tratamiento de etileno y 1-MCP en la expresión de los genes de la ruta de biosíntesis de triptófano en muestras de flavedo (F) y albedo (A) de naranjas ‘Navelate’. 142
- Figura 38: Representación gráfica (Aracyc) del estudio del efecto del tratamiento de etileno y 1-MCP en la expresión de los genes de la ruta de biosíntesis de fenilalanina y tirosina en muestras de flavedo (F) y albedo (A) de naranjas ‘Navelate’. 143
- Figura 39: Representación gráfica (Aracyc) del estudio del efecto del tratamiento de etileno y 1-MCP en la expresión de los genes de la ruta de biosíntesis de fenilpropanoides en muestras de flavedo (F) y albedo (A) de naranjas ‘Navelate’. 144
- Figura 40: Representación gráfica (Aracyc) del estudio del efecto del tratamiento de etileno y 1-MCP en la expresión de los genes de la ruta de biosíntesis de carotenoides en muestras de flavedo (F) y albedo (A) de naranjas ‘Navelate’. 146
- Figura 41: Ejemplo ilustrativo del análisis Northern correspondiente a los genes aislados de la biblioteca de cDNA ‘FlavCurFr1’ agrupados en los patrones 1 y 2 (C+F>F). 172
- Figura 42: Comparación de los resultados obtenidos a partir de las hibridaciones realizadas con las micromatrices ‘7K’ y ‘12K’, y los análisis Northern en el estudio de los cambios de expresión de factores de transcripción en frutos de mandarina ‘Fortune’. 174
- Figura 43: Análisis Northern correspondientes a los genes aislados de la biblioteca de cDNA ‘FlavCurFr1’ cuya expresión fue diferente entre frutos de mandarina ‘Fortune’ heridos y no heridos. 177

Figura 44: Ejemplo ilustrativo del análisis Northern correspondiente a los genes aislados de la biblioteca de cDNA 'FlavCurFr1' agrupados en los patrones 1 y 2 de acuerdo a su perfil de expresión en el flavedo de frutos de naranja 'Navelate'. **186**

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1: Listado de unigenes más representados en la biblioteca 'FlavCurFr1'. En la tabla se indica el nombre de la proteína más similar representante del 'contig', el n° de acceso en la base de datos, el n° de clones que forman el 'contig' y el E-value de homología de secuencia. **60**
- Tabla 2: Listado de los 30 primeros genes que mostraron las mayores diferencias de expresión (SAM FDR<1%) entre los frutos acondicionados y almacenados 20 días en frío respecto a los frutos almacenados 20 días directamente a 2 °C siendo ésta superior en los primeros (C+F>F). **65**
- Tabla 3: Listado de los 30 primeros genes cuya expresión fue significativamente mayor en los frutos almacenados a 2 °C respecto a los frutos acondicionados y transferidos al frío. **66**
- Tabla 4: Genes incluidos en la micromatriz '7K' que codifican proteínas relacionadas con el estrés oxidativo y que presentan expresión diferencial en la comparación C+F vs F. **69**
- Tabla 5: Genes que codifican OMTs con homología al gen At5g54160 de *A. thaliana*. En gris (●) se marcan los unigenes 6305 y 5970 correspondientes al gen *FortOMTII* y al gen ACR233, respectivamente. **70**
- Tabla 6: Análisis de ontologías génicas (FatiGO+) de procesos biológicos ($p < 0.05$) basado en las hibridaciones con la micromatriz '7K' en el estudio de los cambios de expresión en el flavedo de frutos de mandarina de la variedad 'Fortune' en respuesta al calor, al frío y a la combinación de calor y frío. **73**
- Tabla 7: Genes que participan en procesos de biosíntesis de lípidos que constituyen, en el nivel 6 del análisis FatiGO+, un porcentaje estadísticamente sobrerrepresentado en el total de genes incluidos en la micromatriz '7K' que disminuyeron su expresión en respuesta a la combinación específica de calor y frío. **74**
- Tabla 8: Resumen de los resultados del análisis FatGO+ (BABELOMICS) referentes a componente celular (A) y a función molecular (B) basado en las hibridaciones con la micromatriz '7K' en el estudio de los cambios de expresión en el flavedo de frutos de mandarina de la variedad 'Fortune' en respuesta al calor, al frío y a la combinación de calor y frío. **75**
- Tabla 9: Genes que codifican ATPasas, LOX, desaturasas y de degradación de lípidos de membrana con mayor nivel de expresión en los frutos almacenados directamente a 2 °C respecto a los previamente acondicionados (A) o viceversa (B). **76**
- Tabla 10: Principales familias de genes incluidos en la micromatriz '7K' que codifican proteínas relacionadas con procesos de señalización celular y factores transcripción con expresión diferencial en respuesta al frío o a la combinación de calor y frío respecto de los frutos recién traídos de campo (RTC). **81**
- Tabla 11: Lista de genes incluidos en la micromatriz '7K' que codifican proteínas relacionadas con procesos de señalización celular y factores transcripción agrupados por familias con mayor nivel de expresión en los frutos almacenados 20 días a 2 °C que habían sido previamente acondicionados 3 días a 37 °C (C+F) respecto de los frutos almacenados directamente en frío (F). **83**
- Tabla 12: Lista de genes incluidos en la micromatriz '7K' que codifican proteínas relacionadas con procesos de señalización celular y factores transcripción agrupados por familias con mayor nivel de expresión en los frutos no acondicionados almacenados 20 días a 2 °C (F) respecto a los previamente acondicionados 3 días a 37 °C (C+F). **84**
- Tabla 13: Listado de todos los genes incluidos en la micromatriz '12K' con mayor nivel de expresión en los frutos almacenados directamente en frío respecto a los previamente acondicionados 3 días a 37 °C. **88**

Tabla 14: Listado de los 30 genes incluidos en la micromatriz 12K que más se indujeron en respuesta a la combinación de calor y frío pero no en respuesta al frío con respecto a los niveles iniciales observados en los frutos RTC.	89
Tabla 15: Principales familias de genes incluidos en la micromatriz '12K' que codifican proteínas relacionadas con procesos de señalización celular y factores transcripción con expresión diferencial estadísticamente significativa (SAM, FDR<1%) en respuesta al frío o a la combinación de calor y frío respecto de los frutos control (RTC).	90
Tabla 16: Genes incluidos en la micromatriz '12K' que codifican proteínas relacionadas con procesos de señalización celular y factores transcripción agrupados por familias con mayor nivel de expresión en A) los frutos almacenados directamente a 2 °C respecto a los previamente acondicionados (F>C+F); B) los frutos curados y expuestos a 2 °C respecto a los almacenados directamente e 2 °C (C+F>F).	91
Tabla 17: Análisis de ontologías génicas (FatiGO+, BABELOMICS) basado en las hibridaciones con la micromatriz '12K' en el estudio de los cambios de expresión en el flavedo de frutos de mandarina de la variedad 'Fortune' en cuatro situaciones postcosecha: 1) frutos recién traídos de campo (RTC); 2) frutos curados (C); 3) frutos curados y almacenados 30 días a 2 °C (C+F); 4) frutos recién cosechados y almacenados 30 días a 2 °C (F).	93
Tabla 18: Genes que participan en procesos de biosíntesis de lípidos incluidos en el nivel 6 de la jerarquía de ontologías génicas y que presentan una disminución de su nivel de expresión en respuesta a la combinación específica de calor y frío.	94
Tabla 19: Genes que codifican ATPasas, LOX, desaturasas y de degradación de lípidos de membrana con mayor nivel de expresión en los frutos almacenados directamente a 2 °C respecto a los previamente acondicionados (A) o viceversa (B).	95
Tabla 20: Listado de genes comunes a ambas micromatrices que mostraron diferencias de expresión entre frutos de mandarina 'Fortune' acondicionados y sin acondicionar una vez almacenados a 2 °C, tanto por análisis SAM (FDR<1%) como porque una de las condiciones no presentó valor de expresión.	102
Tabla 21: Comparación de los resultados del análisis de ontología génicas (FatiGO+) en las micromatrices '7K' y '12K' indicando los procesos biológicos estadísticamente sobre o infrarrepresentados coincidentes en el grupo de genes con expresión diferencial en respuesta al calor, al frío o a la combinación de calor y frío.	103
Tabla 22: Lista de genes comunes a la micromatriz '7K' y '12K' clasificados según el análisis FatiGO+ en procesos de biosíntesis de lípidos (nivel 6).	104
Tabla 23: Genes con homología en <i>A. thaliana</i> y de función conocida que a los 4 días de almacenamiento se expresaron específicamente en el flavedo (A) o en el albedo (B) de los frutos recién acondicionados con etileno (1) o tratados 14 h con 1-MCP y almacenados en 4 días en aire (2).	121
Tabla 24: Listado de genes que se indujeron a los 4 días en los frutos tratados con etileno y se reprimieron en los tratados 14 h con 1-MCP almacenados en aire (1) o viceversa (2).	122
Tabla 25: Listado de los 30 primeros genes con mayor inducción en el flavedo de los frutos acondicionados 4 días con etileno y en los almacenados 14 días en aire después de tratarse con 1-MCP.	125
Tabla 26: Listado de los 30 primeros genes con mayor inducción en el albedo de los frutos acondicionados 4 días con etileno y en los almacenados 14 días en aire después de tratarse con 1-MCP.	126

- Tabla 27: Listado de los 30 primeros genes con mayor represión en el flavedo de los frutos acondicionados 4 días con etileno y en los almacenados 14 días en aire después de tratarse con 1-MCP. 127
- Tabla 28: Listado de los 30 primeros genes con mayor represión en el albedo de los frutos acondicionados 4 días con etileno y en los almacenados 14 días en aire después de tratarse con 1-MCP. 128
- Tabla 29: Resumen de los resultados del análisis de ontologías génicas (FatGO+) del conjunto de procesos biológicos no redundantes sobre o infrarrepresentados en el flavedo (F) o albedo (A) de frutos de naranja 'Navelate': A) tratados 4 días con etileno; B) almacenados 14 días en aire inmediatamente después de tratarse 14 h con 1-MCP. 130
- Tabla 30: Análisis de ontologías génicas (FatGO+) de procesos biológicos en el estudio de los cambios de expresión en el flavedo y albedo de frutos de 'Navelate' inmediatamente después de ser tratados 4 días con etileno (4d E) y de frutos almacenados 14 días en aire inmediatamente después de tratarse 14 h con 1-MCP (14h 1-MCP + 14d A). 131
- Tabla 31: Resumen de los resultados del análisis de ontologías génicas (FatiGO+) referente a componente celular. Se indica la locación celular no redundante de genes cuya expresión se alteró en el flavedo y albedo de frutos de naranja 'Navelate' (A) tratados 4 días con etileno ($10\mu\text{L L}^{-1}$) y (B) almacenados 14 días en aire inmediatamente después de tratarse 14 h con 1-MCP ($1\mu\text{L L}^{-1}$). 134
- Tabla 32: Resumen de los resultados del análisis FatiGO+ (BABELOMICS) indicando las funciones moleculares sobre o infrarrepresentadas en el conjunto de genes que mostraron cambios de expresión diferencial en el flavedo y albedo de frutos de naranja 'Navelate' tratados con etileno ($10\mu\text{L L}^{-1}$) o 1-MCP ($1\mu\text{L L}^{-1}$) y almacenados posteriormente en aire. 137
- Tabla 33: Genes incluidos en la categoría de procesos de transporte de electrones (nivel 5) del análisis FatiGO+ que se indujeron en el flavedo (●), albedo (●) o en el flavedo y el albedo (●) de los frutos tratados 4 días con etileno. 148
- Tabla 34: Resumen de las principales familias de genes relacionados con el estrés oxidativo. Se indica el número de genes en cada una de ellas que se indujeron o reprimieron en: 1) Frutos tratados cuatro días con etileno (4 días Etileno); 2) Frutos tratados 14 h con 1-MCP y almacenados 14 días en atmósfera de aire pero que no sufren modificación con el tratamiento de etileno (14 h 1-MCP + 14 días Aire). 150
- Tabla 35: Resumen del análisis de genes reunidos en la micromatriz '12K' que codifican proteínas que participan en la biosíntesis de ácido jasmónico, degradación de lípidos de membrana o implicados en procesos de biosíntesis, elongación y β -oxidación de ácidos grasos. 152
- Tabla 36: Genes reunidos en la micromatriz '12K' relacionados en procesos de respuesta a la infección por hongos (nivel 6) que aumentaron su expresión en los frutos almacenados 14 días en aire inmediatamente después de tratarse con 1-MCP. 154
- Tabla 37: Genes reunidos en la micromatriz '12K' implicados en procesos de ubiquitinación de proteínas (nivel 8) que aumentaron su expresión en los frutos almacenados 14 días en aire inmediatamente después de tratarse con 1-MCP. 155
- Tabla 38: Genes reunidos en la micromatriz '12K' implicados en procesos de biosíntesis de carbohidratos (nivel 6) que disminuyeron su expresión en los frutos almacenados 14 días en aire inmediatamente después de tratarse con 1-MCP. 156
- Tabla 39: Número de genes que codifican proteínas relacionadas con procesos de señalización celular y factores transcripción que aumentaron (+) o disminuyeron (-) su expresión (SAM, FDR<1%) en el flavedo y albedo de frutos de naranja 'Navelate' en respuesta a cada una de las condiciones almacenamiento estudiadas con respecto a los niveles iniciales correspondientes a los frutos RTC (A). 157

- Tabla 40: Principales familias de genes incluidos en la micromatriz '12K' que codifican proteínas relacionadas con procesos de señalización celular y factores transcripción con expresión en los frutos recién acondicionados con etileno (4 días Etileno) y en los frutos expuestos durante 14 h a 1-MCP y almacenados 14 días en aire (1-MCP + Aire). 159
- Tabla 41: Análisis FatiGO+ (BABELOMICS) de los procesos biológicos que mostraron cambios significativos al comparar entre sí los tejidos de flavedo y albedo para cada una de las condiciones estudiadas. 161
- Tabla 42: Análisis FatiGO+ (BABELOMICS) de las funciones moleculares (1) y componente celulares (2) que mostraron cambios significativos al comparar entre sí los tejidos de flavedo y albedo para cada una de las condiciones estudiadas. N: nivel de especificidad en el análisis. 163
- Tabla 43: Lista del conjunto de ESTs de la biblioteca de cDNA 'FlavCurFr1' que mostraron homología con factores de transcripción en la base de datos de proteínas no redundante del GenBank. 165
- Tabla 44: Caracterización de los clones que presentaron homología con factores de transcripción seleccionados en la biblioteca de cDNA 'FlavCurFr1'. 167
- Tabla 45: Cambios en la acumulación relativa y patrones de expresión de los factores de transcripción seleccionados. RTC: frutos recién traídos de campo; C: frutos acondicionados hasta 3 días a 37 °C; C+F: frutos curados y almacenados a 2 °C; F: frutos almacenados directamente a 2 °C. 170
- Tabla 46: Cambios en la acumulación relativa de mRNA y patrones de expresión de los factores de transcripción seleccionados. RTC: frutos recién traídos de campo; CH: frutos heridos; SH: frutos sin herida. 176
- Tabla 47: Cambios en la acumulación relativa y patrones de expresión de los factores de transcripción seleccionados en el flavedo de frutos de naranjas 'Navelate' en las siguientes situaciones: 1) frutos recién recolectados y almacenados 14 h en aire (controles); 2) frutos almacenados en aire durante 14 días (Aire); 3) frutos acondicionados 4 días con 10 $\mu\text{L L}^{-1}$ de etileno y posteriormente almacenados 10 días en aire (Etileno + Aire); 4) frutos tratados 14 h con 1 μL de 1-MCP y almacenados 4 días en aire (1-MCP + Aire); 5) frutos tratados 14 h con 1 $\mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP, acondicionados 4 días con 10 $\mu\text{L L}^{-1}$ de etileno y posteriormente almacenados 10 días en aire (1-MCP + Etileno + Aire). 182
- Tabla 48: Cambios en la acumulación relativa y patrones de expresión de los factores de transcripción seleccionados en el albedo de frutos de naranjas 'Navelate' en las siguientes situaciones: 1) frutos recién recolectados y almacenados 14 h en aire (controles); 2) frutos almacenados en aire durante 14 días (Aire); 3) frutos acondicionados 4 días con 10 $\mu\text{L L}^{-1}$ de etileno y posteriormente almacenados 10 días en aire (Etileno + Aire); 4) frutos tratados 14 h con 1 μL de 1-MCP y almacenados 4 días en aire (1-MCP + Aire); 5) frutos tratados 14 h con 1 $\mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP, acondicionados 4 días con 10 $\mu\text{L L}^{-1}$ de etileno y posteriormente almacenados 10 días en aire (1-MCP + Etileno + Aire). 184
- Tabla 49: Caracterización de las bibliotecas de cDNA reunidas en el Consorcio de Genómica Funcional de Cítricos (CFGF) 279
- Tabla 50: Conjunto de genes de la micromatriz '7K' que se expresan diferencialmente de manera específica en los frutos acondicionados y transferidos al frío o en los frutos no acondicionados y transferidos directamente a 2 °C. 283
- Tabla 51: Conjunto de genes de la micromatriz '7K' que se reprimen de forma específica en los frutos acondicionados y transferidos al frío. 284
- Tabla 52: Conjunto de genes de la micromatriz '7K' que se reprimen de forma específica en los frutos no acondicionados expuestos directamente al frío. 285

- Tabla 53: Listado de los genes de la micromatriz '12K' cuya expresión sólo se detectó en: A) los frutos acondicionados a los 30 días de almacenamiento a 2 °C (C+F); B) los frutos almacenados 30 días directamente a 2 °C (F). **286**
- Tabla 54: Conjunto de genes que se reprimen de forma específica en los frutos acondicionados y almacenados a 2 °C. **287**
- Tabla 55: Conjunto de genes de la micromatriz '12K' que se reprimen de forma específica en los frutos no acondicionados expuestos directamente al frío. **288**
- Tabla 56: Genes cuya expresión aumentó significativamente a los 14 días de almacenamiento en el flavedo de los frutos almacenados en aire, tratados o no previamente con 1-MCP, pero no en los acondicionados con etileno. **289**
- Tabla 57: Genes cuya expresión aumentó significativamente a los 14 días de almacenamiento en el albedo de los frutos almacenados en aire, tratados o no previamente con 1-MCP, pero no en los acondicionados con etileno. **290**
- Tabla 58: Genes relacionados con el estrés oxidativo que aumentaron su expresión en los frutos recién acondicionados con etileno antes de transferirlos a aire respecto a los frutos RTC (escala Log₂). **291**
- Tabla 59: Genes relacionados con el estrés oxidativo que aumentaron su expresión en los frutos tratados con 1-MCP y almacenados 14 días en aire pero que no se expresan diferencialmente en los frutos tratados 4 días con etileno antes de la transferencia a aire, respecto a los frutos RTC. **292**
- Tabla 60: Genes relacionados con el estrés oxidativo que disminuyeron su expresión en los frutos recién acondicionados con etileno antes de transferirlos a aire, respecto a los frutos RTC. **293**
- Tabla 61: Genes relacionados con el estrés oxidativo que disminuyeron su expresión en los frutos tratados con 1-MCP y almacenados 14 días en aire pero que no se expresan diferencialmente en los frutos tratados 4 días con etileno antes de la transferencia a aire, respecto a los frutos RTC. **294**
- Tabla 62: Genes de la micromatriz '12K' incluidos en la categoría FatiGO+ 'Respuesta sistémica dependiente de ácido jasmónico y etileno' (nivel 8) que se indujeron en el flavedo de los frutos de 'Navelate' tratados 4 días con etileno con respecto a RTC. **295**
- Tabla 63: Genes de la micromatriz '12K' incluidos en la categoría FatiGO+ 'Respuesta sistémica dependiente de ácido jasmónico y etileno' (nivel 8) que se indujeron en el albedo de los frutos de 'Navelate' tratados 14 h con 1-MCP almacenados 14 días en aire con respecto a RTC. **296**
- Tabla 64: Genes reunidos en la micromatriz '12K' relacionados en procesos de respuesta a de defensa en la interacción incompatible planta-patógeno (nivel 7) que aumentaron su expresión en el flavedo de frutos acondicionados 4 días con etileno antes de su transferencia a aire. **297**
- Tabla 65: Genes reunidos en la micromatriz '12K' relacionados en procesos de respuesta a de defensa en la interacción incompatible planta-patógeno (nivel 7) que aumentaron su expresión en el albedo de los frutos tratados 14 h con 1-MCP y almacenados 14 días en aire. **298**
- Tabla 66: Genes que variaron su expresión en los frutos tratados 4 días con etileno antes de la transferencia a aire respecto a los frutos RTC, y que codifican proteínas que participan en la biosíntesis de ácido jasmónico, degradación de lípidos de membrana o implicados en procesos de biosíntesis, elongación y β -oxidación de ácidos grasos. **299**
- Tabla 67: Genes cuya expresión aumentó en los frutos tratados con 1-MCP y almacenados 14 días en aire con respecto a los frutos RTC, pero no en los tratados 4 días con etileno, y que codifican proteínas que participan en la biosíntesis de ácido jasmónico, degradación de lípidos de membrana o implicados en procesos de biosíntesis, elongación y β -oxidación de ácidos grasos. **300**

- Tabla 68: Genes cuya expresión disminuyó en los frutos tratados con 1-MCP y almacenados 14 días en aire con respecto a los frutos RTC, pero no en los tratados 4 días con etileno, y que codifican proteínas que participan en la biosíntesis de ácido jasmónico, degradación de lípidos de membrana o implicados en procesos de biosíntesis, elongación y β -oxidación de ácidos grasos. **301**
- Tabla 69: Genes relacionados con el transporte de metabolitos cuya expresión se indujo en el albedo de los frutos recién acondicionados 4 días con etileno con respecto a los frutos RTC. **302**
- Tabla 70: Genes relacionados con el transporte de metabolitos cuya expresión se indujo en el albedo de los frutos tratados con 1-MCP y almacenados 14 días en aire con respecto a los frutos RTC. **303**
- Tabla 71: Genes que codifican proteínas de unión a calcio relacionados con su transporte o señalización cuya expresión se indujo (●) o se reprimió (●) en el albedo de los frutos tratados con 1-MCP y almacenados 14 días en aire. **305**
- Tabla 72: Genes que codifican proteínas de señalización y factores de transcripción que aumentaron su expresión en los frutos tratados 4 días con etileno antes de la transferencia a aire respecto a los frutos RTC. **306**
- Tabla 73: Genes que codifican proteínas de señalización y factores de transcripción que aumentaron su expresión en los frutos tratados con 1-MCP almacenados 14 días en aire y no variaron en los tratados 4 días con etileno respecto a los frutos RTC. **308**
- Tabla 74: Genes que codifican proteínas de señalización y factores de transcripción que disminuyeron su expresión en los frutos tratados 4 días con etileno antes de su transferencia a aire. **312**
- Tabla 75: Genes que codifican proteínas de señalización y factores de transcripción que disminuyeron su expresión en los frutos tratados con 1-MCP almacenados 14 días en aire, pero que se reprimieron en los tratados 4 días con etileno, respecto a los frutos RTC. **313**
- Tabla 76: Estudios de la expresión de los genes de la micromatriz '7K' incluidos en la micromatriz '12K' en respuesta al calor, al frío y a la combinación de calor y frío en frutos de 'Fortune' y en respuesta al tratamiento con etileno y 1-MCP a los 4 y 14 días de almacenamiento en el flavedo (F) y albedo (A) de frutos de 'Navelate'. **316**
- Tabla 77: Estudios de la expresión de los genes de la micromatriz '12K' en respuesta al calor, al frío y a la combinación de calor y frío en frutos de 'Fortune' y en respuesta al tratamiento con etileno y 1-MCP a los 4 y 14 días de almacenamiento en el flavedo (F) y albedo (A) de frutos de 'Navelate'. **317**

ABREVIATURAS

A	albedo	DXR	1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa
aa-dUTP	aminoalil-dUTP	ERF	factor de respuesta a etileno
AAO3	oxidasa del aldehído del ácido abscísico	F	flavedo
ABA	ácido abscísico	FLS	flavonol sintasa
ABA1	anteraxantina/zeaxantina epoxidasa	FPFTA	farnesil pirofosfato farnesil transferasa
ABA2	xantoxin deshidrogenasa	FPS	farnesil pirofosfato sintasa
ACC	ácido 1-aminociclopropano 1-carboxílico	PUFA	ácidos grasos poliinsaturados
ACO	ACC oxidasa	GcpE	4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-il difosfato sintasa
ACP	acyl carrier protein'	GPPS	geranil pirofosfato sintasa
ACS	ACC sintasa	GGPPS	geranil geranil pirofosfato sintasa
AMV	ácido mevalónico	GGTA	geranil geranil transferasa
AOAT	alanina transaminasa	GR	glutación reductasa
AOS	óxido aleno sintasa	GSH	glutación reducido
AOX	oxidasa alternativa	GST	glutación S-transferasa
APX	ascorbato peroxidasa	H₂O₂	peróxido de hidrógeno
ARF	factor de respuesta a auxinas ('auxin-responsive factor')	HR	humedad relativa
AC	atmósfera controlada	HSP	proteína de choque térmico ('heat-shock protein')
AM	atmósfera modificada	HSF	factor de transcripción de choque térmico ('heat-shock transcription factor')
β-OHasa	β-caroteno hidroxilasa	IRL	isoflavona reductasa
BAP	acetil CoA acetiltransferasa	IPP	isopentenil pirofosfato
C4H	cinamato 4-hidroxilasa	IspH	1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil-4-difosfato reductasa
CAD	cinamil alcohol deshidrogenasa	LEA	'Late-embriogenesis abundant'
CAT	catalasa	LOX	Lipoxigenasa
CCoAOMT	cafeil-CoA O-metiltransferase	LTP	proteína transportadora de lípidos ('Lipid-transfer protein')
CCR	cinamil-CoA reductasa	LPP	fosfatidato fosfatasa
cDNA	DNA complementario	LUT1	ε-caroteno hidroxilasa
CFGP	Proyecto de Genómica Funcional de Cítricos	LUT2	licopeno ε-ciclasa
CHS	chalcona sintasa (o calcona sintasa)	LYC	licopeno β-ciclasa
4CL	4-cumarato CoA ligasa	MAPKs	'Mitogen-Activated Protein Kinases'
CLA	1-deoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa	1-MCP	1-metilciclopropeno
COMT	ácido cafeico O-metiltransferasa	MeJA	jasmonato de metilo
COX	citocromo c oxidasa	MEP	2-metil-D-eritritol 4-fosfato
CS	cafeína sintasa	MGDG	monogalactosil DAG
DAG	diacilglicerol	MTs	metalotioneínas
DETC	dietilditiocarbamato de sodio	mRNA	RNA mensajero
DNA	ácido desoxirribonucleico		
DHAR	dehidroascorbato reductasa		

MVK	mevalonato quinasa	PSY	fitoeno sintasa
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido	R	de resistencia
NAM	proteínas de meristemo no apical	REF	cumarato 3-hidroxilasa
NCBI	National Center for Biotechnology Information	RNA	ácido ribonucleico
NCED	9-cis epoxicarotenoide dioxigenasa	rRNA	RNA ribosómico
NPQ	anteraxantina/violaxantina epoxidasa	ROS	especies activas de oxígeno (‘reactive oxygene species’)
O₂^{•-}	radical superóxido	SAD	sinapil alcohol deshidrogenasa
OH[•]	radical hidroxilo	SAM	S-adenosil-L-metionina
OMT	O-metiltransferasa	SD	desviación estándar
OPDA	ácido 12-oxo-fitodienoico	SDS	dodecil sulfato sódico
PAL	L-fenilalanina amonio-liasa	SOD	superóxido dismutasa
PCR	reacción en cadena de la polimerasa	SS	sacarosa sintasa
PDS	fitoeno desaturasa	SSC	citrato sódico + cloruro sódico
Phe	fenilalanina	TBP	‘TATA-binding protein’
PLA	fosfolipasa A ₂	TFIID	Complejo de inicio de la transcripción en eucariotas
PLC	fosfolipasa C	TFIIA, B, F	elementos del complejo TFIID
PLD	fosfolipasa D	Trp	triptófano
POD	peroxidasa	TRX	tiorredoxina
PP	pirofosfato (o difosfato)	Tyr	tirosina
PR	relacionadas con la patogénesis (‘pathogenesis- related’)	UV	ultravioleta
		V-ATPasa	H ⁺ -ATPasa vacuolar
		ZDS	ζ-caroteno desaturasa

ABREVIATURAS EMPLEADAS EN LOS EXPERIMENTOS

C	frutos curados o tratados 3 días a 37 °C
C + F	frutos curados o tratados 3 días a 37 °C y posteriormente almacenados en frío
F	frutos almacenados directamente en frío
ICC	Índice de ‘colapso de la corteza’
IDF	Índice de ‘daños de frío’
4d ó 14d A	4 ó 14 días de almacenamiento en aire
4d E	4 días de tratamiento con 10 μL L ⁻¹ de etileno
14h 1-MCP	14 h con 1 μL L ⁻¹ de 1-MCP
Par	paracuat
RTC	frutos recién de campo

INTRODUCCIÓN

El mantenimiento de la calidad de los productos hortofrutícolas desde la recolección hasta su consumo constituye el factor más importante en términos de mercado y el principal objetivo de las investigaciones llevadas a cabo en el área de postcosecha. Si bien es cierto que es difícil mejorar la calidad de un producto una vez ha sido cosechado, se puede evitar en la medida de lo posible su deterioro y tratar de minimizar la incidencia de alteraciones producidas por diferentes tipos de estrés biótico y abiótico, que frecuentemente se derivan de una incorrecta manipulación y procesamiento del mismo. El primer factor que limita la aceptación de cualquier producto hortofrutícola es el aspecto externo del mismo. Por ello, aunque muchas de las alteraciones frecuentes en postcosecha no afectan a la calidad interna del producto, ocasionan manchas en la piel y por tanto su rechazo por parte del consumidor.

Además de las alteraciones causadas por hongos o por ataque de insectos, el deterioro de un producto se debe a la aparición de desórdenes fisiológicos causados por temperaturas extremas, tanto de calor como de frío, exposición a niveles de humedad relativa (HR) inadecuados o golpes y heridas que se producen durante la manipulación postcosecha, entre otros factores. El desarrollo de métodos de acondicionamiento que inducen tolerancia a diferentes tipos de estreses, y reducen la susceptibilidad de los productos hortofrutícolas a desarrollar fisiopatías, está de sobra justificado y constituye el objetivo último de numerosos estudios de investigación que tratan de conocer los mecanismos de defensa de las plantas y entender sus bases fisiológicas, bioquímicas y moleculares.

En los cítricos, se han descrito diversas alteraciones fisiológicas que pueden tener lugar en el campo y/o después de la recolección durante la postcosecha (Grierson, 1986; Kader y Arpaia, 2002; Lafuente y Zacarias, 2006). El clima, las prácticas de cultivo y otros factores como la polución atmosférica, pueden dar origen a alteraciones precosecha. La incorrecta manipulación y procesamiento de los productos así como el almacenamiento en condiciones no adecuadas para una determinada variedad, son las causas que originan muchos de los desórdenes fisiológicos durante la postcosecha. Es interesante señalar que algunas de estas alteraciones se inician en campo y se desarrollan o manifiestan durante la postcosecha, y que la incidencia de las mismas depende en gran medida de la variedad seleccionada.

En los últimos años, en el grupo de investigación de Fisiología y Biotecnología de Postcosecha del IATA se ha trabajado en dos de las alteraciones más comunes en la postcosecha de los frutos cítricos: los ‘daños de frío’ y el ‘colapso de la corteza’. En esta introducción se describen diferentes aspectos que hacen referencia a su morfología y a las causas que las originan. Además, se ofrece una visión global de los mecanismos fisiológicos, bioquímicos y moleculares conocidos hasta el momento, asociados a estas dos alteraciones, objeto del presente trabajo de investigación, y de los mecanismos implicados en la susceptibilidad de los frutos a desarrollar dichas fisiopatías inducidos por diferentes métodos de acondicionamiento.

1. Daños de frío

1.1. Causas y morfología

La conservación a bajas temperaturas de los productos hortofrutícolas es la técnica más empleada para prolongar su vida útil y mantener la calidad, ya que reduce la tasa de respiración de los frutos, la deshidratación, la incidencia de podridos y retrasa la senescencia. Además, en los frutos cítricos los tratamientos de cuarentena para el control de la mosca del mediterráneo (*Ceratitis capitata*), que se exigen para la exportación a países como Estados Unidos y Japón, se realizan a temperaturas próximas a 0 °C durante periodos de tiempo comprendidos entre 14 y 24 días (Martínez-Jávega *et al.*, 1999). Sin embargo, muchos cultivares de frutos cítricos son susceptibles a desarrollar ‘daños de frío’ cuando se almacenan a temperaturas inferiores a 10 - 15 °C (Pantastico *et al.*, 1968; Schirra y Mulas, 1995b). La sensibilidad al frío puede variar notablemente entre distintas especies, siendo en general los pomelos, limones y limas los más susceptibles. Los híbridos de mandarina como ‘Fortune’, y en menor medida ‘Nova’, pueden ser también muy sensibles a desarrollar dicha alteración fisiológica. Los síntomas se manifiestan fundamentalmente como un picado y áreas de color pardo que afectan al flavedo, aunque también pueden afectar en menor medida al albedo, o como un escaldado superficial que se limita fundamentalmente a la parte más externa de la corteza del fruto. Un ejemplo del primer tipo de síntomas mencionado lo presentan frutos de mandarina de la variedad ‘Fortune’ (Martínez-Jávega *et al.*, 1992; Sanchez-Ballesta *et al.*, 2003), mientras que algunas variedades de naranjas del grupo Navel, como ‘Navelate’, menos sensibles al frío, manifiestan el segundo tipo de síntomas (Alfárez *et al.*, 2005a) (Figura 1). En otros cultivares, como en algunas variedades de limón, esta alteración afecta principalmente al albedo que se oscurece de manera progresiva con el tiempo (Grierson, 1986). En ningún caso se produce una alteración de la calidad interna del fruto pero el deterioro de su aspecto externo deprecia su calidad y lo hace más susceptible al ataque por agentes patógenos (Chalutz *et al.*, 1985). El pardeamiento observado en estados avanzados de la alteración se ha relacionado con la disrupción del tonoplasto y la oxidación enzimática del contenido de las vacuolas, rico en sustancias fenólicas. Además, se ha sugerido que los cambios en las propiedades de la cutícula y de las membranas aparentemente modifican el balance hídrico de las áreas dañadas (Matile, 1984; Vercher *et al.*, 1994). La susceptibilidad al frío varía a lo largo de la campaña (Purvis *et al.*, 1979; Lafuente *et al.*, 1997), comprobándose que las horas de acumulación de frío en campo y las temperaturas a las que están expuestos los frutos antes de la recolección son factores que determinan la susceptibilidad de los frutos a desarrollar ‘daños de frío’ durante la postcosecha (Gonzalez-Aguilar *et al.*, 2000) De hecho, la mandarina ‘Fortune’, utilizada como modelo de estudio por su elevada susceptibilidad al frío, puede verse afectada por dicha alteración fisiológica tanto en campo como durante la postcosecha cuando los frutos se exponen a temperaturas inferiores a 10 °C (Agustí y Almela, 1989; Martínez-Jávega *et al.*, 1992; Martínez-Téllez y Lafuente, 1993)

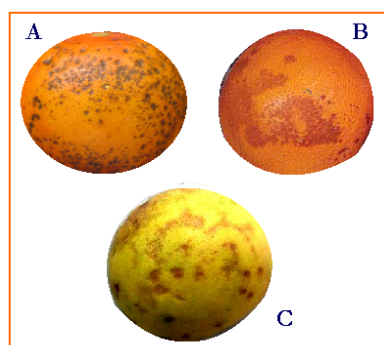


Figura 1: Síntomas de ‘daños de frío’ en diferentes especies de frutos cítricos. A) picado y áreas de color pardo en frutos de mandarina ‘Fortune’; B) escaldado superficial en frutos de naranja ‘Navelate’; C) picado y áreas de color pardo en frutos de pomelo blanco.

1.2. Métodos que reducen la incidencia de ‘daños de frío’

Los tratamientos de acondicionamiento térmico, la aplicación de hormonas y otros agentes químicos, como compuestos antioxidantes y fungicidas, así como la modificación de la atmósfera que rodea al producto mediante el empleo de atmósferas controladas (AC) o modificadas (AM), son algunos de los métodos que pueden reducir o retrasar la incidencia de ‘daños de frío’ en las especies vegetales (Wang, 1993). En este apartado se resumen los principales métodos ensayados para aumentar la tolerancia al frío en los frutos cítricos.

a) Tratamientos de acondicionamiento térmico.

Entre todos los métodos que se han utilizado en los últimos años, hoy por hoy los tratamientos de acondicionamiento térmico han resultado ser los más eficaces aumentando la tolerancia de los frutos cítricos al frío (Artes, 2000). Sin embargo, la eficacia de dichos tratamientos es muy variable y depende de factores precosecha tales como las condiciones ambientales a las que están expuestos los frutos antes de la recolección, el estado de maduración y el cultivar seleccionado (Lafuente *et al.*, 2005).

Los tratamientos de acondicionamiento térmico pueden realizarse a altas temperaturas (>30 °C) no letales para el fruto o a temperaturas intermedias entre las del crecimiento de la planta y las del frío, lo que comúnmente se denomina en inglés ‘hardening’. Estos tratamientos pueden aplicarse de forma previa o intermitente durante el almacenamiento de los frutos en frío.

La eficacia de los tratamientos de calor aumentando la tolerancia al frío de los productos hortofrutícolas depende de la combinación tiempo-temperatura aplicada y del calor de transmisión del medio empleado. Estos tratamientos pueden aplicarse de tres formas distintas: 1) en baños de agua caliente a 45 - 55 °C durante minutos-horas o en duchas a 50-70 °C durante segundos; 2) en aire saturado de vapor de agua a temperaturas que oscilan entre 40 y 50 °C; 3) en aire húmedo caliente entre 12 y 96 h a temperaturas comprendidas entre 35 y 46 °C (Lurie, 1998).

Los tratamientos de acondicionamiento térmico que emplean agua como medio transmisor de calor pueden ser más fáciles de implementarse industrialmente que los que emplean aire húmedo caliente y se ha comprobado que su eficacia puede aumentar mediante la aplicación de fungicidas (Wild, 1993; Rodov *et al.*, 1995; Schirra y Mulas, 1995a; Schirra y Ben Yehoshua, 1999). Sin embargo, la temperatura requerida para un tratamiento de corta duración que asegure un grado de efectividad adecuado está próxima a la temperatura que puede inducir ‘daños de calor’ en los frutos cítricos, cuyos síntomas se caracterizan por la aparición de escaldado superficial (Schirra y D'hallewin, 1997; Schirra *et al.*, 1997; Lafuente *et al.*, 2001a). Por otro lado, el margen de temperaturas en el que pueden

producirse cambios en la eficacia es muy estrecho. Además, para una misma variedad el bajo grado de reproducibilidad observado cuando se manipulan frutos cosechados en distintas campañas o en diferentes estados de maduración, que han estado expuestos a condiciones variables durante la precosecha, limitan su aplicación para aumentar la tolerancia al frío en los frutos cítricos (Schirra *et al.*, 1997; Lafuente *et al.*, 2001a).

Los tratamientos que emplean aire húmedo caliente a temperaturas más bajas (35-46 °C) y tiempos mayores son más reproducibles que los de inmersión en agua caliente y no producen daños en la piel (Lafuente *et al.*, 2005). Resultados previos han demostrado que un acondicionamiento de 3 días a 37 °C y alta humedad relativa (HR), comúnmente denominado ‘curado’, previene la aparición de ‘daños de frío’ en frutos muy sensibles al frío, como la mandarina de la variedad ‘Fortune’ (Martínez-Jávega *et al.*, 1994; Martínez-Téllez y Lafuente, 1997). Así, los frutos de esta variedad desarrollan ‘daños de frío’ aproximadamente a partir de 10 días de almacenamiento a 2 °C mientras que el tratamiento de curado previo al almacenamiento a bajas temperaturas evita la aparición de dichos daños durante al menos 60 días (Gonzalez-Aguilar *et al.*, 2000) Por otro lado, se ha comprobado que la eficacia de dicho tratamiento se reduce cuando se acorta la duración o la temperatura del mismo y por tanto, puede variar dependiendo del grado de susceptibilidad de los frutos al frío en el momento de ser cosechados (Gonzalez-Aguilar *et al.*, 1998). Numerosos estudios han puesto de manifiesto la eficacia de otros tratamientos de acondicionamiento térmico que emplean temperaturas intermedias entre las del crecimiento de la planta y las que ocasionan ‘daños de frío’ para aumentar la tolerancia al frío en los frutos cítricos, y que pueden realizarse de forma previa al almacenamiento a bajas temperaturas (Spalding y Reeder, 1983; McDonald *et al.*, 1985; Obenland *et al.*, 1997; Rivera *et al.*, 2006) o de forma intermitente durante el mismo (Davis y Hofmann, 1973; Cohen *et al.*, 1983; Martínez-Jávega y Cuquerella, 1984; Cohen, 1988; Artes *et al.*, 1993; Artes, 1995; Schirra y Mulas, 1995b; Schirra y Cohen, 1999; Porat *et al.*, 2003). Sin embargo, el curado es uno de los métodos más efectivos y su eficacia es muy reproducible independientemente de los factores precosecha a los que hayan estado expuestos los frutos antes de almacenarse en frío. Por ello, la aplicación de este tratamiento en la variedad de mandarinas ‘Fortune’, utilizada como modelo de estudio por su elevada susceptibilidad al frío, constituye una herramienta adecuada para el estudio de los mecanismos moleculares implicados en la adquisición de tolerancia al frío en los frutos cítricos.

b) Hormonas y otros tratamientos químicos.

Además de los tratamientos de acondicionamiento térmico, existen otros tratamientos que pueden aumentar, aunque en menor medida, la tolerancia al frío en los frutos cítricos (Wang, 1993). Así, se ha comprobado que la aplicación de la hormona etileno a frutos de mandarina ‘Fortune’ durante el almacenamiento a 2 °C reduce la incidencia del ‘daños de frío’ mientras que la aplicación de 1-metilciclopropeno (1-MCP), un inhibidor de la acción de esta hormona, la aumenta (Lafuente *et al.*, 2001b; Lafuente *et al.*, 2004). Este hecho concuerda con resultados obtenidos al aplicar otros inhibidores de la síntesis o acción del etileno en diversas variedades de frutos cítricos (Porat *et al.*, 1999; Lafuente *et al.*, 2001b). No obstante, el efecto del 1-MCP en la susceptibilidad al frío puede depender de la concentración a la que se aplica o de la variedad seleccionada (Dou *et al.*, 2005; Salvador *et al.*, 2006).

Existen pocos estudios acerca del efecto de la aplicación exógena de otras hormonas en la susceptibilidad al frío de los frutos cítricos. Se ha observado que la aplicación de ácido giberélico y otros reguladores del crecimiento como el ácido 2-4

diclorofenoxiacético y benziladenina, pueden reducir la incidencia de ‘daños de frío’ en frutos de pomelo (Ismail y Grierson, 1977), de lima (Sierra *et al.*, 1993) y de mandarina ‘Fortune’ (Zaragoza *et al.*, 1996). Por otro lado, se ha demostrado el efecto beneficioso de la aplicación de jasmonato y salicilato de metilo aumentando la tolerancia al frío en diversas especies vegetales (Ding *et al.*, 2001; Ding *et al.*, 2002; Fung *et al.*, 2004; Fung *et al.*, 2006). En frutos cítricos, Meir *et al.* (1996), observaron que el tratamiento con ácido jasmónico podía reducir tanto la severidad de los síntomas de ‘daños de frío’ como el porcentaje de frutos afectados aunque en ningún caso, a diferencia del curado, evitó su incidencia.

Además de la aplicación de hormonas, existen otros tratamientos químicos que pueden aumentar la tolerancia al frío en los cítricos. Así, se ha comprobado que el tratamiento exógeno con escualeno evita la aparición de ‘daños de frío’ en frutos de pomelo durante al menos 21 días de almacenamiento a 5°C (McDonald *et al.*, 1993a). La aplicación de nitrato cálcico justo antes o durante el cambio de color también puede reducir la incidencia de esta alteración en frutos de mandarina ‘Fortune’ en frío lo que se relacionó con una disminución de la permeabilidad de la cutícula (Zaragoza *et al.*, 1996). Por otro lado, la aplicación de los fungicidas tiabendazol e imazalil, en combinación con tratamientos de acondicionamiento térmico, además de controlar el crecimiento de agentes patógenos, puede favorecer la eficacia de éstos últimos en la reducción de ‘daños de frío’ aunque el efecto es variable según el cultivar seleccionado (Schiffmann-Nadel *et al.*, 1975; Wardowski *et al.*, 1975; McDonald *et al.*, 1991; Wild, 1993; Schirra *et al.*, 2002).

c) *Atmósferas controladas, modificadas y encerado.*

El empleo de atmósferas controladas (AC) y modificadas (AM) reduce la incidencia de ‘daños de frío’ en numerosas especies vegetales (Wang, 1993), incluyendo los frutos cítricos (Grierson, 1971; Hatton *et al.*, 1975). Su eficacia se ha relacionado con la alteración de los niveles de O₂ y CO₂ en la atmósfera de almacenamiento o en el interior de los frutos y con su efecto en la HR y deshidratación de los mismos. Así, se ha comprobado que el almacenamiento en AC con niveles bajos de O₂ o el empleo de envases que aumentan los niveles de CO₂ y reducen los de O₂, disminuyen la incidencia de esta alteración en frutos de naranja (Jahn *et al.*, 1969; Porat *et al.*, 2004b), mandarina (Artes, 1999) y pomelo (Porat *et al.*, 2004b). Por otro lado, el efecto de la HR en la susceptibilidad a los ‘daños de frío’ en los frutos cítricos no es claro ya que se han encontrado resultados contradictorios. Así, se ha comprobado que la utilización de envases que mantienen una elevada HR (>98%) y minimizan la pérdida de agua, pueden reducir la incidencia de ‘daños de frío’ (Pantastico *et al.*, 1968; Wardowski *et al.*, 1973; Porat *et al.*, 2004b) mientras que otros estudios apoyan la idea de que un elevado estatus hídrico podría favorecer la manifestación de esta alteración fisiológica (Purvis, 1984; Cohen *et al.*, 1994; Henriod *et al.*, 2005). Estos resultados concuerdan con un estudio realizado por Alférez *et al.* (2005a), que puso de manifiesto que se producía una mayor pérdida de agua en frutos de naranjas del mutante ‘Pinalate’ con respecto a su parental ‘Navelate’ durante el almacenamiento en frío a pesar de que este mutante es menos susceptible a desarrollar ‘daños de frío’. Además, concuerdan con resultados previos que mostraron que los tratamientos de calor aumentan la pérdida de agua y reducen la incidencia de ‘daños de frío’ (McDonald *et al.*, 1993a; Schirra *et al.*, 2004; Erkan *et al.*, 2005). Por tanto, la pérdida de agua no es un factor crítico en el desarrollo de síntomas de dicha alteración fisiológica como se había sugerido originalmente (Purvis, 1984; Cohen *et al.*, 1994).

La aplicación de altas concentraciones de CO₂ (10-35%), durante periodos cortos de tiempo antes o durante la conservación en frío puede reducir los ‘daños de frío’ y

retrasar la senescencia en algunas frutas y hortalizas (Kader *et al.*, 1974; Maldonado *et al.*, 2002; Maldonado *et al.*, 2004). En los frutos cítricos se ha comprobado su eficacia aumentando la tolerancia al frío en algunas variedades de pomelos (Wardowski *et al.*, 1988), naranjas (Martínez-Jávega *et al.*, 1987) y limones (Artes *et al.*, 1993), observándose resultados variables en función de la dosis y momento de aplicación. No obstante, este tipo de tratamiento no fue eficaz aumentando la tolerancia al frío en mandarina ‘Fortune’ muy susceptible al frío.

Aunque existen diversos estudios que han puesto de manifiesto que la aplicación de ceras puede aumentar la tolerancia al frío de algunos frutos, incluyendo los frutos cítricos (Paull, 1990; Wild, 1993), su eficacia es parcial y parece depender en gran medida de su composición y de la susceptibilidad varietal o de las condiciones precosecha a las que están expuestos los frutos antes de su recolección. Así, se ha comprobado que la aplicación de ceras de polietileno puede reducir la incidencia de algunas variedades de frutos de mandarina (Salvador *et al.*, 2000; Bajwa y Anjum, 2007) mientras que los resultados obtenidos en frutos de pomelo ‘Marsh’ por Dou (2004) mostraron una mayor eficacia de las ceras de goma laca respecto a las de polietileno.

2. ‘Colapso de la corteza’

2.1. Causas y morfología

El ‘colapso de la corteza’ es una alteración fisiológica conocida hace ya más de 30 años que puede iniciarse en los frutos antes de su recolección o posteriormente durante su almacenamiento a temperaturas superiores a las que causan ‘daños de frío’ (Albrigo y Brown, 1970; Zaragoza y Alonso, 1975; Agustí *et al.*, 2001; Lafuente y Sala, 2002; Alférez *et al.*, 2003). Entre las variedades de cítricos que son susceptibles a esta alteración se encuentran naranjas del grupo Navel como ‘Navelina’ (Casas y García-Bataller, 1986; Sala *et al.*, 1992b), ‘Washington Navel’, ‘Lane late’ (Henriod, 2006) y ‘Navelate’ (Agustí *et al.*, 2001; Alférez *et al.*, 2003), pero también se ha descrito en otros cultivares como naranjas ‘Shamouti’ (Ben-Yehoshua *et al.*, 2001; Ben Yehoshua *et al.*, 2001; Porat *et al.*, 2004b), pomelos ‘Marsh’ (Petracek *et al.*, 1998a; Alférez y Burns, 2004) y mandarinas ‘Fallglo’ (Petracek *et al.*, 1998b; Alférez *et al.*, 2005b). Los síntomas se caracterizan por la aparición de depresiones en la piel, más o menos circulares y de extensión variable, que suelen presentarse en la zona ecuatorial del fruto y que afecta tanto al flavedo como al albedo (Figura 2) (Casas y García-Bataller, 1986; Agustí *et al.*, 2001; Alférez y Burns, 2004). Agustí *et al.* (2001) observaron en frutos de naranja ‘Navelate’ que los síntomas iniciales se producen en la zona de transición entre el flavedo y el albedo. Estos autores sugieren que el desequilibrio entre el funcionamiento del plasmalema y del tonoplasto de las células colapsadas afecta a su capacidad osmoreguladora y favorece la pérdida de su contenido celular. Asimismo, la ruptura de las glándulas de aceite junto a la liberación de sustancias fenólicas presentes en las vacuolas podrían explicar el pardeamiento observado en estados más avanzados de esta alteración fisiológica (Matile, 1984; Casas y García-Bataller, 1986; Agustí *et al.*, 2001; Alférez y Burns, 2004). Por otro lado, un examen microscópico reveló que no existen diferencias en la morfología de la cutícula (espesor y contenido en ceras epicuticulares) ni en la permeabilidad de la misma entre células dañadas e intactas (Agustí *et al.*, 2001).

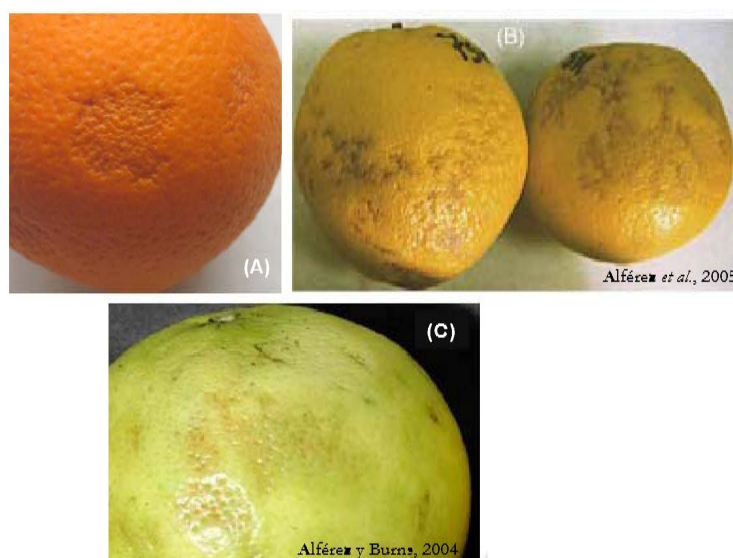


Figura 2: 'Colapso de la corteza'. A) naranjas 'Navelate'. B) naranjas 'Pinalate'. C) Pomelo 'Marsh'.

La incidencia de este tipo de alteración varía de un año a otro e incluso dentro de un mismo campo, y más aún, entre frutos procedentes de un mismo árbol (Zaragoza y Alonso, 1975; Almela *et al.*, 2000). Asimismo, la incidencia de esta alteración depende del pie del árbol comprobándose que frutos de 'Navelate' provenientes de árboles injertados sobre pie citrange Carrizo [*Citrus sinensis* (L.) Osb. X *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] eran mucho más susceptibles a desarrollar la alteración que aquellos provenientes de árboles injertados sobre pie de mandarina Cleopatra o naranjo amargo. Este hecho se relacionó con el mayor diámetro medio de los vasos conductores en el xilema del pedúnculo de los frutos que favorecían la deshidratación de los mismos (Agustí *et al.*, 2003). Otras observaciones en campo sugirieron que las condiciones ambientales, y en particular las que afectan al nivel de HR, influyen también de manera importante en la incidencia del 'colapso de la corteza' (Casas y García-Bataller, 1986; Almela *et al.*, 2000; Agustí *et al.*, 2001). En condiciones postcosecha, Lafuente y Sala (2002) observaron en frutos de naranja 'Navelina' almacenados a 22 °C y baja HR (55-60%) una menor incidencia de dicha alteración con respecto a los almacenados a igual temperatura pero a mayor HR (85-90%). En cambio, otros autores encontraron en otras variedades de naranjas que el uso de envases que mantienen una HR elevada reducía la incidencia de esta alteración fisiológica (Ben Yehoshua *et al.*, 2001; Porat *et al.*, 2004b; Henriod, 2006). Por otro lado, diversos estudios han demostrado que el cambio brusco a alta HR ambiental en frutos que han sido previamente deshidratados puede potenciar la incidencia de este desorden fisiológico en frutos de naranja 'Navelate' y 'Navelina' (Agustí *et al.*, 2001; Alférez y Zacarias, 2001; Alférez *et al.*, 2003), pomelo 'Marsh' (Alférez y Burns, 2004) y mandarinas 'Fallglo' (Alférez *et al.*, 2005b). Además, Alférez *et al.* (2005b) encontraron un coeficiente de correlación alto entre el índice de 'colapso de la corteza' y el porcentaje acumulado de pérdida de peso en frutos de pomelo deshidratados (30% HR) y transferidos a alta HR (90%). Estos estudios ponen de manifiesto la importancia del estatus hídrico de los frutos cítricos en la incidencia de esta alteración durante su manipulación postcosecha e indican que el grado de HR y los cambios producidos en la misma constituyen un factor importante en el desarrollo del 'colapso de la corteza'. No obstante, dicha incidencia depende además del cultivar o del pie

del árbol, de otros factores precosecha como el tamaño del fruto y su estado fisiológico, así como de las condiciones climáticas previas a la cosecha (Treeby *et al.*, 1995; Lafuente y Zacarias, 2006). De hecho, se ha comprobado que esta alteración se manifiesta también en frutos recolectados después de condiciones que no suponen un estrés hídrico en campo y almacenados en cámaras que mantienen un nivel constante y elevado de HR (90-95%) (Lafuente y Sala, 2002; Cajuste y Lafuente, 2007).

Diferentes estudios indican que la modificación de la atmósfera interna o de la que rodea al fruto podría ser un factor relevante en la incidencia del ‘colapso de la corteza’. Sin embargo, se han encontrado resultados contradictorios sobre el efecto de los niveles de O₂ y CO₂ en la incidencia de este desorden. Así, se ha sugerido en frutos de pomelo que la disminución de los niveles internos de O₂ en el interior de los envases, bien por la aplicación de ceras poco permeables o por el empleo de AC, puede favorecer la aparición de síntomas característicos de esta alteración (Petracek *et al.*, 1998a; Petracek *et al.*, 1998b). Otros autores encontraron un menor porcentaje de frutos de naranja y mandarina afectados al emplear envases que modificaban la atmósfera aumentando los niveles de CO₂ y disminuyendo los de O₂ (Porat *et al.*, 2004b). Sin embargo, Ben Yehoshua *et al.* (2001) observaron que otros envases que también aumentaban los niveles de CO₂ favorecían el ‘colapso de la corteza’. Además, estudios más recientes en pomelos deshidratados antes de transferirlos a HR elevada indican que la modificación de los niveles de O₂ y CO₂ no es el factor desencadenante de la alteración en frutos encerados (Alfárez y Burns, 2004). No obstante, estos autores indicaron que los niveles internos de CO₂ aumentaban como consecuencia del incremento en la respiración lo que podría aumentar la severidad del daño especialmente si éstos han sido previamente deshidratados.

2.2. Métodos que reducen la incidencia del ‘colapso de la corteza’

El mantenimiento de alta HR durante el almacenamiento puede reducir la incidencia del ‘colapso de la corteza’ (Ben Yehoshua *et al.*, 2001; Porat *et al.*, 2004b; Henriod, 2006), aunque es aconsejable evitar la exposición a cambios de humedad que alteren el estatus hídrico de la piel de los frutos (Casas y García-Bataller, 1986; Alfárez *et al.*, 2003; Alfárez *et al.*, 2005a). Así, es recomendable no recolectar los frutos tras un periodo de deshidratación provocado por elevadas temperaturas y descensos en la HR ambiental, así como tratar de minimizar, en la medida de lo posible, los saltos de HR en las atmósferas de conservación una vez éstos han sido cosechados o durante los procesos de lavado o encerado en frutos deshidratados.

El empleo de envases o recubrimiento con films que aseguren un grado adecuado de permeabilidad al vapor de agua y por tanto, mantengan niveles altos de HR, pueden reducir la incidencia de esta alteración fisiológica (Ben Yehoshua *et al.*, 2001; Porat *et al.*, 2004b; Henriod, 2006). Por otro lado, se ha sugerido que el lavado de los frutos, que puede eliminar o redistribuir el contenido natural de ceras de la cutícula, no es recomendable ya que podría favorecer la deshidratación de los mismos y aumentar la incidencia de ‘colapso de la corteza’ (Lafuente y Zacarias, 2006). No obstante, hay que tener en cuenta que la eficacia de estas medidas puede ser variable ya que puede depender de distintas condiciones precosecha a las que han estado expuestos los frutos. De hecho, Lafuente y Sala (2002) observaron que la incidencia del ‘colapso de la corteza’ puede ser menor en frutos de naranjas ‘Navelina’ almacenados a baja HR que en los almacenados a alta HR. Como se ha indicado anteriormente, el estatus hídrico (o el grado de deshidratación) de los frutos puede influir en la eficacia de estos tratamientos (Alfárez y Burns, 2004). Además, se ha demostrado que pequeñas diferencias en el régimen hídrico durante el almacenamiento de

los frutos puede producir diferencias importantes en la inducción de este desorden (Ben Yehoshua *et al.*, 2001).

Por otro lado, Petracek *et al.* (1998a) observaron que la aplicación de ceras de goma laca, y en menor medida de polietileno y carnauba, aumentaba la incidencia del ‘colapso de la corteza’ ya que se producía en todos los casos, una reducción de los niveles internos de O₂ y un aumento paralelo de los de CO₂. Otros autores, sin embargo, proponen que el encerado de los frutos ‘per se’ no desencadena el ‘colapso de la corteza’ aunque puede favorecer el daño en frutos expuestos a cambios de humedad durante el almacenamiento (Alfárez y Burns, 2004).

Distintos estudios han puesto de manifiesto que la incidencia del ‘colapso de la corteza’ se puede reducir o retrasar almacenando los frutos a bajas temperaturas de conservación (2-6 °C) (Ben Yehoshua *et al.*, 2001; Lafuente y Sala, 2002; Henriod, 2006) mientras que los tratamientos de acondicionamiento a altas temperaturas, muy eficaces reduciendo los ‘daños de frío’, pueden potenciarlo (Holland *et al.*, 2005).

El tratamiento exógeno con etileno inmediatamente después de la recolección en frutos maduros de naranja ‘Navelina’ y ‘Navelate’ reduce notablemente la incidencia de esta alteración fisiológica (Lafuente y Sala, 2002; Sala y Lafuente, 2004; Cajuste y Lafuente, 2007), siendo su eficacia dependiente de la concentración aplicada (Lafuente y Sala, 2002). La eficacia de esta hormona podría depender del estado de maduración del fruto o de la variedad. Así, no se observaron diferencias significativas en la incidencia del ‘colapso de la corteza’ entre frutos de mandarina ‘Fallglo’ cosechados antes del cambio de color, acondicionados o no con esta hormona (Petracek *et al.*, 1998b). A pesar de la eficacia del etileno reduciendo el ‘colapso de la corteza’ y que el desarrollo de esta alteración se retrasa y reduce almacenando los frutos en frío, conviene señalar que el efecto de la aplicación conjunta de ambos tratamientos es variable e incluso puede potenciar su incidencia (Lafuente *et al.*, 2008). Por otro lado, el efecto de la aplicación de 1-MCP puede depender de la concentración aplicada y de la variedad seleccionada. Así, por ejemplo, se comprobó en frutos de mandarina tratados con 500 µg L⁻¹ de 1-MCP una reducción significativa del 25% en el porcentaje de frutos afectados por esta alteración, mientras que concentraciones superiores de 1000 µg L⁻¹ potenciaba su incidencia. En cambio, en pomelos solamente se obtuvieron diferencias significativas cuando el tratamiento se aplicó a concentraciones superiores (2000 y 5000 µg L⁻¹) (Dou *et al.*, 2005).

3. Susceptibilidad de los frutos cítricos al frío y tolerancia inducida por los tratamientos de acondicionamiento térmico

3.1. Bases fisiológicas y bioquímicas

La respuesta primaria del ‘daño de frío’ no se conoce con exactitud aunque existe una opinión generalizada de que el estrés de frío provoca un cambio en la permeabilidad de la membrana plasmática y que la fluidez de la misma depende de la composición de fosfolípidos y la proporción de ácidos grasos insaturados de la bicapa lipídica (Lyons, 1973). Dicho cambio comportaría un desequilibrio de los procesos de intercambios de iones y metabolitos a través de la misma y, en consecuencia, la alteración de procesos metabólicos y la generación de una serie de respuestas secundarias que desencadenarían finalmente el desarrollo de síntomas característicos de dicha alteración (Wang, 1982). En condiciones extremas podría producir autólisis y muerte celular (Raison *et al.*, 1971; Lyons, 1973; Martin, 1986; Murata, 1990). Diversos estudios, incluyendo ensayos realizados en plantas transgénicas, indican que el grado de insaturación de los lípidos de membrana es un factor importante que confiere a las plantas la capacidad para percibir cambios de temperatura, y han relacionado la adaptación de las plantas al frío con un aumento del

porcentaje de ácidos grasos insaturados. No obstante, otros estudios indican que este no es un mecanismo universal para todas las especies vegetales (Parkin y Kuo, 1989). En los frutos cítricos, se ha comprobado que diversos lípidos pueden cambiar durante el proceso de aclimatación al frío en pomelos (Nordby *et al.*, 1987; Schirra, 1993), y que la exposición al frío de frutos de mandarina 'Fortune' incrementa el contenido total de lípidos aunque las modificaciones en el grado de insaturación de los ácidos grasos se producen al final del almacenamiento, cuando los daños son muy acusados. Por ello, se pensó que la elevada susceptibilidad al frío de esta variedad de mandarinas podría deberse en parte a una falta de reorganización de los lípidos de membrana o de reajuste del desequilibrio producido entre ambas fracciones insaturada/saturada de los ácidos grasos durante su almacenamiento a bajas temperaturas (Mulas *et al.*, 1996). Por otro lado, la falta de correlación entre el grado de insaturación de la fracción lipídica en el flavedo y el efecto beneficioso de tratamientos de calor intermitente o de acondicionamiento a altas temperaturas ha sido documentada (Mulas *et al.*, 1997; Schirra y Cohen, 1999). En tomate, sin embargo, sí se encontró buena correlación entre el grado de insaturación de los ácidos grasos y la tolerancia al frío inducida por distintos tratamientos de acondicionamiento a altas temperaturas (Lurie *et al.*, 1997).

Numerosos estudios han revelado que las situaciones de estrés en plantas, incluido el estrés de frío (Wise y Naylor, 1987a; Wise y Naylor, 1987b; Ju *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1995; Saruyama y Tanida, 1995), conducen a la alteración del balance producción/eliminación de especies reactivas de oxígeno (ROS) provocando condiciones de estrés oxidativo en la célula (Mittler *et al.*, 2004; Apel y Hirt, 2004; Fedoroff, 2006). Uno de los primeros estudios que puso de manifiesto la implicación de procesos de fotoperoxidación lipídica en el desarrollo de los 'daños de frío' fue realizado a finales de los años '80' por Wise y Nylon (1987a,b). Estos investigadores observaron en hojas de pepino expuestas al frío y a elevada luminosidad que se producía una caída en la concentración de antioxidantes, como clorofilas, carotenoides, ascorbato, glutatión y α -tocoferol, y un aumento en la peroxidación lipídica (Wise y Naylor, 1987b). Posteriormente, Hariyadi y Parkin (1991) sugirieron que el estrés oxidativo no es sólo una cuestión de fotoperoxidación sino que el incremento de productos de peroxidación lipídica puede ocurrir también en frutos de pepino almacenados a temperaturas que causan 'daños de frío' en oscuridad. Numerosos estudios corroboraron después esta hipótesis en diversos productos hortofrutícolas como calabacín (Wang, 1994), melones (Ben-Amor *et al.*, 1999), tomates (Fung *et al.*, 2006) y pimientos (Fung *et al.*, 2004) y, en el caso de los frutos cítricos, se ha propuesto que el estrés oxidativo puede participar en el desarrollo de dicha alteración fisiológica (Purvis *et al.*, 1995; Sala, 1998; Sala y Lafuente, 1999; Sanchez-Ballesta *et al.*, 2003).

La importancia de las ROS, fundamentalmente del anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^{\bullet}), radica es su elevada capacidad para reaccionar con ácidos grasos poliinsaturados de los lípidos de membrana, inducir ruptura y agregación de proteínas, aumentando su susceptibilidad al ataque de proteasas, y causar mutaciones y deleciones en los ácidos nucleicos que darían lugar al daño celular. Las plantas han desarrollado diferentes mecanismos para defenderse de estas especies evitando su formación o favoreciendo su eliminación (Mittler, 2002; Mittler *et al.*, 2004; Moller *et al.*, 2007). En el primer caso, una vía alternativa que consume oxígeno y evita que el oxígeno molecular reaccione con las ubisemiquinonas es la vía de la respiración alternativa mediada por la oxidasa alternativa (AOX), que de esta forma evita la generación de ROS (Moller, 2001). La participación de la respiración alternativa en la tolerancia al frío en los frutos cítricos fue propuesta inicialmente por Purvis (1985) quien observó que los frutos

cosechados del interior del árbol eran menos susceptibles a desarrollar ‘daños de frío’ respecto a los situados en la parte exterior y presentaban una mayor respiración alternativa. Estudios posteriores en frutos de pimiento corroboraron esta hipótesis, ya que se encontró una correlación negativa entre los niveles de actividad de la enzima AOX, o en la acumulación de su mensajero, y la susceptibilidad al frío de este fruto (Purvis, 2001; Fung *et al.*, 2004).

Las diferencias observadas en la actividad de las enzimas del sistema antioxidante superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APX) y glutatión reductasa (GR), que favorecerían la eliminación de ROS, se han relacionado con la mayor tolerancia al frío de frutos de mandarina ‘Clementina’ y ‘Clemenules’ respecto a las mandarinas ‘Fortune’ y ‘Nova’ (Sala, 1998; Sala y Lafuente, 2000). Asimismo, se ha comprobado que el tratamiento de curado (3 días 37 °C), que induce tolerancia al frío en la mandarina ‘Fortune’, aumenta la actividad de las enzimas CAT, APX y SOD y que estas diferencias se mantienen durante el almacenamiento de los frutos a 2 °C (Sala y Lafuente, 1999). Además, el hecho de que: 1) un inhibidor específico de la actividad CAT revierte la eficacia del curado; 2) la eficacia de diferentes métodos de acondicionamiento a altas temperaturas se relacione con el nivel de inducción y el tiempo de persistencia de la actividad CAT durante la exposición de los frutos a las bajas temperaturas, y 3) la mayor actividad de la enzima CAT en el mutante de naranjas ‘Pinalate’ que es tolerante al frío respecto de su parental ‘Navelate’, susceptible a desarrollar ‘daños de frío’, sugiere un papel clave de esta enzima en el proceso de inducción de tolerancia al frío en los frutos cítricos (Sala y Lafuente, 2000; Sala *et al.*, 2005).

Teniendo en cuenta la capacidad antioxidante y estabilizadora de membranas de las poliaminas (Drolet *et al.*, 1986), se ha prestado considerable atención al estudio de su posible implicación en la tolerancia al frío de los productos hortícolas (Serrano *et al.*, 1996). El primer estudio que puso de manifiesto la acumulación de putrescina, poliamina mayoritaria en el flavedo, durante el desarrollo de ‘daños de frío’ fue realizado en los años ‘80’ por McDonald y Kushad (1986) en pomelo. Estos autores observaron un incremento en putrescina en los frutos almacenados en frío por lo que sugirieron que la incidencia y desarrollo de dicha alteración podían estar relacionadas con el contenido de esta poliamina. Por otro lado, Rodov *et al.* (1995) observaron que la concentración de putrescina aumentaba durante el acondicionamiento de frutos de pomelo y limón a altas temperaturas (53 °C 2-3 min). Sin embargo, se ha comprobado que el acondicionamiento de frutos de limón durante 3 ó 7 días a 21 °C y 27 °C aumenta la concentración de putrescina pero no de espermina o espermidina (McDonald, 1989). Además, estudios posteriores en los que se comparó el efecto del almacenamiento de mandarinas ‘Fortune’, cosechadas en distintos estados de maduración, a temperaturas que causaban o no ‘daños de frío’ (Gonzalez-Aguilar *et al.*, 1998) y de diferentes tratamientos de acondicionamiento, que inducen distinto grado de tolerancia al frío, en la concentración de las poliaminas putrescina, espermina y espermidina (Gonzalez-Aguilar *et al.*, 1997; 2000), mostraron que estas aminas no desempeñan un papel determinante en la adaptación de los frutos cítricos al frío.

La reacción de desaminación del aminoácido L-fenilalanina para formar el ácido trans-cinámico está catalizada por la enzima L-fenilalanina amonio-liasa (PAL; EC 4.3.1.5) y constituye el primer paso en la ruta de biosíntesis de fenilpropanoides tales como antocianinas, flavonoides, isoflavonoides y cumarinas, entre otros. El aumento de actividad de esta enzima y del contenido de diversos fenilpropanoides podrían formar parte de los mecanismos de defensa de diversos sistemas vegetales en respuesta a una gama muy amplia de estreses bióticos y abióticos que causan daños celulares (Dixon y Paiva, 1995). Sin

embargo, esta enzima puede participar también en el desarrollo de diversos desórdenes fisiológicos que se manifiestan como zonas necrosadas (Hyodo *et al.*, 1978; Ke y Saltveit, 1989). En los cítricos, se ha demostrado que tanto la actividad PAL como la acumulación del transcrito del gen *FPAL2* aumentan en respuesta al frío en frutos de mandarina 'Fortune' y que dichos aumentos se producen con la aparición de los primeros síntomas de 'daños de frío', que se manifiestan en este cultivar en forma de picado (Martínez-Téllez y Lafuente, 1997; Sanchez-Ballesta *et al.*, 2000a), y son mucho más marcados en las zonas de tejido necrosado. Es interesante señalar que este aumento de actividad PAL en respuesta al frío solamente se produce en variedades susceptibles de desarrollar 'daños de frío' (Martínez-Téllez y Lafuente, 1993; Lafuente *et al.*, 2003; Sala *et al.*, 2005) y que el perfil de actividad PAL depende del cultivar y del tipo de daño celular. Así, en frutos de mandarina 'Fortune', la actividad PAL aumenta de forma progresiva a lo largo de todo el periodo de almacenamiento en frío a medida que aumenta el área del fruto con zonas dañadas o picadas, mientras que en frutos de naranja 'Navelate' este incremento es transitorio y se produce al inicio de los primeros síntomas de daño (Sala *et al.*, 2005). Además, se ha observado que la aplicación de un inhibidor específico de la actividad de esta enzima favorece el desarrollo de 'daños de frío', lo que sugiere que la PAL podría tener un papel protector en los frutos cítricos frente al frío (Lafuente *et al.*, 2001b). Sin embargo, la capacidad de los frutos cítricos para activar la PAL en respuesta al frío puede depender del estado de maduración del fruto, siendo en los frutos más maduros donde se producen los mayores incrementos (Lafuente *et al.*, 2003). Por otro lado, aunque se ha sugerido que la eficacia del tratamiento de curado (3 días 37 °C) previniendo la aparición de 'daños de frío' en frutos de mandarina 'Fortune' podría estar relacionada con una inducción transitoria de la actividad PAL durante la exposición de los frutos al calor (Sanchez-Ballesta *et al.*, 2000b), se ha demostrado que el incrementar la actividad PAL antes de exponer los frutos de este cultivar al frío no reduce la incidencia de esta alteración (Lafuente *et al.*, 2001b). Se ha comprobado, además, que en los frutos previamente curados no se produce un incremento en la actividad PAL una vez realizada la transferencia de los frutos al frío, hecho que se relacionó con que los frutos curados no presentaban daños y, por tanto, no resultaba necesaria la síntesis de fenilpropanoides para reducir, aunque no evitar, los 'daños de frío', (Martínez-Téllez y Lafuente, 1997). Un estudio posterior puso de manifiesto que el curado inhibía la actividad PAL inducida por el frío pero no la acumulación del transcrito, lo que indicaba que el efecto del choque de calor sobre la actividad de la enzima en los frutos almacenados en frío se producía a nivel post-transcripcional (Sanchez-Ballesta *et al.*, 2000b). El pardeamiento asociado a desórdenes fisiológicos en productos hortícolas se ha relacionado también con las enzimas polifenol oxidasa (PPO) (Pesis *et al.*, 2002) y peroxidasa (POD) (Ke y Saltveit, 1988), aunque esta última puede participar en procesos de defensa de las plantas disminuyendo la formación de ROS (Mittler, 2002). En cambio, en frutos de mandarina 'Fortune' se ha comprobado que no existían diferencias en la actividad de ninguna de ellas en frutos almacenados a temperaturas que causan 'daños de frío' y se ha sugerido que la adquisición de tolerancia al frío inducida por el tratamiento de acondicionamiento térmico en frutos de esta variedad podría estar relacionada con la mayor actividad observada de la segunda de estas enzimas, la POD, en los frutos previamente acondicionados (Martínez-Téllez y Lafuente, 1997). El incremento en actividad PAL podría favorecer la síntesis de compuestos fenólicos que participasen en el sellado de heridas (Ismail y Brown, 1979) y también, dada su naturaleza antioxidante (Manthey, 2004), proteger a los frutos frente al estrés oxidativo. Aunque no se han encontrado diferencias significativas en el contenido de fenoles totales en frutos cítricos almacenados a temperaturas que causan o no daños de frío, o en frutos almacenados en frío habiendo sido sometidos o no al tratamiento de curado (Martínez-Téllez, 1993), se ha sugerido

recientemente que la escoparona puede estar relacionada con la tolerancia al frío de los frutos cítricos y con el efecto protector de los tratamientos de acondicionamiento a altas temperaturas (Lluch, 2006). Así, se encontró que la concentración de esta cumarina, hasta el momento relacionada con la defensa de los frutos cítricos frente a la infección por hongos como *Penicillium digitatum* (Afek y Szejnberg, 1988; Kim *et al.*, 1991; Rodov *et al.*, 1992; Ortuño *et al.*, 1997), era mayor en frutos recién cosechados de mandarina 'Hernandina', tolerante al frío, que en frutos de mandarina 'Fortune' muy susceptibles a dicha alteración y que el tratamiento de curado seguido de la exposición de los frutos de 'Fortune' a 2 °C, podría favorecer las reacciones de O-metilación y con ello, la síntesis de esta cumarina. Aunque no se conoce el modo de acción de este compuesto protegiendo los sistemas vegetales frente al frío, se ha descrito su capacidad inhibidora de procesos de peroxidación lipídica no enzimática, debido a su acción quelante de iones hierro y, en animales, se ha demostrado que es capaz de secuestrar aniones superóxido que inducen estrés oxidativo (Hoult y Paya, 1996).

El papel del etileno en la tolerancia al frío de los sistemas vegetales es complejo ya que puede reducir o potenciar la manifestación de los síntomas de daño. Su eficacia depende de la especie o cultivar, del tipo de síntomas y del efecto del mismo sobre los mecanismos implicados en el desarrollo de dichos síntomas (Lafuente *et al.*, 2005). Numerosos estudios han demostrado que en los frutos cítricos sensibles al frío se produce un incremento en la producción de etileno durante el almacenamiento de los frutos a 2 °C (Cooper *et al.*, 1969; McCollum y McDonald, 1991) y que éste ocurre en paralelo al desarrollo de los síntomas de 'daño de frío' (McCollum y McDonald, 1991; Martínez-Téllez y Lafuente, 1997; Lafuente *et al.*, 2003). Este aumento parece ser el resultado del efecto del estrés de frío en los precursores o enzimas que intervienen en su síntesis, ya que aumenta la concentración del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) y la actividad de la enzima ACC oxidasa (ACO). Dichos cambios se han relacionado con la expresión del gen *ACO* y de uno de los que codifica ACC sintasa (*ACS2*) identificados hasta la fecha, que se acumulan fundamentalmente en las áreas de tejido afectadas por los 'daños de frío'. (Zacarias *et al.*, 2003). Se ha comprobado que dicho incremento en etileno no es responsable del desarrollo de los síntomas de 'daños de frío' en los frutos cítricos sino que constituye un sistema de defensa y participa reduciendo la severidad de los mismos. Así, se ha comprobado en mandarinas 'Fortune' almacenadas a 2 °C que la aplicación de etileno durante el almacenamiento de los frutos en frío reduce la incidencia del 'daños de frío' (Lafuente *et al.*, 2004), mientras que la aplicación de inhibidores de la síntesis y acción de esta hormona favorece el daño en éste y otros cultivares sensibles al frío (Martínez-Téllez *et al.*, 1995; Porat *et al.*, 1999; Lafuente *et al.*, 2001b; Lafuente *et al.*, 2004). Estos resultados pusieron de manifiesto que el incremento de los niveles basales de etileno son necesarios para frenar el desarrollo del daño producido durante la exposición de los frutos cítricos al frío (Lafuente *et al.*, 2001b).

Los mecanismos por los cuales el etileno actúa protegiendo a los frutos cítricos frente al estrés de frío no se conocen con exactitud, aunque se ha demostrado que el efecto beneficioso de esta hormona puede estar relacionado en parte con su efecto aumentando la actividad PAL a bajas temperaturas. Así, en los frutos cítricos el incremento en la producción de etileno en respuesta al estrés de frío fue acompañado de un aumento en la actividad PAL (Martínez-Téllez y Lafuente, 1997). Además, Lafuente *et al.* (2001b) observaron que la aplicación de inhibidores de la síntesis del etileno disminuía la actividad de esta enzima inducida por el frío y favorecía el daño, mientras que la aplicación de la hormona durante el almacenamiento de los frutos en frío, que reduce la alteración, la aumentó (Lafuente *et al.*, 2004). Por otra parte, la aplicación de inhibidores de la acción del

etileno puso de manifiesto otra vía independiente de inducción de la PAL que podía estar relacionada con el daño (Lafuente *et al.*, 2001b). En otros frutos como el melón, el etileno puede favorecer el ‘daño de frío’ y esto se ha relacionado con el efecto de la hormona disminuyendo la actividad de las enzimas del sistema antioxidante (Ben-Amor *et al.*, 1999). En cambio, en los frutos cítricos el etileno aplicado a bajas temperaturas origina un incremento transitorio de la actividad CAT y no afecta a las enzimas SOD, APX, GR ni a la POD libre o unida a pared. Teniendo en cuenta que la actividad CAT no se mantiene durante periodos prolongados de almacenamiento en frío, a pesar de que el etileno sigue siendo efectivo reduciendo los síntomas de daño, se ha sugerido que la implicación de esta enzima en la tolerancia al frío inducida por el etileno es limitada (Lafuente *et al.*, 2004).

El ácido abscísico (ABA), al igual que el etileno, puede participar en las respuestas de defensa de las plantas frente a distintas situaciones de estrés, incluido el frío (Wang, 1993). Estudios llevados a cabo para determinar la implicación de esta hormona en la sensibilidad al frío de los frutos cítricos han dado lugar a resultados contradictorios. Así, en pomelos se observó un paralelismo entre la susceptibilidad al frío y el contenido de ABA en frutos cosechados en distinto estado de maduración y en frutos acondicionados a 29 °C o con etileno, que presentaron mayores concentraciones de ABA (Kawada, 1980). Por contra, Lafuente *et al.* (1997) observaron en frutos de mandarina ‘Fortune’, una falta de correlación entre la susceptibilidad a desarrollar esta alteración fisiológica y el contenido en ABA en el momento de la cosecha a lo largo de la campaña. Estos mismos autores comprobaron que un tratamiento de acondicionamiento con etileno, que favorece la incidencia de ‘daños de frío’, aumenta la concentración de ABA en frutos de esta variedad de mandarinas mientras que el tratamiento de curado (3 días a 37 °C) la disminuye. Estos resultados indicaban que en el mecanismo que induce tolerancia al frío no interviene el ABA, hecho que se confirmó al comprobar que la aplicación de esta hormona aumentaba el daño producido por el frío (Gosalbes *et al.*, 2004). Además, se ha comprobado que los frutos de naranja ‘Pinalate’, deficiente en esta hormona, no desarrollan ‘daños de frío’ cuando se almacenan a bajas temperaturas de conservación, a diferencia de su parental ‘Navelate’ que sí es sensible al frío (Alfárez *et al.*, 2005a).

La implicación del metabolismo de carbohidratos en la tolerancia al frío de las plantas se ha sugerido en base a que éstos pueden actuar como osmoreguladores y el estrés de frío puede llevar implícito un estrés hídrico. Diversos estudios realizados en semillas y hojas de tomate mostraron que cambios en la susceptibilidad al frío podían estar relacionados con cambios en el contenido de algunos carbohidratos, como la sacarosa o el almidón, lo que sugirió que estos compuestos podían participar en las respuestas de defensa de las plantas frente al estrés de frío (King *et al.*, 1988; Keller y Steffen, 1995). En los frutos cítricos, Purvis y Grierson (1982) observaron que la tolerancia al frío de frutos de pomelo aumentaba con la acumulación de glucosa y fructosa y la disminución de sacarosa a lo largo de la campaña. Sin embargo, Holland *et al.* (1999) demostraron que el incremento en azúcares reductores durante el invierno en mandarinas ‘Fortune’ no precedía a la tolerancia al frío. Por contra, los frutos que presentaban mayores concentraciones de glucosa y fructosa, y también de almidón, fueron los que presentaron más ‘daños de frío’ durante el almacenamiento a bajas temperaturas. Asimismo, comprobaron que mientras que los niveles de azúcares reductores aumentaban durante los meses más fríos, los de sacarosa se mantenían constantes e inferiores a éstos. Sin embargo, la actividad sacarosa fosfato sintasa (SPS) fue muy baja y la de las enzimas invertasa ácida y alcalina y de la sacarosa sintasa (SS), medida en el sentido de la degradación de sacarosa, aumentó con la maduración del fruto durante los meses de invierno. Estos resultados indicaron, de acuerdo a la idea planteada

originalmente por Echeverría *et al.* (1988; 1992), que podría existir una traslocación de sacarosa desde otras partes de la planta al fruto. Además, Holland *et al.* (1999) sugirieron que estos cambios en carbohidratos solubles en mandarina 'Fortune' estaban más relacionados con el proceso de maduración que con las bajas temperaturas a las que estaban expuestos los frutos durante este proceso ya que se habían observado cambios similares a lo largo de la maduración en otros cultivares de frutos cítricos que maduran en el campo en condiciones climáticas diferentes (Purvis y Grierson, 1982; Tadeo *et al.*, 1987) o en frutos que maduran en invernadero a temperatura que no causa 'daños de frío' (Sala *et al.*, 1992a). Otros resultados que cuestionaron la participación de los azúcares reductores, así como del almidón, en la tolerancia al frío de los frutos cítricos, pusieron de manifiesto que el acondicionamiento a elevadas temperaturas (3 días 37 °C), que era muy efectivo reduciendo el 'daño de frío', en mandarinas 'Fortune' y naranjas 'Navelate' favorecía la caída de estos carbohidratos durante el almacenamiento a 2 °C (Holland *et al.*, 2002; Holland *et al.*, 2005). Por contra, la sacarosa y dos de las enzimas claves en su síntesis (SPS y SS) se relacionaron con el efecto beneficioso del tratamiento (Holland *et al.*, 2002; Holland *et al.*, 2005). No obstante, la participación de la sacarosa en el efecto beneficioso del curado no es limitante ya que en frutos inmaduros el efecto del curado en los cambios en sacarosa es poco marcado y el tratamiento sigue siendo muy efectivo (Holland *et al.*, 2002). Otros resultados que sugieren la implicación de la sacarosa en la tolerancia de los frutos cítricos al frío pusieron de manifiesto que la concentración de este azúcar y la actividad de las enzimas SS y SPS en frutos recién cosechados de naranjas 'Pinalate', tolerantes al frío, eran muy superiores a los encontrados en frutos de 'Navelate' que es sensible al frío (Holland *et al.*, 2005).

3.2. Bases Moleculares de los 'daños de frío' y del efecto beneficioso del tratamiento de curado que reduce dicha alteración fisiológica

La mayor parte de lo que se conoce hasta el momento sobre los mecanismos moleculares asociados con la tolerancia al frío en los frutos cítricos deriva de estudios de cambios de expresión génica llevados a cabo de forma individual con determinados genes. En los frutos cítricos, se generó una biblioteca substractiva de cDNA de flavedo de frutos de mandarina 'Fortune' enriquecida en genes que se expresaban diferencialmente en respuesta a un tratamiento de acondicionamiento térmico de 3 días a 37 °C (curado) y cuya expresión persistía una vez transferidos los frutos a frío o en respuesta a la combinación de calor y frío (Sanchez-Ballesta *et al.*, 2003). Posteriormente, Sapitnitskaya *et al.* (2006) construyeron dos bibliotecas substractivas de cDNA a partir del flavedo de frutos de pomelo 'Star Ruby' acondicionados en baños de agua caliente a 62 °C 20 s y almacenados 24 h a 2 °C, y de frutos de la misma variedad inmediatamente después de ser acondicionados en aire húmedo a 16 °C durante 7 días. Actualmente, los estudios moleculares que emplean micromatrices de cDNA permiten evaluar cambios de expresión de grandes conjuntos de genes de forma simultánea en respuesta a diferentes tipos de estrés o asociados con diversos procesos del desarrollo en numerosas sistemas vegetales, principalmente en *A. thaliana* (Seki *et al.*, 2001; Seki *et al.*, 2002), pero también en tomate (Zhan *et al.*, 2004) o en arroz (Rabbani *et al.*, 2003). En el caso de los frutos cítricos, este trabajo, realizado dentro del marco del Consorcio de Genómica Funcional de Cítricos (CFGP), constituye una de las primeras aproximaciones al estudio global de los cambios de expresión mediante el uso de micromatrices de cDNA en respuesta al almacenamiento a bajas temperaturas que causan 'daños de frío' o asociados al efecto beneficioso del curado (3 días 37 °C) que evita la incidencia de dicha alteración. No obstante, conviene señalar que durante la fase final de elaboración de esta memoria, se han publicado los resultados de un

estudio transcriptómico, llevado a cabo por Maul *et al.*, (2008), sobre los mecanismos implicados en la tolerancia al frío inducida en frutos de pomelo mediante un tratamiento previo de acondicionamiento de 7 días a una temperatura intermedia (16 °C) que no supone un choque de calor para el fruto.

En muchas plantas, la exposición a cambios graduales de la temperatura ambiental induce tolerancia a temperaturas extremas que causan daños en la célula. La mayor parte de lo que se conoce hasta la fecha deriva de estudios realizados con plántulas de *A. thaliana*, que aunque no desarrollan ‘daños de frío’ a bajas temperaturas, superiores a las de congelación, su acondicionamiento a temperaturas de frío (1-2 °C) activa un conjunto de mecanismos que confieren a la planta la capacidad para resistir ulteriores temperaturas de congelación y que se conoce con el nombre de ‘aclimatación al frío’ (Seki *et al.*, 2001; Thomashow, 2001; Fowler y Thomashow, 2002). Dichos mecanismos implican la activación de genes que codifican elementos sensores como la proteína calmodulina, de proteínas que participan en procesos de transducción de señal entre las que se encuentran las proteínas MAP quinasas (MAPK), y de factores de transcripción que regulan la expresión de otros genes en la respuesta al estrés (Heino y Palva, 2003; Seki *et al.*, 2003). Las alteraciones en los lípidos y composición de carbohidratos, la activación de genes que codifican enzimas que desdoblan las reservas de almidón y sacarosa aumentando los niveles de azúcares solubles, que actúan como agentes osmoprotectores y mantienen el potencial hídrico intracelular estabilizando la estructura de las membranas y de las macromoléculas, la acumulación de otros solutos compatibles como prolina, betaína (Lynch y Steponkus, 1987; Thomashow, 1994; Bohnert *et al.*, 1995) y la activación de canales de intercambio iónico (Knight *et al.*, 1996), son algunas de las respuestas que se producen durante la exposición al frío y que podrían tener un papel relevante en la tolerancia a la congelación. (Kaplan y Guy, 2004; Kaplan *et al.*, 2006; Kaplan *et al.*, 2007). Por otro lado, un estudio previo llevado a cabo por Provart *et al.* (2003) con mutantes de *A. thaliana* que desarrollan ‘daños de frío’ cuando se exponen a una temperatura de 13 °C (temperatura que en inglés se denominó con el término ‘chilling’) pero no a temperaturas más bajas de frío (4 °C), puso de manifiesto que la activación de genes que participan en la síntesis de proteínas, incluyendo proteínas de unión a RNA necesarias para la traducción, RNA helicasas o proteínas Clp que participan en la conformación y procesamiento de las proteínas sintetizadas, es necesaria en el proceso que induce tolerancia a las temperaturas que causan ‘daños de frío’. Asimismo, estos autores observaron en mutantes letales expuestos a 13 °C una alteración a nivel transcripcional de genes cuyos productos se acumulan en el cloroplasto así como en la regulación de componentes del metabolismo de carbohidratos y de la maquinaria de fijación del carbono que conllevaría cambios en la tasa de fotosíntesis y generación de energía. Además, el análisis fenotípico reveló que existían diferencias entre los mutantes crecidos a 13 °C y a 4 °C, lo que sugirió que las respuestas moleculares que se inducen a ambas temperaturas son diferentes (Provart *et al.*, 2003). Por otro lado, entre los genes identificados hasta el momento en plantas que modifican su expresión en respuesta al estrés de frío, también denominados genes COR (del inglés ‘cold-regulated’), se incluyen genes que codifican enzimas desaturasas de lípidos de membrana (Kodama *et al.*, 1995), genes relacionados con la defensa de la planta frente al estrés oxidativo (Scandalios, 1990), genes que codifican pequeñas proteínas hidrofílicas denominadas dehidrinas (dhn-) o proteínas LEA (del inglés ‘late embryogenesis abundant’) (Lin *et al.*, 1990; Close, 1997), y otros genes implicados en la síntesis de proteínas con propiedades crioprotectoras y anticongelantes, que presentan alto grado de homología con proteínas PR (del inglés ‘pathogenesis-related’) (Hon *et al.*, 1994).

La aparición de respuestas comunes a diferentes tipos de estrés ha sugerido la existencia de un proceso de protección cruzada mediante el cual la exposición a un estrés

confiere tolerancia a otro que tiene lugar a posteriori y que incluso puede ser de naturaleza distinta. Este hecho podría explicar la eficacia de los tratamientos de acondicionamiento a altas temperaturas, no letales, que inducen tolerancia a temperaturas que causan ‘daños de frío’ o ‘daños de congelación’. Sin embargo, los cambios moleculares asociados a este proceso han sido poco estudiados y se han llevado a cabo en plantas, fundamentalmente en *A. thaliana*, después de breves (30 min-6 h) exposiciones a altas temperaturas (>30 °C) (Lee *et al.*, 1999; Heino y Palva, 2003; Krishna, 2003). Además de las HSPs (Parsell *et al.*, 1993; Sabehat *et al.*, 1998b; Iba, 2002; Krishna, 2003), se han identificado varios genes regulados por el calor, tales como los que codifican una triosa fosfato isomerasa y una aldolasa (Wang *et al.*, 2001). En frutos que desarrollan ‘daños de frío’ cuando se almacenan a bajas temperaturas, en los últimos años se ha profundizado en el conocimiento de los mecanismos moleculares de las respuestas que se inducen a dichas temperaturas necesarias para prolongar la vida útil durante la postcosecha. Asimismo, se ha profundizado en el estudio de los cambios moleculares que ocurren durante su exposición a temperaturas de acondicionamiento altas o intermedias entre las del crecimiento de la planta y las que causan la alteración, que inducen tolerancia al frío o frente al efecto protector de diversos tratamientos como la aplicación de jasmonato y salicilato de metilo que reducen también la incidencia de la alteración. Así, destaca el tomate (Sabehat *et al.*, 1996; Kadyrzhanova *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1999; Kerdnaimongkol y Woodson, 1999; Li *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2005b; Fung *et al.*, 2006), el pimiento (Fung *et al.*, 2004) o los frutos cítricos (Sanchez-Ballesta *et al.*, 2000a; Sanchez-Ballesta *et al.*, 2000b; Porat *et al.*, 2002a; Porat *et al.*, 2002b; Lafuente *et al.*, 2003; Sanchez-Ballesta *et al.*, 2003; Porat *et al.*, 2003; Gosalbes *et al.*, 2004; Sanchez-Ballesta *et al.*, 2004; Rozenzviég *et al.*, 2004; Porat *et al.*, 2004a; Sanchez-Ballesta *et al.*, 2006; Sapitnitskaya *et al.*, 2006).

Como se ha mencionado anteriormente, todavía no se conoce con precisión el origen de la incidencia de los ‘daños de frío’ aunque la mayor parte de los autores sugieren que los cambios de fase de la fracción lipídica de la membrana plasmática de las células son determinantes en los cambios de permeabilidad de la misma (Lyons, 1973). Los estudios llevados a cabo con plantas transgénicas que sobreexpresan o carecen de genes que codifican distintos tipos de desaturasas indican que éstas podrían participar en el grado de percepción a las bajas temperaturas apoyando así la idea planteada originalmente por algunos autores (Silvius, 1982; Somerville, 1995). Así, en plantas de tabaco la sobreexpresión del gen *FAD7* de *A.thaliana* (Kodama *et al.*, 1994; Kodama *et al.*, 1995) o del gen *Δ9-desaturasa* de cianobacterias (Ishizaki-Nishizawa *et al.*, 1996), aumentó la tolerancia al frío. En plantas de arroz y tabaco, la de dos genes que codifican una glicerol 3-fosfato aciltransferasa de cloroplastos de *A. thaliana* (*AGPAT*) y de espinaca (*SGPAT*), respectivamente, también disminuyó la susceptibilidad al frío y mejoró la capacidad de fotosíntesis y de crecimiento a bajas temperaturas (Murata *et al.*, 1992; Murata y Tasaka, 1997; Yokoi *et al.*, 1998; Ariizumi *et al.*, 2002). Asimismo, se ha comprobado que mutantes de *A. thaliana* que contienen niveles reducidos de ácidos grasos poliinsaturados debido a la disrupción de genes que codifican desaturasas desarrollan ‘daños de frío’ cuando se exponen durante periodos prolongados a temperaturas de frío (Hugly *et al.*, 1989; Miquel *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 1997; Routaboul *et al.*, 2000). Por ejemplo, mutantes de *A. thaliana* *fad5* y *fad 6* que desarrollaban ‘daños de frío’ a 6 °C llegaban a manifestar clorosis (Hugly y Somerville, 1992). Además, la sobreexpresión de un gen *plsB* de *E. coli* que codifica una glicerol 3-fosfato aciltransferasa selectiva de sustratos acil-ACP saturados (Wolter *et al.*, 1992) o la disminución de la expresión de un gen que codifica una proteína transferasa de aminofosfolípidos (*ALA1*) (Gomès *et al.*, 2000), incrementó la sensibilidad al frío de plantas de *A. thaliana* que mostraron ‘daños de frío’ a 8-12 °C. Por otro lado, se han identificado genes nsLTP (del inglés ‘non-specific lipid transfer protein’), que codifican proteínas de

transporte de lípidos que participan en la biogénesis de la membrana (Kader, 1996), que se expresan en algunas plantas en respuesta al estrés salino, hídrico, de frío o de congelación (Hughes *et al.*, 1992; White *et al.*, 1994; Hon *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 2004). En los frutos cítricos, Sanchez-Ballesta (1998) identificó un gen *nsLTP* en el flavedo de frutos de mandarina 'Fortune' que disminuía su expresión en respuesta al frío en éste y otro cultivar ('Navelate') sensible al frío, mientras que en los frutos de cultivares tolerantes ('Hernandina' y 'Pinalate') no se producía esta disminución. Además, durante el tratamiento de curado se produjo una disminución hasta niveles indetectables en la acumulación de este transcrito en frutos de mandarina 'Fortune'. Por otro lado, Sapinitskaya *et al.* (2006) identificaron dos genes que codifican una proteína LTP y una enzima desaturasa FAD2 regulados específicamente por la combinación de un tratamiento de acondicionamiento térmico de 7 días a 16 °C seguido de un periodo de 9 días de almacenamiento a 2 °C. Estos resultados sugieren la participación de genes del metabolismo de lípidos en el mecanismo que confiere tolerancia al frío en frutos de pomelo (Sapinitskaya *et al.*, 2006).

Por otro lado, diversos estudios han comprobado que la modificación de la expresión de genes que participan en la detoxificación de ROS altera la susceptibilidad a desarrollar 'daños de frío' en numerosas especies de plantas. Así por ejemplo, la supresión específica del gen *CAT1* en tomate, que redujo de 2 a 8 veces la actividad CAT y aumentó la producción de H₂O₂ durante la exposición de las plantas a 4 °C, provocó un aumento de la incidencia de 'daños de frío' (Kerdnaimongkol y Woodson, 1999). Asimismo, se ha comprobado que la sobreexpresión de un gen de *Arthobacter globiformis* que codifica una enzima oxidasa de colina en plantas de tomate favorece la acumulación de glicina betaína y aumenta su tolerancia al frío probablemente debido a la inducción del sistema enzimático detoxificador de H₂O₂ (Park *et al.*, 2004). Por otra parte, Fung *et al.* (2004) observaron que el tratamiento con salicilato y jasmonato de metilo aumentó la tolerancia al frío en frutos de pimiento e incrementó los niveles de acumulación relativa de los transcritos del gen *CaAOX1*, que codifica una AOX que previene o disminuye la formación de ROS, y de otros genes que codifican enzimas que eliminan estas especies reactivas como dos enzimas Mn y Cu/ZnSOD, una CAT y una APX citosólica. En otras especies de plantas también se ha comprobado que la sobreexpresión de genes detoxificadores de ROS, como el gen *LePHGPx*, que codifica una enzima peroxidasa de hidroperóxidos de fosfolípidos dependiente de glutatión, en plantas de tabaco (Chen *et al.*, 2004), o genes que codifican diversas enzimas SOD, APX o GR en maíz (Van Breusegem *et al.*, 1999b), tabaco (Foyer *et al.*, 1994; Van Breusegem *et al.*, 1999a), alfalfa (McKersie *et al.*, 1993) o algodón (Payton *et al.*, 2001), aumenta la tolerancia al estrés oxidativo disminuyendo con ello la susceptibilidad al frío. En los frutos cítricos, se identificó un gen que codifica una proteína homóloga a otra oxigenasa inducida por patógenos (PIOX) que aumentaba en el flavedo de los frutos de mandarina 'Fortune' dañados por frío a los 21 días de almacenamiento a 2 °C, no detectándose en los frutos recién cosechados ni en respuesta al calor o a la combinación de calor y frío (Sanchez-Ballesta *et al.*, 2003). Asimismo, Gosalbes *et al.* (2004) comprobaron que los niveles de mRNA de este gen aumentaban transitoriamente en el flavedo de frutos de esta variedad de mandarinas con el desarrollo de los primeros síntomas de 'daños de frío', aunque posteriormente disminuían a pesar del aumento progresivo en la severidad del daño. Sin embargo, en frutos de mandarina 'Hernandina', que no desarrolla 'daños de frío', no se observó la inducción de este gen. Además, se comprobó que el acondicionamiento de los frutos con 10 µL L⁻¹ de etileno que aumentan la concentración endógena de ABA en el flavedo, y la aplicación de altas concentraciones (1 mM) de ABA, aceleraba el desarrollo de 'daños de frío' y el aumento transitorio de los niveles de acumulación relativa del mRNA de este gen. Estos resultados indican que este gen, al que se denominó *CIOX*, podría ser un

buen marcador del daño producido por la exposición al frío, sugiriendo la implicación del estrés oxidativo en la incidencia de esta alteración en los frutos cítricos (Gosalbes *et al.*, 2004). Posteriormente, Sapitnitskaya *et al.* (2006) comprobaron que otros genes relacionados con el estrés oxidativo, como dos genes que codifican una tioredoxina (TRX) y una CAT, se inducían, al igual que CIOX, en respuesta al frío y en ambos casos los tratamientos de acondicionamiento a altas temperaturas seguidos de la exposición al frío reducían o retrasaban su inducción. Estos autores observaron también en frutos de pomelo que la expresión de un gen que codifica una SOD era superior en frutos sometidos a un tratamiento previo de acondicionamiento térmico, que aumentaba la tolerancia al frío, que en sus frutos control almacenados directamente en frío (Sapitnitskaya *et al.*, 2006). Por otro lado, se ha comprobado que otros genes que participan en la protección frente al estrés oxidativo, como dos genes que codifican una proteína homóloga a CEO1 y una glutaredoxina (Sanchez-Ballesta *et al.*, 2003), u otro que codifica una formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión (ADH, clase III) (Sapitnitskaya *et al.*, 2006), aumentaban más su expresión en respuesta a la combinación de calor y frío que al frío. Estos resultados y los anteriores sugieren la posible participación del sistema antioxidante en el mecanismo que induce tolerancia al frío en distintos sistemas vegetales incluyendo los frutos cítricos.

Teniendo en cuenta que la exposición al frío puede producir un aumento de la pérdida de agua por deshidratación, algunas de las respuestas que se producen durante la exposición a las bajas temperaturas de conservación pueden ser comunes a las que acontecen en condiciones de deshidratación, por una vía dependiente de ABA (Mohapatra *et al.*, 1988; Perras y Sarhan, 1989). Un ejemplo de estas respuestas comunes lo constituye un grupo de genes que codifican proteínas dehidrinas, con función estabilizadora de membranas y de otras estructuras celulares, que se han relacionado con situaciones de estrés por deshidratación, pero también con la exposición a bajas temperaturas, la aplicación de ABA y con otros tipos de estrés que comportan una deshidratación de los tejidos como el estrés salino o la congelación (Baker *et al.*, 1988; Bray, 1993; Close, 1997). En estudios previos se ha descrito que los frutos cítricos contienen una única familia de dehidrinas que difiere de otras dehidrinas encontradas en otras especies vegetales y que podrían estar implicadas en la aclimatación al frío (Cai *et al.*, 1995; Hara *et al.*, 1999; Porat *et al.*, 2002b; 2004a). Se ha comprobado que un tratamiento de ducha con agua caliente a 62 °C durante 20 segundos previo al almacenamiento a 2 °C, que incrementa la tolerancia al frío en frutos de pomelo (Porat *et al.*, 2000a; Porat *et al.*, 2000b), previene la caída de expresión de una dehidrina (*cor15*) que se produce en respuesta al frío, durante al menos 6 semanas de almacenamiento a 2 °C aunque su expresión no se vio modificada en respuesta al calor 'per se' (Porat *et al.*, 2002b). Por otro lado, Sapitnitskaya *et al.* (2006) identificaron en esta misma variedad de pomelos, otro gen que codifica una dehidrina de *Citrus paradisi* que aumentaba sus niveles de mRNA en respuesta a la combinación específica de calor y frío pero no en respuesta al calor ni al frío 'per se'. Estos resultados sugirieron que estas proteínas, al igual que otros miembros idénticos de la familia descritos en otros cultivares de cítricos (Cai *et al.*, 1995; Hara *et al.*, 1999), que se inducen durante la aclimatación al frío, podrían tener una función clave en la reducción de 'daños de frío' en los frutos cítricos. Por otro lado, se ha comprobado que la sobreexpresión del gen *cor19* de *Citrus unshiu* en plantas de tabaco transgénicas aumenta la tolerancia al frío (Hara *et al.*, 2003). Posteriormente, Porat *et al.* (2004a) identificaron en el flavedo de frutos de naranja 'Navel' y pomelo 'Star Ruby' 2 genes que codifican dehidrinas, uno de los cuales aumentó su expresión de forma específica en respuesta a la combinación de calor y frío aunque el frío 'per se' y otras condiciones de estrés como la ausencia de O₂, la herida, la luz UV y un tratamiento con

etileno, disminuyeron sus niveles de expresión. Por el contrario, Sanchez-Ballesta *et al.* (2004) encontraron que un tratamiento de calor de 3 días a 37 °C producía en frutos maduros de mandarina 'Fortune' una disminución hasta límites indetectables en la expresión de un gen (*CrCOR15*) muy abundante en el flavedo de estos frutos aunque ésta no varió en respuesta al frío. Estos resultados indican que la expresión del gen *CrCOR15* de mandarinas 'Fortune', que codifica una proteína con un 97.8% de homología con la proteína cor15 de pomelo, no está relacionada con el grado de susceptibilidad a desarrollar 'daños de frío' ni con la tolerancia al frío inducida por el tratamiento de curado en frutos de mandarina 'Fortune'.

Además de genes que codifican proteínas de la familia de las dehidrasas, Porat *et al.* (2002a) comprobaron en frutos de pomelo que el tratamiento de ducha con agua caliente a 62 °C durante 20s previo al almacenamiento a 2 °C produjo un aumento transitorio de los niveles de mRNA de un gen que codifica una proteína vacuolar de intercambio de iones Na^+/H^+ (*cNHX1*), encargada de eliminar el exceso de iones Na^+ . La respuesta específica al calor y a la combinación de calor y frío, pero no al frío 'per se' ni a otras condiciones de estrés, como la exposición al etileno o luz UV, sugirió que este gen podría estar relacionado con el mecanismo de tolerancia al frío inducido por los tratamientos de acondicionamiento térmico en los frutos cítricos.

Por otro lado, se ha comprobado que algunas cultivares de cereales tolerantes al frío acumulan proteínas AFPs (Antikainen y Griffith, 1997) que presentan un porcentaje muy alto de homología con proteínas hidrolasas como quitinasas y β -1,3 glucanasas, y otras relacionadas con el estrés osmótico como taumatinas y osmotinas, todas ellas denominadas proteínas PR porque se describieron inicialmente en respuesta a la infección por agentes patógenos (Bol *et al.*, 1990; Hon *et al.*, 1994; Van Loon y Van Strien, 1999). En frutos cítricos se ha identificado un gen (*CrGlcQ*) que codifica una β -1,3-glucanasa de clase III que se induce en respuesta al frío en frutos de mandarina 'Fortune' almacenados a 2 °C, pero no en frutos de la misma variedad almacenados a 12 °C, ni en frutos de mandarina 'Hernandina' (tolerante al frío), expuestos al 2 °C (Sanchez-Ballesta *et al.*, 2006). Además, estos autores observaron que el aumento en la expresión del gen precedió a la aparición de los primeros síntomas de 'daños de frío' e incrementó con la severidad del daño. Estos resultados, junto al hecho de que la acumulación del transcrito fue mayor en las zonas de tejido afectadas por dicha alteración, indican que este gen es un marcador del daño celular provocado por el frío probablemente por una vía dependiente de etileno, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Ding *et al.* (2002) en frutos de tomate. Teniendo en cuenta que la aplicación de esta hormona durante el almacenamiento a 2 °C de las mandarinas 'Fortune', que reducía la incidencia de 'daños de frío' y aumentaba notablemente los niveles de mRNA *CrGlcQ*, se sugirió la implicación de esta enzima en el mecanismo de defensa destinado a reducir o reparar el daño celular causado por el frío en los frutos cítricos (Sanchez-Ballesta *et al.*, 2006). En un estudio posterior se comprobó que un tratamiento con agua a 62 °C durante 20 s, que induce tolerancia al frío en frutos de pomelo, reprimía la expresión de un gen que codifica una proteína homóloga a una endo-1,3;4- β -D-glucanasa diferente al gen *CrGlcQ* identificado por Sanchez-Ballesta *et al.* (2006) (Sapitnitskaya *et al.*, 2006). Además, dentro de esta familia de proteínas PR, se han identificado genes que codifican proteínas con actividad quitinasa, comprobándose que además de participar en respuestas de defensa frente a la infección por hongos patógenos constituyen señalizadores implicados en la regulación de interacciones simbióticas con bacterias o de procesos del desarrollo como la floración o la senescencia en hojas (Collinge *et al.*, 1993). Además, se han relacionado con la tolerancia al calor, al estrés salino y de deshidratación (Kwon y Kim,

2007). En frutos cítricos, se identificó un gen que codifica una quitinasa de carácter ácido de clase II que aumentaba su expresión en respuesta al curado en frutos de mandarina 'Fortune' y cuyos niveles se mantenían elevados una vez transferidos los frutos al frío (Sanchez-Ballesta *et al.*, 2003). La expresión de este gen no varió en respuesta al frío 'per se', lo que sugirió que podría ser un buen candidato implicado en las respuestas de defensa asociadas al mecanismo que confiere tolerancia al frío inducido por la exposición a altas temperaturas en los frutos cítricos.

En la mayoría de las plantas, la enzima PAL esta codificada por diferentes miembros (2-6) de una familia multigénica que pueden expresarse diferencialmente en distintos tejidos de la planta y en respuesta a diferentes situaciones de estrés (Liang *et al.*, 1989; Lois *et al.*, 1989). En frutos de mandarina 'Fortune', la expresión del gen *FPAL2* y la actividad PAL aumenta con el desarrollo de 'daños de frío' (Sanchez-Ballesta *et al.*, 2000a). Sin embargo, en respuesta a la combinación de calor y frío se observó una falta de paralelismo entre la acumulación de mRNA *FPAL2* y de la actividad enzimática lo que sugirió que este gen podría estar regulado a nivel post-transcripcional (Sanchez-Ballesta *et al.*, 2000b). Por otra parte, los bajos niveles constitutivos de mRNA *FPAL2* y de su actividad en el flavedo de los frutos recién cosechados de mandarina 'Fortune' en comparación con los altos niveles observados en la variedad tolerante al frío 'Hernandina', en la que disminuyen durante el almacenamiento a 2 °C en frutos acondicionados y sin acondicionar, sugirió que este gen podría constituir un marcador molecular del grado de susceptibilidad a desarrollar 'daños de frío' en los frutos cítricos (Sanchez-Ballesta *et al.*, 2000b).

Otro de los genes identificados por Sanchez-Ballesta *et al.* (2003) implicados en el metabolismo de fenilpropanoides, codifica una O-metiltransferasa de ácido cafeico de clase II (ACR556), al que se denominó posteriormente *FortOMTII*. La expresión de este gen se inducía por las altas temperaturas y se mantenía alta cuando los frutos se transferían al frío a pesar de no inducirse en respuesta al frío 'per se'. Estos mismos autores identificaron otro gen que codifica una O-metiltransferasa de ácido cafeico (ACR 233), distinto a *FortOMTII*, que se indujo en respuesta al frío en frutos de mandarina 'Fortune'. Se comprobó que un tratamiento de 1 d a 37 °C, que resultó tan efectivo como el curado (3 días a 37 °C) previniendo la aparición de 'daños de frío', también incrementó los niveles del gen *FortOMTII* que se mantuvieron elevados durante 30 días de almacenamiento a 1,5 °C. Estos resultados indican que la expresión de este gen está claramente regulada por el calor y/o la combinación de calor y frío constituyendo un buen candidato que podría participar en el mecanismo de protección frente al 'daño de frío'. Además, su mayor acumulación en los frutos recién cosechados y en frutos almacenados durante tiempos largos a 1,5 °C de las variedades resistentes al frío, sugirió que *FortOMTII* era un buen marcador de la tolerancia natural (genético-varietal) al frío en los frutos cítricos (Lluch, 2006). Los niveles de estas OMTs (ACR 233 y *FortOMTII*) fueron superiores en las zonas de tejido no dañado respecto a las zonas necrosadas en los frutos de mandarina 'Fortune' almacenados en frío, se ha sugerido que ninguno de estos genes estaría asociado al daño. Este conjunto de resultados reforzó la idea de que el metabolismo de fenilpropanoides participa en la tolerancia al frío de los frutos cítricos a través de la síntesis de compuestos fenólicos, que podrían reducir el estrés oxidativo que se produce en respuesta durante la exposición a bajas temperaturas que causan 'daños de frío' (Lluch, 2006).

Otro de los genes identificados en la genoteca substractiva de mandarinas 'Fortune' por Sanchez-Ballesta *et al.* (2003), codifica una proteína PRP (del inglés 'proline-rich protein'), que puede funcionar como andamiaje para la deposición de ligninas y que se ha

relacionado con el remodelamiento de paredes celulares (Györgyey *et al.*, 1997) y en procesos de cicatrización de heridas (Yasuda *et al.*, 1997), aumentó en respuesta al frío, sugiriendo una posible función de reparación del daño celular causado por las bajas temperaturas.

Distintos estudios han puesto de manifiesto el papel protector del etileno en el desarrollo de ‘daños de frío’ en los frutos cítricos. A nivel molecular, se observó que los niveles de mRNA de un receptor del etileno tipo ERS (CERS) aumentaban en el flavedo de frutos de mandarina ‘Fortune’ expuestos a 2,5 °C, pero no a 12 °C. El acondicionamiento térmico de 3 días a 37 °C disminuyó los niveles del transcrito aunque éstos incrementaron de nuevo al transferir los frutos al frío (Cubells, 1998). Posteriormente, Zacarías *et al.* (2003) mostraron que la exposición al frío de frutos de esta misma variedad de mandarinas producía un aumento del nivel de acumulación relativa de los transcritos de ACO y ACS2, fundamentalmente en las zonas de tejido afectadas por el frío, lo que explicaría el aumento observado en la actividad enzimática ACO y en la producción de etileno. Recientemente se ha comprobado en frutos de pomelo que un tratamiento de acondicionamiento a altas temperaturas (agua caliente a 62 °C 20 s) seguido de la exposición al frío, disminuye la expresión del gen EIN2, que participa en la transducción de la respuesta al etileno (Sapitnitskaya *et al.*, 2006). Estos resultados sugieren que el etileno podría ser un marcador del daño cuando los frutos se almacenan directamente en frío.

Además del etileno, se ha comprobado que algunos genes que participan en la síntesis de poliaminas pueden ser regulados por el frío, como por ejemplo un gen que codifica una espermidina sintasa en raíces de plantas de arroz (Imai *et al.*, 2004) o en plántulas de *A. thaliana* (Kasukabe *et al.*, 2004). Sin embargo, hasta el momento no existe ningún estudio a nivel molecular que relacione esta familia de reguladores con la tolerancia al frío en los frutos cítricos.

La exposición de las plantas a condiciones de estrés, aunque en general disminuye la tasa de síntesis de proteínas de la célula, induce la síntesis de nuevas proteínas que protegerían los tejidos frente al daño causado por dicho estrés (Sachs y Ho, 1986). Numerosos estudios indican que la exposición a altas temperaturas no letales induce la expresión de HSPs (del inglés ‘heat-shock proteins’) o proteínas de choque térmico, que se han relacionado con la protección frente a temperaturas extremas de calor y de frío (Vierling, 1991). Durante muchos años, el efecto protector del calor frente al frío se relacionó fundamentalmente con la inducción y mantenimiento de estas proteínas. Así, se sugirió su implicación en la tolerancia al frío inducida por los tratamientos de acondicionamiento a altas temperaturas en tejidos de pepino (Lafuente *et al.*, 1991; Jennings y Saltveit, 1994), tomate (Lurie y Klein, 1991; Sabehat *et al.*, 1996; Kadyrzhanova *et al.*, 1998), aguacate (Woolf *et al.*, 1995), fresas (Ledesma *et al.*, 2004) y manzana (Wang *et al.*, 2001). Es interesante señalar que algunas de estas proteínas se encuentran asociadas a membranas celulares como varias sHSP y HSP70 en maíz (Cooper y Ho, 1987), o la proteína HICT2 en frutos de tomate (Sabehat *et al.*, 1998a), por lo que se ha sugerido su posible implicación en la protección y mantenimiento de las proteínas de membrana durante la exposición a temperaturas extremas de calor o de frío (Jinn *et al.*, 1993). Asimismo, se ha comprobado que la acumulación de estas proteínas también puede producirse en respuesta a las bajas temperaturas. Por ejemplo, la exposición al frío en plantas de *A. thaliana*, espinaca, arroz y *Brassica napus* aumenta los niveles de los transcritos de genes que codifican diversos miembros de esta familia de proteínas (Neven *et al.*, 1993; Pareek *et al.*, 1995; Krishna *et al.*, 1995; Sung *et al.*, 2001; Seki *et al.*, 2002). Otros estudios

realizados en patata (Berkel *et al.*, 1994) y tomate (Li *et al.*, 1999), han sugerido que la acumulación de estas proteínas en respuesta al frío no evita la aparición de ‘daños de frío’ aunque podría minimizar la severidad de los mismos. Por otro lado, se ha comprobado que otros tratamientos que también inducen tolerancia al frío pueden activar la expresión de genes que codifican HSPs. Así por ejemplo, Ding *et al.* (2001) observaron que el tratamiento con jasmonato de metilo o con salicilato de metilo en frutos de tomate, que disminuye la incidencia y desarrollo de ‘daños de frío’, produjo una acumulación de los transcritos de genes que codifican diversos miembros de esta familia de proteínas. Asimismo, numerosos estudios han puesto de manifiesto que la sobreexpresión o represión de genes que codifican HSPs puede modificar el grado de termotolerancia. Así, la represión de un gen que codifica una HSP100 disminuye la tolerancia a la congelación en plantas de *A. thaliana* y plántulas de sorgo (Howarth y Skot, 1994) y la sobreexpresión de un gen que codifica una sHSP (HSP17.7) aumentó la termotolerancia de una suspensión celular de frutos de zanahoria (Malik *et al.*, 1999). Además, se ha comprobado que la sobreexpresión de factores de transcripción que regulan positivamente la expresión de genes que codifican HSPs (HSF, del inglés ‘heat shock factor’), como HSF1 o HSF3 en plantas de *A. thaliana*, aumenta el nivel basal de los niveles de estas proteínas en situaciones de no estrés incrementando el grado de termotolerancia basal, lo que podría conferir una mayor protección cuando las plantas se exponen a temperaturas extremas de calor y frío (Lee *et al.*, 1995; Prandl *et al.*, 1998). Asimismo, la sobreexpresión de un gen que codifica un HSF de *A. thaliana* en semillas de tomate aumentó la tolerancia al calor y al frío lo que apoya la idea de la implicación de estas proteínas en el proceso de adquisición de termotolerancia en las plantas (Li *et al.*, 2003)

La inducción de HSPs en respuesta a la exposición a altas temperaturas en los frutos cítricos ha sido documentada. Rozenzvieg *et al.* (2004) comprobaron en frutos de pomelo ‘Star Ruby’ que el acondicionamiento en baños de agua caliente a 62 °C durante 20s inducía un aumento en los niveles de mRNA de 4 genes que codifican HSPs, manteniéndose niveles elevados de tres de ellos durante el almacenamiento en frío y solamente uno se indujo por exposición al frío ‘per sé’. Además, estos autores observaron que cuando los frutos acondicionados se almacenaban a 20 °C, los niveles de los transcritos de estos 4 genes disminuían a las 48 h y que era necesaria la combinación específica del calor y frío para mantener constantes los niveles inducidos en respuesta al calor. Recientemente se ha identificado en frutos de esta variedad de pomelos dos genes que codifican HSPs, que como en el caso anterior, se inducían en respuesta al calor durante el mismo tratamiento de acondicionamiento a altas temperaturas y se mantenían posteriormente durante el almacenamiento a 2 °C, aunque su expresión no varió en respuesta a un tratamiento de 7 días a 16 °C, que también induce aclimatación al frío en esta variedad de frutos cítricos (Sapitnitskaya *et al.*, 2006). Estos resultados y los anteriores sugieren que esta familia de genes regulados por el calor y la combinación de calor y frío podrían formar parte del conjunto de mecanismos que confieren tolerancia al frío en los frutos cítricos. Sin embargo, estos genes no fueron aislados por Sanchez-Ballesta *et al.* (2003) en la genoteca substractiva de flavedo de frutos de mandarina ‘Fortune’ acondicionados y almacenados en frío. Este resultado podría estar relacionado con la naturaleza transitoria de la acumulación de mRNA HSP en los cítricos. No obstante, la reducción del tiempo de exposición al calor disminuyó la eficacia reduciendo los ‘daños de frío’ lo que indicaría que este proceso de adquisición de tolerancia al frío no está limitado por esta familia de proteínas en los cítricos.

La implicación de genes que codifican proteinasas en respuesta al estrés de frío ya se ha demostrado en algunos frutos como el tomate, y se han relacionado con funciones de

degradación de proteínas desnaturalizadas durante la exposición a bajas temperaturas y con procesos de muerte celular (Orth *et al.*, 2000). En los frutos cítricos, Sanchez-Ballesta *et al.* (2003) observaron la inducción de un gen que codifica una ubiquitin proteínasa en respuesta al frío cuya expresión aumentó claramente durante el almacenamiento a 2 °C en los frutos de mandarina ‘Fortune’ sin acondicionar, con el desarrollo de los daños. Posteriormente, Lliso *et al.* (2007) observaron que la exposición al frío en frutos de tanger incrementaba la actividad de una cistein proteasa en el albedo (Lliso *et al.*, 2007).

Aunque en la bibliografía se ha descrito el papel regulador de los factores de transcripción en las respuestas de defensa de las plantas frente a diferentes situaciones de estrés biótico y abiótico, incluido el frío (Heino y Palva, 2003; Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2006), existe poca información relacionada con su implicación en la tolerancia de frutos cítricos a este estrés cuando se almacenan durante periodos largos a bajas temperaturas para su conservación. En el trabajo realizado por Sanchez-Ballesta *et al.* (2003), uno de los cambios más relevantes observados entre los genes que se inducían en respuesta al curado y cuya expresión se mantenía una vez transferidos los frutos a las bajas temperaturas, o en respuesta a la combinación de calor y frío, correspondió a un grupo de tres factores de transcripción. El primero de estos genes codifica un factor TFIIB, imprescindible para el inicio de la transcripción por la RNA polimerasa II en eucariotas y que forma parte del complejo TFIID (Pan *et al.*, 2000). La expresión de este gen se indujo por el curado y su expresión fue mayor en los frutos curados que en los no curados durante los 7 primeros días de almacenamiento en frío. Además, la expresión de este gen no aumentó en respuesta al frío. Los otros dos genes que codifican dos miembros de la familia WRKY, específica de plantas, no modificaron el nivel de acumulación de sus transcritos en respuesta al calor ‘per sé’ aunque el curado potenció su expresión durante el almacenamiento de los frutos a 2 °C. Aunque diferentes investigaciones indican que algunos miembros de esta familia de factores de transcripción pueden estar implicados en la regulación de procesos del desarrollo y de la senescencia, y pueden regular la expresión de una gran variedad de genes de defensa de las plantas frente a situaciones de estrés biótico y abiótico (Hinderhofer y Zentgraf, 2001; Dong *et al.*, 2003; Ulker y Somssich, 2004; Qiu *et al.*, 2004; Eugelm *et al.*, 2005), existe poca información acerca de su implicación en la tolerancia de los sistemas vegetales al frío (Rizhsky *et al.*, 2002; Sanchez-Ballesta *et al.*, 2003; Narusaka *et al.*, 2004; Marè *et al.*, 2004). En los frutos cítricos, éste fue el primer trabajo que sugirió su participación en el mecanismo que confiere tolerancia al frío inducido por la exposición a altas temperaturas previa al almacenamiento en frío.

4. Mecanismos relacionados con el desarrollo del ‘colapso de la corteza’ y con el efecto beneficioso del tratamiento con etileno reduciendo la alteración

4.1. Bases fisiológicas y bioquímicas

Hoy por hoy son pocos los estudios llevados a cabo para entender las bases fisiológicas y los mecanismos bioquímicos asociados al desarrollo del ‘colapso de la corteza’. Alférez y Zacarías (2001) en ‘Navelate’ y posteriormente Alférez *et al.* (2003) en ‘Navelina’, propusieron un modelo que explica el efecto que tienen los cambios de baja a alta HR en el estado hídrico de las células del flavedo y el albedo de frutos deshidratados y transferidos a cámaras de almacenamiento con alta HR y que conducen a la aparición de síntomas de daño característicos de esta alteración. Según estos autores, cuando se dan condiciones de estrés hídrico se genera una diferencia de presión de vapor de agua entre la atmósfera y las células de la corteza del fruto generándose un flujo de vapor de agua a favor de un gradiente de concentración desde las células del exocarpo (flavedo) y

endocarpo (albedo) hacia el exterior. Cuando se produce la transferencia a elevada HR se invierte este flujo de vapor de agua y las células del flavedo y albedo se convierten en células que demandan agua. Las células más superficiales de la corteza del fruto (flavedo), como en cualquier sistema de intercambio de materia, se rehidratan más rápidamente que las situadas en la parte interna que demandan agua a las primeras. Como consecuencia, la fuerza de succión de las células del albedo provocaría el colapso de las células subepidérmicas adyacentes en el flavedo, lo que concuerda con los resultados observados por Agustí *et al.* (2001) que mostraron que el inicio de esta alteración en la zona de transición del flavedo y el albedo, hecho que ha sido confirmado posteriormente por otros autores (Alfárez y Burns, 2004). Además, a medida que aumenta el grado de deshidratación del fruto antes de su transferencia a elevada HR, la capacidad con que las células recuperan su estado hídrico disminuye lo que potenciaría la severidad de los síntomas (Alfárez *et al.*, 2003).

Algunos autores han asociado la incidencia de esta alteración con anomalías en el contenido o morfología de las ceras epicuticulares de la corteza que podrían favorecer la deshidratación de los frutos (Albrigo y Brown, 1970; Schulman y Monselise, 1970; Albrigo, 1972a; Albrigo, 1972b). Sin embargo, el papel de las ceras epicuticulares en la susceptibilidad de los frutos cítricos al ‘colapso de la corteza’ es todavía desconocido. Agustí *et al.* (2001) no encontraron diferencias en la morfología de la cutícula (espesor y contenido en ceras epicuticulares) ni en la permeabilidad de la misma entre células dañadas e intactas a pesar de producirse una pérdida de agua en las áreas de tejido afectado. Tampoco se encontró relación entre el contenido total de ceras epicuticulares y la susceptibilidad de las naranjas ‘Navelina’ a desarrollar esta alteración (Sala *et al.*, 1992b). No obstante, se observó que el contenido de ceras ‘duras’, que se fracturan más fácilmente que las ceras ‘blandas’ (Albrigo, 1972a) era mayor en frutos de ‘Navelina’ que presentaban más daños (Sala *et al.*, 1992b), hecho que fue confirmado por microscopía electrónica de barrido (Sala, resultados no publicados). Además, El-Otmani *et al.* (1989) observaron que la severidad del ‘colapso de la corteza’ en naranjas ‘Valencia’ estaba relacionado con el contenido de ceras amorfas y fue mayor cuando estas se rompían.

El etileno juega un papel importante en la tolerancia de los frutos cítricos a las condiciones que favorecen esta alteración. Se ha comprobado que se produce un incremento en la tasa respiratoria y en la producción de etileno que precede a la aparición de los primeros síntomas. Dichos incrementos son transitorios por lo que se ha sugerido que están más asociados con los cambios de turgencia y el daño celular provocado por la variación del potencial hídrico, que con el progreso de síntomas del ‘colapso de la corteza’ (Alfárez *et al.*, 2003). Estos autores sugieren además, que el etileno podría ser un buen marcador del grado de susceptibilidad de los frutos al desarrollo de dicha alteración fisiológica ya que se ha observado que la producción de esta hormona en el momento de la recolección es mayor en frutos sometidos a condiciones climáticas que favorecen su incidencia. Por otro lado, se ha comprobado que el acondicionamiento de naranjas ‘Navelina’ y ‘Navelate’ con esta hormona reduce la incidencia y el desarrollo de síntomas de este desorden fisiológico (Lafuente y Sala, 2002; Cajuste y Lafuente, 2007) y que la aplicación de 1-MCP a concentraciones superiores a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ puede favorecer su incidencia en algunos cultivares como mandarinas (Dou *et al.*, 2005). Los mecanismos por los cuales el etileno protege a los frutos cítricos frente a esta alteración son todavía poco conocidos. Se ha postulado que la eficacia del tratamiento de acondicionamiento con etileno podría estar relacionada en parte con su efecto sobre la actividad PAL y la síntesis de compuestos subsiguientes del metabolismo de fenilpropanoides, así como sobre la actividad de la enzima POD que puede favorecer la eliminación de ROS o participar en la

síntesis de ligninas (Cajuste y Lafuente, 2007). Estos autores observaron que la actividad PAL y el contenido de fenoles totales y de ligninas aumentaban en el flavedo de naranjas 'Navelate' no acondicionadas con etileno, que desarrollaron la alteración, mientras que en el albedo, que presentaba una actividad PAL más baja, el contenido de fenoles apenas cambiaba y el de ligninas disminuía a pesar de aumentar la actividad de la enzima al manifestarse el daño. Además, observaron que la actividad POD soluble o unida a pared disminuía en ambos tejidos. En vista de estos resultados sugirieron que los incrementos en PAL y en los metabolitos subsiguientes podían reflejar una demanda de fenilpropanoides para reducir la incidencia del 'colapso de la corteza', mientras que la falta de capacidad del albedo para incrementar la actividad POD o la concentración de dichos metabolitos secundarios podría contribuir a la susceptibilidad de los frutos a desarrollar la alteración. Además, Sala *et al.* (2005) observaron que el máximo de actividad de la enzima PAL en el flavedo se producía inmediatamente después del mayor aumento en la producción de etileno de forma paralela a la aparición de los primeros síntomas de daño. Estos autores comprobaron también que el incremento en etileno y en la actividad PAL era mayor en frutos de 'Pinalate' almacenados a 12 °C que en frutos de 'Navelate', lo que podría estar asociado con que el daño fue mayor en el mutante (Sala *et al.*, 2005; Alférez *et al.*, 2005a). Cajuste y Lafuente (2007) comprobaron que el acondicionamiento de los frutos con etileno aumentó la actividad PAL en ambos tejidos y que este incremento fue transitorio y mayor en el albedo que en el flavedo. En ambos casos, la actividad PAL observada en los frutos tratados con la hormona fue superior a la de los frutos sin acondicionar. Asimismo, el acondicionamiento con etileno disminuyó la caída de la fracción soluble de la POD en ambos tejidos, y en el flavedo, aumentó transitoriamente el contenido de fenoles y ligninas mientras que en el albedo retrasó la caída en el contenido de fenoles y evitó la disminución en el contenido de ligninas. Estos cambios en la actividad de las enzimas PAL y POD así como en el contenido de fenoles y ligninas y de los subsiguientes metabolitos podrían ser en parte responsables del efecto beneficioso del acondicionamiento de los frutos con etileno reduciendo el 'colapso de la corteza', aunque sería necesaria la participación de otras rutas metabólicas para explicar su eficacia.

Teniendo en cuenta que el etileno incrementa los niveles de ABA en el flavedo de los frutos cítricos (Goldschmidt *et al.*, 1973; Lafuente *et al.*, 1997) y que esta hormona a su vez, se ha relacionado con la protección de las plantas frente a condiciones de estrés hídrico (Zeevart y Creelman, 1988), Lafuente y Sala (2002) estudiaron si el efecto beneficioso de la aplicación de etileno en la reducción del grado de incidencia del 'colapso de la corteza' podría estar relacionado con el incremento de los niveles de ABA. Así, comprobaron que la concentración de ABA aumentaba considerablemente en frutos de 'Navelina' tratados con distintas concentraciones de etileno que protegían al fruto frente al 'colapso de la corteza. Sin embargo, no encontraron diferencias en los niveles inducidos de ABA por las distintas concentraciones de etileno ensayadas a pesar de que la eficacia del tratamiento con etileno aumentaba con la concentración aplicada y la duración del mismo. Asimismo, estos autores observaron que la concentración de ABA disminuía notablemente al transferir los frutos al aire y que no habían diferencias en la concentración de ABA entre los frutos tratados y no tratados con etileno. Tampoco encontraron diferencias entre el contenido de ABA de frutos almacenados a baja y alta HR a pesar de que los almacenados a baja HR presentaron menos daño. Por otro lado, observaron que el almacenamiento a 2 °C de frutos de esta misma variedad disminuyó los niveles de ABA a pesar de que éstos presentaron un índice de daño menor al de los frutos almacenados a 22 °C. Este conjunto de resultados indicó que el incremento en ABA no era limitante en el efecto beneficioso del etileno reduciendo el 'colapso de la corteza'. Sin embargo, la mayor tendencia a la

deshidratación del mutante 'Pinalate', deficiente en ABA, se ha relacionado con su elevada susceptibilidad a desarrollar 'colapso de la corteza' (Alfárez *et al.*, 2005a).

Diversos estudios en plantas han relacionado el daño causado por estrés hídrico con el aumento de ROS (Senaratna *et al.*, 1985). La implicación de estas especies en el desarrollo del 'colapso de la corteza' no se ha demostrado hasta el momento. No obstante, distintos trabajos sugieren la implicación del sistema antioxidante en la tolerancia de los frutos cítricos al desarrollo de esta alteración fisiológica (Sala y Lafuente, 2004; Sala *et al.*, 2005). Así, se ha sugerido que las enzimas SOD y CAT podrían estar implicadas en la mayor tolerancia al desarrollo del 'colapso de la corteza' que presentan los frutos de 'Navelate' respecto a los de 'Pinalate' (Sala *et al.*, 2005). Además, la actividad de ambas enzimas así como la de la GR y APX fue mayor en frutos de naranja 'Navelina' expuestos continuamente a condiciones de HR (55-60%) que en los almacenados a alta HR que presentaron un mayor índice de daño (Sala y Lafuente, 2004). Por otro lado, se ha comprobado que el acondicionamiento de los frutos con etileno ($10 \mu\text{L L}^{-1}$), que fue muy efectivo reduciendo el 'colapso de la corteza', aumentó significativamente la actividad GR en frutos de 'Navelina' (Sala y Lafuente, 2004) y como se ha mencionado, también la actividad de la enzima POD y el contenido de fenoles totales, que constituyen la mayor proporción de compuestos antioxidantes en la piel de los frutos cítricos (Manthey, 2004), en el flavedo de naranjas 'Navelate' (Cajuste y Lafuente, 2007). Por otro lado, datos recientes que indican que el incremento en la actividad fosfolipasa A (PLA), que se origina como consecuencia de la exposición de mandarinas 'Fallglo' y naranjas 'Navel' a cambios bruscos de humedad favorece el 'colapso de la corteza' (Alfárez *et al.*, 2008). Teniendo en cuenta que el aumento de ROS favorece la peroxidación de lípidos de membrana, el conjunto de estos resultados apoyan la idea de que el estrés oxidativo está implicado en el desarrollo y severidad de esta alteración fisiológica en los frutos cítricos.

Por último, la implicación del metabolismo de carbohidratos en la incidencia del 'colapso de la corteza' ha sido objeto de estudio ya que estos compuestos participan en la respuesta de defensa de los frutos cítricos frente a la deshidratación (Hockema y Etxeberria, 2001). Holland *et al.* (2005) observaron en frutos de naranja maduros recién cosechados del mutante deficiente en ABA 'Pinalate', con tendencia a la deshidratación, un mayor contenido en sacarosa respecto a frutos de 'Navelate', más tolerantes al 'colapso de la corteza', mientras que los niveles de azúcares reductores fueron similares en ambos cultivares. Por otro lado, comprobaron que el tratamiento de curado (3 días a 37°C), que no reduce la incidencia del 'colapso de la corteza', incrementa la concentración de sacarosa aunque no se observaron diferencias significativas entre frutos de naranja 'Pinalate' y 'Navelate' acondicionados y sin acondicionar, almacenados a 12°C . Asimismo, en este estudio no se encontró ninguna relación entre los niveles de azúcares reductores o de almidón con la susceptibilidad de los frutos cítricos a desarrollar esta alteración. Estos resultados y los anteriores indican que los azúcares solubles y el almidón no parecen tener un papel relevante en la susceptibilidad de los frutos cítricos a desarrollar el 'colapso de la corteza'.

4.2. Bases moleculares

Hoy por hoy no se conocen las bases moleculares relacionadas con la incidencia y el desarrollo del 'colapso de la corteza' en los frutos cítricos que puedan explicar las diferencias en la susceptibilidad a desarrollar dicha alteración entre diversas variedades. En un trabajo en el que se construyó una biblioteca de cDNA a partir de tejido de flavedo de

mandarinas 'Fortune' almacenadas en frío se aisló un gen *Crvor15* que codifican una dehidrina (Sanchez-Ballesta *et al.*, 2004) y un gen que codifica una proteína transportadora de lípidos (LTP) (Sanchez-Ballesta, 1998). Un análisis Northern reveló que los niveles de expresión de estos genes en frutos recién cosechados de naranjas 'Navelate' eran muy inferiores respecto a los encontrados en 'Pinalate' y que estos niveles aumentaban durante el almacenamiento a 12 °C en frutos de ambas variedades de naranja, siendo dicho incremento mayor en la variedad más susceptible al 'colapso de la corteza' ('Pinalate'). Resultados similares se obtuvieron al estudiar los cambios de expresión del gen *FPAL2* cuya expresión aumentó al producirse esta alteración. La expresión de otros genes aislados de esta genoteca de frío que codificaron una proteína homóloga a una acil transferasa (*3c1*) y una proteína β -1,3 glucanasa de carácter ácido (*CrGlcQ*) aumentaron transitoriamente su expresión en frutos de 'Pinalate', alcanzando un máximo a los 14 días de almacenamiento a 12 °C, disminuyendo posteriormente hasta niveles indetectables. Dicho incremento fue muy superior al observado a los 14 días en 'Navelate' (Sanchez-Ballesta, 1998; Sanchez-Ballesta *et al.*, 2008). Estos resultados sugirieron que ambos genes podría ser buenos marcadores de la susceptibilidad de los frutos cítricos al desarrollo del 'colapso de la corteza'. Además, se comprobó que el aumento de la expresión del gen *CrGlcQ* fue paralelo al mayor incremento en la producción de etileno y precedió a la aparición de síntomas de daño (Sanchez-Ballesta *et al.*, 2008). Este mismo gen ya había sido relacionado anteriormente con el daño celular producido por el estrés de frío en frutos de mandarina 'Fortune' (Sanchez-Ballesta *et al.*, 2006) lo que sugiere la participación de estas proteínas PR en el desarrollo de daños celulares en los frutos cítricos. El estudio de cambios de expresión de 5 genes que codifican PLA puso de manifiesto que la expresión de 3 de ellos (*CsPAT2*, *CssPLA2a* y *CssPLA2b*) aumentaba con el desarrollo del 'colapso de la corteza' como consecuencia del cambio del estatus hídrico en frutos de mandarinas 'Fallglo' al igual que la actividad de la enzima PLA2; mientras que la expresión de los genes *CsPAT2* y *CsPAT3* aumentaba en las zonas necrosadas o en estados avanzados de la alteración, respectivamente (Alfárez *et al.*, 2008).

Por otro lado, la construcción de una biblioteca substractiva de cDNA a partir de flavedo de frutos 'Navel' que presentaban daños o no en la piel puso de manifiesto que la expresión de 4 genes que codifican proteínas de unión a Ca^{2+} , una cistein proteinasa, una expansina y un factor de transcripción NAC era mayor en el tejido dañado que en el no dañado (Gao *et al.*, 2006). Desafortunadamente, los autores no describen el origen ni la morfología de este daño por lo que no hay seguridad de que corresponda a la alteración fisiológica 'colapso de la corteza' objeto de este estudio. En un estudio posterior, se demostró que el factor de transcripción NAC aislado de esta genoteca se inducía de forma transitoria por la aplicación de altas concentraciones de etileno ($600 \mu\text{g L}^{-1}$) y en respuesta a condiciones de estrés como la herida y condiciones de anoxia (Gao *et al.*, 2006; Fan *et al.*, 2007). Aunque se ha sugerido que la exposición a bajas concentraciones de O_2 puede potenciar la incidencia del 'colapso de la corteza' (Petracek *et al.*, 1998a), se comprobó que la expresión de este gen no se modificaba al tratar los frutos con un 3% de O_2 durante un periodo de 24 h (Fan *et al.*, 2007). Los resultados de este trabajo sugirieron que este factor de transcripción podría estar implicado en la ruta de señalización del etileno como ya se había propuesto para su homólogo en *A. thaliana* (He *et al.*, 2005).

Los mecanismos moleculares que se inducen en respuesta al tratamiento con etileno y que serían responsables de su efecto beneficioso en la reducción de esta alteración son desconocidos. Conviene señalar, sin embargo, que existen diferentes trabajos que han examinado las respuestas moleculares de los frutos cítricos al tratamiento con etileno y se han descrito conjuntos de genes con funciones muy diversas regulados a nivel transcripcional por esta hormona (Jacob-Wilk *et al.*, 1999; Katz *et al.*, 2004; Rodrigo y

Zacarias, 2007; Fujii *et al.*, 2007). Recientemente en frutos maduros de mandarina (*Citrus unshiu* Marc.) tratados con altas concentraciones ($100 \mu\text{L L}^{-1}$) de etileno durante 72 h, se ha realizado un estudio molecular mediante la técnica de micromatrices de cDNA que ha permitido identificar un total de 1493 genes regulados a nivel transcripcional por esta hormona (Fujii *et al.*, 2007). Estos autores encontraron que la expresión de genes de funciones muy diversas, como algunos relacionados con la fotosíntesis, biogénesis de cloroplastos, metabolismo de hidratos de carbono, metabolismo de pared celular así como diversos factores de transcripción, algunos de ellos posiblemente responsables de los cambios observados durante la maduración de los frutos cítricos, se modificaban en respuesta al etileno. Es interesante señalar que más de la mitad de los mismos reprimían su expresión en respuesta al etileno exógeno aplicado.

5. Situación actual y perspectivas futuras en el estudio transcriptómico del genoma de cítricos en España

La presente revisión bibliográfica pone de manifiesto que en cítricos hoy por hoy todavía no se dispone de un marco que nos permita abordar de forma global el estudio de los mecanismos moleculares que puedan explicar los cambios que tienen lugar en las diversas etapas de su desarrollo así como las respuestas que se producen en situaciones de estrés biótico y abiótico, tanto en campo como durante la postcosecha, y que pueden originar diferentes alteraciones en los mismos. El desarrollo de nuevas técnicas moleculares y bioinformáticas, unido a la disminución de los costes de secuenciación, ha permitido desarrollar grandes colecciones de genes con las que se puede evaluar globalmente la expresión génica de los mismos y desentrañar cuáles actúan de forma coordinada en una determinada ruta metabólica o participan en un mismo proceso biológico. Uno de los avances más importantes que se ha realizado en el área de la citricultura ha sido la creación del CFGP (Forment *et al.*, 2005). (<http://bioinfo.ibmcp.upv.es/genomics/cfgpDB/>). Este consorcio está integrado por distintos grupos de investigación del Instituto de Biología Molecular Celular y de Plantas (IBMCP), del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) y nuestro grupo de Fisiología y Biotecnología de la Postcosecha del IATA. El objetivo de este consorcio es el de caracterizar el transcriptoma de los cítricos utilizando la mandarina 'Clemenules' como modelo. Con este fin se han generado bibliotecas de cDNA, tanto estándar como substractiva o normalizadas a partir de tejidos u órganos en distintos estadios de desarrollo o sometidos a diferentes condiciones de estrés biótico y abiótico. Actualmente el consorcio cuenta con 53 bibliotecas de cDNA que reúnen un total de 27.551 unigenes, 57% 'singletons' y 43% 'contigs' (Anexo I Tabla 49). A partir de las colecciones de ESTs obtenidas se han fabricado tres micromatrices de cDNA, que constituyen la herramienta principal en los estudios globales de expresión génica, dos de las cuales han sido utilizadas en este trabajo de investigación. La primera de ellas, denominada 'micromatriz de primera generación' o 'micromatriz 7K', reúne 12.671 clones que representan 6.333 unigenes, procedentes de 15 bibliotecas de cDNA, mientras que la segunda, la 'micromatriz 12k', contiene 24.288 clones impresos correspondientes a 11.241 unigenes obtenidos a partir de 40 bibliotecas de cDNA. En el grupo se han generado 5 bibliotecas de cDNA que incluyen genes que se expresan diferencialmente en respuesta a alteraciones postcosecha debidas a la infección por *P. digitatum* ('RindPdig24', 'PostharvP1' y 'RindPdigS') o en respuesta a la exposición de los frutos al calor y a la combinación de calor y frío ('FlavFrSub1' y 'FlavCurFr1'). Estos genes fueron incluidos en la micromatriz '12K' (Figura 3).

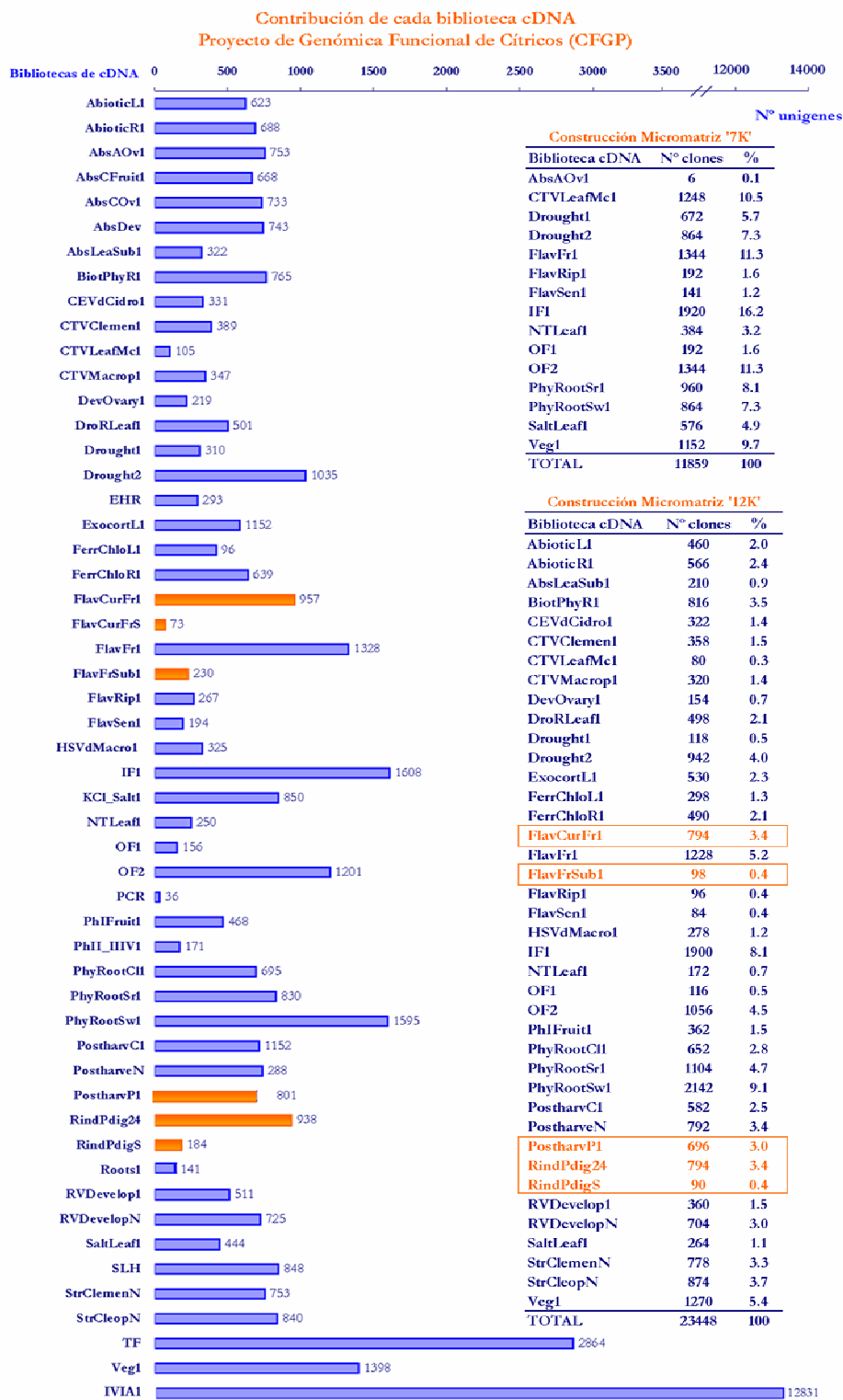


Figura 3. Contribución en unigenes (%) de las bibliotecas de cDNA reunidas en el Consorcio Español de Genómica Funcional de Cítricos (CFGP). Bibliotecas utilizadas para la construcción de la micromatriz 7K y 12K. En la construcción de la micromatriz 12K se utilizaron 5 bibliotecas de cDNA construídas en nuestro grupo de Fisiología y Biotecnología de la Postcosecha del IATA (□)

OBJETIVOS

Los objetivos que se abordan en esta tesis doctoral son:

1. Aislamiento, secuenciación y análisis de un número representativo de ESTs mediante la construcción de una biblioteca de cDNA de flavedo de frutos de mandarina 'Fortune' sometidos a un tratamiento de acondicionamiento térmico a 37 °C y almacenados posteriormente en frío.
2. Estudio de la expresión génica mediante el empleo de micromatrices de cDNA para identificar cambios asociados a la tolerancia al frío de los frutos de mandarina 'Fortune' así como otros que pueden participar en el efecto beneficioso del etileno en la disminución de la incidencia del 'colapso de la corteza' en naranjas 'Navelate'.
3. Análisis Northern de factores de transcripción seleccionados de la biblioteca de cDNA en respuesta al calor, al frío y a la combinación de calor y frío, y en respuesta a la herida en frutos de mandarina de la variedad 'Fortune'. Asimismo, se estudiará su patrón de expresión en respuesta al tratamiento con etileno que reduce la incidencia del 'colapso de la corteza' en naranjas 'Navelate' y en respuesta a la aplicación del inhibidor de su acción: 1-MCP.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIAL VEGETAL.

El estudio de la tolerancia al frío inducida por el tratamiento de curado, que previene la aparición de ‘daños de frío’, y del efecto de los tratamientos con sales de metales divalentes o con sistemas que inducen la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la incidencia de esta alteración fisiológica, se llevó a cabo con frutos de mandarina de la variedad ‘Fortune’ (*Citrus clementine* Hort. Ex Tanaka x *Citrus reticulata*, Blanco), un híbrido de clementina ‘Fina’ y mandarina ‘Dancy’. Asimismo, el estudio de la respuesta a estrés por herida mecánica se llevó a cabo con frutos de esta misma variedad.

Por otro lado, el estudio del efecto beneficioso del etileno reduciendo la incidencia del ‘colapso de la corteza’ se realizó con naranjas del grupo ‘Navel’, concretamente de la variedad ‘Navelate’ (*Citrus sinensis* L. Osbeck).

Los frutos de mandarina ‘Fortune’ fueron recolectados al azar de árboles adultos de la localidad de Burriana (Castellón) durante la campaña 2004-2005, y de la localidad de Liria (Valencia) durante la campaña 2005-2006. Además, se utilizó tejido de frutos recolectados en una campaña anterior al comienzo de este trabajo (2000-2001) que presentaban un índice de ‘daños de frío’ similar como tercera réplica biológica en los análisis de expresión mediante hibridación de micromatrices. En las tres campañas, los frutos se recolectaron a principios de marzo. Los frutos de ‘Navelate’, procedentes de la localidad de Burriana (Castellón), fueron recolectados por las mismas fechas, durante las campañas 2003-2004, 2004-2005 y 2006-2007. En los frutos de ambas variedades, se procedió a una selección de los mismos descartando todos aquellos que presentaban daños mecánicos o causados por insectos u hongos, ‘daños de frío’ o ‘colapso de la corteza’, o cualquier otro tipo de alteración.

2. TRATAMIENTOS.

2.1. Condiciones de almacenamiento y tratamiento de acondicionamiento térmico en frutos de mandarina ‘Fortune’.

Los frutos se dividieron al azar en 3 lotes. El primero se acondicionó durante 3 días a 37 °C y el 90-95% de humedad relativa (HR) (curado) y posteriormente se transfirió a una cámara de almacenamiento a 2 °C (temperatura de ‘daños de frío’) y el 80-85% HR. El segundo y tercer lote se almacenaron inmediatamente después de la recolección a 12 °C (temperatura control que no causan ‘daños de frío’) y a 2 °C respectivamente, y el 80-85% HR. El periodo de almacenamiento para los 3 lotes fue de 60 días (Figura 4).

En cada lote se incluyeron 30 frutos para la evaluación de la incidencia de ‘daños de frío’. Por otro lado, para estudiar los cambios de expresión génica asociados con la tolerancia al frío a partir de tejido de flavedo, se utilizaron 10 frutos por periodo de almacenamiento. Se utilizaron un total de 3 réplicas biológicas, cada una de ellas de frutos cosechados en marzo durante tres campañas diferentes. El tejido se separó cuidadosamente con un cuchillo de la totalidad del fruto, se congeló en nitrógeno líquido, se trituró en un molinillo de café previamente enfriado con nitrógeno líquido y se guardó a -80 °C para posteriores análisis.

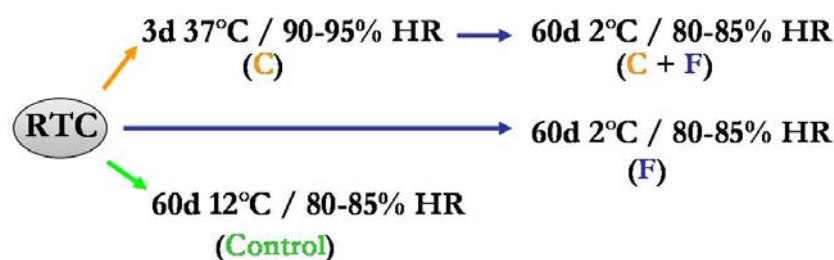


Figura 4: Condiciones de almacenamiento y tratamiento de acondicionamiento térmico a altas temperaturas en frutos de mandarina de la variedad 'Fortune'. RTC: frutos recién traídos de campo; C: frutos curados (3 días 37 °C); C+F: frutos curados y almacenados posteriormente en frío; F: frutos almacenados directamente en frío.

2.2. Estudio del efecto de tratamientos con metales divalentes en la incidencia de 'daños de frío' en frutos de mandarina 'Fortune'.

Teniendo en cuenta que determinados metales divalentes pueden favorecer o reducir el estrés oxidativo favoreciendo el efecto Fenton o actuando como cofactores de enzimas implicados en los procesos de detoxificación de ROS, se estudió el efecto de la aplicación de diferentes sales de metales divalentes en la incidencia de 'daños de frío' en mandarinas 'Fortune'. De forma resumida, se estudió el efecto de la aplicación de sales de metales divalentes en: 1) frutos recién traídos de campo (RTC) antes de ser almacenados durante 30 días directamente en frío (2 °C); 2) frutos RTC antes del curado y posterior almacenamiento durante 30 días en frío; 3) inmediatamente después del curado, antes del almacenamiento durante 30 días en frío; 4) frutos curados y almacenados durante 20 días a 2 °C, antes de someterlos a un periodo adicional de almacenamiento en frío de 10 días. Adicionalmente, para comprobar la posible fitotoxicidad de los tratamientos ensayados, se estudió el efecto de dichos metales en frutos almacenados, después del tratamiento, durante 30 días a la temperatura que no causa 'daños de frío' (12 °C) (Figura 5).

Se recolectaron 3150 frutos (campana 2005-2006), se dividieron en distintos lotes y se trataron con distintas concentraciones de sales de metales divalentes antes de ser sometidos al tratamiento de curado o al almacenamiento a 2 °C o a 12 °C. Los frutos sometidos a dichos tratamientos se dejaron secar durante al menos 4 h y se dividieron posteriormente en tres lotes conteniendo el mismo número de frutos. El primer lote se sometió al tratamiento de curado y posteriormente se almacenó 30 días a 2 °C. Los otros dos lotes se almacenaron también durante 30 días directamente a 2 °C y a 12 °C respectivamente. Se estudió el efecto de los iones divalentes Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} y Mn^{2+} . En los tres lotes, se incluyeron como controles 30 frutos tratados con agua. En todos los casos, los tratamientos se realizaron sumergiendo los frutos durante 1 min en bandejas con agua o con las sales de estudio disueltas en agua a las concentraciones deseadas. Se aplicaron tres concentraciones diferentes de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, que en ambos casos fueron de 1, 10 y 100 mM. Además, se estudió el efecto del ácido tánico y del dietilditiocarbamato de sodio (DETC), agentes quelantes de Fe^{2+} y Cu^{2+} , respectivamente, de forma aislada o en combinación con la sal. En los ensayos que sólo incluían la presencia de agente quelante, el ácido tánico se aplicó al 5%, mientras que las concentraciones ensayadas de DETC fueron 1, 10 y 100 mM. Además, el ácido tánico al 5% se aplicó en

combinación con el $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 ó 100 mM y el DETC 100 mM en combinación con $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1, 10 ó 100 mM. Por otro lado, se estudió el efecto de la aplicación de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, todos ellos a una concentración 100 mM.

Con el fin de favorecer la inducción de estrés oxidativo, que podría potenciar la incidencia de los ‘daños de frío’, se aplicó una mezcla de diclorohidrato de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo (paracuat, ICI-ZELTIA, S.A.) 1 mM, H_2O_2 1 mM y Fe^{2+} 0,1 mM para favorecer la formación de radicales hidroxilo (OH^\bullet). Dicha mezcla se dejó reaccionar durante 5 min a 37 °C antes de ser aplicada a los frutos RTC. Como control adicional al del agua, se utilizaron en este caso, frutos tratados con Fe^{2+} 0,1 mM.

En este mismo experimento, con el fin de estudiar si el Fe^{2+} o el Cu^{2+} revertían el efecto beneficioso del curado reduciendo los ‘daños de frío’, otros lotes de frutos se sometieron al tratamiento de curado o se almacenaron 20 días en frío tras el curado, antes del tratarse con $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 mM, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1 mM y agua (controles). Los frutos curados y tratados con ambas sales o con agua se transfirieron a 2 °C y se mantuvieron a esa temperatura durante 30 días. De igual modo, los frutos tratados después de ser curados y almacenados 20 días en frío, se mantuvieron un periodo adicional de 10 días a 2 °C (Figura 5).

El número de frutos por tratamiento para estimar la incidencia de los ‘daños de frío’ y de posibles efectos fitotóxicos, fue de 30.

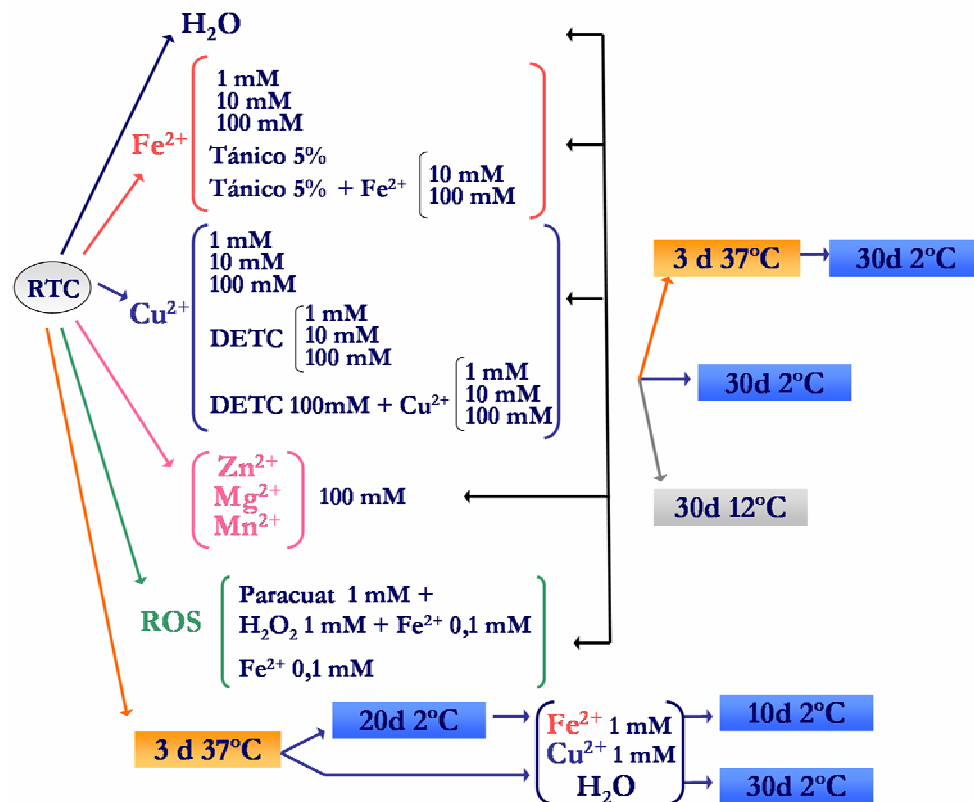


Figura 5: Tratamientos con sales de metales divalentes y de inducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en frutos de mandarina ‘Fortune’. Se aplicaron sales de Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} y Mn^{2+} de forma aislada o en combinación con agentes quelantes (ácido tánico 5% para Fe^{2+} y DETC 100 mM para Cu^{2+})

En un segundo experimento, tras haber analizado los resultados del primero, se estudió el efecto de la aplicación de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a una concentración final de 0,1 mM. Además, se estudió el efecto de la aplicación de la sal de Fe^{2+} tras aplicar un agente quelante, empleándose en este caso ferrocina 1 mM.

En esta segunda experiencia se confirmó además, el efecto de la mezcla paracuat y H_2O_2 en presencia de Fe^{2+} . En este caso se ensayó el efecto del paracuat y H_2O_2 a dos concentraciones (1 y 10 mM) para una misma concentración de Fe^{2+} (0,1 mM). Asimismo, se estudió el efecto de la aplicación de una mezcla de paracuat y H_2O_2 , ambas a 1 mM, y del paracuat 1 y 10 mM en ausencia de Fe^{2+} en ambos casos. En este experimento los tratamientos se aplicaron exclusivamente a los frutos recién recolectados, antes de someterlos a cualquier tratamiento térmico. Para cada tratamiento, al igual que en el experimento anterior, se emplearon 30 frutos y se utilizaron como controles frutos tratados con agua (Figura 6).

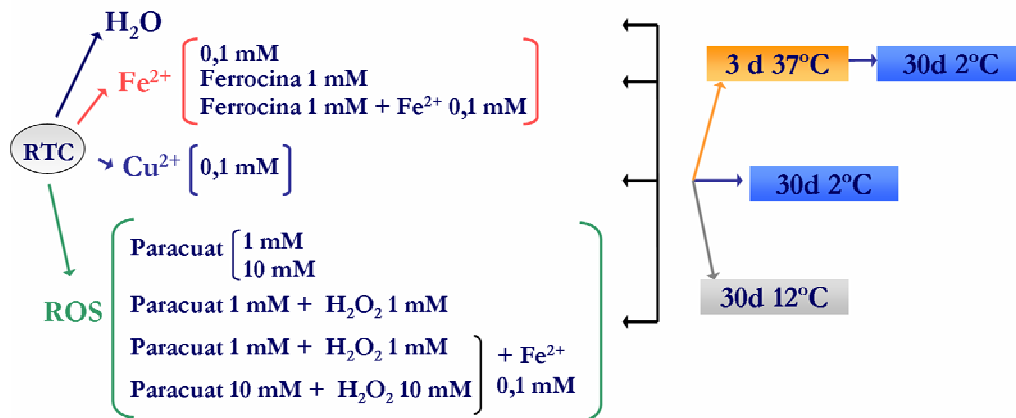


Figura 6: Tratamiento con sales de metales divalentes y de inducción de ROS en frutos de mandarina 'Fortune' acondicionados posteriormente a altas temperaturas y almacenados a 2 °C, almacenados directamente en frío y almacenados a 12 °C (control). Se aplicaron sales de Fe^{2+} y Cu^{2+} . Se utilizó ferrocina como quelante del Fe^{2+} .

2.3. Estudio de la respuesta a estrés por herida mecánica en frutos de mandarina 'Fortune'.

Los frutos recién traídos de campo se dividieron en dos lotes de 120 frutos. A los frutos del primer lote se les practicaron heridas en la superficie con un cepillo de púas metálicas a lo largo del eje vertical produciendo alrededor de 9 perforaciones/cm² de 2-3 mm de profundidad (CH), y se almacenaron inmediatamente a 22 °C y el 90-95% HR. Los frutos del segundo lote, utilizados como controles, se mantuvieron intactos y se almacenaron en las mismas condiciones de temperatura y humedad que los primeros. Durante todo el periodo de almacenamiento se hizo pasar una corriente de aire húmedo para evitar la deshidratación de los frutos. Periódicamente, a las 4, 8, 13, 24, 48 y 72 h se tomaron muestras de 10 frutos de ambos lotes y se separó el tejido de flavedo de la totalidad del fruto, se congeló en nitrógeno líquido, se trituró en un molinillo de café enfriado con nitrógeno líquido, y se guardó a -80 °C para posteriores análisis.

2.4. Estudio de la tolerancia al 'colapso de la corteza' inducida por el acondicionamiento con etileno en naranjas 'Navelate'.

Los frutos recién cosechados fueron llevados al laboratorio. Diez frutos fueron empleados como muestra inicial (RTC), dividiéndose el resto en dos lotes de 120 frutos cada uno. El primer lote se trató durante 14 h con 1 $\mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP a una temperatura de 22 °C en un contenedor de 120 L de capacidad herméticamente cerrado en presencia de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ para evitar la acumulación de CO_2 procedente de la respiración de los frutos. El 1-MCP se preparó disolviendo la cantidad adecuada de producto comercial EthylBloc (43% m.a.) (Rohm and Haas España, S. A.) en un vial con 3 mL de H_2O a 40 °C, de acuerdo con las instrucciones del fabricante del producto. El segundo lote de frutos se almacenó en las mismas condiciones pero en ausencia de este inhibidor de la acción del etileno. A continuación, el lote de frutos sin tratar, se dividió en dos grupos de 60 frutos. El primero se acondicionó con etileno a una concentración de 10 $\mu\text{L L}^{-1}$ durante 4 días y posteriormente se transfirió a aire durante un periodo adicional de 10 días a la misma temperatura y el 90-95% HR. Durante dicho periodo se hizo pasar una corriente de aire húmedo para evitar la deshidratación de los frutos (Fotografía 1). El resto de frutos se almacenaron durante 14 días directamente en aire en las mismas condiciones de temperatura y HR. De forma paralela, se procedió de igual modo para los frutos procedentes del tratamiento con 1-MCP, la mitad de los cuales se acondicionó con etileno durante 4 días de forma previa al almacenamiento durante 10 días en aire, y la otra mitad, se almacenó directamente en aire durante 14 días (Figura 7).



Fotografía 1: Frutos de 'Navelate' almacenados a 22 °C y el 90-95% HR. Efecto del etileno en la disminución de la incidencia del 'colapso de la corteza' en naranjas 'Navelate'.

El tratamiento con etileno se realizó inyectando 24 mL de etileno comprimido comercial (Acethyl, Air LiquidTM) (50.000 $\mu\text{L L}^{-1}$ etileno) en un contenedor de 120 L herméticamente cerrado. A lo largo de los 4 días de acondicionamiento con etileno, se comprobó la concentración de CO_2 y de etileno en el interior de los contenedores

inyectando una muestra de gas del espacio de cabeza del contenedor en un cromatógrafo de gases, comprobándose que la concentración de CO₂ era siempre inferior al 0,3% y la del etileno de $10,0 \pm 0,7 \mu\text{L L}^{-1}$. La aplicación de etileno se hizo diariamente después de que los contenedores se ventilaran durante 30 min.

Los frutos de 'Navelate' sometidos a los cuatro tratamientos descritos se dividieron en dos subgrupos de 30 frutos. El primero sirvió para estimar la severidad del 'colapso de la corteza' a lo largo del almacenamiento y el segundo, 10 frutos por tratamiento y periodo de almacenamiento, para estudiar los cambios en la expresión génica asociados con el desarrollo de esta alteración fisiológica y con el efecto beneficioso del etileno reduciendo su incidencia. Dicho estudio se llevó a cabo tanto en el flavedo como en el la parte del albedo contigua al flavedo, por lo que se separaron ambos tipos de tejidos de la totalidad del fruto y se almacenaron a -80 °C después de haber sido congelados con N₂ líquido y triturados para posteriores análisis.

El número de réplicas biológicas empleadas fue de tres. La primera correspondiente a frutos recolectados en la campaña 2003-2004, y las otras dos correspondientes a frutos procedentes de una misma campaña, 2004-2005, pero procesados de forma independiente.

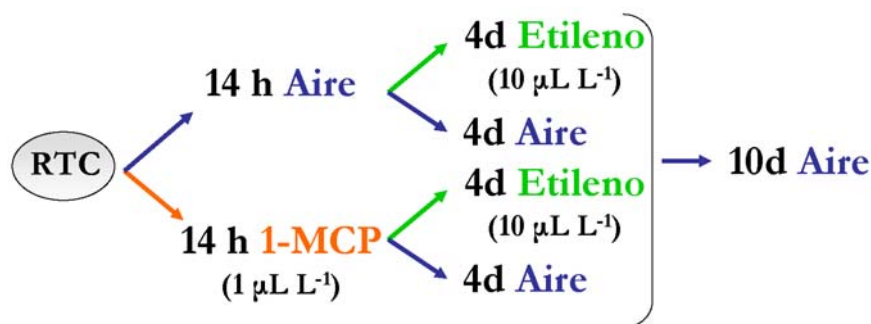


Figura 7: Diseño experimental de los tratamientos con etileno y/o 1-MCP para estudiar la incidencia del 'colapso de la corteza' en naranjas 'Navelate'.

3. MÉTODOS.

3.1. Estimación de daños en la piel.

a) Escala visual de ‘daños de frío’ en mandarinas ‘Fortune’.

El índice de ‘daños de frío’ (IDF) de los frutos acondicionados y no acondicionados se calculó de forma periódica a lo largo del almacenamiento. Los ‘daños de frío’, caracterizados por la aparición de picado y áreas de color pardo en el flavedo, se evaluó estableciendo una escala visual del 0 (sin daño) al 3 (daño severo) de acuerdo con la intensidad del manchado. Los frutos se clasificaron de la siguiente forma: 0 = frutos sin daño; 1 = daños ligeros; 2 = daños moderados; 3 = daños severos (Figura 8). El IDF se calculó a partir del sumatorio del número de frutos pertenecientes a cada categoría multiplicado por el valor de la escala correspondiente a cada nivel de daño, todo ello dividido por el número total de frutos evaluados (Lafuente *et al.*, 1997). Los resultados se presentaron como el valor medio \pm el error estándar (S.E.M.).



Figura 8: Escala visual de evaluación de ‘daños de frío’ en frutos de mandarina ‘Fortune’. 0 = frutos sin daño; 1 = daños ligeros; 2 = daños moderados; 3 = daños severos.

b) Escala visual del ‘colapso de la corteza’ en naranjas ‘Navelate’.

El ‘colapso de la corteza’ se caracteriza por la aparición de depresiones en la piel más o menos circulares que suelen presentarse en la zona ecuatorial del fruto y que afecta tanto al flavedo como al albedo. Para evaluar la incidencia de este tipo de daños, se estableció la siguiente escala visual: 0 = frutos sin daños; 1 = daños incipientes; 2 = daños ligeros; 3 = daños moderados; 4 = daños severos (Figura 9). Se calculó el índice de ‘colapso de la corteza’ (ICC) a partir del sumatorio del número de frutos pertenecientes a cada categoría multiplicado por el valor de la escala correspondiente a cada nivel de daño, todo ello dividido por el número total de frutos evaluados.

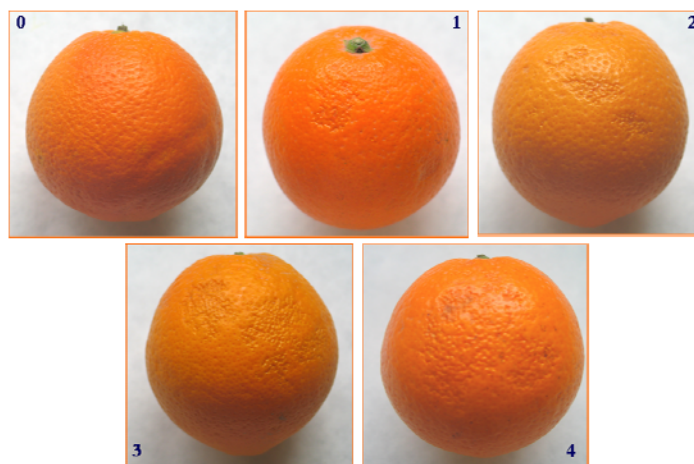


Figura 9: Escala visual de la severidad del 'colapso de la corteza' en naranjas 'Navelate'. 0 = frutos sin daños; 1 = daños incipientes; 2 = daños ligeros; 3 = daños moderados; 4 = daños severos.

3.2. Medida de la concentración de CO₂ y etileno.

En el estudio del efecto beneficioso del etileno en la disminución de la incidencia del 'colapso de la corteza' en naranjas 'Navelate', se llevó a cabo un control de la eficacia del Ca[OH]₂ evitando la acumulación de CO₂ en el interior de los contenedores por efecto respiratorio de los frutos almacenados en los mismos. Esta concentración se determinó diariamente por cromatografía de gases utilizando un cromatógrafo AutoSystem (Perkin-Elmer) equipado con una columna de Chromosorb® 102 de 1,5 m x 2,0 mm (Supelco) y un detector de conductividad térmica (TDC). Las condiciones empleadas fueron las siguientes: temperatura del inyector = 160 °C, temperatura de la columna = 60 °C, temperatura del detector = 180 °C. La temperatura de la columna fue constante y el flujo del gas portador, el helio, fue de 30 mL/min. Por otro lado, durante el tratamiento con etileno, se comprobó por cromatografía la concentración de dicho gas en el interior de los contenedores. Para ello, se empleó una columna de alúmina activa de 1 m x 2,6 mm (Supelco) y un detector de ionización de llama (FID). Las condiciones empleadas fueron las siguientes: temperatura del inyector = 160 °C, temperatura de la columna = 140 °C, temperatura del detector = 180 °C. Al igual que en el caso anterior, la temperatura de la columna se mantuvo constante. Como gas portador se empleó el nitrógeno con un flujo de 30 mL/min. En ambos casos, se utilizaron 5 réplicas para cada determinación tomando 1 mL del espacio de cabeza de los contenedores a través del septum con una jeringa hipodérmica después de la aplicación de etileno comercial y antes de la apertura de éstos para ventilar. Se determinó la concentración de CO₂ y etileno a partir del área del pico por referencia a un patrón formado por una mezcla de gases de concentración conocida (0,5% CO₂, 1 µL L⁻¹ etileno y N₂ como gas inerte).

3.3. Extracción de RNA.

El protocolo que se describe a continuación está basado en el método descrito por Ballester *et al* (2005). El RNA se extrajo de muestras de flavedo de los frutos de mandarina 'Fortune' o muestras de flavedo y albedo de naranjas 'Navelate' congeladas a -80 °C. Para la extracción se añadieron 2 g de tejido a una mezcla que contenía 10 mL de tampón de extracción (Tris-HCl 200mM pH 8,0, NaCl 400mM, EDTA 50 mM pH 8,0, Sarkosyl 2% y PVP-40 1%), 5 mL de fenol y 100 µL de β-mercaptoetanol previamente calentada durante

5 min a 65 °C. A continuación, se homogeneizó con un disruptor Politrón (Kinematica) durante 1 min. El extracto se incubó 15 min a 65 °C con agitación esporádica, y después de atemperar las muestras, se añadió 5 mL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1; v/v) y se centrifugó a 3990 x g durante 20 min a 4 °C. La fase acuosa se volvió a extraer con 5 mL de fenol y 5 mL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1; v/v) y se volvió a centrifugar a 3990 x g durante 20 min a 4 °C. Los ácidos nucleicos se precipitaron con 1,5 volúmenes de etanol 100% y posterior centrifugación a 27000 x g durante 15 min a 4 °C. Después de lavar el precipitado con etanol al 70%, se disolvió el precipitado con 7,5 mL de TESa (Tris-HCl 10mM pH 8,0, EDTA 5mM pH 8,0 y Sarkosyl 0,1%) a 65 °C. A continuación, se añadió 7,5 mL de agua miliQ estéril y se precipitó el RNA con 5 mL de LiCl 12M y posterior incubación a 4 °C durante al menos 12 h. El precipitado obtenido después de centrifugar a 27000 x g durante 1 h a 4 °C, se lavó con etanol al 70%. Para eliminar los polisacáridos se lavó el precipitado con 250 µL de acetato de sodio 3 M pH 6,0, se centrifugó durante 5 min a 13000 x g a temperatura ambiente y se lavó nuevamente con etanol al 70%. Finalmente, el RNA se disolvió con agua estéril, se incubó a 65 °C durante 15 min y se centrifugó durante 5 min a 13000 x g a temperatura ambiente, recuperándose únicamente el sobrenadante.

El RNA se cuantificó mediante determinación de la absorbancia a 230, 260, 280 y 320 nm. Para comprobar que no se había producido ningún tipo de degradación, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v).

3.4. Construcción de una biblioteca de cDNA y análisis de secuencias.

a) Biblioteca de cDNA 'FlavCurFr1'.

Con el objetivo de tener una muestra representativa de las respuestas tempranas y tardías de los frutos al tratamiento de acondicionamiento térmico y a la combinación del tratamiento térmico y posterior almacenamiento en frío, la construcción de la biblioteca de cDNA se llevó a cabo a partir de poly(A⁺) RNA de una muestra formada por una mezcla proporcionada de RNA de flavedo de frutos de mandarina 'Fortune' acondicionados 4 h, 1 y 3 días a 37 °C, y de frutos curados y almacenados 1, 3 y 10 días a 2 °C. Para la purificación de poly (A⁺) se utilizó el kit 'MicroPoly(A)Purist' (Ambion) siguiendo las instrucciones del fabricante. La cuantificación del RNA poly (A⁺) se llevó a cabo con un espectrofluorímetro (Fluoroskan Ascent FL. Labsystems) utilizando el fluoróforo RiboGreen (Molecular Probes). Además, para comprobar la integridad del RNA poly(A⁺), se llevó a cabo un análisis Northern (véase apartado 3.5) empleando como sonda un fragmento amplificado del gen 'lipid transfer protein' (LTP), previamente disponible en el grupo de trabajo.

La síntesis del cDNA se realizó utilizando el kit comercial 'ZAP-cDNA Synthesis Kit' (Stratagene) siguiendo las instrucciones suministradas en el mismo. En resumen, en primer lugar se sintetizó una cadena complementaria de DNA con residuos de cisteína metilados mediante retrotranscripción por la enzima transcriptasa inversa, que sirvió de molde para la síntesis de la cadena complementaria por la acción de la DNA polimerasa I. A continuación, tuvo lugar la adición de los adaptadores *EcoRI* y su fosforilación, la digestión con la enzima de restricción *XhoI* y finalmente la ligación del inserto al vector Uni-ZAP XR, suministrado previamente predigerido con *EcoRI* y *XhoI*, mediante la acción de la enzima T4 DNA ligasa. Posteriormente, se llevó a cabo el empaquetamiento y la transfección con el kit 'ZAP-cDNA Gigapack III Gold Cloning Kit' (Stratagene) siguiendo las instrucciones del mismo. Para la transfección se utilizó un cultivo de XL1-Blue-MRF-, en medio LB + Tetracilina (Tet). A partir de la biblioteca primaria se procedió a su amplificación por medio de la excisión en masa del fasmido pBluescript que contiene el vector Uni-ZAP XR empleándose para ello el fago 'ExAssistant Helper Phage' en células

de *E.coli* no supresivas SOLR en medio LB + Ampicilina (Amp). La purificación del plásmido se realizó en placas de 96 pocillos con el kit 'Montage Plasmid Miniprep96' (Millipore) y la secuenciación se llevó a cabo en el 'Servicio de secuenciación de ADN' del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP) (<http://www.ibmcp.upv.es>). En la secuenciación de los diferentes clones se utilizaron dideoxinucleótidos (terminadores) marcados con compuestos fluorescentes. La resolución y análisis de los productos marcados se realizó en un equipo de secuenciación automática ABI 3100 (Applied Biosystems).

b) Análisis de secuencias.

El análisis de las secuencias se realizó con el programa informático Seqtools (<http://www.dnatoools.org/seqtools.html>). En primer lugar, los cromatogramas obtenidas fueron depurados manualmente para la eliminación de las secuencias del vector y de los adaptadores, descartando aquellas secuencias que poseían menos de 50 pb, sin contar los nucleótidos correspondientes a la cola poly (A⁺). En la búsqueda de secuencias homólogas se utilizó el algoritmo BLASTX contra un una base de datos de proteínas (GenBank non-redundant (nr) protein database), fijándose un E-value de 10⁻⁵ por encima del cual no se consideró significativa la homología de secuencia. Además, se realizó una comparación interna de las secuencias de la genoteca para conocer el número de 'singletons', es decir ESTs que constituyen una copia única del gen en la biblioteca de cDNA, y 'contigs' o secuencias solapantes pertenecientes a un mismo gen. Identificadas todas las secuencias, se procedió a su clasificación.

La anotación funcional fue realizada por el grupo de bioinformática del CFGP. Para ello, se realizó una búsqueda de secuencias homólogas con el algoritmo BLASTX contra la base de datos de proteínas de *A. thaliana* del MIPS (Munich Information Center for Protein Sequences, <http://mips.gsf.de>). La anotación funcional por ontologías génicas ('Gene Ontology', GO) (<http://www.geneontology.org>) de cada ortólogo de *A. thaliana*, fue asignada al unigen correspondiente. Por otro lado, los unigenes con ortólogo en *A. thaliana* se clasificaron de acuerdo al modelo propuesto por la base de datos Kegg (<http://www.genome.ad.jp/kegg/pathway.html>) (Kanehisa *et al.*, 2006). Se les asignó un código E.C. lo que permitió identificar las reacciones en donde podían intervenir, así como su integración en diversas rutas metabólicas.

3.5. Análisis Northern.

a) Electroforesis y transferencia del RNA membranas de nylon.

Las muestras de RNA, 8 µg por muestra, fueron desnaturalizadas y separadas mediante electroforesis en gel de agarosa (1,2% p/v) conteniendo formaldehído 2,2 M (Sambrock *et al.*, 1989). Acabada la electroforesis, se procedió a la transferencia por capilaridad de los RNAs a membranas de Nylon Hybond N⁺ (Amersham Biosciences) empleando tampón 20 X SSC (NaCl 3M, citrato sódico 300 mM, pH 7,0) como solución de transferencia. El RNA se unió de forma covalente a la membrana irradiando con luz UV a 120 mJ/cm² en un UV Crosslinker (Hoefer). Después de la fijación, se realizó una tinción del RNA transferido con azul de metileno al 0,03% en acetato de sodio 300mM pH 5,2, y se lavó con agua miliQ para eliminar los restos de colorante de la membrana.

b) Preparación de las sondas de DNA.

Se realizó una primera amplificación por PCR de los clones seleccionados utilizando como molde 1 ng de DNA plasmídico, y los cebadores FOR17 (5'-GTT TTC

CCA GTC ACG AC -3') y REV 17 (5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'), ambos a una concentración de 0,4 μ M, dNTPs a 0,2 mM y 1 U de la enzima EcoTaq polimerasa (Ecogen). El programa utilizado fue el siguiente: 1 ciclo a 94 °C 3 min, 35 ciclos a 94 °C durante 30 s, 56 °C durante 45 s y 72 °C durante 90 s, seguidos de una extensión final a 72 °C durante 10 min. Los fragmentos de DNA amplificados se purificaron con el kit "High Pure PCR Product Purification Kit" (Roche). A continuación, se cuantificó el DNA purificado con un espectrofluorímetro (Fluoroskan Ascent FL. Labsystems) utilizando el fluoróforo RiboGreen (Molecular Probes).

El marcaje de las sondas se realizó con el isótopo [α - 32 P]dATP mediante una amplificación lineal de la hebra complementaria al mRNA mediante el sistema Strip-EZ PCR (Ambion) y los cebadores T7 o T3 en función de la orientación de las sondas. El isótopo no incorporado se eliminó por cromatografía en columna MicroSpinTM S-300 HR (Amersham Biosciences). Finalmente, se cuantificó la incorporación del isótopo en un contador de centelleo líquido (Wallac 1409).

c) Hibridación y análisis de datos.

Los filtros se trataron con el tampón de prehibridación 'ULTRAhyb Ultrasensitive Hybridization Buffer' (Ambion) en un horno de hibridación a 42 °C durante un periodo mínimo de 2 h. Se añadió a cada tubo las sondas marcadas a una concentración superior a $1,0 \times 10^6$ dpm/mL, y se incubó a 42 °C durante al menos 12 h. Acabada la hibridación, se lavaron los filtros con 2 X SSC y 0,1% SDS (p/v) pH 7,0 durante 10 min a temperatura ambiente y 30 min a 55 °C con 0,1 X SSC y 0,1% SDS (p/v). Los filtros se expusieron con pantallas 'Imaging Plate' (Fujifilm) y se densitometraron con un sistema de adquisición de imágenes FLA 3000 (Fuji). La cuantificación de las señales de hibridación se realizó con el programa Image Gauge V4.0. (Fuji).

La eliminación de la sonda de los filtros, para poder ser hibridados de nuevo con sondas diferentes, se llevó a cabo siguiendo el procedimiento y con los reactivos incluidos en el 'kit' de marcaje.

Con el fin de normalizar los resultados obtenidos con las distintas sondas, los filtros se hibridaron con un fragmento del gen 26S rRNA de *Citrus sinensis* (Acc AJ969115), a una concentración de $1,0 \times 10^5$ dpm/mL previamente disponible en el grupo de trabajo. En primer lugar se cuantificó el nivel de intensidad de los pixels dentro del área delimitada correspondiente a la banda/s de mRNA para un determinado filtro y sonda utilizada, y por otro lado, el del área correspondiente al rRNA para cada filtro y muestra. Se calculó la relación entre ambos niveles de intensidad (mRNA/rRNA) para cada muestra, y se asignó un valor arbitrario de referencia de 100 al mRNA de la muestra correspondiente a los frutos recién traídos de campo (RTC), refiriendo el resto de muestras a ésta.

3.6. Análisis de la expresión génica diferencial mediante el empleo de micromatrices de cDNA.

a) Micromatrices de cDNA.

El análisis de los cambios de expresión génica asociados con la tolerancia al frío, adquirida por el tratamiento de curado, en las mandarinas 'Fortune', se llevó a cabo con dos micromatrices de cDNA diferentes. En primer lugar, se utilizó una micromatriz que contenía 12671 clones correspondientes a 6874 unigenes, con un diámetro de sonda de 120 μ m y una concentración entre 100 y 400 ng/ μ L. El 54% de los clones incluidos en la micromatriz correspondían a 'contigs', que sumaron un total de 40, el 24% a 'singletons', el 11% eran ESTs cuya secuencia no había sido obtenida hasta el momento, y el 5% restante correspondió a secuencias vector o con menos de 20 ó 50 pb. En esta micromatriz de

cDNA, que denominamos '7K', se incluyen 96 controles. La segunda micromatriz empleada, denominada '12K', contiene 24288 clones, 3% de los cuales correspondían entre otros, a controles internos de calibración y a controles negativos. El número de unigenes totales fue de 11193, 42% de los cuales pertenecían a 'contigs' y 58% eran 'singletons'. En esta micromatriz, cada sonda se representó al menos por duplicado, con un diámetro de 90 μm y una concentración de 100 ng/ μL . Cabe señalar que en la construcción de la micromatriz '7K' usada inicialmente no se incluyó ningún clon de la biblioteca de cDNA del presente trabajo. Por otro lado, el estudio de la expresión diferencial en respuesta al tratamiento con etileno, que reduce la incidencia del 'colapso de la corteza' en naranjas 'Navelate', y en respuesta al 1-MCP que bloquea la percepción de esta hormona, se llevó a cabo con la micromatriz 12K.

b) Diseño experimental.

En el estudio de la tolerancia al frío en mandarinas 'Fortune' se utilizaron 3 réplicas técnicas de frutos recolectados en la campaña 2003-2004 para la micromatriz 7k y 3 réplicas biológicas procedentes de tres campañas diferentes para la micromatriz '12K'. En el experimento con 'Navelate' se emplearon 3 réplicas biológicas, dos procedentes de una misma campaña a partir de frutos recolectados en el mismo periodo pero procesados de forma independiente. El número de frutos utilizado para cada réplica biológica fue de 10 para ambas variedades estudiadas.

El diseño experimental seguido en los tres casos fue el de 'referencia común'. En el estudio de los 'daños de frío', se analizaron cuatro condiciones diferentes: 1) frutos recién traídos de campo (RTC); 2) frutos acondicionados 3 días a 37 °C (C); 3) frutos curados y almacenados durante 20 días ('7K') o 30 días ('12K') a 2 °C (CF); 4) frutos almacenados directamente a 2 °C durante 20 días ('7K') o 30 días ('12K') (F). En todos los casos, el RNA fue extraído a partir de flavedo de frutos sometidos a tales condiciones. En el estudio de la expresión diferencial en respuesta al etileno y/o MCP, se analizaron muestras de RNA de flavedo y albedo, de forma independiente, de frutos sometidos a 7 condiciones diferentes: 1) frutos recién recolectados (RTC); 2) frutos almacenados en aire durante 4 días (4d A); 3) frutos almacenados en aire durante 14 días (14d AA); 4) frutos acondicionados con 10 $\mu\text{L L}^{-1}$ de etileno durante 4 días (4d E); 5) frutos acondicionados con 10 $\mu\text{L L}^{-1}$ de etileno durante 4 días y almacenados un periodo adicional de 10 días en aire (14d E-A); 6) frutos tratados durante 14 h con 1 $\mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP y almacenados durante 4 días en aire (4d 1-MCP); 7) frutos tratados durante 14 h con 1 $\mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP y almacenados 14 días en aire (14d 1-MCP-A). Cada una de estas muestras se hibridó junto a una muestra de referencia compuesta por una mezcla proporcionada de todas ellas: [RTC + C + CF + F] en 'Fortune', y [RTC + 4d A + 14d A + 4d E + 14d E-A + 4d 1-MCP + 14d 1-MCP-A] en 'Navelate'. La elección de este tipo de diseño experimental se realizó con la finalidad de obtener el máximo posible de señal en el canal Cy3, teniendo en cuenta los criterios de normalización empleados.

c) Obtención y marcaje del aminoallyl-cDNA.

Las muestras estudiadas se marcaron con el fluoróforo Cy5 y la de referencia común con Cy3. Para ello, se utilizó un método indirecto de marcaje que evita el problema de la diferente eficiencia de incorporación, emisión y estabilidad de los fluoróforos.

El protocolo de síntesis de cDNA y marcaje indirecto está basado en el protocolo descrito por Chris Seidel (<http://www.pangloss.com/seidel/Protocols/aminoallylRT.html>) y modificado posteriormente por Benjamín Schroeder, Eric Snesrud e Ivana

Yang del TIGR (The Institute for Genomics Research; <http://atarrays.tigr.org/PDF/Aminoallyl.pdf>).

En primer lugar, se realizó una síntesis de cDNA a partir de 30 μg de RNA utilizando como cebador el oligonucleótido Oligo(dT)VN (Invitrogen). Se mezclaron 16,5 μL de solución de RNA molde con 1 μL de cebador (2,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). La mezcla se incubó a 70 °C durante 5 min y se mantuvo posteriormente en hielo durante 1 min. A continuación, se adicionaron 12,5 μL de solución que contiene 2 μL de una mezcla de dNTP (7,5 mM dATP, 7,5 mM dCTP, 7,5 mM dGTP, 2,5 mM dTTP y 5mM aminoallyl-dUTP) (Sigma), 6 μL de tampón de primera hebra 5X, 1,5 μL de ditiotreitolo (DDT) (Life Technologies), 10 U de una enzima inhibidora de ribonucleasas (Invitrogen) y 400 U de la enzima retrotranscriptasa Superscript III RT (Invitrogen). La mezcla se mantuvo en un horno de hibridación a 50 °C durante al menos 12 h. Terminada la incubación, se procedió a detener la reacción mediante incubación a 70 °C durante 10 min. Seguidamente, se procedió a la hidrólisis del RNA mediante adición de 10 μL de NaOH 1M y 10 μL de EDTA 0,5M pH 8,0. Tras una incubación a 70 °C durante 15 min, se neutralizó la reacción con 10 μL de HCl 1 M. El aminoallyl -cDNA (aa-cDNA) obtenido se purificó previamente a la unión covalente de los fluoróforos Cy5 y Cy3, que reaccionan específicamente con el grupo amino del aminoallyl-dUTP (aa-dUTP), a fin de eliminar los aa-dUTP no incorporados y las aminas libres susceptibles de unirse a éstos. En esta fase de purificación en columna se siguió el protocolo descrito por Quiagen (MinElute PCR Purification Kit, 'Quiagen spin column protocol') empleando 5mM K_3PO_4 pH 8,0 en 80% EtOH como solución de lavado y 4 mM K_3PO_4 pH 8,5 como tampón de elución.

Para la preparación de los fluoróforos Cy3[®] y Cy5[®] (Amersham), se resuspendió un vial de cada uno de éstos con 70 μL de DMSO (Fluka) y se distribuyeron en tubos eppendorf alícuotas de 4 μL que se centrifugaron en vacío para su secado total y se guardaron a 4 °C en oscuridad y ambiente seco hasta su uso. Para cada reacción, se resuspendió cada fluoróforo con 9 μL de Na_2CO_3 0,1 M pH 9,0 recién preparado, y se transfirieron a los tubos que contenían el aa-dUTP. La mezcla se incubó al menos durante 3 h en oscuridad a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, fue necesaria una segunda etapa de purificación a fin de eliminar el fluoróforo no incorporado, por lo que se adicionó en primer lugar 35 μL de NaAcO 100 mM pH 5,2 y seguidamente las soluciones PB, PE y EB diluido 1:5 del kit de purificación en columna utilizado anteriormente.

Después de cada etapa de purificación, se cuantificó la cantidad total de aa-cDNA sintetizado y la cantidad del aa-cDNA marcado (Cy's-cDNA). Para ello, se realizó una lectura de la absorbancia en placas de 96 pocillos a 260, 550 y 650 nm en un espectrofotómetro 'Multiskan Thermo Electron' y se calculó la concentración teniendo en cuenta que los coeficientes de extinción molar son de 150000 y 25000 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para Cy3 y Cy5 respectivamente, y que una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 37 ng/ μL de cDNA. Además, se calculó el porcentaje de nucleótidos marcados (coeficiente FOI) considerándose óptimo un porcentaje entre el 20 y el 40% de acuerdo a nuestras condiciones de hibridación y características de la micromatriz utilizada.

A continuación, los tubos eppendorf que contenían 100 μL de Cy's-cDNA purificado, se centrifugaron a vacío donde se concentraron hasta un volumen de 2-3 μL y se guardaron a -20 °C hasta su utilización.

d) Hibridación.

Todas las muestras, marcadas con el fluoróforo Cy5, se hibridaron con una misma muestra de referencia que se marcó con el fluoróforo Cy3.

Los cristales se prehibridaron con un volumen de 50 mL de solución que contiene 3X SSC, 0,1% SDS y 0,1 mg/mL de 1% seroalbúmina bovina (BSA; Sigma), a 42 °C durante 1 h. De forma paralela, se adicionó a cada una de las muestras marcadas y concentradas el tampón de hibridación compuesto por formamida 25% (AppliChem), 5X SSC (Sigma), 0,1% SDS (Ambion) y 0,1 mg/mL DNA de esperma de salmón. La cuantificación del cDNA marcado permitió el ajuste de una misma cantidad de pmoles en un volumen de 30 µL para la muestra de estudio y su referencia. A continuación, se mezclaron 30 µL de cada solución de cDNA marcado con Cy5 y Cy3, y se incubó a 95 °C durante 1 min, se centrifugó a 13000 x g durante 30 s a temperatura ambiente y se dejó 5 min a temperatura ambiente.

Finalizada la fase de prehibridación, se lavaron los cristales de forma secuencial en H₂O miliQ estéril (15 s), isopropanol (2 s) (Panreac) y H₂O miliQ estéril (2 s), y se centrifugó a 1064 x g durante 10 min. A continuación, los cristales secos se colocaron en las cámaras de hibridación (HybChamberTM, GeneMachines) previamente humedecidas y se cubrieron con un cubre biselado (Erie Scientific Company). La mezcla de hibridación se aplicó por capilaridad, se cerró la cámara y se incubó 16 h en un baño de agua caliente a 42 °C. Terminada la incubación, se procedió a lavar de forma secuencial los cristales con: 1) solución 2X SSC, 0,1% SDS 3 veces durante 1 s, 5 y 3 min a 42 °C; 2) solución 0,1X SSC, 0,1% SDS durante 10 min a temperatura ambiente; 3) solución 0,1X SSC 5 veces durante 1 min a temperatura ambiente; 4) solución 0,01X SSC durante 5 s a temperatura ambiente. Inmediatamente después de los lavados, los cristales se centrifugaron a 1064 x g durante 10 min.

e) Obtención y procesado de las imágenes, normalización y análisis estadístico.

Las imágenes se escanearon en un plazo no superior a 4 h después de la fase de lavado y centrifugación. Se usó un scanner con laser confocal (GenePix 4100A o 4000B) capaz de detectar la fluorescencia emitida por cada uno de los fluoróforos y de producir imágenes TIFF separadas para cada uno de ellos.

Los cristales hibridados se escanearon primero a 635 nm correspondiente al fluoróforo de mayor longitud de onda (Cy5), y posteriormente a 532 nm correspondiente al de menor longitud de onda (Cy3).

Asumiendo que la cantidad total de cDNA marcado con cada uno de los fluoróforos es igual, y que la mayor parte de los genes tienen una expresión constitutiva y no se expresan de forma diferencial, el cociente de las intensidades de ambos fluoróforos para el conjunto de sondas de la micromatriz tiene que ser próximo al valor de la unidad. Por ello, durante el escaneo, se ajustó la ganancia del fotomultiplicador para que el cociente medio entre las señales Cy5 y Cy3 fuese de $1,0 \pm 0,2$. De esta forma, aunque la intensidad para una determinada sonda pueda ser mayor en uno de los canales que en el otro, al promediar los valores de las intensidades de todas las sondas reunidas en la micromatriz, estas fluctuaciones se compensan.

Una vez obtenidas las imágenes, se llevaron a cabo tres pasos secuenciales: el procesado de la imagen obtenida para el cálculo de los niveles de expresión relativa de cada sonda, la normalización de los datos y el análisis estadístico a fin de identificar los unigenes que se expresan de forma diferencial. La cuantificación de las imágenes se realizó con el programa Genepix Pro 6.0 (Axon Instruments) y los resultados fueron normalizados y analizados estadísticamente con los paquetes informáticos TM4 (<http://www.tigr.org/>) (Saeed *et al.*, 2003) y GEPAS (<http://www.gepas.org/>) (Montaner *et al.*, 2006).

El procesado de la imagen implicó tres etapas. En primer lugar la identificación de cada una de las sondas incluidas en la micromatriz y diferenciación de cualquier artefacto o

defecto de hibridación como hibridación inespecífica, precipitación de los cDNA marcados o, la presencia de polvo u otros contaminantes sobre la superficie del cristal. La información de cada sonda que permitió su identificación está reunida en un fichero 'gal' que consiste en una gradilla que se colocó sobre la imagen escaneada de forma manual. A continuación, el programa calculó el ruido de fondo a nivel local para cada sonda, en vez de calcularlo a nivel global sobre la imagen completa ya que éste es heterogéneo y varía espacialmente. Además, calculó la media y la mediana del conjunto de intensidades para cada sonda y fluoróforo, y proporcionó también estos últimos valores de intensidad substrayendo el valor del ruido de fondo.

La siguiente etapa consistió en una normalización para ajustar diferencias en marcaje y eficiencias de detección de ambos fluoróforos así como también diferencias en la cantidad de RNA de partida de las dos muestras examinadas en la micromatriz. El proceso de normalización comprendió varias fases. En primer lugar, se descartaron del análisis aquellas sondas que, en al menos un canal, presentaban una señal, una vez abstraído el ruido de fondo local, menor al doble de la desviación estándar del ruido de fondo local (SNR). A continuación, y teniendo en cuenta que las fluctuaciones estadísticas en los niveles medidos pueden causar una variación importante en los cocientes calculados y que pequeñas diferencias en la eficiencia de detección o incorporación entre fluoróforos pueden tener gran peso en los genes que tiene un nivel de expresión bajo, se realizó una normalización espacio-intensidad dependiente (LOWESS). La tercera fase consistió en una normalización entre cristales de ajuste de desviaciones en torno a la media del cociente global. Estos dos últimos procesos de normalización se realizaron utilizando el programa de normalización DNMAAD (<http://dnmad.bioinfo.cipf.es>) (Vaquerizas *et al.*, 2004).

Una vez normalizados los datos, se procedió al pre-procesado de los mismos con el programa 'Pre-processing' (<http://bioinfo.cnio.es/cgi-bin/tools/dnarray/preprocess>) (Herrero *et al.*, 2003). En esta fase de pre-análisis, el programa obtiene el valor medio y desviación estándar de los valores, expresados como logaritmo en base 2 del cociente entre las intensidades de ambos fluoróforos (Cy5/Cy3), de los clones que forman parte un mismo unigen. Estableciendo un intervalo de confianza del 95%, los clones con un valor fuera de este intervalo se eliminaron del análisis. A partir de este momento se habla de unigenes, ya sean 'singletons' o 'contigs'. A continuación, para cada uno de los unigenes, utilizando el programa Excel, se analizaron los valores de cada una de las tres réplicas y se determinó cuáles de ellas habían de ser eliminadas antes de proceder al análisis estadístico. Solamente se consideró en el análisis estadístico aquellos unigenes que tenían al menos dos de los tres posibles valores para un determinado tratamiento o ensayo. Después de esta "normalización" entre réplicas, se realizó un test estadístico SAM ("Significance Analysis of Microarrays"; <http://www.tm4.org>) (Tusher *et al.*, 2001) de dos comparaciones estableciendo un valor delta correspondiente a un FDR <1%. Es decir, el número de falsos positivos o unigenes calificados con expresión diferencial pero que tienen expresión constitutiva, fue inferior al 1% del total de unigenes con expresión diferencial. Además, se llevó a cabo este mismo análisis considerando conjuntamente todas las situaciones estudiadas.

Por último, se realizaron dos tipo de análisis de forma paralela, un análisis funcional por ontologías génicas utilizando el programa informático FatiGO+ (Al-Shahrour *et al.*, 2004), y otro de visualización de rutas metabólicas mediante la herramienta 'OMICS Viewer' dentro del programa AraCyc 3.5. Este programa se encuentra implementado via web en 'The Arabidopsis Information Resource' (TAIR) (<http://www.arabidopsis.org>). En ambos casos, el análisis se realizó únicamente con aquellos genes con homología en *A. thaliana*, que fueron del orden de 71 y 77% en las micromatrices 7 y 12K, respectivamente. Los resultados de este análisis permitieron estudiar la expresión diferencial del conjunto de

genes cuyas proteínas participan en un mismo proceso biológico, tienen una misma función molecular o se localizan en el mismo compartimento celular (FatiGO+), o en el segundo caso, dentro de una misma ruta metabólica. El análisis FatiGO+ establece categorías funcionales en diferentes niveles atendiendo al grado de especificidad. Así, en el nivel inferior (nivel 3) las categorías funcionales son muy amplias y a medida que éste aumenta el proceso biológico, función molecular o componente celular definido es más específico. En el análisis AraCyc 3.5 aquellos genes cuyo nivel de expresión se redujo hasta límites indetectables también fueron incluidos en el análisis, asignando para cada comparación estudiada, valores extremos. Asimismo, se representan en este análisis los niveles promedio correspondientes a los valores relativos de acumulación de los mRNA en el caso de existir varios genes con la misma homología en *A. thaliana*.

RESULTADOS

1. ESTUDIO TRANSCRIPTÓMICO DE LOS MECANISMOS IMPLICADOS EN LA TOLERANCIA AL FRÍO INDUCIDA POR EL ACONDICIONAMIENTO TÉRMICO A ALTAS TEMPERATURAS EN FRUTOS DE MANDARINA 'FORTUNE'.

1.1. Efecto del tratamiento de curado en los 'daños de frío'.

La evaluación de la incidencia de los 'daños de frío' se llevó a cabo con 30 frutos en tres campañas diferentes. Los daños comenzaron a aparecer a partir de los 10 días en los frutos no acondicionados almacenados a 2 °C y el mayor incremento en el IDF se produjo entre los 10 y 30 días (Figura 10). El tratamiento de acondicionamiento térmico de 3 días a 37 °C (curado) fue muy efectivo incrementando la tolerancia al frío de las mandarinas 'Fortune', ya que los frutos curados no presentaron 'daños de frío' durante al menos 60 días de almacenamiento a 2 °C (Figura 10). A 12 °C, no aparecieron estos daños (datos no mostrados) y, por tanto, los frutos almacenados a esta temperatura fueron utilizados como controles.

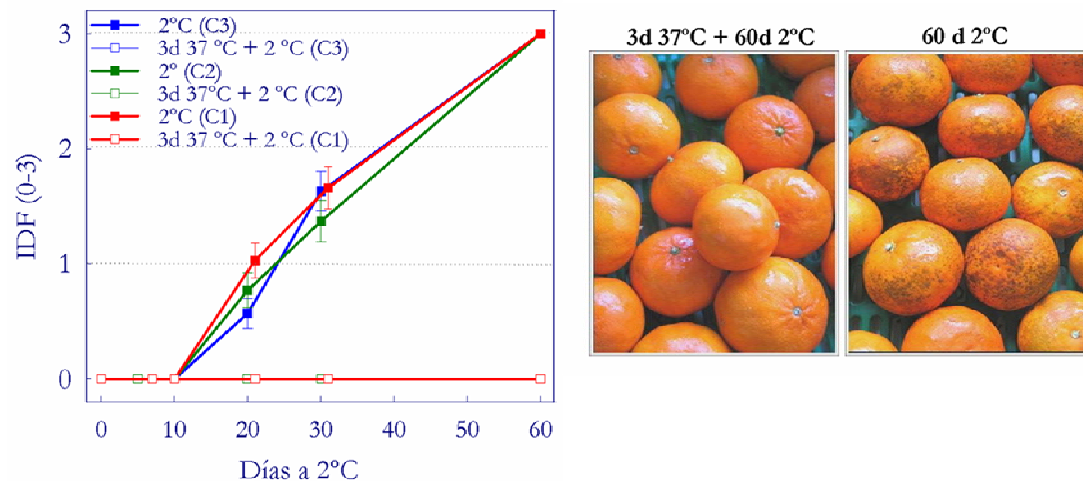


Figura 10: Cambios en el IDF de frutos de mandarinas 'Fortune' procedentes de 3 campañas diferentes almacenadas a 2 °C inmediatamente después de ser cosechadas (●) (■) (■), o después de ser acondicionadas durante 3 días a 37 °C (□) (□) (□). C1: campaña 2000-2001 (datos cedidos por Lafuente, M.T.); C2: campaña 2004-2005; C3: campaña 2005-2006.

1.2. Construcción de una biblioteca de cDNA y análisis de secuencias.

Con objeto de estudiar las respuestas tempranas y tardías al tratamiento de curado y las que tienen lugar una vez realizada la transferencia de los frutos acondicionados al frío, se construyó una biblioteca de cDNA a partir de tejido de flavedo de frutos expuestos a 37 °C durante 4 h, 1 día y 3 días (curado) y de frutos curados y almacenados posteriormente durante 1, 3 y 10 días a 2 °C (Figura 11A).

El título de la genoteca primaria fue de $1,3 \times 10^6$ fagos. A partir de la biblioteca primaria de cDNA, se seleccionaron 20 fagos que se amplificaron por PCR y se calculó el tamaño medio del inserto que fue de 900 pb, obteniéndose un 100% de fagos con inserto. Después de la escisión en masa se obtuvo una colección de clones de cDNA, a la que se le denominó 'FlavCurFr1', de los que se secuenciaron 1.152. Las secuencias obtenidas fueron depositadas en la base de datos del CFGP y los clones se utilizaron para la construcción de

una micromatriz de ‘segunda generación’, también llamada micromatriz ‘12k’, junto con las secuencias obtenidas de otras bibliotecas de cDNA reunidas en el CFGP. En este consorcio se han reunido varios miles de unigenes (>20000) procedentes de distintas etapas del ciclo fisiológico de los cítricos o que se inducen frente a diversas situaciones de estrés en frutos u otras partes de la planta. Se comprobó que, del total de secuencias analizadas, 1117 eran válidas y correspondían a 936 unigenes, lo que supone una redundancia del 16%. Cabe señalar que un 46% de estos unigenes (455) sólo se encuentran en esta genoteca (Figura 11B). El 74% de estos unigenes fueron ‘singletons’, es decir ESTs que constituyen una copia única del gen en la base de datos del CFGP. Los otros pertenecían a distintos agrupamientos que reúnen varios fragmentos solapados del mismo gen (‘contig’), un 73% de los cuales estaban constituidos por dos únicos representantes (Figura 11C).

Del total de unigenes analizados, un 19% no presentaron homología en la base de datos de *A. thaliana* (<http://mips.gsf.de>) y en el resto, se encontró un total de 618 secuencias (63%) correspondientes a genes que codifican proteínas de función conocida en esta misma base de datos. El análisis de las secuencias de este último grupo de genes indica que codifican proteínas de funciones muy diversas. Además de proteínas del metabolismo primario (42,4%), destacan diversas proteínas relacionadas con funciones de transcripción (13,1%), proteínas implicadas en procesos de ciclo celular y procesamiento del DNA (10,7%), transducción de señal (3,2%), energía (3,1%), respuesta de defensa de la célula (3,4), transporte celular (2,3%), así como otras relacionadas con síntesis de proteínas (7,9%) y con procesos de plegamiento, localización y modificación de las mismas (7,9%) (Figura 11D).

Por otro lado, los unigenes que tenían una mayor representación en esta biblioteca de cDNA, codifican una metalotioneína (MT), una nodulina y una dehidrina, con 16, 11 y 9 ESTs, respectivamente (Tabla 1). Además, se encontró una gran abundancia de genes que codifican proteínas relacionadas con el estrés oxidativo, como una peroxidasa (POD), una tioredoxina (TRX) y una SOD dependiente de Mn, y de genes que codifican factores de transcripción, como un coactivador de la transcripción de respuesta a etileno. Otros genes agrupados en ‘contigs’ de 4 miembros codifican una ciclofilina implicada en plegamiento de proteínas y dos proteínas precursoras de una enzima implicada en la biosíntesis de tiazol y de una quitinasa de carácter ácido, respectivamente. Además de estos genes, se encontró un gen del metabolismo de fenilpropanoides, concretamente una OMT correspondiente a un ‘contig’ de 3 miembros, y otros genes que codifican dos proteínas LEA, una proteína relacionada con la patogénesis (PR), una proteína de transporte de lípidos (LTP), una metalotioneína, una proteína inhibidora de proteinasas así como otra que participa en la síntesis de almidón (Tabla 1).

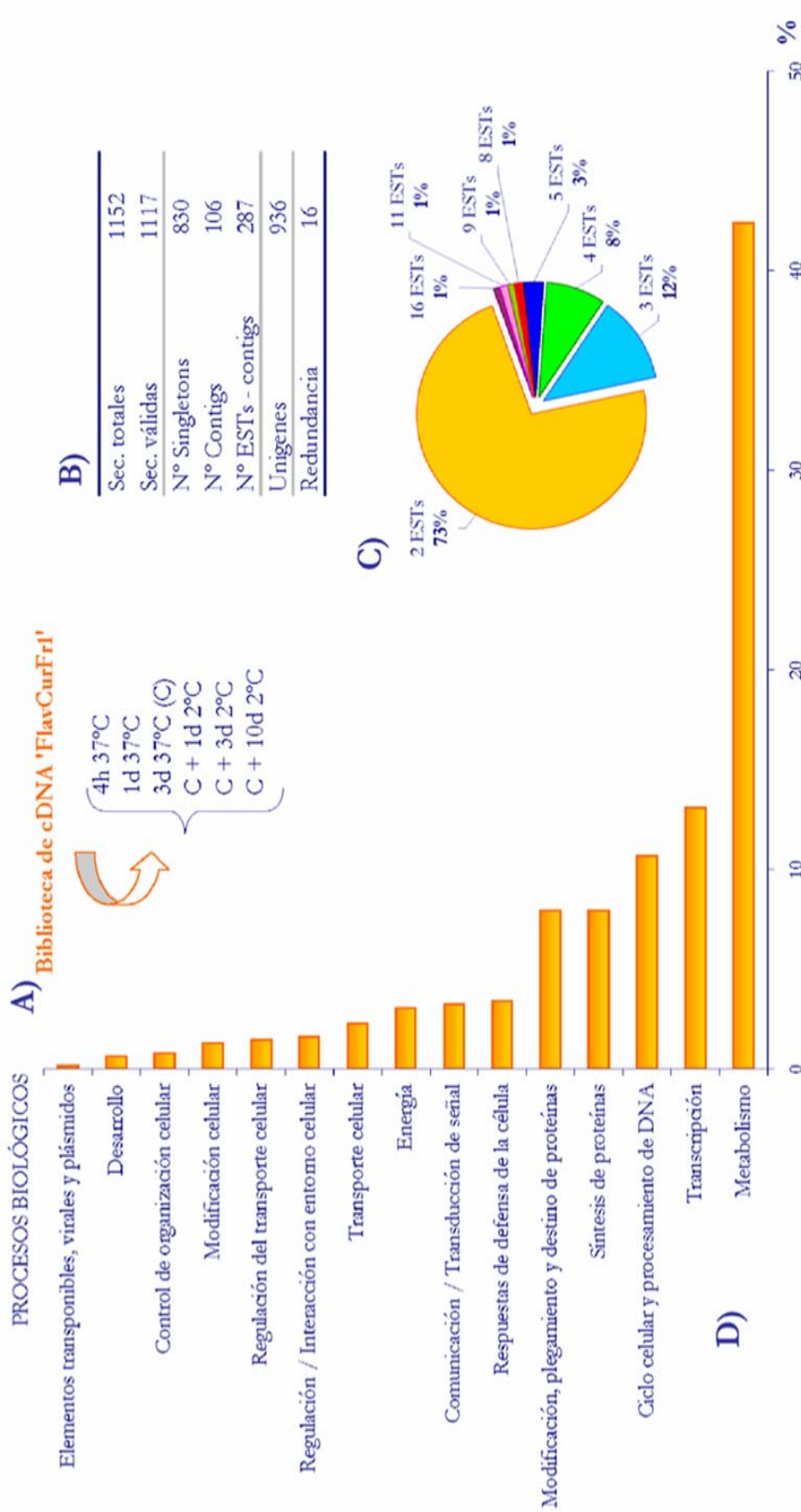


Figura 11: Características de la biblioteca FlavCurFrl. A) Muestras utilizadas para su construcción; B) Número de secuencias pertenecientes a 'singletons' o 'contigs'; C) Distribución de 'contigs' por número de representantes; D) Análisis funcional por ontologías génicas (FatiGO+) de los unigenes con homólogo en *A. thaliana* en relación a procesos biológicos.

Tabla 1: Listado de unigenes más representados en la biblioteca 'FlavCurFr1'. En la tabla se indica el nombre de la proteína más similar representante del 'contig', el nº de acceso en la base de datos, el nº de clones que forman el 'contig' y el E-value de homología de secuencia.

Biblioteca de cDNA 'FlavCurFr1'			
Proteína más similar	Nº Acceso	Nº clones del contig	E-value
Metalotioneína [<i>Citrus unshiu</i>]	BAA31562.1	16	5E-36
Nodulina 'actinorizal AgNOD-GHRP' [<i>Alnus glutinosa</i>]	AAD00171.1	11	6E-17
Dehidrina [<i>Citrus unshiu</i>]	BAA74736.1	9	6E-63
Secuencia sin homología en <i>A. thaliana</i>		8	
LTP ('Lipid-transfer protein') [<i>Citrus sinensis</i>]	AAM21292.1	5	2E-39
Peroxidasa catiónica (EC 1.11.1.7)	T10790	5	2E-45
Secuencia sin homología en <i>A. thaliana</i>		5	
Prot. de maduración, de respuesta a ác. abscísico [<i>Prunus persica</i>] / Probable factor de transcripción [<i>Vitis vinifera</i>]	AAL26889.1	4	2E-56
Secuencia sin homología en <i>A. thaliana</i>		4	
Alcohol deshidrogenasa de cadena corta 'wts2L' [<i>Citrullus lanatus</i>]	BAA89230.1	4	2E-44
Ciclofilina [<i>Triticum aestivum</i>]	AAP76508.1	4	3E-84
Secuencia sin homología en <i>A. thaliana</i>		4	
Coactivador de transcripción de respuesta a etileno, probable [<i>A. thaliana</i>]	NP_191427.1	4	6E-64
Secuencia sin homología en <i>A. thaliana</i>		4	
Enzima de biosíntesis de tiazol (thi1) [<i>Citrus sinensis</i>]	O23787	4	2E-14
Prot. precursora de quitinasa clase II, de carácter ácido (EC 3.2.1.14) [<i>Citrus sinensis</i>]	T10106	4	1E-105
Metalotioneína [<i>Citrus unshiu</i>]	BAA31561.1	3	6E-15
Prot. hipotética ycf1, 226 kDa (ORF 1901)	P12222	3	2E-69
Tioredoxina H [<i>Citrus × paradisi</i>]	AAP33009.1	3	2E-56
LEA ('Late embryogenesis abundant protein') [<i>Lycopersicon esculentum</i>]	T07161	3	2E-17
Mn-SOD ('superóxido dismutasa con cofactor Mn'), precursor de mitocondria	P35017	3	1E-102
Prot. precursora de almidón sintasa Ib [<i>Phaseolus vulgaris</i>]	BAC76613.1	3	5E-59
LEA 5 ('Late embryogenesis abundant protein 5') [<i>Citrus sinensis</i>]	Q39644	3	6E-35
PR10A ('Pathogenesis-related protein 10A') [<i>Datisca glomerata</i>]	CAD33532.1	3	2E-42
Secuencia sin homología en <i>A. thaliana</i>		3	
Prot. inhibidora de cistein proteasas [<i>Manihot esculenta</i>]	AAF72202.1	3	2E-28
Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa [<i>Nicotiana tabacum</i>]	CAB39974.1	3	7E-37
Prot. ribosomal L90B (RPL90B), 60S [<i>A. thaliana</i>]	NP_564417.1	3	2E-89
Ac. cafeico O-metiltransferasa [<i>Rosa chinensis</i>]	BAC78828.1	3	6E-30

1.3. Estudio de los cambios en la expresión génica asociados a la adquisición de tolerancia al frío mediante empleo de micromatrices de cDNA.

a) Micromatriz '7K'.

La micromatriz de 'primera generación' o micromatriz '7K', en el marco del proyecto CFGP, reúne un total de 12.671 clones que representan aproximadamente 6300 unigenes, procedentes de 15 bibliotecas de cDNA reunidas en la base de datos del mismo. El análisis funcional por ontologías génicas del total de genes de esta micromatriz y que presentaban homología con genes de función conocida de *A. thaliana* (71%), reveló que un 58% de los mismos participan en el metabolismo primario, un 43% intervienen en procesos metabólicos de macromoléculas, un 22% en procesos de biosíntesis de componentes celulares y un 11% corresponden a genes de respuesta a condiciones de estrés (Figura 12).

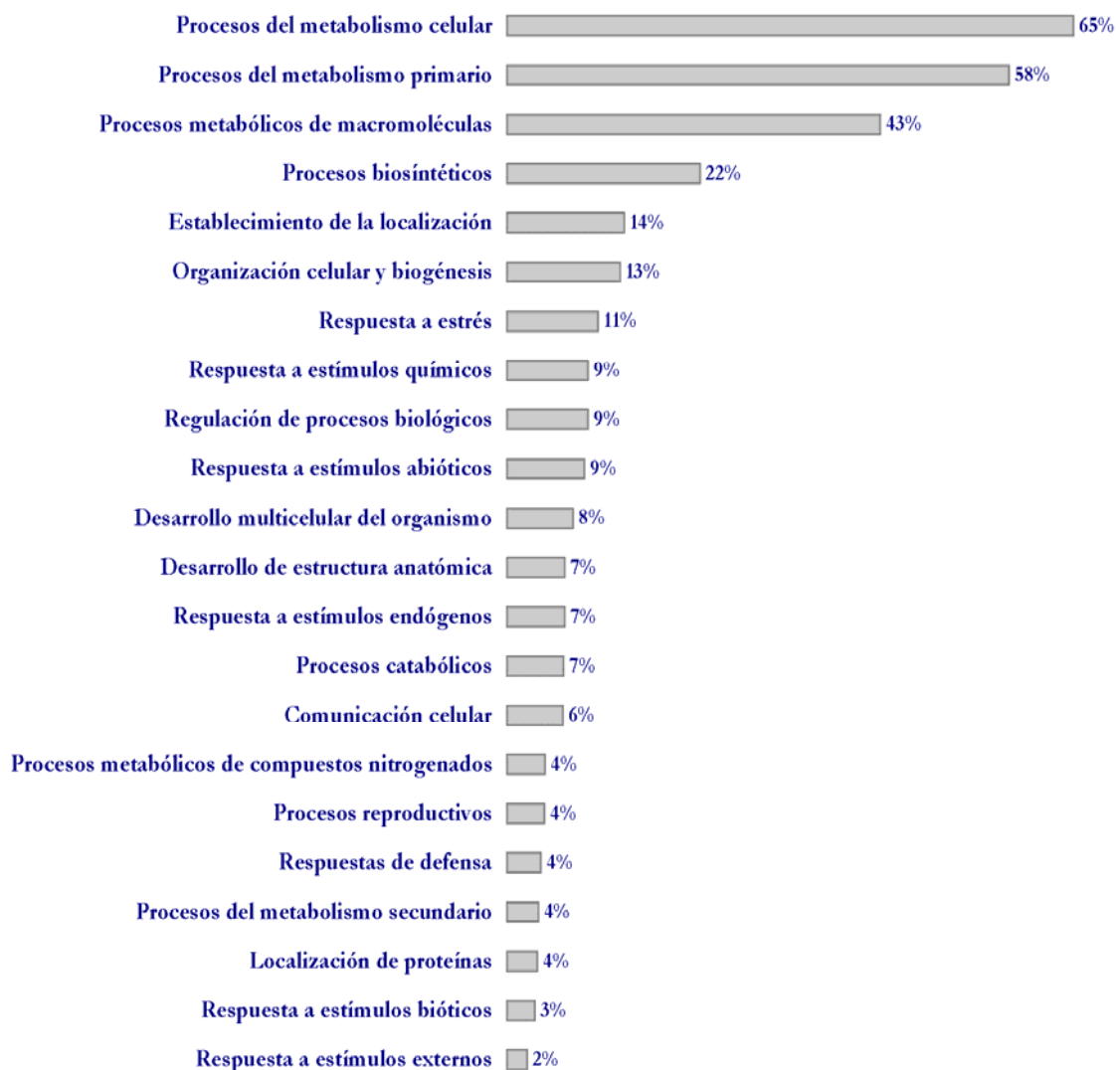


Figura 12: Análisis FatiGO+ de los procesos biológicos en el conjunto de unigenes que presentan homología con genes de *A. thaliana* incluidos en la micromatriz '7K'.

En el estudio de la tolerancia al frío en frutos de mandarina ‘Fortune’ se utilizaron 3 réplicas técnicas para cada una de las siguientes condiciones de estudio: 1) frutos recién traídos de campo (RTC); 2) frutos acondicionados 3 días a 37 °C (C); 3) frutos curados y almacenados durante 20 días a 2 °C (C+F); 4) frutos almacenados directamente a 2 °C durante 20 días (F). La hibridación se realizó con una muestra correspondiente a cada una de estas cuatro condiciones, que se marcó con el fluoróforo Cy5, y una muestra de referencia, formada por una mezcla equitativa de RNA de flavedo de frutos en cada una de dichas situaciones que se marcó con el fluoróforo Cy3 (Figura 13).

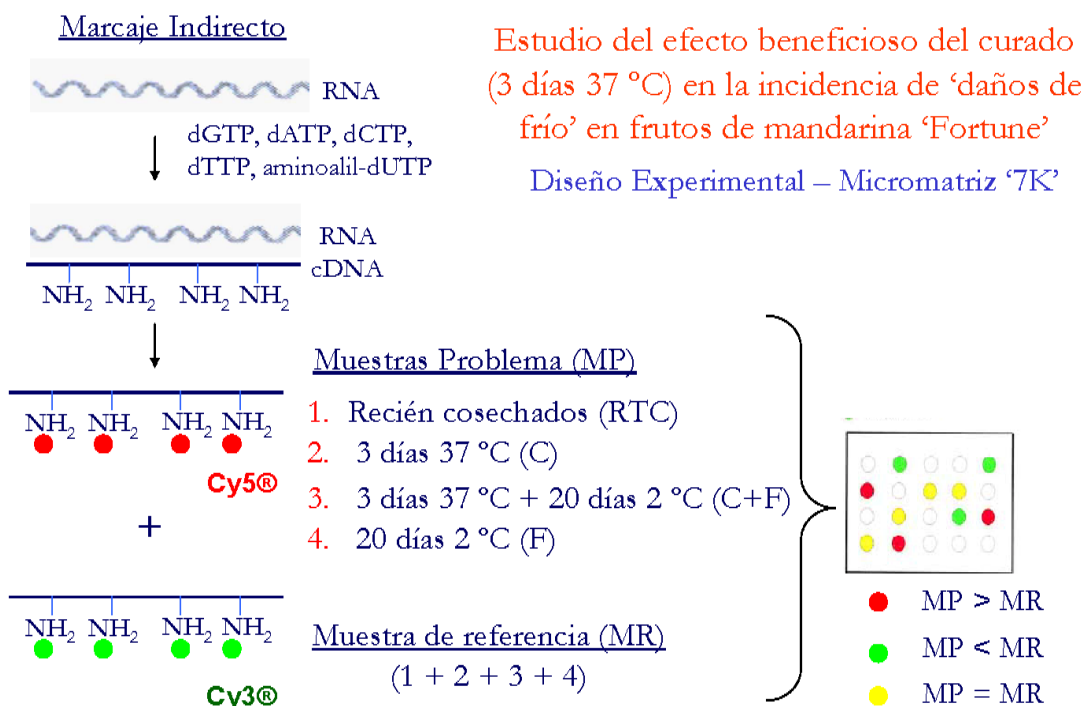


Figura 13: Diseño experimental del análisis de la expresión génica mediante el empleo de la micromatriz ‘7K’. En las hibridaciones, la muestra problema se marcó con el fluoróforo Cy5 y la muestra de referencia, formada por una mezcla equitativa de todas las muestras evaluadas, con el fluoróforo Cy3. Para cada situación estudiada, se utilizaron 3 réplicas técnicas.

En la Figura 14 se muestran dos diagramas de Venn que reúnen el conjunto de genes con diferencias de expresión estadísticamente significativas (SAM con FDR<1%), de inducción y de represión, en respuesta al frío, al calor y a la combinación de ambos estímulos, respecto al nivel de expresión correspondiente a los frutos recién cosechados (RTC). Los resultados mostraron que alrededor de un 48% de los genes analizados en la micromatriz ‘7K’ modifican su expresión frente a alguna de las tres condiciones estudiadas y en todos los casos, el número de genes reprimidos fue superior al de genes inducidos. Así, entre los genes que responden al calor, un 43% se inducen y un 57% se reprimen; entre los que responden al frío, estos porcentajes fueron del 41 y 59%, respectivamente; y entre los que se expresan diferencialmente en respuesta a la combinación de calor y frío, el número de genes reprimidos superó en un 8% al número de genes inducidos. Por otro lado, la mayor abundancia de genes tanto inducidos como reprimidos se observó en los frutos acondicionados durante el almacenamiento a 2 °C, constituyendo un 65% del total de genes inducidos y un 62% de los reprimidos. Además, el análisis SAM reveló un total de 682 genes inducidos de forma específica en respuesta a la combinación de calor y frío respecto

a RTC mientras que los inducidos en respuesta al calor o al frío sumaron un total de 414 y 209, respectivamente. Del mismo modo, el número de genes reprimidos específicamente en los frutos curados y almacenados en frío superó en un 22% al número de genes reprimidos por el calor y en un 81% al de genes reprimidos solamente en los frutos almacenados directamente a 2 °C. Por otro lado, el número de genes que presentan una respuesta común a varios estímulos, representados en las intersecciones de los círculos de cada diagrama de Venn, constituyen un 34 y un 45% del total de genes inducidos y reprimidos, respectivamente. El 27 y el 23% de estos genes de respuesta no específica se inducen o reprimen, según el caso, en respuesta a los tres estímulos estudiados, respecto a RTC, como puede observarse en el centro de cada diagrama. Además, dentro de este contexto, se encontró una mayor abundancia de genes que se expresan diferencialmente tanto en los frutos acondicionados y transferidos posteriormente al frío como en los almacenados directamente a 2 °C (39% inducidos y 38% reprimidos).

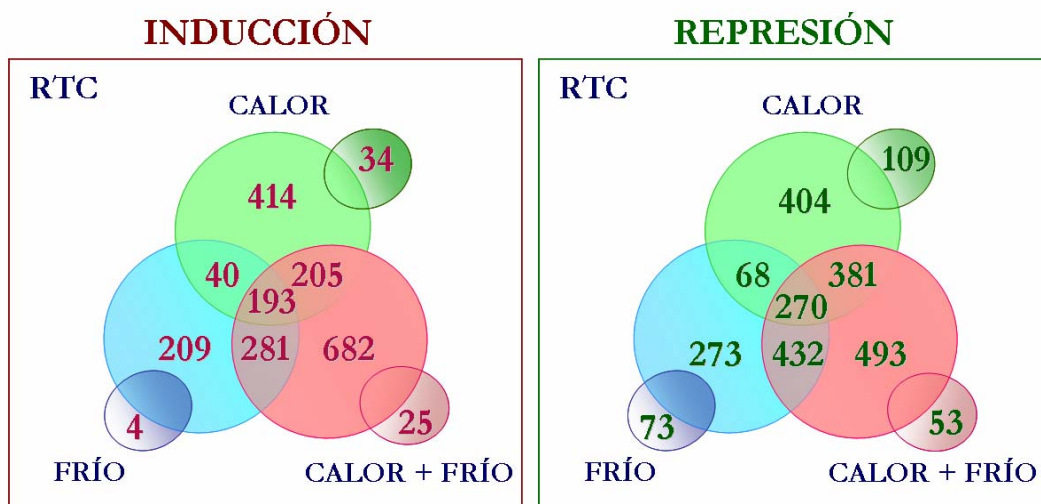


Figura 14: Diagramas de Venn que muestran el número de genes con cambios de expresión estadísticamente significativos en respuesta al calor, al frío y a la combinación de ambos estímulos, respecto al nivel de expresión de frutos recién cosechados en la micromatriz '7K'. En las intersecciones de los círculos se representa el número de genes que presentan una respuesta diferencial frente a varias de las situaciones estudiadas. En los círculos pequeños se indica el número de genes que sólo se expresan o dejan de expresar en cada una de estas situaciones.

El análisis estadístico SAM reveló un total de 750 genes con mayor nivel de expresión relativo en frutos acondicionados y almacenados en frío respecto a los transferidos directamente a 2 °C y 859 que, por el contrario, presentaron mayor expresión en respuesta al frío en los frutos sin acondicionar respecto a los acondicionados. En la Tabla 2 se muestra un listado de los 30 genes que mostraron mayor expresión diferencial en frutos acondicionados y almacenados en frío respecto a los almacenados directamente a 2 °C (C+F>F). Con una diferencia de al menos 4 veces en el nivel de expresión entre ambos tipos de frutos, se encontraron dos genes que codifican quitinasas, con la misma homología en la base de datos de *A. thaliana* (At3g12500), y 4 genes correspondientes a una ferritina 3 (At5g01600) y a tres proteínas de unión al RNA ricas en residuos de glicina (At2g21660). Además, se observaron dos factores de transcripción, uno de ellos de respuesta a etileno (At3g16770) y otro de la familia NAM (Atg01720). Otros dentro de este grupo codifican una enzima desaturasa de lípidos de membrana (At2g46210), cuya expresión a 2 °C fue al menos 3 veces superior en los frutos acondicionados respecto a los

transferidos directamente a dicha temperatura, y tres enzimas que participan en la glicólisis. Entre estos últimos, dos corresponden a enzimas piruvato descarboxilasas (At5g01320 y At4g3307) cuya expresión disminuyó en respuesta al frío 'per se' y el tercero a una fosfoglucoasa isomerasa (At5g42740) que se indujo 8 veces en respuesta al calor y su expresión se mantuvo alta durante 20 días de almacenamiento a 2 °C (Tabla 2). Entre los restantes al menos dos veces más expresados en respuesta a la combinación de calor y frío respecto al frío 'per se' (Fichero Excel 'Fortune'-'7K' adjunto), se encontraron genes que participan en el metabolismo de fenilpropanoides como 3 genes que codifican una cinamato 4-hidroxilasa (C4H) (At2g30490), una cafeil-CoA O-metiltransferasa (CCoAOMT) (At4g34050) y una isoflavona reductasa (IRL) (At4g39230). En los dos primeros, el curado evitó la caída del nivel de expresión que se produce en respuesta al frío en los frutos sin acondicionar mientras que en el tercero, se produjo una inducción específica en respuesta a la combinación de calor y frío. Asimismo, se encontraron genes de estrés oxidativo, como un gen que codifica una AOX (At3g22360) que se indujo más de 4 veces en respuesta a la combinación de calor y frío respecto de los niveles de expresión en los frutos RTC, u otros que codifican una glutatión S-transferasa (GST) (At2g30860) o una glutaredoxina (At3g11920) cuya inducción se produjo solamente en los frutos acondicionados antes y después de la transferencia a 2 °C. Otros genes de este grupo codifican HSPs, proteínas de respuesta a hormonas como etileno o auxinas, histonas y proteínas reparadoras de DNA y otras relacionadas con el metabolismo de carbohidratos. Así, entre estos últimos se incluyen dos SS (At3g43190), una proteína transportadora de sacarosa de clase 2 (At2g02860), una invertasa (At1g56560) o una proteína SPF1 (At2g38470) relacionada con la degradación de almidón e inducida más de 7 veces en respuesta a la combinación de calor y frío. Por último, también destaca una gran abundancia de genes implicados en la biosíntesis de aminoácidos así como proteínas de señalización y factores de transcripción.

Entre los genes con mayor nivel de expresión en frutos almacenados directamente a 2 °C respecto a los acondicionados previamente (F>C+F), se encontró un gen que codifica una monooxigenasa P-450 (At5g05260), con una diferencia en el nivel de acumulación relativa de los transcritos de al menos 8 veces (Tabla 3). Asimismo destacan otros genes que codifican dos HSP (At5g12020 y At4g27670), tres LEAs (At4g02380 y At4g15910), una β -poligalacturonasa (At1g70370) o una proteína similar a una β -glucosidasa (At1g26560), cuya expresión se reprimió en respuesta a la combinación de calor y frío siendo 4 veces mayor en los frutos no acondicionados expuestos al frío. En otros casos, como en dos genes que codifican una proteína precursora de fitosulfoquina (At3g44735) y un precursor PAR-1b de respuesta a fotoasimilados (At5g52390), se observó una inducción específica en respuesta al frío 'per se' y una diferencia de al menos 3 veces en el nivel de expresión entre los frutos acondicionados y sin acondicionar. (Tabla 3). En el resto de genes de este grupo, que se detallan en el Fichero Excel 'Fortune'-'7K' adjunto, se encontró una gran abundancia de genes COR15 algunos de los cuales mostraron una caída de la expresión durante el almacenamiento en frío en los frutos curados y una inducción en los frutos almacenados directamente a 2 °C. Un comportamiento similar lo presentaron dos genes que codifican dos invertasas (At1g12240 y At3g13790) o un gen que codifica una esterasa inducida por etileno (At2g23620). Asimismo, se encontraron diversos genes que codifican HSPs, proteínas de pared como una β -xilosidasa (At1g02640) o una exostosina (At4g38040) y otros de degradación de lípidos y proteínas, estos últimos reprimidos en respuesta al frío aunque el curado potenció dicho efecto. Por último, se encontró un número elevado de genes que codifican la enzima Rubisco, ATPasas, citocromos P-450, proteínas de unión a clorofilas, enzimas de estrés oxidativo, enzimas de transporte de

fosfolípidos, lipoxigenasas (LOX) y otras que participan en la síntesis de isoprenoides y compuestos derivados como carotenoides.

Tabla 2: Listado de los 30 primeros genes que mostraron las mayores diferencias de expresión (SAM FDR<1%) entre los frutos acondicionados y almacenados 20 días en frío respecto a los frutos almacenados 20 días directamente a 2 °C siendo ésta superior en los primeros (C+F>F). En las tres primeras columnas de valores logarítmicos se muestra el resultado de las comparaciones de los niveles de expresión encontrados en los frutos curados (C), curados y almacenados en frío (C+F) y almacenados directamente a 2 °C (F), respecto a los observados en los frutos recién traídos de campo (RTC). La última columna refleja el incremento del nivel de expresión observado en respuesta a la combinación específica de calor y frío respecto al frío ‘per se’ (valores positivos de Log₂ C+F/F). (●) inducciones; (●) represiones. Solamente se incluyen en la tabla aquellos genes en los que se encontró un nivel relativo de expresión detectable en F y C+F.

Proteína más similar	Unigen	Homología en <i>A. thaliana</i>	C + F > F			
			LOG ₂ (C/RTC)	LOG ₂ (C+F/RTC)	LOG ₂ (F/RTC)	LOG ₂ (C+F/F)
Quitinasa de carácter ácido, clase II [<i>Citrus jambhiri</i>]	923	At3g12500	3.95	2.50	-0.42	2.92
Secuencia no disponible	C05041C10	-	0.46	3.41	0.70	2.71
Feritina 3, precursor cloroplasto (SFerH-3)	6792	At5g01600	0.00	3.40	0.72	2.68
Prot. de unión a RNA rica en residuos de glicina [<i>Citrus unshiu</i>]	6823	At2g21660	1.97	2.73	0.14	2.59
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	5499	-	2.58	1.46	-1.01	2.47
Prot. de unión a RNA rica en residuos de glicina [<i>Citrus unshiu</i>]	5642	At2g21660	1.81	2.54	0.12	2.42
Prot. de unión a RNA rica en residuos de glicina [<i>Citrus unshiu</i>]	6872	At2g21660	1.51	2.28	-0.10	2.38
Secuencia no disponible	C03001A08	-	1.60	2.20	-0.14	2.34
Prot. VPS1 de unión a GTP	C08002G01	At2g14120	1.03	0.97	-1.34	2.31
ERF [<i>Cucumis melo</i>]	6160	At3g16770	0.68	2.42	0.16	2.26
Prot. F10N7 170 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	5528	At4g32020	1.58	3.07	0.84	2.23
Factor de liberación de cadenas peptídicas en eucariotas, subunid. 1-3 (eRF1-3) [<i>Oryza</i> sp]	7046	At1g12920	0.23	2.16	-0.06	2.22
Secuencia no disponible	C05018G08	-	1.64	2.54	0.32	2.21
Prot. de unión a clorofila a/b	6889	At2g21660	1.71	2.30	0.11	2.19
Piruvato descarboxilasa [<i>Fragaria x ananassa</i>]	C08007F10	At5g01320	-0.08	0.81	-1.28	2.09
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	4	-	0.80	0.76	-1.32	2.07
Quitinasa de carácter ácido, clase I [<i>Citrus jambhiri</i>]	7132	At3g12500	2.69	1.62	-0.42	2.04
Prot. de respuesta a hipoxia [<i>A. thaliana</i>]	5525	At3g05550	0.55	2.41	0.40	2.02
Piruvato descarboxilasa 1 [<i>Lotus corniculatus</i>]	6987	At4g33070	0.02	0.77	-1.18	1.94
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	6114	-	2.40	1.42	-0.51	1.93
LTCOR12 regulado por frío [<i>Lavatera thuringiaca</i>]	C20004H04	At1g75750	2.37	0.76	-1.13	1.89
Fosfoglucosa isomerasa citosólica [<i>Arabis glabra</i>]	C03004E06	At5g42740	3.11	2.02	0.16	1.86
Glicosil hidrolasa 17 [<i>A. thaliana</i>]	2194	At4g34480	1.89	1.41	-0.46	1.86
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	241	-	-0.15	1.50	-0.36	1.86
Prot. familia NAM (‘no apical meristem’) [<i>A. thaliana</i>]	233	At1g01720	1.09	3.49	1.64	1.85
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	2904	-	0.11	1.67	-0.15	1.81
Quitinasa de carácter ácido, clase I [<i>Citrus jambhiri</i>]	7103	At3g12500	2.76	1.79	-0.01	1.80
Desaturasa de δ 8-esfingolípidos (EC 1.14.99.)	C07008B12	At2g46210	-0.02	3.20	1.42	1.78
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	C08007A08	-	0.60	2.23	0.47	1.76
Factor de transcripción bZIP [<i>A. thaliana</i>]	6141	At3g62420	0.37	2.93	1.17	1.76

Tabla 3: Listado de los 30 primeros genes cuya expresión fue significativamente mayor en los frutos almacenados a 2 °C respecto a los frutos acondicionados y transferidos al frío (Ver detalles en Tabla 2).

Proteína más similar	Micromatriz '7K' - Fortune		F > C + F			
	Unigen	Homología en <i>A. thaliana</i>	LOG ₂ (C/RTC)	LOG ₂ (C+F/RTC)	LOG ₂ (F/RTC)	LOG ₂ (C+F/F)
Citocromo P450	6147	At5g05260	1.06	0.38	3.53	-3.14
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	231	-	-2.40	-3.51	-0.59	-2.92
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	C03001C11	-	-0.04	-3.69	-0.78	-2.91
Poligalacturonasa, subunid. β	6564	At1g70370	-3.01	-4.69	-2.13	-2.57
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	C04005G08	-	-1.85	-2.69	-0.35	-2.34
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	C04011F04	-	1.55	0.69	2.99	-2.30
Secuencia no disponible	C04004E08	-	1.81	0.88	3.17	-2.30
LEA5	7192	At4g02380	1.24	0.32	2.60	-2.28
Secuencia no disponible	C03005G04	-	-1.39	-2.36	-0.12	-2.23
LEA5	7050	At4g02380	1.60	0.70	2.93	-2.23
Secuencia no disponible	C04023A05	-	-2.15	-2.87	-0.67	-2.20
Prot. función desconocida [<i>A. thaliana</i>]	C20005G09	At5g53480	-1.26	-1.73	0.43	-2.16
HSP clase II citosólica de bajo PM [<i>Prunus</i> sp]	4499	At5g12020	-1.39	-2.28	-0.14	-2.14
sHSP [<i>Lycopersicon esculentum</i>]	6998	At4g27670	-0.97	-2.14	-0.03	-2.11
Secuencia no disponible	C04005H11	-	-2.58	-1.42	0.63	-2.05
Prot. de unión a clorofila a/b	7142	At3g22840	-2.59	-1.65	0.38	-2.02
β-Glucosidasa, probable [<i>A. thaliana</i>]	C18004D03	At1g26560	-0.75	-1.64	0.38	-2.02
LEA5	5533	At4g15910	1.56	0.62	2.62	-2.00
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	2386	-	-0.11	-0.01	1.97	-1.98
Prot. precursora de fitosulfoquina [<i>Glycine max</i>]	4536	At3g44735	-0.39	-0.16	1.81	-1.97
Secuencia no disponible	C05028F06	-	1.48	0.69	2.66	-1.97
Secuencia no disponible	C05011H01	-	1.85	1.05	2.99	-1.95
Secuencia no disponible	C03001D01	-	-0.17	0.34	2.27	-1.93
Secuencia no disponible	C03001A10	-	-1.75	-1.68	0.23	-1.92
Proteasa del cloroplasto [<i>Capsicum annuum</i>]	6349	-	-1.18	-2.53	-0.62	-1.91
Orf107a [<i>A. thaliana</i>]	7101	-	-0.97	-0.76	1.13	-1.89
Secuencia no disponible	C04004F08	-	0.57	0.04	1.92	-1.88
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	2295	-	-1.93	-1.53	0.35	-1.88
Secuencia no disponible	C04004B03	-	-2.73	-1.33	0.54	-1.86
Precursor PAR-1b de respuesta a fotoasimilados	6990	At5g52390	-0.28	-0.35	1.51	-1.86

Estudiando la especificidad de respuesta para cada tipo de estímulo, representada en los círculos periféricos de los diagramas de Venn, se observó que 34 genes se expresaban exclusivamente en los frutos curados. Asimismo, se observaron 25 genes expresados de manera específica en respuesta a la combinación de calor y frío, y únicamente 4 genes en respuesta al frío. Considerando el caso contrario, es decir genes que se expresan en todas las condiciones a excepción de una de ellas, encontramos un total de 109, 73 y 53 genes reprimidos de forma específica en respuesta al calor, al frío y a la combinación de calor y frío, respectivamente (Figura 14). Entre los genes expresados de forma específica en respuesta a la combinación de calor y frío (Anexo II Tabla 50A), se encontraron genes que codifican proteínas de función muy diversa como enzimas implicados en sistemas antioxidantes incluyendo una proteína geranyl geranyl transferasa (GGTA) del ácido homogentísico (At2g18950) que interviene en la síntesis del tocoferol, una enzima deshidrogenasa de cadena corta Tic32 (At4g23420), que participa en el balance redox celular, una citocromo c oxidasa (COX), implicada en el transporte de electrones, o un precursor de una ferritina 2 del cloroplasto (At2g40300). Además, se encontraron dos factores de transcripción ‘zinc finger’ de clase C₃HC₄ RING (At4g02075 y At4g30400), un gen que codifica una proteína nucelina (At4g33490) y dos genes que codifican proteínas quinesinas (At3g16630 y At3g54870), que actúan en el citoesqueleto desplazando vesículas, mitocondrias, lisosomas y otros componentes celulares. Los genes que se inducen únicamente en los frutos almacenados directamente a 2 °C y que no se expresan en respuesta al calor ni a la combinación de calor y frío fueron solamente 4 y codifican una isopentenil pirofosfato sintasa (At3g02780) y una proteína SABRE (At1g58250), implicado en la regulación de la expansión celular y otros dos sin homología en *A. thaliana* o correspondiente a una secuencia no disponible (Anexo II Tabla 50B). Por otro lado, fueron 53 genes los que a excepción de la combinación de calor y frío, se expresan en el resto de condiciones. Entre los 30 con mayor nivel de represión en los frutos acondicionados y almacenados a 2 °C (Anexo II Tabla 51), se encontraron dos genes que codifican proteínas relacionadas con lípidos de membrana como una LOX (At3g45140) que también se reprimió por el frío ‘per se’ aunque el curado favoreció la caída de la expresión del gen durante la exposición a frío hasta niveles no detectables, y un precursor de una proteína de transferencia de lípidos (At2g38540), que no modificó su nivel de expresión en respuesta al frío en los frutos no acondicionados. Otros genes que se reprimieron durante el curado y su expresión no se detectó al transferir a frío codifican una UDP-glucosiltransferasa (At3g55700) y una glicosil hidrolasa (At3g18080). Asimismo, un total de 73 genes reunidos en la micromatriz ‘7K’ reprimieron su expresión hasta límites no detectados en respuesta al frío ‘per se’, 15 de los cuales también lo hicieron, aunque en menor grado, en respuesta a la combinación específica de calor y frío y 2 en respuesta al calor durante el curado. Entre los 30 primeros genes de este grupo con mayor represión en respuesta a frío con respecto a los niveles de expresión de los frutos RTC (Anexo II Tabla 52), se encontraron 3 genes que codifican una MAP quinasa 4 (At4g01370), una tioesterasa del ácido palmítico (At3g60340) y una proteína de respuesta a nitratos (At5g55850) cuya expresión disminuyó también en los frutos curados y almacenados 20 días a 2 °C. En este grupo de genes, solamente uno de ellos que codifica una enzima acetil-CoA sintasa (At5g36880), implicada en la biosíntesis de novo de ácidos grasos a partir de acetato, se indujo en respuesta a la combinación de calor y frío.

En base a resultados que ponen de manifiesto la implicación del estrés oxidativo en la incidencia de ‘daños de frío’ y la participación de enzimas del sistema antioxidante en el efecto beneficioso del curado (Purvis *et al.*, 1995; Sala, 1998; Sala y Lafuente, 1999; Sanchez-Ballesta *et al.*, 2003), se realizó un análisis del conjunto de genes de esta familia incluidos en la micromatriz ‘7K’. Entre aquellos más expresados en respuesta a la

combinación de calor y frío respecto al frío 'per se' (C+F>F) (Tabla 4A), se encontraron 11 genes, algunos de los cuales, como un gen que codifica una AOX (At3g22360), se indujeron durante la exposición a altas temperaturas y su expresión se mantuvo altas temperaturas durante 21 días de almacenamiento a 2 °C. Asimismo, con este perfil se encontraron 4 genes que codifican dos GST 22 (At2g30860), una glutaredoxina (At3g11920) y una dehidroascorbato reductasa (DHAR) (At1g75270), todas ellas con una diferencia de expresión de al menos dos veces entre ambos tipos de frutos. Además, destacan 3 genes cuya inducción fue específica de la combinación de calor y frío y codifican una tioredoxina (At5g06690), una proteína precursora de POD (At1g05260) y una GST 14 (At3g09270). Por último, se encontraron dos genes que codifican dos SOD dependientes de Cu y Mn (At1g08830), uno de los cuales se indujo durante el curado aunque su expresión no se mantuvo al transferir los frutos a 2 °C y el otro se reprimió en respuesta al frío hasta límites indetectables en los frutos sin acondicionar.

Por otro lado, entre un total de 13 genes con mayor expresión en los frutos almacenados a 2 °C respecto a los previamente acondicionados a altas temperaturas (F>C+F) (Tabla 4B), 5 codifican tioredoxinas con diverso perfil de expresión, dos de los cuales (unigenes 6636 y 4820) se reprimieron en respuesta al frío, aunque el curado potenció este efecto. Asimismo, se encontraron 3 genes que codifican dos enzimas POD dependientes de glutatión (At4g11600), un precursor mitocondrial de una Mn-SOD (At3g10920), una GST (At2g47730) o una peroxiredoxina, sin homología en la base de datos de *A. thaliana* (unigen 6749), cuyo nivel de expresión disminuyó en los frutos durante la exposición al calor y/o después de la transferencia a 2 °C pero no en respuesta al frío 'per se'.

Tabla 4: Genes incluidos en la micromatriz '7K' que codifican proteínas relacionadas con el estrés oxidativo y que presentan expresión diferencial en la comparación C+F vs F. Los valores se expresan en escala logarítmica (LOG₂) (Ver detalles en Tabla 2).

Micromatriz '7K' - 'Fortune'			A) C + F > F			
Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	C/RTC	C+F/RTC	F/RTC	CF/F
Cu-Zn SOD [<i>Avicennia marina</i>]	1893	At1g08830	0.08	0.35	-	+
AOX 1a [<i>Lycopersicon esculentum</i>]	C18004H01	At3g22360	0.63	2.34	0.88	1.46
GST 22 [<i>Glycine max</i>]	2496	At2g30860	0.64	1.96	0.77	1.19
Glutaredoxina, probable [<i>A. thaliana</i>]	1849	At3g11920	1.46	0.89	-0.19	1.08
GST 22 [<i>Glycine max</i>]	5575	At2g30860	0.82	1.77	0.83	0.94
GST [<i>Phaseolus acutifolius</i>]	549	At2g30860	0.55	1.40	0.64	0.77
Dehidroascorbato reductasa (DHAR) [<i>Nicotiana tabacum</i>]	6903	At1g75270	0.57	0.42	-0.19	0.61
Tioredoxina [<i>A. thaliana</i>]	3097	At5g06690	-0.24	0.62	0.11	0.52
POD (EC 1.11.1.7) isoenzima 40K precursor, catiónico	6952	At1g05260	0.12	0.75	0.24	0.52
GST 14 [<i>Glycine max</i>]	6484	At3g09270	0.01	1.04	0.65	0.39
Cu-Zn SOD [<i>Citrus limon</i>]	5397	At1g08830	0.42	0.23	-0.07	0.30

			B) F > C + F			
Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	C/RTC	C+F/RTC	F/RTC	C+F/F
Glutation POD, probable [<i>A. thaliana</i>]	4322	At2g25080	-1.04	-1.85	-0.56	-1.29
Tioredoxina POD [<i>Nicotiana tabacum</i>]	6029	At5g06290	-0.45	-1.36	-0.22	-1.14
Tioredoxina m2, probable [<i>Pisum sativum</i>]	6636	At3g15360	-1.09	-1.81	-0.80	-1.02
PHGPx (del inglés 'phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase') [<i>Citrus sinensis</i>]	6875	At4g11600	-0.42	-1.09	-0.30	-0.79
Peroxioredoxina [<i>Populus tremula</i> x <i>Populus tremuloides</i>]	6749	At1g65980	-0.34	-0.71	0.00	-0.72
PHGPx (del inglés 'phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase') [<i>Citrus sinensis</i>]	6317	At4g11600	-0.30	-0.97	-0.26	-0.71
Tioredoxina tipo H (TRX-H)	C03004H03	At3g51030	-0.45	-0.14	0.51	-0.65
GST [<i>Pisum sativum</i>]	6983	At5g02790	0.05	-0.02	0.61	-0.63
Tioredoxina POD [<i>Nicotiana tabacum</i>]	5379	At5g06290	-0.11	-0.46	0.16	-0.62
Mn SOD, precursor mitocondrial	7063	At3g10920	-0.50	-0.89	-0.35	-0.54
POD [<i>Populus balsamifera</i> subsp. <i>trichocarpa</i>]	6502	At5g06720	-1.51	-0.34	0.20	-0.54
Tioredoxina, probable [<i>A. thaliana</i>]	4820	At5g16400	-0.89	-1.03	-0.55	-0.48
GST [<i>Euphorbia esula</i>]	7183	At2g47730	0.21	-0.73	-0.30	-0.44

Por otro lado, en base a resultados previos que indican que el metabolismo de fenilpropanoides podría participar en la tolerancia al frío de los frutos cítricos a través de la síntesis de compuestos fenólicos en donde participan diversas OMTs, se estudió esta familia de genes incluidos en la micromatriz '7K'. El gen *FortOMTII*, correspondiente al clon *ACR556* identificado por Sanchez-Ballesta *et al.* (2003), que se inducía en frutos de mandarina 'Fortune' por las altas temperaturas y su expresión se mantenía alta cuando éstos se transferían al frío, presentaba como ortólogo en *A. thaliana* el gen At5g54160 correspondiente al unigen 6305 en la base de datos del CFGP. El análisis SAM de los resultados de la hibridación con la micromatriz '7K' reveló un aumento en su nivel de expresión en respuesta al calor, al frío y a la combinación de calor y frío, aunque éste fue 1,7 veces mayor en los frutos almacenados a 2 °C que habían sido previamente acondicionados respecto a los frutos que se transfirieron directamente a frío. Asimismo, el gen *ACR233*, correspondiente a una OMT que se inducía en respuesta al frío en frutos de

esta misma variedad de cítricos y que presenta la misma homología en la base de datos de *A. thaliana* que *FortOMTII*, aunque correspondiente a un unigen distinto (5970) en la base del CFGP, se indujo al menos 3 veces durante la exposición al frío en frutos acondicionados y sin acondicionar, no observándose diferencias significativas al comparar entre sí ambos tipos de frutos. El análisis detallado de todos aquellos genes incluidos en la micromatriz '7K' con la misma homología al gen At5g54160 de *A. thaliana* mostró perfiles de expresión muy diversos. Así, se encontraron 3 genes, además de *FortOMTII* y *ACR233*, inducidos por la exposición al frío tanto en frutos acondicionados como en los transferidos directamente a 2 °C, uno reprimido en respuesta al frío en estos últimos frutos, tres reprimidos en respuesta a la combinación de calor y frío y los 4 restantes con expresión constitutiva (Tabla 5).

Tabla 5: Genes que codifican OMTs con homología al gen At5g54160 de *A. thaliana*. En gris (●) se marcan los unigenes 6305 y 5970 correspondientes al gen *FortOMTII* y al gen *ACR233*, respectivamente. (●): inducciones; (●): represiones. (Ver detalles en Tabla 2).

Micromatriz '7K' - 'Fortune' - OMTs

Proteína más homóloga	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	LOG ₂ (C / RTC)	LOG ₂ (C + F / RTC)	LOG ₂ (F / RTC)	LOG ₂ (C + F / F)
Ac. Cafeico 3-OMT	6305	At5g54160	+	+	+	0.86
Ac. Cafeico OMTII [<i>Nicotiana tabacum</i>]	5454	At5g54160	1.13	1.55	0.79	0.75
Catecol OMT (EC 2.1.1.6) - common tobacco	1816	At5g54160	1.27	1.94	1.32	0.62
Catecol OMTIII (EC 2.1.1.6) III - common tobacco	5970	At5g54160	0.45	1.64	1.63	0.02
Catecol OMTIII (EC 2.1.1.6) - common tobacco	6947	At5g54160	0.22	2.08	2.06	0.01
Ac. Cafeico 3-OMT	5531	At5g54160	0.01	-0.40	0.07	-0.47
Catecol OMTIII (EC 2.1.1.6) - common tobacco	7211	At5g54160	-0.18	-0.38	-0.42	0.04
Ac. Cafeico OMT	6577	At5g54160	-0.05	-0.34	-0.28	-0.06
Catecol OMTII [<i>Thalictrum tuberosum</i>]	2054	At5g54160	0.06	0.40	-0.01	0.40
Ac. Cafeico OMT	5951	At5g54160	-0.16	-0.16	-0.35	0.18
Ac. Cafeico OMT [<i>Coffea canephora</i>]	5706	At5g54160	0.00	0.03	0.13	-0.10
Ac. Cafeico OMT	C08010D03	At5g54160	-0.07	0.02	0.17	-0.15
Catecol OMTIII (EC 2.1.1.6) - common tobacco	6533	At5g54160	-0.04	0.01	0.21	-0.20

El análisis funcional por ontologías génicas (FatiGO+) (Tabla 6) mostró que el tratamiento de curado en los frutos almacenados en frío (RTC vs C+F) favorecía la inducción de procesos de regulación de la transcripción (nivel 7). Asimismo, este análisis reveló que un elevado porcentaje de genes que participan en el metabolismo de ácidos monocarboxílicos y de biosíntesis de lípidos (nivel 6) se reprimían en respuesta a la combinación específica de calor y frío pero no en respuesta al frío 'per se'. Un análisis más detallado de este último grupo de genes (Tabla 7) indicó que muchos de ellos participan en la biosíntesis y elongación de ácidos grasos, como una proteína precursora de ACP1 (At4g25050), una enoil-ACP reductasa dependiente de NADH₂ (At2g05990), una 6-fosfogluconato deshidrogenasa (At4g11820), una 3-cetoacil-ACP sintasa (At1g74960) o una acetil-CoA carboxilasa (At2g38040), esta última implicada en la regulación del estado redox. Otros genes dentro de este grupo, codifican enzimas desaturasas como una acil-ACP desaturasa (At2g43710) o una desaturasa de ácidos grasos ω-3 (At5g05580). Además, se encontraron genes que codifican enzimas que participan en procesos de biosíntesis de ceras epicuticulares como una enzima CUT1 (At1g68530), una proteína 'Fiddlehead'

(At2g26250) y una proteína CER1 (At5g57800). Según la clasificación FatiGO+, en estos procesos también se incluyeron genes de biosíntesis de isoprenoides como los que codifican una geranil pirofosfato sintasa (GPPS) (At4g36810), una farnesil pirofosfato farnesil transferasa (FPFTA) (At4g34640), una mevalonato difosfato descarboxilasa (At3g54250), una proteína precursora de LYTb (At4g34350), una proteína precursora de 1-deoxi D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa (At5g62790) y otros relacionados con la biosíntesis de carotenoides, como lo que codifican una β -caroteno hidroxilasa (β -OHasa 1) (At4g25700), una fitoeno sintasa (PSY) (At5g17230), una ζ -caroteno desaturasa (ZDS) (At3g04870) o una anteraxantina/zeaxantina epoxidasa (ABA1) (At5g67030).

Por otro lado, el análisis FatiGO+ mostró una proporción muy elevada de genes relacionados con procesos de traducción (nivel 6) reprimidos en respuesta al frío en frutos acondicionados y sin acondicionar. Asimismo, se observó que el grupo de genes con menor expresión en frutos curados y almacenados a 2 °C respecto a los no tratados a altas temperaturas está enriquecido en genes de respuesta al calor (nivel 5) y del metabolismo de isoprenoides (nivel 6). La exposición al calor (C) induce la expresión de genes que participan en procesos de modificación de proteínas aunque una vez realizada la transferencia de los frutos a bajas temperaturas de conservación (C+F), no se observan diferencias respecto al nivel correspondiente a los frutos recién cosechados (RTC). Asimismo, se observa que la exposición al calor reprime genes del metabolismo de derivados de aminoácidos (nivel 5) al comparar los frutos curados antes y después de la transferencia a 2 °C.

Por otro lado, los resultados del análisis FatiGO+ que hacen referencia a componente celular (Tabla 8A) indicaron que la exposición al frío tanto en frutos previamente acondicionados a altas temperaturas como expuestos directamente a 2 °C favorece la represión de genes que codifican proteínas constituyentes de los ribosomas. Más específicamente, en el grupo de genes que disminuyeron su expresión en los frutos transferidos directamente a las bajas temperaturas con respecto a los niveles iniciales, se encontró un porcentaje elevado de genes que codifican proteínas que forman parte de la subunidad 40S del ribosoma (nivel 9) a partir de la cual se forman los complejos 43S y 48S (nivel 8). Estos resultados concuerdan con los anteriores que indicaron una proporción muy reducida de genes implicados en procesos de traducción dentro del grupo de genes que se indujeron en respuesta al frío tanto en frutos acondicionados como almacenados directamente a 2 °C. Asimismo, el curado favorece el aumento de expresión de genes localizados en orgánulos intracelulares unidos a membrana (nivel 7) mientras que el frío 'per se' tuvo un efecto represor sobre los mismos. Por último, al comparar el grupo de genes diferenciales entre ambos tipos de frutos expuestos al frío se encontró una gran abundancia de genes localizados en orgánulos no unidos a membrana (nivel 3) más expresados en los frutos acondicionados y en el caso contrario, de genes localizados en el cloroplasto (nivel 9).

El análisis FatiGO+ que hace referencia a función molecular puso de manifiesto que la exposición a frío favorece la represión de genes que codifican componentes estructurales del ribosoma (nivel 3) en ambos tipos de frutos. Además, se encontró una elevada proporción de genes de unión a oxígeno (nivel 3) reprimidos de forma específica en respuesta a la combinación de calor y frío (Tabla 8B). Asimismo, se comprobó en este análisis que la combinación de calor y frío favorecía la actividad de factores de transcripción (nivel 5). No obstante, en el grupo de genes con expresión diferencial entre frutos curados y expuestos directamente al frío, este análisis no mostró ninguna categoría funcional sobre o infrarrepresentada con significancia estadística.

En base a resultados previos que indican que la membrana es un componente celular clave donde tienen lugar muchas de las respuestas que se producen frente al estrés

de frío, se realizó un estudio detallado de genes que codifican ATPasas, LOXs, desaturasas de ácidos grasos y enzimas de degradación de lípidos (Tabla 9). En el grupo de genes más expresados en los frutos expuestos directamente al frío respecto a los previamente acondicionados se encontraron dos genes que codifican ATPasas de tipo AAA y tres de la familia V-ATPasa (‘vacuolar type H⁺-ATPasa’). Sin embargo, también se detectaron otros miembros de estas familias de transportadores entre aquellos genes con mayor expresión en estos últimos frutos. Por otro lado, se encontraron 4 genes que codifican enzimas LOX reprimidos en ambos tipos de frutos aunque de forma más marcada en los frutos curados. En relación al conjunto de genes incluidos en la micromatriz que codifican desaturasas de ácidos grasos se observaron perfiles de expresión muy diversos. Así, se encontraron tres de ellos con mayor expresión en los frutos no acondicionados y dos, por el contrario, más expresados en los frutos previamente curados. Entre estos últimos, destaca un gen que codifica una desaturasa de δ -8-esfingolípidos, la cual se indujo más de 8 veces en respuesta a la combinación de calor y frío con respecto a los frutos RTC. Por último, la mayoría de genes que participan en procesos de degradación de lípidos de membrana presentaron una expresión más alta en los frutos no acondicionados expuestos a las bajas temperaturas. Entre ellos, un gen que codifica una fosfolipasa D tipo α -1 (PLD α -1), cuya represión por frío se vio favorecida por el curado, o una palmitoil tioesterasa, que se indujo de forma específica en respuesta al frío ‘per se’.

Tabla 6: Análisis de ontologías génicas (FatiGO+) de procesos biológicos ($p < 0.05$) basado en las hibridaciones con la miromatriz '7K' en el estudio de los cambios de expresión en el flaveo de frutos de mandarina de la variedad 'Fortune' en respuesta al calor, al frío y a la combinación de calor y frío. Los genes analizados en cada comparación son aquellos que mostraron expresión diferencial tanto en el análisis SAM como porque una de las condiciones no presentó valor de expresión. (+): segundo término de la comparación mayor que el primero; (-): primer término de la comparación mayor que el segundo; (●): categorías no redundantes; (↑): proceso biológico inducido en el segundo término de la comparación respecto al primero; (↓): proceso biológico inducido en el primer término de la comparación respecto al segundo.

Análisis FatiGO+ - 'Fortune'		RTC vs C		RTC vs C+F		RTC vs F		C vs C+F		C vs F		C+F vs F	
		Nº genes	Nº genes	Nº genes	p-value	Nº genes	p-value	Nº genes	p-value	Nº genes	p-value	Nº genes	p-value
PROCESOS BIOLÓGICOS													
Nivel 3													
Proc. biosintéticos	435			155	8.67E-04 ↓	121	3.13E-05 ↓						
Proc. regulación de proc. biológicos	183			25	5.38E-03 ↑								
Nivel 4													
Proc. de biogénesis y ensamblaje del compl.	70									31	9.99E-03 ↓		
Proc. biosintéticos de la célula	392			143	8.91E-04 ↓	112	2.01E-05 ↓						
Proc. regulación de proc. metabólicos	144			15	8.67E-04 ↑					15	1.09E-02 ↑		
Proc. regulación de proc. celulares	170			21	1.20E-03 ↑								
Nivel 5													
Proc. metab. de derivados de aminoácidos	45									24	8.05E-03 ↑		
Proc. regulación de proc. metabólicos de la célula	143			15	8.67E-04 ↑					14	3.81E-03 ↑		
Transcripción	142			15	8.67E-04 ↑					14	4.79E-03 ↑		
Proc. de biosíntesis de macromoléculas	223			85	1.32E-02 ↓	73	7.59E-05 ↓			79	3.45E-03 ↓		
Respuesta al calor	33											13	4.44E-02 ↑
Nivel 6													
Proc. de biosíntesis de lípidos	67	25	4.52E-02 ↓	31	4.16E-02 ↓								
Proc. de modificación de proteínas	177	11	4.52E-02 ↑										
Proc. metab. de ác. monocarbox.	53			26	4.51E-02 ↓								
Regulación de nucleobase, nucleósido, nucleótido y ác. nucleicos	129			12	8.67E-04 ↑					12	4.79E-03 ↑		
Traducción	175			70	4.20E-03 ↓	64	4.54E-06 ↓			70	1.04E-04 ↓		
Proc. de biosíntesis de RNA	67									2	1.73E-03 ↑		
Proc. metabólicos de isoprenoides	30											12	4.28E-02 ↑
Nivel 7													
Proc. de regulación de la transcripción	128			12	2.01E-03 ↑					12	2.52E-02 ↑		
Transcripción, dependiente de DNA	67									2	3.81E-03 ↑		
Nivel 8													
Proc. de regulación de la transcripción, dependiente de DNA	63									2	3.81E-03 ↑		

Tabla 7: Genes que participan en procesos de biosíntesis de lípidos que constituyen, en el nivel 6 del análisis FatiGO+, un porcentaje estadísticamente sobrerrepresentado en el total de genes incluidos en la micromatriz '7K' que disminuyeron su expresión en respuesta a la combinación específica de calor y frío (Ver detalles en Tabla 2).

Procesos de biosíntesis de lípidos (Nivel 6) - C+F < RTC (31/67) - Micromatriz '7K' - 'Fortune'

Proteína más similar	Unigen	Homología en <i>A. thaliana</i>	LOG ₂ (C/RTC)	LOG ₂ (C+F/RTC)	LOG ₂ (F/RTC)	LOG ₂ (C+F/F)
Enzima CUT1 [<i>A. thaliana</i>]	5421	At1g68530	0.69	-2.21	-2.32	0.10
Valenceno sintasa [<i>Citrus sinensis</i>]	C04015E09	At5g23960	-1.70	-1.68	-0.60	-1.08
β-caroteno hidroxilasa [<i>Citrus unshiu</i>]	6917	At4g25700	-1.60	-1.31	-1.22	-0.09
ACP 1, precursor cloroplasto	6334	At4g25050	-0.84	-1.19	-1.38	0.19
Enoil-ACP reductasa (NADH ₂) (EC 1.3.1.9)	5404	At2g05990	-0.82	-1.08	-0.85	-0.23
Acetil-CoA carboxilasa / carboxiltransferasa, subunid. α	4382	At2g38040	-0.56	-1.03	-0.43	-0.60
Prot. Mup24-10 [<i>A. thaliana</i>]	6877	At5g60600	-	-1.00	-0.05	-0.95
β-hidroxiacil-ACP deshidratasa, probable [<i>A. thaliana</i>]	2492	At2g22230	-1.13	-0.98	-0.79	-0.19
Fitoeno sintasa [<i>Citrus unshiu</i>]	1979	At5g17230	-0.60	-0.92	-0.16	-0.76
CER1 protein, probable (WAX2) [<i>A.s thaliana</i>]	4288	At5g57800	-0.49	-0.91	-0.84	-0.07
Citocromo P450 90A1 (CYP90A1) (CYP90) (CPD) [<i>A.thaliana</i>]	5371	At5g05690	-0.37	-0.86	-0.40	-0.47
Capsantina / capsobina sintasa, precursor C cloroplasto	6479	At3g10230	-	-0.84	0.08	-0.92
Mio-inositol 1-fosfato sintasa [<i>Artemisia marina</i>]	6137 / 7200	At2g22240	-1.01	-0.82	-0.50	-0.32
S-adenosil L-metionina: ác.salicílico metiltransferasa [<i>Antirrhinum</i> sp]	7140 / 6940	At1g19640	-0.80	-0.82	0.27	-1.09
ζ-caroteno desaturasa [<i>Citrus sinensis</i>]	928	At3g04870	-0.36	-0.79	-0.71	-0.08
Mevalonato difosfato descarboxilasa [<i>Hevea brasiliensis</i>]	5998	At3g54250	-0.55	-0.76	-0.43	-0.32
Acil-ACP desaturasa, precursor cloroplasto	1801	At2g43710	-0.51	-0.74	-0.46	-0.28
Prot. precursora de LYTB [<i>Adonis palaestina</i>]	7011 / 6095	At4g34350	-0.66	-0.71	-0.25	-0.46
Ciclopropil isomerasa (CPI1) [<i>A. thaliana</i>]	2071	At5g50375	-0.07	-0.65	-0.24	-0.41
Prot. precursora de 1-desoxi D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa [<i>Oryza</i> sp]	4214	At5g62790	-0.68	-0.62	-0.14	-0.47
Farnesil difosfato farnesiltransferasa (EC 2.5.1.21)	C02004F09	At4g34640	-0.78	-0.59	-0.51	-0.08
Prot. 'fiddlehead' [<i>Gossypium hirsutum</i>]	3510	At2g26250	1.00	-0.58	-0.48	-0.10
Cloroplasto ω-3-desaturasa [<i>Prunus persica</i>]	6495	At5g05580	-0.41	-0.58	-1.00	0.42
Geranil difosfato sintasa, subunid. pequeña [<i>Mentha x piperita</i>]	6628	At4g36810	-0.09	-0.54	-0.20	-0.34
Zeaxantina epoxidasa [<i>Citrus unshiu</i>]	C16003C08	At5g67030	0.02	-0.49	-0.16	-0.33
Aldehído decarboxilasa, probable [<i>A. thaliana</i>]	2185	At1g02205	0.00	-0.37	-0.31	-0.06
Citocromo P450, probable [<i>A. thaliana</i>]	1914	At3g53130	-0.24	-0.36	-0.43	0.07
3-oxoacil-ACP sintasa [<i>Cuphea pulcherrima</i>]	1919	At1g74960	-0.34	-0.33	0.42	-0.74
6-fosfogluconatodeshidrogenasa [<i>A. thaliana</i>]	5512	At4g11820	0.47	-0.31	-0.58	0.27
3-β -hidroxiesteroides deshidrogenasa/isomerasa	C03005H08	At2g33630	-0.29	-0.30	-0.28	-0.02

Tabla 8: Resumen de los resultados del análisis FatGO+ (BABELOMICS) referentes a componente celular (A) y a función molecular (B) basado en las hibridaciones con la micromatriz '7K' en el estudio de los cambios de expresión en el flavedo de frutos de mandarina de la variedad 'Fortune' en respuesta al calor, al frío y a la combinación de calor y frío. (↑): inducción en el segundo término de la comparación respecto al primero; (↓): inducción en el primer término de la comparación respecto al segundo.

Análisis FatGO+ - Micromatriz '7K' 'Fortune'

A)

Componente Celular no redundante

RTC vs C+F				RTC vs F			
Función Molecular	Nivel	p-valor	Ind ↑ /Rep ↓	Función Molecular	Nivel	p-valor	Ind ↑ /Rep ↓
Núcleo	8	2.10E-02	↑	Orgánulos intracelulares unidos a membrana	7	1.37E-04	↓
Orgánulos intracelulares unidos a membrana	7	1.79E-02	↑	Complejo de preiniciación 43S eucariotas	8	2.34E-03	↓
Ribosoma	8	1.50E-02	↓	Complejo de iniciación 48S eucariotas	8	1.13E-02	↓
				Citosol	9	2.20E-06	↓
				Subunidad pequeña del ribosoma	9	1.01E-03	↓

C+F vs F			
Función Molecular	Nivel	p-valor	Ind ↑ / Rep ↓
Orgánulos no unidos a membrana	3	4.01E-02	C+F > F
Cloroplasto	9	4.44E-02	F > C+F

Análisis FatGO+ - Micromatriz '7K' 'Fortune'

B)

Función Molecular no redundante

RTC vs C+F				RTC vs F			
Función Molecular	Nivel	p-valor	Ind ↑ /Rep ↓	Función Molecular	Nivel	p-valor	Ind ↑ /Rep ↓
Actividad Factor de transcripción	5	4.20E-03	↑	Componente estructural del ribosoma	3	5.78E-03	↓
Unión a oxígeno	3	1.30E-02	↓				
Componente estructural del ribosoma	3	7.30E-03	↓				

Tabla 9: Genes que codifican ATPasas, LOX, desaturasas y de degradación de lípidos de membrana con mayor nivel de expresión en los frutos almacenados directamente a 2 °C respecto a los previamente acondicionados (A) o viceversa (B) (Ver detalles en Tabla 2).

A)			F > C+F			
Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	LOG ₂ (C/RTC)	LOG ₂ (CF/RTC)	LOG ₂ (F/RTC)	LOG ₂ (CF/F)
ATPasa 1 transportadora de fosfolípidos	2397	At5g04930	1.231	0.283	2.059	-1.776
ATPasa tipo AAA, probable [<i>A. thaliana</i>]	6345	At1g07510	-0.519	-1.024	-0.119	-0.906
Prot. inhibidora de ATPasa / F1F0 [<i>A. thaliana</i>]	6067	At2g27730	-0.776	-0.983	-0.379	-0.604
ATPasa tipo AAA, probable [<i>A. thaliana</i>]	C18004F09	-	0.089	0.191	0.743	-0.552
H ⁺ -ATPase vacuolar, probable [<i>A. thaliana</i>]	C18012A05	At2g28520	0.633	0.735	1.280	-0.545
H ⁺ -ATPase vacuolar, subunidad B [<i>Citrus unshiu</i>]	4397	At4g38510	-0.483	-0.606	-0.190	-0.416
ATPasa vacuolar, subunidad catalítica A	C20002A04	At1g78900	-0.310	-0.378	-0.040	-0.338
LOX [<i>Citrus jambhiri</i>]	865	At3g45140	-0.639	-2.314	-0.863	-1.451
LOX [<i>Citrus jambhiri</i>]	C20001H03	At3g45140	-0.610	-2.438	-1.049	-1.389
LOX [<i>Citrus jambhiri</i>]	7117	At3g45140	-0.705	-1.878	-0.965	-0.913
LOX [<i>Citrus jambhiri</i>]	1746	At3g45140	0.218	-	-0.840	-
Desaturasa FAD2 de ác. δ -12 oleico [<i>Vernicia fordii</i>]	7029	At3g12120	-1.029	-0.931	0.054	-0.986
Prot. familia desaturasas de ác. grasos [<i>A. thaliana</i>]	4229	At3g15850	0.454	-0.098	0.363	-0.461
Prot. precursora de desaturasa del ác. grasos ω -6, cloroplasto	6833	At4g30950	0.249	0.530	0.929	-0.399
Lipasa/hidrolasa con motivo GDSL [<i>A. thaliana</i>]	2029	At5g14450	-0.491	-1.786	-0.174	-1.612
Lipasa clase 3 [<i>A. thaliana</i>]	C04005B08	At5g42930	0.396	0.306	0.969	-0.664
Prot. precursora de fosfolipasa D α -1 (PLD α -1) / Colina fosfatasa 1	6488	At1g52570	-0.226	-1.203	-0.610	-0.593
Palmitoil tioesterasa, probable [<i>Tropaeolum majus</i>]	C20006F06	At3g60340	0.631	0.241	0.745	-0.504
Prot. familia lipasas/hidrolasa α/β [<i>A. thaliana</i>]	2108	At3g48410	-0.434	-0.438	-0.133	-0.305

B)			C+F > F			
Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	LOG ₂ (C/RTC)	LOG ₂ (CF/RTC)	LOG ₂ (F/RTC)	LOG ₂ (CF/F)
ATPasa tipo AAA, probable [<i>A. thaliana</i>]	6794	At1g02890	0.300	1.153	0.339	0.813
ATPasa dependiente de DNA, probable [<i>A. thaliana</i>]	C20006A01	At5g18620	0.154	1.125	0.339	0.786
H ⁺ -ATPase tipo P [<i>Vicia faba</i>]	6828	At2g24520	-0.669	0.286	-0.244	0.530
ATPasa tipo AAA, probable [<i>A. thaliana</i>]	1945	At2g29080	+	+	+	0.525
ATPasa del retículo endoplasmático TER94 (89.6 kD)	596	At3g09840	0.449	0.545	0.129	0.416
ATPasa de transporte de Ca ²⁺ , probable [<i>A. thaliana</i>]	6156	At5g57110	0.113	0.556	0.162	0.394
ATPasa tipo AAA, probable [<i>A. thaliana</i>]	C20010E06	At2g03670	-0.218	-0.200	-	+
Desaturasa de δ -8-estingolípido δ -8 (EC 1.14.99.-)	C07008B12	At2g46210	-0.020	3.201	1.419	1.782
Desaturasa de ác. grasos ω -3, cloroplasto [<i>Prunus persica</i>]	6495	At5g05580	-0.413	-0.578	-1.002	0.424
Prot. familia lipasas/hidrolasa α/β [<i>A. thaliana</i>]	4511	At5g11650	-0.238	0.934	0.095	0.839
Palmitoil tioesterasa, probable [<i>A. thaliana</i>]	5413	At3g60340	-0.007	-0.439	-	+

Aleno oxidasa sintasa [<i>Citrus sinensis</i>]	2242	At5g42650	0.106	0.558	0.045	0.513
12-oxofotodienoato reductasa 3 [<i>Lycopersicon esculentum</i>]	C02008A02	At2g06050	0.128	0.541	0.218	0.322

A partir de los genes que se expresan diferencialmente frente a alguna de las tres situaciones de estudio se llevó a cabo una visualización de rutas metabólicas usando la herramienta 'OMICS Viewer' dentro del programa AraCyc 3.5. Los resultados mostraron que la combinación de calor y frío favorece el aumento de expresión de genes que participan en la biosíntesis de etileno (Figura 15). Así, inducidos en los frutos acondicionados y almacenados 20 días a 2 °C con respecto a los frutos RTC se encontraron 3 genes que codifican metionina adenosiltransferasas (At3g17390, At4g01850 y SAM-1: At1g02500) y 4 genes que codifican 2 ACSs (ACS1 y ACS10) y 2 ACOs (At1g03400 y EFE). No obstante, a los 20 días de almacenamiento a 2 °C solamente los tres primeros y el gen *EFE* mostraron una mayor expresión en los frutos acondicionados respecto a los almacenados directamente en frío (C+F>F). Cabe destacar este último, *EFE* (At1g05010), el cual se indujo más de 8 veces por la combinación de calor y frío y por frío 'per se'.

Los resultados del análisis FatiGO+, que indicaron una elevada proporción de genes del metabolismo de isoprenoides menos expresados en los frutos acondicionados respecto a los expuestos directamente a 2 °C, fueron confirmados en Aracyc (Figura 16). En las dos rutas que conducen a la biosíntesis de IPP se encontró un comportamiento diferencial. En la primera de ellas, la ruta del 2-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP) localizada en los plastidios, la exposición al calor disminuyó los niveles de expresión de algunos genes y éstos se mantuvieron reducidos durante la exposición a 2 °C como es el caso de tres que codifican 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa (DXR; At5g62790), una 4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-il-difosfato sintasa (GcpE; At5g60600) o una 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil-4-difosfato reductasa (IspH; At4g34350). Sin embargo, se encontraron dos genes de la ruta citosólica del mevalonato que codifican una acetil-CoA C-acetiltransferasa (BAP1; At4g11820) y una mevalonato quinasa (MVK; At5g27450) cuya expresión disminuyó en respuesta al frío 'per se' y se indujo durante la exposición al calor aunque una vez realizada la transferencia a 2 °C sus niveles fueron similares a los de los frutos RTC. A diferencia de estos últimos, se observó otro gen que codifica una GGPPS (At4g36810) que se indujo más de 5 veces por el curado y sus niveles de expresión se mantuvieron elevados después de la transferencia al frío y no variaron en respuesta al frío 'per se'. Por último, si observamos las etapas finales que conducen a la biosíntesis de carotenoides, y en último término a ABA y compuestos derivados (Figura 17), encontramos un total de 9 genes reprimidos en los frutos acondicionados y almacenados a 2 °C. En dos de ellos esta respuesta fue específica de la combinación de calor y frío y codifican las enzimas anteraxantin/zeaxantin epoxidasa (ABA1; At5g67030) y dioxigenasa de 9-cis epoxicarotenoides (NCED3; At3g14440) implicadas en las etapas finales que conducen a la biosíntesis de ABA. Asimismo, con un perfil similar encontramos 3 genes que codifican las enzimas fitoeno sintasa (PSY; At5g17230), licopeno β -ciclase (LYC; At3g10230) y una oxidasa del aldehído del ácido abscísico (AAO3; At2g27150). Por último, fueron tres los genes de esta ruta que disminuyeron su nivel de expresión tanto en los frutos acondicionados como sin acondicionar durante el almacenamiento a bajas temperaturas, aunque el curado favoreció este efecto represor, y codifican una ζ -caroteno desaturasa (ZDS; At3g04870), una β -caroteno hidroxilasa (β -OHase 1; At4g25700), y una ϵ -caroteno hidroxilasa (LUT1; At3g53130) implicadas en la síntesis de licopeno, de los compuestos β -criptoxantina y zeaxantina precursores de apocarotenoides, y de luteína, respectivamente. Además, con este perfil también se encontraron dos genes que codifican glucosiltransferasas (UGT84B1; At2g23260 / UGT84B2; At2g23250) que forman ésteres de glucosa con el ácido abscísico.

Por último, entre los genes más expresados en los frutos almacenados en frío después de ser acondicionados respecto a los expuestos directamente a 2 °C (C+F>F) también se encontraron genes que participan en la biosíntesis de poliaminas y en el

metabolismo de carbohidratos (Ver Fichero Excel-‘Fortune’ ‘7K’). Así, entre los primeros destacan dos que codifican enzimas adenosilmetionina descarboxilasas (At3g02470 y At5g15950) que se indujeron al menos dos veces de forma específica en respuesta a la combinación de calor y frío. En el segundo grupo, se encontró un gen que codifica una SS SUS4 (At3g43190) y otros correspondientes a enzimas de la ruta de biosíntesis de almidón como una glucosa 6-fosfato isomerasa (At5g42740) que aumentó 8 veces su nivel de expresión al final del tratamiento de curado y se mantuvo elevado después de la transferencia de los frutos acondicionados al frío.

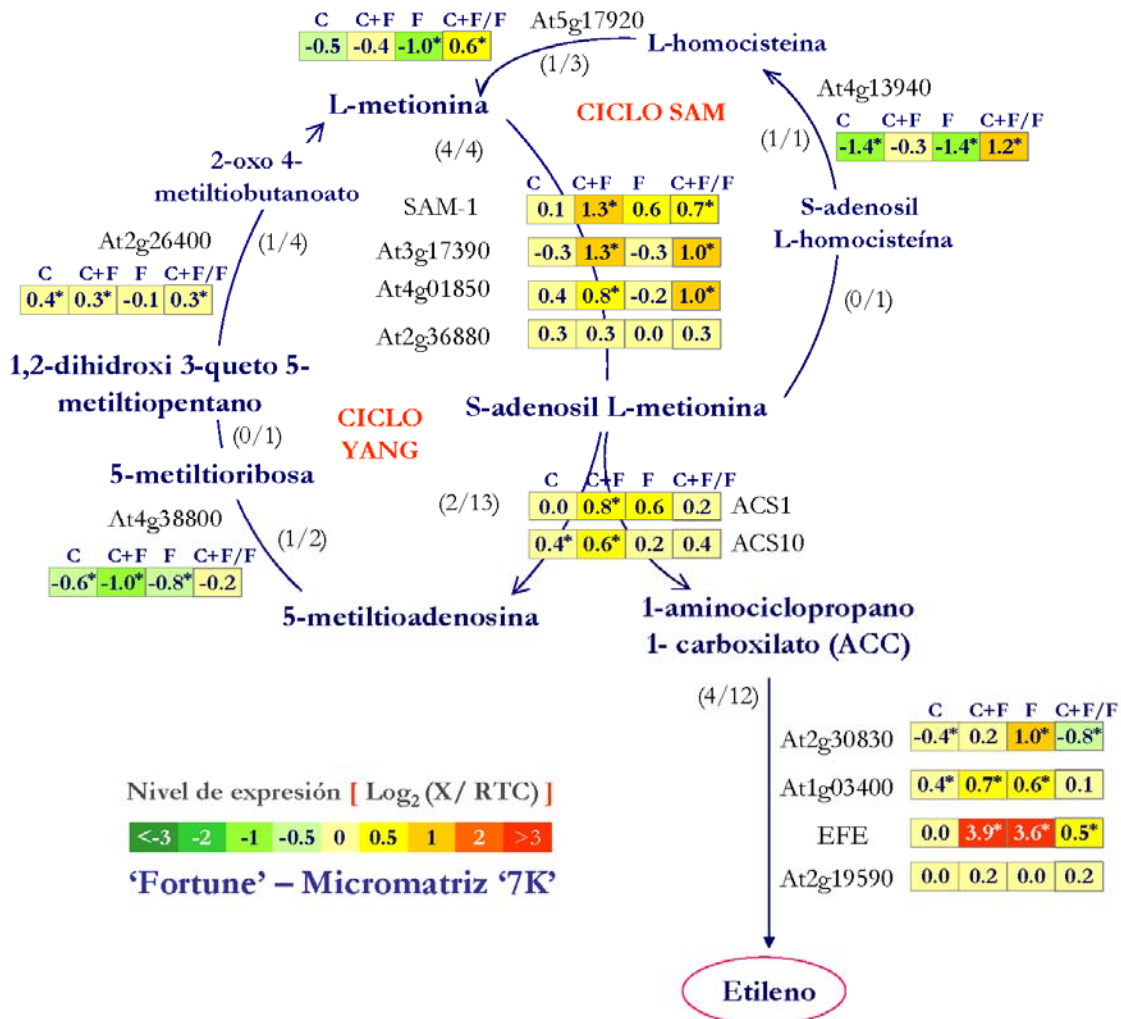


Figura 15: Representación gráfica (Aracyc) del estudio de la influencia del tratamiento de curado en la expresión de los genes de la ruta de biosíntesis de etileno en el flavedo de los frutos de mandarina ‘Fortune’ almacenados en frío. Se indican aquellos genes incluidos en la micromatriz ‘7K’ que mostraron cambios significativos (*) en la expresión en respuesta al calor (C), al frío (F) o a la combinación de calor y frío (C+F) con respecto al nivel correspondiente a frutos recién traídos de campo (RTC), así como entre frutos acondicionados y no acondicionados almacenados 20 días a 2 °C (C+F/F). Todos los valores vienen expresados en escala logarítmica en base 2. Este análisis se llevó a cabo con la herramienta informática ‘OMICS Viewer’ de ‘Aracyc 3.5’. En cada paso de la ruta se indica entre paréntesis el número de genes con homología en la base de datos de *A. thaliana* incluidos en la micromatriz y en segundo término, el número de genes de *A. thaliana* descritos hasta la fecha que interviene en el paso metabólico.

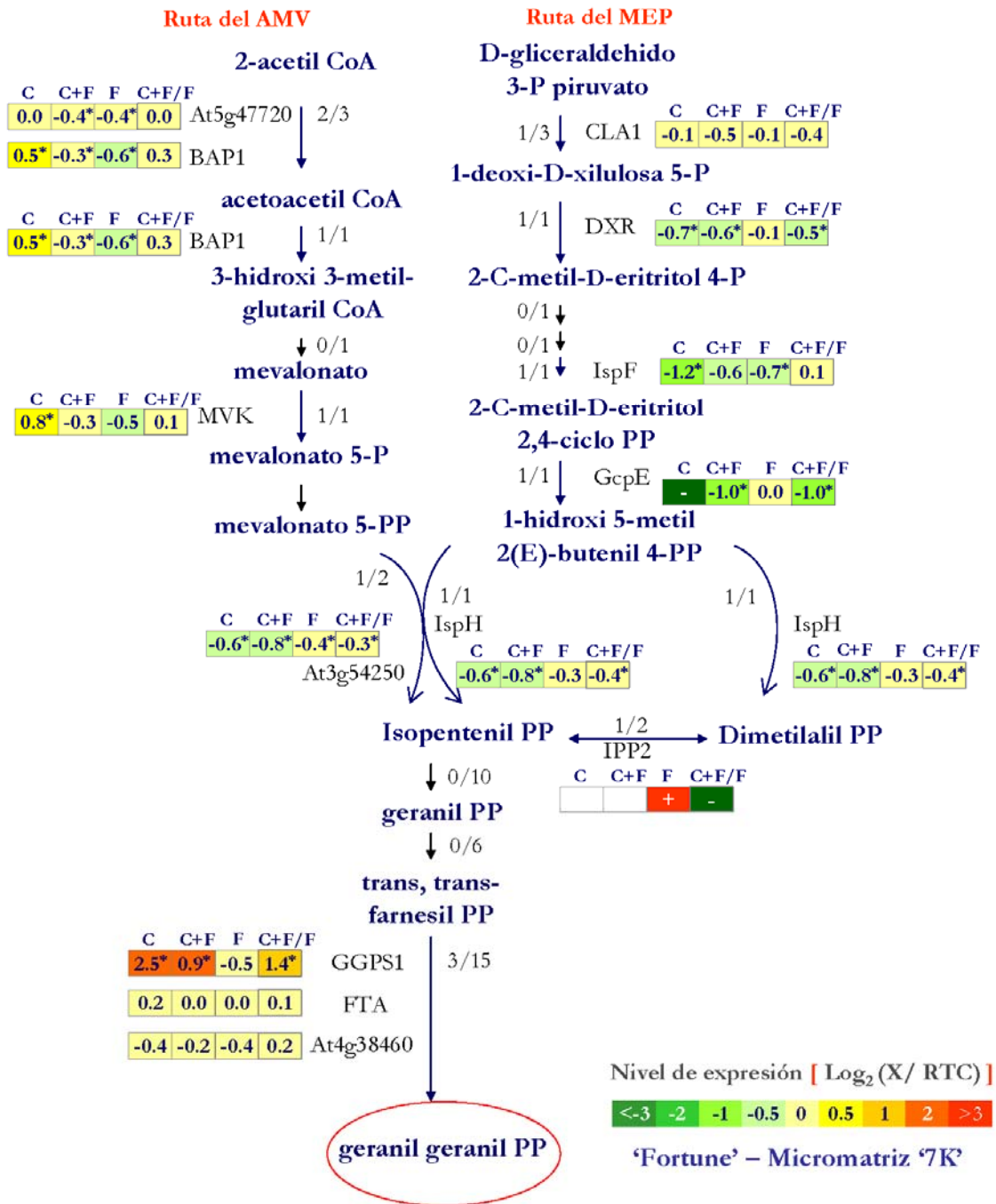


Figura 16: Representación gráfica (Aracyc) del estudio de la influencia del tratamiento de curado en la expresión de los genes de la ruta del mevalonato y la ruta MEP que conducen a la biosíntesis de isopentenil PP, precursor en la biosíntesis de geranyl geranyl PP, en el flavedo de los frutos de mandarina 'Fortune' almacenados en frío (Ver detalles en Figura 15).

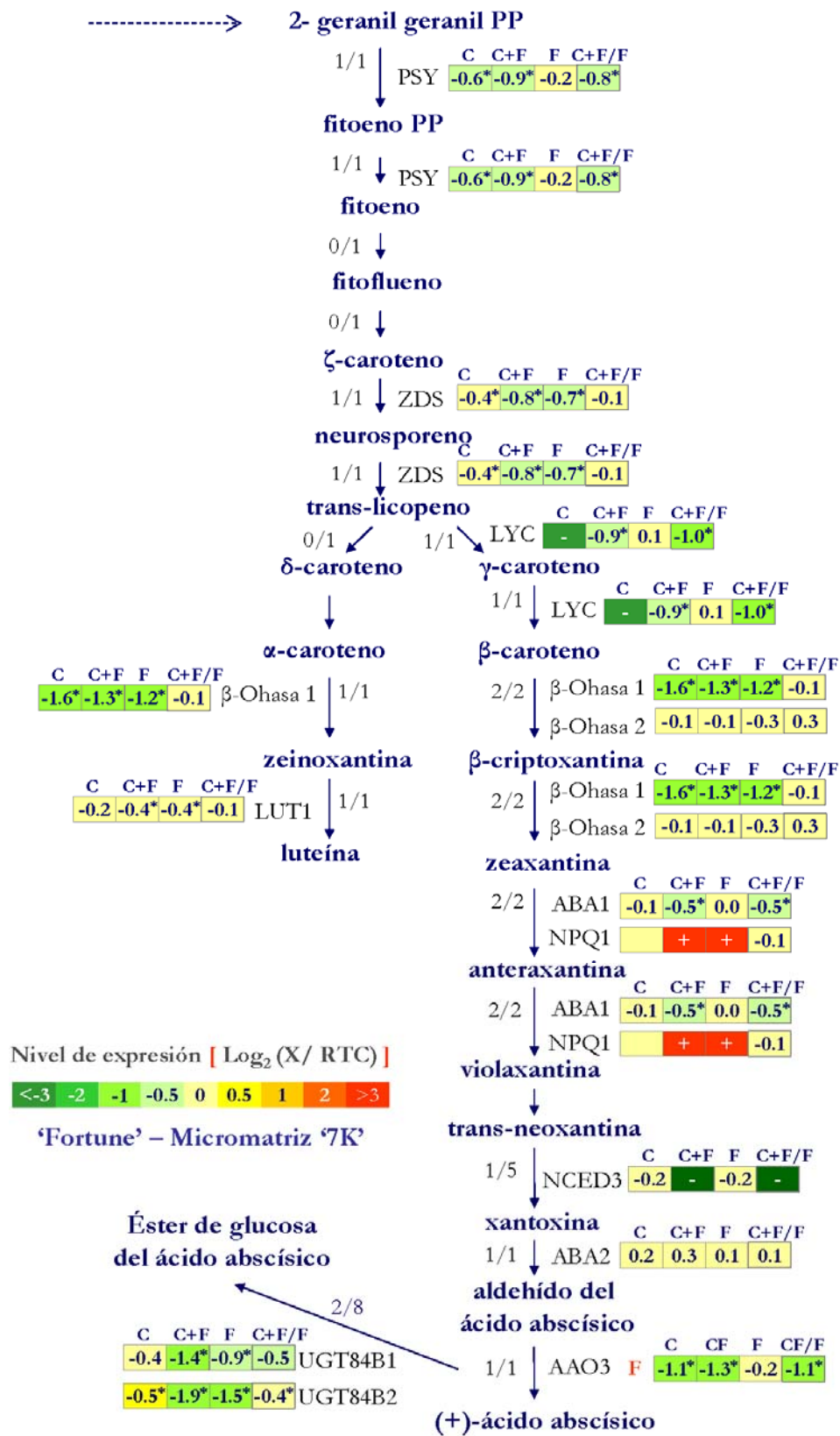


Figura 17: Representación gráfica (Aracyc) del estudio de la influencia del tratamiento de curado en la expresión de los genes de la ruta de biosíntesis de carotenoides y ABA, en el flavedo de los frutos de mandarina ‘Fortune’ almacenados en frío (Ver detalles en Figura 15).

El análisis de ontologías génicas FatiGO+ de función molecular, como se ha visto, mostró en el nivel 7 una sobrerrepresentación de factores de transcripción que aumentaron su nivel de expresión en respuesta a la combinación de calor y frío con respecto a los frutos RTC (Tabla 8B). Teniendo en cuenta estos resultados y otros previos que ponían de manifiesto la importancia de este grupo de proteínas en el proceso de aclimatación a las bajas temperaturas en los frutos cítricos (Sanchez-Ballesta *et al.*, 2003), se realizó un estudio más detallado de aquellos genes reunidos en la micromatriz que codifican factores de transcripción y otras proteínas que intervienen en procesos de transducción de señal. De 344 genes estampados en la micromatriz '7K', un 48% (166) mostraron expresión diferencial en al menos una de las tres situaciones de estudio. De estos 166, 50 presentaron mayores niveles de expresión en los frutos acondicionados y almacenados en frío respecto a los expuestos directamente a 2 °C, mientras que 29 se expresaron más en éstos últimos. En la Tabla 10 se muestra un resumen de las principales familias de genes que codifican proteínas de señalización y factores de transcripción que se inducen o reprimen en respuesta al frío o a la combinación de calor y frío respecto a los frutos RTC. Además, en las Tablas Tabla 11 y Tabla 12 se detallan los genes que se expresaron diferencialmente al comparar entre sí los frutos acondicionados y sin acondicionar almacenados a 2 °C.

Tabla 10: Principales familias de genes incluidos en la micromatriz '7K' que codifican proteínas relacionadas con procesos de señalización celular y factores transcripción con expresión diferencial en respuesta al frío o a la combinación de calor y frío respecto de los frutos recién traídos de campo (RTC) indicando en primer lugar el número de genes específicos (Esp) y en segundo lugar, el número total de genes inducidos o reprimidos en cada una de las condiciones estudiadas (Σ). Asimismo, en las dos últimas columnas se indica el número de genes con cambios de expresión entre frutos acondicionados y no acondicionados almacenados 20 días a 2 °C.

Micromatriz '7K' - 'Fortune'	↑ C + F		↑ F		↓ C + F		↓ F		C + F > C + F <	
	Esp.	Σ	Esp.	Σ	Esp.	Σ	Esp.	Σ	F	F
Señalización										
MAP Kinasas					2	3	0	1	1	1
Señalización - Etileno	2	2							3	
Otras	1	4	0	2	0	4	0	2	1	5
Factores de Transcripción										
Complejo TFIID	2	2			1	2	0	1		1
Factores transcripción - respuesta a etileno	2	4	0	1					3	
Factor transcripción WRKY	1	3	0	1	1	1			1	
No apical meristem (NAM) / NAC / Fac. transcripción ARF	3	9	0	6					6	
Factor transcripción MYB / MYC	5	7	0	2					3	
Factor transcripción Zinc Finger	3	7	2	6	2	2			7	1
Factor transcripción bZIP	1	5	0	4					3	
Factor transcripción bHLH	1	2	0	1	0	1	0	1	1	
Factor transcripción HD-ZIP										
Factor transcripción MADS-box	1	1				2	0	2		1
Factor transcripción HSF					1	1				2
Factor transcripción familia YABBY			1	1	2	2				2

Entre aquellos cuya expresión se vio favorecida por el curado (Tabla 11) se encontraron 5 genes que intervienen en la señalización celular y codifican una proteína MAPK 4 (At4g01370), una quinasa ASK y tres proteínas de la ruta de señalización del etileno, uno de los cuales, el receptor EIN3 (At2g27050), que presentó el doble de expresión en los frutos almacenados en frío que habían sido previamente acondicionados. Además, se observaron 3 genes que codifican factores de transcripción de respuesta a esta hormona destacando uno de ellos (At3g16770) que se indujo durante el curado y aumentó más de 4 veces su expresión a los 20 días después de la transferencia a 2 °C u otro que se indujo dos veces de manera específica en respuesta a la combinación de calor y frío (At3g14230). Además de genes que codifican factores de transcripción de la familia ‘zinc finger’, se observó una abundancia de genes que codifican proteínas de la familia NAM, MYB/MYC y bZIP. Asimismo, se encontraron 3 genes de respuesta a auxinas. Dos de ellos (At5g62010 y At3g16500) se indujeron en respuesta a la combinación de calor y frío mientras que en el tercero (At5g65670) la exposición a frío reprimió sus niveles de expresión tanto en frutos acondicionados como sin acondicionar con respecto a los niveles iniciales. Sin embargo, solamente en este último se observó una expresión significativamente mayor en los frutos acondicionados respecto a los frutos sin acondicionar transferidos directamente a las bajas temperaturas de conservación. Por último, la combinación de calor y frío favoreció la expresión de 3 genes que codifican proteínas WRKY aunque solamente uno de ellos (At4g01720) presentó diferencias significativas en su expresión entre ambos tipos de frutos almacenados a bajas temperaturas.

Por otro lado, entre los genes más expresados en los frutos no acondicionados durante la exposición al frío (Tabla 12), se encontraron diversos genes que codifican proteínas relacionadas con procesos de señalización. Así, se encontró un gen que codifica una MAPK homóloga a NTF6 reprimido en respuesta a la combinación específica de calor y frío u otro, correspondiente a la subunidad α de una proteína G (At2g26300), inducido dos veces en los frutos no acondicionados expuestos al frío. Asimismo, se encontró un miembro del complejo TFIID, que codifica la proteína β -TFIIF (At1g75510) cuyo nivel de expresión disminuyó al 50% en los frutos curados y almacenados a 2 °C. Además, se encontró un gen que codifica una ‘TATA-binding’ (TBP) (At1g02680) cuya expresión se redujo en los frutos acondicionados respecto a los frutos RTC aunque en la comparación entre frutos acondicionados y sin acondicionar, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Por otro lado, destacan 2 genes que codifican proteínas que regulan la expresión de HSPs, denominados ‘heat shock factors’ (HSF), uno de los cuales (At2g26150) se reprimió de forma específica en respuesta a la combinación de calor y frío. Un comportamiento similar lo tuvo un gen que codifica un miembro de la familia de factores de transcripción MADS-box (At1g24260), donde se observó una disminución de los niveles del mensajero en respuesta al frío aunque el curado potenció este efecto. Por último, se encontraron 2 genes que codifican factores de transcripción de la familia YABBY, que al igual que los WRKY se han relacionado con la respuesta de defensa frente a patógenos y con procesos de muerte celular, cuya expresión fue superior en los frutos almacenados directamente en frío respecto a los previamente acondicionados. Uno de ellos (At2g37630) se indujo en respuesta al frío ‘per se’ y otro se reprimió en respuesta a la combinación de calor y frío (At1g69180).

Tabla 11: Lista de genes incluidos en la micromatriz '7K' que codifican proteínas relacionadas con procesos de señalización celular y factores transcripción agrupados por familias con mayor nivel de expresión en los frutos almacenados 20 días a 2 °C que habían sido previamente acondicionados 3 días a 37 °C (C+F) respecto de los frutos almacenados directamente en frío (F) (Ver detalles en la Tabla 2).

Fortune' - Micromatriz 7K			C + F > F			
Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	Log ₂ (C/RTC)	Log ₂ (C+F/RTC)	Log ₂ (F/RTC)	Log ₂ (C+F/F)
1. SEÑALIZACIÓN						
MAPK / MAPKK						
MAP kinasa 4 [<i>Petroselinum crispum</i>]	2030	At4g01370	0.1	-0.4	-	+
Receptores de etileno						
Receptor de etileno EIN3 [<i>Cucumis melo</i>]	1839	At2g27050	0.7	1.6	0.5	1.1
Prot. de respuesta a etileno [<i>A. thaliana</i>]	6760	At4g29100	0.9	0.5	-0.1	0.6
Receptor de etileno, probable [<i>Pyrus communis</i>]	2355	At3g04580	0.2	0.7	0.1	0.6
Otros						
Prot. quinasa 'Shaggy-related' eta (ASK-eta)	2979	At4g18710	0.3	0.7	-0.1	0.7
2. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN						
Factores de transcripción de respuesta a etileno						
Factor de transcripción de respuesta a etileno (ERF) [<i>Cucumis melo</i>]	6160	At3g16770	0.7	2.4	0.2	2.3
Coactivador de la transcripción de respuesta a etileno, probable	6383	At3g58680	0.6	0.3	-0.3	0.6
Factor de transcripción de respuesta a etileno [<i>Fagus sylvatica</i>]	1748	At3g14230	0.6	1.0	0.5	0.5
Factores de transcripción WRKY						
Prot. de unión a DNA T15B16.12, probable / WRKY47 [<i>A. thaliana</i>]	C04005E02	At4g01720	1.4	0.5	-0.2	0.7
No apical meristem (NAM) / NAC / respuesta a auxinas						
Prot. NAM ('non-apical meristem') [<i>A. thaliana</i>]	233	At1g01720	1.1	3.5	1.6	1.9
Prot. NAM ('no apical meristem') 10 [<i>Petunia x hybrida</i>]	617	At1g01720	0.4	1.5	0.7	0.8
Prot. NAM ('no apical meristem') 3 [<i>Petunia x hybrida</i>]	4666	At1g01720	1.1	2.9	2.3	0.6
Prot. NAM ('no apical meristem') RD26 [<i>A. thaliana</i>]	6913	At4g27410	-0.1	1.8	1.3	0.5
Prot. NAM ('no apical meristem') [<i>A. thaliana</i>]	6916	At1g69490		+	+	0.5
Prot. de respuesta a auxina/IAA [<i>Populus tremula</i> x <i>Populus tremuloides</i>]	6645	At5g65670	0.4	-0.3	-0.8	0.4
Factores de transcripción Myb/Myc						
Factor de transcripción Myb [<i>Nicotiana tabacum</i>]	1760	-	0.2	0.4	-0.1	0.6
Factor de transcripción Myb 1, inducible por TMV - common tobacco	2228	At3g23250	-0.1	0.8	0.3	0.5
Factor de transcripción Myb [<i>A. thaliana</i>]	3512	At5g47390	0.0	0.5	0.3	0.3
Factores de transcripción Zinc Finger						
Prot. 'zinc-finger' 1 [<i>Daucus glomerata</i>]	6033	At1g27730	-0.4	2.1	1.0	1.1
Factor de transcripción 'jumonji (jmi)' / 'zinc finger'	3367	At1g30810	0.3	2.1	1.2	1.0
Factor de transcripción 'zinc finger' tipo RING3 protein [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)]	4643	At3g01770	0.6	1.0	0.2	0.8
Prot. 'zinc finger' tipo C ₂ H ₂ [<i>A. thaliana</i>]	4228	At3g02790	0.6	0.4	-0.3	0.7
Prot. 'zinc finger homeobox' / 'ZF-HD homeobox'	C03003F04	At1g69600	0.0	0.9	0.3	0.6
Prot. F17F8_14 / 'zinc finger' [<i>A. thaliana</i>]	4435	At1g30970	0.2	0.7	0.1	0.6
Prot. 'zinc finger' LSD1 [<i>Brassica oleracea</i>]	5665	At4g20380	0.1	0.7	0.3	0.3
Factores de transcripción bZIP						
Factor de transcripción bZIP [<i>A. thaliana</i>]	6141	At3g62420	0.4	2.9	1.2	1.8
Factor de transcripción bZIP ATB2 [<i>Glycine max</i>]	4437	At1g75390	0.5	1.5	0.7	0.7
Factor de transcripción bZIP BZI-4 [<i>Nicotiana tabacum</i>]	C08005F12	At3g62420	0.1	1.2	0.7	0.5
Factores de transcripción bHLH						
Prot. bHLH protein-like [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)]	C07002F01	At1g09250	0.4	0.8	0.2	0.6
Otros						
Factor de transcripción [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)]	3542	At4g13640	0.3	-0.4	-	+
Prot. Bola / asociada a metabolismo de Fe-S	2017	At4g26500	-0.4	0.3	-0.2	0.5
Prot 'SPL1-Related2' (SPL1R2) / familia TF SBP [<i>A. thaliana</i>]	C20003C08	At1g20980	0.4	0.9	0.2	0.7

Tabla 12: Lista de genes incluidos en la micromatriz '7K' que codifican proteínas relacionadas con procesos de señalización celular y factores transcripción agrupados por familias con mayor nivel de expresión en los frutos no acondicionados almacenados 20 días a 2 °C (F) respecto a los previamente acondicionados 3 días a 37 °C (C+F) (ver detalles en la tabla 2).

Fortune' - Micromatriz 7K			F > C + F			
Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	Log ₂ (C/RTC)	Log ₂ (C+F/RTC)	Log ₂ (F/RTC)	Log ₂ (C+F/F)
1. SEÑALIZACIÓN						
MAPK / MAPKK						
MAP kinasa homolog NTF6 (P43)	1949	At4g01370	-0.1	-0.5	0.1	-0.6
Otros						
Prot. ASR [<i>Ginkgo biloba</i>]	6637	At4g35800	-1.7	-3.8	-2.7	-1.2
Prot. calnexina - maize	6957	At5g61790	-0.6	-0.8	0.1	-1.0
Prot. kinasa F8F16.70 [<i>A. thaliana</i>]	5483	At4g31250	0.1	-0.3	0.4	-0.8
Prot. kinasa AFC1 / AME2 [<i>A. thaliana</i>]	5629	At3g53570	0.0	-1.2	-0.6	-0.6
Prot. G, subunidad α -1 [<i>Phytophthora infestans</i>]	C08013B10	At2g26300	0.5	0.5	1.1	-0.6
2. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN						
Complejo TFIIID						
Factor de inicio de la transcripción, subunidad β -IIF (β -TFIIF)	6289	At1g75510	0.1	-0.5	0.2	-0.7
Factores de transcripción Zinc Finger						
Factor de transcripción 'zinc finger' tipo 'C3HC4 RING finger' [<i>A. thaliana</i>]	2015	At1g65040	-0.4	0.2	0.6	-0.4
MADS-box						
Factor de transcripción MADS-box 4 [<i>Vitis vinifera</i>]	7139	At1g24260	-0.9	-1.9	-0.9	-1.0
HSF ('Heat shock responsive factor')						
Factor de transcripción 'heat shock' (HSF) [<i>A. thaliana</i>]	1823	At2g26150	0.0	-0.4	0.1	-0.5
Factor de transcripción 'heat shock' 4 (HSF4) [<i>A. thaliana</i>]	6445	At4g36990	-0.3	0.0	0.4	-0.4
Factores de transcripción familia YABBY						
Factor de transcripción YABBY / CRABS CLAW	C02019G10	At1g69180	-0.1	-	0.2	-
Prot. 'phantastica' [<i>Nicotiana tabacum</i>]	C20006B02	At2g37630	-1.4	-0.5	0.6	-1.1
Otros						
Factor de transcripción, probable [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)]	2344	At4g38900	0.2	-0.3	0.5	-0.8
Factor de transcripción del complejo CCR4-NOT, probable [<i>A. thaliana</i>]	C07004C03	At1g80780	-0.5	0.1	0.6	-0.5
Factor de transcripción B3 [<i>A. thaliana</i>]	1675	At4g01580	-1.2	-1.3	-0.9	-0.3

b) Micromatriz '12K'.

La segunda micromatriz empleada, la micromatriz '12K', reúne un total de 24.288 clones correspondientes a 11.193 unigenes. El 77% de los mismos presentan homología en la base de datos de *A. thaliana*. La distribución por categorías funcionales de esta micromatriz es similar a la de la micromatriz '7K'. Los procesos biológicos de metabolismo celular (65%), de metabolismo primario (58%) y los procesos metabólicos de macromoléculas (43%) son los más representados, mientras que los procesos de respuesta a estrés suponen un 11% y más específicamente, los de respuesta a estímulos abióticos, un 9% (datos no mostrados). El diseño experimental utilizado fue el mismo al empleado con la micromatriz '7K', aunque en este caso se utilizaron tres réplicas biológicas a partir de frutos cosechados en campañas diferentes, incluyendo la campaña 2004 utilizada en el primer caso.

En la Figura 18 se muestran los resultados del análisis estadístico SAM (FDR<1%) referentes al número de genes que mostraron cambios significativos en los niveles de acumulación de sus transcritos en respuesta a cada una de las tres condiciones de estudio, calor (C), frío (F) y combinación de calor y frío (C+F), respecto a los niveles iniciales correspondientes a los frutos RTC. Este análisis indicó que un 24% de los genes de esta micromatriz se expresaron de forma diferencial al menos frente a alguna de las situaciones estudiadas, de los cuales alrededor del 40% se indujeron o reprimieron en repuesta al calor o al frío, aunque la mayor parte de ellos (51%) lo hicieron en respuesta a la combinación de calor y frío. Asimismo, se observó un mayor porcentaje de genes reprimidos respecto de los inducidos en los frutos recién acondicionados y en los que posteriormente se transfirieron al frío con una diferencia en ambos casos de más del doble. Sin embargo, en los frutos expuestos directamente al frío predominan las respuestas de inducción (795 genes) sobre las de represión (358 genes). Por otro lado, solamente 15 de los genes aumentaron su expresión en los frutos recién acondicionados a 37 °C continuaron inducidos durante la exposición de los frutos al frío mientras que el número de genes reprimidos en respuesta al calor y a la combinación de calor y frío fue mucho mayor (247). Sin embargo, el número de genes con expresión diferencial en respuesta al frío, tanto en frutos acondicionados como sin acondicionar, fue más igualado, sumando un total de 141 genes inducidos y 124 reprimidos.

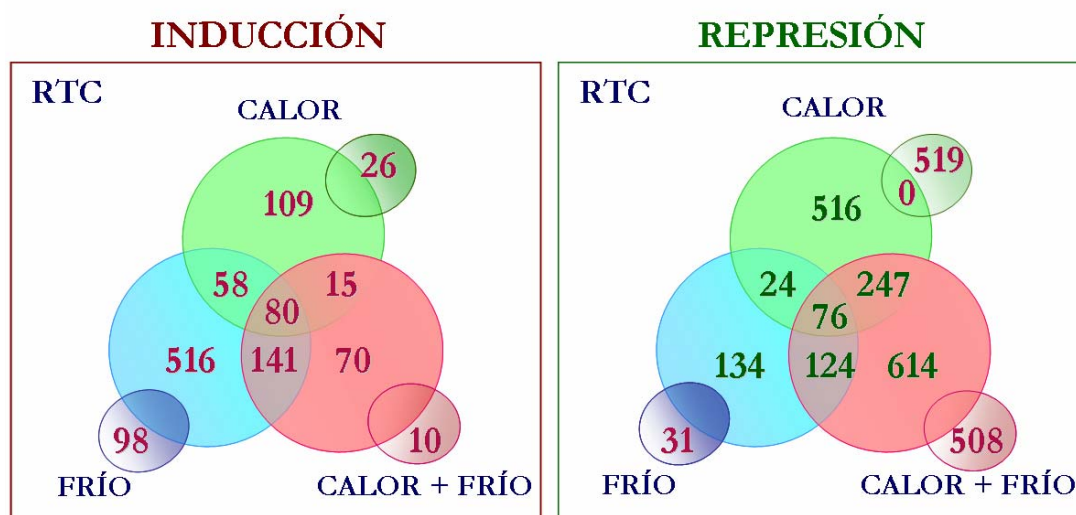


Figura 18: Diagramas de Venn que muestran el número de genes de la micromatriz '12K' con expresión diferencial en respuesta al calor (C), al frío (F) y/o a la combinación de ambos estímulos (C+F), respecto al nivel de expresión de los frutos recién cosechados (RTC). En las intersecciones de los círculos se representa el número de genes que presentan una respuesta diferencial frente a varias de las situaciones estudiadas. En los círculos pequeños se indica el número de genes que se expresan o reprimen de forma específica en cada una de estas situaciones

El análisis individual de los genes incluidos en esta micromatriz reveló un total de 945 genes cuya expresión fue estadísticamente superior en los frutos almacenados directamente en frío con respecto a los frutos tratados previamente 3 días a 37 °C, aunque solamente 46 de éstos mostraron niveles detectables de expresión en estos últimos frutos (Tabla 13). Entre ellos destacan dos citocromos P-450 correspondientes al gen At5g05260 de *A. thaliana*, inducidos más de 16 veces en los frutos no tratados almacenados a 2 °C, y diversos transportadores ABC, todos ellos inducidos también de forma específica en respuesta al frío 'per sé'. Además, se encontraron varios genes que codifican oxidoreductasas dependientes de FAD, 3 de la familia CPRD2 (dos con homología a At4g20820 y una a At1g26390), una nectarina 5 de tabaco (At5g44360) que posee actividad glucosa oxidasa, una proteína relacionada con la síntesis de alcaloides (At5g44380) y otra sin nombre asignado (At2g34790). En todos ellos, la expresión fue al menos 4 veces mayor en los frutos no acondicionados almacenados 30 días a 2 °C que en los previamente tratados a altas temperaturas. Además, entre los que mostraron una diferencia de al menos 3 veces entre ambos tipos de frutos expuestos al frío se encontraron dos genes del metabolismo secundario, que codifican una OMT del ácido cafeico (At4g34050) y una cafeína sintasa (At1g19640), dos que codifican proteínas de biosíntesis de tocoferol con homología al gen At2g18950, y otro correspondiente a una fosfolipasa D (At2g42010). Asimismo, se encontraron diversos factores de transcripción y genes que codifican proteínas de pared celular como una proteína inhibidora de endoglucanasas fúngicas (At1g03220), una exostosa (At5g04500) o una poligalacturonasa (At4g23820).

Cabe señalar que, debido a la variabilidad intrínseca que conlleva el empleo de réplicas biológicas, en esta micromatriz no se encontró ningún gen con niveles de expresión detectables mayores en frutos acondicionados respecto a los frutos almacenados directamente a 2 °C. Sin embargo, al comparar estos primeros respecto a los frutos RTC, el análisis estadístico reveló un total de 315 genes inducidos en respuesta a la combinación de calor y frío, 83 de los cuales no modificaron su expresión en respuesta al frío 'per se'. En la

Tabla 14 se muestra una lista con los 30 genes que presentaron un mayor nivel de inducción en la comparación C+F vs RTC. Entre ellos, se encontraron genes que codifican enzimas de pared celular como una β -1,3-glucanasa (At5g55180) que se indujo más de 5 veces en los frutos acondicionados durante la exposición a frío, y otras proteínas hidrolasas como una carboxil esterasa (At5g27320) y una β -amilasa (At3g23920) las cuales se indujeron dos veces en estos mismos frutos. También forman parte de este grupo un gen que codifica una desaturasa de Δ -8 esfingolípidos (At2g46210) con un nivel de acumulación relativa de los mensajeros 3 veces superior al de los frutos RTC en respuesta a la combinación de calor y frío, u otros dos que codifican una proteína de choque térmico DnaJ (At5g22060) y un factor TFIIE de inicio de la transcripción, que se indujeron dos veces durante la exposición a las altas temperaturas y cuyos niveles se mantuvieron altos después de la transferencia a 2 °C.

El número de genes que se expresan específicamente en respuesta al calor o a la combinación de calor y frío fue muy reducido, concretamente 26 y 10, respectivamente, lo que contrasta con el número de genes que se reprimieron, también de forma específica, en respuesta a dichas condiciones: 519 y 508 en cada caso. Sin embargo, en el tratamiento de frío 'per se' fueron 98 los genes inducidos específicamente y 31 los reprimidos. Una información más detallada de estos genes se incluye en el anexo II. Así, entre los genes más expresados en respuesta al frío cuyos niveles no fueron detectados en el resto de las situaciones estudiadas, incluyendo los frutos RTC (Anexo II Tabla 53), se encontraron genes que codifican proteínas de función muy diversa como fosfatasa, una proteína catecol OMT (At5g54160) y una enzima que participa en la síntesis de celulosa, la celulosa sintasa (At1g55850), aunque la mayoría codifican proteínas sin homología en la base de datos de *A. thaliana* o de función desconocida. Entre aquellos cuya expresión no fue detectada en los frutos acondicionados a los 30 días de almacenamiento a 2 °C pero sí en el resto de las situaciones estudiadas y que mostraron los niveles más elevados en los frutos RTC (Anexo II Tabla 54), se encontraron genes que codifican proteínas ribosomales y otras implicadas en la degradación de proteínas como una proteína reguladora del complejo COP9 de *A. thaliana* (At4g14110). En el resto, se observó una abundancia de genes que codifican enzimas de degradación de lípidos y proteínas, diversas glicosil hidrolasas y proteínas R de la familia NBS-LRR (Fichero Excel 'Fortune'-'12K' adjunto). Por último, entre los genes sin nivel de detección en la condición de frío pero sí en el resto de situaciones estudiadas (Anexo II Tabla 55) se encontraron genes que codifican proteínas muy diversas como una proteína transportadora de azúcares, una SOD o diversas enzimas de biosíntesis de vitaminas.

Tabla 13: Listado de todos los genes incluidos en la micromatriz '12K' con mayor nivel de expresión en los frutos almacenados directamente en frío respecto a los previamente acondicionados 3 días a 37 °C. En ambos casos el tiempo de almacenamiento de los frutos a 2 °C fue de 30 días. (Ver detalles en la Tabla 2).

Proteína más similar	Micromatriz '12K' - Fortune		F > C + F			
	Unigen	Homología en <i>A. thaliana</i>	LOG ₂ (C/RTC)	LOG ₂ (C+F/RTC)	LOG ₂ (F/RTC)	LOG ₂ (C+F/F)
Citocromo P450	4408	At5g05260	0.52	-0.50	4.34	-4.84
Prot. inhibidora de endoglucanasas fúngicas espec. xiloglucanos	1067	At1g03220	0.39	0.72	5.23	-4.51
Citocromo P450	5105	At5g05260	-	-0.11	4.03	-4.14
Cafeína sintasa [<i>Camellia sinensis</i>]	4794	At1g19640	0.35	-0.29	3.46	-3.76
Glutamato descarboxilasa isozima 3 [<i>Nicotiana tabacum</i>]	5967	At2g02010	0.99	-1.17	2.28	-3.45
Transportador ABC [<i>A. thaliana</i>]	6518	At1g66950	0.93	0.26	3.62	-3.36
Transportador ABC [<i>A. thaliana</i>]	C34101E02	At2g36380	0.75	-0.05	3.22	-3.27
Transportador ABC [<i>A. thaliana</i>]	2817	At2g36380	0.51	-0.28	2.80	-3.08
Peptidilprolil cis-trans isomerasa /ciclofilina 40 (CYP40)	C05142A10	At2g15790	0.61	0.24	3.24	-3.00
CPRD2 [<i>Vigna mungiculata</i>]	4436	At4g20820	0.71	0.34	3.31	-2.97
Prot. precursora de ác. tetrahydrocannabinolico sintasa [<i>Cannabis sativa</i>]	C04016A09	At5g44380	0.81	-0.16	2.81	-2.96
Homogentisato fúlpreniltransferasa (HPT1)	6566	At2g18950	-0.50	-1.09	1.81	-2.90
GMFP5 [<i>Glycine max</i>]	4596	At2g36950	0.74	-0.31	2.57	-2.88
CPRD2 [<i>Vigna mungiculata</i>]	2332	At1g26390	0.74	0.39	3.24	-2.85
Prot. de transporte de dicarboxilato mitocondrial, probable [<i>A. thaliana</i>]	3863	At2g22500	1.14	0.29	3.08	-2.80
Transportador ABC [<i>A. thaliana</i>]	6004	At2g36380	-0.62	-1.51	1.25	-2.76
Ac. homogentisico geranilgeranil transferasa [<i>Triticum</i>]	537	At2g18950	-0.62	-1.03	1.72	-2.75
Nectarin 5 [<i>Nicotiana langsdorffii</i> x <i>Nicotiana sanderae</i>]	C08027E03	At5g44360	0.09	0.80	3.49	-2.69
Proteína con dominio U-box [<i>A. thaliana</i>]	C31801H08	At3g11840	0.04	0.51	3.05	-2.54
Prot. homeótica 29 relacionada con BEL1 [<i>Solanum tuberosum</i>]	3879	At2g35940	-0.09	0.59	3.08	-2.49
Arogenato deshidrogenasa [<i>A. thaliana</i>]	5166	At5g34930	0.03	-0.21	2.26	-2.47
Fosfolipasa D [<i>A. thaliana</i>]	4878	At2g42010	0.29	-0.05	2.28	-2.32
CPRD2 [<i>Vigna mungiculata</i>]	6357	At4g20820	0.70	0.50	2.79	-2.29
Factor de transcripción tipo bHLH [<i>A. thaliana</i>]	C05133A11	At5g43650	0.49	-0.09	2.19	-2.28
Prot. 28 familia hidrolasas de glucósidos / poligalacturonasa / pectinasa	4406	At4g23820	0.52	-0.71	1.55	-2.26
Prot.con dominio de unión a FAD [<i>A.s thaliana</i>]	6694	At2g34790	-0.05	-1.05	1.20	-2.24
Prot. función desconocida [<i>A. thaliana</i>]	3783	At1g55230	1.10	0.09	2.22	-2.13
ORFX [<i>Lycopersicon esculentum</i>]	C16018B04	At1g14870	0.56	-1.04	0.99	-2.02
Factor 5 de respuesta a etileno, probable [<i>Vitis aestivalis</i>]	6948	At5g47230	1.49	-0.78	1.17	-1.94
Exostosa, probable [<i>Oryza sativa</i>]	2704	At5g04500	0.90	-0.78	1.06	-1.84
trans-Cafeil-CoA OMT	7170	At4g34050	-0.11	-0.95	0.81	-1.76
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	C21001F07	-	-1.04	-0.88	0.62	-1.50
T1O24.6 [<i>A. thaliana</i>]	5626	At2g43320	-0.27	-0.34	1.01	-1.35
Prot. similar a amt2 [<i>Medicago truncatula</i>]	5039	At2g38290	-0.08	0.01	1.27	-1.26
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	5339	-	0.42	0.09	1.30	-1.21
Prot. unión a oxisterol, probable [<i>Oryza sativa</i> (japonica)]	6032	At4g08180	0.34	-0.02	1.07	-1.10
Prot. familia permeasa aminoácidos [<i>A. thaliana</i>]	C34104D08	At1g58032	0.39	-0.11	0.92	-1.03
ATPasa 6 transporte de fosfolípidos, probable	C31804B05	At1g54280	-0.18	-0.03	0.91	-0.94
Aldo/queto reductasa, probable [<i>A. thaliana</i>]	C16017D10	At2g37770	-0.30	-0.63	0.20	-0.82
Capsantin/capsorubín sintasa, precursor cloroplasto	6479	At3g10230	-1.14	-1.79	-0.97	-0.81
Prot. rica en residuos de leucina, probable [<i>Oryza sativa</i> (japonica)]	6670	At5g21090	-0.34	-0.97	-0.20	-0.77
Prot. con repeticiones tetratricopéptido, probable [<i>Oryza sativa</i> (japonica)]	3597	At4g32070	0.19	0.26	1.02	-0.76
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	5408	-	-	0.55	1.23	-0.68
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	C08013H07	-	-	0.03	0.69	-0.66
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	3193	-	-	-0.03	0.52	-0.55
Transportador de sulfatos [<i>Brassica napus</i>]	C04023E09	At3g12520	0.56	1.25	1.72	-0.47

Tabla 14: Listado de los 30 genes incluidos en la micromatriz 12K que más se indujeron en respuesta a la combinación de calor y frío pero no en respuesta al frío con respecto a los niveles iniciales observados en los frutos RTC (Ver detalles Tabla 2).

Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	Log ₂ (C/RTC)	Log ₂ (C+F/RTC)	Log ₂ (F/RTC)	Log ₂ (C+F/F)
1,3-glucanasa NtEIG-E76, inducible por elicitador [<i>Nicotiana tabacum</i>]	257	At5g55180	-0.16	2.50	1.35	0.73
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	5775	-	0.03	2.16	1.43	+
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	C19005E05	-	0.14	2.15	-	1.14
Prot. familia glicosil hidrolasa 17 [<i>A. thaliana</i>]	5536	At5g55180	0.23	2.00	0.86	0.97
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	927	-	0.18	1.85	0.87	0.40
Prot. desaturasa de δ -8 esfingolipidos (EC 1.14.99.-) Citrina	C07008B12	At2g46210	-0.73	1.76	1.36	0.19
	C15000A03	citrina_C	0.50	1.68	1.49	0.78
Prot. α / β hidrolasa [<i>A. thaliana</i>]	3876	At3g10870	0.04	1.54	0.76	0.27
Prot. con repet. anquirina [<i>A. thaliana</i>]	3747	At2g31820	-0.33	1.52	1.25	0.43
Prot. transportadora de oxalacetato de membrana mitocondrial	C18020E02	At5g58970	-	1.49	1.06	0.46
Prot. familia ribonucleasa II [<i>A. thaliana</i>]	4096	At1g77680	-0.04	1.37	0.91	0.46
TFIIIE, subunidad β , probable [<i>Oryza sativa</i>]	3995	At4g20330	-0.09	1.36	0.90	0.79
Rafinosa sintasa [<i>Cucumis sativus</i>]	6318	At5g40390	-0.21	1.35	0.56	0.43
Prot. función desconocida [<i>A. thaliana</i>]	4324	At3g04470	0.10	1.27	0.84	0.70
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	C01010A04	-	1.04	1.19	0.49	0.12
Prot. F17L21.12 [<i>A. thaliana</i>]	6059	At1g27350	0.57	1.18	1.07	0.59
Prot. familia nodulina [<i>A. thaliana</i>]	3269	At2g39210	-0.12	1.14	0.55	0.65
Prot. similar a carboxilesterasa [<i>Oryza sativa</i> (japónica)]	C01018C09	At3g27320	0.17	1.13	0.48	0.36
Prot. poliproteína gag-pol, probable [<i>Oryza sativa</i> (japónica)]	C18021H10	At1g37110	0.05	1.11	0.75	0.30
Prot. T3F17.27 [<i>A. thaliana</i>]	6885	At2g46080	0.60	1.09	0.79	0.53
Factor de inicio de traducción 3G (eIF3g) en eucariotas [<i>A. thaliana</i>]	4683	At3g11400	0.06	1.08	0.55	0.46
Prot. de unión a RNA 45 [<i>Nicotiana glauca</i>]	6756	At1g11650	0.56	1.07	0.61	0.90
Prot. con dominio de unión a metil-CpG [<i>A. thaliana</i>]	1765	At3g30300	0.85	1.06	0.16	0.31
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	C04002E03	-	0.31	1.06	0.75	-0.42
Prot. Transportadora ABC 'multidrug resistant (MDR)', probable [<i>A. thaliana</i>]	4736	At3g62150	0.35	1.05	1.47	0.63
Prot. familia transporte de cationes [<i>A. thaliana</i>]	C01018D03	At2g39450	0.09	1.04	0.41	0.19
β -amilasa, probable / 1,4- α -D-glucan maltohidrolasa, probable	6975	At3g23920	0.06	1.02	0.82	0.23
Prot. Similar a DnaJ [<i>Salix glauca</i>]	C34001C10	At5g22060	1.00	1.00	0.76	0.91
Miraculina 2, probable [<i>Citrus x paradisi</i>]	1168	At1g17860	1.51	0.99	0.08	0.51
Prot. 'remorin', probable [<i>Oryza sativa</i> (japónica cultivar-group)]	1697	At2g41870	0.10	0.96	0.45	0.44

En la Tabla 15 se muestra un resumen del número de genes que codifican proteínas de las principales familias implicadas en procesos de señalización y de factores de transcripción que modificaron su expresión en respuesta al frío y a la combinación de calor y frío. A continuación, en la Tabla 16 se detallan aquellos genes con niveles diferenciales de expresión en los frutos acondicionados respecto a los almacenados directamente a 2 °C. Un total de 42 genes presentaron mayor expresión en estos últimos y entre ellos, diversos miembros de la familia ‘zinc finger’, bHLH y otros factores de respuesta a etileno como un gen con homología a At5g47230 que mostró una diferencia de expresión entre ambos tipos de frutos de 4 veces. Además, dentro de este grupo se encontraron 7 genes que codifican tres proteínas MAPK (At2g18170, At3g13530 y At3g21220), una proteína G Ras (At4g17530), dos receptores kinasas (At2g31880 y At5g56040) y una proteína transmembrana rica en residuos de leucina (At4g28490), que podría actuar como mediadora de la interacción de la proteína G con su receptor. Sin embargo, en ninguna de éstas se detectó expresión en respuesta a la combinación de calor y frío. Por otro lado, aunque se observó una abundancia de genes que codifican factores de transcripción NAM, WRKY, MYB y bZIP o dos TBP del complejo TFIID entre aquellos más expresados en respuesta al frío respecto a RTC, a los 30 días de almacenamiento a 2 °C no se detectaron diferencias entre los frutos curados y no curados. Por otra parte, solamente 3 genes presentaron un nivel de expresión mayor en los frutos acondicionados durante el almacenamiento en frío respecto a los frutos no tratados, en los cuales no se detectó expresión, y codifican un factor de transcripción con dominio AP2 y dos miembros de la familia PHD y MYB.

Tabla 15: Principales familias de genes incluidos en la micromatriz ‘12K’ que codifican proteínas relacionadas con procesos de señalización celular y factores transcripción con expresión diferencial estadísticamente significativa (SAM, FDR<1%) en respuesta al frío o a la combinación de calor y frío respecto de los frutos control (RTC). (Ver detalles en Tabla 10).

Micromatriz '12K' - 'Fortune'	↑ C + F		↑ F		↓ C + F		↓ F		C + F > C + F <	
	Esp.	Σ	Esp.	Σ	Esp.	Σ	Esp.	Σ	F	F
Señalización										
MAP Kinasas			2	2	3	3				3
Receptores de etileno	0	1	0	1						
Otras	0	4	3	5	3	5	0	1		4
Factores de Transcripción										
Complejo TFIID	1	1	2	2						
Factores transcripción - respuesta a etileno	1	2	1	2	2	3	1	2	1	3
Factor transcripción WRKY	0	1	1	3						
No apical meristem (NAM) / NAC / Fac. transcripción ARF	0	6	4	10						
Factor transcripción MYB / MYC	0	2	3	5			1	1	1	
Factor transcripción Zinc Finger	0	2	2	6	4	5	0	2	1	6
Factor transcripción bZIP			0	4	0	1				1
Factor transcripción bHLH			1	1						2
Factor transcripción HD-ZIP										
Factor transcripción MADS-box			0	1						1
Factor transcripción HSF			2	2	1	1				1
Factor transcripción familia YABBY					0	1	0	1		

Tabla 16: Genes incluidos en la micromatriz '12K' que codifican proteínas relacionadas con procesos de señalización celular y factores transcripción agrupados por familias con mayor nivel de expresión en A) los frutos almacenados directamente a 2 °C respecto a los previamente acondicionados (F>C+F); B) los frutos curados y expuestos a 2 °C respecto a los almacenados directamente a 2 °C (C+F>F). En todos los frutos el tiempo de almacenamiento fue de 30 días. Los valores están expresados en escala logarítmica en base 2 (Log₂)

Fortune' - Micromatriz '12K'			F > C + F			
Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	Log ₂ (C/RTC)	Log ₂ (C+F/RTC)	Log ₂ (F/RTC)	Log ₂ (C+F/F)
A						
1. SEÑALIZACIÓN						
MAPK / MAPKK - Transducción señal						
MAP quinasa [<i>Prunus armeniaca</i>]	3658	At2g18170	0.2	-	-0.2	-
MAP quinasa ε-3 (ε-MAP3K) [<i>A. thaliana</i>]	4387	At3g13530	0.2	-	0.2	-
MAP quinasa 'MEK kinsae' [<i>Medicago sativa</i> subsp. x varia]	C07005E02	At3g21220	0.1	-	0.3	-
Otros						
Receptor quinasa [Nicotiana tabacum]	C08034D01	At2g31880	1.6	-	-0.7	-
Receptor quinasa [<i>A. thaliana</i>]	C32107D11	At5g56040	-0.1	-	0.3	-
Prot. transmembrana quinasa rica en residuos de leucina, probable	C16015B05	At4g28490	0.0	-	-0.8	-
Prot. G Ras	C31208B06	At4g17530	-0.2	-	-0.2	-
2. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN						
Factores de transcripción de respuesta a etileno						
Factor 5 de respuesta a etileno, probable [<i>Vitis aestivalis</i>]	6948	At5g47230	1.5	-0.8	1.2	-1.9
Factor de transcripción con dominio AP2, probable [<i>A. thaliana</i>]	686	At1g22810	0.0	-	0.3	-
Prot. con dominio de unión a DNA AP2 [<i>Catbarantibus rosea</i> s]	C08020E12	At2g44840	0.0	-	0.5	-
Factores de transcripción Zinc Finger						
Prot. 'zinc finger' tipo B-box [<i>A. thaliana</i>]	2164	At2g21320	+	-	+	-
Prot. 'zinc finger 5' (ZFP5) [<i>A. thaliana</i>]	3312	At1g10480	-	-	+	-
Prot. 'zinc finger' tipo GATA [<i>A. thaliana</i>]	C02007B05	At3g54810	-	-	-0.3	-
Prot. 'zinc finger' tipo CCCH, probable [<i>A. thaliana</i>]	C05807D10	At2g41900	-0.1	-	0.1	-
Prot. 'zinc finger' tipo 'C3HC4' RING finger' [<i>A. thaliana</i>]	C08033H03	At4g35840	0.2	-	-0.3	-
Factor de transcripción 'jumonji (jmiC)'	C18022H12	At5g63080	-	-	-0.7	-
Factores de transcripción bZIP						
Factor de transcripción bZIP [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)]	C18025B12	At1g21740	-	-	0.1	-
Factores de transcripción bHLH						
Factor de transcripción bHLH [<i>A. thaliana</i>]	C05133A11	At5g43650	0.5	-0.1	2.2	-2.3
Factor de transcripción bHLH [<i>Cucumis melo</i>]	2633	At1g72210	-	-	0.4	-
MADS-box						
Factor de transcripción MADS-box [<i>Malus x domestica</i>]	C20007B02	At5g20240	+	-	+	-
HSF ('Heat shock responsive factor')						
Factor de transcripción 'heat shock' 8 (HSF8)	C18019A10	At4g17750	0.9	-	-0.5	-
Otros						
Prot. 'BEL1-related homeotic' '29 [<i>Solanum tuberosum</i>]'	3879	At2g35940	-0.1	0.6	3.1	-2.5
Prot. P0426D06.23 [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)]	1791	At1g23400	0.2	-	-0.3	-
Factor de transcripción T12185 - fava bean	2198	At5g56780	0.7	-	-0.5	-
Prot. Ttg1 [<i>Malus x domestica</i>]	5081	At5g24520	-	-	0.1	-
Prot. con dominio de unión a DNA [<i>A. thaliana</i>]	2240	At5g39860	-	-	0.4	-
Prot. 'finger protein Dof' - common tobacco	C08003G05	At4g24060	0.4	-	0.3	-
B						
Fortune' - Micromatriz '12K'			C + F > F			
Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	Log ₂ (C/RTC)	Log ₂ (C+F/RTC)	Log ₂ (F/RTC)	Log ₂ (C+F/F)
Factor de transcripción 'zinc finger' tipo PHD, probable [<i>A. thaliana</i>]	4833	At2g36720	-	-0.4	-	+
Prot. PHAP2A / AP2 [<i>Petunia x hybrida</i>]	6044	At4g36920	-0.4	0.0	-	+
Factor de transcripción Myb [<i>A. thaliana</i>]	C08036G05	At2g21650	0.6	0.6	-	+

Los resultados del análisis funcional FatiGO+ de los genes con homología en la base de datos de *A. thaliana* que mostraron expresión diferencial en respuesta a alguna de las tres situaciones estudiadas (Tabla 17) indican que la exposición al calor y a la combinación de calor y frío induce la expresión de una elevada proporción de genes implicados en el metabolismo de RNA con respecto a los niveles iniciales correspondientes a los frutos RTC. Asimismo, la combinación de calor y frío disminuyó la expresión de genes del metabolismo de lípidos (nivel 6) (Tabla 18) y de biosíntesis de isoprenoides (nivel 7). Entre los genes reprimidos en respuesta al frío 'per se' se encontró una abundancia de genes implicados en procesos biosintéticos celulares (nivel 4) y de genes del metabolismo de ácidos carboxílicos (nivel 5). No obstante, en este análisis no se encontró ningún proceso biológico sobre o infrarrepresentado al comparar entre sí los frutos acondicionados y sin acondicionar a los 30 días de almacenamiento a 2 °C.

Un análisis más detallado del conjunto de genes agrupados en este análisis dentro de los procesos de biosíntesis de lípidos (nivel 6), altamente representados entre los genes reprimidos en respuesta a la combinación de calor y frío respecto a RTC (Tabla 18), reveló que la gran mayoría de ellos están implicados en metabolismo de isoprenoides y compuestos derivados como carotenoides. Así, se encontraron genes que codifican enzimas que participan en la biosíntesis de IPP y de sus derivados isoprenoides como las enzimas mevalonato difosfato descarboxilasa (At3g54250) o farnesil difosfato sintasa (FPS) (At4g17190), cuyos niveles de expresión también disminuyeron en respuesta al frío en los frutos sin acondicionar. Sin embargo, otras como una FPFTA (At4g34640), una isopentenil isomerasa (At3g02780) o algunas de la ruta de biosíntesis de carotenoides, como una capsantina/capsorubina sintasa (At3g10230), una ZDS (At3g04870) o una ABA1 (At5g67030), solamente se reprimieron en los frutos expuestos a 2 °C que habían sido previamente curados. No obstante, en este grupo se incluyen otros genes no relacionados con los anteriores que codifican enzimas desaturasas de ácidos grasos como una ω -3 desaturasa (At3g11170) o una estearil-CoA / δ -9 desaturasa (At3g15870), y otros como dos genes que codifican una oxidoescualeno ciclasa (At2g07050) y una enzima de condensación CUT1 (At1g68530), cuya respuesta también fue específica del calor y/o de la combinación de calor y frío. Destaca el primero de estos genes, que mostró una disminución de su expresión de hasta 4 veces en los frutos curados y expuestos a 2 °C respecto a los frutos RTC. Además, se encontraron genes de biosíntesis de terpenos. Entre ellos, un gen que codifica una γ -terpineno sintasa (At3g25830), que se reprimió en respuesta al frío aunque el curado potenció dicho efecto, y el correspondiente a una β -farneseno sintasa (At5g23960), que disminuyó su expresión hasta niveles imperceptibles en respuesta al calor y a la combinación de calor y frío. En el resto, donde se incluyen enzimas de biosíntesis y elongación de ácidos grasos y diversas LOX, la exposición al frío disminuyó de forma similar los niveles de expresión del gen en ambos tipos de frutos no detectándose diferencias entre ellos.

Por otro lado, el análisis FatiGO+ referente a función molecular indicó que el curado puede favorecer durante el almacenamiento en frío la expresión de genes con dominio de unión a ácidos nucleicos (nivel 3) ya que se encontró una proporción significativamente elevada de estos genes inducidos en respuesta a la combinación de calor y frío respecto a RTC. No obstante, este análisis no reveló ningún otro término con significancia estadística en el resto de comparaciones realizadas. Asimismo, tampoco se obtuvieron resultados significativos en este mismo análisis en cuanto se refiere a componente celular (datos no mostrados).

Tabla 17: Análisis de ontologías génicas (FatiGO+, BABELOMICS) basado en las hibridaciones con la miromatriz '12K' en el estudio de los cambios de expresión en el flaveado de frutos de mandarina de la variedad 'Fortune' en cuatro situaciones postcosecha: 1) frutos recién traídos de campo (RTC); 2) frutos curados (C); 3) frutos curados y almacenados 30 días a 2 °C (C+F); 4) frutos recién cosechados y almacenados 30 días a 2 °C (F). (●) procesos biológicos no redundantes; (↑): proceso biológico inducido en el segundo término de la comparación respecto al primero; (↓) proceso biológico inducido en el primer término de la comparación respecto al segundo.

		Análisis FatiGo+ - 'Fortune'		RTC vs C		RTC vs C+F		RTC vs F		C vs F	
		Nº genes	Nº genes	Nº genes	p-value	Nº genes	p-value	Nº genes	p-value	Nº genes	p-value
MICROMATRIZ 12K			+		-		+		-		+
PROCESOS BIOLÓGICOS											
Nivel 3											
Proc. biosintéticos		705						55	2.90E-02 ↓		
Nivel 4											
Proc. metabólicos de ác. orgánicos		247						26	3.04E-02 ↓		
Proc. biosintéticos de la célula		630						50	2.90E-02 ↓		
Nucleobase, nucleósido, nucleótido, ác. nucleicos		624								84	2.17E-02 ↓
Nivel 5											
Proc. metabólicos de lípidos de la célula		142						33	2.15E-02 ↓		
Proc. metabólicos de ác. carboxílicos		246								26	3.04E-02 ↓
Proc. metabólicos de RNA		315		8	3.35E-02 ↑			14	2.15E-02 ↑		
Nivel 6											
Proc. de biosíntesis de lípidos		109						30	4.30E-03 ↓		
Traducción		257									50
Nivel 7											
Proc. de biosíntesis de isoprenoides		34						13	2.29E-02 ↓		

Tabla 18: Genes que participan en procesos de biosíntesis de lípidos incluidos en el nivel 6 de la jerarquía de ontologías génicas y que presentan una disminución de su nivel de expresión en respuesta a la combinación específica de calor y frío (Ver detalles en Tabla 2).

Procesos de biosíntesis de lípidos (Nivel 6) - C+F < RTC (30/109) - Micromatriz '12K' - 'Fortune'

Proteína más similar	Unigen	Homología en <i>A. thaliana</i>	LOG ₂ (C/RTC)	LOG ₂ (C+F/RTC)	LOG ₂ (F/RTC)	LOG ₂ (C+F/F)
Lipoxigenasa [<i>Citrus jambhiri</i>]	7117 / C02023C12 / C20001H03 / C05808B05	At3g45140	0.33	-3.37	-1.75	-1.24
Inositol 3-fosfato sintasa (Mio-inositol-1-fosfato sintasa)	7200	At2g22240	-1.17	-2.42	-1.63	-0.79
AOS: aleno oxido sintasa [<i>Medicago truncatula</i>]	6832	At3g25780	0.69	-2.29	-1.92	-0.37
γ-terpineno sintasa [<i>Citrus limon</i>]	2624	At3g25830	1.12	-2.16	-1.67	-0.49
Desaturasa de ác. grasos ω-3 [<i>Betula pendula</i>]	3363	At3g11170	-0.22	-2.16	-1.09	-1.07
Lipoxigenasa [<i>Citrus jambhiri</i>]	C31103F06	At1g72520	0.40	-1.97	-1.40	-0.57
Capsantina / capsorubina sintasa, cloroplasto precursor C	6479	At3g10230	-1.14	-1.79	-0.97	-0.81
Mevalonato difosfato descarboxilasa [<i>Hevea brasiliensis</i>]	5998	At3g54250	-0.34	-1.75	-1.55	-0.20
Ac. eucarenoico hidroxilasa (KAO1) / citocromo P450	C08012B11	At1g05160	-1.07	-1.63	-1.35	-0.28
Inositol 3-fosfato sintasa (Myo-inositol 1-fosfato sintasa)	1121 / C31706E09	At5g10170	-0.88	-1.53	-1.08	-0.45
6-fosfogluconato deshidrogenasa [<i>A. thaliana</i>]	5512	At4g11820	-0.36	-1.50	-1.27	-0.23
Enoil-ACP reductasa (NADH ₂) (EC 1.3.1.9)	5404	At2g05990	-0.89	-1.42	-1.38	-0.04
Lipoxigenasa, cloroplasto precursor [<i>Oryza sativa</i> (japonica)]	C02025G09	At1g17420	0.48	-1.34	-1.07	-0.26
3-quetoacil CoA sintasa 1(KCSI) [<i>A. thaliana</i>]	4071	At1g01120	1.10	-1.32	-1.61	0.29
Farnesil difosfato farnesil transferasa (EC 2.5.1.21)	C02004F09	At4g34640	-0.46	-1.22	-0.66	-0.56
Isopentenil difosfato isomerasa 1/ ID12	3810 / 7025	At3g02780	0.30	-1.19	-0.47	-0.72
ζ-caroteno desaturasa [<i>Citrus sinensis</i>]	C34102H04	At3g04870	-1.04	-1.18	-1.04	-0.14
Zeaxantina epoxidasa [<i>Citrus unshiu</i>]	7007	At5g67030	-0.89	-1.06	-0.72	-0.34
Farnesildifosfato sintasa [x <i>Citrofortunella microcarpa</i>]	1440	At4g17190	-0.48	-0.88	-1.11	0.23
Prot. quinasa [<i>A. thaliana</i>]	C08036G09	At1g11050	-	-	2.24	-
Enzima CUT1 - condensación de ác. grasos de cadena muy larga [<i>A. thaliana</i>]	5421	At1g68530	-	-	-0.23	-
Prot. MutT/nudix [<i>A. thaliana</i>]	2207	At1g79690	-0.07	-	-0.14	-
Oxidoescualeno ciclasa [<i>Panax ginseng</i>]	C20002F05	At2g07050	0.37	-	0.08	-
Esteroido 5-α-reductasa [<i>Gossypium hirsutum</i>]	C31805H09	At2g38050	-	-	0.16	-
Poliribonucleotido nucleotidiltransferasa, probable [<i>A. thaliana</i>]	C06005C07	At3g03710	-	-	0.20	-
Estearil-CoA desaturasa (δ-9-desaturasa) [<i>Danio rerio</i>]	C08020E05	At3g15870	0.44	-	0.46	-
Prot. LKB de biosíntesis de brasinoesteroides [<i>Pisum sativum</i>]	C08034A05	At3g19820	1.01	-	-	-
CDP-alcohol fosfatidiltransferasa [<i>A. thaliana</i>]	C31803A03	At4g04870	0.02	-	0.08	-
Prot. de unión a AMP, probable [<i>A. thaliana</i>]	C21006C05	At4g14070	0.65	-	-0.07	-
β-farneseno sintasa [<i>Citrus junos</i>] / Terpeno sintasa [<i>Vitis vinifera</i>]	4326 / C06010C07	At5g23960	-	-	0.18	-

De forma paralela al análisis de la micromatriz ‘7K’, en esta micromatriz también se llevó a cabo un análisis detallado de los genes que mostraron diferencias significativas entre frutos acondicionados y no acondicionados almacenados a 2 °C (C+F vs F) y que codifican enzimas ATPasas, LOX, desaturasas y lipasas. Entre los más expresados en los frutos expuestos directamente al frío se observó una gran abundancia de genes de degradación de lípidos, la mayoría de los cuales se reprimieron hasta límites no detectables en respuesta a la combinación de calor y frío, como diversos genes que codifican lipasas extracelulares y de la familia de hidrolasas α/β . Además, destaca un gen que codifican una β -fosfolipasa D (β -PLD) (At2g42010) que se indujo más de 4 veces en repuesta al frío ‘per se’. Por otro lado, en esta micromatriz solamente se encontró un gen *LOX* y dos genes que codifican enzimas desaturasas con diferencias significativas entre ambos tipos de frutos, y en todos ellos se produjo una represión en respuesta a la combinación específica de calor y frío. El resto de genes que codifican enzimas ATPasas mostraron perfiles muy diversos, encontrándose algunos de ellos más expresados en los frutos almacenados directamente a 2 °C mientras que en otros, por el contrario, el curado favoreció su expresión.

Tabla 19: Genes que codifican ATPasas, LOX, desaturasas y de degradación de lípidos de membrana con mayor nivel de expresión en los frutos almacenados directamente a 2 °C respecto a los previamente acondicionados (A) o viceversa (B) (Ver detalles en Tabla 2).

F > C+F						
Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	LOG2 (C/RTC)	LOG2 (CF/RTC)	LOG2 (F/RTC)	LOG2 (CF/F)
ATPasa 6 de transporte de fosfolípidos	C31804B05	At1g54280	-0.179	-0.031	0.907	-0.938
Prot. inhibidora de ATPasa / F1F0 [<i>A. thaliana</i>]	6067	At2g27730	+		+	-
ATPasa tipo IIB, transporte de Ca ²⁺ [<i>Medicago truncatula</i>]	C18025A06	At3g63380			+	-
LOX [<i>Nicotiana attenuata</i>]	C05808B05	At3g45140	1.017	-	-0.612	-
Desaturada FAD2 de ác. δ -12 oleico [<i>Vernicia fordii</i>]	7029	At3g12120	-0.114	-	0.243	-
Estearoil-CoA desaturase (δ -9-desaturasa) [<i>Danio rerio</i>]	C08020E05	At3g15870	0.441	-	0.462	-
Fosfolipasa D [<i>A. thaliana</i>]	4878	At2g42010	0.287	-0.046	2.277	-2.324
Lipasa 1 extracelular familia II (EXL1) [<i>A. thaliana</i>]	1667	At1g75880	0.532	-	-1.172	-
Lipasa 3 extracelular familia II (EXL3) [<i>A. thaliana</i>]	C02007G12	At1g75900	0.053	-	0.154	-
Lipasa clase 3 [<i>A. thaliana</i>]	C31602F04	At1g51440	0.186	-	-0.088	-
Palmitoil tioesterasa [<i>A. thaliana</i>]	5413	At3g60340	0.388	-	0.084	-
Prot. familia lipasas/hidrolasa α/β [<i>A. thaliana</i>]	4154	At1g11090	-0.426	-	-0.355	-
Prot. familia lipasas/hidrolasa α/β [<i>A. thaliana</i>]	C31804H06	At4g24140			+	-

C+F > F						
Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	LOG2 (C/RTC)	LOG2 (CF/RTC)	LOG2 (F/RTC)	LOG2 (CF/F)
ATPasa tipo AAA, inducida por sal [<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>]	5478	At2g27600	-	-0.058	-	+
ATPasa de membrana plasmática transportadora de Ca ²⁺ [<i>Glycine max</i>]	5780	At1g27770	-0.079	-0.280	-	+
ATPasa vacuolar, subunidad F [<i>A. thaliana</i>]	6581	At4g02620	-	-0.149	-	+
Lipasa/hidrolasa con motivo GDSL [<i>A. thaliana</i>]	2029	At5g14450	0.220	-1.059	-	+

En la ruta de biosíntesis de etileno, visualizada en el análisis Aracyc, y a diferencia de los resultados obtenidos en la micromatriz '7K', no se observó un efecto inductor de la expresión de genes que participan en la misma en respuesta a la combinación del calor y frío (Figura 19). Solamente dos ACOs (At2g19590 y EFE) se indujeron en los frutos acondicionados y almacenados a 2 °C, aunque este efecto fue mucho mayor en los frutos almacenados directamente a dicha temperatura. Por otro lado, se observó una caída de la expresión de diversos genes de la rutas de biosíntesis de isoprenoides fundamentalmente en respuesta a la combinación de calor y frío, aunque en algunos de ellos también se produjo en respuesta al frío 'per se' (Figura 20). Los genes que participan en la ruta citosólica del mevalonato no mostraron diferencias en la expresión entre frutos acondicionados y no acondicionados expuestos a 2 °C. Sin embargo, en la ruta MEP que también conduce a la síntesis de IPP, se encontraron 3 genes reprimidos en respuesta al calor y/o a la combinación de calor y frío pero no al frío 'per se'. Éstos codifican las enzimas 4-(citidina 5'-difosfo)-2-C-metil-D-eritritol quinasa (At2g26930), IspH (At4g34350) e isopentenil pirofosfato δ -isomerasa (IPP2; At3g02780). En la ruta de biosíntesis de carotenoides, no obstante, ningún gen mostró diferencias significativas en sus niveles de acumulación de mensajero entre frutos acondicionados y no acondicionados almacenados directamente a 2 °C (Figura 21).

Otras rutas visualizadas en este análisis que incluyen un número importante de genes con mayores niveles de expresión en los frutos almacenados directamente a 2 °C respecto a los previamente acondicionados, son la ruta de biosíntesis de celulosa, de degradación de homogalacturanos y diversos compuestos lipídicos y de biosíntesis de ácido jasmónico (datos no mostrados). En esta última, el curado evitó la inducción que se produce en respuesta al frío en los frutos sin acondicionar de dos genes que codifican una S-adenosil L-metionina: ácido jasmónico carboxil metiltransferasa (At1g19640) y una OPDA reductasa OPR2 (At1g76690). No obstante, el resto de genes de la misma en general disminuyeron sus niveles de mensajero durante la exposición a frío, no encontrándose diferencias significativas entre ambos tipos de frutos, acondicionados y no acondicionados expuestos al frío. Por otro lado, en este grupo (F>C+F) se detectaron otros genes que participan en las rutas de biosíntesis de glicina y alanina, fotorespiración y biosíntesis de fenilpropanoides (datos no mostrados). Algunos de ellos, como los que codifican una alanina glioxilato transminasa (AGT1) (At2g13360), una alanina transaminasa 2 (AOAT2) (At1g70580), una flavonol 3'-OMT (OMT1; At5g54160), se reprimieron hasta límites indetectables en respuesta a la combinación de calor y frío.

Por último, en este análisis no se visualizó ninguna ruta metabólica sobrerrepresentada en el conjunto de genes más expresados en respuesta a la combinación de calor y frío respecto al frío 'per se'.

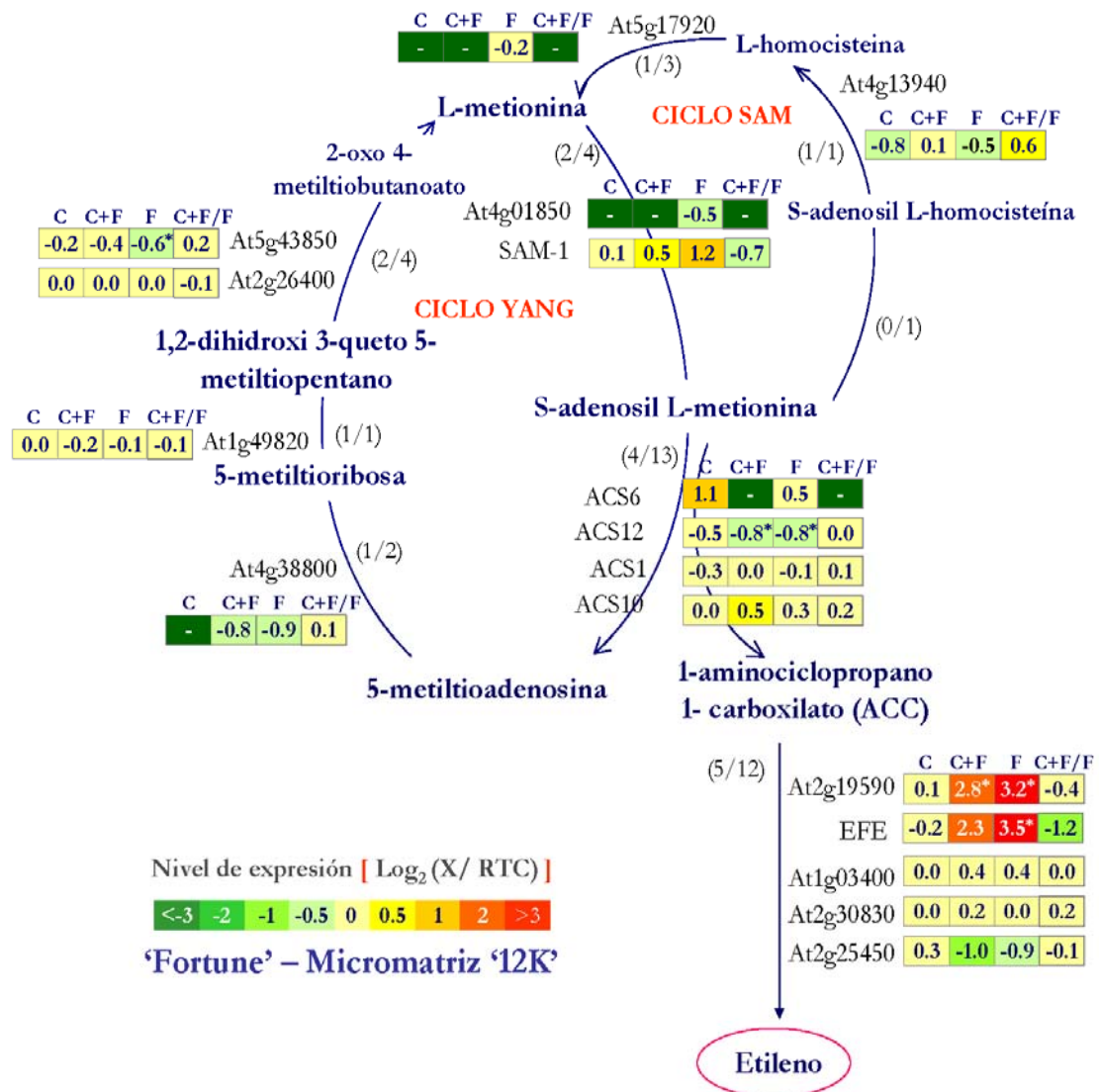


Figura 19: Representación gráfica (Aracyc) del estudio de la influencia del tratamiento de curado en la expresión de los genes de la ruta de biosíntesis de etileno en el flavedo de los frutos de mandarina 'Fortune' almacenados en frío. Se indican los valores relativos de expresión de los genes incluidos en la micromatriz '12K'. (Ver detalles en Figura 15).

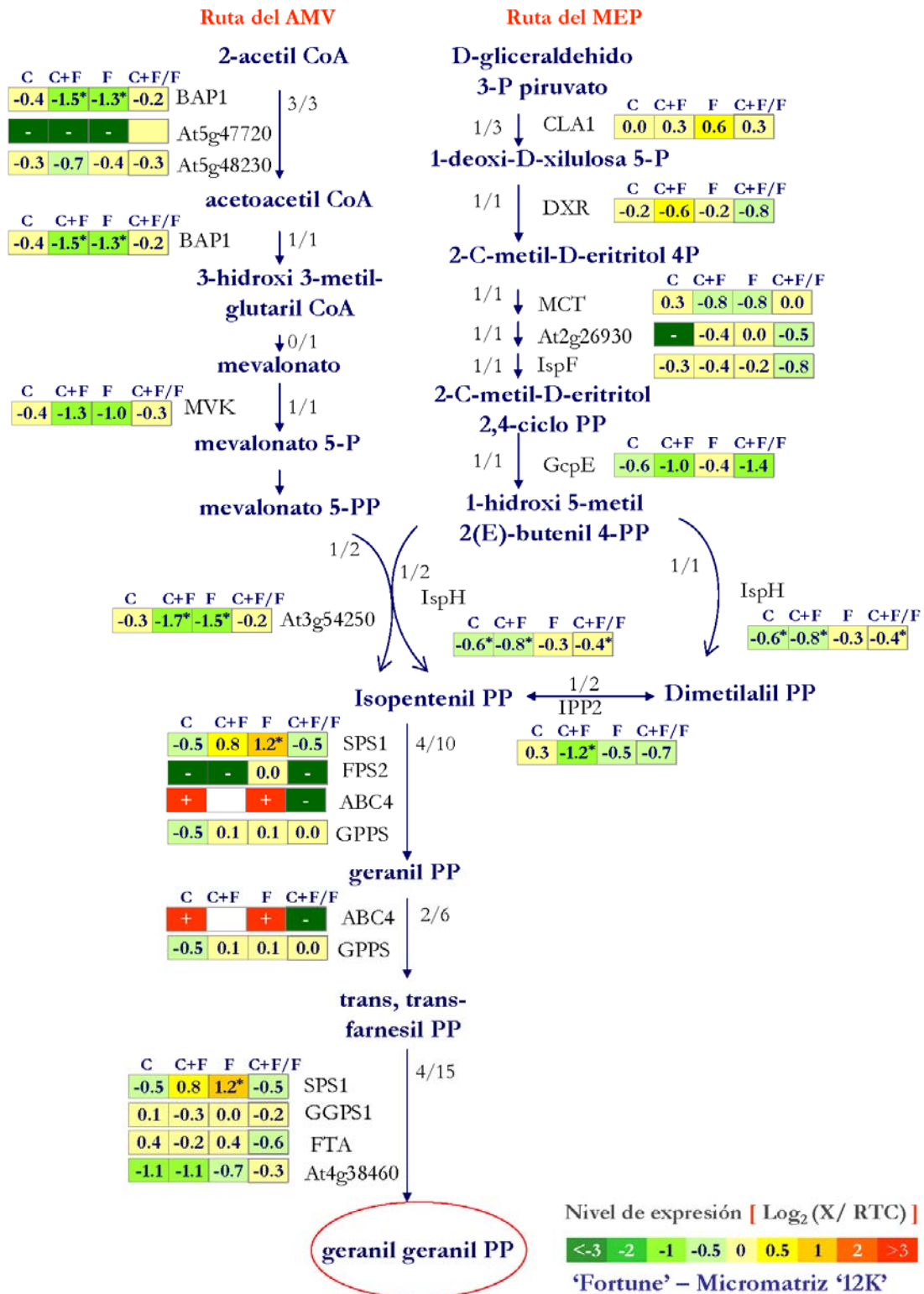


Figura 20: Representación gráfica (Aracyc) del estudio de la influencia del tratamiento de curado en la expresión de los genes de la ruta de mevalonato y la ruta MEP que conducen a la biosíntesis de isopentenil PP, precursor en la biosíntesis de geranyl geranyl PP, en el flavedo de los frutos de mandarina 'Fortune' almacenados en frío. (Ver detalles en Figura 15).

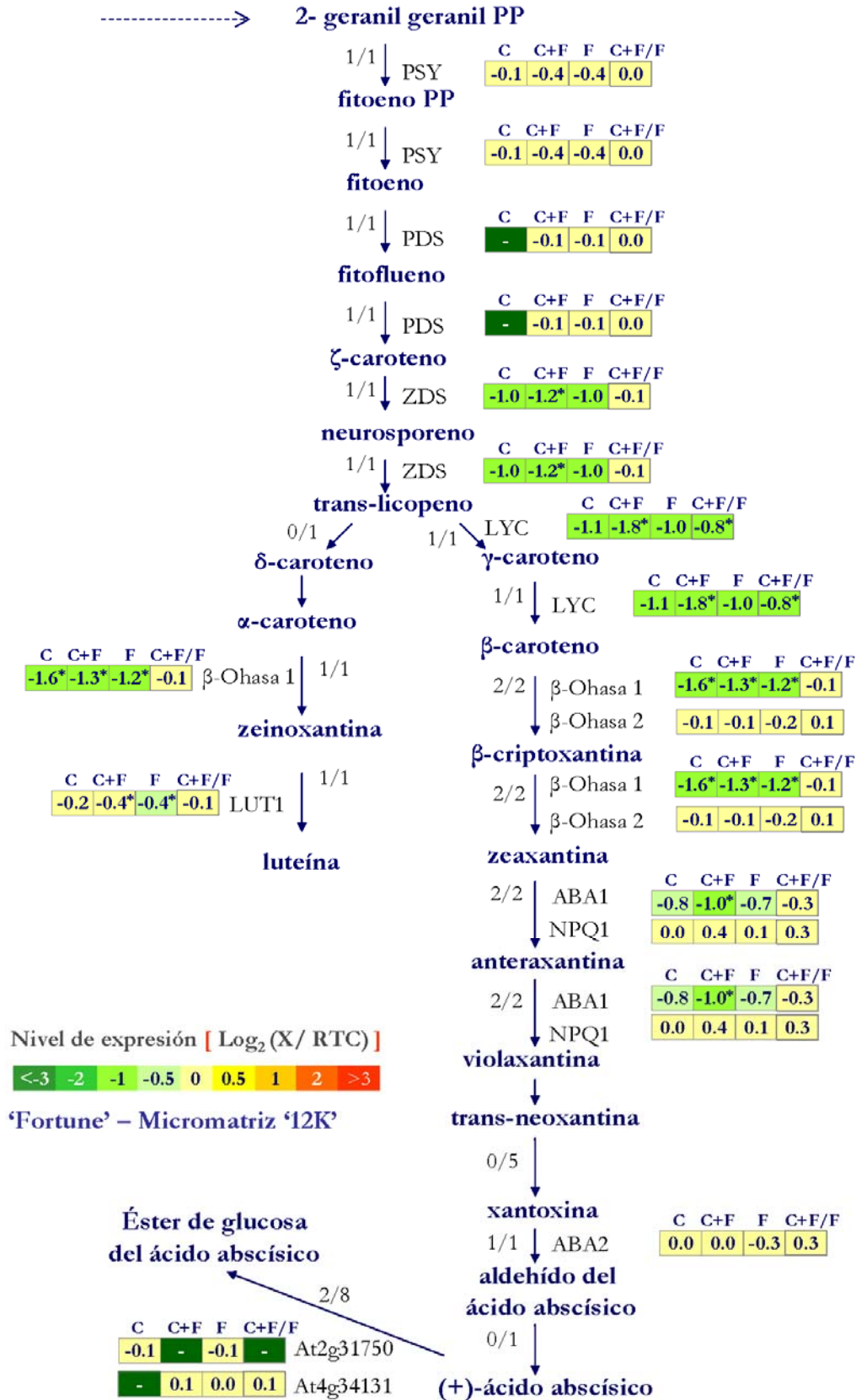


Figura 21: Representación gráfica (Aracyc) del estudio de la influencia del tratamiento de curado en la expresión de los genes de la ruta de biosíntesis de carotenoides y ABA en el flavedo de los frutos de mandarina 'Fortune' almacenados en frío (Ver detalles en Figura 15).

- c) Comparación de los resultados obtenidos en los ensayos de hibridación con las micromatrices '7K' y '12K'.

El empleo de réplicas biológicas (M'12K') redujo aproximadamente en un 24% el número de unigenes que se expresan diferencialmente en respuesta a alguna de las tres condiciones estudiadas. Este hecho puso de manifiesto la influencia de los factores precosecha en la reproducibilidad de las respuestas inducidas por este tipo de tratamientos. En la micromatriz '7K' se encontró una mayor abundancia de genes que respondían a la combinación de calor y frío, ya se trate de inducción (1361 genes) o represión (1576 genes) constituyendo un 73% del total de genes que mostraron cambios significativos en el nivel de acumulación de los mensajeros en respuesta al calor, al frío o a la combinación de calor y frío. Sin embargo, en la micromatriz '12K' el porcentaje de genes con cambios de expresión significativos en respuesta a cada uno de estos estímulos fue similar oscilando alrededor del 40-50% del total de genes diferencialmente expresados. En ambos casos, el porcentaje de genes que responden al calor y al frío 'per se' fue similar en ambas micromatrices. Asimismo, en la primera de estas micromatrices se encontró un mayor número de genes reprimidos que inducidos en respuesta a las tres situaciones de estudio con respecto al nivel de acumulación relativa correspondiente a los frutos recién traídos de campo (RTC). Este mismo hecho se observó en la segunda micromatriz en respuesta al calor y a la combinación de calor y frío, aunque en los frutos almacenados directamente a las bajas temperaturas que causan los 'daños de frío' predominaron los fenómenos de inducción, ya que entre los genes que mostraron cambios en respuesta al frío un 78% se indujo mientras que el 22% restante se reprimió.

Entre los 4407 genes comunes a ambas micromatrices, se encontraron 37 genes con mayor expresión en los frutos transferidos directamente al frío respecto de los que habían sido previamente acondicionados ($F > C + F$), entre los que se incluyen 11 genes obtenidos en el análisis SAM y 26 cuya expresión no se detectó en respuesta a la combinación de calor y frío. Entre los primeros (Tabla 20A) destacan 3 genes relacionados con el estrés oxidativo que se indujeron en respuesta al frío pero no a la combinación de calor y frío y codifican dos proteínas CPRD2 que en la micromatriz '12K' se indujeron más de 9 veces con respecto a los frutos RTC, y una citocromo P-450 que mostró en esta misma micromatriz una diferencia de expresión al menos de 28 veces entre ambos tipos de frutos almacenados a 2 °C. Además, con un perfil similar se encontraron dos genes que codifican una glutamato descarboxilasa y una proteína transmembrana de la familia de transportadores ABC inducidos en la micromatriz '12K' más de 4 y 12 veces en respuesta al frío, respectivamente. En otros casos, como un gen que codifica un transportador de sulfatos, se observó una inducción tanto en frutos acondicionados como sin acondicionar durante el frío aunque en los primeros este efecto fue menor. Este comportamiento también fue observado en el caso de la micromatriz '7K' para un gen que codifica una proteína GMFP5 (del inglés '*Glycine max* farnesylated protein 5') con capacidad de unión a metales. Por otro lado, se observaron en ambas micromatrices dos genes cuya expresión en respuesta al frío no varió pero disminuyó en respuesta a la combinación de calor y frío. Estos genes codifican una capsantina sintasa implicada en la biosíntesis de carotenoides y una CCoAOMT (At4g34050).

La comparación de los resultados obtenidos de ambas micromatrices puso además de manifiesto que solamente dos de los genes comunes presentaron mayores niveles de expresión en los frutos acondicionados y transferidos a 2 °C respecto a los almacenados directamente a dicha temperatura ($C + F > F$). Estos genes codifican una ATPasa tipo AAA (At1g02890) y una proteína sin homología en *A. thaliana* (unigen 4947). No obstante, 9 de los genes que en la micromatriz '7K' mostraron mayores diferencias significativas entre

ambos tipos de frutos, en la micromatriz '12K' su expresión fue al menos dos veces mayor en respuesta a la combinación de calor y frío respecto al frío 'per se' aunque estas diferencias no fueron significativas (Tabla 20B). Entre ellos, destacan 7 genes que se indujeron durante la exposición al calor y/o en respuesta a la combinación de calor y frío pero no modifican sus niveles de expresión en respuesta al frío 'per se' respecto de los niveles en RTC y codifican una proteína precursora de ferritina 3, una quitinasa de carácter ácido de clase I, la subunidad catalítica LigB de una proteína de la familia de dioxigenasas que rompen los anillos de los compuestos aromáticos así como tres proteínas que no presentan homología en *A. thaliana* y otra proteína de función desconocida. Asimismo, se encontró un gen que codifica una proteína de pared celular que hidroliza enlaces glicosídicos cuya expresión aumentó en respuesta a la combinación de calor y frío y un gen que codifica una dehidrina de *Citrus sinensis* cuya expresión disminuyó específicamente en respuesta al frío pero no en respuesta al calor ni a la combinación de ambos estímulos.

El análisis funcional (FatiGO+) mostró en ambas micromatrices una represión significativa de procesos biológicos de biosíntesis de lípidos en respuesta a la combinación de calor y frío (Tabla 21). Al estudiar con detalle los genes agrupados dentro de esta categoría funcional (nivel 6) se encontró un total de 8 genes comunes al comparar ambas micromatrices cuya expresión disminuía en los frutos almacenados a 2 °C después de ser acondicionados con respecto a RTC (Tabla 26). En general, este grupo de genes mostró también una represión en respuesta al calor y al frío directo, aunque sólo en el caso de la micromatriz '7K' la mayoría de las represiones fueron estadísticamente significativas.

Además, en ambas micromatrices el calor y el frío 'per se' reprimió procesos relacionados con la traducción lo que refleja aspectos comunes en las respuestas a ambas situaciones extremas de temperatura.

Por otro lado, aunque los resultados obtenidos a partir de la micromatriz '7K' pusieron de manifiesto que la exposición al calor y/o a la combinación de calor y frío podía alterar la expresión de genes del metabolismo de derivados de aminoácidos u otros implicados en la modificación de proteínas, en la micromatriz '12K' el análisis por ontologías génicas no confirmó estos hechos.

La evaluación de la incidencia de 'daños de frío' en los frutos de mandarina 'Fortune' recolectados en las tres campañas mostró valores más similares en el IDF a los 30 días de almacenamiento a 2 °C, alrededor de 1,5, que a los 20 días (Figura 10). Además, en los frutos procedentes de la tercera campaña, el IDF a los 20 días fue muy reducido. Por ello, aunque el estudio de la expresión génica mediante el empleo de réplicas técnicas se realizó a partir de RNA procedente de frutos, acondicionados y sin acondicionar, almacenados 20 días a 2 °C, en la micromatriz '12K' se estudió la expresión a los 30 días de almacenamiento a dicha temperatura. Aunque no podemos descartar la posibilidad de que algunas de las respuestas que se producen a los 20 días podrían ser transitorias y no observarse a 30 días, o viceversa, no obstante, el IDF de los frutos utilizados en la micromatriz '7K' fue similar al de los frutos utilizados en la micromatriz '12K'.

Tabla 20: Listado de genes comunes a ambas micromatrices que mostraron diferencias de expresión entre frutos de mandarina 'Fortune' acondicionados y sin acondicionar una vez almacenados a 2 °C, tanto por análisis SAM (FDR<1%) como porque una de las condiciones no presentó valor de expresión. (A) Lista de genes en los que F > C+F en orden decreciente según los resultados de la micromatriz '7K'; (B) Lista de genes en los que C+F > F en la micromatriz '7K' y donde el valor logarítmico correspondiente en la micromatriz '12K' es mayor a 1.0 aunque no fue significativo (Ver detalles en la Tabla 2)

Proteína más similar	Unigen	Homología en <i>A. thaliana</i>	F > C + F				Micromatriz '7K'				Micromatriz '12K'			
			Log ₂ (C/RTC)	Log ₂ (C + F/RTC)	Log ₂ (F/RTC)	Log ₂ (C + F/F)	Log ₂ (C/RTC)	Log ₂ (C + F/RTC)	Log ₂ (F/RTC)	Log ₂ (C + F/F)	Log ₂ (C/RTC)	Log ₂ (C + F/RTC)	Log ₂ (F/RTC)	Log ₂ (C + F/F)
Citocromo P450	4408	At5g05260	0.29	0.35	2.21	-1.85	0.52	-0.50	4.34	-4.84				
Glutamato des carboxilasa isozima 3 [<i>Nicotiana tabacum</i>]	5967	At2g02010	0.63	0.02	1.40	-1.38	0.99	-1.17	2.28	-3.45				
Transportador ABC [<i>A. thaliana</i>]	6518	At1g66950	-	-0.24	0.90	-1.15	0.93	0.26	3.62	-3.36				
CPRD2 [<i>Vigna unguiculata</i>]	4436	At4g20820	0.56	0.23	1.33	-1.11	0.71	0.34	3.31	-2.97				
Capsantina/capsorubina sintasa, cloroplasto precursor	6479	At3g10230	-	-0.84	0.08	-0.92	-1.14	-1.79	-0.97	-0.81				
CPRD2 [<i>Vigna unguiculata</i>]	2332	At1g26390	0.85	0.30	1.15	-0.85	0.74	0.39	3.24	-2.85				
Transportador de sulfatos [<i>Brassica napus</i>]	C04023E09	At3g12520	0.65	0.46	1.26	-0.80	0.56	1.25	1.72	-0.47				
GMFP5 [<i>Glycine max</i>]	4596	At2g36950	0.81	0.84	1.53	-0.70	0.74	-0.31	2.57	-2.88				
Prot. precursora de ác. tetrahidrocannabinólico sintasa [<i>Cannabis sativa</i>]	C04016A09	At5g44380	1.12	0.02	0.65	-0.63	0.81	-0.16	2.81	-2.96				
Cafeil-CoA O-metiltransferasa	7170	At4g34050	-0.25	-0.40	0.03	-0.43	-0.11	-0.95	0.81	-1.76				
Prot. rica en residuos de glicina [<i>Citrus sinensis</i>]	5339	-	-0.08	-0.06	0.29	-0.35	0.42	0.09	1.30	-1.21				

Proteína más similar	Unigen	Homología en <i>A. thaliana</i>	C + F > F				Micromatriz '7K'				Micromatriz '12K'			
			Log ₂ (C/RTC)	Log ₂ (C + F/RTC)	Log ₂ (F/RTC)	Log ₂ (C + F/F)	Log ₂ (C/RTC)	Log ₂ (C + F/RTC)	Log ₂ (F/RTC)	Log ₂ (C + F/F)	Log ₂ (C/RTC)	Log ₂ (C + F/RTC)	Log ₂ (F/RTC)	Log ₂ (C + F/F)
Ferritina 3, precursor cloroplasto (SFerH-3)	6792	At5g01600	-0.001	3.400	0.719	2.681	0.279	1.653	0.593	1.061				
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	6114	-	2.400	1.415	-0.512	1.927	2.520	0.673	-1.122	1.795				
Quitinasa de carácter ácido, clase I [<i>Citrus jambhiri</i>]	7103	At3g12500	2.759	1.787	-0.012	1.799	2.880	1.866	0.244	1.622				
Subunid. LigB catalítica de prot. familia de dioxigenasas de anillos aromáticos	2335	At4g15090	2.092	1.061	-0.686	1.746	2.294	1.066	0.004	1.062				
Prot. familia glicosilhidrolasas 17 [<i>A. thaliana</i>]	5536	At5g55180	-0.689	3.430	1.913	1.518	0.226	1.999	0.861	1.137				
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	6517	-	3.083	1.469	0.055	1.414	3.490	0.445	-1.346	1.791				
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	C08007H11	-	1.331	1.053	0.068	0.985	1.947	1.297	0.080	1.217				
Dehidrina [<i>Citrus sinensis</i>]	5584	At1g76180	-0.275	0.010	-0.863	0.873	0.036	0.054	-1.060	1.115				
Prot. función desconocida [<i>A. thaliana</i>]	C07005A04	At4g24750	1.014	0.487	-0.228	0.715	2.158	0.476	-0.884	1.359				

Tabla 21: Comparación de los resultados del análisis de ontología génicas (FatiGO+) en las micromatrices '7K' y '12K' indicando los procesos biológicos estadísticamente sobre o infrarrepresentados coincidentes en el grupo de genes con expresión diferencial en respuesta al calor, al frío o a la combinación de calor y frío. (Ver detalles en la Tabla 6).

COINCIDENCIAS MICROMATRIZ 7K Y 12K	RTC vs CF		RTC vs F		C vs F	
	7K	12K	7K	12K	7K	12K
PROCESO BIOLÓGICO						
Nivel3						
Procesos biosintéticos			3.13E-05	2.90E-02		
Nivel4						
Procesos biosintéticos de la célula			2.01E-05	2.90E-02		
Nivel6						
Procesos de biosíntesis de lípidos	4.16E-02	4.30E-03				
Traducción					1.04E-04	7.68E-03

Tabla 22: Lista de genes comunes a la micromatriz '7K' y '12K' clasificados según el análisis FatiGO+ en procesos de biosíntesis de lípidos (nivel 6). Se indica el unigen, homología de secuencia en la base de datos de *A. thaliana* y los valores, expresados en escala logarítmica en base 2 (Log2) resultado de las comparaciones de los niveles de acumulación relativa de los transcritos en respuesta al calor (C), al frío (F) y a la combinación de calor y frío (C+F) respecto a los correspondientes a los frutos recién traídos de campo (RTC). Se compara además entre sí la expresión en los frutos curados y almacenados a 2 °C frente a los expuestos directamente a 2 °C (C+F/F) (Ver detalles en la Tabla 2).

Proteína más similar	Procesos de biosíntesis de lípidos (Nivel 6) - C+F < RTC				Micromatriz '7K'				Micromatriz '12K'				
	Unigen	Homología en <i>A. thaliana</i>	LOG ₂ (C/RTC)	LOG ₂ (C+F/RTC)	LOG ₂ (F/RTC)	LOG ₂ (C+F/F)	LOG ₂ (C/RTC)	LOG ₂ (C+F/RTC)	LOG ₂ (F/RTC)	LOG ₂ (C+F/F)	LOG ₂ (C/RTC)	LOG ₂ (C+F/RTC)	LOG ₂ (F/RTC)
Enzima CUT1 [<i>A. thaliana</i>]	5421	At1g68530	0.69	-2.21	-2.32	0.10	-	-	-0.23	-	-	-	-
Enoil-ACP reductasa (NADH ₂) (EC 1.3.1.9)	5404	At2g05990	-0.82	-1.08	-0.85	-0.23	-0.89	-1.42	-1.38	-0.04	-0.89	-1.42	-1.38
Capsantina / capsorubina sintasa, precursor C cloroplasto	6479	At3g10230	-	-0.84	0.08	-0.92	-1.14	-1.79	-0.97	-0.81	-1.14	-1.79	-0.97
Mfo-inositol 1-fosfato sintasa [<i>Albizinia marina</i>]	7200	At2g22240	-1.01	-0.82	-0.50	-0.32	-1.17	-2.42	-1.63	-0.79	-1.17	-2.42	-1.63
ζ-caroteno desaturasa [<i>Citrus sinensis</i>]	C34102H04	At3g04870	-0.36	-0.79	-0.71	-0.08	-1.04	-1.18	-1.04	-0.14	-1.04	-1.18	-1.04
Mevalonato difosfato descarboxilasa [<i>Hevea brasiliensis</i>]	5998	At3g54250	-0.55	-0.76	-0.43	-0.32	-0.34	-1.75	-1.55	-0.20	-0.34	-1.75	-0.20
Farnesil difosfato farnesiltransferasa (EC 2.5.1.21)	C02004F09	At4g34640	-0.78	-0.59	-0.51	-0.08	-0.46	-1.22	-0.66	-0.56	-0.46	-1.22	-0.66
6-fosfogluconatodeshidrogenasa [<i>A. thaliana</i>]	5512	At4g11820	0.47	-0.31	-0.58	0.27	-0.36	-1.50	-1.27	-0.23	-0.36	-1.50	-1.27

1.4. Efecto del tratamiento con sales de metales divalentes en el estudio de los 'daños de frío' en mandarinas de la variedad 'Fortune'.

Los resultados del análisis de micromatrices de cDNA mostraron que algunos de los genes que se expresaron diferencialmente en respuesta al calor y/o a la combinación de calor y frío codifican proteínas cuya función está relacionada con la presencia de metales divalentes. Por ello, se estudió el efecto de la aplicación de sales de Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} y Mg^{2+} en la incidencia de 'daños de frío' en frutos recién traídos de campo almacenados a 2 y 12 °C, y en frutos acondicionados durante 3 días a 37 °C y almacenados en frío.

En la Figura 22 se muestra el efecto de la aplicación de concentraciones crecientes de FeSO_4 en la aparición de daños en la piel de mandarinas 'Fortune' almacenadas a 2 y 12 °C, inmediatamente después de ser cosechadas, y en mandarinas almacenadas a 2 °C después de ser acondicionadas durante 3 días a 37 °C. La aplicación de Fe^{2+} 100 mM tuvo un efecto fitotóxico muy marcado ya que originó daños severos en los frutos, distintos a los del frío, inmediatamente después del tratamiento. Por tanto, resultó imposible evaluar el efecto de este tratamiento en la susceptibilidad al frío de la mandarina 'Fortune' (datos no mostrados). La aplicación de FeSO_4 10 mM también originó daños en la piel, que fueron evidentes desde el principio del almacenamiento. Aunque dichos daños fueron menos severos que los de los frutos tratados con Fe^{2+} 100 mM, no pudieron obtenerse resultados concluyentes sobre el efecto del tratamiento en los 'daños de frío'. Cuando se aplicó la concentración de sal de Fe^{2+} 1 mM se detectaron daños en la piel, claramente diferentes a los del frío, en los frutos almacenados directamente a 12 °C y en los frutos curados y almacenados en frío. Este tipo de síntomas fue muy poco evidente en los frutos almacenados a 2 °C, que presentaron un índice de daño en la piel a esta temperatura similar o ligeramente superior al de los frutos tratados sólo con agua (Figura 22). Por otra parte, se comprobó que la aplicación de esta concentración de sal de Fe^{2+} no revertía el efecto beneficioso del curado cuando la sal se aplicó inmediatamente después del curado, o tras un periodo de almacenamiento de 20 días a 2 °C en los frutos previamente curados, antes de ser expuestos durante un periodo adicional de 30 y 10 días en frío, respectivamente (datos no mostrados).

Con el fin de evitar que otros daños fitotóxicos pudiesen dificultar la evaluación de la incidencia de 'daños de frío', se estudió el efecto de una concentración de FeSO_4 más baja (0,1 mM). En este caso no aparecieron daños en la piel en los frutos almacenados a 12 °C ni en los frutos curados almacenados en frío (Figura 22). Por otro lado, este tratamiento apenas modificó la susceptibilidad al frío de los frutos almacenados directamente a 2 °C (Figura 22). Sin embargo, en frutos cosechados un mes más tarde que presentaron mayor susceptibilidad al frío la aplicación de esta concentración de sal redujo en aproximadamente un 30% el índice de 'daños de frío' durante al menos 43 días de almacenamiento a 2 °C en los frutos no acondicionados. Estas diferencias se redujeron después de periodos superiores de almacenamiento a 2 °C. En un tercer experimento con la misma concentración de FeSO_4 se volvió a observar este efecto (Figura 29). No obstante, después de periodos prolongados de almacenamiento aparecieron daños en la piel relacionados con el envejecimiento de los frutos, que fueron más acusados en los frutos acondicionados a altas temperaturas, sin encontrarse diferencias relevantes en los frutos sometidos a los distintos tratamientos, incluyendo el agua (datos no mostrados).

Además de estudiar el efecto de la aplicación de Fe^{2+} , se estudió el efecto de la aplicación de dos quelantes de este metal divalente: el ácido tánico (5%) y la ferrocina (1 mM). En ningún caso se modificó la susceptibilidad al frío de los frutos tratados con el quelante de forma aislada o en combinación con la sal de Fe^{2+} con respecto a los frutos control tratados sólo con agua (datos no mostrados).

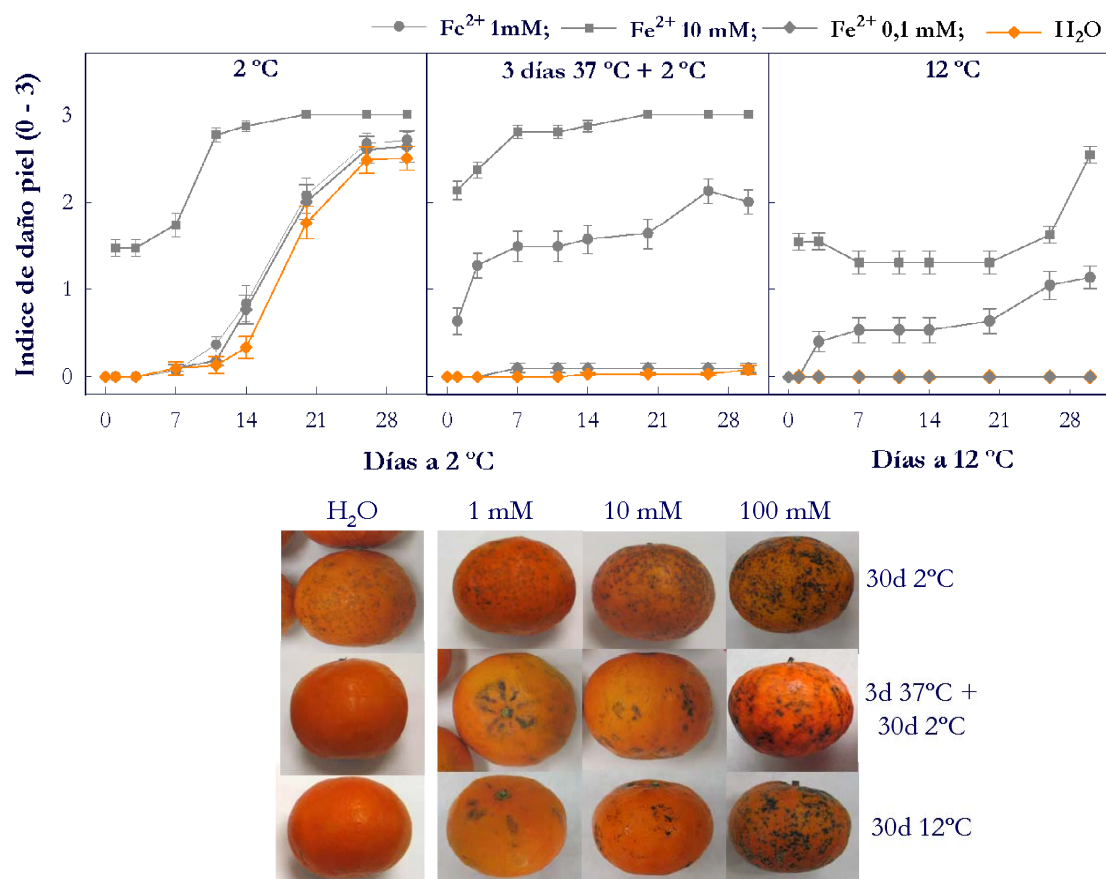


Figura 22: Estudio del efecto de la aplicación de FeSO₄ en la incidencia de daños en la piel en frutos de mandarina ‘Fortune’ almacenados, inmediatamente después de ser cosechados, 30 días a 2 y 12 °C, y en frutos curados (3 días 37 °C) y almacenados en frío durante el mismo periodo de tiempo. Los frutos se trataron con H₂O (♦) o con concentraciones de sal de Fe²⁺ 0,1 (◆), 1 (●) y 10 mM (■).

La aplicación de la sal de Cu²⁺ 1, 10 y 100 mM también originó daños fitotóxicos en la superficie de los frutos expuestos a las tres condiciones de almacenamiento (2 °C, 12 °C, 3 días 37 °C + 2 °C), siendo este efecto mayor a medida que aumentaba la concentración de la sal (Figura 23). Aunque este tipo de daño fue diferente al de los ‘daños de frío’, no pudieron obtenerse resultados fiables sobre el efecto del cobre en la incidencia de los mismos en los frutos almacenados directamente a 2 °C. Teniendo en cuenta que a las concentraciones ensayadas de sal de Cu²⁺ no se pudo llevar a cabo una evaluación fiable de los ‘daños de frío’, debido a la aparición de daños fitotóxicos, en una segunda experiencia se ensayó una concentración menor de esta sal: 0,1 mM. La aplicación se realizó sobre frutos recién cosechados y almacenados a 2 °C, con y sin acondicionamiento previo, y a 12 °C. Esta concentración de Cu²⁺ redujo en un 40% la incidencia de los ‘daños de frío’ en los frutos almacenados directamente a 2 °C (Figura 24) y no produjo daños fitotóxicos en los frutos almacenados a esta misma temperatura previamente acondicionados ni en los almacenados a 12 °C.

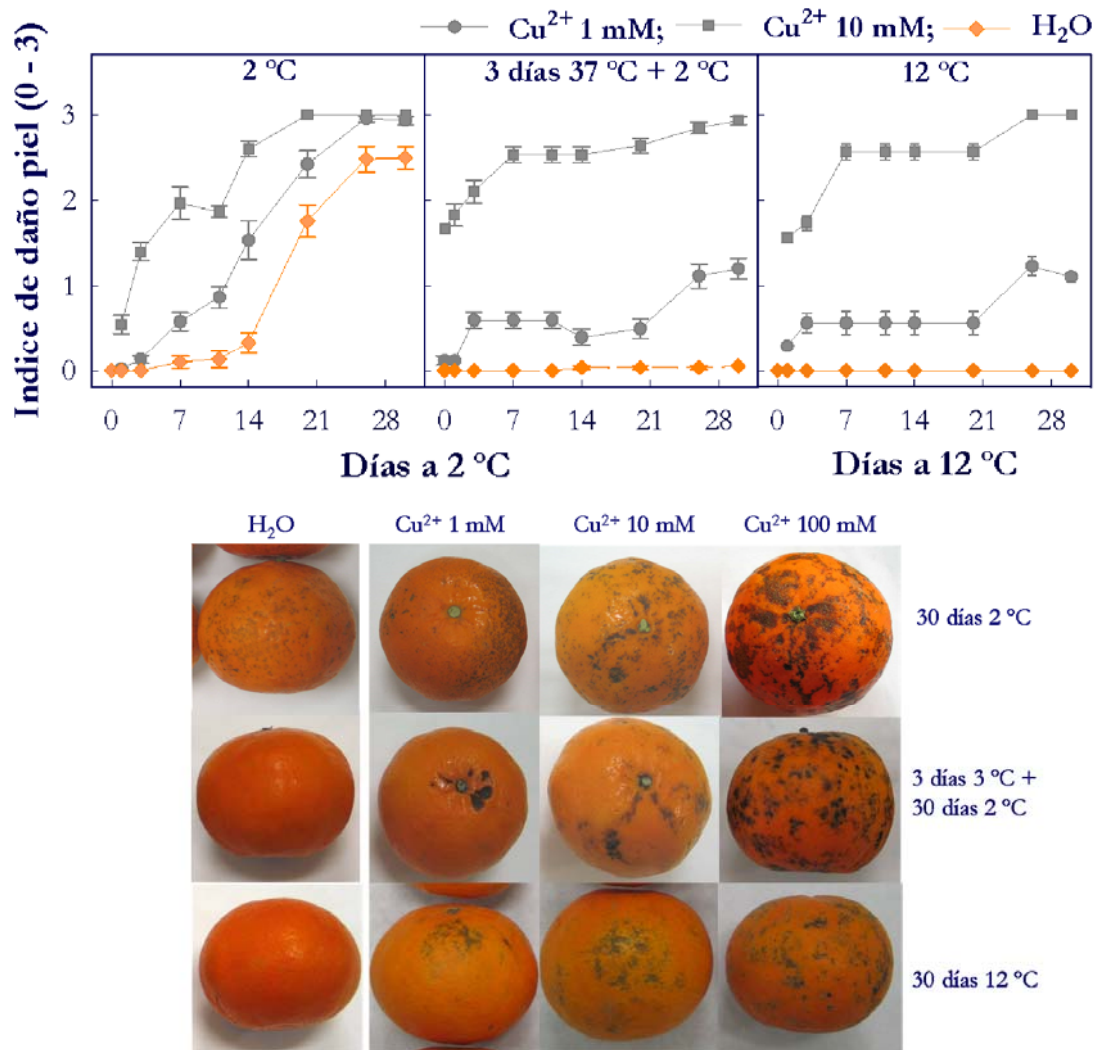


Figura 23: Estudio del efecto de la aplicación de CuSO_4 en la incidencia de daños en la piel en frutos de mandarina 'Fortune' almacenados, inmediatamente después de ser cosechados, durante 30 días a 2 y 12 °C, y en frutos curados (3 días 37 °C) y almacenados en frío durante el mismo periodo de tiempo. Los frutos se trataron con H_2O (◆) o con concentraciones de sal de Cu^{2+} 1 (●) y 10 mM (■).

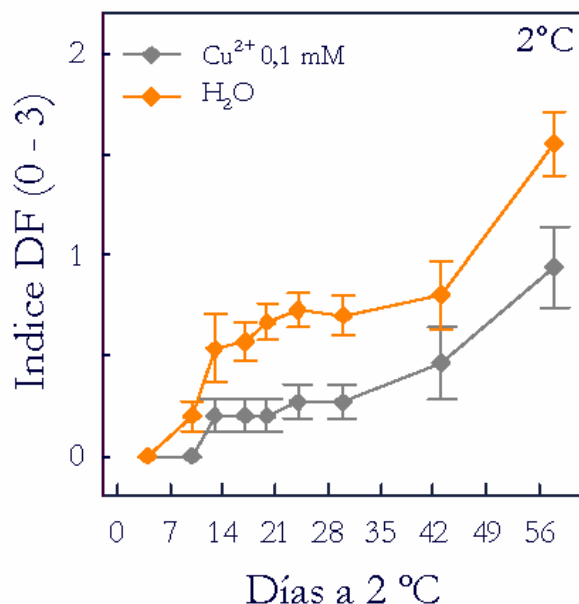


Figura 24: Efecto de la aplicación de CuSO_4 0,1 mM en la incidencia de ‘daños de frío’ en frutos de mandarina ‘Fortune’ almacenados, inmediatamente después de ser cosechados, durante 30 días a 2 °C. Los frutos se trataron con H_2O (◆) o la sal de Cu^{2+} 0,1 mM (◆)

La aplicación de DETC, quelante del Cu^{2+} , no modificó la susceptibilidad al frío de las mandarinas ‘Fortune’. En los frutos almacenados directamente a 2 °C sólo se observaron pequeñas diferencias entre el índice de ‘daños de frío’ de los frutos tratados con las tres concentraciones de DETC ensayadas (1, 10 y 100 mM) y el de los frutos tratados solo con agua, al final del almacenamiento, presentando estos últimos un índice de daño 20% inferior al de los tratados con DETC. Por otro lado, el DETC no favoreció la aparición de ‘daños de frío’ en los frutos curados aunque, después de tiempos largos de almacenamiento, aparecieron síntomas de senescencia, más evidentes a medida que aumentaba la concentración de DETC. Estos daños aparecieron incluso en los frutos almacenados a 12 °C después de 20 días de almacenamiento cuando la concentración de DETC fue 100 mM (Figura 25).

La aplicación conjunta del DETC 100 mM y de Cu^{2+} a las tres concentraciones ensayadas (1, 10 y 100 mM) tampoco afectó a la incidencia de ‘daños de frío’ en los frutos almacenados directamente a 2 °C. No obstante, este tratamiento favoreció la aparición de daños en la piel, distintos a los del frío, en los frutos curados durante el almacenamiento a 2 °C. Dichos daños fueron similares a los observados en los frutos tratados exclusivamente con Cu^{2+} , aunque menos severos. Estos daños no se observaron en los frutos almacenados a 12 °C (datos no mostrados).

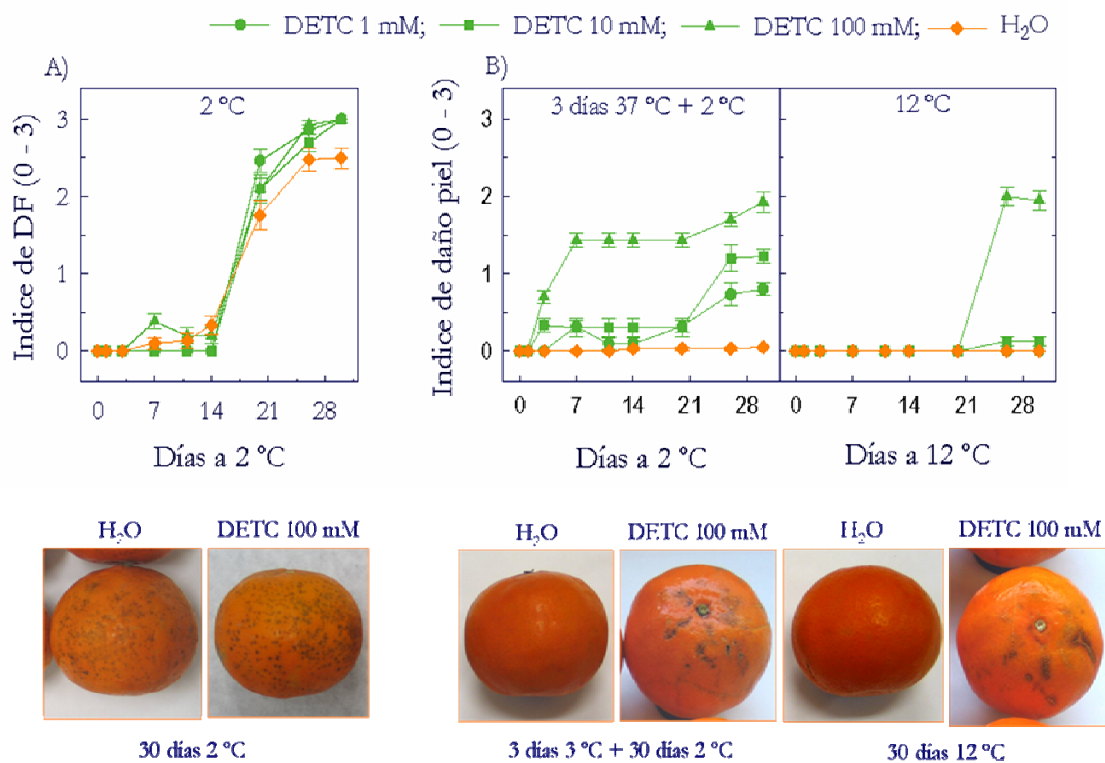


Figura 25: Estudio del efecto de la aplicación de DETC en la incidencia: A) de ‘daños de frío’ en frutos de mandarina ‘Fortune’ almacenados, inmediatamente después de ser cosechados, durante 30 días a 2 °C; B) de daños en la piel en frutos de mandarina ‘Fortune’ curados (3 días 37 °C) y almacenados durante 30 días a 2 °C, y en frutos recién cosechados almacenados a 12 °C durante igual periodo de tiempo (frutos control). Los frutos se trataron con H₂O (♦) o con concentraciones de DETC 1 (●), 10 (■) y 100 mM (▲).

Teniendo en cuenta que genes como los que codifican nodulinas o MTs, altamente representados en la biblioteca de cDNA construida en este trabajo, son capaces de unir, además del Fe²⁺ o Cu²⁺, otros metales divalentes, se evaluó el efecto de la aplicación de sales de Zn²⁺, Mn²⁺ y Mg²⁺ en la incidencia de ‘daños de frío’ (Figura 26). En este caso, se aplicaron dichas sales a una concentración 100 mM. La aplicación de ZnSO₄·7H₂O 100 mM tuvo un claro efecto fitotóxico con síntomas, diferentes a los ‘daños de frío’, que pudieron apreciarse a las pocas horas tras la aplicación en los frutos curados y almacenados a 2 °C y en los frutos almacenados a 12 °C, y a los 7 días en los frutos almacenados directamente en frío. Como se observa en las fotografías (Figura 26), estos daños se caracterizaron por la aparición de áreas necróticas de color verde oscuro que fueron pardeando con el tiempo. Los frutos almacenados directamente a 2 °C también presentaron ‘daños de frío’ aunque no pudo realizarse una evaluación fiable de los mismos, puesto que fueron enmascarados en gran medida por los daños fitotóxicos.

El tratamiento con MnSO₄·H₂O 100 mM también produjo daños en la piel, diferentes a los ‘daños de frío’, en los frutos almacenados a 2 °C, con y sin acondicionamiento previo, pero no en los almacenados a 12 °C que mantuvieron igual apariencia hasta el final del almacenamiento. Estos daños, aparentemente similares a los daños por senescencia, fueron muy ligeros en los frutos almacenados directamente a 2 °C, y aparentemente no se encontraron diferencias en la incidencia de ‘daños de frío’ entre los frutos control y los tratados con la sal de Mn²⁺.

Por último, la aplicación de MgSO₄·7H₂O 100 mM, que no produjo daños fitotóxicos en ninguna de las tres condiciones de almacenamiento, no modificó la

incidencia de ‘daños de frío’ en los frutos almacenados directamente a 2 °C ni en los frutos curados y expuestos al frío.

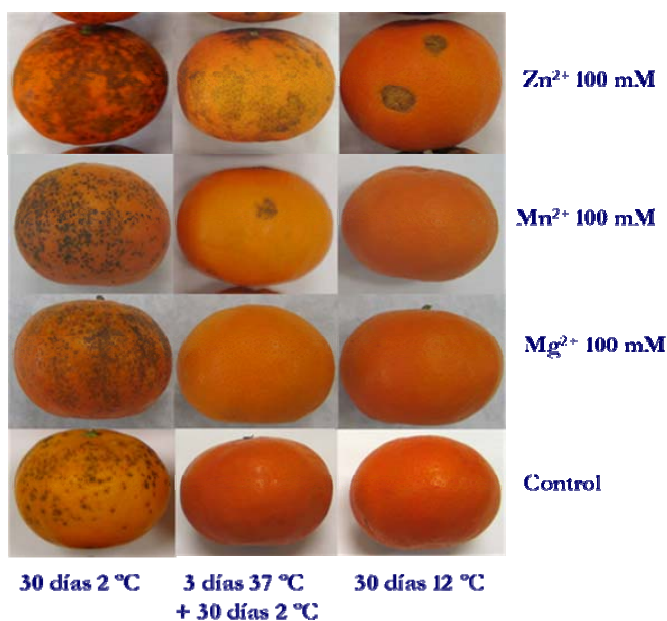
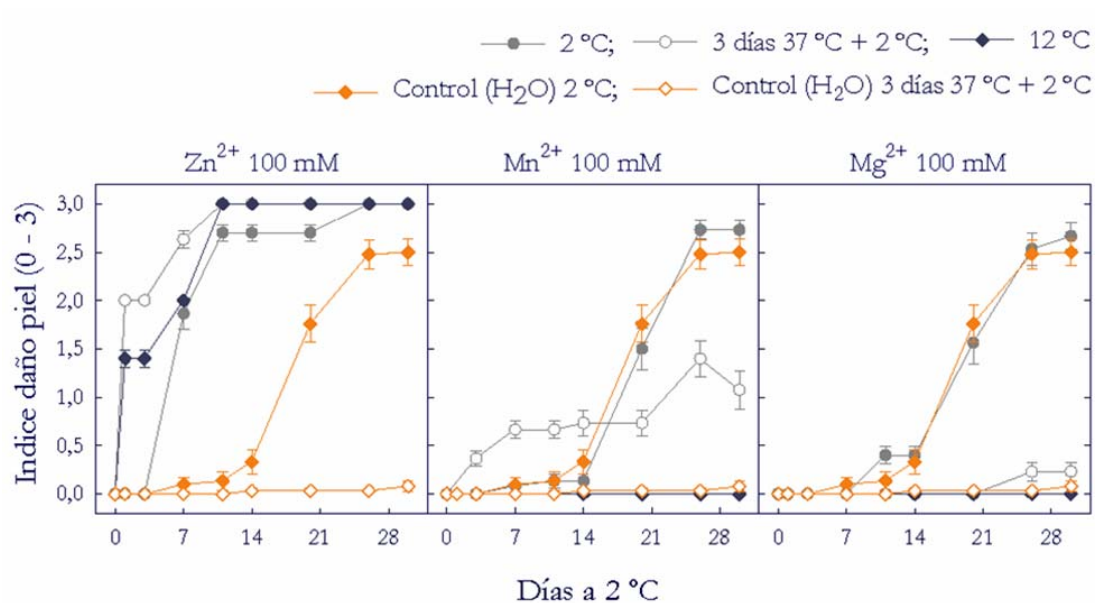


Figura 26: Estudio del efecto de la aplicación de ZnSO₄, MnSO₄ y MgSO₄ 100 mM en la incidencia de daños en la piel en frutos de mandarina ‘Fortune’ almacenados, inmediatamente después de ser cosechados, durante 30 días a 2 (●) y 12 °C (◆), y en frutos curados (3 días 37 °C) y almacenados en frío durante igual periodo de tiempo (○). Como controles se emplearon frutos tratados con H₂O, curados y almacenados 30 días a 2 °C (◇), o expuestos directamente al frío (◆) durante el mismo periodo de tiempo.

De forma paralela al estudio del efecto de la aplicación de sales de metales divalentes en la susceptibilidad al frío de frutos de mandarina ‘Fortune’, se llevó a cabo en este mismo experimento un tratamiento para favorecer la inducción de especies activas de oxígeno (ROS). Para ello, se aplicó paracuat 1 mM, un inductor de radicales superóxido ($O_2^{\bullet -}$), en combinación con H_2O_2 1 mM y Fe^{2+} 0,1 mM, para favorecer la formación de radicales hidroxilo (OH^{\bullet}). Los resultados de dicho tratamiento indican que reduce ligeramente la incidencia de los ‘daños de frío’ en las mandarinas ‘Fortune’ (Figura 27). Así, el índice de ‘daños de frío’ de los frutos tratados con la mezcla paracuat 1 mM + H_2O_2 1 mM y Fe^{2+} 0,1 mM fue aproximadamente un 20% o un 30% inferior al de los frutos tratados con agua o Fe^{2+} 0,1 mM, respectivamente, al final del almacenamiento. Los frutos curados y almacenados a 2 °C y los frutos almacenados a 12 °C, no presentaron síntomas de ‘daños de frío’ al menos durante los 30 días que duró el almacenamiento, aunque presentaron daños de senescencia ligeros, que no se observaron en los frutos no acondicionados almacenados a 2 °C. Cabe señalar que en los frutos tratados con esta mezcla y almacenados a 2 y 12 °C, el parámetro a/b, que indica un cambio de color hacia tonalidades más amarillas, se redujo en aproximadamente un 20 y un 30% respecto a los frutos tratados con agua, en un caso y en otro (Figura 28). Estos resultados podrían reflejar una degradación de carotenoides, que se ha utilizado como indicador de estrés oxidativo.

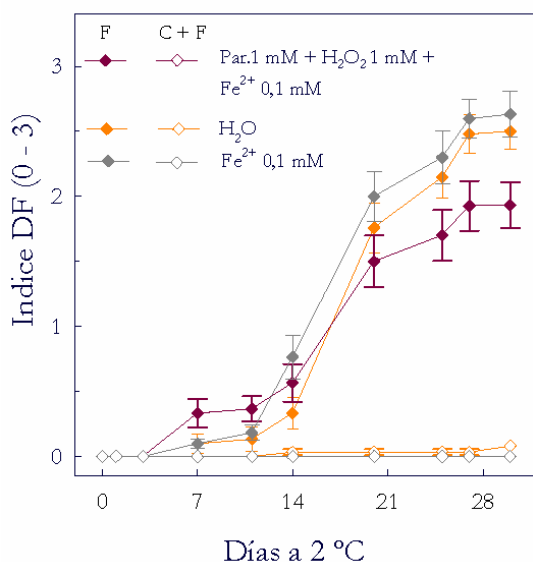


Figura 27: Efecto de la aplicación de una mezcla de paracuat (par) 1 mM + H_2O_2 1 mM + Fe^{2+} 0,1 mM (\blacklozenge \diamond) en la susceptibilidad al frío de frutos de mandarina ‘Fortune’. Como controles se emplearon frutos tratados con H_2O (\blacktriangle \diamond) y con Fe^{2+} 0,1 mM (\blacktriangle \diamond). Los frutos sometidos a dichos tratamientos se almacenaron directamente a 2 °C (F) o se acondicionaron de forma previa al almacenamiento en frío (C+F).

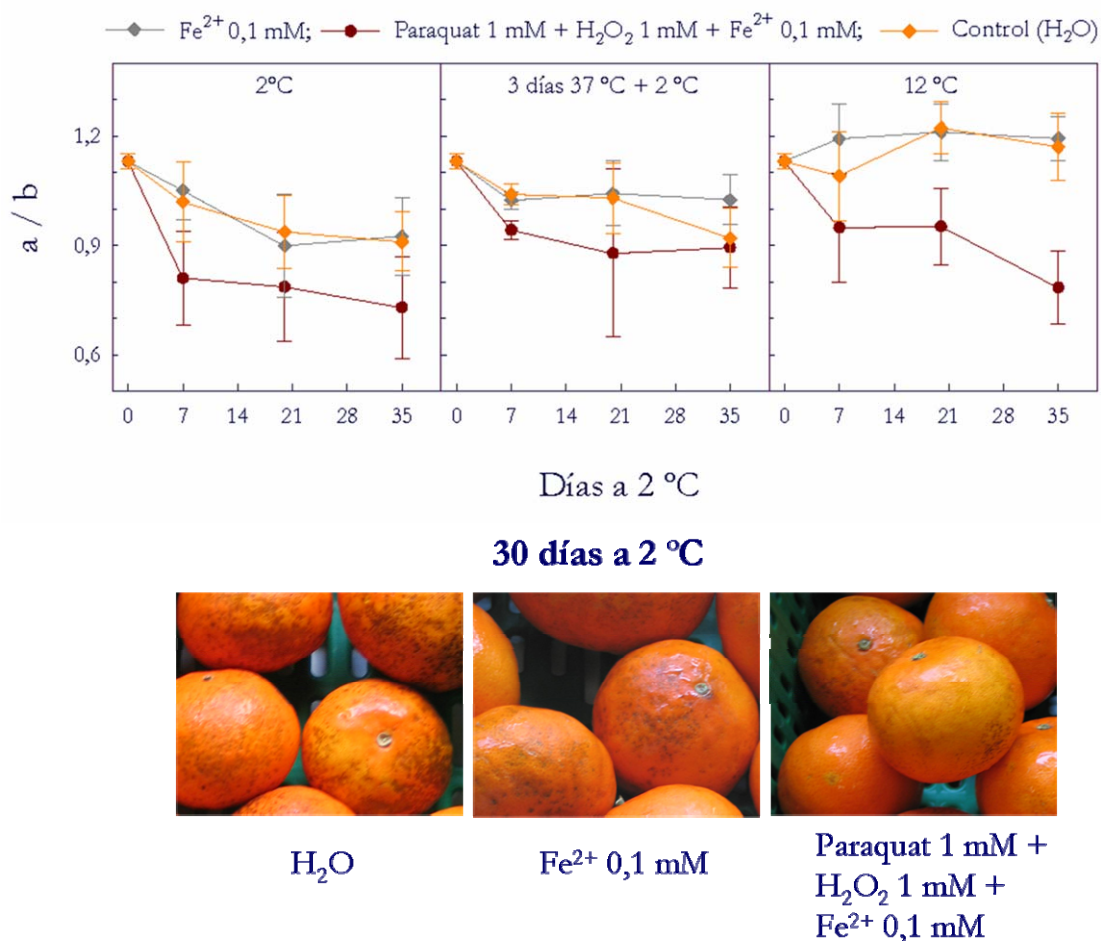


Figura 28: Efecto del tratamiento con la mezcla paraquat 1 mM + H_2O_2 1 mM + Fe^{2+} 0,1 mM (●) en el parámetro a/b de medida del color en frutos de mandarina ‘Fortune’ almacenados a 2 y 12 °C, inmediatamente después de ser cosechados, y en mandarinas almacenadas a 2 °C después de ser acondicionadas durante 3 días a 37 °C. Como controles se emplearon frutos tratados con H_2O (●) y con Fe^{2+} 0,1 mM (●).

El efecto protector frente al frío del tratamiento paraquat + H_2O_2 + Fe^{2+} se confirmó en una segunda experiencia con frutos cosechados un mes más tarde, que presentaron una susceptibilidad muy inferior al frío con respecto a los frutos utilizados en el primer experimento (Figura 29). Utilizando las mismas concentraciones que en el experimento anterior, se comprobó cómo en este caso dicho tratamiento reducía notablemente la incidencia de ‘daños de frío’. Así, después de 60 días de almacenamiento a 2 °C, el índice de ‘daños de frío’ de los frutos expuestos a este tratamiento fue muy bajo y aproximadamente 3 veces inferior al de los frutos tratados con agua. La eficacia de este tratamiento fue similar a la encontrada al evaluar el efecto de la combinación de paraquat y H_2O_2 , en ausencia de Fe^{2+} , o del paraquat 1 mM. Estos tratamientos también redujeron 3 veces el índice de ‘daños de frío’ después de 60 días de almacenamiento (Figura 29A). La eficacia de la mezcla paraquat + H_2O_2 + Fe^{2+} y de paraquat + H_2O_2 fue similar a lo largo de todo el periodo de almacenamiento y superior a la del paraquat 1 mM ya que ambas mezclas frenaron o retrasaron en mayor medida el desarrollo de ‘daños de frío’ que el paraquat ‘per sé’. En este mismo experimento, se comprobó además que la eficacia de la mezclas paraquat + H_2O_2 + Fe^{2+} y de paraquat + H_2O_2 no mejoraba al aumentar la concentración del paraquat y del H_2O_2 desde 1 (Figura 29A) hasta 10 mM (Figura 29B). Del

mismo modo, se confirmó que al aumentar la concentración de paraquat no aumentaba su eficacia reduciendo los ‘daños de frío’. Además de utilizar frutos control tratados con agua, en este experimento se utilizaron frutos tratados con la sal $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 mM como un control adicional en el estudio del efecto de la mezcla paraquat + H_2O_2 + Fe^{2+} . En este caso, se observó que el Fe^{2+} reducía la incidencia de ‘daños de frío’ con respecto a los frutos tratados con agua pero en mucha menor medida que dicha mezcla a las dos concentraciones de paraquat y H_2O_2 estudiadas. En ambos casos, el tratamiento con este sistema de inducción de estrés oxidativo no provocó la aparición de ‘daños de frío’, aunque sí favoreció la aparición de otros daños en la piel asociados con la senescencia, en los frutos curados y almacenados a 2 °C y en los frutos almacenados a 12 °C (Figura 30).

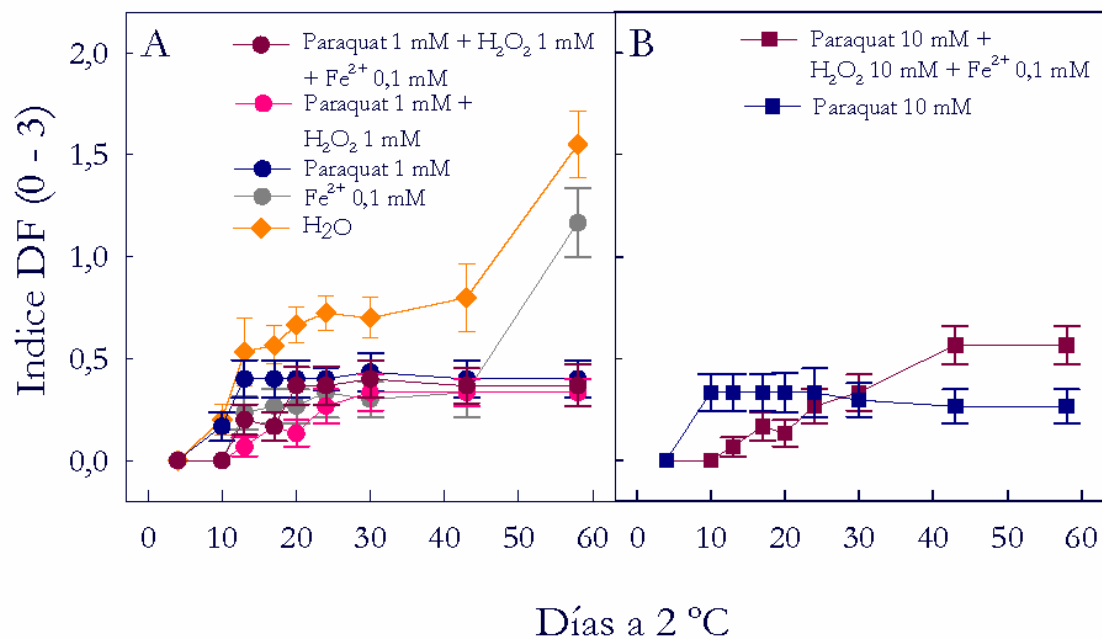


Figura 29: Efecto de la aplicación de un tratamiento que favorece la inducción de especies activas de oxígeno (ROS) en la incidencia de ‘daños de frío’ en frutos de mandarina ‘Fortune’ almacenados 60 días a 2 °C. (A) Frutos tratados con paraquat 1 mM + H_2O_2 1 mM + Fe^{2+} 0,1 mM (●), paraquat 1 mM (●), paraquat 1 mM + H_2O_2 1 mM (●), Fe^{2+} 0,1 mM (●) y agua (◆); (B) Frutos tratados con paraquat 10 mM + H_2O_2 10 mM + Fe^{2+} 0,1 mM (■), paraquat 10 mM (■).

Frutos no acondicionados
50 días 2 °C



Paraquat 1 mM +
H₂O₂ 1 mM +
Fe²⁺ 0,1 mM

Frutos acondicionados



1 días 37 °C 2 días 37 °C 3 días 37 °C 3 días 37 °C +
50 días 2 °C

Figura 30 Detalle de la sintomatología de los daños en la piel en frutos de mandarina 'Fortune'. (A) Frutos tratados con paraquat 1 mM + H₂O₂ 1 mM + Fe²⁺ 0,1 mM almacenados 50 días a 2 °C; (B) Frutos tratados con paraquat 1 mM + H₂O₂ 1 mM + Fe²⁺ 0,1 mM a lo largo del tratamiento de acondicionamiento térmico, y almacenados 50 días a 2 °C después del curado.

2. ESTUDIO TRANSCRIPTÓMICO DE LOS MECANISMOS IMPLICADOS EN LA TOLERANCIA AL ‘COLAPSO DE LA CORTEZA’ INDUCIDA POR EL ACONDICIONAMIENTO CON ETILENO EN FRUTOS DE NARANJA ‘NAVELATE’.

2.1. Efecto del etileno en la disminución de la incidencia del ‘colapso de la corteza’ en naranjas ‘Navelate’.

a) Evaluación de los daños en la piel por ‘colapso de la corteza’:

Los resultados obtenidos al evaluar la incidencia del ‘colapso de la corteza’ en frutos de naranja ‘Navelate’ cosechados en dos campañas diferentes y almacenados a 22 °C y a HR próximas a la saturación (90-95%), para minimizar su deshidratación, pusieron de manifiesto que los frutos maduros de esta variedad desarrollan dicha alteración independientemente de las condiciones climáticas a las que hubiesen estado expuestos antes de ser cosechados. Así, ésta se produjo tanto en frutos cosechados después de periodos secos (HR inferiores al 40%) (campaña 2) como en los expuestos a HR próximas al 80% (campaña 1), aunque en ningún caso los frutos se cosecharon después de vientos fuertes y secos (datos no mostrados). Asimismo, el acondicionamiento de los frutos de ambas campañas durante 4 días con una concentración de etileno de 10 $\mu\text{L L}^{-1}$ redujo la incidencia del ‘colapso de la corteza’, observándose al final del almacenamiento en ambos casos un índice de daño inferior a 0,5. Además, en todos ellos se comprobó que la aplicación de 1-MCP potenciaba dicha alteración. Así, en las dos campañas, los frutos expuestos a 1-MCP presentaron tras 14 días de almacenamiento un ICC próximo a 2,0 mientras que en los frutos control, almacenados continuamente en aire, éste fue inferior a 1,0. (Figura 31).

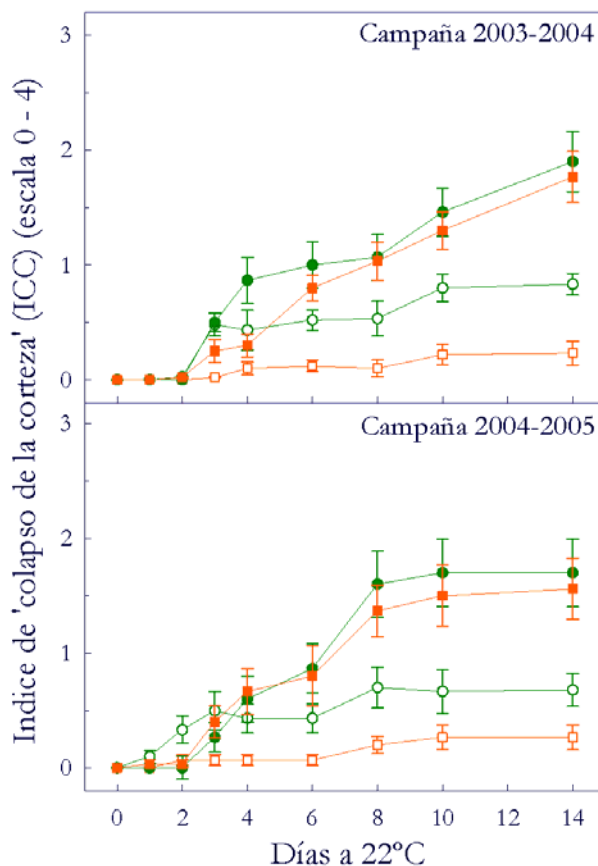


Figura 31: Evolución del ‘colapso de la corteza’ en naranjas ‘Navelate’ cosechadas a principios de marzo y almacenadas 1) continuamente en aire (○); 2) tratadas 4 días con 10 $\mu\text{L L}^{-1}$ de etileno a 22 °C y posteriormente transferidas a aire a la misma temperatura (□); 3) tratadas 14 h con 1-MCP (1 $\mu\text{L L}^{-1}$) a 22 °C y transferidas inmediatamente a aire a la misma temperatura (●); 4) tratadas 14 h con 1-MCP (1 $\mu\text{L L}^{-1}$) a 22 °C, luego 4 días con 10 $\mu\text{L L}^{-1}$ de etileno a 22 °C y por último transferidas a aire a la misma temperatura (■). La HR fue constante y del 90-95% durante todo el periodo de almacenamiento en todas las condiciones de estudiadas.

2.2. Estudio de los cambios de expresión génica mediante empleo de micromatrices de cDNA asociados al efecto protector del etileno reduciendo la incidencia del ‘colapso de la corteza’.

En el estudio de los cambios en el transcriptoma en respuesta al tratamiento con etileno y/o MCP se analizó la expresión del conjunto de genes reunidos en la micromatriz ‘12K’ en frutos: 1) recién traídos de campo (RTC); 2) almacenados 4 días en aire; 3) tratados 4 días con 10 $\mu\text{L L}^{-1}$ de etileno; 4) tratados 14 h con 1 $\mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP y después almacenadas 4 días en aire; 5) almacenadas 14 días en aire; 6) tratados 4 días con 10 $\mu\text{L L}^{-1}$ de etileno y después almacenadas 14 días en aire; 7) tratados 14 h con 1 $\mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP y después almacenadas 14 días en aire. En todos los casos, el análisis transcriptómico se llevó a cabo a los 4 y 14 días de almacenamiento en los dos tejidos que constituyen la corteza del fruto, el flavedo y el albedo, de forma independiente. Se analizaron tres réplicas biológicas, una a partir de frutos recolectados en la campaña 2003-2004 y dos en la campaña 2004-2005 pero procesados de forma independiente. Como referencia común, se empleó una mezcla de RNA procedente de flavedo y albedo de frutos sometidos a cada una de las situaciones de estudio descritas (Figura 32).

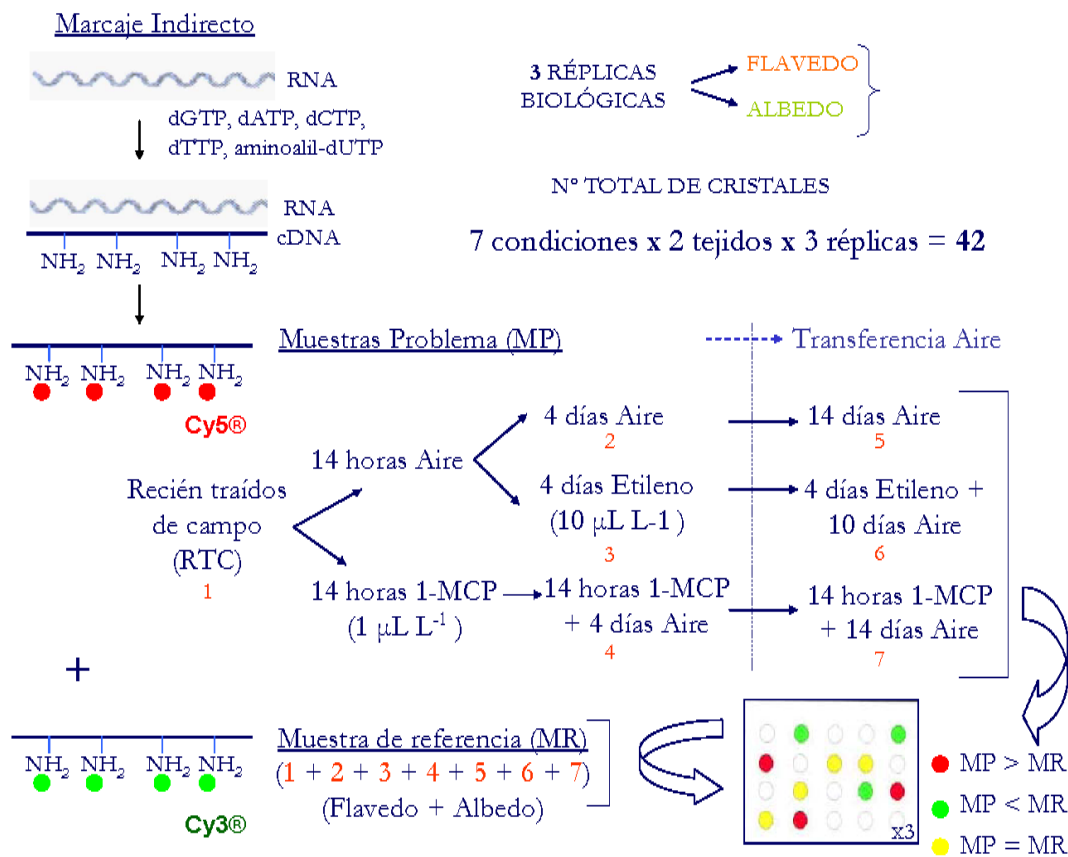


Figura 32: Diseño Experimental del análisis de los cambios de expresión mediante el empleo de la micromatriz ‘12K’. El marcaje se realizó indirectamente para asegurar una misma eficacia entre ambos fluoróforos. En las hibridaciones, la muestra problema correspondiente a cada una de las 7 situaciones estudiadas se marcó con el fluoróforo Cy5 y la muestra de referencia, formada por una mezcla equitativa de todas las muestras evaluadas, con el fluoróforo Cy3. En cada una de las condiciones analizadas el flavedo y el albedo se estudiaron de forma separada y se utilizaron 3 réplicas biológicas.

El análisis estadístico de los resultados de hibridación con la micromatriz '12K' reveló un total de 1970 genes en el flavedo y 3899 en el albedo expresados diferencialmente en respuesta a al menos una de las condiciones estudiadas con respecto a los niveles iniciales correspondientes a los frutos RTC, lo que representa un 18 y un 35% del total de genes reunidos en dicha micromatriz, respectivamente. Estos datos reflejan que el albedo es el tejido que mostró mayor número de cambios significativos en la expresión génica, comprobándose además este hecho en todas las situaciones estudiadas.

En respuesta al tratamiento de 4 días con etileno, el número de genes inducidos en ambos tejidos fue mayor al de genes reprimidos. Por el contrario, en los frutos expuestos a 1-MCP y almacenados 4 días en aire el número de genes que aumentaron su expresión en el flavedo y albedo fue reducido y mucho menor al de genes reprimidos (Figura 33). En relación a las respuestas comunes de inducción, representadas en las áreas de intersección de los círculos de los diagramas de Venn, a 4 días destacan 122 genes inducidos en el albedo de los frutos acondicionados con etileno y de los controles mantenidos en aire. Por otro lado, el número de genes que disminuyeron su expresión a los 4 días de almacenamiento en respuesta al etileno o a la combinación de 1-MCP y aire fue similar en el flavedo mientras que en el albedo éste fue mayor en los frutos recién acondicionados con la hormona. (Figura 33).

A los 14 días de almacenamiento, el mayor número de respuestas de inducción lo presentaron los frutos que habían sido expuestos a 1-MCP, fundamentalmente en el albedo, donde se encontraron un total de 1.927 genes. Estos mismos frutos fueron los que presentaron el mayor número de represiones tanto en el flavedo (474 genes) como en albedo (1.330) (Figura 33).

El conjunto de estos resultados indica que la aplicación de 1-MCP tuvo más bien un efecto represor que inductor en los frutos almacenados 4 días en aire con respecto a los niveles iniciales de los frutos RTC, mientras que en los frutos tratados con etileno antes de la transferencia a aire predominaron las respuestas de inducción. Al final del almacenamiento los mayores cambios, tanto en inducción como en represión, se observaron en los frutos tratados con 1-MCP.

En la Figura 34 se representa la evolución de los cambios diferenciales a tiempos cortos y largos en cada una de las situaciones analizadas. En respuesta al etileno, un 84% (481 genes) y un 63% (565 genes) de los genes inducidos en el flavedo y albedo, respectivamente, lo hicieron de forma transitoria al acabar el periodo de acondicionamiento. Únicamente 41 genes en el flavedo y 136 en el albedo presentaron mayor expresión durante todo el periodo de almacenamiento. Aunque en estos frutos el mayor número de represiones en el flavedo y albedo también se observó antes de la transferencia a aire, en este caso las diferencias entre 4 y 14 días no fueron tan marcadas. Por el contrario, en los frutos expuestos a 1-MCP y almacenados en aire, más del 90% de las respuestas de inducción en ambos tejidos se produjeron al final del almacenamiento. Asimismo, la gran mayoría de los genes que disminuyeron su expresión en el albedo de estos frutos tratados con 1-MCP lo hicieron a tiempos largos (>80%), mientras que sólo un 8% de ellos se reprimieron a los 4 días (111 genes) y un 10% (145 genes) mantuvo sus niveles reducidos hasta el final del almacenamiento en aire. En el flavedo, sin embargo, el número de genes reprimidos a los 4 y 14 días de almacenamiento fue similar y un 14% (104 genes) fueron comunes a ambos tiempos.

En resumen, el conjunto de los resultados de este análisis puso de manifiesto que en ambos tejidos el mayor número de cambios en la expresión génica se produjo inmediatamente después del acondicionamiento con etileno (4 días $10 \mu\text{L L}^{-1}$) y a los 14 días de almacenamiento en aire en los frutos que habían sido tratados con 1-MCP, que fueron los que presentaron el mayor ICC (Figura 34). Así, se observaron alrededor de 900

genes en el flavado (55% inducidos y 45% reprimidos) y 1200 genes en el albedo (57% inducidos y 43% reprimidos) que mostraron cambios significativos en el nivel de acumulación relativa de sus transcritos en respuesta al etileno exógeno, y del orden de 800 genes en flavado (53% inducidos y 47% reprimidos) y de 3200 en el albedo (59% inducidos y 41% reprimidos), en el segundo caso.

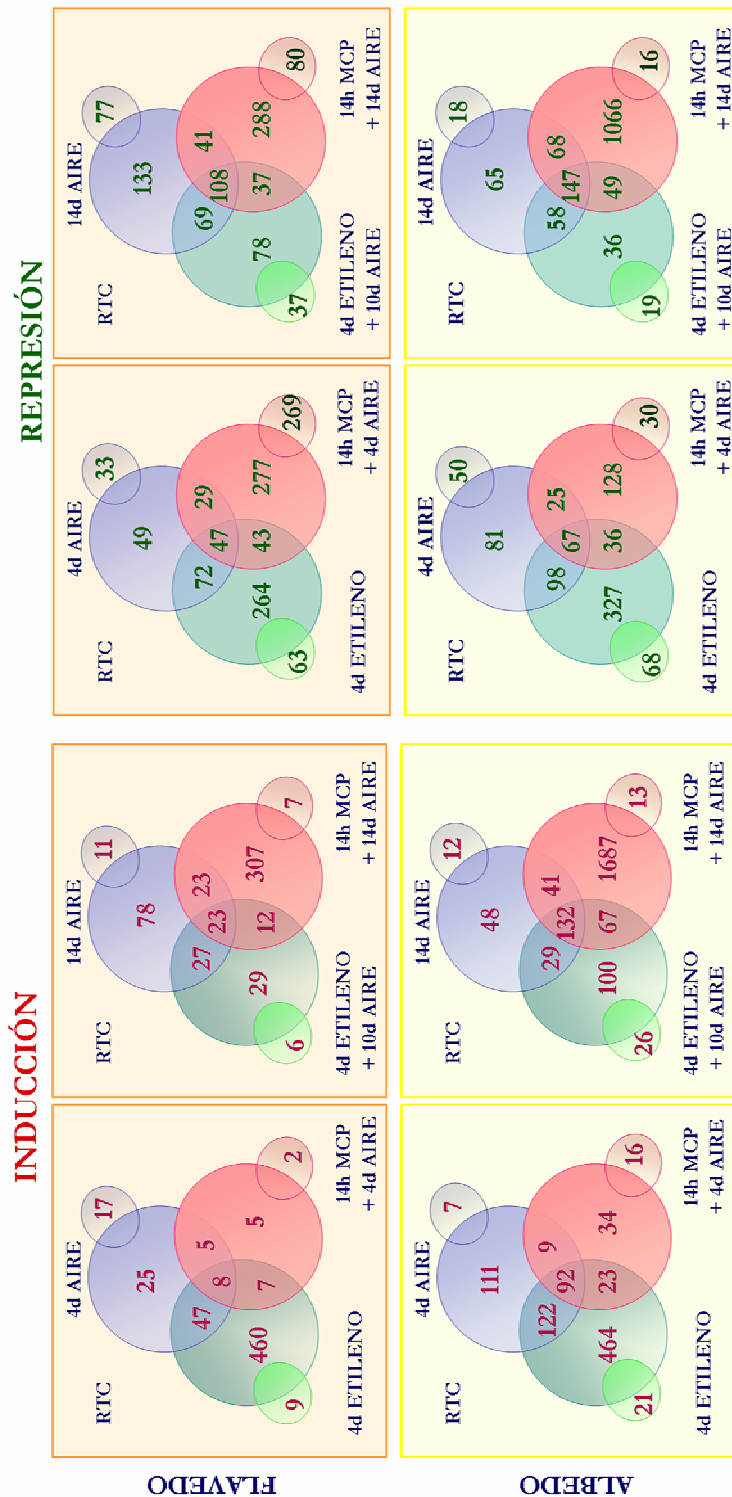


Figura 33: Diagramas de Venn que muestran el número de genes con expresión diferencial significativa (SAM, FDR < 1%) en el flavado y albedo de frutos de naranja 'Navelate' almacenados 10 días en aire (Aire); 2) acondicionados 4 días con 10 $\mu\text{L L}^{-1}$ de etileno (4d Etileno) y posteriormente almacenados 14 días en aire (4d Etileno + 10 d Aire); 3) tratados durante 14 h con 1 $\mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP y almacenados posteriormente en aire (14h MCP + 4d Aire ó 14d Aire). Las comparaciones se realizan con los niveles observados en los frutos recién traídos de campo (RTC). Se analiza de forma separada las respuestas de inducción (●) y de represión (●) y de represión específica en cada una de las situaciones estudiadas. Los círculos periféricos representan el número de genes que mostraron una expresión o represión específica en cada una de las situaciones estudiadas.

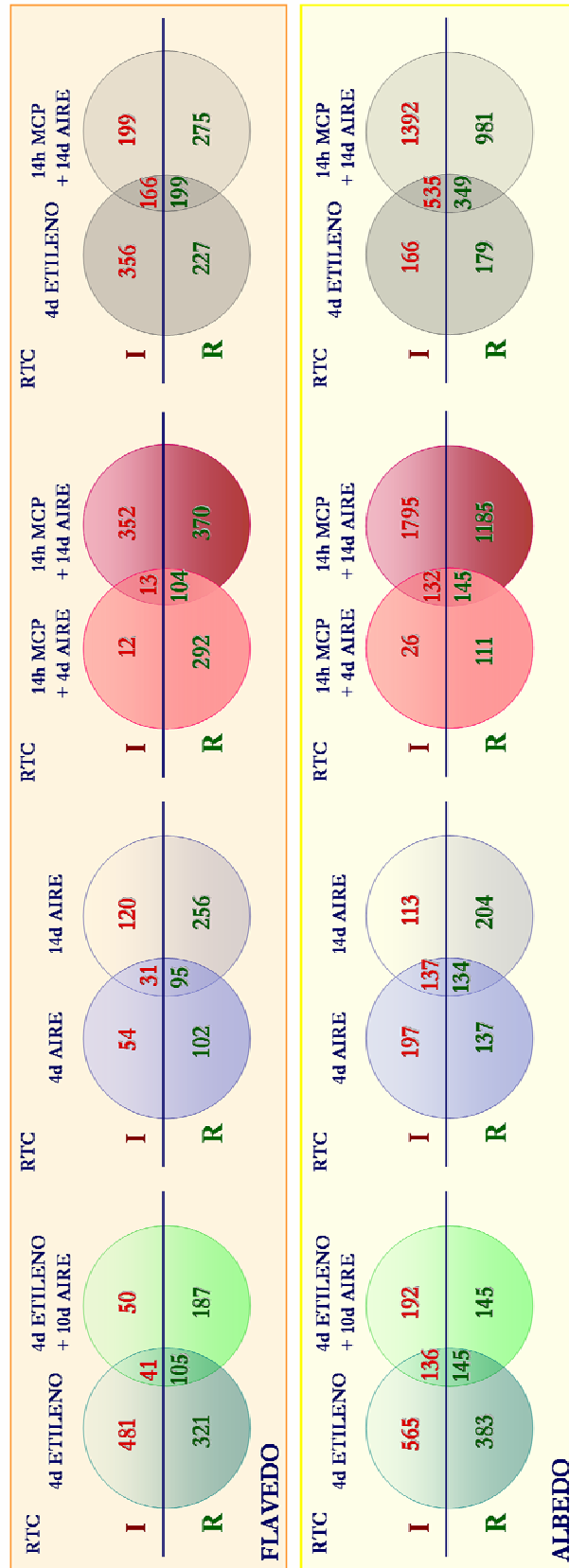


Figura 34: Estudio temporal del número de genes que mostraron cambios significativos de expresión (SAM, FDR<1%) en el flavedo y albedo de frutos de naranja ‘Navelate’ sometidos a diversas condiciones de almacenamiento. En las áreas de intersección de los diagramas de Venn se indica el número de genes inducidos (●) o reprimidos (●) a los 4 días en respuesta al etileno, a aire y a la combinación de 1-MCP y aire cuya expresión no varió durante el resto del almacenamiento en aire (Ver detalles en la Figura 33).

Del estudio de la especificidad de respuesta en los frutos tratados 4 días con etileno, es decir, de aquellos genes solamente detectados en dichos frutos pero no en los frutos RTC ni en los expuestos o no a 1-MCP y almacenados en aire, se detectaron 9 genes en el flavedo y 21 en el albedo, aunque solamente fueron 4 y 10 los que presentaron homología con genes de *A. thaliana* o con función conocida, respectivamente (Figura 33 y Tabla 23-1). Entre ellos, se encontró uno en el flavedo que codifica una proteína Skp1 (At5g42190) que junto a la culina 1 forma parte del complejo 'SCF-type E3 ubiquitin ligase', necesario para marcar proteínas destinadas a degradación por el proteasoma 26S. En el albedo, tres codifican una catecol OMT (At5g54160), una invertasa de pared celular (At3g13790) y una palmitoil tioesterasa (At3g60340), encargada de liberar el grupo acil-CoA del ácido para su utilización en el ciclo de Krebs y la β -oxidación. La expresión de este último, tampoco se detectó a los 14 días de almacenamiento en ninguna situación, incluyendo los frutos acondicionados con dicha hormona. Otros en cambio, como el gen que codifica una glucosiltransferasa 2 (At1g22370) u otro correspondiente a un precursor de citocromo c1 (At5g40810), se indujeron a los 14 días en los frutos inicialmente tratados con 1-MCP. Por otro lado, entre los genes únicamente expresados en los frutos tratados con 1-MCP y almacenados 4 días en aire (Tabla 23-2), destacan en el albedo dos genes que codifican una proteína transmembrana de transporte 'emp24' (At3g07680) y una proteína similar a la proteína argonauta del complejo RISC ('RNA-induced silencing complex') (At2g27880) cuya expresión no se detectó a los 14 días de almacenamiento en ninguna de las tres situaciones estudiadas. Sin embargo, algunos genes, como dos que codifican un transportador ABC (At4g04770) y un factor de elongación EF-1-alpha del citoesqueleto (At5g60390) fueron igualmente expresados en este tejido y tipo de frutos al final del almacenamiento.

La aplicación de 1-MCP en los frutos almacenados posteriormente 4 días en aire tuvo más un efecto represor que inductor (Figura 33), coincidiendo con el momento en que se produjo el aumento brusco en el desarrollo del 'colapso de la corteza' (Figura 31). Así, se encontraron un total de 396 genes en el flavedo y 256 en el albedo cuya expresión se redujo específicamente en estos frutos con respecto a los frutos RTC (Figura 33). Entre ellos, se encontraron genes que codifican proteínas de función muy diversa incluyendo enzimas del estrés oxidativo, proteínas de respuesta de defensa a hongos, como proteínas inhibitoras de endoglucanasas (At1g03220), y diversos factores de transcripción, como un HSF8 (At4g17750) o un MYB (At2g21650). Otros, codifican proteínas ribosomales, de inicio de la traducción, como el factor 5A (At1g13950) que se ha relacionado con la senescencia en plantas, y proteínas tipo quinasa. Asimismo, se encontraron 269 genes en el flavedo y 30 en el albedo cuya expresión no fue detectada a los 4 días en los frutos tratados con 1-MCP (Figura 33). En el flavedo, se encontraron genes que codifican proteínas ribosomales y otras de estrés oxidativo, como diversas PODs. Otros codifican proteínas del metabolismo de fenilpropanoides, como una flavonona 3-hidroxisilasa o una cinamil CoA reductasa, o enzimas de pared celular y de degradación de lípidos, como una PLA₂ que no varió su expresión en resto de condiciones analizadas (Fichero Excel 'Navelate'). En el conjunto de reprimidos en los frutos tratados con 1-MCP almacenados 4 días en aire, un total de 4 genes en el flavedo y 21 en el albedo se indujeron en respuesta al tratamiento con etileno en los frutos recién acondicionados antes de su transferencia a aire (Tabla 24). Así, además de genes que codifican proteínas sin homología en *A. thaliana* o de función desconocida, se identificaron genes que codifican UDP-glucosiltransferasas, una SPS, una proteína rica en residuos de glicina e hidroxiprolina implicada en refuerzo de pared celular (unigen C05068B07) y dos genes del metabolismo de fenilpropanoides que codifican una PAL y una reductasa del éster del ácido fenilcumaran, implicada en la biosíntesis de lignanos. Además, se identificaron otras de respuesta a estrés como dos

fosfatasa y una lipasa. Por otro lado, se analizó la expresión de los genes que se indujeron a los 4 días en los frutos tratados con 1-MCP y que por el contrario, se reprimieron en los acondicionados con etileno. Sin embargo, no se encontró ninguno en el flavedo y solamente 1 en el albedo que codifica una enzima constituyente del complejo OEC (del inglés ‘oxygen-evolving complex’) del fotosistema II implicado en la oxidación de agua para proporcionar protones dirigidos al fotosistema I.

Tabla 23: Genes con homología en *A. thaliana* y de función conocida que a los 4 días de almacenamiento se expresaron específicamente en el flavedo (A) o en el albedo (B) de los frutos recién acondicionados con etileno (1) o tratados 14 h con 1-MCP y almacenados en 4 días en aire (2).

1) 4 días Etileno				2) 14 horas 1-MCP + 4 días Aire			
A) FLAVEDO				A) FLAVEDO			
Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>		Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	
Ssp1 [<i>Medicago sativa</i>]	6570	At5g42190		Prot. de unión a DNA [<i>Danais carota</i>]	2681	At5g65310	
Prot. 11 del complejo T [<i>A. thaliana</i>]	C18018H11	At1g22930					
Pre-mRNA 'splicing factor', probable [<i>A. thaliana</i>]	C08031F08	At3g49430					
GST [<i>A. thaliana</i>]	6741	At1g10360					
B) ALBEDO				B) ALBEDO			
Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>		Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	
Prot. con dominios PPR (pentatricopeptide repeat) [<i>A. thaliana</i>]	C18016G10	At2g26790		Prot. de la familia 'emp24/gp25L/p24' [<i>A. thaliana</i>]	C06003B09	At3g07680	
Prot. precursora de citocromo c1 [<i>Solanum tuberosum</i>]	2619	At5g40810		EF-1 alpha [<i>Oryza sativa</i>]	6973	At5g60390	
Prot. 'transformer-2 alpha' / activadora de MAPK, probable	C08018G05	At3g08000		Glioxilato oxidasa, probable [<i>Vitis vinifera</i>]	4692	At3g14420	
Prot. activadora de GTPasa, probable [<i>A. thaliana</i>]	C05054H09	At4g21160		Prot. asociada a receptor, probable [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)]	C31707A03	At3g63310	
Prot. palmitoilil tioesterasa, probable [<i>Tropaeolum majus</i>]	C20006F06	At3g60340		Prot. similar a 'Argonaute'	C08021G10	At2g27880	
Prot. reguladora de citoquinesis, probable [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)]	4663	At1g21010		Transportador ABC 1 [<i>A. thaliana</i>]	4532	At4g04770	
Prot. con dominio SPX (SYG1/Pho81/XPR1) [<i>A. thaliana</i>]	4543	At2g26660		Cinamil CoA-reductasa [<i>A. thaliana</i>]	C34002H12	At2g33590	
Catecol OMT (EC 2.1.1.6) III - common: tobacco	5970	At5g54160					
Invertasa de pared celular [<i>Fragaria x ananassa</i>]	6660	At3g13790					
Glucoamiltransferasa 2 [<i>Vigna angularis</i>]	C34100E07	At1g22370					

Tabla 24: Listado de genes que se indujeron a los 4 días en los frutos tratados con etileno y se reprimieron en los tratados 14 h con 1-MCP almacenados en aire (1) o viceversa (2). Los valores de expresión de las comparaciones realizadas respecto a los frutos RTC se expresan en escala logarítmica en base 2 (Log₂). (●): inducción; (●): represión. (+): ausencia de valor de expresión en el primer término de la comparación que corresponde a los frutos RTC; (-): ausencia de valor de expresión en el segundo término de la comparación.

1) ↑ 4 días Etileno - ↓ 14 horas 1-MCP + 4 días Aire

			A) FLAVEDOS											
Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	4 días			14 días								
			Aire		Etileno		1-MCP		Aire		Etileno		1-MCP	
			F	A	F	A	F	A	F	A	F	A	F	A
Prot. función desconocida [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)]	C03003E07	At1g16720	0.5	1.4	1.0	1.8	-0.8	-0.5	-0.2	-0.3	-0.3	-0.1	1.0	0.7
Prot. similar a hsr203J [<i>Lycopersicon esculentum</i>]	5868	At5g06570	0.4	1.3	0.9	1.6	-0.9	-0.5	-0.2	-0.3	-0.3	-0.1	1.1	0.9
Metionina adenosiltransferasa (EC 2.5.1.6)	C08030G11	At4g01850	0.3	+	0.6		-	+	-0.1	+	0.0	+	0.0	+
Prot. no homóloga en <i>A. thaliana</i>	3838	-	0.0	0.4	0.3	0.6	-0.6	-0.6	-0.6	0.0	-0.6	-0.2	-0.3	-0.7

			B) ALBEDOS											
Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	4 días			14 días								
			Aire		Etileno		1-MCP		Aire		Etileno		1-MCP	
			F	A	F	A	F	A	F	A	F	A	F	A
OSJNBa0051H17.28 [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)]	C05068B07	At3g16030	-	0.0	-	2.9	0.0	-	-	-	-	-	-	-
Prot. no homóloga en <i>A. thaliana</i>	6674	-	0.8	0.4	1.7	2.1	-0.2	-	0.8	0.5	1.1	0.5	1.6	2.4
Prot. transportadora de sulfatos [<i>Brassica oleracea</i>]	C19008G08	At3g51895	0.2	1.1	0.8	1.5	-1.4	-0.8	-1.4	-0.5	-2.1	-0.9	0.6	0.4
Prot. L-treonina aldolasa F22O13.11 [<i>A. thaliana</i>]	C08036F01	At1g08630	-0.6	0.6	-0.1	1.4	-1.8	-1.5	-2.4	-1.5	-2.4	-1.9	0.0	-0.2
P0031D11.2 [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)]	2484	At3g55240	0.1	1.8	0.1	1.4	-1.6	-1.3	-1.2	0.1	-2.1	-0.5	0.6	-0.5
Prot. fosfatasa 2C, nódulo [<i>Lotus japonicus</i>]	2477	At5g59220	0.2	0.8	0.9	1.3	-1.4	-1.5	-4.5	-	-0.8	-0.4	-0.7	-0.9
Sacarosa fosfato sintasa, probable [<i>A. thaliana</i>]	1609	At4g10120	-0.3	0.4	0.9	1.1	-1.2	-1.8	-1.4	-0.8	-1.0	-1.0	0.5	-1.4
Estenasa inducible por etileno [<i>Citrus sinensis</i>]	7124	At2g23620	-0.5	-1.0	1.8	1.1	-2.5	-2.2	-2.2	-2.3	-1.6	-1.7	0.1	-0.3
UDP-glucoronosil/UDP-glucosil transferasa	6620	At3g11340	0.0	0.7	0.5	1.1	-1.6	-1.7	-0.8	-0.7	-1.1	-0.6	0.0	-0.4
Prot. no homóloga en <i>A. thaliana</i>	2257	-	-0.5	-0.4	0.5	1.1	-0.4	-0.8	-1.5	-0.9	-0.6	-0.9	-0.7	0.0
UDP-glucoronosil/UDP-glucosil transferasa	C01003C04	At3g11340	0.4	0.3	0.8	1.0	-0.6	-0.8	-0.1	-0.3	-0.1	-0.4	0.3	-0.1
Prot. no homóloga en <i>A. thaliana</i>	C34009E05	-	0.1	-0.2	0.8	1.0	-0.7	-2.0	-0.9	-1.6	-0.8	-1.9	-1.0	-1.9
Fosfoinositido fosfatasa [<i>A. thaliana</i>]	3496	At3g14205	0.2	0.7	0.7	0.9	-1.4	-0.7	-	-0.3	-	-	0.4	0.0
Prot. hidrolasa α/β [<i>A. thaliana</i>]	1346	At3g50440	-0.2	-0.5	1.6	0.9	-1.5	-1.2	-1.4	-1.0	-1.0	-0.7	0.1	0.0
Reductasa del ester del ácido fenilcumaran benílico, similar a F1	C01005G12	At1g75280	0.2	0.4	0.7	0.8	-0.4	-0.9	-0.5	-0.7	-0.5	-0.7	0.9	-0.1
TPA (phytosulfokine peptide precursor), probable [<i>Glycine max</i>]	6688	At3g44735	0.2	0.0	0.5	0.8	-0.9	-1.1	-0.6	-0.8	-0.5	-0.4	0.0	-0.1
Prot. no homóloga en <i>A. thaliana</i>	C19008H11	-	0.2	0.0	0.5	0.8	-1.0	-0.9	-0.6	-0.7	-0.6	-0.4	0.0	-0.1
PAL [<i>Citrus clementina</i> x <i>Citrus reticulata</i>]	6764	At2g37040	0.2	0.4	0.4	0.8	-	-	-0.4	-	-0.2	-	0.2	0.4
Prot. no homóloga en <i>A. thaliana</i>	3838	-	0.0	0.4	0.3	0.6	-0.6	-0.6	-0.6	0.0	-0.6	-0.2	-0.3	-0.7
Prot. no homóloga en <i>A. thaliana</i>	4924	-	0.8	-0.4	1.1	0.5	-0.8	-1.9	0.1	-2.0	0.6	-1.1	0.4	-2.1
Prot. función desconocida	4943	At5g51180	-0.6	-0.6	0.6	0.4	-1.0	-0.8	-1.2	-1.0	-1.1	-0.9	-0.3	0.0

2) ↓ 4 días Etileno - ↑ 14 horas 1-MCP + 4 días Aire

			B) ALBEDOS											
Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	4 días			14 días								
			Aire		Etileno		1-MCP		Aire		Etileno		1-MCP	
			F	A	F	A	F	A	F	A	F	A	F	A
OEE1 ('Oxygen-evolving enhancer protein 1'), cloroplasto	7177	At3g50820	-0.9	-0.5	-1.6	-1.3	0.1	0.5	0.1	0.4	0.1	0.8	-1.5	-0.5

Asimismo, podrían ser igualmente interesantes aquellos genes que aumentaron su expresión al final del almacenamiento en los frutos que presentaron ‘colapso de la corteza’, no acondicionados con etileno, expuestos o no de forma previa al almacenamiento a 1-MCP, con respecto a RTC (14 días Aire y 14 h 1-MCP + 14 días Aire). Este conjunto de genes se detallan en las Tabla 56 y Tabla 57 incluidas en el anexo III. Cabe destacar la presencia de 3 genes que codifican dos enlongasas de ácidos grasos (At2g28630 y At1g01120) y una lisofosfolipasa (At2g38420) que se indujeron en el flavedo de ambos tipos de frutos dañados más de 3 veces, siendo dicho incremento claramente superior al de los frutos tratados con etileno. Asimismo, en este grupo se incluyen genes que se indujeron inmediatamente después del tratamiento con etileno aunque sus niveles no se mantuvieron después de la transferencia a aire como dos genes que codifican una proteína de transporte de azúcares (At5g41760) y una hidroquinona glucosiltransferasa (At4g01070). Con este mismo perfil, en el albedo se encontraron genes que codifican proteínas de funciones muy diversas como un gen que codifica un receptor quinasa LecRK relacionado con la respuesta a ácido salicílico (At2g37710), uno homólogo a una exostosa de pared celular (At5g04500) u otro similar a una OPDA reductasa OPR2 (At1g76690), implicada en la biosíntesis de ácido jasmónico.

Los genes que se indujeron en respuesta al tratamiento con etileno, antes de transferir los frutos a aire, que también lo hicieron en los frutos tratados con 1-MCP al final del almacenamiento podrían tener un papel protector en la reducción del daño en estos últimos, que fueron los que presentaron el mayor ICC. Alternativamente, dicha inducción en los frutos tratados con 1-MCP podría producirse como consecuencia del incremento en etileno que se origina en estos últimos (datos no mostrados) si se hubiesen sintetizado nuevos receptores. Por ello, se estudió más en detalle este conjunto de genes. Conviene señalar que algunos de ellos también se indujeron en los contraoles almacenados 4 días en aire aunque en general dicho incremento fue inferior al de los frutos tratados con etileno (Figura 34D). Entre los inducidos en el flavedo (Tabla 25) y en el albedo (Tabla 26) en ambos tipos de frutos, se observó un número elevado que codifican enzimas del metabolismo secundario implicados en la ruta de biosíntesis de fenilpropanoides. Así, entre los que presentaron mayor nivel de inducción en respuesta al etileno se encontraron 4 genes que codifican una hidroxicinamil transferasa (At5g48930), una catecol OMT (At5g54160), una OMT de ácido cafeico (At5g54160) y una cinamil alcohol deshidrogenasa (At5g19440), todos ellos inducidos al menos dos veces en ambos tejidos en respuesta a etileno. Sin embargo, dicha inducción fue mucho mayor a los 14 días en los frutos pretratados con 1-MCP, observándose en los tres primeros un incremento de al menos 8 veces respecto a RTC. Asimismo, se encontraron genes que codifican diversas proteínas relacionadas con el estrés oxidativo, como dos GSTs con homología al gen At2g29420 de *A. thaliana*, cuya inducción en el albedo de los frutos tratados con el inhibidor a los 14 días fue superior a 12 veces, u otras proteínas con actividad redox como una CPRD2 (At4g20820) o una nectarina 5 (At5g44360), que se indujo más de 8 veces en el albedo de los frutos recién acondicionados y más de 32 veces en el de los frutos tratados con 1-MCP al final del almacenamiento. Dentro de este grupo destaca además un gen que codifica una β -cianoalanina sintasa (At3g61440), implicada en la eliminación de cianida durante el proceso de biosíntesis de etileno, que se indujo en los dos tejidos y condiciones estudiadas pero fundamentalmente en el albedo de los frutos acondicionados con etileno (22 veces). Es interesante señalar que a los 4 días de almacenamiento, este gen también se indujo en el albedo de los controles, más de 16 veces, pero no en los tratados con 1-MCP. Con un perfil de expresión similar al anterior, se detectó un gen que codifica una proteína de la familia cupina (Atg07750), que participa en el metabolismo de azúcares y en la biosíntesis de la pared celular, cuya inducción en el albedo de los frutos recién

acondicionados y de los controles fue superior a 8 y 3 veces, respectivamente. Su expresión en los frutos tratados con 1-MCP y almacenados 4 días en aire disminuyó en ambos tejidos aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (SAM; FDR<1%).

En el grupo de genes cuya expresión disminuyó en los frutos acondicionados 4 días con etileno y en los almacenados 14 días en aire previamente expuestos a 1-MCP se encontraron genes muy diversos. Muchos de ellos, además, se reprimieron a los 4 días en los frutos control mantenidos en aire pero no en los tratados con 1-MCP. Entre los que más disminuyeron su expresión tanto en el flavedo (Tabla 27) como en el albedo (Tabla 28) en respuesta al etileno se encontraron 3 genes *COR15* y diversos genes que codifican enzimas del metabolismo de carbohidratos como proteínas CP12 y galactinol sintasas implicadas en la síntesis de polisacáridos de la familia rafinosa. Además, destacan 3 genes que codifican una subunidad del complejo de transporte intracelular de proteínas ‘clathrin adaptor’ (At4g24550), un precursor de una proteína OEE1 (del inglés ‘oxygen-environment enhancer protein 1’) del fotosistema II (At3g50820) y una proteína que participa en la síntesis de conjugados de IAA (At5g56650). Este último se reprimió al final del almacenamiento solamente en los frutos no acondicionados con etileno, expuestos o no a 1-MCP (Tabla 27). Por último, se encontró un gen que codifica una HSP (At4g27670) cuya expresión disminuyó más de 8 veces en el flavedo y albedo de los frutos expuestos a 1-MCP al final del almacenamiento. En general, el grado de disminución observado en respuesta a etileno en los frutos recién acondicionados en la mayoría de los genes incluidos en este grupo fue inferior al de los frutos expuestos a 1-MCP y almacenados 14 días en aire.

Tabla 25: Listado de los 30 primeros genes con mayor inducción en el flavedo de los frutos acondicionados 4 días con etileno y en los almacenados 14 días en aire después de tratarse con 1-MCP. Los genes se disponen en la tabla por orden de inducción en respuesta al etileno con respecto a los niveles correspondientes a los frutos RTC. Los valores logarítmicos (Log2) son el resultado de la comparación de los niveles de acumulación de los transcritos en cada condición de almacenamiento respecto a los valores iniciales de los frutos RTC. (●) inducciones; (●) represiones.

Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	FLAVEDO						ALBEDO					
			4 días			4 días + 10 días Aire			4 días			4 días + 10 días Aire		
			Aire	Etileno	I-MCP	Aire	Etileno	I-MCP	Aire	Etileno	I-MCP	Aire	Etileno	I-MCP
Prot. F26P21_130 [<i>A. thaliana</i>]	4241	At2g26080	1.69	3.28	-0.66	1.03	1.77	3.40	1.11	2.41	0.88	1.80	2.01	2.67
Prot. cupina [<i>A. thaliana</i>]	2220	At1g07750	1.25	3.27	-2.05	-0.70	-0.77	0.76	1.95	3.37	-0.96	0.71	0.27	0.80
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	4907	-	1.66	2.73	-0.25	1.13	1.80	2.79	1.07	2.96	-0.24	1.03	1.31	3.41
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	C08012E03	-	1.82	2.69	0.49	1.66	2.10	3.03	1.33	4.00	-0.39	1.91	1.98	4.28
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	1176	-	1.50	2.67	0.38	1.40	1.89	3.04	1.20	3.35	-0.40	1.34	1.45	3.95
Prot. dicianina [<i>Symplocos escententum</i>]	4496	At5g20230	0.48	2.49	-0.10	-0.35	0.67	2.05	0.02	1.56	1.18	0.20	0.43	2.96
Prot. cloroflase 1	5755	At5g43860	1.45	2.37	0.10	1.05	0.77	1.47	0.51	2.41	-0.06	0.27	0.20	0.51
β -cianoalanina sintasa [<i>Betula pendula</i>]	5206	At3g61440	1.66	2.18	-1.91	-0.95	-1.96	2.18	4.23	4.51	-1.49	0.89	0.66	2.92
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	648	-	1.09	2.16	-0.05	0.90	1.61	2.17	0.60	2.21	-0.34	0.52	0.62	2.45
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	651	-	1.05	2.03	-0.09	1.01	1.68	2.14	0.48	2.18	-0.09	0.56	0.65	2.22
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	C08016G11	-	0.73	2.01	-0.25	0.22	0.87	2.26	0.32	2.24	-0.31	0.49	0.32	2.83
Prot. transportadora de glucosa [<i>Enterococcus faecalis</i> V583]	C08019G01	-	1.04	1.92	-0.23	0.67	1.13	1.84	0.58	2.20	-0.30	0.42	0.44	2.42
Acetiltransferasa [<i>A. thaliana</i>]	C31809F08	At3g26040	1.37	1.82	-0.06	0.90	0.95	1.86	0.63	1.81	0.76	0.03	0.31	1.98
Hidroxinamil transferasa [<i>Nicotiana tabacum</i>]	3765	At5g48930	0.93	1.80	0.29	0.16	0.34	2.58	0.49	0.90	0.40	-0.37	0.11	2.70
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	C01002D02	-	0.46	1.77	-0.20	-0.06	0.42	1.26	0.71	1.11	0.43	1.61	1.48	0.81
Catecol O-metiltransferasa (EC.2.1.1.6) III - common tobacco	6533	At5g54160	0.93	1.74	0.64	0.38	0.56	3.02	0.34	1.54	0.89	-0.06	-0.02	2.93
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	6674	-	0.83	1.71	-0.18	0.75	1.14	1.60	0.36	2.09	-	0.47	0.54	2.38
Prot. F21J9.24 [<i>A. thaliana</i>]	C18009H04	At1g24580	0.55	1.68	-0.75	0.23	0.82	1.92	1.09	3.09	-0.95	1.22	1.20	3.66
Prot. kinasa transmembrana rica en leucina	C34104D04	At1g74360	0.37	1.67	0.63	-0.17	-0.01	1.32	0.43	1.51	0.82	0.32	0.31	2.12
Glutatioin S-transferasa [<i>Cinnarbita maxima</i>]	4728	At2g29420	0.77	1.66	1.32	0.34	0.58	1.18	0.19	0.70	1.51	0.48	0.24	3.67
CPR2 [<i>Vigna unguiculata</i>]	4436	At4g20820	0.74	1.61	0.59	-0.33	0.28	1.91	0.53	1.33	0.99	0.17	0.35	3.70
Ginamil alcohol deshidrogenasa (EC.1.1.1.195)	6699	At5g19440	1.03	1.60	0.53	0.90	0.82	1.93	1.30	1.95	0.40	0.56	0.97	2.10
tRNA/rRNA metiltransferasa (SpoU) [<i>A. thaliana</i>]	C03007F08	At4g17610	0.81	1.56	0.01	0.77	1.32	1.76	0.37	2.01	-0.01	0.57	0.71	2.37
3-O-metiltransferasa de ác. caféico	1479	At5g54160	0.04	1.53	0.09	-0.77	-0.20	3.69	-0.26	1.28	0.49	-0.28	-0.02	3.84
Prot. reparadora de DNA UMUC [<i>A. thaliana</i>]	6500	At1g49980	0.44	1.51	0.24	0.27	0.74	1.13	-0.21	0.03	-0.19	-0.07	-0.05	1.30
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	C08012B05	-	0.81	1.49	0.35	0.79	1.25	1.68	2.04	3.54	1.69	2.46	2.40	3.94
Sulfato adeniltransferasa 1 / ATP-sulfunilasa (APSI) [<i>A. thaliana</i>]	6838	At3g22890	1.12	1.44	1.11	1.55	1.04	2.43	1.25	1.83	0.95	1.34	1.58	2.42
Fosfo 2-dehidro 3-deoxiheptanoato aldolasa 1 [<i>Nicotiana tabacum</i>]	6471	At1g22410	1.12	1.44	0.25	0.25	-0.02	0.92	0.40	1.47	1.07	-0.19	0.21	1.61
Glutatioin S-transferasa [<i>Cinnarbita maxima</i>]	3237	At2g29420	0.86	1.42	1.02	0.25	0.46	1.05	-0.11	0.53	1.11	0.08	0.25	3.80
Citocromo P450 [<i>A. thaliana</i>]	5928	At4g31940	1.16	1.39	0.64	1.44	1.46	1.55	1.07	1.33	0.43	-0.12	0.34	1.67
β -1,4-xilosidasa [<i>A. thaliana</i>]	5507	-	0.65	1.31	0.44	-0.90	-0.42	1.43	0.07	1.39	0.29	0.24	0.09	2.07

Tabla 26: Listado de los 30 primeros genes con mayor inducción en el albedo de los frutos acondicionados 4 días con etileno y en los almacenados 14 días en aire después de tratarse con 1-MCP (Ver detalles en Tabla 25).

Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	FLAVEDO						ALBEDO					
			4 días			4 días + 10 días Aire			4 días			4 días + 10 días Aire		
			Aire	Etileno	I-MCP	Aire	Etileno	I-MCP	Aire	Etileno	I-MCP	Aire	Etileno	I-MCP
Prot. respuesta a herida [<i>A. thaliana</i>]	959	At4g10270	0.74	0.95	0.35	2.56	2.93	1.41	4.18	4.64	3.67	5.76	6.31	3.93
β-cinnoolamina sintasa [<i>Betula pendula</i>]	5206	At3g61440	1.66	2.18	-1.91	-0.95	-1.96	2.18	4.23	4.51	-1.49	0.89	0.66	2.92
Prot. de unión AMP [<i>A. thaliana</i>]	2745	At3g16910	0.18	-0.01	0.76	0.32	0.25	1.20	3.67	4.07	4.11	3.42	3.47	4.84
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	C08012E03	-	1.82	2.69	0.49	1.66	2.10	3.03	1.33	4.00	-0.39	1.91	1.98	4.28
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	C08012C04	-	2.36	3.20	1.87	2.34	2.81	3.28	2.12	3.95	1.50	2.62	2.44	4.40
Prot. ribosomal 40S-S5 [<i>Griffithsia japonica</i>]	C08024C06	At2g37270	0.33	1.46	-0.51	0.07	0.66	1.78	2.25	3.86	2.05	2.58	2.53	4.20
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	C08012B05	-	0.81	1.49	0.35	0.79	1.25	1.68	2.04	3.54	1.69	2.46	2.40	3.94
Prot. resistencia enfermedad (CC-NBS-LRR class), probable / PRM1	C18016E08	At1g59124	-0.33	-0.43	0.20	0.12	-1.52	-	3.00	3.42	3.50	3.52	3.37	3.73
Prot. cupina [<i>A. thaliana</i>]	2220	At1g07750	1.25	3.27	-2.05	-0.70	-0.77	0.76	1.95	3.37	-0.96	0.71	0.27	0.80
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	1176	-	1.50	2.67	0.38	1.40	1.89	3.04	1.20	3.35	-0.40	1.34	1.45	3.95
Nectarina 5 [<i>Nicotiana langsdorffii</i> x <i>Nicotiana sanderae</i>]	C08027E03	At5g44360	0.18	1.17	0.83	-2.83	-0.97	1.02	2.11	3.16	3.40	1.82	1.57	5.47
Prot. F21J9.24 [<i>A. thaliana</i>]	C18009H04	At1g24580	0.55	1.68	-0.75	0.23	0.82	1.92	1.09	3.09	-0.95	1.22	1.20	3.66
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	4907	-	1.66	2.73	-0.25	1.13	1.80	2.79	1.07	2.96	-0.24	1.03	1.31	3.41
L-asparaginasa [<i>Glycine max</i>]	3858	At3g16150	0.15	1.18	-0.10	-0.79	-1.22	1.68	0.95	2.52	0.19	-0.14	-0.09	2.33
Prot. F26P21_130 [<i>A. thaliana</i>]	4241	At2g26080	1.69	3.28	-0.66	1.03	1.77	3.40	1.11	2.41	0.88	1.80	2.01	2.67
Oxidoreductasa, 2OG-Fe(II) oxigenasa [<i>A. thaliana</i>]	C34009B09	At4g10500	-0.99	0.76	2.64	-1.94	-0.84	4.80	0.24	2.39	3.30	-0.01	0.11	4.70
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	C19008A04	-	-0.21	0.50	0.94	-1.43	-1.92	0.18	1.59	2.34	2.02	0.26	0.23	3.20
OSJNB0088C09.8 [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)]	6390	At4g38540	0.85	1.24	0.47	0.44	0.13	1.07	1.43	2.29	1.15	0.92	1.01	1.99
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	C08016G11	-	0.73	2.01	-0.25	0.22	0.87	2.26	0.32	2.24	-0.31	0.49	0.32	2.83
Prot. respuesta a herida [<i>A. thaliana</i>]	5693	At4g10270	2.06	2.27	2.84	4.28	4.51	3.06	1.70	2.23	0.77	3.56	3.89	1.41
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	648	-	1.09	2.16	-0.05	0.90	1.61	2.17	0.60	2.21	-0.34	0.52	0.62	2.45
Prot. transporte glucosa [<i>Enterococcus faecalis</i> V583]	C08019G01	-	1.04	1.92	-0.23	0.67	1.13	1.84	0.58	2.20	-0.30	0.42	0.44	2.42
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	651	-	1.05	2.03	-0.09	1.01	1.68	2.14	0.48	2.18	-0.09	0.56	0.65	2.22
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	6674	-	0.83	1.71	-0.18	0.75	1.14	1.60	0.36	2.09	-	0.47	0.54	2.38
Serina/Treonina fosfatasa BSL3 (BSU1-like protein 3)	C18009G03	At2g27210	1.99	2.85	0.65	1.73	2.05	2.92	0.67	2.06	0.24	0.55	0.63	2.43
Fosfatidato citidiltransferasa [<i>A. thaliana</i>]	C01008H04	At3g45040	1.18	0.51	1.22	0.81	0.54	2.43	3.41	2.02	1.23	1.11	1.23	2.63
tRNA/rRNA metiltransferasa (SpoU) [<i>A. thaliana</i>]	C03007F08	At4g17610	0.81	1.56	0.01	0.77	1.32	1.76	0.37	2.01	-0.01	0.57	0.71	2.37
Cinamil alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.195)	6699	At5g19440	1.03	1.60	0.53	0.90	0.82	1.93	1.30	1.95	0.40	0.56	0.97	2.10
Factor de transcripción WRKY [<i>A. thaliana</i>]	2313	At1g62300	0.60	1.23	-0.11	-0.56	-0.38	0.61	1.20	1.83	0.60	1.09	0.91	2.17
Sulfato adenosiltransferasa 1 / ATP-sulfilasa 1 (APS1) [<i>A. thaliana</i>]	6838	At3g22890	1.12	1.44	1.11	1.55	1.04	2.43	1.25	1.83	0.95	1.34	1.58	2.42

Tabla 27: Listado de los 30 primeros genes con mayor represión en el flavado de los frutos acondicionados 4 días con etileno y en los almacenados 14 días en aire después de tratarse con 1-MCP (Ver detalles en Tabla 25).

Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	FLAVADO						ALBEDO					
			4 días			4 días + 10 días Aire			4 días			4 días + 10 días Aire		
			Aire	1-MCP	Aire	Etileno	I-MCP	Aire	Etileno	I-MCP	Aire	1-MCP	Aire	Etileno
Prot. unión a clorofila a/b chlorophyll 2	7142	At3g22840	-4.29	-3.26	-3.57	-3.05	-3.27	-3.84	-2.65	-2.41	-2.06	-2.14	-2.03	-2.31
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	6771	-	-2.00	-2.91	-2.17	-1.46	-2.80	-3.28	-0.83	-2.48	-2.37	-1.07	-1.33	-3.80
Prot.subunidad. media del complejo 'Clathrin adaptor'	C04035E04	AtHg24550	-1.36	-2.65	-0.46	-1.23	-1.45	-2.27	-1.46	-1.94	-0.08	-1.07	-1.00	-0.87
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	C01004G01	-	-1.34	-2.43	-0.45	-1.05	-1.32	-1.93	-1.20	-1.76	0.06	-0.79	-0.67	-0.65
Factor lacrimatorio sintasa [<i>Allium porrum</i>]	4267	At2g25770	-1.16	-2.11	-0.49	-1.16	-1.18	-1.98	-1.14	-1.59	0.23	-0.64	-0.71	-0.70
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	7111	-	-1.00	-2.11	-0.35	-0.77	-1.00	-1.52	-0.76	-1.23	-0.11	-0.52	-0.35	-0.51
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	5855	-	-1.35	-1.98	-0.31	-0.93	-1.18	-1.90	-1.31	-1.89	-0.01	-0.95	-0.74	-0.70
COR15 [<i>Citrus clementina</i> x <i>Citrus reticulata</i>]	2799	-	-1.11	-1.67	-1.72	-0.86	-1.04	-2.83	-1.05	-2.06	-1.53	-1.36	-1.65	-3.61
Prot. con dominio PPR [<i>A. thaliana</i>]	1650	At3g59300	-1.06	-1.66	-1.74	-0.96	-0.98	-2.68	-1.08	-1.74	-1.22	-1.17	-1.42	-2.66
Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplast precursor (OEE1)	7177	At3g50820	-0.86	-1.62	0.09	0.14	0.08	-1.48	-0.46	-1.35	0.53	0.43	0.79	-0.51
TOBAC														
Prot. función desconocida [<i>A. thaliana</i>]	C06003B11	At5g14790	-1.09	-1.60	-1.52	-0.79	-0.95	-2.64	-0.97	-1.84	-1.36	-1.25	-1.42	-3.02
Calmodulina (MSS3) [<i>A. thaliana</i>]	4628	At2g43290	-0.93	-1.59	-1.40	-0.99	-1.02	-2.46	-0.95	-1.74	-1.14	-1.10	-1.20	-2.61
COR15 [<i>Citrus clementina</i> x <i>Citrus reticulata</i>]	1199	At1g54410	-0.87	-1.55	-1.53	-0.64	-0.80	-2.90	-1.00	-2.04	-1.72	-1.60	-1.63	-3.59
Prot. CP12 precursor, cloroplasto	5687	At3g62410	-1.45	-1.53	-0.96	-0.86	-0.71	-2.69	-1.94	-2.17	-1.09	-0.80	-0.38	-2.33
Peroxidasa (EC 1.11.1.7)	7179	AtHg21960	-0.41	-1.51	0.76	0.37	-1.23	-2.35	-0.01	-0.91	0.15	0.18	-0.75	-2.28
OSJNBa0094H06.13 [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)]	C16012B01	At5g38050	-1.03	-1.51	-1.18	-0.57	-0.50	-2.30	-1.17	-1.95	-1.24	-1.24	-1.59	-3.07
Galactinol sintasa, probable [<i>A. thaliana</i>]	7038	At1g56600	-1.49	-1.49	-1.57	-1.37	-1.76	-2.17	-2.11	-2.63	-1.90	-1.93	-1.74	-2.60
OSJNBa0073L04.6 [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)]	2361	At3g44450	-1.84	-1.47	-1.73	-1.50	-1.24	-1.87	-1.20	-0.74	-0.43	-0.42	-0.39	-0.59
Prot. F-box (FBL15) [<i>A. thaliana</i>]	4822	At4g33210	-1.01	-1.43	-0.41	-0.77	-0.97	-1.59	-0.92	-1.40	0.04	-0.59	-0.47	-0.60
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	1172	-	-0.50	-1.43	0.49	0.07	0.24	-1.36	-1.02	-1.48	0.17	-0.35	0.37	-1.03
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	C08019G02	-	-0.79	-1.43	-0.89	-0.40	-0.47	-1.67	-0.45	-1.60	-0.95	-0.32	-0.84	-1.95
Fosforibuloquinasa, cloroplasto precursor	1508	At1g32060	-1.13	-1.39	-1.06	-0.24	-0.03	-1.65	-1.17	-1.88	-1.40	-1.20	-1.28	-2.64
LD37206p [<i>Drosophila melanogaster</i>]	C06005D08	AtHg20350	-0.92	-1.37	-0.17	-0.94	-0.89	-1.10	-0.56	-0.89	0.07	-0.24	0.34	-
IAA-amino acid hydrolasa [<i>Oryza sativa</i> (indica cultivar-group)]	C07001E08	At5g56650	-1.02	-1.37	-0.78	-1.00	-0.34	-1.57	-0.81	-0.86	-0.74	-0.54	-0.06	-0.64
COR15 [<i>Citrus clementina</i> x <i>Citrus reticulata</i>]	6659	At1g54410	-0.77	-1.33	-1.33	-0.38	-0.49	-2.41	-0.71	-1.64	-1.27	-1.07	-1.31	-2.82
Prot. función desconocida [<i>A. thaliana</i>]	1708	At5g02020	-1.10	-1.32	-1.07	-1.39	-1.76	-1.67	-0.87	-1.56	-1.10	-1.13	-1.37	-2.14
Prot. función desconocida [<i>A. thaliana</i>]	4875	At5g01750	-1.38	-1.31	-1.25	-1.11	-1.83	-2.77	-0.64	-0.82	-1.18	-0.79	-1.65	-3.40
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	6797	-	-0.90	-1.28	-1.17	-0.84	-0.67	-1.43	-0.84	-1.37	-1.19	-1.24	-1.05	-2.01
HSP 26a, cloroplasto - common tobacco	6664	AtHg27670	-1.53	-1.27	-0.99	-1.10	-1.98	-3.30	-0.03	-0.45	-0.47	-0.03	-0.84	-3.30
Prot. función desconocida	C16016C04	At1g21645	-0.82	-1.27	-1.15	-0.58	-0.71	-1.98	-0.87	-1.42	-1.25	-1.03	-1.17	-1.90

Tabla 28: Listado de los 30 primeros genes con mayor represión en el albedo de los frutos acondicionados 4 días con etileno y en los almacenados 14 días en aire después de tratarse con 1-MCP (Ver detalles en Tabla 25).

Homólogo en <i>A. thaliana</i>	Unigen	Proteína más similar	FLAVEDO				ALBEDO							
			4 días		4 días + 10 días		4 días		4 días + 10 días					
			Aire	1-MCP	Aire	1-MCP	Aire	1-MCP	Aire	1-MCP				
Benzodiazepina receptor [<i>A. thaliana</i>]	6697		-1.38	-1.43	-1.80	-0.26	-0.41	-2.31	-2.43	-2.75	-2.39	-1.67	-1.48	-2.75
Galactinol sintasa, probable [<i>A. thaliana</i>]	7038		-1.49	-1.49	-1.57	-1.37	-1.76	-2.17	-2.11	-2.63	-1.90	-1.93	-1.74	-2.60
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	6771		-2.00	-2.91	-2.17	-1.46	-2.80	-3.28	-0.83	-2.48	-2.37	-1.07	-1.33	-3.80
Prot. unión clorofila a/b	7142		-4.29	-3.26	-3.57	-3.05	-3.27	-3.84	-2.65	-2.41	-2.06	-2.14	-2.03	-2.31
Prot. P0710E05.6 [<i>Oryza sativa</i> (japónica cultivar-group)]	3899		-1.66	-2.47	-3.30	0.27	0.34	-1.79	-1.65	-2.37	-0.13	-0.02	0.47	-1.63
Prot. con dedos de Zn [<i>A. thaliana</i>]	C31703G06		-0.27	-0.35	-0.76	-0.41	-0.25	-1.74	-1.10	-2.21	-1.65	-1.21	-1.45	-4.18
CPI12 precursor, cloroplasto	A15g54630		-1.45	-1.53	-0.96	-0.86	-0.71	-2.69	-1.94	-2.17	-1.09	-0.80	-0.38	-2.33
asparinyl proteasa [<i>A. thaliana</i>]	A13g18490		-0.01	-1.28	-0.47	0.47	-0.38	-1.26	-0.88	-2.12	-1.24	-1.25	-1.25	-2.88
COR15 [<i>Citrus clementina</i> x <i>Citrus reticulata</i>]	2799		-1.11	-1.67	-1.72	-0.86	-1.04	-2.83	-1.05	-2.06	-1.53	-1.36	-1.65	-3.61
Proteína de maduración respuesta a deshidratación [<i>Prunus persica</i>]	7080		-0.52	-1.25	-0.39	0.19	0.02	-2.44	-1.14	-2.06	-0.95	-1.25	-1.21	-3.67
COR15 [<i>Citrus clementina</i> x <i>Citrus reticulata</i>]	A11g54410		-0.87	-1.55	-1.53	-0.64	-0.80	-2.90	-1.00	-2.04	-1.72	-1.60	-1.63	-3.59
OSJNBa0094H06.13 [<i>Oryza sativa</i> (japónica cultivar-group)]	C16012B01		-1.03	-1.51	-1.18	-0.57	-0.50	-2.30	-1.17	-1.95	-1.24	-1.24	-1.24	-1.59
Prot. subunid. media del complejo 'clathrin adaptor'	C04035E04		-1.36	-2.65	-0.46	-1.23	-1.45	-2.27	-1.46	-1.94	-0.08	-1.07	-1.00	-0.87
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	5853		-1.35	-1.98	-0.31	-0.93	-1.18	-1.90	-1.31	-1.89	-0.01	-0.95	-0.74	-0.70
Fagopititol sintasa 2 [<i>Fagopyrum esculentum</i>]	3600		-1.24	-0.99	-1.32	-3.05	-1.12	-1.53	-1.53	-1.89	-1.63	-1.61	-1.75	-2.08
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	C08029E12		-0.47	-1.18	0.42	0.22	0.40	-0.97	-1.50	-1.89	-0.15	-0.51	-0.44	-1.07
Fosfonilquinasa, cloroplasto precursor	1508		-1.13	-1.39	-1.06	-0.24	-0.03	-1.65	-1.17	-1.88	-1.40	-1.20	-1.28	-2.64
Prot. ribosomal L18 [<i>Sporoptera frugiperda</i>]	C08002D11		-0.29	-0.79	-0.13	0.25	0.26	-	-0.86	-1.85	-0.85	-0.85	-0.77	-2.48
Prot. función desconocida [<i>A. thaliana</i>]	C06003B11		-1.09	-1.60	-1.52	-0.79	-0.95	-2.64	-0.97	-1.84	-1.36	-1.25	-1.42	-3.02
LEA5_CITSI	7192		-0.71	-0.69	-0.72	-0.77	-0.69	-0.89	-0.82	-1.75	-1.58	-1.41	-1.34	-1.75
Prot. con dominio PRP [<i>A. thaliana</i>]	1650		-1.06	-1.66	-1.74	-0.96	-0.98	-2.68	-1.08	-1.74	-1.22	-1.17	-1.42	-2.66
Calmodulina (MSS3) [<i>A. thaliana</i>]	4628		-0.93	-1.59	-1.40	-0.99	-1.02	-2.46	-0.95	-1.74	-1.14	-1.10	-1.20	-2.61
Prot. función desconocida [<i>A. thaliana</i>]	C01014H01		-0.02	0.58	-2.12	-0.13	-1.19	-0.33	-1.89	-1.66	-0.85	-1.36	-0.29	-3.92
Prot. abundante de embiogénesis	1615		-1.31	-0.90	-3.42	-0.95	-1.01	-1.27	-1.68	-1.66	-1.01	-1.02	-1.06	-1.19
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	C01014G02		-0.74	-0.79	-1.30	-1.38	-1.29	-3.06	-1.18	-1.66	-0.45	-1.17	-0.98	-2.85
Prot. F18O14.29 [<i>A. thaliana</i>]	2686		-0.67	-1.62	0.60	0.59	0.11	-0.78	-0.72	-1.66	0.26	0.25	0.26	-0.96
COR15 [<i>Citrus clementina</i> x <i>Citrus reticulata</i>]	6659		-0.77	-1.33	-1.33	-0.38	-0.49	-2.41	-0.71	-1.64	-1.27	-1.07	-1.31	-2.82
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	C08019G02		-0.79	-1.43	-0.89	-0.40	-0.47	-1.67	-0.45	-1.60	-0.95	-0.32	-0.84	-1.95
Factor lacrimatorio sintasa [<i>Allium porrum</i>]	4267		-1.16	-2.11	-0.49	-1.16	-1.18	-1.98	-1.14	-1.59	0.23	-0.64	-0.71	-0.70
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	3926		-0.89	-0.91	-0.85	-0.86	-0.65	-1.65	-1.03	-1.57	-0.88	-1.33	-1.23	-2.46
Prot. acuponina [<i>Ricinus communis</i>]	7116		-0.75	-1.37	-0.33	-0.38	-0.96	-0.62	-0.63	-1.56	-0.75	-0.50	-0.66	-0.97
Prot. desconocida [<i>A. thaliana</i>]	1708		-1.10	-1.32	-1.07	-1.39	-1.76	-1.67	-0.87	-1.56	-1.10	-1.13	-1.37	-2.14
Prot. transportadora integral de membrana [<i>A. thaliana</i>]	C05074B01		-0.64	-1.15	-1.15	-0.75	-0.85	-1.91	-0.93	-1.55	-1.16	-1.15	-1.22	-2.25
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	4217		-1.76	-1.17	0.77	-0.79	-0.73	-1.51	-1.29	-1.52	-0.86	-1.28	-1.12	-1.57
Citocromo P450 [<i>Coccyzus americanus</i>]	5572		0.12	-0.28	0.46	1.28	1.20	0.06	-1.25	-1.52	0.07	-0.49	-0.04	-1.25
Galactinol sintasa, isoforma GoS-1 [<i>Aryza nepsans</i>]	2304		-0.86	-0.64	-0.53	-0.62	-0.64	-0.90	-1.24	-1.52	-1.03	-1.16	-1.20	-1.56
Lipoproteína membrana [<i>A. thaliana</i>]	1409		-0.73	-1.25	0.04	0.25	0.24	-1.07	-0.91	-1.51	0.04	0.01	0.18	-1.05
Glutamine sintasa, probable [<i>Oryza sativa</i>]	C31303B12		-0.35	-0.85	-0.85	-0.98	-0.89	-6.57	-0.60	-1.51	-1.33	-1.54	-1.83	-2.39

El análisis por ontologías génicas FatiGO+ mostró tanto en procesos biológicos, función molecular o componente celular, que los cambios diferenciales de expresión génica más relevantes se produjeron en los frutos recién acondicionados con etileno y en los frutos expuestos durante 14 h a 1-MCP y almacenados 14 días en aire, algunos de los cuales ocurren simultáneamente en ambas situaciones (Tabla 29 y Tabla 30).

El análisis de procesos biológicos (Tabla 30), reveló que la aplicación de etileno induce procesos del transporte de electrones (nivel 5) y la biosíntesis de fenilpropanoides (nivel 7) en el flavedo y el albedo. Además, en el flavedo se encontraron genes que participan en el metabolismo del triptófano y en la biosíntesis de indolalquilaminas (nivel 8), en la síntesis de aminoácidos aromáticos y en el metabolismo del ácido jasmónico u oxilipinas (nivel 9). Asimismo, en el albedo se encontró un gran número de genes que participan en la biosíntesis de hormonas (nivel 5) y en la biosíntesis de aminoácidos (nivel 7), fundamentalmente de aminoácidos azufrados (nivel 7). Por otro lado, estudiando los genes reprimidos en el flavedo en respuesta al etileno, antes de transferir los frutos al aire, se observó un porcentaje significativamente elevado de genes que intervienen en procesos de metabólicos de biopolímeros (nivel 4) y de proteínas (nivel 5), mientras que en el albedo en categorías no redundantes se encontró una proporción elevada de genes implicados en traducción (nivel 6), en metabolismo del DNA (nivel 5) y en procesos de biogénesis y ensamblaje del complejo ribonucleoproteína (nivel 4).

Entre los genes que se inducían en el albedo de forma específica en los frutos tratados con 1-MCP a los 14 días de almacenamiento se encontró un alto porcentaje que participa en procesos de generación de precursores metabólicos (nivel 4) y de genes de respuesta a la infección por hongos (nivel 6). Y entre los que reprimían su expresión, genes implicados en la biosíntesis de carbohidratos (nivel 6) y de compuestos terpenoides, fundamentalmente tetraterpenoides (nivel 8).

Es interesante señalar, que muchas de las respuestas observadas en los frutos recién acondicionados con etileno fueron comunes a las observadas en los frutos tratados con 1-MCP a los 14 días de almacenamiento. Así, ambas condiciones de almacenamiento favorecieron en el albedo la represión de un elevado porcentaje de genes implicados en procesos fotosintéticos (nivel 3) y en procesos de organización y biogénesis celular (nivel 3).

Por otro lado, se observó que muchos de los genes inducidos en el flavedo en respuesta al etileno se inducían en el albedo en los frutos tratados con el inhibidor de la acción del etileno a los 14d de almacenamiento en aire. Este es el caso de genes que participan en la respuesta sistémica dependiente de ácido jasmónico y etileno (nivel 8) u otros implicados en la biosíntesis de compuestos aromáticos (nivel 5), los cuales también se indujeron en albedo en respuesta a etileno.

Las mayores diferencias encontradas entre ambas condiciones de almacenamiento se observaron en el albedo, en genes implicados en procesos de ubiquitinación (nivel 8) o procesos de catabolismo de proteínas (nivel 9). Así, mientras en los frutos tratados con 1-MCP este tejido está enriquecido en genes que participan en procesos que conducen a la degradación de proteínas, éstos constituyen un porcentaje muy reducido en el global de genes de respuesta a etileno en los frutos recién acondicionados.

Tabla 29: Resumen de los resultados del análisis de ontologías génicas (FatGO+) del conjunto de procesos biológicos no redundantes sobre o infrarrepresentados en el flavedo (F) o albedo (A) de frutos de naranja 'Navelate': A) tratados 4 días con etileno; B) almacenados 14 días en aire inmediatamente después de tratarse 14 h con 1-MCP. Se indican los procesos biológicos sobre o infra-representados en las dos situaciones y aquellos que muestran un comportamiento opuesto. (↑): sobrerrepresentado en el segundo término de la comparación; (↓): sobrerrepresentado en el primer término de la comparación.

A) RTC vs 4 días Etileno			
Nivel	Proceso biológico	F	A
5	Transporte de electrones	↑	↑
6	Biosíntesis de fenilpropanoides	↑	↑
8	Proc. metab. del triptófano	↑	
8	Proc. de bios. de indolalquilaminas	↑	
9	Proc. metab. del ác. jasmónico	↑	
9	Proc. de bios. de oxilipinas	↑	
9	Proc. de bios. de la familia de aminoácidos aromáticos	↑	
5	Proc. bios. hormonas		↑
7	Proc. de bios. de aminoácidos		↑
7	Proc. metab. de aminoácidos azufrados		↑
4	Proc. metab. de biopolímeros	↓	
5	Proc. metab. de proteínas de la célula	↓	
3	Respuesta a estímulos abióticos		↓
4	Proc. de biogénesis y ensamblaje del complejo ribonucleoproteína		↓
5	Proc. metab. del DNA		↓
6	Traducción		↓

B) RTC vs 14 horas 1-MCP + 14 días Aire			
Nivel	Proceso biológico	F	A
4	Respuesta a toxina	↑	
4	Generación de precursores metab. y energía		↑
6	Resp. de defensa a hongos		↑
3	Proc. del desarrollo de estructuras anatómicas		↓
4	Resp. a estímulos térmicos		↓
6	Proc. de bios. de carbohidratos		↓
9	Proc. de bios. de terpenoides/tetraterpenoides		↓

C) Procesos Biológicos afectados en ambos tratamientos					
Nivel	Proceso biológico	4 días Etileno		14 horas 1-MCP + 14 días Aire	
		F	A	F	A
5	Proc. de bios. de compuestos aromáticos	↑	↑	↑	↑
8	Resp. sistémica dependiente de ácido jasmónico y etileno	↑		↑	↑
3 ó 4	Organización y biogénesis de orgánulos de la célula		↓	↓	↓
3	Proc. fotosintéticos		↓	↓	↓
8	Proc. de ubiquitinación de proteínas				↑
9	Proc. del catabolismo de proteínas dependiente de modificación		↓		↓

Tabla 30: Análisis de ontologías génicas (FatGO+) de procesos biológicos en el estudio de los cambios de expresión en el flavedo y albedo de frutos de ‘Navelate’ inmediatamente después de ser tratados 4 días con etileno (4d E) y de frutos almacenados 14 días en aire inmediatamente después de tratarse 14 h con 1-MCP (14h 1-MCP + 14d A). (●): procesos no redundantes en el flavedo; (●): procesos no redundantes en el albedo (Ver detalles en Tabla 6).

Proc. BIOLÓGICOS	RTC vs [4d E]												RTC vs [14h 1-MCP + 14d A]																	
	FatiGO+ - 'Navelate'						FLAVEDO						ALBEDO						FLAVEDO						ALBEDO					
	Micromatriz '12K'		FLAVEDO		ALBEDO		FLAVEDO		ALBEDO		FLAVEDO		ALBEDO		FLAVEDO		ALBEDO		FLAVEDO		ALBEDO									
	Nº total genes	Nº gen.	p-value	Nº gen.	p-value	Nº gen.	p-value	Nº gen.	p-value	Nº gen.	p-value	Nº gen.	p-value	Nº gen.	p-value	Nº gen.	p-value	Nº gen.	p-value	Nº gen.	p-value									
Nivel 3																														
Resp. a estímulos externos	76	19	7.74E-05 ↑																											
Proc. del sistema inmune	53	13	2.46E-03 ↑																	25	3.77E-02 ↑									
Resp. a estrés	331	41	2.86E-03 ↑																											
Proc. del metabolismo secundario	106	18	1.09E-02 ↑			21	1.57E-02 ↑																							
Resp. a estímulos bióticos	114	18	2.43E-02 ↑																	48	6.22E-03 ↑									
Resp. a estímulos abióticos	291																			65	3.31E-02 ↓									
Proc. fotosintéticos	50																			2	3.77E-02 ↓									
Resp. de defensa	124																			58	3.11E-05 ↑									
Proc. metab. de macromoléculas	1543	58	7.25E-02 ↓			75	3.57E-07 ↓													65	1.29E-03 ↓									
Organización y biogénesis celular	443	10	2.86E-03 ↓			12	5.80E-04 ↓																							
Proc. del desarrollo de estructuras anatómicas	269																			40	3.77E-02 ↓									
Nivel 4																														
Resp. a herida	48	19	1.06E-07 ↑			14	6.20E-03 ↑																							
Proc. metab. de ácidos orgánicos	247	38	7.74E-05 ↑																											
Proc. metab. de componentes aromáticos	94	20	2.64E-04 ↑			21	6.20E-03 ↑																							
Proc. metab. de lípidos	172	28	5.69E-04 ↑																											
Proc. metab. de heterociclos	61	14	2.77E-03 ↑																											
Proc. metab. de aminoácidos y derivados	190	28	2.86E-03 ↑			31	2.56E-02 ↑																							
Resp. inmune	53	13	2.62E-03 ↑																	25	3.10E-02 ↑									
Resp. a otros organismos	111	18	2.07E-02 ↑																	46	6.37E-03 ↑									
Resp. a toxina	17																													
Proc. metab. de macromoléculas de la célula	971	33	2.04E-04 ↓			51	8.40E-03 ↓																							
Proc. metab. de proteínas	951	33	4.57E-04 ↓			50	9.32E-03 ↓																							
Proc. metab. de biopolímeros	895	32	1.64E-03 ↓			45	7.02E-03 ↓																							
Organización y biogénesis de orgánulos de la célula	207					1	3.98E-04 ↓													19	1.16E-04 ↓									
Proc. de metabolismo de macromoléculas	145					0	3.92E-03 ↓																							
Proc. de biogénesis y ensamblaje del complejo ribonucleoproteína	105					0	2.56E-02 ↓																							
Generación de precursores metab. y energía	236																													
Resp. a estímulos térmicos																				79	3.77E-02 ↑									
																				33	2.81E-02 ↓									

Continuación de la Tabla 30

Proc. BIOLÓGICOS	RTC vs [4d E]				RTC vs [14h 1-MCP + 14d A]			
	FLAVEDO		ALBEDO		FLAVEDO		ALBEDO	
	Nº total genes	Nº gen. p-value	Nº gen. p-value	Nº gen. p-value	Nº gen. p-value	Nº gen. p-value	Nº gen. p-value	
Nivel 5								
Proc. metab. de ácidos carboxílicos	246	38 6.04E-05 ↑	35 4.48E-02 ↑					
Proc. de bios. de ácidos orgánicos	45	14 7.74E-05 ↑						
Proc. metab. de derivados de aminoácidos	71	17 2.04E-04 ↑	21 8.35E-05 ↑					
Proc. metab. de lípidos de la célula	142	25 2.64E-04 ↑						
Proc. de bios. de compuestos aromáticos	52	13 1.59E-03 ↑	14 7.54E-03 ↑			25 1.84E-02 ↑		
Resp. inmune innata	52	13 1.59E-03 ↑				24 4.01E-02 ↑		
Transporte de electrones	152	22 1.75E-02 ↑	28 6.20E-03 ↑					
Proc. de bios. de hormonas	13		2.89E-02 ↑					
Proc. metab. de proteínas de la célula	937	33 2.14E-03 ↓	50 3.75E-02 ↓					
Proc. del catabolismo de macromoléculas de la célula	136		0 7.00E-03 ↓					
Proc. del catabolismo de biopolímeros	108		0 2.56E-02 ↓					
Proc. metab. del DNA	103		0 3.01E-02 ↓			115 2.81E-02 ↑		
Proc. de modificación de biopolímeros	363					11 3.83E-02 ↑		
Proc. de resp. a hongos	17							
Proc. de organización y biogénesis de plastidios	27						12 3.56E-02 ↓	
Proc. metab. de terpenos	24						11 3.80E-02 ↓	
Nivel 6								
Proc. de bios. de ácidos carboxílicos	45	14 7.74E-05 ↑						
Proc. de bios. de lípidos	109	22 7.74E-04 ↑						
Proc. metab. de ácidos monocarboxílicos	89	19 1.70E-04 ↑						
Proc. de bios. de derivados de aminoácidos	53	14 2.64E-04 ↑	15 1.92E-03 ↑					
Resp. inmune innata (sensu Viridiplantae)	52	13 1.02E-03 ↑				24 3.77E-02 ↑		
Proc. metab. de fenilpropanoides	44		12 8.40E-03 ↑					
Proc. de bios. de aminas	73		14 4.92E-02 ↑					
Traducción	257		6 4.92E-02 ↓					
Proc. de modificación de proteínas	350					113 6.37E-03 ↑		
Resp. de defensa a hongos	14					10 2.81E-02 ↑		
Proc. de bios. de terpenos	19						10 3.31E-02 ↓	
Proc. de bios. de carbohidratos	66						21 3.75E-02 ↓	
Proc. de biogénesis y organización del cloroplasto	18						9 4.48E-02 ↓	

Continuación de la Tabla 30

Proc. BIOLÓGICOS	FatiGO+ - 'Navelate' Micromatriz '12K'						RTC vs [4dE]						RTC vs [14h 1-MCP + 14dA]					
	FLAVEDO			ALBEDO			FLAVEDO			ALBEDO			FLAVEDO			ALBEDO		
	Nº total genes	Nº gen.	p-value	Nº gen.	p-value	Nº gen.	Nº gen.	p-value	Nº gen.	p-value	Nº gen.	Nº gen.	p-value	Nº gen.	p-value	Nº gen.	p-value	
Nivel 7																		
Proc. metab. de ácidos grasos	59	16	7.74E-05 ↑															
Resp. de defensa, interacción incompatible	41	11	2.81E-03 ↑											21	1.73E-02 ↑			
Proc. metab. de indolalquilaminas	6	4	1.87E-02 ↑															
Proc. de bios. de fenilpropanoides	31	8	3.48E-02 ↑						9	3.00E-02 ↑								
Proc. metab. de aminoácidos azufrados	17								7	1.85E-02 ↑								
Proc. de bios. de aminoácidos	65								14	2.86E-02 ↑								
Proc. de modificación de proteínas por conjugación con pequeñas proteínas	31													18	6.37E-03 ↑			
Proc. de fosforilación de aminoácidos proteicos	222													75	1.81E-02 ↑			
Proc. del metabolismo de polisoprenoides	24															11	3.84E-02 ↓	
Nivel 8																		
Proc. metab. de oxilipinas	14	9	6.04E-05 ↑															
Proc. de bios. de ácidos grasos	40	14	7.74E-05 ↑															
Resp. sistémica dependiente de ácido jasmónico y etileno	20	9	5.69E-04 ↑											13	1.71E-02 ↑			
Proc. metab. del triptófano	6	4	2.91E-02 ↑															
Proc. de bios. de indolalquilaminas	6	4	2.91E-02 ↑															
Proc. de ubiquitinación de proteínas	28																	
Proc. de bios. de polisoprenoides	19													17	6.37E-03 ↑			
Proc. metab. de terpenoides	24															10	3.31E-02 ↓	
Nivel 9																		
Proc. metab. del ácido jasmónico	14	9	7.74E-05 ↑															
Proc. de bios. de oxilipinas	14	9	7.74E-05 ↑															
Proc. de bios. de la familia de aminoácidos aromáticos	6	4	4.67E-02 ↑															
Proc. del catabolismo de proteínas dependiente de modificación	89								0	4.71E-02 ↓								
Proc. de bios. de terpenoides	19															10	3.31E-02 ↓	
Proc. metab. de tetraterpenoides	15															8	5.00E-02 ↓	

Los resultados del análisis FatiGO+ referentes a componente celular (Tabla 31) confirmaron que el albedo fue el tejido más afectado por el tratamiento con etileno o 1-MCP. En este tejido se observó que el grupo de genes que se inducen inmediatamente después del tratamiento con etileno, ya sea en la comparación respecto a los frutos RTC o a los controles almacenados 4 días en aire, está enriquecido en genes del sistema de endomembranas que hace referencia a sistemas de transporte intracelular a través de membranas (Tabla 31A). Por el contrario, en este grupo se encontró una representación reducida de genes localizados en el interior de la célula. En los frutos expuestos 14 h a 1-MCP y almacenados 4 días en aire este análisis no reveló ningún componente celular estadísticamente sobre o infrarrepresentado en el conjunto de genes inducidos o reprimidos con respecto a los frutos RTC o a los controles. Sin embargo, al final del almacenamiento en estos mismos frutos se observó entre los genes inducidos con respecto a RTC un porcentaje también elevado de genes del sistema de endomembranas y muy reducido de genes de orgánulos intracelulares al igual que sucedía en respuesta al etileno a tiempos cortos (Tabla 31B). Asimismo, es interesante señalar que en estos frutos que presentaron el ICC más elevado, el número de genes constituyentes del complejo de ubiquitinación (6) fue elevado. Además, al comparar el grupo de genes inducidos en estos últimos con respecto a los frutos acondicionados o los controles al final de su almacenamiento, también se encontró una abundancia de genes del complejo proteosoma lo que indica una activación de procesos de degradación de proteínas y confirma los resultados del análisis FatiGO+ referentes a procesos biológicos. Además, según indica este análisis, la mitocondria y el peroxisoma juegan un papel importante en el albedo de estos frutos tratados con 1-MCP, ya que se observó un porcentaje elevado de genes localizados en estos orgánulos inducidos en los mismos respecto a los controles (14 días Aire). Asimismo, en estos frutos los plastidios formaron una categoría infrarrepresentada en las comparaciones realizadas tanto frente a los frutos RTC como frente a los almacenados en aire con o sin tratamiento previo con etileno.

Tabla 31: Resumen de los resultados del análisis de ontologías génicas (FatiGO+) referente a componente celular. Se indica la locación celular no redundante de genes cuya expresión se alteró en el flavedo y albedo de frutos de naranja ‘Navelate’ (A) tratados 4 días con etileno (10µL L⁻¹) y (B) almacenados 14 días en aire inmediatamente después de tratarse 14 h con 1-MCP (1µL L⁻¹) (↑): sobrerrepresentado en el segundo término de la comparación; (↓): infrarrepresentado en el segundo término de la comparación.

A) Etileno

RTC vs 4 días Etileno					4 días Aire vs 4 días Etileno				
	Componente Celular	Nivel	p-valor	Ind/Rep		Componente Celular	Nivel	p-valor	Ind/Rep
Flavedo	Orgánulo, Intracelular	6	2.30E-02	↓	Albedo	Sistema endomembrana	5	1.07E-02	↑
Albedo	Sistema endomembrana	5	4.73E-02	↑		Parte intracelular	5	1.13E-02	↓
	Parte intracelular	5	8.28E-03	↓					
	Tilacoides	9	6.24E-04	↓					

Continuación de la Tabla 31.

B) 1-MCP + 14 días Aire

RTC vs				14 días Aire				4 días Etileno + 10 días Aire			
14 horas 1-MCP + 14 días Aire				vs 14 horas 1-MCP + 14 días Aire				vs 14 horas 1-MCP + 14 días Aire			
Componente Celular	Nivel	p-valor	Ind/Rep	Componente Celular	Nivel	p-valor	Ind/Rep	Componente Celular	Nivel	p-valor	Ind/Rep
Albedo				Albedo			Albedo				
Sistema endomembrana	5	1.26E-02	↑	Complejo Proteosoma	7	2.78E-03	↑	Sistema endomembrana	5	4.58E-05	↑
Complejo 'ubiquitin-ligase'	6	2.81E-02	↑	Parte integral de membrana	7	2.82E-02	↑	Complejo Proteosoma	7	5.32E-04	↑
Orgánulo, Intracelular	6	3.77E-02	↓	Parte mitocondrial	9	2.86E-03	↑	Complejo ribonucleoproteína	6	3.53E-02	↓
Tilacoides	8	3.31E-02	↓	Peroxisoma	9	1.66E-02	↑	Orgánulos no unidos a membrana	7	2.86E-02	↓
Plastidio	8	3.31E-02	↓	Parte interior membrana	9	2.49E-02	↑	Plastidio	8	3.63E-02	↓
Cloroplasto	9	4.19E-03	↓	Parte exterior, membrana	9	4.74E-02	↑	Cloroplasto	9	2.62E-03	↓
Citosol	9	4.48E-02	↓	Orgánulos no unidos a membrana	7	1.77E-02	↓				
				Plastidio	8	3.18E-02	↓				
				Cloroplasto	9	5.61E-03	↓				

El análisis de ontologías génicas referente a función molecular puso de manifiesto, como ya se había observado en los análisis anteriores, que los cambios más relevantes en la mayoría de las situaciones estudiadas tienen lugar en el albedo (Tabla 32). En primer lugar, fijándonos en el conjunto de genes inducidos en respuesta al tratamiento con etileno en los frutos recién acondicionados antes de su transferencia a aire con respecto a los niveles iniciales de los frutos RTC, se encontró un porcentaje elevado de genes con actividad oxidoreductasa, tanto en el flavedo como en el albedo. Además, en el albedo destacan también genes con actividad de unión a oxígeno y otros con actividad quinasa de nucleótidos. Entre aquellos que se reprimieron en estos mismos frutos se encontró un elevado número de genes con capacidad de unión a ácidos nucleicos en el albedo, y si establecemos la comparación de estos frutos con respecto a los controles almacenados durante igual tiempo pero sin acondicionar con la hormona (4 días Aire), observamos que el etileno favorece la represión de genes con actividad UDP-glucosiltransferasa.

Al final del almacenamiento en los frutos acondicionados con etileno se observó una proporción elevada de genes inducidos en el flavedo con actividad lipoxigenasa con respecto a los frutos tratados con 1-MCP y almacenados 14 días en aire. Por el contrario, otros genes que codifican GST y CoA-ligasa presentaron mayor expresión en el albedo de estos últimos. Sin embargo, al comparar ambos tipos de frutos con respecto a los correspondientes controles (14 días Aire), este análisis no reveló diferencias significativas en el porcentaje de estos grupos de genes, lo que parece indicar que ambos tipos de frutos tratados con etileno o 1-MCP representan las situaciones más diferentes y de hecho fueron los que presentaron las mayores diferencias en el ICC. Por otro lado, el conjunto de genes que codifican proteínas constituyentes del ribosoma y de unión a DNA constituyeron una categoría funcional infrarrepresentada en el conjunto de genes que en el albedo mostraron mayor nivel de expresión en los frutos expuestos a 1-MCP respecto a los tratados con etileno, ambos al final del almacenamiento.

El tratamiento con 1-MCP a tiempos cortos (4 días) favoreció en el albedo la inducción de genes de transporte de carbohidratos. Sin embargo, el número de genes inducidos con actividad de unión a RNA o reguladora de la transcripción en este mismo tejido y tipo de frutos fue muy reducido.

Tabla 32: Resumen de los resultados del análisis FatiGO+ (BABELOMICS) indicando las funciones moleculares sobre o infrarrepresentadas en el conjunto de genes que mostraron cambios de expresión diferencial en el flavedo y albedo de frutos de naranja ‘Navelate’ tratados con etileno (10µL L⁻¹) o 1-MCP (1µL L⁻¹) y almacenados posteriormente en aire. (↑): sobrerrepresentado en el segundo término de la comparación; (↓): infrarrepresentado en el primer término de la comparación.

A) Comparación vs RTC

RTC vs 4 días Etileno					RTC vs 4 días Etileno + 10 días Aire				
	Función Molecular	Nivel	p-valor	Ind/Rep		Función Molecular	Nivel	p-valor	Ind/Rep
Flavedo	Actividad oxidoreductasa	3	2.04E-04	↑	Flavedo	Actividad lipoxigenasa	6	1.72E-02	↑
Albedo	Actividad oxidoreductasa	3	6.75E-03	↑	RTC vs 14 horas 1-MCP + 14 días Aire				
	Unión a oxígeno	3	4.92E-02	↑		Función Molecular	Nivel	p-valor	Ind/Rep
	Actividad quinasa de nucleótido	7	6.20E-03	↑	Albedo	Actividad oxidoreductasa	3	6.37E-03	↑
	Unión de ácidos nucleicos	3	2.78E-02	↓					

B) Comparación vs 4 días Aire

4 días Aire vs 4 días Etileno				
	Función Molecular	Nivel	p-valor	Ind/Rep
Albedo	Actividad UDP-glucosiltransferasa	5	1.67E-02	↓
4 días Aire vs 14 horas 1-MCP + 4 días Aire				
	Función Molecular	Nivel	p-valor	Ind/Rep
Albedo	Actividad oxidoreductasa	3	6.27E-04	↑
	Transporte de carbohidratos	3	3.77E-03	↑
	Actividad 'porter'	5	9.63E-03	↑
	Actividad GST	5	2.38E-02	↑
	Actividad CoA-ligasa	5	2.76E-02	↑
	Constituyente estructural del ribosoma	3	3.59E-02	↓
	Unión a RNA	4	2.10E-02	↓
	Actividad como factor de transcripción	5	2.26E-04	↓
	Unión a átomos de Zn	6	8.90E-03	↓

C) Comparación Etileno vs 1-MCP

4 días Etileno vs 14 horas 1-MCP + 4 días Aire				
	Función Molecular	Nivel	p-valor	Ind/Rep
Flavedo	Unión a nucleótidos	3	2.28E-02	↑
	Actividad oxidoreductasa	3	1.35E-04	↓
	Actividad ciclasa	3	9.46E-03	↓
4 días Etileno + 10 días Aire vs 14 horas 1-MCP + 14 días Aire				
	Función Molecular	Nivel	p-valor	Ind/Rep
Flavedo	Actividad lipoxigenasa	6	2.26E-02	↓
Albedo	Actividad oxidoreductasa	3	5.32E-04	↑
	Actividad GST	5	2.92E-02	↑
	Actividad CoA-ligasa	5	3.42E-02	↑
	Constituyente estructural del ribosoma	3	6.60E-03	↓
	Unión a DNA	4	4.21E-02	↓

Como se acaba de mencionar, el análisis FatiGO+ mostró entre los procesos biológicos más sobrerrepresentados inducidos en el flavedo de los frutos tratados con etileno antes de su transferencia al aire, los relacionados con el metabolismo del ácido jasmónico u oxilipinas, lo que fue confirmado posteriormente en la visualización de rutas metabólicas mediante la herramienta AraCyc (Figura 35). Así, se observó un total de 7 genes inducidos que participan en la biosíntesis del ácido jasmónico, como los que codifican las enzimas lipoxigenasa LOX2, óxido aleno sintasa (AOS) u OPDA reductasa OPR3 (At2g06050). Los dos últimos además aumentaron su expresión en el albedo de estos frutos. Asimismo, otros 5 genes de esta ruta que codifican una lipoxigenasa LOX1, una AOS, dos OPDA reductasas (OPR3: At2g06050 y OPR2: At1g76690) y una metil transferasa (At1g19640), también se indujeron en el albedo de los frutos inicialmente tratados con el inhibidor de la acción del etileno y almacenados 14 días en aire. Entre ellos, destaca *LOX1* con un aumento de 8 veces con respecto a los niveles iniciales correspondientes a los frutos RTC. Por otro lado, diversos genes que participan en la biosíntesis de glicolípidos, fosfolípidos y triacilgliceroles (TAG) así como implicados en la biosíntesis de ácidos grasos de cadena larga aumentaron sus niveles de mensajero en el flavedo y el albedo en respuesta a la aplicación exógena de etileno. Entre ellos, los que codifican las enzimas MGDG galactosil transferasa (DGD1; At3g11670), fosfatidato fosfatasa (At3g02600) y dolicol quinasa (At3g45040), junto a otro gen que codifica una β -fosfolipasa D (β -PLD), se indujeron en el albedo y/o flavedo de los frutos tratados con 1-MCP al final del almacenamiento, siendo el aumento en los tres primeros mayor al observado en los frutos recién acondicionados con etileno (Figura 35). En base a estos resultados, se estudió en detalle todo el conjunto de genes impresos en la micromatriz relacionados con el metabolismo del ácido jasmónico u oxilipinas y de otros asociados a membrana con actividad lipasa o tioesterasa, implicados en la degradación de lípidos, o implicados la biosíntesis, elongación y β -oxidación de ácidos grasos (ver más adelante Tabla 35).

El análisis por ontologías génicas indicó que el tratamiento con etileno favoreció los procesos de biosíntesis de aminoácido aromáticos en el albedo de los frutos recién acondicionados con la hormona. En esta categoría funcional se incluyeron fundamentalmente genes que participan en la biosíntesis de etileno aunque se encontraron también dos genes de biosíntesis de cisteína y cistationina así como otro que codifica una β -cianoalanina sintasa implicada en la detoxificación de cianida (Tabla 29). En el análisis de visualización de rutas metabólicas (Figura 36) se observó que varios de estos genes fueron inducidos también en el flavedo y/o albedo de los frutos tratados con 1-MCP al finalizar el almacenamiento. Así, en el caso del gen que codifica una S-metil-5-tioribosa quinasa (At1g49820) o en el que codifica la enzima metionina adenosiltransferasa (At4g01850), dicho aumento fue de dos veces en el flavedo. Con un perfil similar se encontraron 4 genes que intervienen en la síntesis de etileno a partir de SAM y que codifican 2 enzimas ACS (ACS6 y ACS12) y 2 ACO (EFE y At1g03400), cuya inducción se produjo fundamentalmente en el albedo en ambos tipos de frutos.

Siguiendo el mismo paralelismo entre los resultados obtenidos en el análisis FatiGO+ y AraCyc, diversos genes del metabolismo de aminoácidos aromáticos aumentaron su expresión en el flavedo y/o albedo de los frutos acondicionados con etileno antes de su transferencia a aire (Figura 37 y Figura 38). Así, se encontraron 3 genes inducidos en el albedo y 4 en el flavedo que codifican enzimas implicados en la biosíntesis de corismato, antranilato 5-fosforibosil 1-fosfato, indol y triptófano (Figura 37). Además, en esta ruta se encontraron 7 genes inducidos al final del almacenamiento en el flavedo y/o albedo de los frutos inicialmente tratados con 1-MCP, entre los que destacan una siquimato 5-deshidrogenasa (At3g06350) y una antranilato sintasa (At1g25220) en el flavedo, y una

antranilato fosforibosiltransferasa (At5g17990) en ambos tejidos, con un aumento de al menos dos veces respecto a los niveles iniciales (RTC). Por otro lado, 4 genes implicados en la biosíntesis de fenilalanina y tirosina se indujeron al finalizar el tratamiento con etileno y al final del almacenamiento en los frutos expuestos 14 h a 1-MCP y codifican las enzimas fosfoglicerato deshidrogenasa (At4g34200), ACS (ACS12), arogenato/prefenato deshidrogenasa dependiente de NADP⁺ (At5g34930) y CYP79A2 monoxigenasa (At5g05260). El gen que codifica la última de estas enzimas, implicada en la biosíntesis de derivados glucosilados a partir de L-phe, aumentó dos veces su expresión en el albedo de los frutos recién acondicionados con etileno y 5 veces en el albedo de los tratados con el inhibidor de su acción y almacenados 14 días en aire (Figura 38).

El metabolismo de fenilpropanoides, según el análisis FatiGO+, constituyó un proceso biológico altamente representado en el conjunto de genes que se indujeron en el flavedo y albedo de los frutos tratados con etileno antes de ser transferidos a aire. En la Figura 39 se representan todos los genes reunidos en la micromatriz que participan en las rutas que biosíntesis de flavonoides, ácidos fenilpropanoides libres o suberina. Entre ellos, 5 aumentaron su expresión en ambos tejidos y codifican una fenilalanina amonio-liasasa (PAL1), una cinamil CoA reductasa (CCR1), una 4-cumarato CoA ligasa (At4g05160) y dos OMTs (OMT1 y At5g20230). Así, dicho aumento fue superior a dos veces en ambos tejidos en el caso del gen *PAL1*, y de 8 y 5 veces en el flavedo de los que codifican OMTs, respectivamente. Asimismo, los genes que codifican las enzimas cinamato 4-hidroxilasa (ATC4H) e hidroxicinamil transferasa (Atg48930) se indujeron en estos frutos de forma específica en el flavedo mientras que en los que codifican una cumarato 3-hidroxilasa (REF8), una 3-monoxigenasa de flavonoides (At5g07990) y una alcohol deshidrogenasa (At5g19440) dicha inducción tuvo lugar en el albedo. Por otro lado, la mayoría de estos genes que se indujeron por etileno mostraron también un aumento en sus niveles relativos de mRNA en los frutos tratados con 1-MCP y almacenados 14 días en aire. Destacan los genes *OMT1* y *At5g20230*, que codifican OMTs, cuya inducción en estos últimos frutos fue superior a 5 veces en el flavedo y albedo para el gen *OMT1*, y de 4 veces en el flavedo y 8 en el albedo para el gen *At5g20230*, con respecto a los niveles iniciales (RTC). Otros, como los que codifican las enzimas PAL1, 4-cumarato CoA ligasa (At4g05160) o 3-monoxigenasa de flavonoides (At5g07990), solamente aumentaron en el albedo y en todos ellos, alrededor de 2,5 veces.

Los resultados del análisis de ontologías génicas indicaron que el tratamiento con 1-MCP en los frutos almacenados 14 días en aire favoreció en el albedo la caída de expresión de genes que participan en procesos de biosíntesis de terpenoides. De nuevo, el análisis AraCyc, confirmó dichos resultados. En relación a la biosíntesis de carotenoides y ABA (Figura 40), se observó una represión de la mitad de los genes de esta ruta. Destacan 3 genes que codifican las enzimas licopeno β -ciclaza (LYC), zeaxantina/anteraxantina epoxidasa (ABA1) y fitoeno sintasa (PSY), el primero de los cuales también disminuyó su expresión en estos mismos frutos y tejido aunque a tiempos más cortos (14 h 1-MCP + 4 días Aire).

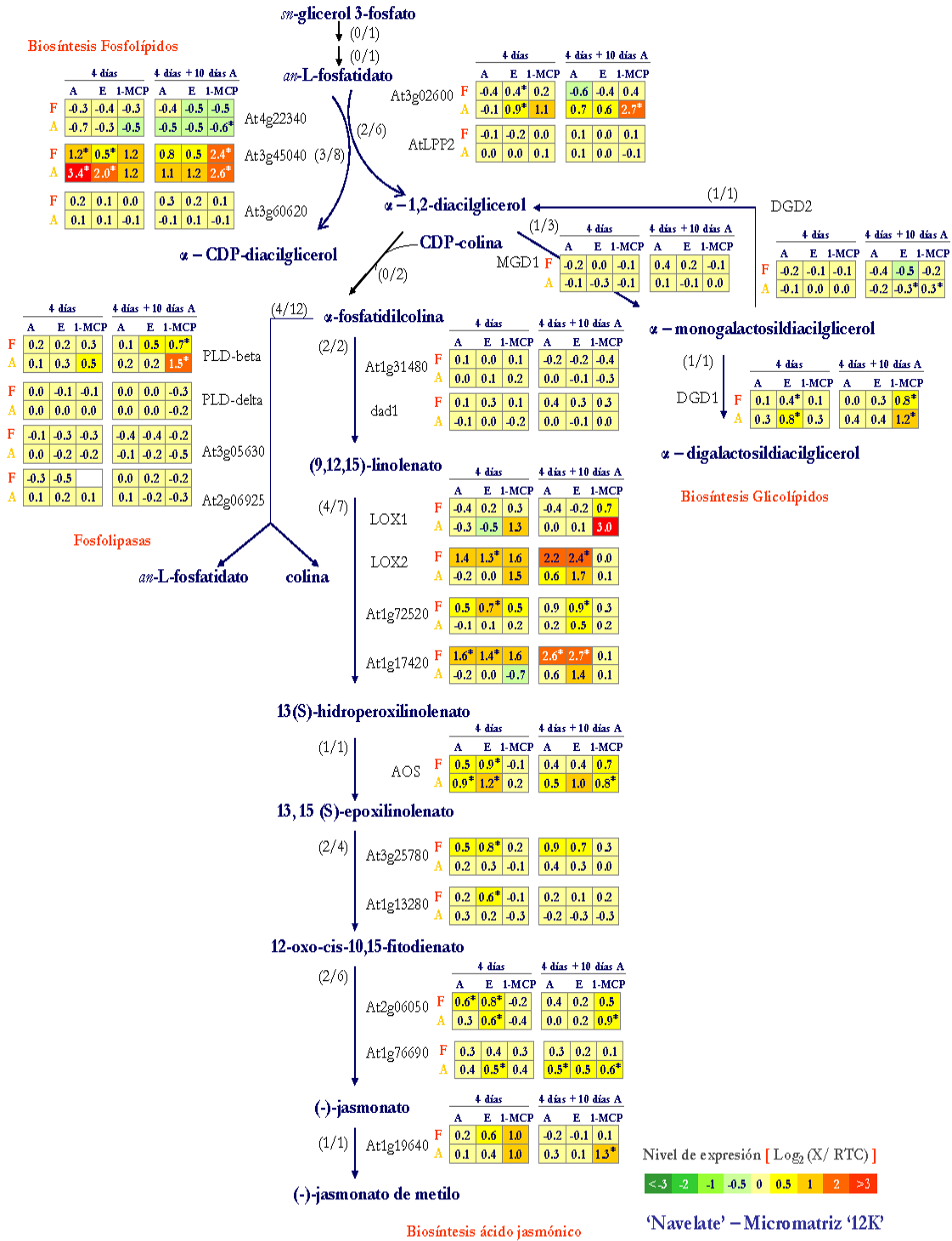


Figura 35: Representación gráfica (Aracyc) del estudio del efecto del tratamiento de etileno y 1-MCP en la expresión de los genes de la ruta de biosíntesis de fosfolípidos y glicolípidos, y de degradación de éstos por acción de enzimas fosfolipasas, en muestras de flavedo (F) y albedo (A) de naranjas 'Navelate'. Además, se representa la ruta de biosíntesis de ácido jasmónico. En cada una de las etapas se indica entre paréntesis el número de genes estudiados incluidos en la micromatriz '12K' con respecto al número total de genes de *A. thaliana* identificados hasta el momento que participan en dicha reacción. Para cada gen se indica el valor logarítmico (\log_2) de la expresión relativa en cada una de las situaciones estudiadas con respecto a los niveles de los frutos RTC en el flavedo y el albedo. (*): genes con cambios de expresión significativos (SAM FDR<1%).

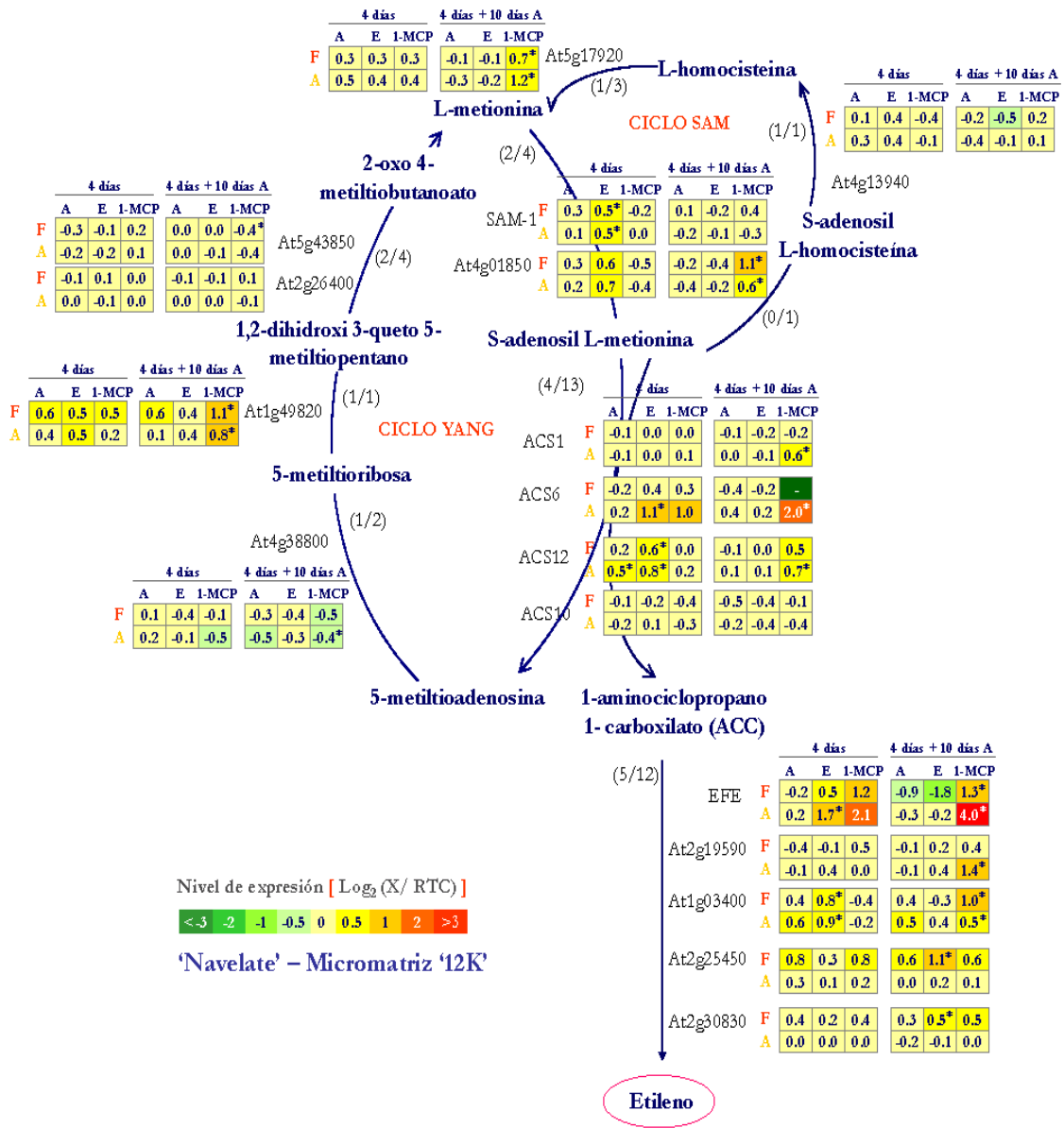


Figura 36: Representación gráfica (Aracyc) del estudio del efecto del tratamiento de etileno y 1-MCP en la expresión de los genes de la ruta de biosíntesis de etileno en muestras de flavedo (F) y albedo (A) de naranjas 'Navelate' (Ver detalles en Figura 35).

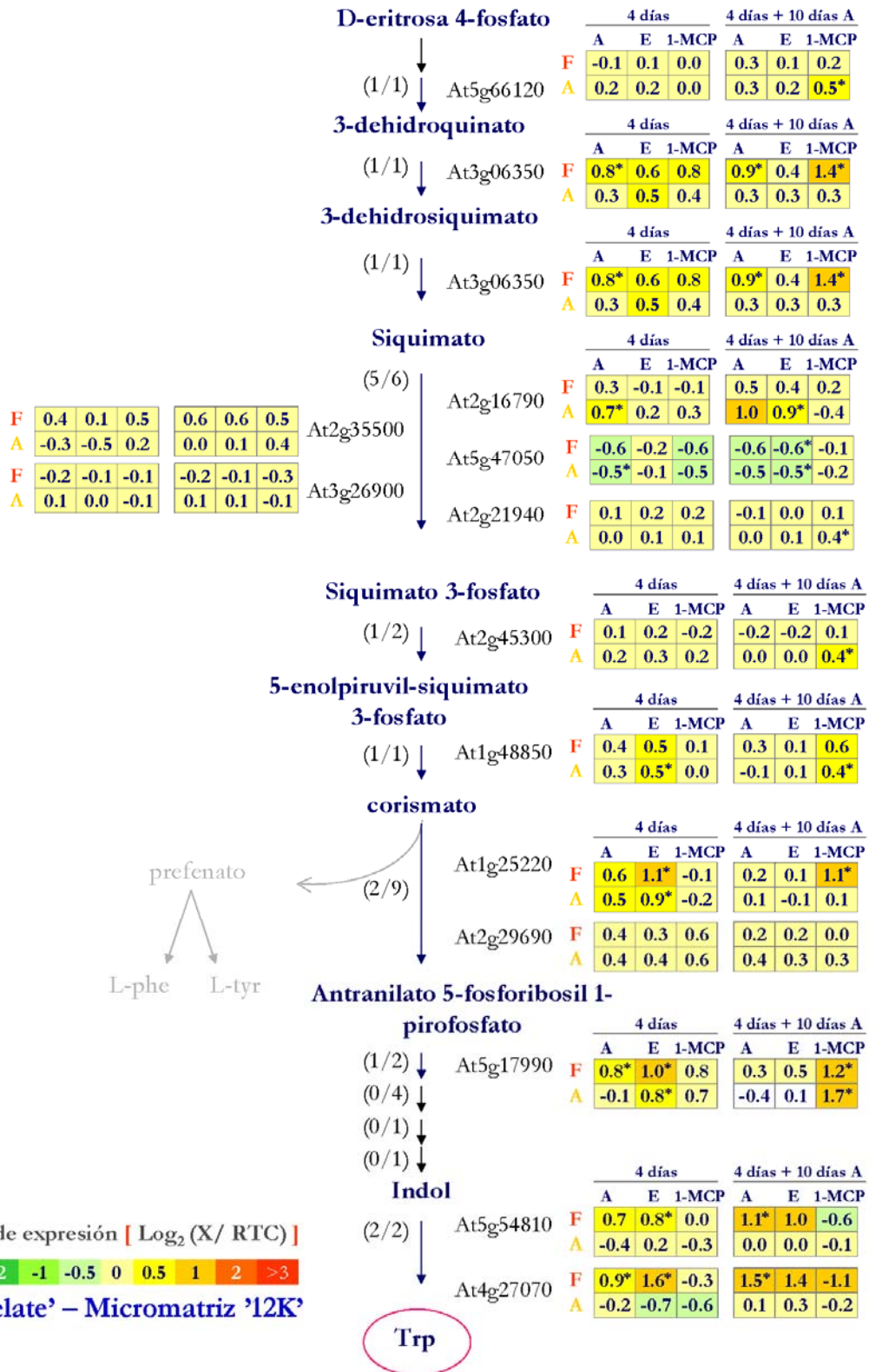


Figura 37: Representación gráfica (Aracyc) del estudio del efecto del tratamiento de etileno y 1-MCP en la expresión de los genes de la ruta de biosíntesis de triptófano en muestras de flavedo (F) y albedo (A) de naranjas 'Navelate' (Ver detalles en Figura 35).

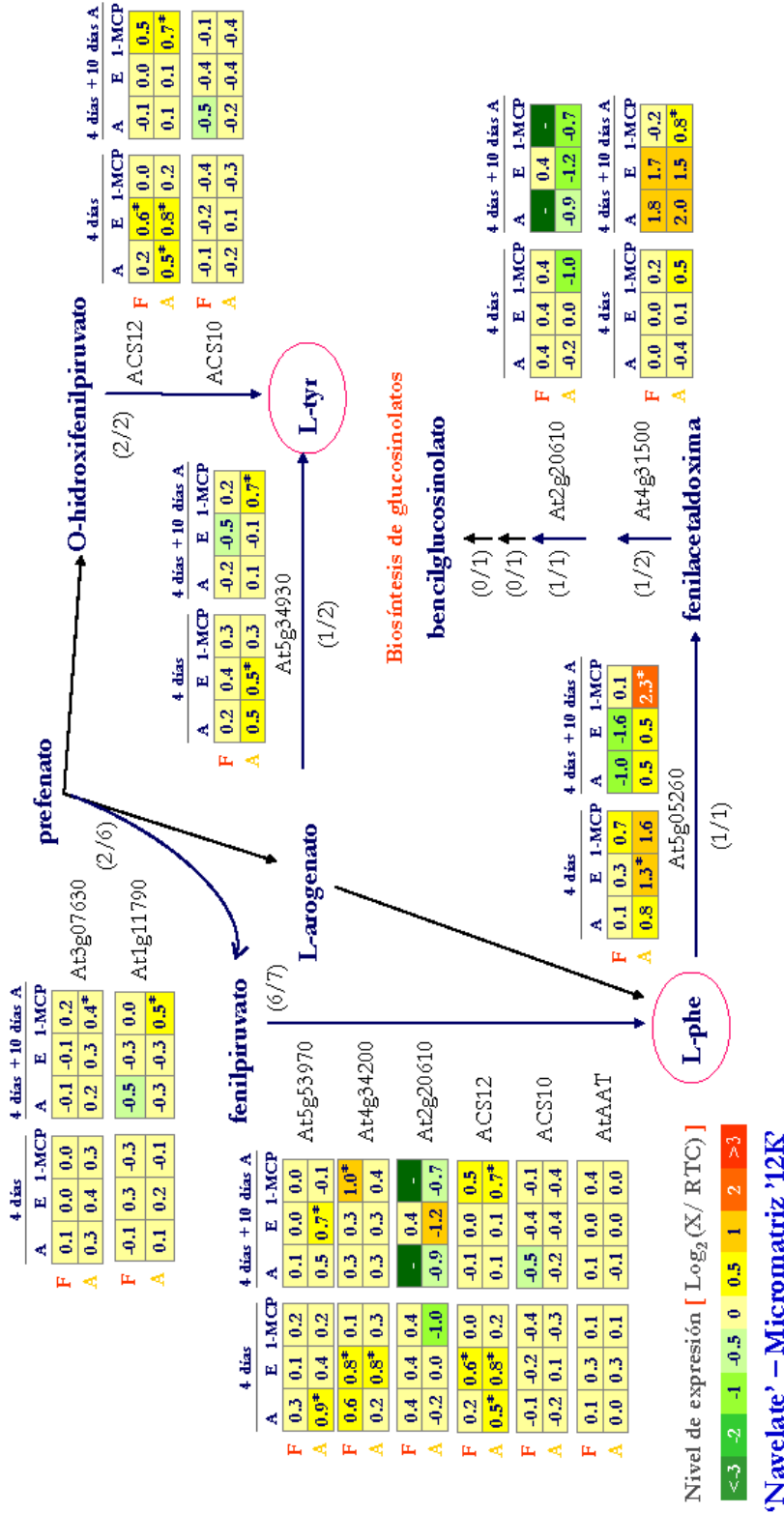


Figura 38: Representación gráfica (Aracyc) del estudio del efecto del tratamiento de etileno y 1-MCP en la expresión de los genes de la ruta de biosíntesis de fenilalanina y tirosina en muestras de flavedo (F) y albedo (A) de naranjas 'Navelate' (Ver detalles en Figura 35).

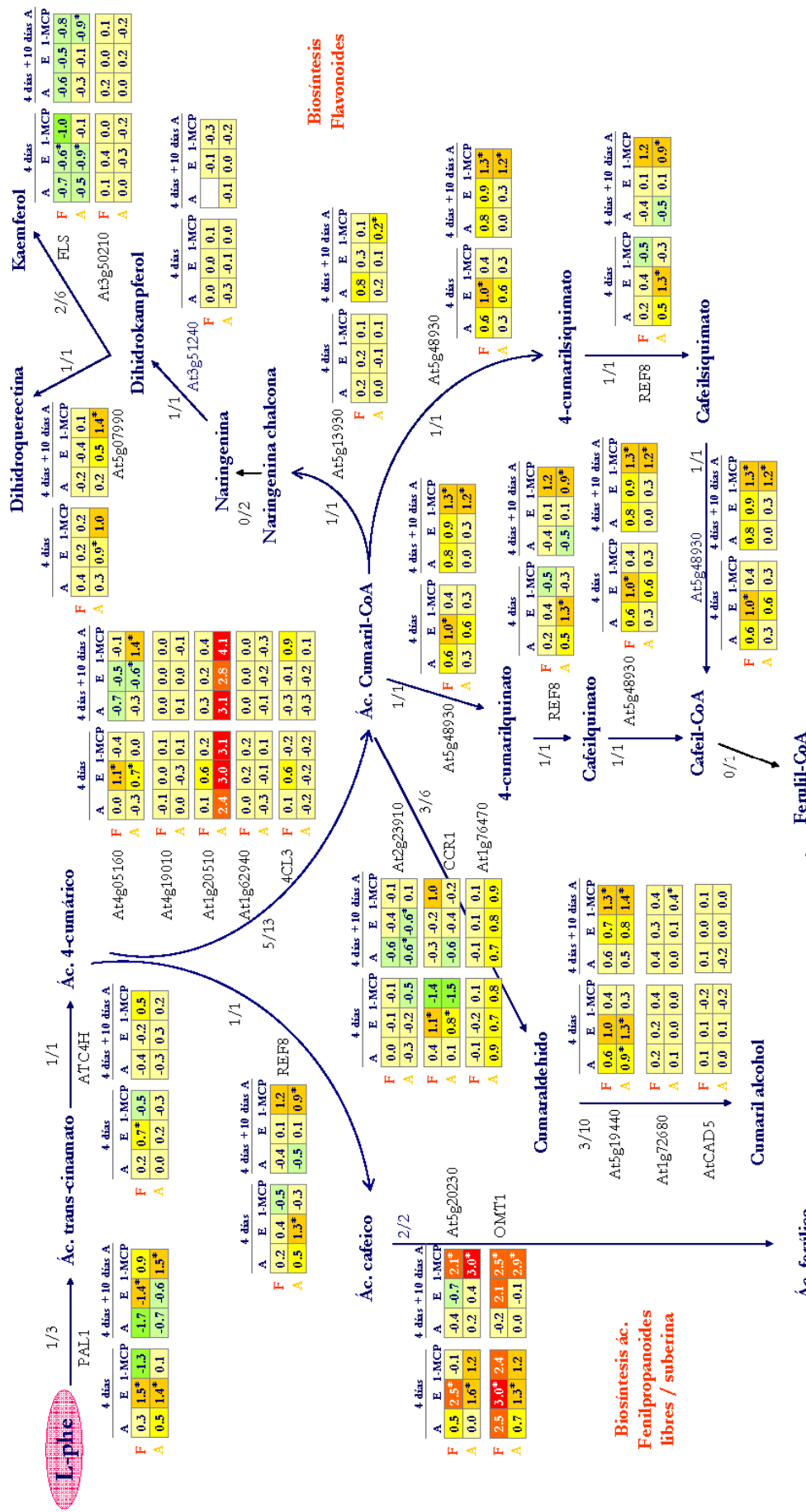
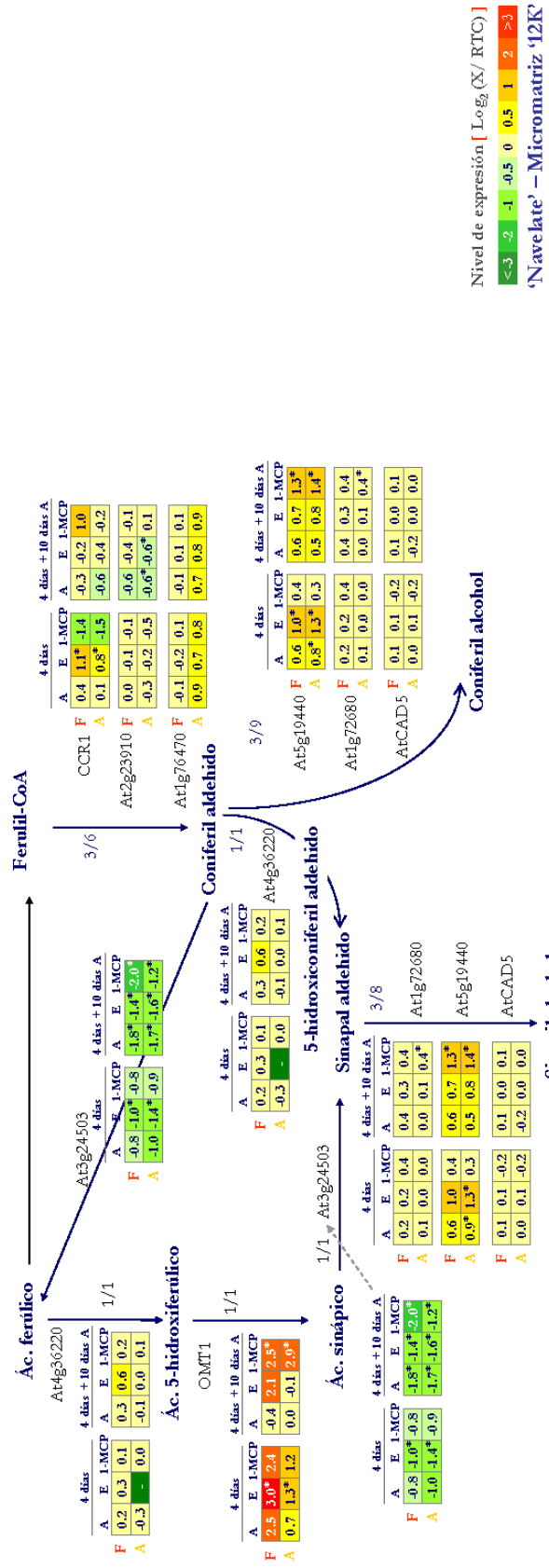


Figura 39: Representación gráfica (Aracyc) del estudio del efecto del tratamiento de etileno y 1-MCP en la expresión de los genes de la ruta de biosíntesis de fenilpropanoídes en muestras de flavedo (F) y albedo (A) de naranjas 'Navelate' (Ver detalles en Figura 35).



Continuación Figura 39

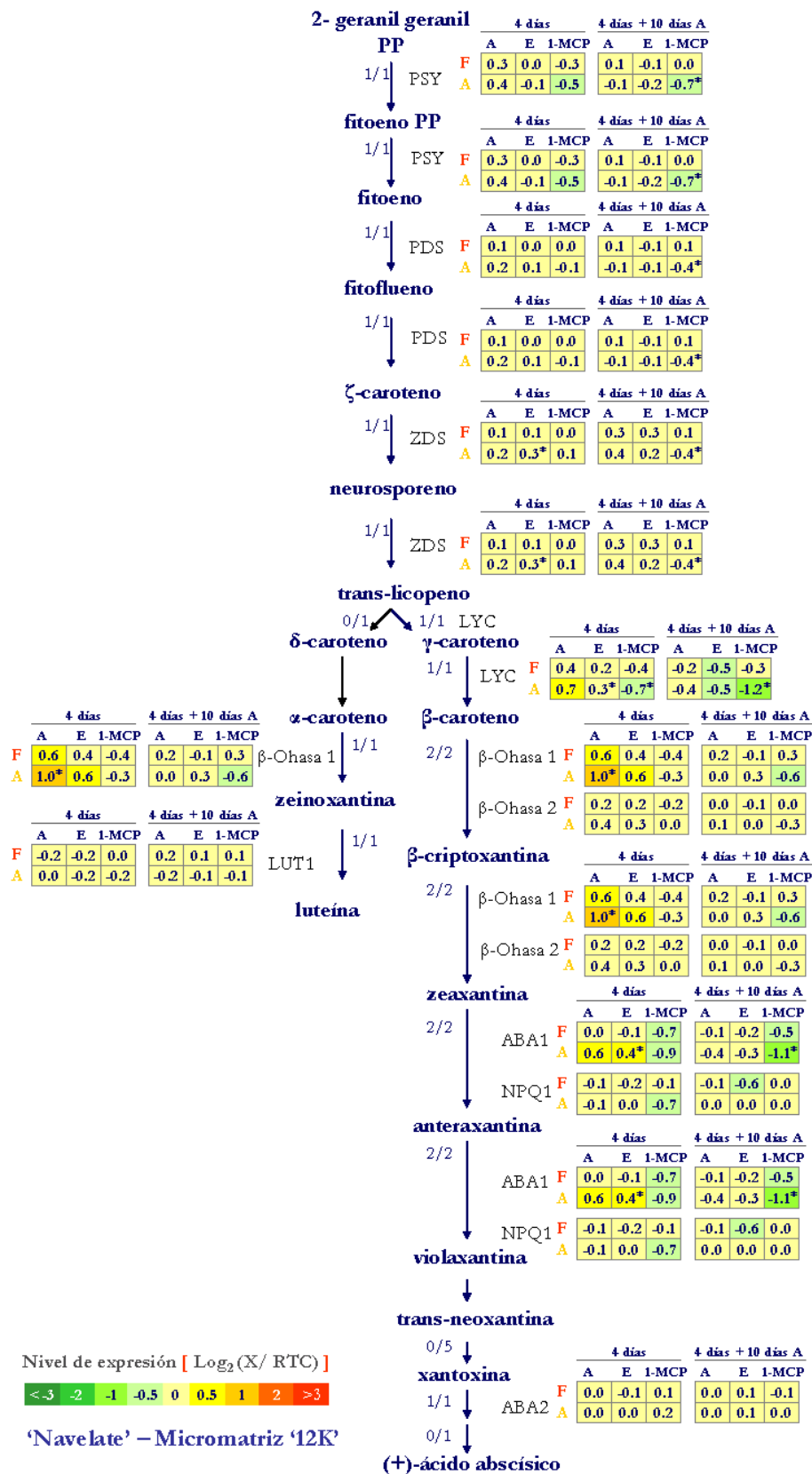


Figura 40: Representación gráfica (Aracyc) del estudio del efecto del tratamiento de etileno y 1-MCP en la expresión de los genes de la ruta de biosíntesis de carotenoides en muestras de flavedo (F) y albedo (A) de naranjas 'Navelate' (Ver detalles en Figura 35).

El análisis FatiGO+ mostró una sobrerrepresentación de genes implicados en procesos de transporte de electrones (nivel 5), y por tanto en el balance redox celular, en el flavedo y en el albedo de los frutos de 'Navelate' tratados 4 días con etileno (Tabla 29A y Tabla 30). El análisis detallado de este grupo mostró una abundancia de genes que codifican proteínas oxidorreductasas con dominio de unión a FAD, incluyendo varias proteínas CPRD2 o una nectarina 5, los cuales en su mayoría se indujeron tanto en el flavedo como en el albedo de dichos frutos así como de los tratados con 1-MCP almacenados 14 días en aire (Tabla 33). Además, se encontraron 13 genes que codifican proteínas citocromo P-450, 6 inducidos en el flavedo y 11 en el albedo en respuesta al tratamiento con etileno. La expresión de 6 de ellos también aumentó en el albedo de los frutos control a los 4 días mientras que en los frutos tratados con 1-MCP solamente se encontró un gen inducido en ambos tejidos (unigen 3012). Al final del almacenamiento (14 días) solamente 4 genes de esta familia mantuvieron su expresión elevada en los frutos acondicionados con etileno mientras que la mayoría se indujo en los frutos tratados con 1-MCP y lo hicieron fundamentalmente en el albedo. Por otro lado, se encontraron genes que codifican otros componentes principales de los complejos de transporte de electrones que, además de flavinas (FMN, FAD), incluyen deshidrogenadas dependientes de NADH, proteínas ferrosulfuradas, como la ferredoxina, o citocromos b y c. Así, se encontró un gen que codifica una NADH oxidorreductasa (unigen 3492) que se indujo a los 4 días específicamente en el albedo de los frutos tratados con etileno aunque sus niveles no se mantuvieron después de 10 días de almacenamiento en aire. Este gen, además, se indujo a los 14 días únicamente en el albedo de los frutos tratados con 1-MCP al menos dos veces respecto a RTC. Otros genes de este grupo codifican proteínas relacionadas con el estrés oxidativo como una TRX o una glutaredoxina que se indujeron en el albedo de los frutos tratados 4 días con etileno y de los expuestos a 1-MCP almacenados 14 días en aire. No obstante, este último aumentó su expresión en el resto de las condiciones analizadas aunque dicho incremento no fue significativo.

Aunque el análisis FatiGO+ no mostró una sobrerrepresentación de procesos de estrés oxidativo, teniendo en cuenta resultados previos de fisiología que indican que éste puede estar implicado en el desarrollo de esta alteración, se llevó a cabo un análisis más detallado de los genes incluidos en la micromatriz '12K' en las dos condiciones de almacenamiento estudiadas que mostraron mayores cambios de expresión génica: 1) en respuesta al tratamiento de 4 días con etileno o 2) a los 14 días de almacenamiento en los frutos tratados con 1-MCP. Este análisis mostró que un total de 36 genes modificaron su expresión en el primer caso (22 inducidos y 14 reprimidos) y que 39 lo hicieron en el segundo (24 inducidos y 15 reprimidos). En la Tabla 34 se muestra un resumen de las principales familias de este grupo de enzimas que participan en el metabolismo de ROS indicando el número de genes encontrado de cada una de ellas en las dos situaciones de estudio seleccionadas, los cuales se describen con más detalle en las Tabla 58-Tabla 61 del Anexo III.

Entre los genes que aumentaron su expresión en respuesta al etileno (Anexo III Tabla 58) destaca una gran abundancia de genes que codifican proteínas GST en el flavedo y el albedo. Además de estos genes, se encontraron otros 9 genes diferentes de esta familia, que aunque no variaron en respuesta al etileno 'per se', se indujeron a los 14 días de almacenamiento específicamente en el albedo de los frutos dañados tratados con 1-MCP (Anexo III Tabla 59). Por otro lado, el etileno reprimió la expresión de 3 catalasas (CAT), 1 en el flavedo y 2 en el albedo, y de una SOD dependiente de Cu-Zn en el flavedo (Anexo III Tabla 60). Es interesante señalar que no se observaron otros genes *CAT* con expresión diferencial en el resto de situaciones estudiadas. Sin embargo, sí se observaron 3 genes que codifican enzimas SOD inducidos en los frutos expuestos a 1-MCP al final del

almacenamiento, dos dependientes de Fe y uno de Cu-Zn (Anexo III Tabla 59), y otros 3 reprimidos (Anexo III Tabla 61).

Entre los genes reprimidos en respuesta a etileno, se encontraron 2 genes del ciclo Halliwell-Asada que codifican una GR y una MDHA reductasa (Anexo III Tabla 60). Por otra parte, otro gen que codifica una MDHA reductasa, diferente al anterior, y dos que codifican enzimas APX, se indujeron en el albedo de los frutos tratados con 1-MCP al finalizar su almacenamiento pero no en respuesta al etileno ‘per se’ (Anexo III Tabla 59). Sin embargo, se encontró un gen que codifica otra enzima APX (unigen 5091) que se indujo 2,8 veces en el flavedo y más de 5 veces en el albedo en estos últimos frutos expuestos a 1-MCP. Si observamos el grupo de genes que disminuyeron su expresión en estos últimos, pero no en los frutos recién tratados con etileno, encontramos 3 genes que codifican dos ferredoxinas y una enzima NAD(P)H-quinona oxidoreductasa cuya expresión se redujo más de dos veces y no varió en el resto de condiciones de almacenamiento estudiadas (Anexo III Tabla 61).

Tabla 33: Genes incluidos en la categoría de procesos de transporte de electrones (nivel 5) del análisis FatiGO+ que se indujeron en el flavedo (●), albedo (●) o en el flavedo y el albedo (●) de los frutos tratados 4 días con etileno. Se indica el valor relativo de expresión (Log₂) en cada condición de almacenamiento con respecto a los valores correspondientes a frutos RTC. (●): inducciones; (●): represiones; (+): sin valor detectado en el primer término de la comparación; (-): sin valor detectado en el segundo término de la comparación.

FatiGO+ Transporte de electrones (Nivel 5) ↑ 4 días Etileno (Flavedo Albedo)			4 días						14 días Aire					
Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	Aire		Etileno		1-MCP		Aire		Etileno		1-MCP	
			F	A	F	A	F	A	F	A	F	A	F	A
Prot. dicianina [<i>Lycopersicon esculentum</i>]	4496	At5g20230	0.5	0.0	2.5	1.6	-0.1	1.2	-0.4	0.2	0.7	0.4	2.1	3.0
CPRD2 [<i>Vigna unguiculata</i>]	4436	At4g20820	0.7	0.5	1.6	1.3	0.6	1.0	-0.3	0.2	0.3	0.4	1.9	3.7
Citocromo P450 [<i>A. thaliana</i>]	5928	At4g31940	1.2	1.1	1.4	1.3	0.6	0.4	1.4	-0.1	1.5	0.3	1.6	1.7
OSJNBb0088C09.8 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	6390	At4g38540	0.9	1.4	1.2	2.3	0.5	1.1	0.4	0.9	0.1	1.0	1.1	2.0
Nectarina 5 [<i>Nicotiana langsdorffii</i> x <i>Nicotiana sanderae</i>]	C08027E03	At5g44360	0.2	2.1	1.2	3.2	0.8	3.4	-2.8	1.8	-1.0	1.6	1.0	5.5
CPRD2 [<i>Vigna unguiculata</i>]	2332	At1g26390	0.6	0.4	1.1	1.0	0.6	1.0	-0.2	0.2	0.2	0.4	1.4	3.0
Citocromo P450 [<i>A. thaliana</i>]	279	At3g25180	1.0	1.1	1.1	1.2	0.4	0.4	1.1	0.1	1.2	0.4	1.4	1.4
Prot. con dominio de unión a FAD [<i>A. thaliana</i>]	6694	At2g34790	0.4	0.5	1.0	1.0	-0.3	-0.2	-1.1	-0.6	-0.7	-0.2	0.0	1.0
(S)-2-hidroxi-acid oxidasa, peroxisomal (Glycolato oxidasa) (GOX)	6436	At3g14420	0.3	0.8	0.9	1.2	-0.5	-0.7	-0.1	-0.3	-0.4	-0.1	1.1	1.1
Prot. dicianina [<i>Lycopersicon esculentum</i>]	1276	At5g26330	-0.1	0.1	0.8	1.3	0.2	1.5	-1.2	0.1	-0.9	0.4	0.6	2.8
CPRD2 [<i>Vigna unguiculata</i>]	6357	At4g20820	0.1	0.8	0.7	1.4	0.5	1.3	-0.7	0.4	-0.9	0.6	0.7	2.7
Citocromo P450 [<i>Cicer arietinum</i>]	3012	At4g37370	0.9	2.0	0.6	1.7	1.9	2.0	1.0	0.9	0.9	1.0	2.2	2.6
Sulfito reductasa [<i>Prunus armeniaca</i>]	1855	At5g04590	0.2	0.8	0.5	0.9	0.6	0.8	0.5	0.4	-0.1	0.3	0.7	0.6
Prot. de unión a cobre ('blue copper-binding protein') [<i>A. thaliana</i>]	C20006B11	At3g27200	0.2	+	0.5	+	2.6	+	-0.4	+	-0.3	+	-	+
Citocromo P450 inducible por elicitores [<i>Nicotiana tabacum</i>]	C06017D04	At2g45560	0.7	0.9	0.5	1.0	0.4	0.3	0.7	0.6	0.6	0.5	0.7	0.6

Continuación de Tabla 33.

FatiGO+ Transporte de electrones (Nivel 5) ↑ 4 días Etileno (Flavado Albedo)			4 días						14 días Aire					
Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	Aire		Etileno		1-MCP		Aire		Etileno		1-MCP	
			F	A	F	A	F	A	F	A	F	A	F	A
Prot. precursora de ferredoxina [2Fe-2S] fd1, no fotosintética	6665	At2g27510	0.4	0.5	0.9	0.5	-0.9	-0.5	-0.5	-0.1	-0.5	0.3	0.5	-0.1
Prot. de función desconocida [<i>A. thaliana</i>]	5388	At2g46820	-0.2	-0.1	0.8	-0.1	-0.2	0.0	0.2	-0.1	0.2	0.1	-0.2	0.1
Citocromo b5 - common tobacco	4470	At2g32720	0.3	0.2	0.7	0.6	-0.1	-0.1	0.2	0.0	0.1	0.0	0.8	0.4
NADPH-tioredoxina reductasa, probable [<i>Oryza sativa</i> (japonica)]	1524	At2g17420	0.3	-0.2	0.6	0.5	0.0	-0.4	0.2	0.3	0.1	0.3	0.5	1.1
Prot. precursora de desaturasa de ácidos grasos ω-6, cloroplasto	6833	At4g30950	0.3	-0.3	0.6	-0.2	0.2	-0.5	0.5	-0.1	0.3	0.2	-0.1	0.2
Prot. rica en residuos de prolina [<i>Capsicum annuum</i>]	C01011E06	At5g53870	0.5	0.0	0.6	0.3	0.4	0.4	0.1	-0.1	0.4	-0.1	0.3	-0.7
Citocromo P450 82C1	3706	At4g31940	0.9	-0.1	0.5	0.3	1.3	0.5	1.5	0.5	1.4	0.8	1.3	1.4
Citocromo P450, probable [<i>Vitis vinifera</i>]	C06010G10	At2g45570	-0.3	0.1	0.5	0.5	-0.7	-0.6	-0.3	-0.3	0.1	-0.2	0.0	-0.1
Citocromo b5	2972	At2g32720	0.1	0.1	0.4	0.4	0.0	0.0	0.1	0.0	0.1	0.0	0.5	0.1
Monooxigenasa con dominio flavina (FMO)	C34210D03	At1g12200	0.2	0.3	0.4	0.5	-0.1	-0.2	-0.1	-0.1	-0.1	0.1	0.2	0.2
Citocromo P450 [<i>Nicotiana tabacum</i>]	C05804C01	At5g06900	1.0	1.1	0.5	1.6	0.4	0.9	0.6	0.4	0.3	0.7	0.8	1.3
Citocromo P450 P-450LXXIA1	C05068H02	At3g26230	0.2	0.8	0.6	1.4	-0.4	0.1	-0.6	1.0	0.0	0.9	0.1	1.0
Monooxigenasa (MO2), probable [<i>A. thaliana</i>]	6227	At4g38540	0.9	1.3	0.4	1.1	0.8	0.4	1.3	1.3	1.4	1.4	1.6	1.5
NADH deshidrogenasa, probable [<i>Oryza sativa</i> (japonica)]	3492	At1g07180	-0.2	-0.3	0.2	0.9	0.3	1.2	-0.6	-0.1	-1.5	-0.8	-0.2	1.1
Prot. con dominio de unión a FAD [<i>A. thaliana</i>]	1655	At4g20840	-0.4	0.2	0.2	0.9	-0.9	-0.6	-0.2	0.2	-0.4	0.3	-0.3	0.7
Citocromo P450 [<i>Vitis vinifera</i>] _186	186	At2g45550	-0.1	0.4	0.5	0.9	-0.9	-0.7	0.0	-0.3	0.1	0.1	0.7	0.2
Glutaredoxina [<i>A. thaliana</i>]	C05138D10	At1g28480	2.2	0.1	2.1	0.8	2.3	1.0	1.0	0.9	1.0	0.9	2.9	2.1
Citocromo c, probable [<i>A. thaliana</i>]	C03001G03	At5g40810	0.2	0.3	0.5	0.8	-0.4	-0.2	0.2	0.0	-0.1	0.0	0.6	0.8
Citocromo P450 [<i>Citrus sinensis</i>]	4868	At3g26310	0.3	0.4	0.4	0.7	0.6	0.6	0.3	0.4	0.4	0.6	0.6	1.2
Citocromo P450 [<i>Nicotiana tabacum</i>]	C03004G05	At3g48310	0.3	0.4	0.3	0.6	0.1	0.2	0.3	0.1	0.3	0.2	0.4	0.6
Citocromo c, probable [<i>A. thaliana</i>]	7022	At4g10040	0.2	0.7	0.2	0.6	0.3	0.6	0.8	0.9	0.4	1.0	0.6	0.9
Citocromo P450 [<i>Citrus sinensis</i>]	773	At3g26230	0.1	0.2	0.4	0.5	0.6	0.6	0.2	0.4	0.2	0.5	0.4	1.2
Carbohidrato oxidasa [<i>Helianthus annuus</i>]	C02015G07	At4g20840	-0.5	-0.2	0.4	0.5	-0.5	0.0	-0.3	0.1	-0.3	0.1	-0.3	1.0
GR citosólica (GRase) (GOR2)	6541	At3g24170	-0.4	0.0	0.0	0.4	-0.6	-0.3	-0.7	-0.4	-0.6	-0.4	-0.2	0.6
Complejo ubiquinol citocromo C reductasa (7.8 kDa), probable	1940	At1g15120	0.2	0.2	0.1	0.4	-0.2	0.2	-0.3	0.1	-0.4	-0.1	-0.3	0.4
Prot. función desconocida [<i>A. thaliana</i>]	2864	At3g24200	0.3	+	0.2	+	0.8	+	-	+	0.6	+	0.4	+
Citocromo P450 71D11	6104	At5g25140	0.4	+	0.7	+	-0.3	+	0.2	+	0.4	+	0.4	+
Prot. precursora de citocromo c1 [<i>Solanum tuberosum</i>]	2619	At5g40810	-	+	0.0	+	-		2.6		-	+	-	+

Tabla 34: Resumen de las principales familias de genes relacionados con el estrés oxidativo. Se indica el número de genes en cada una de ellas que se indujeron o reprimieron en: 1) Frutos tratados cuatro días con etileno (4 días Etileno); 2) Frutos tratados 14 h con 1-MCP y almacenados 14 días en atmósfera de aire pero que no sufren modificación con el tratamiento de etileno (14 h 1-MCP + 14 días Aire) (F); respuesta específica en el flavedo; (A):respuesta específica en el albedo; (F+A): respuesta en ambos tejidos; (Σ): sumatorio de todos los genes de cada familia con cambios en el flavedo, albedo o en ambos tejidos.

Proteína más similar	Inducción					Represión						
	4 días Etileno			14 horas 1-MCP + 14 días Aire - no a 4 días Etileno		4 días Etileno			14 horas 1-MCP + 14 días Aire - no a 4 días Etileno			
	F	A	F+A	Σ	F	A	F+A	Σ	F	A	F+A	Σ
Glutacion S-transferasasa (GST)	4	4	3	11	9			9	2			2
Tioredoxina (TRX)	1	1	1	3	3	1	4	4	2			2
Peroxidasa (POD)												
Ascorbato peroxidasa (APX)				4	2	1	3	3	1	1	2	2
Otras	1	2		1	1		1	1	1	1	2	4
Ferredoxina				1					1			1
Glutaredoxina	1			1	2	1	3	3				3
NAD(P)H quinona oxidoreductasa									1			1
Catalasa									1	2	3	3
Superóxido dismutasa (SOD)					3		3	3	1	1	3	3
Glutacion reductasa (GR)	1	1		2					1			1
Monidehidroascorbato reductasa (MDHAR)					1		1	1		1		1
Dehidroascorbato reductasa (DHAR)											1	1
Σ total	9	9	4	22	0	21	3	24	3	7	4	14
												15

Además de procesos de transporte de electrones, el análisis FatiGO+ de procesos biológicos mostró una inducción en el flavedo de los frutos recién acondicionados con la hormona de procesos de defensa relacionados con la interacción incompatible planta-patógeno (nivel 7) (Tabla 30). Analizando detalladamente este grupo de genes se observó que la gran mayoría de ellos correspondían a enzimas LOX y otras implicadas en la biosíntesis de ácido jasmónico así como reguladores, como PAD4, de la señalización dependiente de ácido salicílico, ácido jasmónico y etileno (Anexo III Tabla 64). Además, el análisis de ontologías génicas también reveló la activación en el flavedo de procesos de metabolismo del ácido jasmónico u oxilipinas (nivel 9) y de respuesta sistémica dependiente de ácido jasmónico y etileno (nivel 8), en respuesta al tratamiento con etileno (Anexo III Tabla 62). En base a estos resultados, se estudió con más detalle este conjunto de genes reunidos en la micromatriz '12K'. Asimismo, junto a éstos, se estudiaron otros genes de membrana con actividad lipasa o tioesterasa implicados en la degradación de lípidos y otros que participan en procesos de biosíntesis, elongación y β -oxidación de ácidos grasos. Además, se realizó una búsqueda de enzimas que participan en la biosíntesis de ceras epicuticulares para analizar su posible implicación en el desarrollo de esta alteración fisiológica (Tabla 35). En las Tabla 66-Tabla 68 del Anexo III se detalla la información de este conjunto de genes.

En este análisis el resultado más concluyente lo constituye el conjunto de genes que participan en la ruta metabólica de biosíntesis de ácido jasmónico y otras moléculas de la familia de las oxilipinas. Así, se observó un total de 9 genes que codifican enzimas LOX y a excepción de una de ellas, que presenta una respuesta diferencial en ambos tejidos, el resto se indujeron de forma específica en el flavedo en respuesta al etileno antes de la transferencia de los frutos acondicionados a aire. Es interesante señalar que 3 de ellos también se indujeron a los 4 días de almacenamiento en los frutos control mantenidos en aire pero, en ningún caso, se observó inducción en los frutos expuestos a 1-MCP a ese tiempo de almacenamiento. Asimismo, 7 de estos genes que codifican LOX incrementaron de forma progresiva sus niveles de acumulación de mensajero durante el almacenamiento en aire en los frutos acondicionados con la hormona, observándose al final del mismo un aumento en los niveles de este grupo de genes de al menos 4 veces con respecto a los iniciales correspondientes a los frutos RTC. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el análisis FatiGO+ referente a función molecular, que mostró una proporción significativamente elevada de genes con actividad lipoxigenasa entre el grupo de genes inducidos en los frutos acondicionados al final del almacenamiento. Por otro lado, al finalizar el periodo de almacenamiento en aire de los frutos expuestos a 1-MCP solamente dos de estos genes se indujeron y ambos lo hicieron en el albedo.

Siguiendo con la familia de genes que codifican enzimas de la β -oxidación de ácidos grasos, el número más elevado de genes inducidos se observó al final del periodo de almacenamiento en el albedo de los frutos tratados con 1-MCP. Es interesante señalar que la expresión de estos genes no se modificó en respuesta a etileno antes de la transferencia a aire. Por otro lado, fijándonos en el grupo de genes que codifican enzimas lipasas, fosfolipasas o estererasas, todas ellas implicadas en procesos de degradación de lípidos de membrana, se encontró un total de 10 genes inducidos en los frutos recién acondicionados con etileno, 6 de los cuales también lo fueron en los frutos expuestos a 1-MCP al final del almacenamiento y lo hicieron de forma más acusada. Además, en todos ellos estas respuestas fueron específicas del albedo, a excepción de un gen que codifica una fosfolipasa D, correspondiente al gen At2g42010 de *A. thaliana*, que se indujo en ambos tejidos aunque de forma más acusada en el albedo. En relación al grupo de genes implicados en la biosíntesis de ceras de la cutícula, algunos aumentaron su expresión en respuesta a etileno (4 días) y más aún en los frutos tratados con 1-MCP y almacenados en aire (14 días). Entre

éstos, diversos genes que codifican enzimas de condensación de ácidos grasos de cadena muy larga u otras enzimas de elongación de ácidos grasos. Otros, sin embargo no variaron en respuesta al tratamiento con etileno, como un gen que codifica una proteína ‘fiddlehead’ que aumentó dos veces su expresión en los frutos sin acondicionar expuestos o no a 1-MCP y almacenados 14 días en aire pero no en los frutos acondicionados ni antes ni después de la transferencia a aire. Por último, en los genes implicados en biosíntesis, elongación o desaturación de ácidos grasos apenas se observaron cambios significativos de expresión en las condiciones de almacenamiento estudiadas.

Tabla 35: Resumen del análisis de genes reunidos en la micromatriz ‘12K’ que codifican proteínas que participan en la biosíntesis de ácido jasmónico, degradación de lípidos de membrana o implicados en procesos de biosíntesis, elongación y β-oxidación de ácidos grasos. Para cada familia, se indica el número de genes que presentaron cambios significativos de expresión en los frutos de naranja ‘Navelate’ tratados 4 días con etileno y en los almacenados 14 días en aire inmediatamente después de tratarse 14 h con 1-MCP, con respecto a los frutos recién traídos de campo (RTC). Se indica el número de genes de respuesta específica del flavedo o del albedo, y los comunes a ambos tejidos.

Micromatriz '12K' - 'Navelate'	INDUCCIÓN								REPRESIÓN							
	4 días Etileno				14 horas 1-MCP + 14 días Aire [No Inducción 4 días Etileno]				4 días Etileno				14 horas 1-MCP + 14 días Aire [No Represión 4 días Etileno]			
	F	A	F+A	Σ	F	A	F+A	Σ	F	A	F+A	Σ	F	A	F+A	Σ
METABOLISMO DE LÍPIDOS																
Biosíntesis ácido jasmónico y Oxilipinas																
Lipoxigenasa (LOX)	8		1	9			2									
12-oxofitodienoato reductasa		1	1	2												
Aleno oxido ciclasa (AOS)	1			1												
S-adenosil-L-metionina: ácido jasmónico carboxilmetiltransferasa	2			2		1		1								
Síntesis de ácidos grasos, etapas iniciales																
Acetil-CoA carboxilasa / sintasa									1		1		2		2	
ACP-S-maloniltransferasa																
β-ketoacil-ACP sintasa	1			1									2		2	
Biosíntesis de ceras epicuticulares																
3-ketoacil-CoA sintasa / Elongasa de ácidos grasos	1			1	1	1		2								
Enzima de condensación de ácidos grasos de cadena muy larga	1	1		2		1		1								
Otras					2	1		2								
Biosíntesis y elongación de ácidos grasos de cadena larga																
Enoil-CoA reductasa																
3-ketoacil-CoA sintasa / Elongasa de ácidos grasos	1			1	1	1		2								
Enoil-ACP reductasa	1			1									1		1	
3-oxoacil-ACP reductasa													1		1	
3-oxoacil-ACP sintasa													1		1	
β-oxidación de ácidos grasos																
Acetil-CoA C-aciltransferasa	1			1	1			1					1		1	
Enoil-CoA hidratasa	1			1		4		4								
Dienoil-CoA isomerasa						3		3	1	1						
Acil-CoA oxidasa						1		1					1		1	
CoA ligasa de ácidos grasos de cadena larga																
Degradación de lípidos																
Lipasa / Fosfolipasa / Esterasa (hidrolasa) de lípidos	2	6	2	10	5	1		6	3		3		1	5		6
Otros																
Desaturasa de ácidos grasos													1		1	
Hidroperóxido liasa													2		2	
ACP ('acyl-carrier protein')	2			2	2			2								
Acil-activating enzyme'					1			1								
ΣTOTAL	21	9	4	34	4	24	1	26	0	3	2	5	3	15	0	18

Asimismo, en base a los resultados del análisis FatiGO+ de componente celular, que indicó una inducción marcado de sistemas de transporte de membrana en el albedo de los frutos recién acondicionados con etileno (Tabla 31A) y en el de los tratados con 1-MCP almacenados 14 días en aire (Tabla 31B), se analizó el conjunto de genes reunidos en la micromatriz que codifican transportadores inducidos en este tejido en las dos condiciones de almacenamiento (Anexo III Tabla 69 y Tabla 70). De forma resumida, el tratamiento con etileno indujo la expresión de genes que codifican transportadores ABC, de metales como el hierro, de nitratos, fosfatos y sulfatos así como implicados en el transporte de azúcares (Anexo III Tabla 69). Muchos de estos genes se indujeron también en los frutos tratados con el inhibidor al final de su almacenamiento. En estos últimos, destaca una gran abundancia de transportadores ABC, la mayoría inducidos de forma específica en esta condición, y de transportadores de metales, azúcares y aminoácidos. Además, se encontraron varios transportadores de nitratos, fosfatos, sulfatos y de micronutrientes como el potasio (Anexo III Tabla 70). Además, se analizaron los genes que codifican proteínas de unión a calcio que interviene en el transporte o señalización del mismo. En este análisis se encontró un elevado número de ellos cuya expresión se indujo en el albedo de los frutos tratados con 1-MCP y almacenados 14 días en aire, algunos de los cuales también se indujeron a los 4 días en el albedo por el tratamiento con etileno (Anexo III Tabla 71).

En el grupo de genes inducidos en el albedo en los frutos tratados con 1-MCP que presentaron el mayor ICC al final del almacenamiento se detectó una proporción significativa de genes que participan en la respuesta sistémica dependiente de etileno y ácido jasmónico y otros que codifican proteínas que participan en la respuesta de defensa a hongos y en procesos de ubiquitinación de proteínas, según indican los resultados del análisis FatiGO+. Entre los primeros, además de genes LOX y otros de la biosíntesis de ácido jasmónico, se encontraron genes de función muy diversa como los que codifican una quitinasa, una proteína GH3 de respuesta a auxinas, dos MAPK implicadas en procesos de señalización o 2 4CLs (Anexo III - Tabla 63). En relación al grupo de genes implicados en la respuesta de defensa a hongos, de un total de 14 genes incluidos en la micromatriz, 10 se indujeron en el albedo de los frutos tratados con 1-MCP a los 14 días (Tabla 36). Entre ellos, destacan dos genes que codifican una quitinasa (At3g12500), agrupada en el proceso anterior, que aumentó al menos 4 veces en el albedo, y la subunidad β de la proteína G (At4g34460), que se indujo 1,6 veces en el flavedo y 1,8 veces en el albedo. Además, se encontró un gen que codifica una sintaxina SYP121 (At3g11820) cuyos niveles de acumulación relativa del mensajero también aumentaron de forma significativa en respuesta al etileno en los frutos acondicionados antes de su transferencia a aire. Otros, codifican factores de transcripción o proteínas constituyentes de complejos de ubiquitinación, como la proteína ubiquitina ligasa SGT1. Asimismo, también relacionados con procesos de ubiquitinación (Tabla 37), se encontraron genes que codifican diversas proteínas con dominio 'armadillo', proteínas quinasas y otras ubiquitinas como una proteína de interacción con COP1.

Por otro lado, los genes implicados en procesos de biosíntesis de carbohidratos constituyeron un porcentaje significativamente representado en el grupo de genes reprimidos en el albedo de los frutos expuestos durante 14 h a 1-MCP y almacenados posteriormente 14 días en aire con respecto a los frutos RTC (Tabla 38). De un total de 66 genes implicados en dichos procesos reunidos en la micromatriz, 21 se incluyen en este grupo. Entre ellos, se encontró una gran abundancia de genes implicados en la biosíntesis de almidón, como dos genes que codifican enzimas ramificadores de 1,4- α -glucanos. Otros, codifican enzimas de biosíntesis de celulosa y de sacarosa u otros polisacáridos de la familia de rafinosas (RFOs). Entre ellos, destacan dos genes que codifican galactinol sintasas, uno

de los cuales, el gen *Gols2* (At1g56600), se reprimió hasta 5 veces en el albedo de los frutos acondicionados con etileno antes de ser transferidos a aire así como de los tratados con 1-MCP al final de su almacenamiento. Con este perfil también se encontró un gen que codifica una proteína precursora de CP12-2 (At3g62410), cuya disminución fue del orden de 4 veces respecto a los niveles iniciales (RTC). Éste y otros genes como el que codifica una fosfoglucomutasa (PGM; At5g51820) participan en la degradación de sacarosa por una vía anaerobia dando lugar a etanol y lactato.

Además, conviene señalar que, a diferencia de este último grupo de genes, a los 14 días de almacenamiento en el albedo de los frutos tratados con 1-MCP se encontró una abundancia de genes inducidos que participan en la respiración como dos succinato CoA ligasas (At2g20420 y At5g08300), una NAD⁺-isocitrato deshidrogenasa (At1g65930) o una fumarato hidratasa (At2g47510) (datos no mostrados; véase Fichero Excel 'Navelate' adjunto).

Tabla 36: Genes reunidos en la micromatriz '12K' relacionados en procesos de respuesta a la infección por hongos (nivel 6) que aumentaron su expresión en los frutos almacenados 14 días en aire inmediatamente después de tratarse con 1-MCP (Ver detalles en Tabla 25).

Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	FLAVEDO						ALBEDO					
			4 días		4 días + 14 días		4 días		4 días + 14 días		4 días		4 días + 14 días	
			Aire	Etileno MCP	Aire	Etileno MCP	Aire	Etileno MCP	Aire	Etileno MCP	Aire	Etileno MCP	Aire	Etileno MCP
Quitinasa [<i>Vitis vinifera</i>]	1061	At3g12500	-0.08	0.38	0.06	-0.19	-0.24	0.06	0.10	0.38	0.33	0.40	0.19	2.03
Prot. 5 de unión a DNA [<i>Nicotiana tabacum</i>]	3964	At5g56400	-0.61	-0.09	1.12	-0.24	-0.15	0.34	-0.56	0.58	1.81	-0.26	-0.14	1.75
Factor de transcripción WRKY1 [<i>Gossypium arboreum</i>]	6207	At1g80840	-0.21	-0.02	0.37	-0.47	-0.38	-0.23	-0.25	0.16	0.95	0.10	0.02	0.91
SGT1 [<i>Nicotiana benthamiana</i>]	C16016F04 / C31010A10	At4g11260	-0.14	-0.17	0.10	-0.13	-0.24	0.14	0.02	0.06	0.54	0.15	0.28	0.87
Prot. G - subunidad β [<i>Pisum sativum</i>]	C05073A03 / C20008F06	At4g24460	0.26	-0.11	0.36	0.45	0.35	0.65	0.20	0.18	-0.30	0.14	0.33	0.82
Avr9/Cf-9 rapidly elicited protein 276 [<i>Nicotiana tabacum</i>]	C34202B10	At1g29340	-0.09	-0.12	-0.12	-0.41	-0.21	0.21	-0.03	0.31	0.18	0.21	0.31	0.79
Sintaxina 121 (SYP121) / Prot. relacionada con sintaxina (SYR1)	C05140C08	At5g11820	-0.10	0.39	-0.11	-0.91	-0.75	0.32	0.08	0.71	0.22	0.12	0.16	0.64
Prot. con dedos de zinc tipo CCCH [<i>A. thaliana</i>]	1320	At2g40140	0.51	0.24	0.52	0.01	0.14	0.53	0.12	0.37	0.37	0.34	0.34	0.53
Prot. resistencia enfermedad [<i>A. thaliana</i>]	C18008B06	At2g34930	-0.45	-0.25	0.06	0.04	-0.01	-0.38	-	-0.07	0.27	0.24	-0.04	0.50
Fragmoplastina, probable [<i>Oryza sativa</i> (japónica cultivar-group)]	4508	At3g60190	0.41	-0.04	0.16	0.34	0.39	0.16	-0.29	-0.08	0.26	0.39	0.34	0.45

Tabla 37: Genes reunidos en la micromatriz '12K' implicados en procesos de ubiquitinación de proteínas (nivel 8) que aumentaron su expresión en los frutos almacenados 14 días en aire inmediatamente después de tratarse con 1-MCP. (Ver detalles en Tabla 25).

Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	FLAVEDO						ALBEDO						
			4 días		4 días + 14 días		4 días		4 días + 14 días		4 días		4 días + 14 días		
			Aire	Etileno	MCP	Aire	Etileno	MCP	Aire	Etileno	MCP	Aire	Etileno	MCP	Aire
Prot. de respuesta a fotoperíodo [<i>Solanum tuberosum</i> subsp. andigena]	C31303F10	At3g18710	0.07	0.19	0.31	-0.05	0.00	0.66	-0.16	0.69	0.58	0.88	0.88	0.88	1.15
'Anmadrillo repeat-containing protein' [<i>Nicotiana tabacum</i>]	C05134D01	At1g76390	0.38	0.37	0.32	0.09	0.20	0.74	0.56	0.56	0.39	0.45	0.54	0.97	
Prot. fúngica elicitora CMPG1 [<i>Petroselinum</i> sp]	C31304F06	At5g37490	0.09	0.40	0.25	-0.16	0.05	0.29	-0.11	0.28	0.26	0.26	0.07	0.83	
'Avr9/Cf-9 rapidly elicited protein 276' [<i>Nicotiana tabacum</i>]	C34202B10	At1g29340	-0.09	-0.12	-0.12	-0.41	-0.21	0.21	-0.03	0.31	0.18	0.21	0.31	0.79	
Prot. con dominio U-box [<i>A. thaliana</i>]	4646	At3g52450	0.12	0.21	-	-0.22	0.04	0.34	0.12	0.53	0.27	0.33	0.32	0.79	
Prot. quinasa [<i>A. thaliana</i>]	4353 / 2780	At2g19410	0.04	-0.14	0.20	-0.05	0.05	0.11	0.33	0.29	0.60	0.36	0.45	0.74	
Armadrillo/beta-catenin repeat protein' / U-box	2702	At3g07360	0.37	0.27	0.30	0.32	0.41	0.68	0.10	0.25	0.01	0.65	0.44	0.73	
Prot. con dominio U-box [<i>A. thaliana</i>]	C31501E04	At5g64660	-0.32	0.17	-0.11	-0.21	-0.23	0.12	-0.23	0.18	0.11	0.09	-0.18	0.68	
Prot. receptor quinasa, probable [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)]	2324	At2g45910	-0.06	-0.06	-0.08	-0.19	-0.45	0.15	0.21	0.28	0.48	0.29	0.52	0.61	
Polubiquitina	3770 / 6662 / C02026E02	At5g20620	-0.16	-0.02	-0.19	0.07	0.04	0.30	0.06	0.08	-0.02	-0.05	0.10	0.58	
Prot. ubiquitina de extensión	6871 / C08013C11	At2g47110	-0.18	-0.13	-0.22	0.03	0.03	0.40	0.20	0.11	-0.02	-0.08	0.21	0.57	
Prot. 'COPI-interacting protein' (CIP8) / Factor de transcripción con dedos de zinc 'C3HC4-type RING'	3911	At5g64920	-0.20	0.19	0.13	0.33	-0.03	0.17	0.25	0.12	-0.24	0.51	0.26	0.55	
Prot. ubiquitina fusión	3059 / C08028D10 / C08030D03	At3g52590	0.01	-0.01	-0.11	0.07	0.08	0.26	0.21	0.24	0.12	0.07	0.18	0.54	
'Anmadrillo repeat-containing protein', probable [<i>Oryza sativa</i> japonica cultivar-group]]	3417	At1g60190	-0.19	-0.06	-	0.14	0.14	0.17	0.08	-1.44	0.48	0.63	0.58	0.47	
Prot. quinasa [<i>A. thaliana</i>]	2774	At4g25160	0.22	-0.03	0.32	-0.13	-0.04	0.40	0.22	0.21	0.53	-0.06	0.13	0.46	
Prot. P0466H10.27 [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)]	C31108H01	At1g20780	-0.02	0.12	0.20	0.00	0.19	0.08	-0.05	0.03	0.25	0.06	0.08	0.22	
Prot. con dominio U-box [<i>A. thaliana</i>]	C31801H08	At3g11840	0.11	0.56	0.03	-0.80	-0.45	0.72	+	+	+	+	+	+	

Tabla 38: Genes reunidos en la micromatriz '12K' implicados en procesos de biosíntesis de carbohidratos (nivel 6) que disminuyeron su expresión en los frutos almacenados 14 días en aire inmediatamente después de tratarse con 1-MCP. (Ver detalles en Tabla 25).

Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	FLAVEDO						ALBEDO					
			4 días		4 días + 14 días		4 días		4 días + 14 días		Aire		MCP	
			Aire	Etileno	MCP	Aire	Etileno	MCP	Aire	Etileno	MCP	Aire	Etileno	MCP
TPA: celuloasa sintasa H2 [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)]	5581	At2g32540	0.05	0.24	-0.53	-0.27	-0.16	-0.88	-0.66	-0.24	-1.07	-1.56	-1.19	-3.12
Galactinol sintasa GolS2, probable [<i>A. thaliana</i>]	7038	At1g56600	-1.49	-1.49	-1.57	-1.37	-1.76	-2.17	-2.11	-2.63	-1.90	-1.93	-1.74	-2.60
Prot.precursor de CP12-2, cloroplasto	5687	At3g62410	-1.45	-1.53	-0.96	-0.86	-0.71	-2.69	-1.94	-2.17	-1.09	-0.80	-0.38	-2.33
Fagopirintol sintasa 2 [<i>Fagopyrum esculentum</i>]	3600	At2g47180	-1.24	-0.99	-1.32	-3.05	-1.12	-1.53	-1.53	-1.89	-1.63	-1.61	-1.75	-2.08
Galactinol sintasa, isoforma GolS-1 [<i>Ajuga reptans</i>]	2304	At1g60470	-0.86	-0.64	-0.53	-0.62	-0.64	-0.90	-1.24	-1.52	-1.03	-1.16	-1.20	-1.56
Enzima de biosíntesis de almidón '1,4- α -glucan branching enzyme' [<i>Phaseolus vulgaris</i>]	C02008F01	At5g03650	-0.73	-1.13	-0.60	-0.69	-0.60	-0.94	-0.85	-1.05	-1.01	-0.85	-0.76	-1.53
Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa B, cloroplasto precursor	6243	At1g42970	-0.99	-0.76	-0.25	-0.11	-0.08	-1.33	-1.22	-1.12	-0.44	-0.80	-0.34	-1.23
Enzima de biosíntesis de almidón '1,4- α -glucan branching enzyme'	C31708E02	At2g36390	0.03	0.07	-0.48	-0.05	-0.01	-0.46	-0.45	-0.46	-0.66	-0.61	-0.39	-1.20
Rafinosa sintasa [<i>Cucumis sativus</i>] / Galactinol-sacarosa galactosiltransferasa SIP1	6318	At5g40390	-0.58	-0.62	-0.80	-0.48	-0.44	-0.88	-0.18	-0.59	-0.56	-0.22	-0.26	-1.06
ADP-glucosa pirofosforilasa, subunidad pequeña [<i>Citrus unshiu</i>]	C31305H08	At5g48300	-0.06	-0.35	0.82	0.63	0.56	-0.69	-0.40	-1.08	-0.02	-0.09	0.03	-0.97
Fosfoglucomutasa PGM [<i>A. thaliana</i>]	6935	At5g51820	-0.08	-0.77	-0.31	-0.09	-0.37	-0.89	-0.01	-0.58	-0.08	0.06	-0.35	-0.76
Celuloasa sintasa [<i>Populus tremuloides</i>]	C03001C04	At4g39350	-0.84	-0.83	-0.88	-0.70	-0.84	-1.15	-0.56	-0.52	-0.49	-0.50	-0.61	-0.62
ADP-glucosa pirofosforilasa, subunidad grande [<i>Lycopersicon esculentum</i>]	5181	At1g27680	0.01	-0.16	-0.39	-0.02	-0.12	-0.25	-0.41	-0.32	-0.48	-0.33	-0.26	-0.53
Fator sigma [<i>Spinacia oleracea</i>]	CI6017D12	At3g53920	0.28	-0.12	0.19	-0.09	-0.03	-0.06	0.20	0.03	-0.08	-0.15	-0.24	-0.48
Glucano sintasa, probable [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)]	C02015B04	At4g04970	0.12	-0.02	-0.14	-0.04	0.15	0.26	0.03	0.06	-0.58	0.00	-0.13	-0.47
Epimerasa / deshidratasa depend. de NAD [<i>A. thaliana</i>]	4310	At3g62830	0.24	-0.07	-0.11	0.36	0.46	0.33	0.66	0.13	-0.12	0.62	0.48	-0.43
Inositol 3-fosfato sintasa (myo-inositol 1-fosfato sintasa)	C31706E09	At5g10170	-0.36	-0.08	-0.23	-0.07	-0.33	-0.30	-0.15	0.01	-0.47	-0.26	-0.37	-0.32
β -amilasa PCT-BMYI [<i>Solanum tuberosum</i>]	C32001B06	At4g17090	-0.49	0.31	-0.20	-0.10	-0.22	-0.19	-0.22	-0.18	-0.44	-0.17	-0.12	-0.29
Sacarosa sintasa SUS3, probable / sacarosa UDP-glucosiltransferasa	6597	At4g02280	0.05	-0.14	-0.03	0.05	0.10	0.06	0.16	-0.05	-0.10	0.21	0.14	-0.26
Sacarosa fosfatasa [<i>Lycopersicon esculentum</i>]	C34004F01	At2g35840	-0.19	-0.09	-	-	-	0.51	1.53	-0.17	-	-	-	-
Citocromo P450 83B1 (CYP83B1) [<i>A. thaliana</i>]	3452	At4g31500	-0.12	-0.46	-	-	-	-	-	-0.11	0.07	-	-	-

En la construcción de la micromatriz '12K' se incluyeron un total de 726 genes que codifican proteínas señalizadoras y factores de transcripción de acuerdo a la clasificación GO. El análisis más detallado de este conjunto de genes reveló que los cambios de expresión más relevantes se produjeron tanto en flavedo como en albedo en los frutos tratados con etileno antes de ser transferidos a aire y en los que presentaron el mayor ICC que corresponde a frutos tratados 14 h con 1-MCP y almacenados posteriormente 14 días en aire (Tabla 39A). Asimismo, en estas dos situaciones fue donde se observaron las mayores diferencias al comparar entre sí los dos tejidos que forman la corteza del fruto (Tabla 39B). Por ello, se seleccionaron estas dos condiciones de almacenamiento para el estudio en profundidad de este grupo de genes.

Tabla 39: Número de genes que codifican proteínas relacionadas con procesos de señalización celular y factores transcripción que aumentaron (+) o disminuyeron (-) su expresión (SAM, FDR<1%) en el flavedo y albedo de frutos de naranja 'Navelate' en respuesta a cada una de las condiciones almacenamiento estudiadas con respecto a los niveles iniciales correspondientes a los frutos RTC (A). Se indica el número de genes con mayor o menor nivel de expresión al comparar entre sí ambos tejidos en cada condición de almacenamiento (B).

		Micromatriz '12K' - 'Navelate'					
		4 días			14 días		
		Aire	Etileno	1-MCP	Aire	Etileno	1-MCP
A) Flavedo	+	4	32	1	12	2	41
	-	3	19	1	4	2	20
Albedo	+	24	43	5	13	19	151
	-	6	33	12	13	10	87

		4 días						14 días		
		Aire	Etileno	1-MCP	Aire	Etileno	1-MCP	RTC		
B) Flavedo vs Albedo	+	38	70	0	5	7	37	0		
	-	23	53	2	9	4	39	6		

En la Tabla 40 se representa un resumen con las principales familias de este grupo de proteínas indicando si la respuesta es específica o común a ambas situaciones, y si se produce en el flavedo, albedo o en ambos tejidos. En las Tabla 72-Tabla 75 del Anexo III se proporciona una información más detallada sobre estos genes. En el conjunto de estas familias de proteínas señalizadoras y reguladoras de la transcripción se observó un total de 42 genes que aumentaron de forma significativa sus niveles de expresión en respuesta a etileno en los frutos recién acondicionados, 31 de los cuales también se indujeron a los 14 días de almacenamiento en los frutos expuestos a 1-MCP. Entre los que solamente se indujeron en respuesta a etileno (Anexo III Tabla 72), se incluyen 5 genes que codifican diversas MAP kinasas y otro que da lugar a la enzima PI-PLC. Asimismo, se encontraron 3 genes que codifican factores de transcripción de respuesta a etileno, dos de los cuales, ERF5 y DDF1, también fueron específicos de esta condición. Otros genes que codifican miembros de la familias WRKY, NAM/NAC/ARF o MYC/MYB y diversas proteínas tipo 'zinc finger', bZIP, bHLH o HD-ZIP, se indujeron también en los frutos tratados con 1-MCP al final del almacenamiento en aire, y en algunos de ellos dicha inducción fue mucho mayor que en respuesta a etileno. Conviene señalar que la mayoría de estos genes se

agrupan en familias cuyos miembros se caracterizan por poseer un mismo dominio idéntico en estructura de unión al DNA aunque en la mayoría de los casos no se conocen sus genes diana ni los procesos que regulan. Por otro lado, si nos fijamos en el conjunto de genes que aumentaron su expresión en los frutos tratados con 1-MCP, observamos un número 3 veces mayor al de genes inducidos en respuesta a etileno y, en al menos un 60% de los casos, estas respuestas fueron específicas del albedo (Anexo III Tabla 73). Entre ellos, algunos codifican proteínas de señalización fundamentalmente tipo MAP kinasas y proteínas transmembrana ricas en residuos de leucina y otros, factores de transcripción de la familia AP2, como dos con homología a un ERF y un EREBP-4. Además, se observó una gran abundancia de genes ‘zinc finger’, MYB, bZIP y bHLH, aunque sino todos, la gran mayoría, con una función desconocida. Asimismo, destacan 5 genes que codifican HSFs y dos que codifican dos miembros de la familia YABBY.

Entre los genes reprimidos en respuesta a etileno se encontraron diversos genes que codifican proteínas de señalización y factores de transcripción de respuesta a etileno, WRKY, ‘zinc finger’ u otros de la familia MYB/MYC (Anexo III Tabla 74). La mayoría de ellos también mostraron niveles reducidos de expresión en los frutos expuestos a 1-MCP y almacenados 14 días en aire. Por el contrario, se encontró un número elevado de genes con una repuesta específica en estos últimos frutos (Anexo III Tabla 75). Entre ellos, 5 genes que codifican factores de transcripción de respuesta a auxinas y 8 de la familia MADS-box, y en todos ellos, esta respuesta fue específica del albedo. Por último, se encontraron genes que codifican proteínas que forman parte de los complejos TFIID y CBF/NF-Y.

El conjunto de estos resultados pone de manifiesto que el tratamiento con etileno favorece la activación de procesos de señalización y de regulación de la transcripción aunque el número de genes que mostraron cambios significativos fue mucho mayor en los frutos almacenados 14 días en aire después de haber sido tratados con 1-MCP, que fueron los que presentaron el mayor ICC.

Tabla 40: Principales familias de genes incluidos en la micromatriz '12K' que codifican proteínas relacionadas con procesos de señalización celular y factores transcripción con expresión en los frutos recién acondicionados con etileno (4 días Etileno) y en los frutos expuestos durante 14 h a 1-MCP y almacenados 14 días en aire (1-MCP + Aire). (●): genes específicos de flaveado; (●): genes específicos de albedo; (●) genes comunes en flaveado y albedos; (Σ esp) número de genes de cada familia específicos en cada una de estas condiciones de estudios; (Σ) número total de genes de respuesta a etileno y a la combinación de 1-MCP y aire.

Micromatriz '12K' 'Navelate'	Inducción										Represión										
	4d Etileno					14h 1-MCP + 14d Aire No.en.4d.Etileno					4d Etileno					14h 1-MCP + 14d Aire No.en.4d.Etileno					
	A	F	A+F	Σ	Σ esp.	A	F	A+F	Σ	Σ esp.	A	F	A+F	Σ	Σ esp.	A	F	A+F	Σ	Σ esp.	
Señalización																					
MAP Kinasas	3	2	2	7	5	6	1	1	1	8	2+8=10						0	1	1	2	2
Receptores de etileno					0	1	1			2	2					0					0
Otras	4		2	6	1	13				13	5+13=18	1	2	1	4	2	6				6
Factores de Transcripción																					
Complejo TFIID	1			1	0					0	1+0=1	2			2	0	2				2
Factores transcripción - respuesta a etileno	1	1	1	3	2	6	1	1	1	8	1+8=9	2			2	1	5				5
Factor transcripción WRKY	3	2	1	6	0	2				3	6+3=9	1			1	0	3	1			4
No apical meristem (NAM) / NAC / Fac. transcripción ARF	1	2	1	4	1	3	1	1	1	5	3+5=8					0	6	1			7
Factor transcripción MYB / MYC	1		4	5	0	5			1	6	5+6=11	3		3	6	0	3				3
Factor transcripción Zinc Finger	3	1	3	7	0	14				14	7+14=21	4	2	2	8	3	2	1			3
Factor transcripción bZIP	1		1	2	0	7			1	8	2+8=10	1	1		2	0					0
Factor transcripción bHLH	1	1		2	1	5			1	6	1+6=7				0	0					0
Factor transcripción HD-ZIP	1		1	2	1	1				1	1+1=2				0	0					0
Factor transcripción MADS-box					0	1				1	1	1			1	0	8				8
Factor transcripción HSF					0	5				5	5				0	0	1				1
Factor transcripción de unión a CCAAT-box (CBF)												1				1	1	1	1		2
Factor transcripción familia YABBY			1	1	0	2				2	1+2=3				1	0	1				1
Σ _{TOTAL}	20	9	17	46	11	71	4	7	7	82	117	15	7	7	28	7	37	5	2	44	66

2.3. Análisis comparativo de los cambios de expresión génica en el flavedo y el albedo de frutos de 'Navelate' tratados con etileno o con 1-MCP mediante empleo de micromatrices de cDNA.

El análisis comparativo de los genes que mostraron diferencias significativas de expresión entre los dos tipos de tejido que constituyen la corteza de los frutos cítricos, flavedo y albedo, indicó que en los frutos recién traídos de campo (RTC) el flavedo es un tejido más enriquecido en genes que participan en la formación de la cutícula (nivel 5), en la biosíntesis de fenilpropanoides (nivel 7) y en la respuesta sistémica dependiente de etileno y ácido jasmónico (nivel 8), que incluye la biosíntesis de ácido jasmónico y oxilipinas (nivel 9) (Tabla 41). Además, en estos frutos, este análisis reveló un mayor número de genes en el flavedo implicados en transporte de electrones, transporte de lípidos (nivel 5), metabolismo del triptófano e indolalquilaminas, así como de genes implicados en la biosíntesis de aminoácidos aromáticos y flavonoides. Por el contrario, en el albedo de estos mismos frutos se encontró un mayor porcentaje de genes inducidos relacionados con la respuesta a estrés (nivel 3) o implicados en procesos del metabolismo de proteínas celulares (nivel 5). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre ambos tejidos en los frutos recién acondicionados con etileno o en los expuestos durante 14 h a 1-MCP y almacenados posteriormente 4 días en aire. No obstante, al final del periodo de almacenamiento en los frutos que habían sido acondicionados con etileno durante 4 días y posteriormente transferidos a aire se encontró una mayor expresión en el flavedo de genes de biosíntesis de compuestos aromáticos (nivel 5), derivados de aminoácidos, fenilpropanoides (nivel 6) y de isoprenoides (nivel 7), así como implicados en la biosíntesis de ácido jasmónico y oxilipinas (nivel 9). En el albedo, sin embargo, se encontró una proporción mayor de genes que participan en procesos de biosíntesis y organización de componentes celulares (nivel 3). En los frutos expuestos al inhibidor de la acción del etileno se observó un elevado número de genes con mayor expresión en este último tejido respecto del flavedo implicados en procesos del metabolismo de proteínas (nivel 5) y otros relacionados con respuestas de defensa a patógenos típicas de una interacción incompatible (nivel 7) o que forman parte de la ruta de biosíntesis del etileno (nivel 9). En estos frutos, los genes que intervienen en la biosíntesis de pigmentos (nivel 5) y más concretamente del IPP, compuesto precursor de isoprenoides como los carotenoides (nivel 8), mostraron mayores niveles de expresión en el flavedo que en el albedo, formando una categoría funcional estadísticamente sobrerrepresentada en el primero de estos dos tejidos. Por último, es interesante señalar que los procesos de desarrollo de la cutícula (nivel 5) y de biosíntesis de ceras (nivel 9) fueron procesos altamente representados en el flavedo tanto en los frutos control como en los expuestos a 1-MCP almacenados 14 días en aire.

Tabla 41: Análisis FatiGO+ (BABELOMICS) de los procesos biológicos que mostraron cambios significativos al comparar entre sí los tejidos de flavedo y albedo para cada una de las condiciones estudiadas. Se indican aquellos procesos biológicos que para una determinada condición están más representados en el flavedo (A) o en el albedo (B). N: nivel de especificidad en el análisis (Ver detalles en Tabla 17).

A) Flavedo > Albedo		4 días			14 días		
		RTC	Aire	Etileno	1-MCP	Aire	Etileno
N.4	Respuesta a herida					3.35E-02	
	Procesos de biosíntesis de la célula	1.10E-02				8.82E-04	2.63E-03
N.5	Transporte de lípidos		4.57E-02				
	Transporte de electrones		4.52E-02				
	Desarrollo de la cutícula	1.04E-02			9.10E-04		2.77E-03
	Biosíntesis de compuestos aromáticos					9.02E-03	
	Biosíntesis de pigmentos						3.05E-02
N6	Biosíntesis de derivados de aminoácidos				4.96E-02		7.49E-03
	Metabolismo de fenilpropanoides						2.89E-03
N.7	Biosíntesis de fenilpropanoides	2.26E-03					
	Biosíntesis de isoprenoides						1.78E-02
N8	Respuesta sistémica dependiente de etileno y ácido jasmónico	1.58E-02	2.96E-03				4.50E-02
	Metabolismo del triptófano		3.68E-03				
	Biosíntesis de indolalquilaminas		3.68E-03				
	Biosíntesis de aminoácidos aromáticos		3.03E-02				
	Biosíntesis de flavonoides		3.70E-02				
	Metabolismo de oxilipinas				4.94E-02		
	Biosíntesis de isopentenil difosfato						4.54E-02
N9	Metabolismo del ácido jasmónico	1.62E-02	7.23E-04				1.78E-02
	Biosíntesis de oxilipinas	1.62E-02	7.23E-04				1.78E-02
	Biosíntesis de ceras	3.28E-03			9.55E-03		2.59E-02
B) Albedo > Flavedo		4 días			14 días		
		RTC	Aire	Etileno	1-MCP	Aire	Etileno
N.3	Respuesta a estrés		2.86E-03				
	Biosíntesis y organización de componentes celulares						7.49E-03
N5	Procesos del metabolismo de proteínas celulares		6.40E-03				1.28E-04
N7	Respuesta de defensa-interacción incompatible						3.20E-02
N9	Biosíntesis de etileno						2.42E-02

Siguiendo con la comparación entre flavedo y albedo, en la Tabla 42 se resumen los resultados obtenidos en el análisis FatiGO+ que hacen referencia a función molecular y componente celular del grupo de genes que mostraron diferencias significativas de expresión entre ambos tejidos en cada una de las situaciones estudiadas. El conjunto de estos resultados ponen de manifiesto que la aplicación de etileno favorece una mayor expresión en el flavedo de genes con actividad peroxidasa y oxidoreductasa dependiente de NADP(H) (nivel 5). Sin embargo, al final del almacenamiento solamente en los frutos no acondicionados con etileno, tratados o no con 1-MCP, se observó una abundancia de este grupo de genes con actividad oxidoreductasa más expresados en el flavedo que en el albedo. Asimismo, de acuerdo a resultados previos obtenidos en este trabajo, este análisis indicó que el etileno también favorece en el flavedo la expresión de genes con actividad lipoxigenasa (nivel 6) en los frutos acondicionados después de ser almacenados durante un periodo adicional de 10 días en aire (4 días Etileno + 10 días Aire), y en el albedo de estos mismos frutos antes de su transferencia a aire (4 días Etileno), de genes de unión a ácidos nucleicos y otros que codifican componentes estructurales del ribosoma (nivel 3). Una proporción significativamente elevada de estos últimos también se observó en el albedo de los frutos expuestos a 1-MCP y almacenados 14 días en aire. El conjunto de estos resultados parece indicar que muchas de las respuestas que se producen en los frutos recién acondicionados con etileno suceden de forma más tardía en los frutos sin acondicionar expuestos al inhibidor de su acción al final del almacenamiento y que presentan un elevado ICC. Por último, destacar que genes que codifican factores de transcripción (nivel 5) formaron una categoría funcional estadísticamente sobrerrepresentada con mayor expresión en el albedo respecto del flavedo en los frutos acondicionados con etileno al final del periodo de almacenamiento pero no en el resto de frutos tratados con 1-MCP o almacenados directamente en aire.

El análisis de componente celular puso de manifiesto que una gran parte de las proteínas codificadas por genes que mostraron mayor expresión en el flavedo que en el albedo en los frutos tratados con etileno antes del almacenamiento en aire, se encuentran localizadas en el sistema de endomembranas, plastidios, parte tilacoidal y cloroplasto. Sin embargo, la localización en el ribosoma predomina entre las proteínas correspondientes a los genes que tuvieron mayor nivel de expresión en el albedo. Por otro lado, a los 14 días de almacenamiento en los frutos que presentaron el mayor índice de daño inicialmente tratados con 1-MCP, se observó que las proteínas localizadas en orgánulos unidos a membranas (nivel 3) están más representadas en el flavedo, mientras que las no unidas a membrana por el contrario son más abundantes en el albedo (nivel 7).

Tabla 42: Análisis FatiGO+ (BABELOMICS) de las funciones moleculares (1) y componente celulares (2) que mostraron cambios significativos al comparar entre sí los tejidos de flavedo y albedo para cada una de las condiciones estudiadas. N: nivel de especificidad en el análisis (Ver detalles en Tabla 17).

FatiGO+ Flavedo vs Albedo Micromatriz '12K' - 'Navelate'

1) Función Molecular

A) Flavedo > Albedo		4 días			14 días		
Función Molecular	RTC	Aire	Etileno	1-MCP	Aire	Etileno	1-MCP
N.3 Unión a oxígeno Unión a tetrapirroles Activ. Oxidoreductasa		5.09E-05	4.04E-02		3.47E-04		3.00E-04
N.4 Activ. Monooxigenasa	1.62E-02	1.70E-02					
N.5 Activ. Peroxidasa Activ. Oxidoreductasa depend. de NADP(H) Activ. Transferasa			1.36E-02		3.42E-02	1.78E-02	
N.6 Activ. Lipoxigenasa Activ. Aciltransferasa Activ. Farnesiltransferasa Activ. enzima málico	1.63E-02	9.22E-03	4.72E-02		2.91E-02		1.06E-04
		3.84E-02					
			4.60E-02				
B) Albedo > Flavedo		4 días			14 días		
Proceso Biológico	RTC	Aire	Etileno	1-MCP	Aire	Etileno	1-MCP
N.3 Componente estructural del ribosoma Unión a ácidos nucleicos		1.86E-05					1.32E-02
N.5 Activ. Factor de transcripción					1.07E-02		
N.6 Activ. GTP-binding					1.05E-02		
		2.34E-02					

2) Componente Celular

A) Flavedo > Albedo		4 días			14 días		
Componente Celular	RTC	Aire	Etileno	1-MCP	Aire	Etileno	1-MCP
N.3 Orgánulos unidos a membrana							2.59E-02
N.5 Sistema endomembrana		2.84E-04	3.99E-02				
N.8 Subcompartimento de orgánulos celulares			2.21E-02				
N.9 Cloroplasto Parte tilacoidal Plastidios			1.42E-02				4.22E-04
			2.45E-02				
			4.94E-02				
B) Albedo > Flavedo		4 días			14 días		
Proceso Biológico	RTC	Aire	Etileno	1-MCP	Aire	Etileno	1-MCP
N.4 Intracelular						3.97E-02	
N.5 Parte Intracelular		1.00E-02					
N.7 Orgánulos intracelulares no unidos a membrana							2.59E-02
N.8 Ribosoma			7.13E-04				

3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN EN RESPUESTA A DIFERENTES SITUACIONES DE ESTRÉS EN LA POSTCOSECHA DE LOS FRUTOS CÍTRICOS POR ANÁLISIS NORTHERN.

3.1. Selección de factores de transcripción.

De las 50 ESTs (del inglés 'Expressed Sequence Tags') aisladas de la biblioteca de cDNA 'FlavCurFr1' que presentaban similitud con diversos factores de transcripción se seleccionaron 22. Para dicha selección se tuvo en cuenta el nivel de similitud con factores de transcripción de función conocida, el número de repeticiones en la biblioteca y la especificidad de los mismos en relación a 13000 genes procedentes de diferentes variedades de cítricos, tejidos u órganos en distintos estadios o sometidos a diferentes condiciones de estrés biótico y abiótico, depositados en la base de datos del CFGP (Forment *et al.*, 2005) (<http://bioinfo.ibmcp.upv.es/genomics/cfgpDB/>).

El 55% de los genes seleccionados fueron 'singletons' y el resto 'contigs' que presentaban homología con factores de transcripción. En la Tabla 43 se reúne el conjunto de genes que mostraron homología con factores de transcripción, indicando aquellos que fueron seleccionados para el análisis de expresión mediante hibridación Northern en relación a su posible implicación en el mecanismo de tolerancia a las bajas temperaturas de conservación que causan 'daños de frío' inducida por el curado (apartado 3.2.), en respuesta al estrés por herida mecánica (apartado 3.3.) en frutos de mandarinas de la variedad 'Fortune' y en relación al efecto beneficioso del tratamiento con etileno que reduce la incidencia del 'colapso de la corteza' en frutos de naranjas 'Navelate' almacenados a 20 °C y 90-95% HR (apartado 3.4.). Dichos genes se describen con más detalle en la Tabla 44.

Tabla 43: Lista del conjunto de ESTs de la biblioteca de cDNA 'FlavCurFr1' que mostraron homología con factores de transcripción en la base de datos de proteínas no redundante del GenBank. Para cada clon se indica el valor esperado (E-value) ($\leq 10^{-5}$), si constituye un 'singleton' o si pertenece a un 'contig', indicando en tal caso el número de ESTs presentes en la biblioteca de cDNA y el número total de representantes del 'contig' en la base de datos del CFGP. (●) Clones seleccionados para el análisis de expresión génica mediante hibridación Northern en el estudio de la tolerancia al frío y la respuesta a estrés por herida mecánica en frutos de mandarina 'Fortune' y en relación al efecto beneficioso del tratamiento con etileno que reduce la incidencia del 'colapso de la corteza' en frutos de naranja 'Navelate'.

Factores de Transcripción en la biblioteca de cDNA 'FlavCurFr1'

Clon	Proteína más similar	E - value	Singl./ Contig	n° ESTs / 'FlavCurFr1'	n° ESTs / CFGP
C06013H07	Factor de transcripción IIA, subunid. grande TFIIA-L [<i>A. thaliana</i>]	1.00E-57	Contig	1	2
C06001E02	Prot. "TATA-binding 2" (TBP2) [<i>Nicotiana tabacum</i>]	9.00E-14	Singl.	1	1
C06003F10	Factor de transcripción familia WRKY [<i>A. thaliana</i>]	5.00E-41	Singl.	1	1
C06009F11	Factor de transcripción familia WRKY [<i>A. thaliana</i>]	2.00E-08	Contig	1	2
C06019B06	Factor de transcripción WRKY4 [<i>Vitis aestivalis</i>]	5.00E-56	Contig	1	4
C06005G12	Factor de transcripción TINY conteniendo dominio AP2, probable [<i>A. thaliana</i>]	1.00E-11	Contig	1	2
C06001C03	Factor de transcripción conteniendo dominio AP2, probable [<i>A. thaliana</i>]	1.00E-08	Contig	1	3
C06003E05	Factor de transcripción conteniendo dominio AP2, probable [<i>A. thaliana</i>]	2.00E-05	Singl.	1	1
C06007H11	Coactivador transcripcional de respuesta a etileno, probable [<i>A. thaliana</i>]	2.00E-46	Contig	2	4
C06013E12	Co-activador transcripcional de respuesta a etileno, probable [<i>A. thaliana</i>]	2.00E-46	Contig	2	4
C06023F07	Co-activador transcripcional de respuesta a etileno, probable [<i>A. thaliana</i>]	6.00E-54	Contig	2	4
C06023F08	Coactivador transcripcional de respuesta a etileno, probable [<i>A. thaliana</i>]	2.00E-54	Contig	2	4
C06003G03	Factor de transcripción ERF, probable [<i>A. thaliana</i>]	1.00E-42	Singl.	1	1
C06003G10	Factor de transcripción 7a de respuesta a auxinas (ARF7a), probable [<i>Oryza sativa</i> (japonica)]	5.00E-22	Singl.	1	1
C06015A04	Prot. IAA9 [<i>Nicotiana tabacum</i>]	7.00E-43	Singl.	1	1
C06023D09	Prot. Aux/IAA [<i>Oryza sativa</i> (indica cultivar-group)]	1.00E-04	Singl.	1	1
C06007A06	Prot. de respuesta a la deficiencia en hierro, probable [<i>A. thaliana</i>]	8.00E-85	Contig	1	8
C06009D04	Prot. 'zinc finger' familia PHD, probable [<i>A. thaliana</i>]	1.00E-59	Contig	1	2
C06019C11	Prot. 'zinc finger' familia 'C3HC4 RING finger' [<i>A. thaliana</i>]	4.00E-51	Singl.	1	1
C06013A04	Prot. 'zinc finger' LSD1 [<i>Brassica oleracea</i>]	3.00E-24	Contig	1	3
C06015E08	Prot. 'zinc finger' familia CCCH [<i>A. thaliana</i>]	1.00E-37	Contig	1	3
C06007A11	Prot. 'zinc finger' familia 'C3HC4 RING finger' [<i>A. thaliana</i>]	1.00E-13	Contig	2	4
C06007B01	Prot. 'zinc finger' familia 'C3HC4 RING finger' [<i>A. thaliana</i>]	3.00E-21	Contig	2	4
C06019D03	Prot. 'zinc finger' familia C2H2 [<i>A. thaliana</i>]	5.00E-25	Contig	1	6
C06015H02	Prot. 'zinc finger' [<i>Oryza sativa</i> (indica cultivar-group)]	1.00E-66	Contig	1	24
C06001B11	Prot. 'zinc finger' familia DHHC [<i>A. thaliana</i>]	3.00E-15	Singl.	1	1
C06011C08	Prot. 'zinc finger' familia 'C3HC4 RING finger' [<i>A. thaliana</i>]	3.00E-55	Singl.	1	1
C06011G10	Prot. 'zinc finger' familia 'C3HC4 RING finger' [<i>A. thaliana</i>]	2.00E-25	Singl.	1	1
C06013E05	Prot. 'zinc finger' familia GATA [<i>A. thaliana</i>]	1.00E-12	Singl.	1	1
C06023F04	Prot. 'zinc finger' familia B-box [<i>A. thaliana</i>]	1.00E-52	Singl.	1	1

Continuación de la Tabla 43

Clon	Proteína más similar	E - value	Singl./ Contig	n° ESTs / 'FlavCurFr'	n° ESTs / CFGP
C06005D11	Factor de transcripción familia MAD-box [<i>Vitis vinifera</i>]	9.00E-69	Contig	1	4
C06019F09	Factor de transcripción familia MAD-box [<i>Betula pendula</i>]	9.00E-40	Contig	1	12
C06021G09	Factor de transcripción familia MAD-box relacionada con SEP3; PTM6 [<i>Populus tremloides</i>]	1.00E-114	Contig	1	20
C06001A02	Prot. 'HOMEBOX KNOTTED-1 LIKE 4' (KNAT4) [<i>A. thaliana</i>]	1.00E-14	Contig	1	2
C06009G12	Factor de transcripción de unión a 'CCAAT-box', probable [<i>A. thaliana</i>]	6.00E-33	Contig	1	2
C06013F07	Prot. TAF2 de unión a 'G-box' - common tobacco [<i>Nicotiana tabacum</i>]	2.00E-41	Singl.	1	1
C06023H01	Prot. con homeodominio HB2 [<i>Populus tremula</i> x <i>Populus tremloides</i>]	2.00E-36	Contig	1	4
C06021B01	Factor de transcripción familia MYB [<i>A. thaliana</i>]	2.00E-47	Contig	1	2
C06013H06	Factor de transcripción familia MYB [<i>Catharanthus roseus</i>]	3.00E-35	Singl.	1	1
C06001G08	Factor de transcripción familia MYC [<i>Solanum tuberosum</i>]	7.00E-14	Singl.	1	1
C06017F01	Prot. 'fringe-related' [<i>A. thaliana</i>]	1.00E-43	Contig	1	1
C06021A08	Prot. Con dominio NAC, probable [<i>Solanum tuberosum</i>]	8.00E-26	Contig	1	1
C06017B03	Factor de transcripción 'NLI-interacting', probable [<i>Oryza sativa</i> (japonica)]	2.00E-51	Contig	1	2
C06011E12	Prot. 'pseudo-response regulator 7' (APRR7) [<i>A. thaliana</i>]	8.00E-24	Contig	1	3
C06005F11	Prot. reguladora de transcripción, probable [<i>A. thaliana</i>]	7.00E-13	Contig	2	6
C06017G06	Prot. reguladora de transcripción del complejo CCR4-NOT [<i>A. thaliana</i>]	1.00E-82	Contig	2	6
C06001D10	Co-regulador transcripcional SEUSS [<i>A. thaliana</i>]	6.00E-56	Singl.	1	1
C06013D08	Prot. Con dominio SET (SUVH1) [<i>A. thaliana</i>]	4.00E-43	Singl.	1	1
C06017B01	Prot. Similar a activador transcripcional CBF1 [<i>A. thaliana</i>]	9.00E-14	Singl.	1	1
C06019A04	Prot. 'Heat shock transcription factor 5' (HSTF5), probable [<i>A. thaliana</i>]	1.00E-05	Singl.	1	1

Tabla 44: Caracterización de los clones que presentaron homología con factores de transcripción seleccionados en la biblioteca de cDNA 'FlavCurFr1'. Para cada clon se indica la homología de la secuencia o proteína más similar, la longitud de la secuencia EST (pb), si constituye un 'singleton' o si pertenece a un 'contig' en cuyo caso se indica el número de representantes así como el valor esperado ($E \leq 10^{-5}$), el número de acceso en la base de datos de proteínas no redundantes del GenBank, el porcentaje de identidad y el número de aminoácidos de la proteína.

Proteína más similar	Clon	Longitud (pb)	Contig/ Singl.	n° repres/ contig	Valor de E	N° Acceso	Identidad de proteína (%)	n° aminoác.
Co-regulador transcripcional SEUSS [<i>A. thaliana</i>]	C06001D10	785	singleton		6.00E-39	AAL57277.1	59	877
Factor de transcripción 'NLI-interacting', probable [<i>Oryza sativa</i> (japonica)]	C06017B03	489	2368	2	8.00E-66	AAG51609.1	87	444
Co-activador transcripcional de respuesta a etileno, probable [<i>A. thaliana</i>]	C06023F07	768	5543	6	7.00E-54	NP_565981.1	84	142
Prot. reguladora de transcripción del complejo CCR4-NOT [<i>A. thaliana</i>]	C06017G06	756	5563	6	1.00E-82	NP_192809.1	78	1074
Factor de transcripción 7a de respuesta a auxinas (ARF7a), probable [<i>Oryza sativa</i> (japonica)]	C06003G10	554	singleton		5.00E-22	BAD19062.1	91 / 100	1107
Activador transcripcional CBF1 / 'C-repeat/ DRE binding protein', probable	C06017B01	637	singleton		4.00E-18	AAG51609.1	47	248
Factor de transcripción ERF, probable [<i>A. thaliana</i>]	C06003G03	821	singleton		1.00E-42	CAE09167.1	80	149
Prot. 'Heat shock transcription factor 5' (HSTF5), probable [<i>A. thaliana</i>]	C06019A04	1005	singleton		1.00E-05	NP_176964.1	65	374
Prot. 'HOMEODOMAIN KNOTTED-1 LIKE 4' (KNAT4) [<i>A. thaliana</i>]	C06001A02	877	2610	2	5.00E-20	CAC03454.1	100	393
Factor de transcripción familia MAD box [<i>Vitis vinifera</i>]	C06005D11	851	4899	4	9.00E-69	AAK58564.1	81	225
Factor de transcripción familia MYB [<i>Catbaranthus roseus</i>]	C06013H06	679	singleton		3.00E-35	CAC19789.1	92 // 48	693
Factor de transcripción familia MYC [<i>Solanum tuberosum</i>]	C06001G08	477	singleton		7.00E-14	CAF74711.1	66	646
Factor de transcripción IIA, subunid. grande 'TFIIA-L' [<i>A. thaliana</i>]	C06013H07	757	2113	2	1.00E-57	CAC19789.1	66	375
Prot. 'TATA-binding 2' (TBP2) [<i>Nicotiana tabacum</i>]	C06001E02	650	singleton		2.00E-14	XP_469080.1	100/95/100	203
Factor de transcripción familia WRKY [<i>A. thaliana</i>]	C06003F10	770	singleton		4.00E-41	NP_199763.1	62	399
Factor de transcripción familia WRKY [<i>A. thaliana</i>]	C06009F11	821	2690	2	2.00E-08	NP_193551.1	46	318
Factor de transcripción WRKY4 [<i>Vitis aestivalis</i>]	C06019B06	785	5125	4	5.00E-56	AAR37421.1	70	311
Prot. 'zinc finger' familia 'C ₃ HC ₄ RING finger' [<i>A. thaliana</i>]	C06007B01	608	4920	4	5.00E-30	NP_565942.1	45	328
Prot. 'zinc finger' familia 'C ₃ HC ₄ RING finger' [<i>A. thaliana</i>]	C06011C08	800	singleton		3.00E-55	NP_566651.1	79	340
Prot. 'zinc finger' familia 'C ₃ HC ₄ RING finger' [<i>A. thaliana</i>]	C06011G10	797	singleton		2.00E-25	NP_194388.1	70	464
Prot. 'zinc finger' LSD1 [<i>Brassica oleracea</i>]	C06013A04	790	4276	3	3.00E-24	gb AAL50981.1	70-52-60	193
Prot. 'zinc finger' familia B-box [<i>A. thaliana</i>]	C06023F04	762	singleton		5.00E-52	NP_565507.1	84	172

3.2. Estudio de la expresión de factores de transcripción en respuesta a los tratamientos de acondicionamiento térmico que previenen la aparición de ‘daños de frío’ en frutos de mandarina de la variedad ‘Fortune’.

Los genes estudiados se clasificaron en 7 patrones de expresión teniendo en cuenta su regulación por frío, calor y la combinación de calor y frío (Tabla 45). En los patrones 1 y 2 se incluyeron aquellos genes cuyo nivel de expresión en los frutos curados y almacenados en frío fue superior al de los frutos expuestos directamente al frío ($C+F > F$) (Figura 41). En los patrones 3, 4 y 5 se englobaron los genes cuya expresión fue superior en los frutos no curados respecto a los frutos acondicionados durante el almacenamiento en frío ($C+F < F$). Por último, en un tercer grupo, se incluyeron todos aquellos que apenas mostraron diferencias entre ambos tipos de frutos, acondicionados y sin acondicionar, a lo largo del almacenamiento a bajas temperaturas que causan ‘daños de frío’ ($C+F = F$).

En el patrón 1 se agruparon los genes que aumentaron su nivel de expresión a 2 °C en los frutos previamente acondicionados pero que no se indujeron en respuesta al calor durante los 3 días de curado ni al frío en los frutos no acondicionados. Dentro de este patrón se incluyeron 4 genes. Uno de ellos presentaba homología con una TATA-binding protein (TBP), que forma parte del complejo TFIID del aparato basal de la transcripción, y el resto con factores de transcripción de la familia WRKY. La acumulación del factor TBP en los frutos curados y almacenados a 2 °C fue transitoria, alcanzándose un máximo a los 20 días de almacenamiento a 2 °C. Un incremento similar ocurrió en la acumulación del transcrito WRKY correspondiente al clon C06009F11, aunque dicho incremento fue superior y se mantuvo durante más tiempo en respuesta a la combinación de calor y frío. El efecto del calor en el WRKY del clon C06003F10 fue claramente inferior. La expresión del gen correspondiente al clon C06019B06 no aumentó por la combinación del calor y frío. Sin embargo, el curado retrasó la caída de expresión del gen durante el almacenamiento de los frutos en frío. Los cambios en la acumulación de estos mensajeros a 12 °C fueron poco relevantes, excepto en el caso del WRKY C06009F11, que aumentó hasta 1,8 veces a esta temperatura.

De los 22 factores de transcripción sólo uno (C06013H07) pertenece al patrón de expresión 2 por presentar una inducción en respuesta al frío ‘per se’ aunque mostró un nivel de expresión mayor en los frutos previamente acondicionados después de 20 días de almacenamiento en frío. La expresión de este gen, homólogo al factor de transcripción TFIIA, aumentó en respuesta al frío en los frutos no acondicionados después de 1 día de almacenamiento a 2 °C aunque a los 60 días la acumulación relativa de sus transcritos en los frutos curados fue aproximadamente 1,4 veces superior a la de los no curados. La expresión de este gen en los frutos almacenados a la temperatura que no causa ‘daños de frío’ (12 °C) fue aproximadamente constante durante todo el periodo de almacenamiento.

La expresión de los genes clasificados en el patrón 3 fue mayor en los frutos no curados durante el almacenamiento a 2 °C ($C+F < F$). Otra característica común de estos genes es que se indujeron en respuesta al frío pero no al calor. Dentro de este grupo se identificó un gen homólogo a un co-regulador transcripcional SEUSS de *A. thaliana* relacionado con la floración (Franks *et al.*, 2002) cuya expresión fue siempre mayor en los frutos no acondicionados durante el almacenamiento en frío; un gen que presentaba homología con un factor de transcripción de arroz inducido por auxinas, que se indujo progresivamente hasta los 60 días a 2 °C en los frutos no acondicionados, y un factor de transcripción MYB que presentó la máxima acumulación relativa (440%) a los 10 días, antes de la aparición de los ‘daños de frío’. Los cambios en la acumulación de estos transcritos no fueron relevantes a 12 °C. Además, se identificaron dos genes homólogos a factores de transcripción que codifican proteínas ‘zinc finger’ que presentaron una

expresión similar. Ésta aumentó durante el almacenamiento en frío, tanto en los frutos acondicionados como en los no acondicionados, pero dicho aumento fue retrasado por el tratamiento de acondicionamiento a altas temperaturas. Ninguno de estos dos genes presentó cambios importantes de expresión durante el almacenamiento a 12 °C, aunque la de uno de ellos aumentó ligera y transitoriamente durante el primer día de almacenamiento.

Además de estos 2 genes que codifican proteínas homólogas a proteínas ‘zinc finger’, se identificó otro (C06007B01) con un patrón de expresión diferente (patrón 4) ya que este gen sí se indujo por el calor. Así, su nivel de expresión aumentó a 37 °C alcanzándose un máximo el primer día de exposición de los frutos a esta temperatura. La acumulación del mRNA en los frutos expuestos 3 días a 37 °C fue similar a la de los recién cosechados y no se incrementó al transferirlos a 2 °C. En cambio, su expresión aumentó progresivamente en los frutos no acondicionados desde el décimo día de almacenamiento, inmediatamente antes de que apareciesen los ‘daños de frío’, hasta los 60 días. A 12 °C se produjo un aumento transitorio en su expresión durante los 3 primeros días, aunque dicho incremento fue poco relevante.

En el conjunto de genes que codifican proteínas que presentan homología a factores de transcripción presentes en la biblioteca ‘FlavCurFr1’ se seleccionaron dos genes que codifican factores de transcripción regulados por la hormona etileno y ambos se indujeron transitoriamente durante el tratamiento de curado a 37 °C. Los cambios inducidos por el calor en el gen que codifica un co-activador transcripcional de respuesta a etileno (clon C06023F07) fueron más acusados que en el gen *ERF* (del inglés ‘Ethylene-responsive factor’) (C06003G03). Sin embargo, en el segundo no se observaron diferencias significativas en el nivel de acumulación de los transcritos entre los frutos acondicionados y sin acondicionar durante el almacenamiento en frío y por ello, se agruparon en diferentes patrones de expresión (patrón 5 y 6, respectivamente). Es interesante señalar que la expresión del gen *ERF* disminuyó a 12 °C, mientras que la del primero se incrementó notablemente después de un día de exposición de los frutos a esta temperatura, que no origina ‘daños de frío’.

Por último, la mayoría de los clones seleccionados correspondieron al patrón 7. En él se incluyeron 9 genes cuya expresión no se indujo por calor, frío ni por la combinación del calor y frío. Además, el nivel de expresión de los mismos en los frutos almacenados directamente a 2 °C fue similar al de los previamente acondicionados y al de los frutos almacenados a 12 °C. En general, la expresión de estos genes disminuyó durante la exposición de los frutos al frío y el efecto fue más marcado en los frutos previamente curados. Dos de ellos presentaron homología con proteínas ‘zinc finger’ previamente identificadas en *A. thaliana*, mientras que los 7 restantes formaron un grupo muy heterogéneo de factores de transcripción implicados, en general, en respuestas de las plantas frente a diversas situaciones de estrés.

Tabla 45: Cambios en la acumulación relativa y patrones de expresión de los factores de transcripción seleccionados. RTC: frutos recién traídos de campo; C: frutos acondicionados hasta 3 días a 37 °C; C+F: frutos curados y almacenados a 2 °C; F: frutos almacenados directamente a 2 °C. Los frutos control se almacenaron a 12 °C. Los índices de 'daños de frío' (IDF) según una escala visual de 0 (no daño) a 3 (daño severo) se indican al final de la tabla. Las inducción se marcan en rojo (● ≥140-200; ● >200) y las represiones en verde (● ≤60). Los niveles de acumulación de los transcritos se expresan de forma relativa en referencia al nivel correspondiente a los frutos recién recolectados (RTC) al que se le asignó un valor arbitrario de 100.

FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN - FORTUNE!																										
Patrón de Expresión	Proteína más similar	Clon	37°C (C)			3d 37°C + 2°C (C+F)			2°C (F)			12°C														
			RTC	4 h	12 h	1 d	3 d	RTC	1d	3 d	10 d	20 d	30 d	60 d	1d	3 d	10 d	20 d	30 d	60 d						
C+F > F Patrón 1 ≤F =C	TBP2 ('TATA-binding protein 2') [<i>Oryza sativa</i>] WRKY [<i>A. thaliana</i>] WRKY [<i>A. thaliana</i>] WRKY4, probable [<i>Vitis aestivalis</i>]	C06001E02	100	73	92	126	85	75	85	150	241	125	122	55	64	114	92	116	102	138	148	135	114	116	103	
		C06003F10	100	91	112	83	74	89	86	88	109	165	125	119	119	114	116	117	105	111	115	103	109	107	100	94
		C06009F11	100	94	113	71	65	96	132	205	260	215	111	82	82	66	93	55	72	73	122	123	175	144	179	152
		C060019B06	100	124	93	92	77	106	124	102	44	40	68	65	65	81	43	70	65	107	41	46	59	43	55	167
Patrón 2 ↑F =C	TFIIIA-L [<i>A. thaliana</i>]	C060013H07	100	69	90	79	69	92	84	95	160	199	259	147	126	138	168	184	177	112	143	136	120	126	105	
C+F < F Patrón 3 ↑F ≤C	Co-regulador transcripcional SEUSS transcripcional [<i>A. thaliana</i>] ARF 7a, probable [<i>Oryza sativa</i> (japonica)] Prot. 'zinc finger' LSD1 [<i>Brassica oleracea</i>] MYB [<i>Catharanthus roseus</i>] Prot. 'zinc finger' familia 'C ₃ HC ₄ RING finger' [<i>A. thaliana</i>]	C06001D10	100	95	79	77	67	87	86	86	94	101	120	135	147	162	148	148	141	106	109	108	117	98	94	
		C06003G10	100	81	95	69	71	93	66	71	86	93	104	95	70	118	147	171	186	101	146	132	139	107	151	
		C06013A04	100	131	106	97	101	117	128	167	263	284	259	141	147	218	220	291	281	116	126	114	110	94	93	
		C06013H06	100	47	40	35	28	38	58	136	280	144	143	125	261	440	245	290	177	126	106	99	87	88	63	
		C06011G10	100	65	63	30	31	44	58	108	231	295	230	125	191	327	224	319	246	146	128	102	80	87	63	
Patrón 4 ↑F ↑C	Prot. 'zinc finger' familia 'C ₃ HC ₄ RING finger' [<i>A. thaliana</i>]	C06007B01	100	98	110	153	94	89	103	80	66	63	107	123	126	139	132	170	183	141	140	106	109	114	105	
Patrón 5 =F ↑C	ERF, probable [<i>A. thaliana</i>]	C06003G03	100	116	145	145	133	124	105	68	44	49	56	129	111	66	73	74	91	58	52	65	66	68	64	
Índice de daños de frío (IDF)			0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6	1.6	2.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	

Continuación de la Tabla 45.

Patrón de Expresión		FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN - 'FORTUNE'																							
		37°C (C)			3d 37°C + 2°C (C+F)			2°C (F)			12°C														
Proteína más similar		Clon	RTC	4 h	12 h	1 d	3 d	1d	3 d	10 d	20 d	30 d	60 d	1d	3 d	10 d	20 d	30 d	60 d						
C+F = F	Patrón 6 =F ↑C Co-activador transcripcional de respuesta a etileno, probable [<i>A. thaliana</i>]	C06023F07	100	120	144	172	96	88	91	87	73	66	72	88	97	99	82	89	74	196	178	163	150	139	147
		C06017B01	100	103	94	79	92	48	32	36	39	44	37	42	41	30	50	64	98	50	52	83	52	67	365
SF ≤C	Patrón 7 Activador transcripcional CBF1 / 'C-repeat/DRE binding protein', probable HSF5 (heat shock transcription factor 5), probable [<i>A. thaliana</i>] HOMEBOX KNOTTED-1 LIKE 4 (KNAT4) [<i>A. thaliana</i>] MYC [<i>Solanum tuberosum</i>] MADS-box [<i>Vitis vinifera</i>] Regulador de transcripción del complejo CCR4-NOT [<i>A. thaliana</i>] Factor de transcripción 'NLI-interacting', probable [<i>Oryza sativa</i> (japónica)] Prot. 'zinc finger', 'B-box type' [<i>A. thaliana</i>] Prot. 'zinc finger' familia 'C ₃ HC ₄ RING finger' [<i>A. thaliana</i>]	C06019A04	100	59	64	38	37	44	41	47	44	37	35	67	65	57	52	56	60	60	52	48	52	43	75
		C06001A02	100	76	85	64	62	68	59	63	56	52	47	99	87	63	53	54	72	96	107	119	108	93	109
		C06001G08	100	108	94	68	60	55	50	51	45	57	81	74	73	62	56	75	98	77	59	51	63	61	109
		C06005D11	100	82	71	50	39	42	42	35	25	21	27	97	84	67	54	61	63	119	128	119	132	130	119
		C06017G06	100	83	66	78	45	33	37	37	35	38	45	81	74	66	54	65	77	108	75	66	71	60	109
		C06017B03	100	115	92	72	69	81	76	58	58	60	80	103	103	100	67	75	83	84	85	82	82	74	81
		C06023F04	100	69	85	70	70	71	62	70	67	117	85	79	70	63	86	58	65	85	100	103	105	102	82
		C06011C08	100	81	89	66	60	70	66	72	89	92	82	90	86	80	76	86	92	108	101	96	109	87	128
			0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6	1.6	2.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
		Indice de daños de frío (IDF)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6	1.6	2.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	

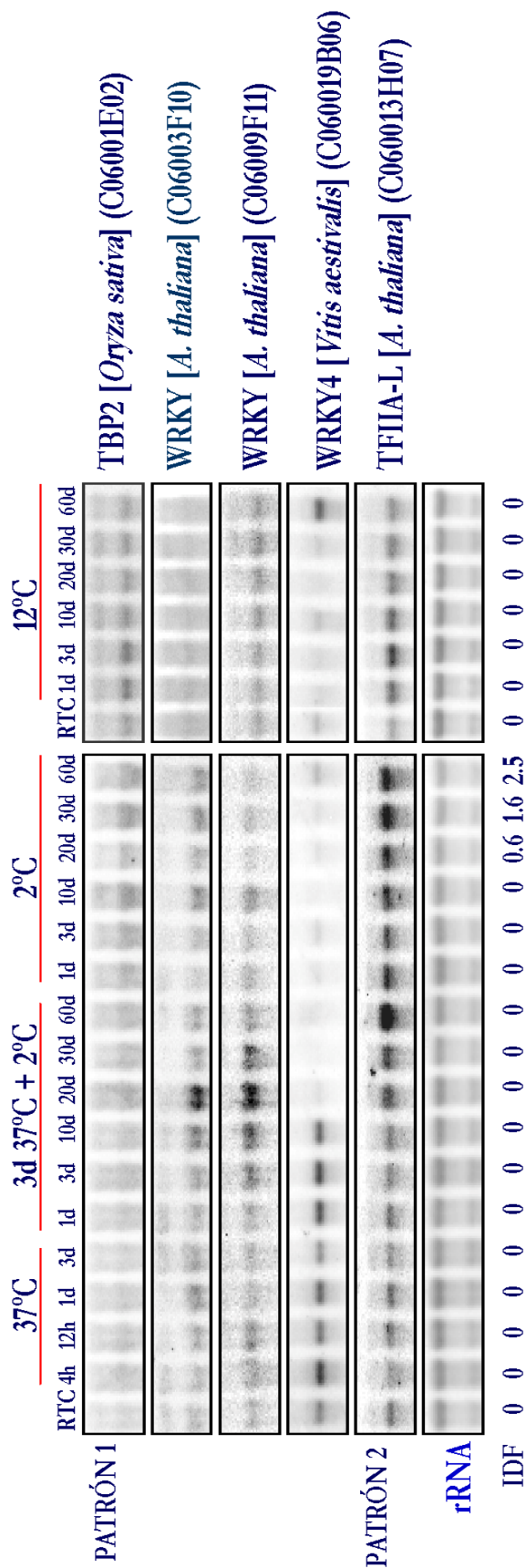


Figura 41: Ejemplo ilustrativo del análisis Northern correspondiente a los genes aislados de la biblioteca de cDNA 'FlavCurFr1' agrupados en los patrones 1 y 2 (C+F>F). Los cambios en la expresión fueron analizados en el flavedo de frutos de mandarina 'Fortune' recién traídos de campo (RTC), frutos mantenidos hasta 3 días a 37 °C, frutos curados y almacenados a 2 °C, frutos almacenados directamente a 2 °C y en frutos almacenados a 12 °C. Los cambios en el índice de 'daños de frío' (IDF) se indican en la parte inferior de la figura.

De los 22 factores de transcripción analizados por Northern, 5 de ellos estaban incluidos en la micromatriz '7K' y quince en la micromatriz '12K'. Conviene recordar que el RNA utilizado en el análisis de expresión Northern y en los ensayos de hibridación con la micromatriz '7K' procede de frutos cosechados en la misma campaña (2004). Sin embargo, en los ensayos de hibridación con la micromatriz '12K' se emplearon tres réplicas biológicas correspondientes a frutos cosechados tres en campañas diferentes, incluyendo la campaña utilizada en los análisis anteriores. Con objeto de evaluar los resultados de hibridación de dichas micromatrices se compararon los resultados obtenidos en las mismas con los obtenidos en las hibridaciones Northern (Figura 42). En la comparación de los resultados del análisis Northern y los obtenidos a partir de la hibridación con la micromatriz '7K', dos genes que codifican un factor de transcripción de la familia WRKY, correspondiente al clon C06009F11, y el factor de transcripción TFIIA (clon C06013H07), presentaron perfiles de expresión muy similares tanto a nivel cualitativo como cuantitativo (Figura 42). Otros genes analizados por Northern también presentes en la micromatriz '7K', que codifican un factor de transcripción 'zinc finger' LSD1, una proteína reguladora de la transcripción del complejo CCR4-NOT, una proteína MADS-box presentaron una misma tendencia frente al calor, al frío y a la combinación de calor y frío aunque, a diferencia de los anteriores, se encontraron diferencias a nivel cuantitativo en los niveles de acumulación de los mensajeros observándose cambios más acusados en el análisis Northern. En resumen, en los 5 genes analizados por Northern incluidos en la micromatriz de 'primera generación', se encontraron resultados similares por lo que se podría considerar que los resultados de la hibridación con la micromatriz '7K' están validados.

Por otro lado, de los quince genes incluidos en la micromatriz '12K' que fueron analizados por Northern, 9 de ellos mostraron un perfil de expresión similar en las dos aproximaciones. Estos genes corresponden a los clones C06013H07, C06019B06, C06003F10, C06017B01, C06001G08, C06017B03, C06023F04, C06007B01 y C06003G10. El resto, presentaron perfiles de expresión diferentes. Estas diferencias podrían deberse por un lado a que este tipo de proteínas reguladoras de la transcripción presentan en general cambios reducidos en los niveles de acumulación de los mensajeros en respuesta al calor, al frío y a la combinación de ambos estímulos abióticos por lo que pequeñas diferencias del nivel de inducción o represión pueden originar marcadas discrepancias entre los resultados obtenidos por ambos tipos de análisis. Por otro lado, hay que tener presente la elevada variabilidad biológica del sistema de estudio y el hecho de que en el análisis de la micromatriz '12K' se han incluido tres muestras biológicas de campañas diferentes.

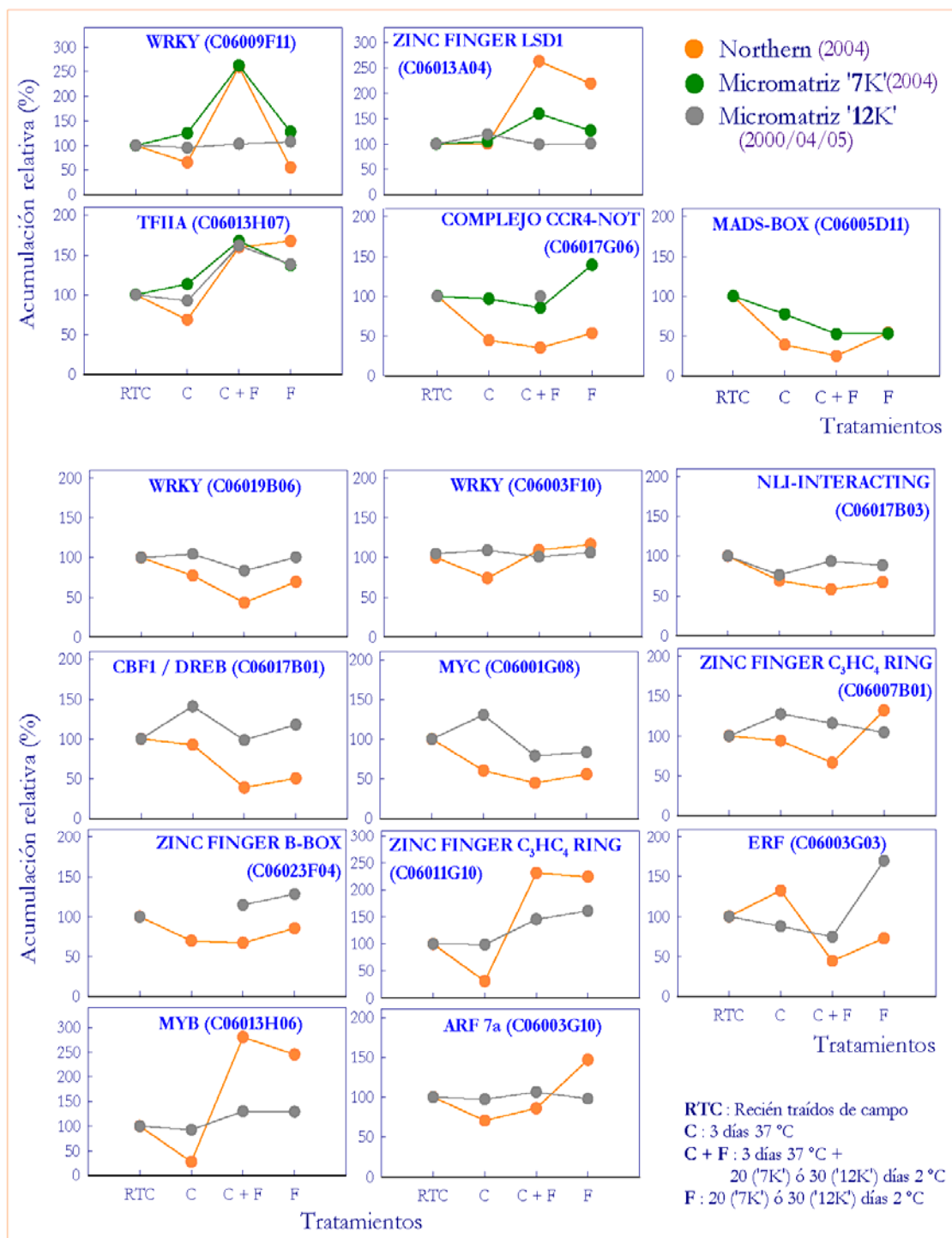


Figura 42: Comparación de los resultados obtenidos a partir de las hibridaciones realizadas con las micromatrices '7K' y '12K', y los análisis Northern en el estudio de los cambios de expresión de factores de transcripción en frutos de mandarina 'Fortune'. El RNA empleado en los análisis Northern (●) y en los ensayos de hibridación con la micromatriz '7K' (●) procede de los mismos frutos mientras que en la micromatriz '12K' (●) se emplearon tres réplicas biológicas a partir de frutos cosechados en tres campañas diferentes. Se estudiaron cuatro situaciones: 1) frutos recién traídos de campo (RTC); 2) frutos curados (3 días a 37 °C) (C); 3) frutos curados y almacenados 20 ('7K') ó 30 ('12K') días a 2 °C (C+F); 4) frutos almacenados directamente a 2 °C durante 20 ('7K') ó 30 ('12K') días. Los niveles de acumulación de los transcritos son relativos y vienen expresados en referencia al correspondiente a los frutos recién recolectados (RTC) al que se asignó un valor arbitrario de 100.

3.3. Estudio de la expresión de factores de transcripción en respuesta a estrés por herida mecánica en frutos de mandarina de la variedad 'Fortune'.

Para averiguar la posible implicación de los factores de transcripción seleccionados en la biblioteca de cDNA en respuesta al estrés por herida mecánica se llevó a cabo un análisis de expresión Northern en frutos heridos y en frutos sanos almacenados a 20 °C y 90-95% HR, y se evaluó el nivel de acumulación de los mensajeros a las 4, 8, 12, 24, 48 y 72 h de almacenamiento en ambos tipo de frutos. De los 22 factores, solamente 10 mostraron expresión diferencial en las situaciones estudiadas y se dividieron en 2 grupos. En el primer grupo, se incluyeron los genes que presentaron un mayor nivel de expresión en los frutos heridos respecto a los frutos sanos almacenados en las mismas condiciones de humedad y temperatura, mientras que aquellos con menor expresión en respuesta a la herida se agruparon dentro del segundo grupo (Tabla 46 y Figura 43).

Dentro del primer grupo, se distinguieron dos perfiles de expresión claramente diferenciados. En el primero de ellos se producía un aumento transitorio del nivel de acumulación relativa de los transcritos a las 4 h de almacenamiento en los frutos heridos aunque a las 8 h no se observaron diferencias significativas respecto al nivel correspondiente a los frutos recién cosechados. Con este perfil de expresión se encontraron 4 genes que codifican el factor LSD1 de la familia 'zinc finger', un factor MYC, una proteína reguladora de la transcripción que forma parte del complejo CCR4-NOT y el factor CBF1. Con excepción de la proteína LSD1, el resto de factores de transcripción presentaron una reducción de aproximadamente el 50% en el nivel de acumulación del mensajero en los frutos heridos al final del almacenamiento. De éstos, el factor CBF1 también disminuyó su expresión en los frutos no heridos, no observándose diferencias a las 72 h de almacenamiento entre los frutos heridos y sanos. El segundo patrón de expresión dentro de este primer grupo corresponde al factor HSF5, en el cual el estrés por herida mecánica produjo un retraso en la caída de expresión que se produce en los frutos sanos a partir de las primeras 12 h de almacenamiento. En los frutos heridos sin embargo, esta disminución no se observó hasta una vez finalizado el tiempo de almacenamiento a 20 °C.

Entre los genes cuyo nivel de expresión fue superior en los frutos sanos se incluyen 5, que a su vez fueron clasificados en dos patrones diferentes de expresión. En el patrón 3 se incluye el factor de transcripción KNAT4, cuyo nivel de expresión aumentó de forma transitoria un 40% a las 4 h de almacenamiento en los frutos sanos. Posteriormente, a partir de las 8 h de almacenamiento ya no se observaron diferencias en el nivel de expresión entre frutos heridos y sanos. Los 4 genes restantes, incluidos en el patrón 4, se caracterizaron porque presentaron una caída del nivel de acumulación relativa de los transcritos en respuesta a la herida al final del almacenamiento. Estos genes codifican una proteína correguladora de la transcripción SEUSS, un factor de transcripción de respuesta a auxinas (ARF7a), una proteína MADS-box y un factor de transcripción con dominio de unión al DNA de dedos de zinc de la familia 'C₃HC₄ Ring'.

Tabla 46: Cambios en la acumulación relativa de mRNA y patrones de expresión de los factores de transcripción seleccionados. RTC: frutos recién traídos de campo; CH: frutos heridos; SH: frutos sin herida. Los frutos se almacenaron hasta 72 h a 20 °C y 90-95% HR. Las inducciones se marcan en color rojo (● ≥140) y las represiones en color verde (● ≤60). (Ver detalles en Tabla 45).

Patrones de Expresión	Proteína más similar	Unigen	RTC	Con Herida (CH)						Sin Herida (SH)					
				4 h	8 h	12 h	24 h	48 h	72 h	4 h	8 h	12 h	24 h	48 h	72 h
CH > SH	Patrón 1 Prot. 'zinc finger LSD1' [<i>Brassica oleracea</i>] MYC [<i>Solanum tuberosum</i>] Regulador transcripcional del complejo CCR4-NOT [<i>A. thaliana</i>] Activador transcripcional CBF1 / 'C-repeat/DRE binding protein', probable	C06013A04	100	145	136	132	106	100	85	129	126	130	117	122	121
		C06001G08	100	180	124	109	71	45	37	89	81	74	77	67	80
		C06017G06	100	141	136	108	85	71	53	74	70	88	81	77	105
		C06017B01	100	149	134	145	94	61	56	122	122	93	123	142	54
SH > CH	Patrón 2 HSTF5 (heat shock transcription factor 5) Patrón 3 HOMEBOX KNOTTED-1 LIKE 4' (KNAT4) [<i>A. thaliana</i>] Patrón 4 Co-regulador transcripcional SEUSS [<i>A. thaliana</i>] ARF 7a, probable [<i>Oryza sativa</i> (japonica)] MADS-box [<i>Vitis vinifera</i>] Prot. 'zinc finger' familia 'C ₃ HC ₄ RING finger' [<i>A. thaliana</i>]	C06019A04	100	64	99	108	81	60	50	70	74	58	56	49	64
		C06001A02	100	68	101	111	102	90	103	141	104	81	105	88	106
		C06001D10	100	96	86	82	76	61	53	100	92	90	86	76	80
		C06003G10	100	68	86	85	70	58	50	79	78	67	78	83	81
		C06005D11	100	63	81	100	83	73	55	107	106	101	91	94	84
		C06011C08	100	75	93	93	72	71	60	85	90	82	84	83	88

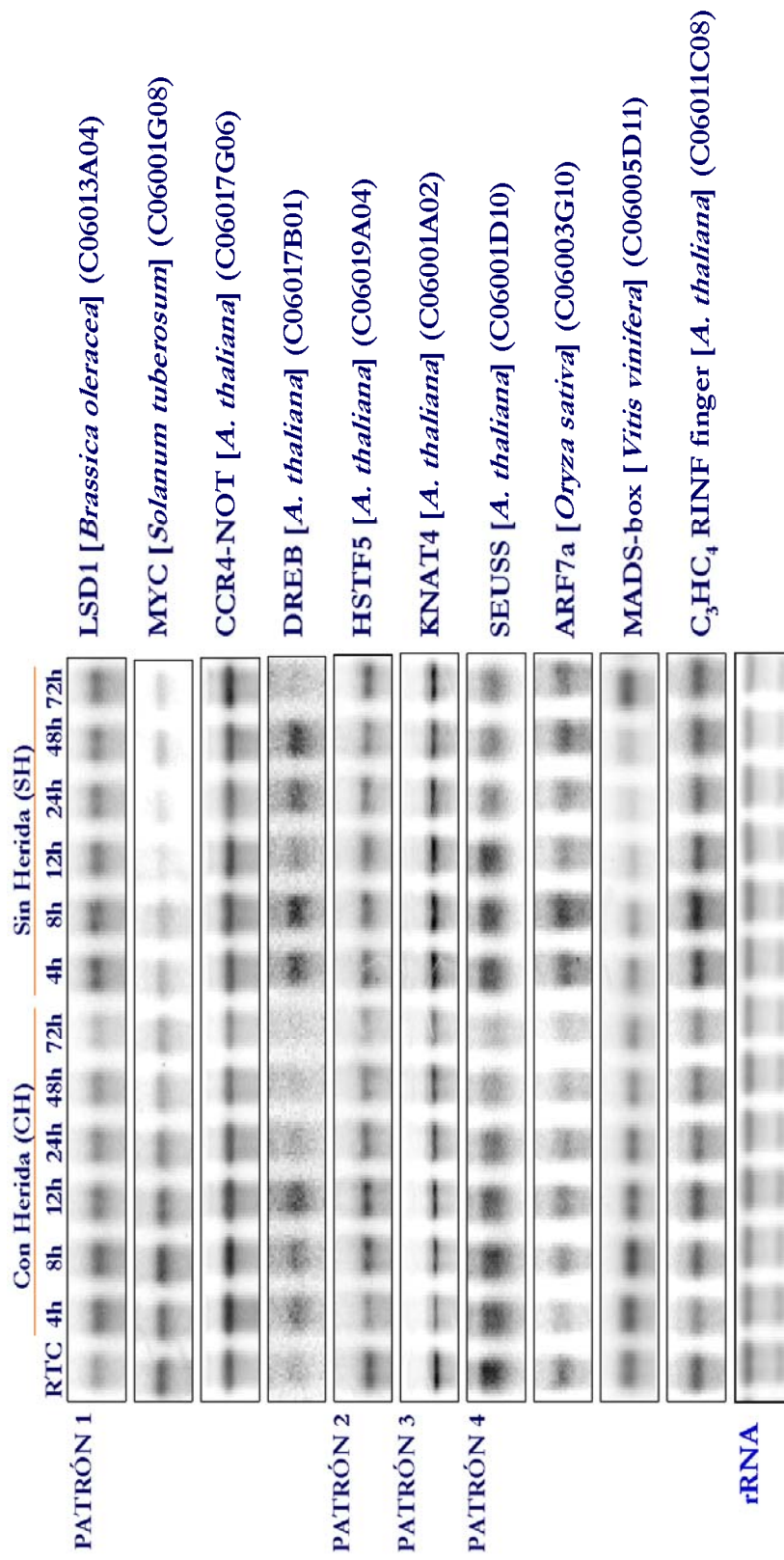


Figura 43: Análisis Northern correspondientes a los genes aislados de la biblioteca de cDNA ‘FlavCurFr1’ cuya expresión fue diferente entre frutos de mandarina ‘Fortune’ heridos y no heridos. Los frutos se almacenaron a 20 °C y 90-95% HR.

3.4. Estudio de la expresión de factores de transcripción en respuesta al tratamiento de etileno y a la aplicación de 1-MCP en relación al ‘colapso de la corteza’ en naranjas ‘Navelate’.

El análisis de los cambios de expresión de los 22 factores de transcripción y que fueron seleccionados de la biblioteca ‘FlavCurFr1’ también se llevó a cabo en frutos de naranjas ‘Navelate’ sometidos a 5 condiciones distintas: 1) frutos recién recolectados (RTC); 2) frutos almacenados en aire durante 14 días; 3) frutos acondicionados con $10 \mu\text{L L}^{-1}$ de etileno durante 4 días y posteriormente almacenados 10 días en aire; 4) frutos tratados durante 14 h con $1 \mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP y almacenados durante 14 días en aire; 5) frutos tratados durante 14 h con $1 \mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP, acondicionados durante 4 días con $10 \mu\text{L L}^{-1}$ de etileno y posteriormente almacenados 10 días en aire. En todos los casos los frutos se mantuvieron al 90-95% HR para minimizar su deshidratación y a 22°C . Para cada una de estas situaciones de estudio, se evaluó el nivel de expresión de estos genes a diferentes tiempos de almacenamiento en los dos tejidos que forman la corteza del fruto, flavedo y albedo, de forma independiente.

Los resultados mostraron un comportamiento diferente de los genes analizados en el flavedo y en el albedo (Tabla 47 y Tabla 48). En ambos casos los genes fueron clasificados en diferentes perfiles de expresión atendiendo a si los niveles de acumulación relativa de los mensajeros en los frutos no tratados (Aire), que presentaron un ICC de 0,8 al final del periodo de almacenamiento, era mayor o menor respecto a los observados en los frutos acondicionados con etileno (Etileno) que apenas presentaron síntomas de esta alteración fisiológica. Así, se establecieron 5 patrones de expresión diferentes para el flavedo y 6 para el albedo.

Entre los genes que presentaron una mayor expresión en el flavedo de los frutos tratados con etileno respecto a los controles almacenados directamente en atmósfera de aire (E-A>A) se encontraron tres que se clasificaron en dos patrones de expresión diferentes (Tabla 47 y Figura 44). Los dos primeros (patrón 1) codifican un factor de transcripción de la familia WRKY correspondiente al clon C06009F11 y el factor HSF5, los cuales aumentaron su nivel de expresión después de 1 día de la aplicación de la hormona. Los niveles de acumulación del mensajero correspondiente al gen WRKY se mantuvieron elevados durante todo el periodo de acondicionamiento con etileno aunque después de la transferencia a aire, éstos disminuyeron y no se encontraron diferencias significativas a los 14 días de almacenamiento. Sin embargo, en el caso del gen HSF5, se observó una diferencia de alrededor del 60% en el nivel de acumulación relativa entre estos frutos y los controles. A los 4 días también se observó una inducción transitoria en los frutos no tratados y a ese tiempo de almacenamiento, no se observaron diferencias respecto a los frutos acondicionados. Por otra parte, si observamos el comportamiento de estos genes en los frutos que habían sido tratados durante 14 h con 1-MCP y almacenados posteriormente en aire, el gen WRKY no mostró cambios significativos, aunque sí el gen HSF5. Éste se indujo al inicio del almacenamiento en aire después de la aplicación con el inhibidor de la acción del etileno y, a diferencia de los frutos tratados con etileno, su nivel de expresión se mantuvo hasta el final del almacenamiento. La aplicación de 1-MCP seguida de un acondicionamiento con etileno y posterior almacenamiento en aire durante 10 días no produjo cambios sustanciales en ninguno de estos genes a excepción del gen WRKY que se indujo un 85% de forma transitoria a los 3 días de la aplicación de la hormona.

El gen que codifica el factor de transcripción ‘zinc finger’ de la familia ‘ C_3HC_4 Ring’ clasificado en el patrón 2, aumentó su nivel de expresión 1,6 veces en respuesta al etileno aunque dicho incremento fue transitorio y tuvo lugar en el segundo día del tratamiento con la hormona. La aplicación de 1-MCP produjo una ligera disminución después de 1 día de

almacenamiento en aire. Por tanto, al comparar de forma global los niveles de acumulación relativa, observamos una situación intermedia correspondiente a los frutos control y las mayores diferencias entre los frutos que no se dañaron tratados con etileno y los frutos donde la incidencia del ‘colapso de la corteza’ fue mayor. Excepto en los frutos tratados con 1-MCP y posteriormente acondicionados con etileno y almacenados 10 días en aire, cuya expresión fue similar a la de los frutos RTC, en el resto de condiciones estudiadas se observó una disminución de la expresión a los 14 días de almacenamiento.

En el segundo grupo de genes caracterizados por tener a los 14 días de almacenamiento una mayor expresión en los frutos no tratados con etileno respecto a los controles (E-A<A), se encontraron 12 genes que se agruparon en dos patrones de expresión diferentes. El gen que codifica el factor SEUSS (patrón 3) solamente se indujo en los frutos control mantenidos en aire. En el caso del gen *MYC*, además se observó un aumento de expresión en los frutos tratados con 1-MCP y acondicionados con etileno aunque éste fue transitorio y no se observaron diferencias al final del almacenamiento con el resto de situaciones de estudio.

En los dos primeros (patrón 3), que codifican un factor de transcripción MYC y un co-regulador de la transcripción SEUSS, solamente se produjo un aumento de expresión en los controles almacenados en aire. Sin embargo, en el caso del gen *MYC* no modificaron de forma importante sus niveles de acumulación del mensajero en respuesta al etileno o al 1-MCP respecto a los niveles iniciales aunque ambos tratamientos evitaron el aumento del nivel de acumulación relativa de los mensajeros que se produjo en los frutos control y tuvo lugar en el primer caso a los 4 días y en el segundo a los 14 días, siendo en ambos casos del orden del 60%. No obstante, el gen *MYC* se indujo transitoriamente casi al doble a los 3 días de la aplicación de etileno en los frutos previamente tratados con 1-MCP. Dicho incremento fue transitorio y no se observaron diferencias significativas al final del almacenamiento con el resto de frutos tratados o no con etileno o 1-MCP.

En el patrón 4 se agruparon los genes que reprimieron su expresión en respuesta al etileno, algunos de los cuales también en respuesta a la aplicación de 1-MCP después de tiempos largos de almacenamiento (14 días). En ningún caso se observaron cambios importantes en los niveles de los mensajeros en los frutos control no tratados y almacenados 14 días en aire. Los genes que disminuyeron su expresión desde el principio del acondicionamiento con etileno en los frutos no tratados con 1-MCP fueron 7 y codifican una proteína reguladora de la transcripción del complejo CCR4-NOT, un factor de transcripción de respuesta a etileno (ERF), dos proteínas de la familia WRKY (C06019B06 y C06003F10), un activador de la transcripción CBF1 con un dominio de unión DREB, un factor de transcripción ‘zinc finger’ de la familia ‘C3HC4 Ring’ y un factor de unión a la secuencia NLI. En general, en el resto de condiciones estudiadas los cambios en su expresión fueron poco relevantes a excepción del gen *CBF1*, que se indujo transitoriamente más de dos veces a las 14 h inmediatamente después de la aplicación de 1-MCP, y el gen WRKY correspondiente al clon C06003F10 cuya expresión disminuyó de forma transitoria también en los frutos tratados con 1-MCP acondicionados o no posteriormente con etileno. Los 3 genes restantes dentro de este patrón de expresión, que codifican un factor MYB, un factor KNAT4 y una ‘TATA-binding protein 2’ (TBP2), aunque no mostraron cambios de expresión durante la aplicación de etileno con respecto a los frutos RTC, mostraron una reducción de su expresión en los frutos acondicionados al final de su almacenamiento en aire, que en los dos últimos también se produjo en los frutos tratados con 1-MCP y almacenados 14 días en aire.

En el patrón 5 se agruparon 7 genes que no mostraron diferencias significativas importantes al comparar los frutos tratados con etileno, con 1-MCP o los transferidos directamente a aire. Solamente uno de ellos, que codifica un co-activador de la

transcripción de respuesta a etileno, mostró una inducción transitoria y temprana en respuesta a la aplicación de 1-MCP que fue más marcada (más de dos veces) en los frutos que se trataron posteriormente con etileno.

En el albedo, los genes fueron clasificados en 6 patrones diferentes de expresión (Tabla 48). Siguiendo el mismo esquema que en el flavedo, en primer lugar se estableció un grupo de 6 genes agrupados en tres patrones distintos, cuyos niveles de acumulación fueron superiores en los frutos acondicionados con etileno que en los expuestos al aire (E-A>A). Los clones C06009F11 y C06011G10 correspondientes a dos genes que codifican una proteína WRKY y un factor 'zinc finger' de la familia 'C3HC4 Ring', respectivamente, así como el gen que codifica una proteína de unión a la secuencia NLI o el que codifica un HSF5, mostraron una clara inducción en respuesta al etileno a tiempos cortos. En los tres primeros casos, este aumento fue transitorio disminuyendo posteriormente hasta niveles similares a los observados en los frutos recién cosechados y en los almacenados directamente en aire. Sin embargo, en el gen *HSF5* este aumento no fue transitorio y se mantuvo hasta el final del almacenamiento, observándose el mayor incremento, de hasta 7 veces el nivel inicial correspondiente a los frutos recién cosechados, en el segundo día de dicho tratamiento. En los frutos tratados con 1-MCP también aumentó el nivel de expresión de este gen aunque de forma más tardía, a los tres días de almacenamiento, y se mantuvo hasta el final del mismo, momento en el cual, se observó una mayor expresión del gen en estos frutos (481%) respecto a los frutos tratados con etileno en ausencia del inhibidor (329%). Asimismo, un hecho que llamó la atención fue el efecto sinérgico de la combinación del inhibidor y del etileno en la inducción del gen ya que para todos los tiempos de almacenamiento analizados, los frutos tratados con ambos compuestos fueron los que presentaron los mayores niveles de expresión, con un máximo de 944% y 937% a los 3 y 4 días durante la aplicación de la hormona. Un comportamiento similar lo tuvo el gen que codifica un factor de transcripción MYC (patrón 2) cuya expresión no varió en respuesta al etileno en el flavedo pero aumentó 3 veces en el albedo a los 4 días del tratamiento con la hormona y sus niveles se mantuvieron elevados después de transferir los frutos a aire. Este gen, a diferencia de los anteriores, se indujo también en los frutos control durante todo el periodo de almacenamiento aunque el etileno potenció dicho efecto. Al igual que el gen *HSF5*, se observó un aumento de la expresión en los frutos expuestos 14 h a 1-MCP a tiempos cortos (1 día) que en general fue menor al observado en los frutos en respuesta al etileno aunque a los 14 días de almacenamiento, los niveles de acumulación relativa fueron mayores en los frutos tratados con el inhibidor. La combinación de ambos tratamientos, también indujo la expresión del gen, aunque a diferencia del gen *HSF5*, la combinación del tratamiento con 1-MCP y etileno potenció su expresión solamente durante los tres primeros días de almacenamiento en presencia de etileno, y al final ésta fue similar a la de los frutos tratados solamente con etileno. En cualquier caso, los frutos control mostraron los menores niveles de inducción del gen MYC. Por último, se observó un caso en donde el etileno evitó la represión de un gen que codifica el factor de transcripción WRKY correspondiente al clon C06003F10, que tiene lugar a los 4 días de almacenamiento de los frutos no tratados en aire, e incluso potenció su expresión en respuesta a la combinación de 1-MCP y etileno durante el almacenamiento en aire. Este gen se clasificó en el patrón 3.

Se encontraron 7 genes que presentaron mayor expresión en los frutos control respecto a los acondicionados con etileno en ausencia de 1-MCP (E-A<A). Dos de ellos, el factor de transcripción CBF1 y el factor WRKY4 (patrón 4), aumentaron su expresión en los frutos no tratados durante el almacenamiento en aire, y en el segundo caso, también en respuesta al etileno. En ambos casos los mayores incrementos se observaron en los frutos expuestos a 1-MCP en ausencia de etileno y, en el factor WRKY, también en los tratados

con ambos compuestos. En este caso, en los frutos tratados con 1-MCP acondicionados y no acondicionados con etileno, se observaron niveles relativos de acumulación de los mensajeros muy similares, del orden de 400-450% durante el tercer y cuarto día de almacenamiento, mientras que en el caso del factor CBF1, el aumento en respuesta a la combinación de ambos tratamientos solamente se produjo a los 14 días y fue inferior al que se produjo en respuesta al 1-MCP. Otros genes dentro de este grupo (patrón 5) no modificaron su expresión en los frutos control pero el tratamiento con etileno redujo ésta aproximadamente al 50%.

Por último, en el patrón 6 se agruparon 9 genes cuyo niveles de expresión fueron similares en todos los frutos. De entre ellos, solamente destaca el gen que codifica el factor KNAT4 el cual se indujo de forma transitoria dos veces a los tres días de almacenamiento en los frutos expuestos durante 14 h a 1-MCP y a los 4 días en los frutos tratados con ambos compuestos, aunque en ambos casos a los 14 días de almacenamiento no se observaron diferencias significativas con el resto de frutos.

El estudio de los cambios de expresión de quince de los factores de transcripción analizados por Northern en frutos de naranja 'Navelate' en relación al desarrollo del 'colapso de la corteza' y en respuesta al etileno que reduce la incidencia de dicha alteración fisiológica, se llevó a cabo también mediante el empleo de micromatrices de cDNA. Aunque una de las réplicas biológicas utilizadas en la hibridación con la micromatriz '12K' fue la que se empleó en la hibridación Northern, los resultados obtenidos en ambas aproximaciones genómicas no pudieron compararse teniendo en cuenta la variabilidad biológica intrínseca al sistema biológico estudiado.

Tabla 47: Cambios en la acumulación relativa y patrones de expresión de los factores de transcripción seleccionados en el flaveado de frutos de naranjas 'Navelate' en las siguientes situaciones: 1) frutos recién recolectados y almacenados 14 h en aire (controles); 2) frutos almacenados en aire durante 14 días (Aire); 3) frutos acondicionados 4 días con 10 $\mu\text{L L}^{-1}$ de etileno y posteriormente almacenados 10 días en aire (Etileno + Aire); 4) frutos tratados 14 h con 1 μL de 1-MCP y almacenados 4 días en aire (1-MCP + Aire); 5) frutos tratados 14 h con 1 $\mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP, acondicionados 4 días con 10 $\mu\text{L L}^{-1}$ de etileno y posteriormente almacenados 10 días en aire (1-MCP + Etileno + Aire). Los índices de 'colapso de la corteza' según una escala visual de 0 (no daño) a 4 (daño severo) se indican al final de la tabla. Las inducciones se marcan en rojo ($\bullet \geq 140$; $\bullet > 200$) y las represiones en verde ($\bullet \leq 60$) (Ver detalles en Tabla 45).

Patrón de Expresión		Proteína más similar	Clon		14h A			Factores de Transcripción - FLAVEADO - 'NAVELATE'			Controles			Etileno + Aire			1-MCP + Aire			1-MCP + Etileno + Aire											
			14h A	14h A	1d	3d	4d	14d	Aire	Etileno	Aire	14d	14h	1d	3d	4d	Aire	14d	14h	1d	3d	4d	14d	14h	1d	3d	4d	14d			
E-A > A	Patrón 1	WRKY [<i>A. thaliana</i>] HSTF5 ('heat shock transcription factor'), probable [<i>A. thaliana</i>]	C06009F11 C06019A04	100	206	111	186	213	233	214	113	69	128	128	106	94	100	194	189	252	182	69	138	185	130	113					
				100	116	162	151	218	200	204	181	87	100	102	159	139	97														
E-A < A	Patrón 2	Prot. 'zinc finger' familia 'C ₃ HC ₄ RING finger' [<i>A. thaliana</i>]	C06011G10	100	86	54	113	162	87	91	47	73	59	60	73	75	73	57	71	74	124										
				100	111	164	116	56	106	89	111	88	86	135	148	122	98	86	126	195	138	86									
E-A < A	Patrón 3	MYC [<i>Solanum tuberosum</i>] Co-regulador transcripcional SEUSS transcripcional [<i>A. thaliana</i>]	C06001D10	100	106	103	164	66	103	103	96	103	108	111	89	76	123	108	104	97	71	102									
				100	81	104	62	32	51	38	79	60	95	126	83	87	50	95	81	69	72	60									
E-A < A	Patrón 4	Regulador transcripcional del complejo CCR4-NOT [<i>A. thaliana</i>] ERF, probable [<i>A. thaliana</i>] WRKY4, probable [<i>Vitis aestivalis</i>] Activador transcripcional CBF1 / 'C-repeat / DRE binding protein', probable [<i>A. thaliana</i>] Prot. 'zinc finger' familia 'C ₃ HC ₄ RING finger' [<i>A. thaliana</i>]	C06017G06 C06003G03 C06019B06 C06017B01 C06007B01	100	72	74	63	51	48	53	37	100	83	76	72	53	100	83	76	72	53	100	83	76	72	53					
				100	75	74	71	51	58	51	70	62	118	67	109	131	71	118	66	113	146	66									
E-A < A	Patrón 5	Factor de transcripción 'NLI-interacting', probable [<i>Oryza sativa</i> (japónica)] MYB [<i>Catharanthus roseus</i>] Prot. 'HOMEBOX KNOTTED-1 LIKE 4' (KNAT4) [<i>A. thaliana</i>] TBP2 ('TATA-binding protein 2') [<i>Oryza sativa</i>] WRKY [<i>A. thaliana</i>]	C06017B03 C06013H06 C06001A02 C06001E02 C06003F10	100	91	68	142	57	57	54	98	228	54	100	90	156	228	80	38	101	64	90	110	99	120	58	90	83	112	98	60
				100	87	102	72	53	61	43	64	59	88	68	72	79	62	88	71	77	71	55									
				100	72	68	67	83	50	66	57	59	91	109	95	83	74	91	52	57	61	101									
				100	105	94	81	74	79	63	67	52	91	97	91	110	55	91	94	105	115	76									
				100	66	103	61	67	93	74	74	58	97	107	101	94	49	97	102	94	93	63									
				100	62	96	71	60	86	77	71	51	126	53	67	50	126	75	58	78	63										
				100	88	92	83	61	42	74	66	69	35	0.0	0.0	0.5	0.9	1.9	0.0	0.0	0.3	0.3	1.8								
				0.0	0.5	0.4	0.8	0.0	0.0	0.0	0.1	0.2	0.0	0.0	0.5	0.9	1.9	0.0	0.0	0.3	0.3	1.8									

Continuación de la Tabla 47.

FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN - 'FLAVEDO' - 'NAVELATE'		14h A	Controles			Etileno + Aire				1-MCP + Aire				1-MCP + Etileno + Aire									
			Aire			Etileno		Aire		Aire		1-MCP		Etileno		Aire							
Patrón de Expresión		Clon	1d	3d	4d	14d	1d	2d	3d	4d	14d	1d	3d	4d	14d	1d	3d	4d	14d				
E-A = A	Patrón 5	Proteína más similar	100	145	100	91	80	98	95	94	154	137	185	97	89	137	231	144	105	119			
		Co-activador transcripcional de respuesta a etileno, probable [<i>A. thaliana</i>]	C06023F07																				
		Prot. 'zinc finger' LSD1 [<i>Brassica oleracea</i>]	C06013A04	100	92	86	88	83	96	62	100	100	75	111	90	92	101	100	111	90	88	66	
		ARF 7a, probable [<i>Oryza sativa</i> (japónica)]	C06003G10	100	100	105	110	92	93	94	95	115	81	84	99	94	83	78	84	100	133	92	83
		MADS-box [<i>Vitis vinifera</i>]	C06005D11	100	103	71	84	60	99	137	110	106	61	102	103	86	76	65	102	122	115	92	73
		Prot. 'zinc finger' familia 'C ₃ HC ₄ RING finger' [<i>A. thaliana</i>]	C06011C08	100	77	62	82	60	53	118	73	64	45	84	78	70	71	47	84	75	82	100	95
		Prot. F22G5.18 / TFIIA, subunidad grande [<i>A. thaliana</i>]	C06013H07	100	84	63	76	52	67	139	62	69	55	85	85	62	65	56	85	76	86	110	111
		Prot. 'zinc finger', familia 'B-box' [<i>A. thaliana</i>]	C06023F04	100	80	58	57	53	57	56	41	65	59	75	85	43	55	60	75	58	59	61	51
		Índice de daños de 'colapso de la corteza'	0.0	0.0	0.5	0.4	0.8	0.0	0.0	0.0	0.1	0.2	0.0	0.0	0.5	0.9	1.9	0.0	0.0	0.0	0.3	0.3	1.8

Tabla 48: Cambios en la acumulación relativa y patrones de expresión de los factores de transcripción seleccionados en el albedo de frutos de naranjas 'Navelate' en las siguientes situaciones: 1) frutos recién recolectados y almacenados 14 h en aire (controles); 2) frutos almacenados en aire durante 14 días (Aire); 3) frutos acondicionados 4 días con 10 µL L⁻¹ de etileno y posteriormente almacenados 10 días en aire (Etileno + Aire); 4) frutos tratados 14 h con 1 µL de 1-MCP y almacenados 4 días en aire (1-MCP + Aire); 5) frutos tratados 14 h con 1 µL L⁻¹ de 1-MCP, acondicionados 4 días con 10 µL L⁻¹ de etileno y posteriormente almacenados 10 días en aire (1-MCP + Etileno + Aire). Los índices de 'colapso de la corteza' según una escala visual de 0 (no daño) a 4 (daño severo) se indican al final de la tabla. Las inducciones se marcan en rojo (● ≥140; ● >200) y las represiones en verde (● ≤60) (Ver detalles en Tabla 45).

Patrón de Expresión		FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN - ALBEDO - 'NAVELATE'		Controles			Etileno + Aire			1-MCP + Aire			1-MCP + Etileno + Aire										
		Clon	14h A	Aire			Etileno			Aire			1-MCP										
E-A > A	Patrón 1	Proteína más similar	100	Id	3d	4d	14d	Id	2d	3d	4d	14d	Id	3d	4d	14d	Id	3d	4d	14d			
		WRKY [<i>A. thaliana</i>]	100	87	85	99	70	238	156	121	183	83	92	49	42	54	92	91	61	61	51		
		Prot. 'zinc finger' familia 'C ₂ HC ₄ RING finger' [<i>A. thaliana</i>]	100	86	61	60	41	180	208	102	148	60	52	49	56	66	89	52	111	100	194		
		Factor de transcripción 'NLI-interacting', probable [<i>Oryza sativa</i> (japonica)]	100	118	113	132	107	171	92	100	104	105	123	92	147	160	111	123	102	129	114		
		HSTF5 ('heat shock transcription factor'), probable [<i>A. thaliana</i>]	100	97	74	76	95	312	711	238	347	329	109	147	435	431	355	109	454	944	937	753	
	Patrón 2	MYC [<i>Solanum tuberosum</i>]	100	365	167	197	242	316	243	387	580	321	119	350	281	303	481	119	430	476	360	399	
	Patrón 3	WRKY [<i>A. thaliana</i>]	100	127	82	40	87	83	101	77	114	65	97	84	101	84	98	97	99	78	157	168	
E-A < A	Patrón 4	Activador transcripcional CBF1 / 'C-repeat / DRE binding protein', probable	100	155	101	102	178	102	81	85	98	102	169	145	174	145	203	169	98	94	130	186	
		WRKY4, probable [<i>Vitis aestivalis</i>]	100	173	107	132	161	149	171	132	155	120	114	204	456	409	275	114	175	456	447	333	
	Patrón 5	Prot. 'zinc finger', familia 'B-box' [<i>A. thaliana</i>]	100	94	67	75	68	59	53	45	71	53	94	71	50	46	46	94	73	90	137	131	
		Regulador transcripcional del complejo CCR4-NOT [<i>A. thaliana</i>]	100	111	72	107	73	46	58	51	98	66	85	89	72	78	69	85	85	57	74	105	
		Coactivador transcripcional de respuesta a etileno, probable [<i>A. thaliana</i>]	100	102	111	90	93	78	55	47	56	66	129	81	83	66	91	129	70	80	95	79	
		Prot. F22G5.18 / TFIIA, subunid. grande [<i>A. thaliana</i>]	100	77	82	88	69	74	89	57	80	55	77	60	83	70	60	77	71	80	86	96	
		ERF, probable [<i>A. thaliana</i>]	100	110	102	89	92	67	59	62	78	63	141	92	79	63	65	141	111	57	79	43	
			0.0	0.0	0.5	0.4	0.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.2	0.0	0.0	0.5	0.9	1.9	0.0	0.0	0.3	0.3	1.8
			Índice de daños de 'colapso de la corteza'																				

Continuación de la Tabla 48

FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN - ALBEDO - 'NAVELATE'		14h.A		Controles			Etileno + Aire			1-MCP + Aire			1-MCP + Etileno + Aire										
		Patrón de Expresión	Clon	Id	3d	4d	14d	Aire	14h	1d	3d	4d	14d	14h	1d	3d	4d	14d					
E-A = A	Patrón 6	Proteína más similar																					
		Prot. 'HOMEBOX KNOTTED-1 LIKE 4' (KNAT4) [<i>A. thaliana</i>]	C06001A02	100	113	92	106	84	114	106	83	111	85	105	90	213	199	123	105	115	159	184	135
		Co-regulador transcripcional SEUSS transcriptional [<i>A. thaliana</i>]	C06001D10	100	83	98	97	101	85	82	116	112	92	90	82	67	55	83	90	81	61	56	63
		ARF 7a, probable [<i>Oryza sativa</i> (japonica)]	C06003G10	100	110	92	92	87	101	88	88	104	71	87	102	85	78	80	87	90	80	80	88
		Prot. 'zinc finger' familia 'C ₃ HC ₄ RING finger' [<i>A. thaliana</i>]	C06007B01	100	100	100	112	84	76	73	74	93	79	115	104	154	140	100	115	125	144	136	99
		Prot. 'zinc finger' familia 'C ₃ HC ₄ RING finger' [<i>A. thaliana</i>]	C06011C08	100	105	90	82	64	109	114	73	95	60	102	68	96	102	82	102	64	75	117	109
		Prot. 'zinc finger LSD1' [<i>Brassica oleracea</i>]	C06013A04	100	114	74	82	88	116	72	84	87	71	105	98	112	124	135	105	92	95	141	135
		TBP2 ('TATA-binding protein 2') [<i>Oryza sativa</i>]	C06001E02	100	101	69	82	56	89	92	58	83	52	89	68	96	103	71	89	85	74	120	102
		MADS-box [<i>Vitis vinifera</i>]	C06005D11	100	79	64	74	53	73	81	67	78	53	99	64	60	52	50	99	85	59	67	57
		MYB [<i>Catharanthus roseus</i>]	C06013H06	100	81	66	65	58	107	116	59	85	46	72	57	69	64	55	72	53	61	83	165
				0.0	0.0	0.5	0.4	0.8	0.0	0.0	0.0	0.1	0.2	0.0	0.0	0.5	0.9	1.9	0.0	0.0	0.3	0.3	1.8

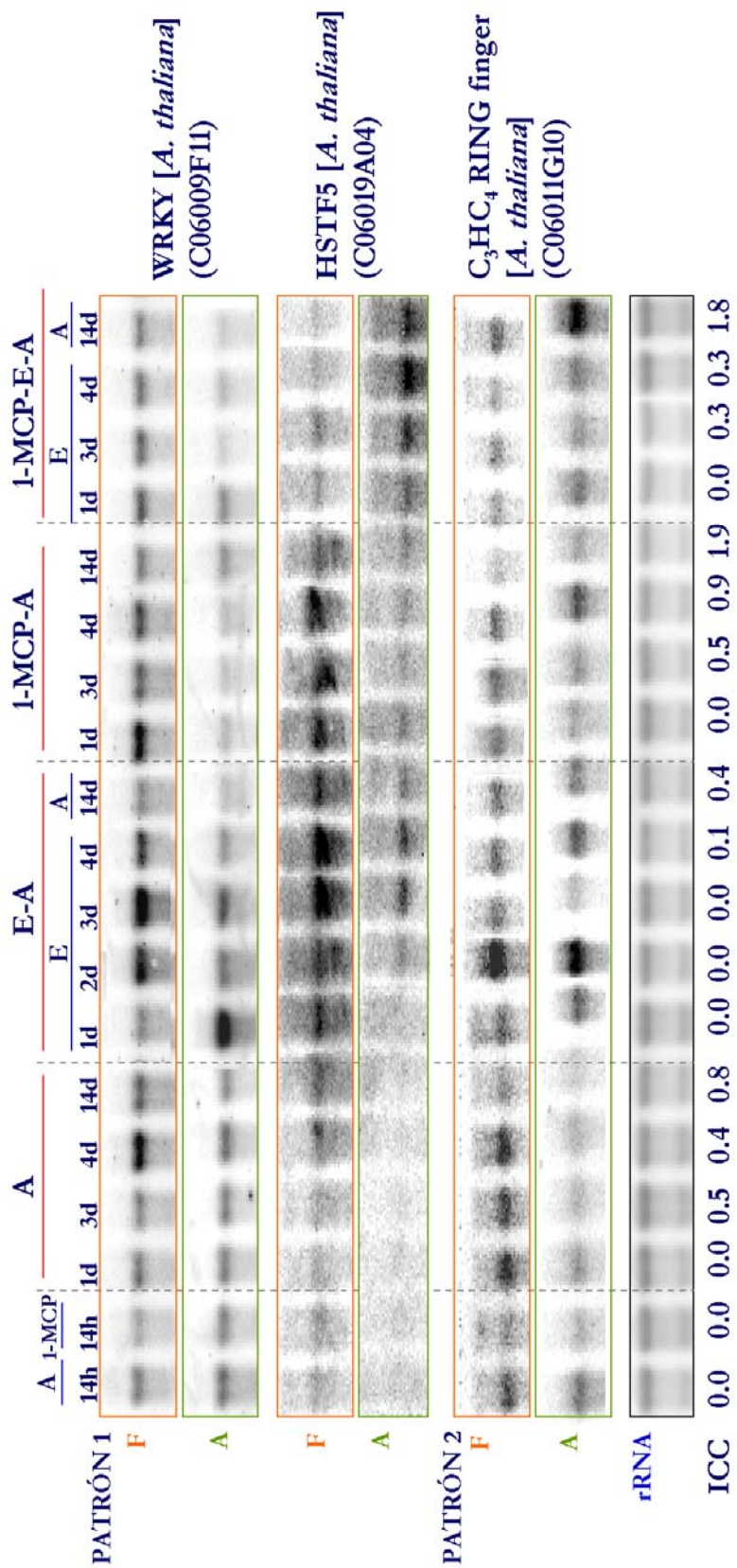


Figura 44: Ejemplo ilustrativo del análisis Northern correspondiente a los genes aislados de la biblioteca de cDNA 'FlavCurFrl' agrupados en los patrones 1 y 2 de acuerdo a su perfil de expresión en el flavado de frutos de naranja 'Navelate'. Los cambios en la expresión fueron analizados en el flavado (F) y albedo (A) de frutos recién traídos de campo (RTC), frutos almacenados en aire, frutos tratados hasta 4 d con 10 μL L⁻¹ de etileno y posteriormente almacenados durante 10 d en aire, frutos tratados 14 h con 1 μL L⁻¹ de 1-MCP y almacenados hasta 14 d en aire y frutos tratados con 1 μL L⁻¹ de 1-MCP, acondicionados hasta 4 d con 10 μL L⁻¹ de etileno y almacenados 10 d en aire. Los cambios en índice de 'colapso de la corteza' (ICC) se indican en la parte inferior de la figura.

DISCUSIÓN

1. ESTUDIO TRANSCRIPTÓMICO DE LOS MECANISMOS IMPLICADOS EN LA TOLERANCIA AL FRÍO INDUCIDA POR EL ACONDICIONAMIENTO TÉRMICO A ALTAS TEMPERATURAS EN FRUTOS DE MANDARINA 'FORTUNE'.

El estudio de los cambios de expresión génica asociados al desarrollo de 'daños de frío' en los frutos cítricos y de los mecanismos que aumentan la tolerancia a las bajas temperaturas inducidos en respuesta al curado (3 días 37 °C) se llevó a cabo mediante el empleo de micromatrices de cDNA. La mandarina 'Fortune' fue seleccionada como sistema de estudio por su elevada susceptibilidad a desarrollar esta alteración fisiológica. Durante dos campañas sucesivas se analizó la incidencia de 'daños de frío' en frutos curados y transferidos a 2 °C y en frutos almacenados directamente a dicha temperatura. Los resultados obtenidos confirmaron datos previos ya que mostraron que el curado fue efectivo aumentando la tolerancia al frío y evitó la aparición de daños durante al menos 60 días de almacenamiento (Gonzalez-Aguilar *et al.*, 2000). Los índices de 'daños de frío' en los frutos no acondicionados de las dos campañas fueron similares. Los primeros síntomas aparecieron a partir de los 10 días de almacenamiento y aumentaron progresivamente hasta observar un índice de aproximadamente 1,5 a los 30 días y de 3,0 al final mismo (Figura 10). En un estudio previo con frutos recolectados en la campaña 2000 se obtuvieron resultados muy similares por lo que también fueron utilizados, como una tercera réplica, para los ensayos de hibridación con la micromatriz '12K'.

En el presente estudio se construyó una biblioteca de cDNA, a la que se denominó 'FlavCurFr1', a partir de poly(A⁺) mRNA de una muestra formada por una mezcla proporcional de RNA de flavedo de frutos de mandarina 'Fortune' acondicionados 4 h, 1 y 3 días a 37 °C, y de frutos curados y almacenados 1, 3 y 10 días a 2 °C. Por tanto, cabría esperar la presencia en esta biblioteca de cDNAs correspondientes a genes inducidos por tratamientos cortos y largos de calor o por la combinación de calor y frío. Asimismo, podrían encontrarse genes inducidos por el frío a pesar de que su expresión pudiese estar afectada por el tratamiento previo de acondicionamiento a altas temperaturas. De un total de 1.152 clones secuenciados y depositados en la base del CFGP, 1.117 fueron secuencias válidas y correspondían a 936 unigenes, 46% de los cuales fueron 'singletons' (Figura 11B). Además de proteínas del metabolismo primario (42,4%), una elevada proporción codifican proteínas con funciones relacionadas con la transcripción (13,1%), ciclo celular y procesamiento del DNA (10,7%), síntesis de proteínas (7,9%) y con procesos de plegamiento, localización y modificación de las mismas (7,9%) (Figura 11D).

Entre los genes más representados de esta biblioteca de cDNA, dos codifican MTs, uno de los cuales presentó 16 representantes (Tabla 1). En la bibliografía se ha descrito que diversos miembros de esta familia de proteínas tienen capacidad de unión a diferentes metales, como Zn²⁺, Cd²⁺, Hg²⁺ o Cu²⁺ y, en algunos casos, se ha sugerido que podrían tener funciones de detoxificación y mantenimiento de la homeóstasis celular así como funciones en la defensa frente al estrés oxidativo (Kinningham y Kasarskis, 1998; Tapia-Alamos, 2002; Hall, 2002). Otros genes altamente representados codifican nodulinas. Los miembros de esta familia de proteínas, específica de plantas, se activan durante la formación de nódulos favoreciendo las interacciones simbióticas entre plantas leguminosas y bacterias del género *Rhizobium*. Estas proteínas poseen dominios conservados ricos en residuos de cisteína con capacidad de unión a diferentes iones divalentes, como el Fe²⁺, Cu²⁺, Ni²⁺, Zn²⁺, Co²⁺, Cd²⁺ o Hg²⁺, pudiendo también jugar un papel importante en la fijación del nitrógeno y en la unión a O₂ (Pawlowski *et al.*, 1997; Kawashima *et al.*, 2001; Kato *et al.*, 2002; Gupta *et al.*, 2002). Sheres *et al.* (1990) sugirieron que algunas podrían

participar en el transporte transmembrana de metales como el Fe^{2+} o Mo^{2+} hacia bacteroides para la síntesis de nitrogenasa y posteriormente Pawlowski *et al.* (1997) y Gupta *et al.* (2002) confirmaron esta idea. Otros autores asignaron a estas proteínas un papel regulador del balance redox en el tejido nodular (Moran *et al.*, 2000). Posteriormente, se comprobó que la sobreexpresión de un gen que codifica una nodulina 22 (Nod22) en *E. coli* aumentaba la tolerancia al estrés oxidativo, lo que indica que estas proteínas podrían estar implicadas en el mecanismo de protección frente a ROS en dichos procesos de simbiosis (Mohammad *et al.*, 2004).

Otros genes altamente representados en la biblioteca codifican enzimas relacionados con el estrés oxidativo, el metabolismo de fenilpropanoides, proteínas PR, entre las que se encuentra una proteína precursora de quitinasa de clase II de carácter ácido, y proteínas dehidrasas tipo LEAs. El papel de estas últimas en la protección al estrés por deshidratación se ha descrito no solamente por su función chaperona sino también por su capacidad de secuestrar iones de hierro (Wise, 2003; Wise y Tunnacliffe, 2004). Además, se ha comprobado que participan en la defensa frente al estrés oxidativo y se ha observado su inducción en respuesta al aumento de la concentración de H_2O_2 inducido por el tratamiento con paraquat o en situaciones de deficiencia de actividad catalasa (Desikan *et al.*, 2000; Vanderauwera *et al.*, 2005; Mowla *et al.*, 2006). En cítricos se ha demostrado su papel en la eliminación de ROS (Hara *et al.*, 2004) y se ha observado que son capaces de unir metales como Fe^{3+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} y Zn^{2+} (Hara *et al.*, 2005). Asimismo, destacan diversos genes que codifican enzimas LTP, una enzima de síntesis de almidón, y una proteína inhibidora de cisteín proteasas. Algunos miembros de esta familia de proteasas, que actúan sobre los grupos tiol, están implicados en la movilización de proteínas almacenadas en vacuolas y su inducción se ha relacionado con procesos de señalización en respuesta a diversos tipos de estrés biótico y abiótico, y con procesos de senescencia y muerte celular (Grudkowska y Zagdanska, 2004). Por último, se encontró una proteína ribosomal que participa en la traducción de proteínas en el citoplasma, y dos factores de transcripción, uno de ellos de respuesta a etileno.

En el estudio de las bases moleculares asociadas con la tolerancia al frío inducida por el tratamiento de curado se emplearon dos micromatrices diferentes de cDNA generadas dentro del marco del CFGP, denominadas '7K' y '12K', cada una con un total de 6300 y 11193 unigenes, respectivamente. En la primera de ellas se emplearon réplicas técnicas mientras que en la segunda se utilizó material genético procedente de frutos cosechados en tres campañas diferentes. Conviene recordar que en la construcción de la micromatriz '12K' se incluyeron los genes aislados de la biblioteca de cDNA generada en este trabajo. Utilizando ambas micromatrices se analizaron los cambios en expresión génica que tenían lugar en respuesta al calor, al frío y a la combinación de calor y frío.

El análisis estadístico SAM (FDR<1%) reveló que un 48% de los genes reunidos en la micromatriz '7K' modificaron los niveles de acumulación de sus transcritos en respuesta a alguna de las tres situaciones estudiadas (frío, calor y combinación de calor y frío), mientras que el empleo de réplicas biológicas redujo este número en aproximadamente un 24%. Este hecho puso de manifiesto la influencia de los factores precosecha en la reproducibilidad de las respuestas inducidas por este tipo de tratamientos ya que los índices de 'daño de frío' en los frutos no acondicionados y el estado de maduración de éstos fueron similares en las tres campañas y el curado fue siempre muy efectivo. En la mayoría de los casos se observó una misma tendencia o perfil de expresión aunque la variabilidad de la magnitud de los cambios de expresión en respuesta a las condiciones de estudio originó una falta de significación estadística en los resultados obtenidos a partir del análisis SAM (FDR<1%). Dicha variabilidad podría ser debida a la influencia de condiciones ambientales precosecha en la expresión de los genes analizados

en los frutos recién cosechados y también a la sensibilidad de los frutos al estímulo estudiado.

Por otro lado, en la micromatriz '7K' la condición que indujo el mayor número de respuestas diferenciales fue la combinación de calor y frío (3 días 37 °C + 20 días 2 °C) (73%) encontrándose un total de 1361 genes inducidos y 1576 reprimidos (Figura 14). En cambio, en la segunda micromatriz el número de genes que mostraron cambios fue similar en las tres condiciones estudiadas, alrededor de un 40-50% de total de genes se expresaron diferencialmente (Figura 18). En las dos micromatrices se comprobó que las respuestas de represión al calor y a la combinación de calor y frío predominaron sobre las de inducción. En respuesta al frío 'per se' en la micromatriz '7K' el número de genes reprimidos superó en un 18% al de genes inducidos (Figura 14). Sin embargo, en la micromatriz '12K' en los frutos almacenados directamente en frío predominaron los fenómenos de inducción, ya que entre los genes que mostraron cambios en respuesta al frío, un 78% se indujo mientras que el 22% se reprimió (Figura 18).

Actualmente no se dispone de una base de datos de anotación funcional para los frutos cítricos ni de herramientas de análisis funcional que permitan el estudio de rutas específicas del metabolismo de los mismos. Por ello, se utiliza como planta modelo *A. thaliana* (<http://www.arabidopsis.org/>). Aunque sólo podemos obtener información de aquellos genes que presentan homología en la base de datos de *A. thaliana*, teniendo en cuenta que el porcentaje de los mismos en las dos micromatrices utilizadas fue elevado (71 y 77 %, respectivamente), el empleo de programas de análisis de *A. thaliana* (FatiGO+ y AraCyc 3.5) ofrece una buena aproximación para el estudio de los mecanismos moleculares implicados en la respuesta al calor, al frío y a la combinación de calor y frío en los frutos cítricos. No obstante, conviene señalar algunas de las limitaciones de estos programas. Una limitación importante reside en el hecho de que varios genes de cítricos pueden tener un mismo ortólogo en *A. thaliana*. En el caso del programa FatiGO+, al estudiar el grupo de genes que para una determinada comparación mostraron cambios de expresión con respecto al resto de genes reunidos en la micromatriz, esto constituye un sesgo en el análisis, ya que un mismo gen de *A. thaliana* no puede agruparse en ambos conjuntos de genes. En el caso de AraCyc 3.5, se representa el promedio de la expresión de todos aquellos genes con el mismo ortólogo en *A. thaliana* a pesar de que éstos son genes diferentes. Conviene señalar que en muchos casos la nomenclatura empleada para designar los genes en la base de *A. thaliana* difiere de los correspondientes ortólogos en los frutos cítricos. Un ejemplo lo constituyen los genes ACS6, ACS1 y EFE de *A. thaliana* que corresponderían a los genes CsACS1 (AF048753), CsACS2 (AJ012696) y ACO (AF321533) de cítricos, respectivamente. La información y nomenclatura empleada en el TAIR se revisa cuatrimestralmente por los miembros de dicha comunidad científica y por tanto está siempre actualizada. Es interesante señalar, que en algunos genes la nomenclatura empleada corresponde a la asignación original desde su caracterización y que se ha conservado hasta la actualidad, como es el caso del gen EFE. Sin embargo, se ha comprobado que pueden existir genes representados en AraCyc 3.5 en una determinada ruta metabólica habiéndose observado una falta de actividad enzimática. Este sería el caso por ejemplo de los genes que codifican ACS10 y ACS12, que no poseen actividad ACC sintasa sino actividad transaminasa de aminoácidos aromáticos e intervienen en la síntesis de tirosina y fenilalanina (Yamagami *et al.*, 2003).

El análisis funcional de ontologías génicas (FatiGO+) mostró en ambas micromatrices una represión significativa de genes de procesos de biosíntesis de lípidos en respuesta a la combinación de calor y frío (Tabla 20). Un análisis más detallado de estos genes mostró que varios de ellos participan en la biosíntesis y elongación de ácidos grasos, biosíntesis de ceras epicuticulares y desaturación de ácidos grasos. Dentro de esta

categoría funcional se incluyeron, además, un gran número de genes implicados en la biosíntesis de isoprenoides, como carotenoides, probablemente debido a que estos compuestos se encuentran asociados con los lípidos de membrana (Tabla 7 y Tabla 18). Por otro lado, en la micromatriz '7K' los resultados de este análisis pusieron de manifiesto que la exposición al calor y/o a la combinación de calor y frío alteró la expresión de genes del metabolismo de derivados de aminoácidos y otros implicados en la modificación de proteínas. Asimismo, en dicha micromatriz este análisis indicó que la tolerancia inducida por el tratamiento de curado está relacionada con la inducción de procesos de regulación de la transcripción (Tabla 6 y Tabla 8B). Además, se observó una proporción muy elevada de genes relacionados con procesos de traducción reprimidos en respuesta al frío en frutos acondicionados y sin acondicionar (Tabla 6). Estas observaciones se confirmaron con los resultados del análisis de componentes celulares que indicaron que el frío favorece la represión de genes que codifican proteínas constituyentes de los ribosomas (Tabla 8A). Al analizar réplicas biológicas no se confirmaron estos hechos (Tabla 17). Sin embargo, teniendo en cuenta que los resultados de este análisis estadístico son porcentuales, es decir, que el nivel de significancia estadística en la representación de procesos biológicos varía en función del conjunto total de genes que se considere, y dada la variabilidad biológica del sistema de estudio, no podemos descartar la validez de los mismos obtenidos al utilizar réplicas técnicas. No obstante, los resultados comunes en ambas micromatrices, aunque más restrictivos, ofrecen un elevado grado de fiabilidad.

1.1. Metabolismo de lípidos.

Aunque no se conoce la señal primaria del 'daño de frío', existen numerosos trabajos que apoyan la teoría propuesta a principios de los 70 por Lyons (Lyons, 1973) indicando que esta alteración se produce como consecuencia de los cambios originados de por el estrés de frío en la permeabilidad de la membrana plasmática. Según esta teoría, los cambios en la composición de fosfolípidos y el grado de insaturación de lípidos de membrana formarían parte de las respuestas de defensa de las plantas frente a este tipo de estrés. El análisis detallado de genes relacionados con el metabolismo de lípidos mostró en las dos micromatrices utilizadas la presencia de un gen que codifica una enzima desaturasa de δ -8 esfingolípidos, homólogo al gen At2g46210 de *A. thaliana* (unigen C07008B12), cuya expresión se indujo más de 3 veces de forma específica en respuesta a la combinación de calor y frío (Tabla 2 y Tabla 14), lo que podría indicar que el efecto beneficioso del curado reduciendo los 'daños de frío' podría estar relacionado con su efecto incrementando el grado de insaturación de lípidos de membrana. En pomelos sin embargo, se comprobó que la exposición a 5 °C de frutos previamente acondicionados 7 días a 16 °C disminuía la expresión de un gen que codifica otra desaturasa Δ -8 de esfingolípidos diferente a la anterior, y aunque dicho tratamiento difiere del curado, también es efectivo reduciendo la incidencia de 'daños de frío'. (Maul *et al.*, 2008). No obstante, dicho tratamiento activó la expresión de un gen *FAD2* (Sapitnitskaya *et al.*, 2006) y de dos genes que codifican una acil-[ACP] desaturasa y una estearil-[ACP] desaturasa en los frutos almacenados posteriormente en frío (Maul *et al.*, 2008). Otros estudios demostraron que la sobreexpresión en plantas de tabaco del gen *FAD7* de *A. thaliana* que codifica una desaturasa de ácidos grasos ω -3 (Kodama *et al.*, 1994) y del gen Δ 9-desaturasa de una cianobacteria (Ishizaki-Nishizawa *et al.*, 1996) aumentaban la tolerancia al frío. Además, se ha observado que los mutantes de *A. thaliana* *fad5*, *fad6* y el triple mutante *fad3 fad7 fad8*, con deficiencia en desaturasas omega-3, eran menos tolerantes al frío, ya que manifestaban clorosis cuando se exponían a bajas temperaturas. Estos resultados sugerían que este grupo de enzimas desaturasas podrían tener un papel

clave en la fotosíntesis y el mantenimiento de la estructura del cloroplasto en plantas sometidas a este estrés (Hugly y Somerville, 1992; Routaboul *et al.*, 2000). Asimismo, se había observado en mutantes sensibles al frío de *A. thaliana* la acumulación del transcrito de un gen que codifica una estearil-ACP desaturasa y del gen *ADS2* que codifica una $\Delta 9$ -desaturasa (delta-9 desaturasa) (Fukuchi-Mizutani *et al.*, 1998). Estos y otros muchos estudios realizados con diversos mutantes de *A. thaliana* sensibles al frío apoyan la idea inicial de que los lípidos pueden ser marcadores del grado de susceptibilidad al estrés de frío (Hugly *et al.*, 1989; Miquel *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 1997; Berberich *et al.*, 1998; Routaboul *et al.*, 2000). Sin embargo, el curado favoreció la disminución de la expresión de otros genes que también codifican enzimas desaturasas (Tabla 7 y Tabla 18). Así, reprimidos en respuesta a la combinación específica de calor y frío pero no al frío 'per se', destaca el gen *FAD2* (At3g12120; unigen 7029), que codifica una desaturasa del ácido ω -6-oleico, cuyos niveles en la micromatriz '7K' disminuyeron a la mitad en los frutos curados y almacenados 20 días a 2 °C y no se detectaron en la segunda micromatriz a los 30 días de almacenamiento a dicha temperatura en los frutos acondicionados. Además, en esta última micromatriz se encontró con un perfil de expresión similar al anterior otro gen que codifica una estearil-CoA / δ -9 desaturasa (At3g15870) (Tabla 18). El conjunto de estos resultados indican que existe una falta de correlación entre el grado de insaturación de lípidos en el flavedo y el efecto beneficioso del tratamiento de curado o de calor intermitente aumentando la tolerancia al frío de los frutos cítricos (Mulas *et al.*, 1997; Schirra y Cohen, 1999). Por otro lado, en este análisis también se detectaron otros miembros de esta familia que disminuyeron sus niveles de expresión en respuesta al frío, no detectándose diferencias significativas al final del almacenamiento con los frutos acondicionados y expuestos directamente a 2 °C. Provar *et al.* (2003) comprobaron que un tipo de mutantes de *A. thaliana* que desarrollaron 'daños de frío' a 13 °C, que se manifestaban como clorosis, no mostraban una disminución significativa de la expresión de diversos genes que codificaban desaturasas durante su almacenamiento a 13 °C. Sin embargo, otros mutantes que no sobrevivían más de 3 días a dicha temperatura presentaron una disminución en la expresión de genes *FAD2*, *FAD3*, *FAD6*, *FAD7* o *FAD8*. En base a estos resultados, estos autores sugirieron que estas enzimas no tienen un papel limitante en el mecanismo que confiere tolerancia al frío en estas plantas aunque pueden ser un factor crítico para su supervivencia durante el almacenamiento a bajas temperaturas.

Otros genes del metabolismo de lípidos incluidos en la lista detallada de los que reprimieron su expresión, según el análisis FatiGO+, en respuesta a la combinación de calor y frío en la micromatriz '7K' (Tabla 7), codifican enzimas implicados en la biosíntesis de ceras epicuticulares, como las proteínas CER1 (At5g57800), 'fiddlehead' (At2g26250) y la enzima de condensación de ácidos grasos de cadena larga VLCFAs (del inglés 'very-long-chain fatty acids') codificada por el gen *CUT1* (At1g68530). No obstante, a excepción del que codifica la proteína 'fiddlehead', implicada en la síntesis de ácidos grasos de cadena larga de la cutícula y en la regulación de las interacciones entre células epidérmicas (Yephremov *et al.*, 1999; Pruitt *et al.*, 2000), el resto mostraron una disminución similar de su expresión en respuesta al frío 'per se'. El análisis de réplicas biológicas mostró que la expresión del gen *CUT1* no varió en los frutos almacenados 30 días a 2 °C mientras que se reprimió hasta límites no detectables en respuesta al calor y a la combinación de calor y frío (Tabla 18 y Tabla 22). Lolle *et al.* (1997) observaron que plantas de *A. thaliana* con una mutación de este gen mostraban cambios en la permeabilidad de la cutícula e indirectamente en el grado de selectividad de la membrana. Asimismo, estudios realizados en mutantes de *A. thaliana* señalan que el gen *CUT1* es esencial en la síntesis de ceras epicuticulares (Kunst *et al.*, 2000) y se expresa en respuesta

al estrés salino o la deshidratación (Millar *et al.*, 1999; Kunst *et al.*, 2000). En pomelos, se ha observado que la exposición a 5 °C reprime la expresión de un gran número de genes que codifican enzimas de biosíntesis y deposición de ceras, entre los que se encuentra el gen *CUT1* y diversas *LTP*, mientras que el acondicionamiento previo de 7 días a 16 °C, que reduce la incidencia de ‘daños de frío’ en estos frutos, evitaba esa represión en los frutos almacenados a 5 °C (Maul *et al.*, 2008). Por otro lado, un estudio realizado con un mutante de *A. thaliana* que presenta una disrupción del gen que codifica la proteína wax2, homólogo a *CER1*, mostró una desorganización estructural de la cutícula, presentando un escaso grosor y un aspecto opaco (Chen *et al.*, 2003). Sin embargo, en nuestro caso este gen no parece tener un papel relevante en el efecto beneficioso del curado ni tampoco está asociado al daño. Aunque en otras variedades de frutos cítricos como pomelos se ha comprobado que la aplicación de ceras reduce la incidencia de ‘daños de frío’ (Wild, 1993; McDonald *et al.*, 1993b; Dou, 2004; Bajwa y Anjum, 2007), los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que los cambios en la expresión de genes implicados en la biosíntesis de ceras epicuticulares no están relacionados con el efecto beneficioso del curado y apoyan la idea de que el estrés hídrico no es un factor crítico en el desarrollo de ‘daños de frío’ en los frutos cítricos (McDonald *et al.*, 1993b; Schirra *et al.*, 2004; Erkan *et al.*, 2005; Alférez *et al.*, 2005a).

Por otro lado, en ambas micromatrices se encontraron genes que codifican enzimas de degradación de lípidos cuya expresión fue mayor en los frutos almacenados directamente a 2 °C respecto a los previamente curados (Tabla 9 y Tabla 19). Así, en la micromatriz ‘7K’ destaca un gen que codifica una fosfolipasa D de tipo α -1 (PLD α -1) (At1g52570) cuya expresión disminuyó en respuesta al frío aunque el curado potenció dicho efecto y un gen que codifica una lipasa de TAG (At1g51440) que se reprimió hasta límites no detectables en respuesta a la combinación de calor y frío. En otros casos, como dos genes que codifican una lipasa de clase 3 (At5g42930) o una tioesterasa del ácido palmítico (At3g60340), se produjo una inducción específica en respuesta al frío ‘per se’ (Tabla 9). Asimismo, en la micromatriz ‘12K’ se encontraron diversos genes que codifican lipasas extracelulares e hidrolasas tipo α/β , que poseen un dominio lipasa, solamente expresados en frío pero en los frutos no curados. (Tabla 19). Además, en esta micromatriz destaca un gen que codifica una β -fosfolipasa D (β -PLD) (At2g42010) que se indujo más de 4 veces en repuesta al frío ‘per se’ y no modificó su expresión en respuesta al calor ni a la combinación de calor y frío. Las enzimas PLDs están implicadas en procesos de regulación de actina en el citoesqueleto, tráfico de vesículas de secreción, endocitosis y procesos de señalización (Jenkins y Frohman, 2005). El aumento de actividad de este grupo de enzimas se ha relacionado con las respuestas de las plantas a la deshidratación, estrés osmótico, herida, respuesta a elicitores y al estrés por bajas temperaturas de frío y de congelación (Wang, 2002; Ruelland *et al.*, 2002; Welti *et al.*, 2002). Asimismo, Zhang *et al.* (2005) sugirieron que podrían estar implicadas en la señalización mediada por ABA y con el aumento en la concentración de ROS. Recientemente, Mao *et al.* (2007) observaron que la exposición de frutos de pepino a 37 °C durante 24 h disminuía tanto la acumulación de los transcritos del gen como la actividad de la enzima durante su posterior almacenamiento a 2 °C, con respecto a frutos expuestos directamente a dicha temperatura. Dichos resultados fueron relacionados con la aparición de daños en la piel (picado) en los frutos almacenados en frío y con cambios en la pérdida iónica que reflejan la alteración de la membrana plasmática. Así, sugirieron que el tratamiento de acondicionamiento a altas temperaturas podía reducir la formación ROS que se producirían como consecuencia de la degradación de la membrana en los frutos almacenados directamente en frío. Asimismo, otros autores, observaron en frutos de pomelo acondicionados 7 días a 16 °C y posteriormente almacenados 14 días a 5 °C, que mostraron menos ‘daños de frío’ que los

almacenados directamente a esta temperatura, una represión en la acumulación de los transcritos de genes que codifican fosfolipasas como una fosfolipasa C (PLC) y diversas lipasas de clase 3 (Maul *et al.*, 2008). Estos resultados son pues coherentes con los obtenidos en el presente trabajo en frutos de mandarina 'Fortune'.

En resumen, los resultados de este trabajo ponen de manifiesto que el efecto del curado reduciendo la incidencia de 'daños de frío' en frutos de mandarina 'Fortune' parece estar más relacionado con su efecto reprimiendo la expresión de genes que codifican fosfolipasas, que con cambios en la expresión de genes que codifican enzimas del metabolismo de ácidos grasos que afectan al grado de insaturación de los mismos o a la síntesis de ceras.

El ácido jasmónico se ha relacionado con la defensa frente al frío en distintos frutos como el pimiento (Fung *et al.*, 2004), la guayaba (Gonzalez-Aguilar *et al.*, 2004) o el tomate (Fung *et al.*, 2006). En el caso de los frutos cítricos, se ha demostrado que reduce la severidad de 'daños de frío' aunque su eficacia es muy inferior a la del curado (Meir *et al.*, 1996). La concentración de esta molécula puede aumentar como consecuencia del incremento en la actividad LOX. En frutos de pomelo se ha comprobado que la exposición al frío disminuye la expresión de algunos genes implicados en su ruta de biosíntesis, como los que codifican las enzimas AOS o OPDA reductasa (Maul *et al.*, 2008). Sin embargo, los resultados del presente trabajo mostraron una mayor expresión de dos genes que codifican dos S-adenosil L-metionina: ácido jasmónico carboximetil transferasas (At1g19640) y del gen homólogo a At1g76690 de *A. thaliana* (unigen 2737), que codifica una OPDA reductasa OPR2, en los frutos de mandarina 'Fortune' no curados almacenados en frío respecto a los previamente curados (Anexo Fichero Excel 'Fortune'- '7K' y '12K' adjunto). Este última, cataliza la conversión de OPDA a OPC con reducida eficiencia en comparación con OPR3 que constituye la isoenzima más relevante implicada en la síntesis de ácido jasmónico (Schaller *et al.*, 2000). Aunque dichos cambios no parecen estar implicados en el efecto beneficioso de este tratamiento, podrían indicar que en los frutos de mandarina 'Fortune' almacenados directamente en frío podría existir una demanda de compuestos de la ruta del ácido jasmónico para reducir el daño producido por este estrés. Esta idea concuerda con la sugerida por Gonzalez-Aguilar *et al.* (2004) de que el efecto beneficioso de ácido jasmónico reduciendo la incidencia de 'daños de frío' en frutos de guayaba podía estar relacionado con el incremento en LOX durante su exposición al frío. Estos autores sugirieron que el ácido jasmónico y los cambios en LOX participarían como señalizadores en la ruta del ácido octadecanoico tratando de frenar la propagación de la lesión asociada a la acumulación de ROS en respuesta al frío.

Otros genes reprimidos en respuesta a la combinación de calor y frío incluidos, según el análisis FatiGO+, en la categoría funcional de procesos de biosíntesis de lípidos (nivel 6), codifican enzimas de biosíntesis de isoprenoides y compuestos derivados como carotenoides (Tabla 6 y Tabla 17). Los carotenoides constituyen componentes esenciales del aparato fotosintético y juegan un papel importante en la captación de luz. Además, pueden participar en la defensa de las plantas frente a situaciones adversas que impliquen estrés fotooxidativo, ya que disipan el exceso de energía luminosa, evitando el daño de las membranas y son capaces de eliminar ROS y de suprimir la peroxidación lipídica (Britton *et al.*, 1998; Peñuelas y Munné-Bosch, 2005; Howitt y Pogson, 2006). En la micromatriz '7K', el análisis Aracyc de visualización de rutas metabólicas mostró dos rutas de biosíntesis del compuesto IPP claramente diferenciadas (Figura 16). En la primera de ellas, la ruta MEP localizada en los plastos, se encontraron 3 genes que conducen a la síntesis del compuesto IPP cuya expresión disminuyó en respuesta al calor y a la combinación de calor y frío. Sin embargo, en la ruta del mevalonato, en el citoplasma, solamente un gen que codifica una enzima de descarboxilación y fosforilación del ácido mevalónico (AMV) y que da lugar a

IPP (difosfomevalonato descarboxilasa), se reprimió en todas las situaciones estudiadas, aunque mostró mayor expresión en los frutos almacenados directamente a 2 °C. Asimismo, el análisis de los perfiles de expresión en la micromatriz '7K' de genes que codifican enzimas que participan en la ruta de biosíntesis de carotenoides (Figura 17) reveló un elevado número de ellos más expresados en los frutos almacenados directamente a 2 °C respecto a los previamente acondicionados. Entre ellos, 5 se reprimieron en respuesta al calor manteniendo reducidos sus niveles durante la exposición al frío y codifican una PSY, una LYC y una AAO3, mientras que no modificaron su expresión en respuesta al frío 'per se'. El primero de ellos cataliza la transformación en dos pasos sucesivos de 2-geranil geranil PP a fitoeno; el segundo la de licopeno a γ -caroteno y el tercero, constituye el último enzima de la ruta y conduce a la síntesis de ABA. En otros genes de esta ruta fue necesaria la combinación de calor y frío para reprimir la expresión del gen. Es el caso de dos genes que codifican una ABA1 y una NCED3 (At3g14440), que conducen a la biosíntesis del aldehído de ABA, cuyos niveles de expresión tampoco variaron en los frutos almacenados directamente a 2 °C. En los frutos cítricos se han caracterizado diversos genes de la familia NCED y estudiado su patrón de expresión en respuesta a estrés por deshidratación y durante el proceso de maduración natural o mediante aplicación de etileno (Rodrigo *et al.*, 2006; Agustí *et al.*, 2007). Así, se ha observado que la expresión del gen *CcNCED1*, que presenta homología con *NCED3* de *A. thaliana*, aumentaba de forma gradual durante la maduración en el flavedo de frutos de naranjas 'Navelate' y por el tratamiento con etileno ¿durante la desverdización? de manera dependiente del tiempo de aplicación (Rodrigo *et al.*, 2006). Además, se inducía en hojas sometidas a estrés hídrico de forma paralela a la acumulación de ABA. Recientemente, otros investigadores aislaron otro gen (*CcNCED3*) que presentaba una identidad del 98% con este último cuya expresión también aumentó en respuesta al estrés hídrico en hojas y ovarios de 'Clemenules' (Agustí *et al.*, 2007). El hecho de que este gen se reprima en los frutos acondicionados almacenados en frío podría explicar que el tratamiento de curado redujese la concentración de ABA en los frutos de mandarina 'Fortuna' y apoyaría la idea de que en el mecanismo que induce tolerancia al frío no interviene el ABA (Lafuente *et al.*, 1997). Este hecho fue también observado en cotiledones de pepinos sensibles al frío y acondicionados a 37 °C (Lafuente *et al.*, 1991).

La pérdida de color por efecto de tratamientos de acondicionamiento térmico en los frutos cítricos ya había sido observada inicialmente por Plaza *et al.* (2004). Posteriormente, Carmona *et al.* (2006) demostraron que el curado puede provocar cambios en el contenido y composición de carotenoides, lo que se relacionó con una pérdida de color en el flavedo de los frutos cítricos. Recientemente estos autores comprobaron que la exposición a 2 °C de frutos de naranjas 'Navelina', tolerantes al frío, apenas produce cambios relevantes en estos compuestos (Carmona *et al.*, 2007). De acuerdo con estos autores, Maul *et al.* (2008) apenas detectaron diferencias en la expresión de genes de esta ruta metabólica en frutos de pomelo almacenados directamente a 5 °C. A diferencia de estos autores, los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que la exposición al frío de frutos no acondicionados de mandarina 'Fortune' reprimió la expresión de dos genes que codifican una ZDS y una LUT1, que participan en la síntesis de licopeno y luteína, respectivamente, así como la de otros que codifican una β -OHasa 1, implicada en la síntesis de los compuestos precursores de los apocarotenoides β -criptoxantina y zeaxantina. No obstante, el análisis de réplicas biológicas, a excepción de 3 genes que codifican una capsantina/capsorubina sintasa y dos terpeno sintasas, que no respondieron al frío (Tabla 18), no confirmó dichos resultados (Figura 21). El conjunto de los resultados obtenidos indican que el tratamiento de curado y el frío pueden afectar a la síntesis de carotenoides en el flavedo de los frutos cítricos, aunque los cambios en la acumulación de los transcritos de

los genes de esta ruta en respuesta a dichas condiciones pueden variar en función de distintos factores precosecha.

1.2. Estrés oxidativo.

Aunque el análisis de ontologías génicas no reveló una proporción estadísticamente significativa en el grupo de genes con expresión diferencial de genes relacionados con procesos de respuesta a estrés oxidativo en ninguna de las comparaciones realizadas, teniendo en cuenta que el estrés oxidativo y la peroxidación de lípidos de membrana se ha relacionado con el ‘daño de frío’ en plantas (Wise y Naylor, 1987a; 1987b; Foyer *et al.*, 1994; Payton *et al.*, 2001) y en distintos frutos almacenados en oscuridad (Lafuente *et al.*, 2005), incluyendo los frutos cítricos (Sala, 1998; Sala y Lafuente, 1999; Sanchez-Ballesta *et al.*, 2003; Sala *et al.*, 2005), se ha llevado a cabo un análisis exhaustivo de los cambios en expresión de genes del sistema antioxidante en los frutos acondicionados y no acondicionados de la mandarina ‘Fortune’ almacenados en frío. Entre aquellos con mayor expresión en los frutos acondicionados respecto a los no acondicionados a los 20 días de almacenamiento a 2 °C (micromatriz ‘7K’), se encontró un gen que codifica una AOX (At3g22360) (Fichero Excel ‘Fortune’-‘7K’ adjunto). El aumento en la expresión de este gen en respuesta a la combinación de calor y frío fue al menos dos veces mayor al que se produjo en respuesta al calor o al frío ‘per se’ lo que sugiere que la enzima AOX podría participar en el efecto protector del curado frente al frío evitando o reduciendo la formación de ROS en los frutos cítricos. Estos resultados confirmarían datos previos que indican la participación de esta enzima en la susceptibilidad al frío de otros frutos (Purvis *et al.*, 1995; Fung *et al.*, 2004).

Asimismo, el curado favoreció la expresión de otros genes que participan en la eliminación de ROS durante el almacenamiento en frío (Tabla 4). Así, se encontraron 4 genes que codifican dos GSTs 22, una glutaredoxina y una DHAR (At1g75270), que se indujeron en respuesta al calor y a la combinación de calor y frío; mientras que otros que codifican una tioredoxina, una proteína precursora de POD y una GST 14 se indujeron exclusivamente en respuesta a la combinación del calor y frío. Además, se encontró un gen que codifica una Cu-Mn SOD que se indujo en respuesta al calor aunque su expresión disminuyó al transferir los frutos a 2 °C. Por otro lado, en la micromatriz ‘7K’ se encontró que la expresión de un gen que codifica una L-galactosa deshidrogenasa implicada en la biosíntesis de ácido ascórbico (At4g33670) (Fichero Excel ‘Fortune’-‘7K’ adjunto) se inducía más de dos veces específicamente en respuesta a la combinación de calor y frío. Conviene señalar que el ácido ascórbico además de ser antioxidante, es necesario para el buen funcionamiento del sistema enzimático antioxidante en el ciclo de Halliwell-Asada. Un resultado similar se observó en frutos de pomelo donde el acondicionamiento de 7 días a 16 °C evitó la caída de expresión de dos genes implicados en la biosíntesis de esta vitamina que se produce cuando los frutos se almacenan directamente 14 días a 5 °C, lo que sugirió que el mantenimiento de sus niveles podría ser necesario para reducir el daño oxidativo generado durante la exposición a temperaturas que causan ‘daños de frío’ (Maul *et al.*, 2008). Por último, se detectaron dos genes con mayor expresión en los frutos curados que en los no curados expuestos al frío que codifican dos proteínas precursoras de ferritinas que, por su capacidad para quelar Fe^{2+} , podrían reducir el efecto Fenton y por consiguiente la formación del radical hidroxilo (OH^{\bullet}), muy tóxico para las células (Cairo *et al.*, 1995; Zhao *et al.*, 2003; Strozycycki *et al.*, 2007; Theil, 2008). Uno de ellos (unigen 6792) se indujo específicamente más de 10 veces en respuesta a la combinación de calor y frío (Tabla 2) mientras que el otro (unigen 6087), solamente se detectó en esta última condición (Tabla 50). El análisis del perfil de expresión de estos genes utilizando réplicas biológicas de frutos cosechados en 3 campañas diferentes no mostró variaciones

significativas en ninguna de las condiciones estudiadas. Es interesante señalar, sin embargo, que los genes que codifican esta familia de proteínas se encuentran entre los más altamente representados en la biblioteca de cDNA de flavedo construida en este trabajo (Tabla 1).

Otros genes relacionados con el estrés oxidativo se expresaron más en los frutos almacenados directamente a 2 °C. Así, en la primera micromatriz se detectaron diversos genes que codifican enzimas SOD, POD y GSTs reprimidos en respuesta al calor y/o a la combinación de calor y frío pero no al frío 'per se' (Tabla 4). También relacionados con la defensa al estrés oxidativo, en la micromatriz '12K' se encontraron dos genes implicados en la síntesis de tocoferol, que codifican una GGTA del ácido homogentísico (unigenes 6566 y 537), los cuales se indujeron más de 3 veces en respuesta al frío y se reprimieron dos veces en respuesta a la combinación de calor y frío (Tabla 13). El tocoferol, a diferencia de otros antioxidantes hidrosolubles como ascorbato o glutatión, posee una función protectora de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) capaz de bloquear la cascada de reacciones de peroxidación lipídica, ya que se encuentra localizado en el interior de las membranas (Sattler *et al.*, 2006; Dörmann, 2007). Recientemente se ha demostrado que los tocoferoles modulan el metabolismo de los PUFAs en el retículo endoplásmico durante la adaptación de plantas de *A. thaliana* al frío, observando que mutantes deficientes en esta vitamina, que muestran una alteración en el desarrollo de la pared celular y en los procesos de transporte de fotoasimilados a dicha temperatura, presentan cambios en la composición de estos ácidos grasos (Maeda *et al.*, 2008). Asimismo, se encontró un gen que codifica una tocoferol OMT (unigen 5042) reprimido dos veces solamente en los frutos curados expuestos al frío (Fichero Excel 'Fortune'-'12K' adjunto). Sin embargo, en frutos de pomelo se observó que los niveles de expresión de un gen de biosíntesis de dicho antioxidante fueron menores en frutos almacenados 14 días a 5 °C respecto a los frutos previamente acondicionados 7 días a 16 °C los cuales no presentaron 'daños de frío' (Maul *et al.*, 2008). No obstante, en base a los resultados obtenidos, no se descarta la posibilidad de que esta vitamina pueda estar implicada en la respuesta de defensa de los frutos de mandarina 'Fortune' frente al frío aunque no parece estar asociado al efecto beneficioso del curado reduciendo la incidencia de esta alteración.

Por otro lado, inducidos específicamente en respuesta al frío 'per se' se encontraron en ambas micromatrices de cDNA diversos genes que codifican oxidoreductasas con dominio de unión a FAD (Tabla 20). Entre ellos, varios genes que codifican proteínas homólogas a CPRD2 de frijol y un gen con homología a una nectarina 5 (NEC5) de tabaco. Las proteínas CPRD (del inglés 'cowpea responsive to dehydration') se inducen en distintas situaciones de estrés como la deshidratación y el estrés salino pero no con el calor o el frío (Iuchi *et al.*, 1996). En la micromatriz '7K' se encontraron dos genes homólogos a CPRD2 y en la micromatriz '12K' tres, uno inducido más de 6 veces y dos más de 9 veces. (Tabla 13 y Tabla 20). La proteína NEC5, codificada por un gen homólogo a At5g44360 de *A. thaliana* y perteneciente a la familia de enzimas BBE (del inglés 'berberine-bridge-enzyme') con dominio de unión a flavina, posee actividad glucosa oxidasa y se ha relacionado con las respuestas de defensa a la infección (Carter y Thornburg, 2004). En la micromatriz '12K', dicho gen junto a otro que codifica una ácido tetrahydrocannabinólico sintasa, que también constituye una oxidoreductasa con dominio de unión a FAD, se indujeron 11 y 7 veces en los frutos almacenados directamente 30 días a 2 °C, respectivamente (Tabla 13). Acorde con estas observaciones, los resultados obtenidos en este trabajo apuntan a considerar que esta familia de proteínas podría estar asociada al desarrollo de 'daños de frío' en frutos de mandarina 'Fortune'. La implicación de proteínas que presentan actividad glucosa oxidasa en el estrés de frío no ha sido descrita hasta el

momento. No obstante, es interesante señalar que el incremento en su actividad favorece la formación de H_2O_2 .

El conjunto de estos resultados ampliaría pues datos previos que sugerían que el estrés oxidativo puede favorecer el desarrollo de ‘daños de frío’ en los frutos cítricos y que el tratamiento de curado es capaz de desencadenar respuestas de defensa que evitan la formación de especies tóxicas o que reducen su impacto una vez formadas (Sala y Lafuente, 1999; Sanchez-Ballesta *et al.*, 2003).

Teniendo en cuenta estos resultados y que algunos de los genes más representados en la biblioteca de cDNA codifican MTs, ferritinas y nodulinas, todas ellas implicadas en el mantenimiento de la homeostasis de metales, se analizó el efecto del tratamiento con una sal de Fe^{2+} en la incidencia y desarrollo de ‘daños de frío’ en frutos de mandarina ‘Fortune’ almacenados durante 40 días a 2 °C (Figura 5 y Figura 6). El exceso de Fe^{2+} podría favorecer la incidencia de estos daños ya que participa en la formación de radicales OH^\bullet en la reacción de Fenton (Halliwell y Gutteridge, 1986; Imlay *et al.*, 1988; Li y Trush, 1993a; Li y Trush, 1993b; Fry *et al.*, 2002). A las concentraciones aplicadas inicialmente (1, 10 y 100 mM) se observó un efecto fitotóxico muy marcado originando daños, diferentes a los causados por el frío, fundamentalmente en los frutos acondicionados y almacenados a 2 °C y en los controles almacenados a 12 °C (Figura 22). Además, ninguno de estos tratamientos revirtió el efecto del curado. La aplicación conjunta de esta sal con agentes quelantes tampoco modificó la susceptibilidad al frío de las mandarinas ‘Fortune’. Para quelar el Fe^{2+} se utilizó primeramente ácido tánico. Lopes *et al.* (1999) comprobaron que la actividad antioxidante del ácido tánico en la célula se debe a su capacidad para formar complejos estables con el Fe^{2+} impidiendo que participe en la reacción de Fenton más que por su capacidad de eliminar OH^\bullet . Estos autores comprobaron que existe una competencia por la unión a este metal con el H_2O_2 . Sin embargo, su aplicación con la sal de Fe^{2+} favoreció la formación de precipitados pardos en la superficie por lo que no pudo realizarse una evaluación fiable de los daños. Por ello, en un segundo experimento se utilizó un quelante más específico: la ferrocina (Figura 6). En estudios previos se ha comprobado que el empleo de este quelante en cepas mutantes $\Delta fur \Delta recA$ de *E. coli*, que producen un exceso de $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, aumenta su tolerancia al estrés oxidativo (Touati *et al.*, 1995). Sin embargo, en nuestro caso no se observaron diferencias en la incidencia de ‘daños de frío’ entre los frutos tratados con ferrocina 1 mM con o sin Fe^{2+} 0.1 mM y los controles almacenados a 2 °C.

La aplicación de la sal de Fe^{2+} a una concentración 0.1 mM redujo en aproximadamente un 30% la incidencia de estos daños en los frutos almacenados 40 días a 2 °C (Figura 29). No obstante, en frutos cosechados en un estado más inmaduro, que presentan menor susceptibilidad al frío, no se observaron estas diferencias entre frutos tratados y no tratados (datos no mostrados). Por otro lado, el tratamiento inductor de estrés oxidativo (paracuat 1 mM + H_2O_2 1 mM + Fe^{2+} 0.1 mM), que favorecería la formación de OH^\bullet , redujo la incidencia de ‘daños de frío’ en un 20-30% con respecto a los frutos control (agua) o a los tratados con Fe^{2+} almacenados a 2 °C (Figura 27). Este hecho fue confirmado en una segunda experiencia utilizando frutos cosechados un mes más tarde (Figura 29). En este caso, se observó una eficacia similar entre este tratamiento y la mezcla de paracuat y H_2O_2 en ausencia de Fe^{2+} , hecho que podría estar relacionado con que los niveles endógenos de este metal podrían ser suficientes para generar el efecto Fenton en estas condiciones. No obstante, en ambos casos los índices de daño de frío fueron 3 veces inferiores a los observados en los frutos control o tratados con Fe^{2+} 0,1 mM. En los dos ensayos los frutos almacenados a 12 °C y los acondicionados y transferidos al frío no presentaron daños en la piel. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en distintos estudios realizados en células animales (Yoo *et al.*, 1999), cianobacterias (Hossain y

Nakamoto, 2003) y en plantas (Okuda *et al.*, 1992; In *et al.*, 2005), donde se ha comprobado que el paracuat o su mezcla con H₂O₂ pueden desencadenar respuestas de defensa que reducirían la peroxidación lipídica cuando las plantas se exponen posteriormente a un estrés térmico. Asimismo, se ha descrito en plantas tratadas con paracuat que el H₂O₂ formado puede difundir al interior de las vacuolas donde se produce la oxidación de compuestos fenólicos y la generación de radicales libres que activan las enzimas del ciclo de Halliwell Asada (Takahama, 2004). Otros autores demostraron que el tratamiento con paracuat en plantas de *A. thaliana* induce un aumento en la expresión de un gen que codifica una fosfolipasa IIA (PLA IIA), la cual puede desencadenar una cascada de señales y activar respuestas secundarias de defensa frente a diversos estreses (Narusaka *et al.*, 2003). Los resultados obtenidos sugieren que el aumento de estrés oxidativo en la célula en los frutos tratados con esta mezcla podría favorecer procesos de protección cruzada frente a dicho estrés aumentando la actividad de enzimas del sistema antioxidante y con ello, la tolerancia al frío en esta variedad de mandarinas. Por otro lado, es interesante señalar que en los frutos tratados con la mezcla de paracuat 1 mM + H₂O₂ 1 mM + Fe²⁺ 0.1 mM almacenados a 12 °C se produjo una pérdida de color hacia tonalidades más amarillas (Figura 28). Este hecho coincidiría con el observado por Youngman y Dodge (1979) en cotiledones de lino y confirmaría que el tratamiento fue eficaz produciendo ROS, ya que estas especies favorecen la degradación de carotenoides (Peñuelas y Munné-Bosch, 2005).

Debido a que uno de los genes más abundantes en la biblioteca de cDNA FlavCurFr1 presentó homología con dos genes de *Agnus glutinosa* que codifican nodulinas (AgNt84 y Ag164), que se caracterizan por su afinidad a unir diferentes metales divalentes (Pawlowski *et al.*, 1997; Gupta *et al.*, 2002), en este trabajo además de estudiar el efecto del Fe²⁺ en la incidencia de los ‘daños de frío’, se analizó el efecto de la aplicación de sales de otros metales divalentes: Cu²⁺, Zn²⁺, Mn²⁺ y Mg²⁺. En el caso de la sal de Cu²⁺ se aplicaron inicialmente concentraciones de 1, 10 y 100 mM y, al igual que con la sal de Fe²⁺, se observó un efecto fitotóxico (Figura 23). Sin embargo, la aplicación de esta sal a una concentración de 0.1 mM redujo la incidencia de ‘daños de frío’ en un 40% respecto a los controles (Figura 24). Es interesante señalar que el Cu²⁺ es cofactor de enzimas implicados en la eliminación de ROS. Además, en los frutos cítricos, se ha comprobado que la aplicación de Cu²⁺, que promueve la abscisión, aumenta la producción de etileno (Ben Yehoshua y Biggs, 1970). Teniendo en cuenta este hecho y que el etileno aplicado durante el almacenamiento en frío reduce la incidencia de ‘daños de frío’ en frutos de mandarina ‘Fortune’ (Lafuente *et al.*, 2004), no se descarta la posibilidad de que la reducción de la incidencia de esta alteración por el tratamiento con esta sal pueda relacionarse con dicha hormona. Por otro lado, la aplicación conjunta de la sal de Cu²⁺ con un quelante específico, el DETC, tampoco modificó la susceptibilidad al frío de las mandarinas ‘Fortune’. Sin embargo, en ausencia de Cu²⁺, el tratamiento con DETC a las 3 concentraciones ensayadas aumentó ligeramente (20%) el índice de ‘daños de frío’ en los frutos almacenados a 2 °C con respecto a los controles tratados con agua y favoreció la aparición de daños de senescencia en los frutos curados y almacenados a 2 °C y en los frutos almacenados a 12 °C tratados con la concentración más elevada de este compuesto (100 mM) (Figura 25). Teniendo en cuenta que el DETC puede inhibir la actividad Cu,Zn-SOD (McBride *et al.*, 1999) y reducir la actividad APX (Fu *et al.*, 2001), estos resultados de nuevo sugieren que la susceptibilidad al frío en los frutos cítricos depende de la capacidad de eliminación de ROS (Sala, 1998; Sala y Lafuente, 2000; Sala *et al.*, 2005).

En la célula, el Zn²⁺ actúa como cofactor de algunas enzimas antioxidantes y de otras como la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa o la triosa fosfato deshidrogenasa. Además, constituye un elemento esencial en la biosíntesis de auxinas e inhibe la apoptosis

(Seve *et al.*, 2002). El Mn^{2+} , además de cofactor de enzimas antioxidantes, es un activador de enzimas implicados en la biosíntesis de ácidos grasos y del ciclo de Krebs como la isocitrato deshidrogenasa. Además, interviene en el transporte de electrones entre el agua y el fotosistema II y actúa en la síntesis de clorofilas. El tercer ión, el Mg^{2+} , es un constituyente esencial de las clorofilas y necesario para la activación de enzimas implicados en los procesos de transferencia de energía. La aplicación de las sales de Zn^{2+} y Mn^{2+} a una concentración de 100 mM también produjo daños en la piel que enmascararon los ‘daños de frío’ por lo que no pudo realizarse una evaluación fiable de los mismos (Figura 26). La aplicación de la sal de Mg^{2+} 100 mM, aunque no tuvo un efecto fitotóxico, no modificó la incidencia de ‘daños de frío’ en los frutos almacenados a 2 °C (Figura 26).

Otros compuestos con propiedades antioxidantes son las poliaminas ya que poseen la capacidad para secuestrar radicales libres y pueden inducir la expresión de genes que codifican enzimas del estrés oxidativo. Sin embargo, aunque éstas se han relacionado con la protección de las plantas al estrés de frío (Serrano *et al.*, 1996), los resultados de este trabajo sugieren que no parecen tener un papel determinante en la tolerancia al frío en frutos de esta variedad de cítricos. Así, el análisis del conjunto de genes de la micromatriz ‘7K’ reveló una inducción específica en respuesta a la combinación de calor y frío de únicamente dos genes que participan en su biosíntesis y codifican dos S-adenosilmetionina descarboxilasas (At3g02470 y At5g15950). Sin embargo, al emplear réplicas biológicas no se confirmaron estos resultados, hecho que concuerda con la variabilidad encontrada en los cambios observados en los niveles de poliaminas en respuesta al estrés térmico en los frutos cítricos en distintos experimentos (Gonzalez-Aguilar *et al.*, 1997; Gonzalez-Aguilar *et al.*, 1998; Gonzalez-Aguilar *et al.*, 2000).

1.3. Metabolismo de fenilpropanoides y otras proteínas de respuesta a estrés.

El análisis transcriptómico en ambas micromatrices reveló un aumento de la expresión de genes del metabolismo de fenilpropanoides y de otros que codifican proteínas PR en respuesta a la combinación de calor y frío, mientras que el frío ‘per se’ favoreció la inducción de genes que codifican proteínas de pared celular, citocromos P450, transportadores ABC y de genes *cor15* y *LEA5*.

Aunque el análisis de ontologías génicas no mostró una sobre o infrarrepresentación del metabolismo de fenilpropanoides en ninguna de las condiciones de almacenamiento estudiadas, la evaluación de la expresión de genes individuales en la micromatriz ‘7K’ reveló que la combinación de calor y frío también tuvo un efecto marcado en la inducción de genes del metabolismo de fenilpropanoides, entre los que destacan dos IRL y diversas OMTs, como una catecol OMT o una ácido cafeico OMT (Tabla 5 y Fichero Excel ‘Fortune’-‘7K’ adjunto) lo que confirmó resultados previos obtenidos por Sanchez-Ballesta *et al.* (2003). En otros casos, como en una C4H y una cinamil alcohol deshidrogenasa, el curado evitó la represión que se produce durante el almacenamiento en frío en los frutos no acondicionados. Estos resultados parecen confirmar observaciones previas que indican que los fenilpropanoides podrían tener un efecto protector que podría estar relacionado con su capacidad para eliminar ROS o favorecer la síntesis de compuestos fenólicos que frenasen el daño celular causado por el frío (Sanchez-Ballesta *et al.*, 2000a; Lafuente *et al.*, 2001b; Sanchez-Ballesta *et al.*, 2003). De hecho, recientemente se comprobó que la concentración de una cumarina, la escoparona, aumentaba en los frutos de mandarina ‘Fortune’ almacenados a 2 °C que habían sido previamente acondicionados (Lluch, 2006). Esta cumarina presenta una capacidad inhibidora de procesos de peroxidación lipídica no enzimática, probablemente debido a su acción quelante de iones Fe^{2+} y a que es capaz de secuestrar $O_2^{\bullet -}$ (Hoult y Paya, 1996). En

pomelos, Maul *et al.* (2008) observaron que la exposición al frío en general favorecía la represión de este conjunto de genes, no encontrando además cambios relevantes en su expresión en respuesta a un tratamiento de acondicionamiento, diferente al curado, a pesar de que también reduce la incidencia de ‘daños de frío’ (Maul *et al.*, 2008). Los resultados del presente trabajo pusieron de manifiesto que el frío ‘per se’ indujo la expresión de un gen que codifica una PAL, enzima de entrada de la ruta de fenilpropanoides, cuya expresión no varió en respuesta al calor ni a la combinación de calor y frío en los frutos de mandarina ‘Fortune’, lo que sugiere que el curado puede re-direccionar la ruta fenilpropanoides hacia la síntesis de flavonoides a través de la CH4, enzima subsiguiente a la PAL, y la IRL, y hacia la síntesis de compuestos metilados mediante la inducción de OMTs sin que suponga una activación inicial de la ruta a través de la PAL. La naturaleza transitoria en la inducción de la actividad PAL y la acumulación de los transcritos del gen *PAL2* en respuesta al calor observado en frutos de la mandarina ‘Fortune’ podría explicar que en ninguna de las dos micromatrices utilizadas se haya observado un aumento de la expresión de estos genes a los 3 días de exposición a 37 °C antes de transferir los frutos al frío (Sanchez-Ballesta *et al.*, 2000b).

El curado tuvo, además, un efecto muy marcado en la expresión de genes que codifican otras proteínas de respuesta a estrés en plantas entre los que destacaron 5 genes que codifican quitinasas, tres de los cuales se indujeron específicamente al menos 3 veces en respuesta al calor y a la combinación de calor y frío con respecto a los frutos RTC (Tabla 2 y Fichero Excel ‘Fortune’-‘7K’ adjunto). La inducción de esta familia de genes en respuesta al curado y su mantenimiento durante la exposición a bajas temperaturas confirma datos previos que ponen de manifiesto un paralelismo entre la eficacia de distintos tratamientos de acondicionamiento térmico que aumentan la tolerancia al frío y los niveles de acumulación relativa de un gen que codifica una quitinasa de carácter ácido de clase II en frutos de mandarina ‘Fortune’ (Sanchez-Ballesta *et al.*, 2003; Lluch, 2006). Es interesante señalar, que este gen identificado por Sanchez-Ballesta *et al.* (2003) presenta con dos de los genes inducidos únicamente en los frutos acondicionados almacenados a 2 °C (unigenes 7132 y 923) un porcentaje de identidad del 96 y 92%, respectivamente. Aunque el papel de las quitinasas en la defensa de las plantas frente al estrés de frío es todavía desconocido, recientemente se ha comprobado que el mutante *host 2* de *A. thaliana*, que contiene una mutación del gen *AtCTL1*, que codifica una endoquitinasa de la familia 19 de glicosil hidrolasas, presenta una reducida tolerancia al calor, al estrés salino y al estrés por deshidratación. Además, se observó en éste una deficiencia en celulosa y una alteración de la integridad en la membrana plasmática (Kwon y Kim, 2007). En base a las características observadas en este mutante, los autores plantearon la hipótesis de que glicoproteínas con dominios arabinogalactanos (AGPs), que interaccionan con microfibrillas de celulosa y pectinas, podrían constituir sustratos de unión de esta familia de endoquitinasas en las plantas y su modificación podría ser necesaria en el proceso de formación de las paredes celulares y adhesión con las membranas celulares. Además, en otros estudios se observó que la alteración de estas glicoproteínas por la aplicación del reactivo Yariv inducía en células de *A. thaliana* la muerte celular programada (PCD) (Gao y Showalter, 1999). Teniendo en cuenta estos resultados y que la membrana es el constituyente celular que primeramente puede verse afectado por el frío, el papel de estas proteínas en las respuestas de defensa al estrés de frío en los frutos cítricos parece evidente, aunque hasta la fecha no sabemos en qué modo confieren esta protección.

Otro grupo de proteínas PR a las que se ha atribuido un papel importante en la defensa frente al desarrollo de ‘daños de frío’ en los frutos cítricos son las β -1,3-glucanasas (Sanchez-Ballesta *et al.*, 2006; Sapitnitskaya *et al.*, 2006). En la micromatriz ‘12K’ se encontraron dos genes de esta familia cuya expresión aumentó más de 4 veces de

forma específica en respuesta a la combinación de calor y frío (Tabla 14). Uno de ellos (unigen 5536), también se encontró en la primera micromatriz y aunque se indujo en respuesta al frío 'per se', el curado potenció dicho efecto observando una diferencia de hasta 3 veces entre ambos tipos de frutos almacenados 20 días a 2 °C (Fichero Excel 'Fortune'-7K' adjunto). No obstante, el curado puede reprimir la expresión de otros genes que codifican glucanasas (Sanchez-Ballesta, 1998). De hecho, en la micromatriz '12K' se encontraron 3 genes de este grupo que reprimieron su expresión hasta límites indetectables en respuesta a la combinación de calor y frío. Uno de ellos, que codifica una β -1,3-glucanasa (unigen 4010), presenta un 88% de identidad con otro gen que codifica una β -1,3-glucanasa con un perfil similar identificada por Sanchez-Ballesta (1998) en frutos de esta variedad de mandarinas. Otros autores han sugerido que en el proceso de aclimatación al frío en plantas de *A. thaliana* participan genes que codifican glucanasas y quitinasas ya que observaron niveles reducidos en la acumulación de estos genes en mutantes que desarrollan 'daños de frío' cuando se exponen a 13 °C (Provart *et al.*, 2003), lo que concuerda con los resultados obtenidos en este estudio sugiriendo el papel protector de este grupo de enzimas frente al estrés de frío.

Entre los genes más expresados en respuesta al frío en ambas micromatrices se encontraron, además, diversos genes que codifican enzimas de pared celular y citocromos P-450. Así, en la micromatriz '7K', con una expresión 4 veces mayor en los frutos almacenados 20 días a 2 °C respecto a los frutos previamente curados, se encontraron dos genes que codifican una β -poligalacturonasa y una β -glucosidasa (Tabla 3). Asimismo, en la segunda micromatriz también se encontraron otros dos genes que codifican una poligalacturonasa y una exostosa al menos 3 veces más expresados en los frutos no acondicionados (Tabla 13). Estos resultados sugieren que los 'daños de frío' también pueden afectar a la pared celular en los frutos cítricos. En relación a la familia de citocromos P-450, destacan dos con homología al gen At5g05260 de *A. thaliana* que se indujeron en la micromatriz '7K' más de 4 veces en los frutos expuestos directamente a 2 °C pero no en los frutos previamente acondicionados (Tabla 3 y Anexo Excel '7K'). En la segunda micromatriz, uno de ellos (unigen 4408), junto con otro miembro de esta familia con el mismo homólogo en *A. thaliana*, mostraron una diferencia de expresión al menos de 28 y 17 veces entre ambos tipos de frutos almacenados a 2 °C, respectivamente (Tabla 13). Todos ellos codifican específicamente citocromos P-450 de tipo CYP79A2. Estas proteínas catalizan la conversión de L-fenilalanina a fenilacetaldoxima, precursor de p-hidroxibencil glucosinolatos que constituyen compuestos glicosilados que contienen azufre y que poseen capacidad antioxidante (Wittstock y Halkier, 2000; Werck-Reichhart *et al.*, 2002). Así, se ha demostrado que la sobreexpresión de estos genes en *A. thaliana* favorece la acumulación de estos compuestos (Wittstock y Halkier, 2000). Aunque se ha descrito en otros tipos de citocromos P-450 CYP79 un papel regulador de la homeostasis de hormonas, como citoquininas y auxinas (Werck-Reichhart *et al.*, 2002), hasta el momento se sabe poco acerca de su interacción con procesos de señalización dependiente de hormonas, incluyendo el etileno. Se ha comprobado que pueden estar implicados en las respuestas dependientes de ácido salicílico incrementando la resistencia al ataque por bacterias patógenas aunque aumentan la susceptibilidad al ataque por hongos necrótrofos debido a la disminución de las respuestas dependientes de ácido jasmónico (Brader *et al.*, 2006). Los resultados obtenidos sugieren que esta familia de proteínas podrían formar parte de las respuestas de defensa asociadas al estrés de frío aunque no parecen estar implicados en el efecto beneficioso del curado ya que en general se reprimieron o no modificaron su expresión en los frutos almacenados en frío previamente acondicionados.

Otros genes cuya expresión se indujo específicamente en respuesta al frío 'per se' codifican proteínas de la familia de transportadores ABC, dos de los cuales (unigenes 6518

y C34101E02) se indujeron más de 9 veces en la micromatriz '12K' (Tabla 13). Esta familia de proteínas transmembrana transportan diversos compuestos como azúcares, vitaminas o iones hacia el interior de la célula y permiten la salida de compuestos tóxicos hacia el exterior de la misma, actuando así como agentes detoxificadores (Yazaki, 2005; Yazaki, 2006). Además, se han relacionado con el transporte de proteínas GST conjugadas con glutatión las cuales a su vez también están implicadas en procesos de detoxificación (Lu *et al.*, 1998). Sin embargo, en la micromatriz '7K' también se encontraron diversos miembros de esta familia de transportadores entre los genes cuya expresión fue mayor en los frutos previamente curados. Entre ellos, dos (At3g62150 y At2g26910) se indujeron únicamente en respuesta a la combinación de calor y frío (Anexo Excel '7K'). Otra familia de genes implicados en el transporte de iones a través de la membrana codifican ATPasas, fundamentalmente de tipo AAA y H⁺-ATPasa vacuolares (V-ATPasas). Las primeras intervienen en fusión de membranas, biogénesis de peroxisomas, transducción de señal, regulación de la expresión génica y fundamentalmente se han descrito en procesos de degradación de proteínas (Benaroudj y Goldberg, 2006). El segundo grupo, las V-ATPasas, participan en el transporte de iones como Na⁺, K⁺ o Ca²⁺ hacia el interior de las vacuolas (Maeshima, 2001) y se han relacionado con el 'daño de frío' en frutos de mandarina 'satsuma' (Ghasemnezhad *et al.*, 2008) Al igual que el caso anterior, se encontraron genes de estas dos familias con perfiles de expresión muy diversos (Tabla 9 y Tabla 19). Estos resultados reflejan una complejidad de sistemas de regulación de este conjunto de transportadores aunque no se descarta la participación de algunos de ellos en la respuesta de protección al estrés de frío o su implicación en el mecanismo de adaptación al frío inducido por la exposición a altas temperaturas.

El análisis de expresión de los genes incluidos en la micromatriz '7K' mostró un total de 7 genes *cor15* y a excepción de uno de ellos, que no presentó respuesta a ninguna de las condiciones estudiadas, el resto mostraron mayores niveles de acumulación de sus transcritos en los frutos almacenados directamente a 2 °C con respecto a los previamente acondicionados. La expresión de todos ellos se reprimió al menos dos veces en los frutos tratados 3 días a 37 °C, aunque posteriormente aumentó en mayor o menor medida al transferir los frutos al frío (Fichero Excel 'Fortune'-'7K' adjunto). No obstante, sólo tres (unigenes 7195 y 7206) se indujeron en respuesta al frío 'per se'. Sin embargo, la utilización de réplicas biológicas en la micromatriz '12K' puso de manifiesto que las diferencias encontradas utilizando réplicas técnicas no eran estadísticamente significativas. Aunque en algunos cultivares de frutos cítricos, como en pomelos, la mayor expresión de genes que codifican dehidrasas se ha relacionado con el efecto beneficioso de tratamientos de acondicionamiento a altas temperaturas (Porat *et al.*, 2002b; Porat *et al.*, 2004a), estos resultados apoyan la idea planteada por Sanchez-Ballesta *et al.* (2004) de que estas proteínas no están relacionadas con la tolerancia al frío inducida por el curado en la mandarina 'Fortune'.

Asimismo, el estudio detallado de los cambios de expresión de genes *LEA5*, relacionadas fundamentalmente con la deshidratación (Zhang y Zhao, 2003; Shao *et al.*, 2005), puso de manifiesto que estas proteínas podrían estar asociadas con el desarrollo de los 'daños de frío' en los frutos cítricos. Así, estos genes en general se indujeron en respuesta al frío 'per se', hecho que se comprobó tanto con réplicas técnicas en la micromatriz '7K' como en las biológicas en la '12K' (Tabla 3 y Anexo Fichero Excel '7K' y '12K'). La expresión de algunos de ellos también aumentó en respuesta al calor pero no a la combinación de calor y frío y solamente 2 de un total de 11 genes se expresaron por la combinación de calor y frío, lo que refleja sistemas de regulación y funciones diferentes entre miembros de esta familia de proteínas. El papel de estas proteínas LEA en la protección al estrés por deshidratación se ha descrito no solamente por su función

chaperona sino también por su capacidad de secuestrar iones de hierro (Wise, 2003; Wise y Tunnacliffe, 2004). Además, se ha comprobado que participan en la defensa frente al estrés oxidativo y se ha observado su inducción en respuesta al aumento de la concentración de H_2O_2 inducido por el tratamiento con paracuat o en situaciones de deficiencia de actividad catalasa (Desikan *et al.*, 2000; Vanderauwera *et al.*, 2005; Mowla *et al.*, 2006). En los frutos cítricos, además de con la deshidratación y el estrés salino, se ha observado su activación en respuesta al calor (Naot *et al.*, 1995) y se ha demostrado su papel en la eliminación de ROS (Hara *et al.*, 2004), ya que son capaces de unir metales como Fe^{3+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} y Zn^{2+} (Hara *et al.*, 2005). Aunque hasta el momento no se ha descrito su papel en relación a la tolerancia al frío, teniendo en cuenta estos y otros resultados previos que han relacionado la inducción de estos genes *LEA5* con el aumento de tolerancia al frío en diversas especies de plantas sensibles al frío como el arroz (Kato y Yoshida, 2002) o el pimiento (Hwang *et al.*, 2005), no podemos descartar que algunos de estas proteínas tengan un papel protector en la reducción de los ‘daños de frío’ en los frutos de mandarina ‘Fortune’.

1.4. Proteínas implicadas en procesos de traducción, transducción de señal y regulación de la transcripción.

Los resultados del análisis de ontologías génicas en las dos micromatrices de cDNA reflejaron que la exposición al frío, tanto en frutos curados como almacenados directamente a 2 °C, favorece la represión de genes que codifican proteínas constituyentes de ribosomas implicadas en los procesos de traducción (Tabla 6, Tabla 8A,B y Tabla 17). Además, en la micromatriz ‘7K’ este análisis mostró en los frutos acondicionados y almacenados 20 días a 2 °C una inducción de un elevado porcentaje de factores de transcripción (Tabla 8B).

Un análisis detallado de los genes implicados en procesos de traducción reprimidos en respuesta al frío reveló la presencia de algunos que codifican proteínas que forman parte de la subunidades 40 y 60S del ribosoma, factores de iniciación eIF, factores de elongación eEF y diversas histonas, chaperonas o proteasas Clp dependientes de ATP, las cuales participan en los procesos de plegamiento de proteínas necesarios para que puedan desempeñar su función biológica (Tabla 8 y Anexo Excel ‘7K’ y ‘12K’). La alteración del metabolismo de proteínas por la exposición a bajas temperaturas de frío ha sido documentada en animales y cianobacterias (Fujita, 1999; Los y Murata, 1999). En plantas, aunque la regulación de la síntesis de proteínas en respuesta a cambios en la temperatura de almacenamiento es menos conocida, se ha sugerido que el estrés de frío favorece la degradación de proteínas (Schaffer y Fischer, 1990) y se ha comprobado una disminución en la acumulación de proteínas del cloroplasto en varios mutantes de *A. thaliana* sensibles al frío (Schneider *et al.*, 1995). Asimismo, Provar *et al.* (2003) comprobaron que en plantas de *A. thaliana* la exposición al frío origina un aumento en la expresión de un elevado número de genes implicados en biosíntesis de proteínas. Sin embargo, en mutantes sensibles al frío, que muestran síntomas de clorosis cuando se exponen a 13 °C, no se observó la inducción de dichos genes. De acuerdo con estos autores, la disminución en la síntesis de proteínas podría ser una respuesta asociada al daño celular originado por las bajas temperaturas de conservación.

El análisis de expresión de los genes que codifican HSPs incluidos en ambas micromatrices reveló perfiles de expresión muy diversos. Así, en la primera de ellas se encontraron 6 genes inducidos en respuesta a la combinación de calor y frío, aunque solamente dos de ellos (unigenes C08003F01 y C20003A06) presentaron mayores niveles de expresión en los frutos acondicionados respecto a los almacenados directamente a 2 °C

(Fichero Excel 'Fortune'-'7K' adjunto). En la micromatriz '12k', los dos únicos genes inducidos en respuesta a la combinación de calor y frío, diferentes a los anteriores (unigenes 3890 y C04010G10), lo hicieron de forma similar en respuesta al frío 'per se' por lo que no se observaron diferencias entre ambos frutos almacenados 30 días a 2 °C (Fichero Excel 'Fortune'-'12K' adjunto). Asimismo, en varios de ellos, como dos genes que codifican HSPs de bajo peso molecular (unigenes 4499 y 6998), el curado favoreció la represión durante la exposición al frío (Tabla 3 y Fichero Excel 'Fortune'-'7K' y '12K' adjunto). Otros, como un gen que codifica una HSP tipo DNAJ (unigen 3449) se indujo específicamente en respuesta al frío 'per se' (Fichero Excel 'Fortune'-'12K' adjunto). Aunque en algunas variedades de cítricos se ha observado una acumulación de distintos HSPs en respuesta a la combinación específica de calor y frío (Rozenzvieg *et al.*, 2004; Sapitnitskaya *et al.*, 2006), los resultados obtenidos en este trabajo, y el hecho de que la eficacia del tratamiento se reduce al disminuir el tiempo de acondicionamiento (Gonzalez-Aguilar *et al.*, 1998), confirman otros previos que sugieren que en frutos de mandarina 'Fortune' estas proteínas no son limitantes en la aclimatación al frío inducida por el curado (Sanchez-Ballesta *et al.*, 2003).

El análisis FatiGO+ puso de manifiesto que la expresión de factores de transcripción aumentó en respuesta a la combinación de calor y frío con respecto a los frutos RTC (Tabla 8B). Teniendo en cuenta estos resultados y otros previos que ponían de manifiesto la importancia de este grupo de proteínas en el proceso de aclimatación a las bajas temperaturas en los frutos cítricos (Sanchez-Ballesta *et al.*, 2003), se realizó un estudio más detallado de éstos y de otros genes que codifican proteínas de señalización (Tabla 10 y Tabla 15). Entre los más expresados en los frutos acondicionados respecto a los almacenados directamente en frío, se encontró una gran abundancia de genes que codifican proteínas que participan en la señalización del etileno y factores de transcripción de respuesta a dicha hormona, así como factores NAM/NAC, WRKY, Myb/Myc y otros de tipo 'zinc finger'. Otros genes que codifican proteínas de la familia HSF y YABBY se expresaron más en los frutos almacenados directamente a 2 °C.

En las variedades de frutos cítricos sensibles al frío almacenadas directamente en frío, el aumento en la producción de etileno en frutos expuestos directamente al frío es paralelo al desarrollo de síntomas de 'daños de frío' (McCollum y McDonald, 1991; Martínez-Téllez y Lafuente, 1997; Lafuente *et al.*, 2003), lo que se ha relacionado con una respuesta de defensa al estrés de frío (Lafuente *et al.*, 2001b; Lafuente *et al.*, 2004). Así, se ha comprobado que la aplicación de esta hormona en frutos almacenados en frío reduce la incidencia de esta alteración (Lafuente *et al.*, 2004), mientras que la aplicación de inhibidores de su síntesis y de su acción la potencia (Martínez-Téllez *et al.*, 1995; Porat *et al.*, 1999; Lafuente *et al.*, 2001b). A nivel molecular, este incremento de etileno en respuesta al frío se ha explicado por un aumento en la acumulación del transcrito del gen *ACO* y de uno que codifica una ACC sintasa (*ACS2*), fundamentalmente en las áreas de tejido más afectadas por el frío (Zacarias *et al.*, 2003). Asimismo, estudios previos demuestran que la exposición de los frutos de mandarina 'Fortune' a 37 °C origina un incremento importante transitorio en la producción de etileno (Holland, 1998) aunque este tratamiento inhibe el aumento en esta hormona cuando se transfieren los frutos al frío (Martínez-Téllez y Lafuente, 1997). De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo, el incremento en etileno a 37 °C podría estar relacionado con el aumento de expresión de *ACS10* y un gen *ACO* (At1g03400) no descritos hasta el momento en los frutos cítricos (Figura 15). Del mismo modo, se comprobó en la micromatriz '7K' que la combinación de calor y frío puede aumentar la expresión de 3 genes *SAM*, 2 *ACS* y 2 *ACO* (Figura 15) y de otros que codifican proteínas implicadas en la señalización y transcripción dependiente de

etileno como una EIN4, una EIN3 o un factor EREBP (Tabla 11) (véase revisión en (Joo y Kim, 2007)). Es interesante señalar, que uno de los genes ACS y ACO inducidos por la combinación de calor y frío, el gen ACS1 y EFE, corresponde al gen ACS2 (unigen 6055) y ACO (unigen 7089) descrito en cítricos, respectivamente. Estos resultados podrían indicar por tanto, que la inhibición de la biosíntesis de etileno en los frutos almacenados en frío después de someterse al tratamiento de curado podría producirse a nivel post-transcripcional. No obstante, no se puede descartar la posibilidad de que otros genes de su biosíntesis no incluidos en la micromatriz pudiesen ser limitantes en este proceso. Otros genes que codifican factores de transcripción de respuesta a etileno aislados de la biblioteca de cDNA y cuyo patrón de expresión se estudió por hibridación Northern, mostraron una inducción de su expresión en respuesta al calor aunque dicho incremento no se mantuvo cuando los frutos acondicionados se transfirieron al frío (Tabla 45). El aumento de etileno en respuesta al calor podría ser responsable del incremento en la expresión de algunos genes a tiempos cortos de almacenamiento en frío en los frutos previamente curados. No obstante, conviene recordar que el acondicionamiento con etileno en frutos de mandarina 'Fortune' antes de ser almacenados en frío no reduce la severidad de los 'daños da frío' y que el etileno aplicado durante el almacenamiento de los frutos a 2 °C tiene una eficacia mucho menor que el curado reduciendo esta alteración (Lafuente *et al.*, 2001b). A los dos tiempos de almacenamiento a 2 °C analizados (20 y 30 días), la mayoría de las respuestas inducidas fueron independientes de etileno (ver más adelante en apartado 3 de Discusión).

La exposición al frío 'per se' indujo la expresión de 3 ACOs, en la micromatriz '7K' (Figura 15) y de 2 ACOs en la micromatriz '12K' (Figura 19). En esta última, además, se encontraron 3 genes que codifican factores de respuesta a etileno con mayor expresión en los frutos expuestos directamente al frío respecto a los previamente curados. Dos de ellos, con dominio AP2, se reprimieron específicamente en respuesta a la combinación de calor y frío (Tabla 16). En plantas de *A. thaliana* se ha demostrado que existe una regulación positiva recíproca entre las proteínas AP2 y AtEBP aunque se ha observado que el tratamiento exógeno con etileno no afecta a la expresión de estos genes AP2 (Ogawa *et al.*, 2007). Asimismo, otros autores comprobaron que en plantas de *A. thaliana* los miembros de la familia CBF que codifican proteínas con dominio AP2 están regulados por el frío pero no por el estrés de deshidratación o la hormona ABA (Medina *et al.*, 1999; Novillo *et al.*, 2007). En frutos cítricos, se han observado perfiles de expresión en respuesta al frío muy diversos entre miembros de las familias de factores de transcripción EREBP y AP2 (Maul *et al.*, 2008). El conjunto de los resultados obtenidos en este trabajo reflejan una elevada complejidad en la regulación de los genes de respuesta a etileno y por ello el estudio de su posible implicación en la tolerancia al frío merece mayor atención.

La expresión de 5 genes que codifican factores de transcripción de la familia NAM/NAC aumentó en ambos tipos de frutos expuestos al frío, aunque el curado potenció dicho efecto (Tabla 11). Esta familia, específica y altamente representada en plantas, incluye un número muy elevado de factores de transcripción que participan en funciones muy diversas como en el control del ciclo celular, formación de meristemas apicales, desarrollo de inflorescencias, regulación de la senescencia e incluso en la respuesta a diferentes tipos de estrés, incluyendo el estrés por bajas temperaturas de frío (Olsen *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2006; Guo y Gan, 2006; Nakashima *et al.*, 2007; Yoo *et al.*, 2007). En otras variedades de frutos cítricos, recientemente se ha comprobado que el almacenamiento a 5 °C de frutos de pomelo también indujo un aumento en la expresión de otro factor de transcripción NAC, diferente a los estudiados en este trabajo, y ésta no variaba en los frutos no dañados por frío que habían sido previamente acondicionados a 16 °C durante 7 días (Maul *et al.*, 2008). En la micromatriz '12K', sin embargo, aunque se encontraron 6 y 10 genes de esta familia inducidos en respuesta a la combinación de calor y frío y al frío

‘per se’, respectivamente, ninguno de ellos mostró diferencias significativas de expresión entre frutos acondicionados y no acondicionados a los 30 días de almacenamiento a 2 °C (Tabla 15).

Los factores WRKY pertenecen a una familia específica de plantas relacionada con las respuestas de defensa frente a patógenos (Rushton *et al.*, 1996; Eugelm *et al.*, 1999; Chen y Chen, 2000; Du y Chen, 2000), con procesos del desarrollo como la senescencia (Robatzek y Somssich, 2001) y también con estreses abióticos como la respuesta a herida (Hara *et al.*, 2000), al calor o a la deshidratación (Rizhsky *et al.*, 2002). Aunque estos factores de transcripción han sido ampliamente estudiados en *A. thaliana* (Yamasaki *et al.*, 2005) y en especies vegetales sensibles al frío como arroz (Ross *et al.*, 2007), tabaco (Kim y Zhang, 2004) o cebada (Marè *et al.*, 2004), en los frutos cítricos su papel regulador es poco conocido, aunque ya se ha sugerido la implicación de algunos de ellos en el mecanismo de tolerancia al frío inducido por la exposición previa a altas temperaturas (Sanchez-Ballesta *et al.*, 2003). Además, recientemente se ha comprobado que en otras variedades de frutos cítricos sensibles al frío, como en pomelos, la exposición a 5 °C tiene un claro efecto represor en la expresión de algunos miembros de esta familia (Maul *et al.*, 2008). En este trabajo, los tres factores de transcripción WRKY aislados de la biblioteca de cDNA y analizados por Northern mostraron niveles mayores de expresión en los frutos previamente curados respecto a los almacenados directamente en frío. De estos genes, solamente uno de ellos (C06009F11; unigen 2904) se incluyó en la micromatriz ‘7K’ donde se observó un perfil de expresión muy similar (Tabla 45 y Figura 42). Otro de ellos (unigen C06019B06) presenta un 88% de identidad con un factor WRKY identificado por Sanchez-Ballesta (2003) cuya expresión también se vio favorecida por efecto del curado durante el almacenamiento en frío de frutos de ‘Fortune’. Por otro lado, la exposición al calor favoreció la expresión de otros miembros de esta familia, como el factor WRKY 47 (At4g01720), que se indujo más de dos veces, aunque su expresión disminuyó después de la transferencia a 2 °C (Tabla 11). Algunos autores han sugerido que algunos miembros de esta familia juegan un papel en la señalización mediada por hormonas como el etileno (Wei *et al.*, 2008) y el ABA (Zou *et al.*, 2004). Recientemente, además, se ha observado que pueden activarse en respuesta a estreses abióticos que impliquen una acumulación de ROS (Miller *et al.*, 2008). De acuerdo a otros autores (Sanchez-Ballesta *et al.*, 2003), los resultados obtenidos indican que algunos miembros de esta familia están implicados en el efecto beneficioso del curado aumentando la tolerancia al frío. En el análisis con réplicas biológicas se encontraron dos genes de esta familia que se indujeron específicamente al menos dos veces en respuesta al frío lo que refleja que éstos, a diferencia de los anteriores, podrían estar asociados al desarrollo de ‘daños de frío’.

El curado también favoreció la expresión de tres factores de la familia Myb/Myc (Martin y Paz-Ares, 1997) que se indujeron específicamente en respuesta a la combinación de calor y frío (Tabla 11). Es interesante señalar, que en otros estudios se ha comprobado que algunos factores Myb pueden interaccionar con genes del metabolismo de fenilpropanoides, sugiriendo que podrían jugar un papel importante en la regulación de la biosíntesis de flavonoles (Moyano *et al.*, 1996; Hartmann *et al.*, 2005). Asimismo, recientemente se observó que la sobreexpresión de un gen Myb de arroz (*OsMYB3R-2*) en plantas de *A. thaliana* incrementaba la tolerancia a la congelación, al estrés salino y al estrés por deshidratación (Dai *et al.*, 2007). La inducción de estos genes en respuesta a la combinación específica de calor y frío sugiere que, al igual que los factores WRKY y NAM/NAC, podrían contribuir a la tolerancia al frío inducida por el curado en frutos de mandarina ‘Fortune’. No obstante estos resultados tampoco se confirmaron al analizar réplicas biológicas (Figura 42).

En la hibridación de la micromatriz '12K', un gen que codifica una subunidad β del factor TFIIE (At4g20330) se indujo específicamente en respuesta a la combinación de calor y frío (Tabla 15 y Fichero Excel 'Fortune'-'12K' adjunto). Al igual que este último, el análisis de expresión por Northern de los dos genes aislados de la biblioteca de cDNA que codifican una TATA-binding protein (TBP) y un factor TFIIA, que también forman parte del complejo de inicio de la transcripción TFIID, mostró que el primero de ellos se inducía específicamente en respuesta a la combinación de calor y frío mientras que en el segundo, el aumento de expresión se produjo en ambos tipos de frutos almacenados a 2 °C, aunque a los 60 días fue mayor en los previamente curados. Cabe señalar que el análisis del factor TFIIA en la micromatriz '7K' reveló un perfil de expresión muy similar al obtenido mediante hibridación Northern (Tabla 45 y Figura 42). En estudios previos realizados en mandarinas 'Fortune' se aisló otro factor de este complejo (TFIIB) que, al igual que éstos, podía estar relacionado con el efecto beneficioso del curado (Sanchez-Ballesta *et al.*, 2003). Este conjunto de resultados sugieren que uno de los efectos beneficiosos de los tratamientos de acondicionamiento térmico reduciendo los 'daños de frío' es que el calor activa la maquinaria de transcripción. Sin embargo, en la micromatriz '7K' se detectaron un factor TF β -IIF (At1g75510) reprimido en respuesta a la combinación de calor y frío (Tabla 12), y en la '12K', otro que codifica una proteína TBP (At1g04950) que se indujo al menos 3 veces de forma específica en respuesta al frío 'per se' y no varió en respuesta a la combinación de calor y frío (Tabla 15 y Fichero Excel 'Fortune'-'12K' adjunto). Además, recientemente se ha comprobado en pomelos que el almacenamiento a 5 °C reprimía a los 14 días la expresión de un gen que codifica un factor TFIIB que no varió en frutos de pomelo acondicionados previamente 7 días a 16 °C, a pesar de que este tratamiento reduce la incidencia de 'daños de frío' (Maul *et al.*, 2008). Teniendo en cuenta que los elementos que forman parte de este complejo de inicio de la transcripción actúan de forma coordinada, la diversidad de perfiles de expresión observados en los estudiados en este trabajo indica que debe existir una regulación de los mismos a nivel post-transcripcional.

Además de factores de respuesta a etileno, NAM o WRKYs, en la micromatriz '7K' se detectaron como diferenciales genes que codifican factores 'zinc finger,' más expresados en los frutos almacenados 20 días a 2 °C previamente curados respecto a los almacenados directamente a dicha temperatura (Tabla 11). Entre ellos, un gen que codifica una proteína LSD1 (At4g20380), que se indujo específicamente en respuesta a la combinación de calor y frío, u otro que codifica un factor 'jumonji' (At1g30810) que se indujo más de 4 veces en los frutos acondicionados y 2 en los expuestos directamente a 2 °C. El factor LSD1 se analizó por Northern y aunque se encontraron diferencias a nivel cuantitativo, su perfil de expresión fue similar al observado en la micromatriz '7K' (Figura 42). Teniendo en cuenta que este gen ha sido descrito por algunos autores como regulador de procesos de muerte celular programada (Wang *et al.*, 2005a), su inducción a 2°C en los frutos previamente curados podría constituir una respuesta a estrés que activase mecanismos de defensa frente al desarrollo de daños celulares originados por el frío.

Entre los genes más expresados en respuesta al frío 'per se' respecto a la combinación de calor y frío se encontraron varios factores de transcripción HSF, aunque éstos presentaron perfiles de expresión muy diversos (Tabla 12 y Tabla 16A). Así, dos de ellos, homólogos a At2g26150 y At4g17750 de *A. thaliana* se reprimieron en respuesta a la combinación de calor y frío, mientras que otros dos presentes en la segunda micromatriz (At4g18880 y At4g36990) se indujeron en respuesta al frío 'per se'. Por el contrario, los resultados obtenidos por Maul *et al.* (2008) en pomelos acondicionados 7 días a 16 °C y almacenados posteriormente a 5 °C mostraron un aumento en la expresión de 2 miembros de esta familia, diferentes a los anteriores, mientras que ninguno varió en los

frutos almacenados directamente a 5 °C. Esta familia de genes, además de mediar la respuesta de defensa en eucariotas al estrés de calor, se ha relacionado con la regulación de procesos de desarrollo y diferenciación celular, así como con situaciones de estrés, como la infección por patógenos, concentraciones elevadas de metales pesados o condiciones de estrés oxidativo (Sorger, 1991; Wu, 1995; Miller y Mittler, 2006). Existen evidencias que apoyan la idea de que estos factores actúan como sensores directos de ROS y controlan la expresión de diversos enzimas que participan en sistemas detoxificadores de estas especies en las plantas (Miller y Mittler, 2006). Así, se ha demostrado que el gen *Apx1* que codifica una enzima APX citosólica y su activador *Zat12* poseen en su promotor un motivo funcional de unión a estas proteínas reguladoras HSFs (Rizhsky *et al.*, 2004). Además, se ha observado que la mutación del gen *Apx* en *A. thaliana* origina una acumulación de H₂O₂ y de los transcritos de dos *AtHsf* lo que sugiere que su expresión está regulada por la concentración de ROS en la células (Pnueli *et al.*, 2003; Davletova *et al.*, 2005). La implicación de esta familia de factores de transcripción en la respuesta al estrés de frío en cítricos no se ha estudiado hasta el momento. Teniendo en cuenta estos resultados, la mayor expresión de estos genes en los frutos expuestos directamente a 2 °C podría relacionarse con un mecanismo protector para activar los sistemas de defensa frente al estrés oxidativo y eliminar las ROS formadas, intentando frenar el desarrollo de daños celulares en respuesta al frío. Asimismo, su menor expresión en los frutos de mandarina 'Fortune' previamente acondicionados podría explicarse en base a resultados previos que indican una mayor activación de los sistemas antioxidantes en estos frutos y una reducción en la acumulación de ROS (Sala y Lafuente, 1999; Sala y Lafuente, 2000).

Otros factores de transcripción más expresados en los frutos almacenados directamente a 2 °C codifican diversas proteínas de la familia YABBY, como una proteína *phantastica* (PHAN) (Tabla 12). Los miembros de esta familia intervienen en la regulación del crecimiento de órganos laterales (Waites y Hudson, 1995; Bowman, 2000). A diferencia de los resultados obtenidos en este trabajo, recientemente se ha descrito una represión de otros miembros de YABBY, incluyendo factores PHAN, en frutos de pomelo almacenados durante 14 días a 5 °C (Maul *et al.*, 2008). Estas diferencias del perfil transcriptómico entre los miembros de esta familia sugieren que podrían tener funciones y mecanismos de regulación muy diferentes. Sin embargo, en ambos frutos estos genes no modificaron su expresión en frío después del acondicionamiento.

Por último, otro de los genes analizados por Northern no incluidos en ninguna de las micromatrices utilizadas codifica un factor de transcripción de respuesta a auxinas: ARF (C003G10). La expresión de este gen aumentó con la severidad de los 'daños de frío'. Su función en la defensa de las plantas frente al frío no se conoce. Sin embargo, es interesante señalar que las auxinas pueden jugar un papel protector frente al estrés oxidativo (Kovtun *et al.*, 2000), que se ha relacionado con la susceptibilidad al frío de frutos de mandarinas (Sala, 1998; Sala y Lafuente, 2000; Sanchez-Ballesta *et al.*, 2003). De acuerdo con estas observaciones, podríamos asignar a este factor de transcripción un papel de protección frente al frío.

1.5. Metabolismo de carbohidratos.

Aunque se ha observado que existe una falta de correlación entre la susceptibilidad al frío de frutos de mandarina 'Fortune' y los niveles de azúcares reductores, Holland *et al.* (2002) observaron que los frutos almacenados en frío que habían sido previamente curados mantenían niveles más elevados de sacarosa que los que habían sido almacenados directamente a 2 °C. Posteriormente, estos autores comprobaron en otra variedad sensible

al frío ('Navelate') que estas diferencias podían estar relacionadas con cambios en la actividad de las enzimas SS y SPS (Holland *et al.*, 2005). Los resultados de este trabajo pusieron de manifiesto que el curado afecta a la expresión de varios genes del metabolismo de carbohidratos (Fichero Excel 'Fortune'-'7K' adjunto). Así, el mantenimiento de los niveles de sacarosa en los frutos curados y almacenados en frío podrían deberse a la inducción de genes que participan en su biosíntesis, como una SS (At3g43190), que se indujo específicamente en respuesta a la combinación de calor y frío, o a la represión de otros implicados en su degradación. Por el contrario, algunos de estos últimos, como el gen homólogo a At1g12240 de *A. thaliana*, se indujeron en los frutos almacenados directamente a 2 °C lo que contribuiría a la disminución de la concentración de sacarosa en estos frutos. En pomelos, otros autores observaron una inducción del gen que codifica una sacarosa fosfato sintasa 1 (SPS1) implicada en la síntesis de sacarosa al finalizar el acondicionamiento y después de 14 días de almacenamiento a 5 °C (Maul *et al.*, 2008). Por otro lado, se ha comprobado que el curado incrementa la tasa respiratoria y favorece el consumo de los azúcares reductores y el almidón en los frutos de mandarina 'Fortune' durante el almacenamiento a 2 °C (Holland *et al.*, 2002). En la micromatriz '7K' se encontraron genes que codifican amilasas cuya expresión se indujo en respuesta al frío aunque el curado potenció este efecto. Destaca un gen que codifica una SPF1 (At2g38470) que se indujo 3 veces en los frutos almacenados directamente en frío y más de 10 en los previamente curados con respecto a los frutos RTC (Fichero Excel 'Fortune'-'7K' adjunto). No obstante, el empleo de réplicas biológicas no reveló, en general, diferencias en la expresión de estos genes en respuesta a las condiciones estudiadas, lo que indica que los cambios en la acumulación de sus transcritos pueden verse afectados por factores precosecha.

2. ESTUDIO TRANSCRIPTÓMICO DE LOS MECANISMOS IMPLICADOS EN LA TOLERANCIA AL 'COLAPSO DE LA CORTEZA' INDUCIDA POR EL ACONDICIONAMIENTO CON ETILENO EN FRUTOS DE NARANJA 'NAVELATE'.

Aunque las causas por las cuales se produce el 'colapso de la corteza' en los frutos cítricos no se conocen con exactitud, distintos trabajos indican que los cambios en el estatus hídrico de los frutos pueden ser un factor importante potenciando su desarrollo (Casas y García-Bataller, 1986; Almela *et al.*, 2000; Agustí *et al.*, 2001; Alférez *et al.*, 2003; Alférez *et al.*, 2005b). No obstante, los resultados del presente trabajo y de otros anteriores (Lafuente y Sala, 2002; Cajuste y Lafuente, 2007) ponen de manifiesto que esta alteración puede producirse de forma natural en frutos almacenados a 22 °C aunque no estén expuestos a condiciones de estrés hídrico o sujetos a cambios bruscos en su estatus hídrico. Así, en este estudio hemos comprobado que frutos recolectados en dos campañas diferentes, en las que los frutos estuvieron expuestos antes de ser cosechados a condiciones de HR diferentes, 40% y 80% HR, y fueron almacenados a 90-95% HR y a 22 °C durante un periodo de 14 días en aire, presentaban un ICC similar (Figura 31). No obstante, conviene señalar que la incidencia y severidad de esta alteración puede aumentar y los síntomas manifestarse de forma más temprana cuando los frutos cosechados se deshidratan e inmediatamente se someten a un proceso de rehidratación (Alférez *et al.*, 2003). Asimismo, en las dos campañas se confirmó que el acondicionamiento de los frutos durante 4 días con etileno (10 $\mu\text{L L}^{-1}$) redujo notablemente la incidencia del 'colapso de la corteza', resultados que concuerdan con los obtenidos en estudios previos (Sala y Lafuente, 2004; Cajuste y Lafuente, 2007). Sin embargo, este tratamiento no modifica la velocidad de pérdida de peso de los frutos o el estatus hídrico del flavedo y albedo (Cajuste y Lafuente,

2005; Cajuste y Lafuente, 2007). Los resultados de este trabajo pusieron además de manifiesto que la aplicación de $1 \mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP durante 14 horas inmediatamente después de la recolección de los frutos aceleró la aparición de esta alteración y aumentó la severidad del daño independientemente de que los frutos se acondicionasen o no posteriormente con etileno, antes de la transferencia a aire (Figura 31). Este inhibidor del etileno se une covalentemente a los receptores de dicha hormona bloqueando su percepción, siendo su afinidad por el receptor aproximadamente 10 veces mayor que la del etileno (Sisler y Serek, 1997), por lo que se ha propuesto que cualquier aumento posterior en la sensibilidad al etileno se debe a la síntesis de nuevos receptores (Blankenship y Dole, 2002; Watkins, 2002). La síntesis de nuevos receptores varía dependiendo del tejido, cultivar, estado de maduración y diversos factores precosecha.

Los resultados del presente trabajo indican pues que el etileno juega un papel importante reduciendo la incidencia de esta alteración en los frutos cítricos y que el 1-MCP, aplicado a una concentración saturante, constituye una buena herramienta para estudiar los mecanismos implicados en el efecto beneficioso del etileno. Con este objetivo se han evaluado cambios globales en la expresión génica en el flavedo y albedo de frutos de naranjas 'Navelate' almacenados en aire a $22 \text{ }^\circ\text{C}$ y 90-95% HR, acondicionados o no previamente 4 días con $10 \mu\text{L L}^{-1}$ de etileno o tratados inicialmente 14 horas con 1-MCP a una concentración saturante ($1 \mu\text{L L}^{-1}$) y almacenados en las mismas condiciones de temperatura y HR (Figura 32). Para ello se ha empleado la micromatriz de cDNA de segunda generación ('12K') utilizando tres réplicas biológicas, dos de las cuales corresponden a frutos recolectados en la misma campaña pero procesados de forma independiente.

Los cambios más relevantes en la expresión génica en ambos tejidos se produjeron a los 4 días inmediatamente después de finalizar el acondicionamiento con etileno y a los 14 días en los frutos previamente expuestos a 1-MCP (Figura 33 y Figura 34). Así, más del 80 y 50% de los genes que modificaron su expresión en el flavedo y albedo de los frutos recién acondicionados con etileno (4 días), mostraron niveles similares a los iniciales (frutos RTC) después de ser almacenados durante un periodo adicional de 10 días. En cambio, más del 90% de los genes que se indujeron en el flavedo y el albedo de los frutos expuestos a 1-MCP lo hicieron a los 14 días de almacenamiento. Asimismo, la gran mayoría de los genes (>80%) que disminuyeron significativamente su expresión en el albedo de estos frutos lo hicieron sólo a tiempos largos (14 días) aunque en el flavedo, el número de genes reprimidos a 4 y 14 días fue similar.

Un total de 1.970 y 3.899 genes en el flavedo y albedo, respectivamente, modificaron su expresión en al menos una de las tres condiciones de almacenamiento estudiadas con respecto a los niveles iniciales (RTC). Al comparar de forma independiente las respuestas en ambos tejidos, el albedo fue en general el que sufrió el mayor número de cambios significativos de expresión génica, lo que sugiere que este tejido se ve más afectado por el 'colapso de la corteza' (Figura 33 y Figura 34). El tratamiento con etileno favoreció la inducción frente a la represión en ambos tejidos. Después de un periodo adicional de 10 días de almacenamiento en aire, sin embargo, en los frutos acondicionados el número de genes inducidos y reprimidos en el albedo fue similar mientras que en el flavedo predominaron las represiones. La aplicación de 1-MCP tuvo más un efecto represor que inductor a los 4 días de almacenamiento en ambos tejidos. Al final del almacenamiento (14 días), en el flavedo también se observó un mayor número de genes reprimidos que inducidos; en el albedo, por el contrario, predominaron las inducciones sobre las represiones (Figura 33 y Figura 34).

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que el tratamiento con etileno desencadena una serie de respuestas de defensa, algunas de las cuales están asociadas a

procesos de senescencia, que evitan el ‘colapso de la corteza’. Entre ellas, la inducción y mantenimiento de la expresión de genes implicados en la biosíntesis de ácido jasmónico y otras oxilipinas, que juegan un papel importante como señalizadores en la activación de estas respuestas (Blée, 2002; Porta y Rocha-Sosa, 2002). El tratamiento con etileno, además, favoreció la inducción genes del sistema antioxidante y de otros del metabolismo de derivados de aminoácidos, entre los que se incluyen los fenilpropanoides. Cuando se inhibió la acción del etileno mediante la aplicación de 1-MCP se observó a los 4 días de almacenamiento en aire un efecto represor de algunas de estas respuestas de defensa a estrés, incluyendo la represión de genes del metabolismo de fenilpropanoides, de proteínas de refuerzo de pared celular o algunos enzimas del estrés oxidativo como PODs. No obstante, otros genes como los que codifican GSTs se indujeron en estos frutos lo que indica que a este tiempo de almacenamiento se produce una acumulación de ROS y coincide con el momento en el que se produjo el aumento brusco en el desarrollo de síntomas característicos de esta fisiopatía (Figura 31). A los 14 días de almacenamiento en los frutos tratados con 1-MCP se detectó un mayor número de genes con cambios de expresión. Teniendo en cuenta que se encontraron genes que codifican receptores de etileno y proteínas implicadas en su señalización cuya expresión aumentó significativamente en estos frutos tratados con 1-MCP, que indican que éstos son capaces de percibir el etileno, muchas de estas respuestas, comunes a las observadas en los frutos tratados 4 días con etileno, podrían haberse inducido por una vía dependiente de esta hormona. Otras respuestas podrían estar relacionadas con el daño asociado al ‘colapso de la corteza’ que fue muy evidente a los 14 días en estos frutos. Entre ellas, la activación del catabolismo de macromoléculas, fundamentalmente de lípidos y proteínas, y de sistemas de transporte de los metabolitos derivados de los mismos, y de forma paralela, la disminución de la actividad anabólica, incluyendo la biosíntesis de carbohidratos y de procesos de traducción y transcripción. Otras respuestas asociadas al daño están relacionadas con respuestas de defensa a hongos.

En base a estos resultados, que discutiremos a continuación, se propone que el efecto beneficioso del etileno en la reducción del ‘colapso de la corteza’, que afecta en mayor medida al albedo, podría deberse a un mecanismo de protección cruzada frente a las condiciones que favorecen esta alteración fisiológica.

2.1. Señalización mediada por ácido jasmónico.

El análisis de procesos biológicos puso de manifiesto que el etileno favorece la activación en el flavedo de procesos relacionados con la señalización mediada por hormonas, como el etileno y el ácido jasmónico. Estos procesos también constituyeron una categoría altamente representada entre los inducidos en el albedo de los frutos tratados con 1-MCP almacenados 14 días en aire (Tabla 29C y Tabla 30). El análisis detallado de los genes incluidos en dichos procesos mostró varios de ellos que codifican genes *LOX* y otros implicados en la ruta de biosíntesis del ácido jasmónico, como los que codifican enzimas AOS o OPDA reductasas (Tabla 62 y Tabla 63). Es interesante señalar, además, que muchos de estos genes fueron incluidos en el análisis FatGO+ dentro de procesos relacionados con la respuesta de defensa en un sistema de interacción incompatible planta-patógeno los cuales constituyeron una categoría, no redundante, sobrerrepresentada en estas dos condiciones de almacenamiento (Tabla 30 y Anexo III Tabla 64 y Tabla 65). Asimismo, los resultados de este análisis referente a función molecular y el análisis comparativo entre tejidos, mostraron que el etileno tiene un efecto marcado en la activación de la expresión de genes que codifican *LOX* en el flavedo de los frutos

acondicionados después de ser almacenados durante un periodo adicional de 10 días en aire (Tabla 32A y Tabla 421A).

En el análisis detallado del conjunto de genes *LOX* incluidos en la micromatriz (Tabla 35 y Anexo III Tabla 66-Tabla 68), se encontraron 7 de ellos inducidos específicamente en el flavedo de los frutos tratados 4 días con etileno. La expresión de la mayoría se incrementó al transferir los frutos a aire hasta producirse a los 14 días de almacenamiento un aumento de su expresión de hasta 4 veces con respecto a los niveles detectados en los frutos RTC (Anexo III Tabla 66). No obstante, algunos de estos genes también aumentaron su expresión a los 4 días en los frutos control y en los tratados con 1-MCP hasta alcanzar valores medios próximos a los de los frutos tratados 4 días con etileno aunque dicho incremento no fue significativo. En cualquier caso, a los 14 días de almacenamiento, a excepción de dos genes *LOX* que se indujeron específicamente en el albedo de los frutos tratados con 1-MCP, el resto solamente aumentó su expresión en los frutos acondicionados con etileno y en algunos casos también en los almacenados en aire donde el ICC fue pequeño (inferior a 1) (Anexo III Tabla 66 y Tabla 67). Los resultados sugieren que este grupo de genes podrían jugar un papel importante en señalización para la activación de respuestas de defensa frente al desarrollo del ‘colapso de la corteza’ y cuya finalidad sería la de frenar el daño celular en los frutos que presentan esta fisiopatía. Los resultados indican, además, que en estados avanzados de la misma en los frutos tratados con 1-MCP almacenados 14 días en aire se reprime su expresión a pesar de que la producción de etileno de estos frutos es muy elevada (datos no mostrados) y de que se detectaron nuevos receptores de la hormona. Por tanto, este resultado indicaría que la regulación de la expresión de genes *LOX* esta mediada por otros factores no dependientes de etileno. Los procesos de señalización dependiente de ácido jasmónico se han relacionado con la senescencia y con la defensa de las plantas frente a diferentes tipos de estrés biótico y abiótico (Blée, 2002; Porta y Rocha-Sosa, 2002). Su implicación en la respuesta de defensa a patógenos en sistemas de interacción incompatible se ha sugerido como alternativa no asociada a la muerte celular (McDowell y Dangl, 2000). En algunos sistemas se ha descrito que el ácido jasmónico actúa de forma conjunta con el etileno activando la expresión de genes de defensa frente a patógenos (Lorenzo *et al.*, 2003). Su efecto beneficioso reduciendo la incidencia de ‘daños de frío’ en frutos de pepino se ha relacionado con la inducción de sistemas de detoxificación de ROS (Fung *et al.*, 2004). Además, se ha observado que el ácido jasmónico favorece la activación del metabolismo secundario, incluyendo la biosíntesis de compuestos fenólicos y terpenoides que ejercen una protección frente al estrés oxidativo (Creelman y Mullet, 1997; Keinänen *et al.*, 2001; Martín *et al.*, 2002). Se ha sugerido también que estas moléculas señalizadoras podrían favorecer la degradación de las membranas tilacoidales durante la transición de cloroplasto a cromoplasto en frutos de tomate (Griffiths *et al.*, 1999) y que estos procesos degradativos aseguran la removilización de nutrientes de forma acoplada a procesos de generación de energía, que constituyen rasgos característicos de los procesos de senescencia en plantas (Lim *et al.*, 2003; Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003).

En los frutos cítricos, tanto el ácido jasmónico como las *LOX* se han relacionado con la defensa al estrés originado por las bajas temperaturas de conservación en variedades sensibles al frío (Meir *et al.*, 1996; Maul *et al.*, 2008) que suele ir acompañada de un incremento en la producción de etileno (Lafuente *et al.*, 2005). Aunque actualmente no podemos explicar el modo de acción por el cual los incrementos de expresión de este grupo de genes reducirían el ‘colapso de la corteza’ en los frutos cítricos, conviene señalar que dicha alteración se ha relacionado con el estrés oxidativo (Sala y Lafuente, 2004; Cajuste y Lafuente, 2007; Alférez *et al.*, 2008) e implica cambios importantes en el metabolismo de fenilpropanoides (Cajuste y Lafuente, 2007).

2.2. Estrés oxidativo.

La acumulación de hidroperóxidos de ácidos grasos normalmente lleva asociada una activación del sistema antioxidante (John *et al.*, 2001). Así, el análisis de ontologías génicas mostró que la aplicación de etileno favorece la inducción en ambos tejidos de genes que codifican enzimas que participan en el mantenimiento del balance redox de la célula (Tabla 32A). También se comprobó que el tratamiento con 1-MCP indujo en el albedo cambios en la expresión de genes implicados en el estrés oxidativo a los 4 y 14 días de almacenamiento, entre los que destaca la abundancia de genes que codifican proteínas con actividad GST (Tabla 32C). Esta sobrerrepresentación de genes *GSTs* también se observó al realizar el estudio de las funciones moleculares inducidas en el albedo de estos frutos tratados con 1-MCP a los 4 días de almacenamiento (Tabla 32B) coincidiendo con el momento en que se produjo el mayor desarrollo de daños en la piel (Figura 31), lo que podría reflejar que a dicho tiempo se produce una acumulación de ROS y con ello, un estrés oxidativo.

En base a estos resultados y a otros previos que sugirieron la implicación del sistema antioxidante en la tolerancia inducida por etileno en los frutos cítricos al desarrollo del ‘colapso de la corteza’ (Sala y Lafuente, 2004; Sala *et al.*, 2005; Cajuste y Lafuente, 2007), se realizó un análisis más detallado de todos aquellos genes impresos en la micromatriz ‘12K’ que codifican enzimas que afectan a la formación o eliminación de ROS (Tabla 34 y Anexo III Tabla 58-Tabla 61). Los resultados obtenidos han puesto de manifiesto que el etileno tiene un gran efecto en la inducción de *GSTs* en frutos cítricos (Anexo III Tabla 58). Este resultado podría indicar que las dosis/tiempo de etileno aplicados pueden ser suficientes para favorecer la formación de niveles suficientes de ROS para desencadenar reacciones de defensa frente al daño oxidativo pero no para dañar el fruto. Dichas reacciones podrían contribuir a evitar el desarrollo de daños en la piel durante la exposición de los frutos a etileno e incluso reducir la incidencia de dichos daños en los frutos transferidos a aire. Por otra parte, la expresión de los genes *GST* disminuyó al transferir los frutos al aire, lo que sugiere que el estrés oxidativo causado por el etileno sería reversible. El modo de acción por el cual este grupo de enzimas puede jugar un papel especialmente relevante frente al desarrollo del ‘colapso de la corteza’ en comparación con otras enzimas eliminadoras de ROS no se conoce, aunque se ha comprobado que pueden interactuar con compuestos flavonoides favoreciendo su transporte al interior de la vacuola y regular los niveles de metabolitos secundarios (Zhou y Goldsbrough, 1993; Mueller *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2003). Asimismo, se han relacionado con el transporte de ácidos hidroxycinámicos desde el citosol hasta la membrana plasmática donde se incorporan a la pared celular (Park y Facchini, 2000) Además, este grupo de enzimas catalizan la conjugación de moléculas electrofílicas al glutatión reducido, reacciones de isomerización dependientes de glutatión y reducen el contenido de hidroperóxidos (Frova, 2003). Su activación en condiciones de estrés como ataque por patógenos, descensos bruscos de la temperatura, daños mecánicos o cambios en los niveles internos de hormonas como el ABA, las auxinas o el etileno, así como durante la senescencia se ha relacionado con una respuesta de defensa. (Dixon *et al.*, 2002; Frova, 2003). En el presente trabajo, como se acaba de mencionar, se ha comprobado que los *GSTs* se inducen tanto en el flavedo como en el albedo de los frutos tratados con etileno (Tabla 34 y Anexo III Tabla 58), pero también en los frutos tratados con 1-MCP a los 4 y 14 días de almacenamiento en aire. Así, a los 14 días en estos últimos frutos se indujeron 20 genes, 9 de los cuales fueron específicos de esta condición (Tabla 34 y Anexo III Tabla 59). Por tanto, la inducción de *GSTs* que se produce en respuesta a etileno podría reforzar la idea del mecanismo de protección cruzada inducido por la hormona mientras que la asociada al daño en los frutos

tratados con 1-MCP podría ser una respuesta de defensa del fruto para tratar de frenar el mismo.

Otros genes relacionados con el estrés oxidativo, como los que codifican PODs o TRXs, se indujeron a los 4 días solamente en el flavedo y/o albedo de los frutos tratados con etileno (Tabla 56). Algunos de estos genes se reprimieron en los frutos tratados con 1-MCP. Sin embargo, a los 14 días de almacenamiento su expresión fue mayor en estos frutos que en los acondicionados con etileno o en los controles. Dichos incrementos podría haberse producido como consecuencia de los mayores niveles de etileno detectados en los frutos tratados con 1-MCP (datos no mostrados) asumiendo que después de 14 días de almacenamiento a esta temperatura se hayan sintetizado nuevos receptores. De hecho, en dichos frutos dañados se encontraron dos genes que codifican receptores del etileno pero también otros implicados en la señalización del etileno o que codifican factores de transcripción de respuesta a esta hormona (ver más adelante).

2.3. Biosíntesis de carotenoides.

Además de genes que codifican enzimas del sistema antioxidante, se estudió la expresión de los genes de la ruta de biosíntesis de carotenoides que, además de formar parte del aparato fotosintético, pueden participar en la defensa frente al estrés oxidativo ya que son capaces de eliminar ROS y de suprimir la peroxidación lipídica ejerciendo de esta forma un efecto protector de las membranas (Britton *et al.*, 1998; Peñuelas y Munné-Bosch, 2005; Howitt y Pogson, 2006). En los frutos cítricos, el efecto inductor en el contenido de carotenoides en respuesta a un tratamiento con etileno exógeno a concentraciones entre 5 y 10 $\mu\text{L L}^{-1}$ en frutos que no habían cambiado de color fue descrito por primera vez en la década de los 70 (Stewart y Wheaton, 1971; Stewart y Wheaton, 1972). Este hecho fue confirmado posteriormente por otros autores quienes estudiaron este efecto a nivel fisiológico y molecular durante la maduración (Young y Jahn, 1972; Rodrigo *et al.*, 2004; Kato *et al.*, 2004; Kato *et al.*, 2006), siendo muy similar al que tiene lugar por la aplicación de etileno (Rodrigo y Zacarias, 2007). No obstante, el efecto del etileno depende de la temperatura a la cual están expuestos los frutos, de la variedad y del estado de maduración (Stewart y Wheaton, 1971; Plaza *et al.*, 2004; Rodrigo y Zacarias, 2007). En el conjunto de genes que mostraron diferencias de expresión en respuesta a etileno no apareció la carotenogénesis como proceso biológico inducido lo que podría estar relacionado con el hecho de que los frutos utilizados en este estudio eran completamente maduros. Solamente se encontró un gen que codifica una enzima ABA1, que cataliza la conversión de zeaxantina a anteraxantina y violaxantina, inducido en el albedo de los frutos recién acondicionados con la hormona antes de transferirlos a aire (Figura 40). El aumento en el contenido de 9-cis-violaxantina en respuesta a la aplicación de etileno en los frutos cítricos ya ha sido observado por otros autores (Rodrigo y Zacarias, 2007). Sin embargo, en los frutos tratados con 1-MCP y almacenados 14 días en aire el análisis FatiGO+ indicó una represión significativa de los procesos de biosíntesis de terpenoides (Tabla 29B y Tabla 30), a pesar del aumento en la producción de etileno observado en los mismos y de la síntesis de nuevos receptores (Fichero Excel-‘Navelate’). En esta categoría, además de 2 genes de biosíntesis de valenceno y otro de farneseno, la mayoría codifican enzimas de la ruta de biosíntesis de carotenoides. Así, se observó que la expresión de los genes que codifican la enzima ABA1 y LYC se reprimieron al final del almacenamiento en el albedo de estos frutos tratados con 1-MCP, aunque ya a los 4 días de almacenamiento este último gen también presentó niveles reducidos de expresión (Figura 40). La comparación entre tejidos (Tabla 41A) solamente mostró diferencias en los frutos tratados con 1-MCP y almacenados 14 días en aire, donde se encontró una mayor expresión de genes implicados en la

biosíntesis del compuesto precursor IPP y de pigmentos carotenoides en el flavedo respecto del albedo, lo que concuerda con el resultado anterior y sugiere que este último tejido se ve más afectado por el ‘colapso de la corteza’.

Diferentes estudios han revelado que las membranas tilacoidales son las primeras membranas en sufrir procesos degenerativos durante la senescencia en plantas, de forma previa a las membranas mitocondriales necesarias para la generación de energía (Kolodziejek *et al.*, 2003). De acuerdo a esta última observación y teniendo en cuenta que los carotenoides se sintetizan en los tilacoides en la ruta alternativa MEP, también llamada DOXP (del inglés ‘1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate’) (Lichtenthaler, 1999), la disminución de la expresión de los genes que participan en su biosíntesis en el albedo de los frutos más dañados, tratados con 1-MCP, podría ser una consecuencia de la pérdida de integridad de estos orgánulos celulares. De hecho, el análisis de ontologías génicas reveló una abundancia significativa de genes que codifican proteínas localizadas en los plastidios reprimidos en el albedo de estos frutos al final de almacenamiento en aire (Tabla 31B).

2.4. Biosíntesis de etileno.

El análisis FatiGO+ puso de manifiesto que la aplicación de etileno exógeno indujo en el albedo procesos del metabolismo de aminoácidos azufrados, que incluyen fundamentalmente genes relacionados con la biosíntesis de etileno, aunque se encontraron también dentro de este grupo dos genes de biosíntesis de cistationina y otro que codifica una β -cianoalanina sintasa, implicada en la eliminación del compuesto tóxico cianida formado durante la biosíntesis de etileno. Este resultado fue visualizado en el análisis Aracyc (Tabla 29^a y Tabla 30, Figura 36). Así, destacan diversos genes del ciclo de Yang y SAM, 4 que codifican 2 enzimas ACS (ACS6 y ACS12) y 2 ACO (EFE y At1g03400), los cuales también se indujeron al final del almacenamiento en el albedo de los frutos expuestos a 1-MCP. Es interesante señalar además que de un total de 4 genes impresos en la micromatriz que codifican receptores de etileno, dos (At2g40940 y At3g04580) se indujeron en el albedo de los frutos tratados con 1-MCP y almacenados 14 días en aire, uno de los cuales también aumentó en el de los frutos recién acondicionados con etileno y de los frutos mantenidos 4 días en aire pero no en el de los tratados con el inhibidor (Fichero Excel ‘Navelate’). Estos resultados concuerdan con otros obtenidos en nuestro grupo que mostraron un aumento en la producción de etileno en los frutos tratados 4 días con la hormona y en los frutos tratados con 1-MCP almacenados 14 días en aire. Además, la comparación entre tejidos en estos últimos frutos reveló que la expresión de genes de la biosíntesis de etileno era mayor en el albedo que en el flavedo (Tabla 41B). Considerando que el etileno es capaz de inhibir su propia síntesis en los frutos cítricos maduros (McMurchie *et al.*, 1972; Riov y Yang, 1982; Mullins *et al.*, 2000; Katz *et al.*, 2004; Marcos *et al.*, 2005), que su producción aumenta cuando los frutos se exponen a distintas situaciones de estrés biótico o abiótico (McCollum y McDonald, 1991; Martínez-Téllez y Lafuente, 1997; Lafuente *et al.*, 2003; Marcos *et al.*, 2005) y teniendo en cuenta los resultados del presente trabajo, no podemos descartar la idea de que las altas dosis de etileno utilizadas en el tratamiento de acondicionamiento (10 uL L⁻¹ durante 4 días) podrían suponer un estrés para los frutos, aunque no fuese un estrés letal ni originase daños visibles en la piel. Asimismo, es bien conocido que el etileno favorece la senescencia y en situaciones extremas la muerte celular en plantas (Orzáez y Granell, 1997; Navarre y Wolpert, 1999; Hoerberichts y Woltering, 2002; van Doorn y Woltering, 2008). Estos resultados apoyarían pues la hipótesis mencionada anteriormente según la cual el etileno activa respuestas de defensa a estrés que protegerían al fruto de condiciones que favoreciesen el ‘colapso de la corteza’. Es interesante señalar que en frutos de pomelo también se observó que la

aplicación de altas concentraciones de etileno (5 uL L^{-1}) durante periodos prolongados (48 horas) aumentó la producción de etileno y que el tratamiento con 1-MCP también inducía la biosíntesis de etileno de manera dependiente de la concentración aplicada (McCollum y Maul, 2007).

2.5. Metabolismo de aminoácidos aromáticos. Fenilpropanoides.

Otros procesos inducidos en respuesta al tratamiento con etileno están relacionados con el metabolismo de aminoácidos aromáticos. Los genes de la ruta de fenilpropanoides se activaron en los dos tejidos y, además, en el flavedo el etileno afectó específicamente a genes del metabolismo del triptófano e indolalquilaminas (Tabla 29A y Tabla 30). En plantas, la inducción de procesos de biosíntesis de los aminoácidos aromáticos se ha relacionado con una necesidad de biosíntesis de nuevas proteínas y de metabolitos secundarios, alcaloides y fenilpropanoides, que actúan como componentes estructurales además de como reguladores del crecimiento y participan en las respuestas de defensa a la infección por patógenos, la herida u otros tipo de estrés, incluyendo el estrés oxidativo (Swain, 1977; Hashimoto y Yamada, 1994; Conn, 1995; Kutchan, 1995; Zhao *et al.*, 1998). Se ha sugerido que su inducción en respuesta a situaciones de estrés podría estar regulada por diferentes señales, como el etileno, ROS o el ácido salicílico (Zhao *et al.*, 1998; Janzik *et al.*, 2005; Ogawa *et al.*, 2005). En el flavedo de los frutos recién acondicionados con etileno se encontró una elevada representación de genes inducidos que participan en el metabolismo del triptófano y en procesos de biosíntesis de indolalquilaminas (Tabla 29A y Tabla 30). En la visualización de la ruta de biosíntesis de este aminoácido se encontraron 4 genes en el flavedo y 3 en el albedo que presentaban inducción en respuesta al tratamiento con etileno (Figura 37). Además, el etileno aumentó la expresión en ambos tejidos de 2 genes que conducen a la síntesis de fenilalanina a partir de corismato (Figura 38). Sin embargo, después de 10 días de almacenamiento en aire, la expresión de todos estos genes fue similar a la de los frutos RTC. La fenilalanina constituye el precursor en la biosíntesis de fenilpropaoides, lo que refuerza los resultados anteriores que sugieren que este grupo de compuestos podría estar implicado en el mecanismo protector del etileno frente al desarrollo del ‘colapso de la corteza’ en los frutos cítricos (Cajuste y Lafuente, 2007). Estos resultados concuerdan con el hecho de que el etileno aumentó los niveles de fenilalanina y triptófano en los frutos recién acondicionados, que sin embargo no se detectaron al final del almacenamiento (Lafuente, comunicación personal).

La aplicación de 1-MCP también tuvo un efecto a tiempos largos de almacenamiento en la inducción de genes de biosíntesis de aminoácido aromáticos (Tabla 29C y Tabla 30). Así, se observó un aumento en la expresión de 6 genes implicados en la biosíntesis de ácido siquímico, corismato e indol en el flavedo y/o albedo de estos frutos que presentaron el mayor ICC. Sin embargo, en el flavedo se encontró un gen reprimido dos veces que cataliza la conversión de indol a triptófano, aunque dicha disminución no fue significativa en el análisis SAM (Figura 37).

En relación al metabolismo de fenilpropanoides, estudios previos han puesto de manifiesto que la actividad de la enzima PAL aumenta transitoriamente en el flavedo y albedo inmediatamente antes de que se manifiesten los síntomas del ‘colapso de la corteza’ en los frutos cítricos (Sanchez-Ballesta, 1998). Asimismo, se ha sugerido que el aumento en la actividad de esta enzima, así como en el contenido total de fenoles y ligninas, podrían constituir respuestas asociadas al efecto beneficioso del acondicionamiento con etileno reduciendo la incidencia de dicha alteración (Cajuste y Lafuente, 2007). Los resultados del presente trabajo muestran además que el etileno favorece la inducción de la expresión de una elevada proporción de genes que participan en la biosíntesis de fenilpropanoides. Entre

ellos, además de una PAL que se indujo más de dos veces en ambos tejidos, se encontraron genes que conducen a la síntesis del ácido cafeico, ácido ferúlico y ácido sinápico, y otros derivados del ácido cumaril CoA. Algunos de ellos se indujeron sólo en el flavedo, como una C4H, mientras que otros, como una CAD o una cumarato 3-hidroxilasa (REF8), lo hicieron específicamente en el albedo (Figura 39). El tratamiento con 1-MCP tuvo un efecto represor muy marcado a los 4 días de almacenamiento en la expresión de este grupo de genes inducidos por etileno, como los que codifican una flavonona 3-hidroxilasa o una cinamil CoA reductasa en el flavedo, y una PAL o una reductasa del éster del ácido fenilcumaran, implicada en la biosíntesis de lignanos, en el albedo. Sin embargo, la mayoría de estos genes aumentaron su expresión significativamente al final del almacenamiento en el flavedo y albedo de los frutos tratados con 1-MCP. Este hecho refuerza la idea del papel protector de estos compuestos con carácter antioxidante en el desarrollo del ‘colapso de la corteza’ (Cajuste y Lafuente, 2007) y sugiere que estos genes podrían estar regulados por una vía dependiente de etileno. Además del papel protector de estos compuestos en las respuestas de defensa frente a la infección por hongos como *Penicillium digitatum* (Afek y Sztejnberg, 1988; Ballester, 2007), se ha sugerido recientemente que podrían participar en el mecanismo de tolerancia al frío de los frutos cítricos y con el efecto protector de los tratamientos de acondicionamiento a altas temperaturas (Sanchez-Ballesta *et al.*, 2003).

2.6. Procesos de transporte de electrones.

El etileno tuvo en ambos tejidos un efecto marcado en la respiración. Así, los resultados del análisis FatiGO+ mostraron una inducción de procesos de transporte electrónico en el flavedo y albedo de los frutos tratados 4 días con etileno (Tabla 29A y Tabla 30). Entre los genes incluidos dentro de esta categoría de procesos biológicos, además de genes que codifican componentes principales de los complejos de transporte de electrones como flavinas (FMN, FAD), deshidrogenasas dependientes de NADH, proteínas ferrosulfuradas, como la ferredoxina, o citocromos b y c, se encontró una abundancia de oxidorreductasas de unión a FAD y de citocromos P450. Entre los primeros, se encontraron varios genes *CPRD2* y otro que codifica una nectarina 5. Este último se indujo 9 veces en el albedo de los frutos tratados 4 días con etileno y más de 32 veces en el de los tratados con 1-MCP almacenados 14 días en aire. La nectarina 5 agrupada en la familia de enzimas BBE (del inglés ‘berberine-bridge-enzyme’) con dominio de unión a flavina, posee actividad glucosa oxidasa y se ha relacionado con las respuestas de defensa a la infección por su capacidad para generar H_2O_2 (Carter y Thornburg, 2004). En cuanto a los genes que codifican citocromos P450, se observó que la mayoría de ellos también se indujeron a los 4 días en el albedo de los frutos control pero no variaron su expresión en el flavedo ni en el albedo de los tratados con 1-MCP. Estos genes, sin embargo, se indujeron a los 14 días de almacenamiento en el albedo de estos últimos frutos, y en algunos de ellos dicho incremento fue mayor al que se produjo en los frutos tratados 4 días con etileno. Dentro de este grupo de genes, además, se encontraron varios de ellos, como *CYP71B24* (At3g26230) o *CYP71B13* (At5g25140), que participan en la biosíntesis de flavonoides. Los procesos de transporte electrónico constituyen un sistema respiratorio asociado a membranas y comportan la fosforilación enzimática del ADP con la consiguiente formación de ATP (Peretó *et al.*, 1996c). Es interesante señalar, que la activación de sistemas de transporte electrónico también se ha relacionado con la generación de calor y con funciones de eliminación del exceso de electrones, que originarían la formación de ROS en la célula, y de compuestos tóxicos oxidantes. (Peretó *et al.*, 1996c). Teniendo en cuenta, como se mencionó anteriormente, que en los frutos tratados 4 días con etileno y en los tratados con 1-MCP almacenados 14 días en aire se

produjo una activación de sistemas de defensa del estrés oxidativo, la activación paralela de los sistemas de transporte electrónico en estas condiciones de almacenamiento podría indicar una vez más que dicho estrés participa en el desarrollo del ‘colapso de la corteza’ y refuerza la idea del mecanismo de protección cruzada inducido por el tratamiento con etileno.

2.7. Degradación de componentes celulares y sistemas de transporte.

El análisis de componente celular reveló una proporción elevada de genes de sistemas de endomembranas en el albedo de los frutos tratados 4 días con etileno y en el de los tratados con 1-MCP almacenados 14 días en aire (Tabla 31A). Además de genes implicados en procesos de transporte de electrones, se encontraron otros que participan en sistemas de transporte intracelular de macro y micronutrientes a través de membranas. Entre ellos, se incluyeron genes que codifican proteínas transportadoras de metales, de sales, azúcares, aminoácidos y de iones como el K^+ o el Ca^{2+} . Otros codifican transportadores ABC, que se han relacionado con procesos de detoxificación de ROS (Yazaki, 2005; Yazaki, 2006), los cuales fueron muy abundantes (Anexo III Tabla 69-Tabla 71). La activación de sistemas de transporte se relaciona con un aumento de la actividad metabólica en procesos de reciclaje de nutrientes para la generación de energía (Fischer, 2006). Sin embargo, los procesos del catabolismo de macromoléculas, según el análisis de ontologías génicas (Tabla 30), tuvieron una representación muy reducida entre los procesos inducidos en respuesta al tratamiento con etileno. No obstante, se encontraron 10 genes implicados en la degradación de lípidos inducidos en los frutos recién acondicionados, 6 de los cuales se indujeron solamente en el albedo (Tabla 35 y Anexo III Tabla 66). Además, después de un periodo adicional de almacenamiento en aire de 10 días, la expresión de la mayor parte de estos genes, que codifican lipasas, fue muy similar a la de los frutos RTC. La degradación de lípidos conduce a una acumulación de ácidos grasos libres que son dirigidos, vía plastoglóbulos y partículas lipoproteicas citosólicas, hacia los peroxisomas donde tiene lugar la β -oxidación (Hopkins *et al.*, 2008). Así, se encontraron dos enzimas de la β -oxidación inducidos a los 4 días en el flavedo de estos frutos y, al igual que los anteriores, esta inducción fue transitoria (Tabla 35).

Otros enzimas incluidos en la micromatriz implicados en la degradación de lípidos codifican enzimas que desesterifican en las posiciones sn-1 y sn-2 de fosfolípidos de membrana. La expresión de estos genes se vio favorecida en los frutos tratados con 1-MCP pero no en los acondicionados con etileno. Entre ellos, un gen que codifica una PLD u otro correspondiente a una PLD1 tipo α , que se reprimió en respuesta a etileno (Anexo III Tabla 67). Sin embargo, otros genes que codifican enzimas de degradación de fosfolípidos presentaron perfiles de expresión diferentes a éstos últimos. Así, se encontraron dos genes que codifican patatinas (unigen 4828 y C05070E09) cuya expresión disminuyó en el albedo de los frutos tratados 4 días con etileno y en el de los frutos tratados con 1-MCP almacenados 14 días en aire, mientras que otro que codifica una PLA_2 (unigen 1744) se reprimió a los 4 días en los frutos tratados con el inhibidor y no modificó su expresión en el resto de condiciones estudiadas (Fichero Excel ‘Navelale’). Las enzimas PLDs son las primeras en actuar en los procesos de degradación de fosfolípidos durante la senescencia en plantas, seguido de las fosfatasa del ácido fosfatídico, que lo convierten en DAG, y por último de otras hidrolasas y lipasas que eliminan los ácidos grasos de esta molécula y lo dirigen a β -oxidación en los peroxisomas (van Doorn y Woltering, 2008). La disminución del contenido total de fosfolípidos como consecuencia de estos procesos degradativos y el aumento originado en la permeabilidad de la membrana precede al colapso de la vacuola durante los procesos que llevan a la muerte celular (Matile y Winkenbach, 1971; Borochoy

y Woodson, 1989; Hopkins *et al.*, 2007; van Doorn y Woltering, 2008). La activación de genes que degradan fosfolípidos durante el desarrollo del ‘colapso de la corteza’ en los frutos cítricos ya ha sido descrita por Alférez *et al.* (2008). Estos autores observaron un paralelismo entre el desarrollo de síntomas de esta alteración y la acumulación de los transcritos de 3 genes que codifican enzimas PLA₂ en frutos de mandarinas ‘Fallglo’ sometidos a procesos de deshidratación-rehidratación. Además, comprobaron que la aplicación de compuestos inhibidores de la actividad fosfolipasa A y D, uno de los cuales es de carácter fenólico (Lindahl y Tagesson, 1997), reducían la incidencia de esta alteración y que este efecto fue mucho más marcado al utilizar inhibidores específicos de PLA₂. Sin embargo, en el presente estudio sólo se han detectado cambios relevantes en la expresión de genes que codifican enzimas PLDs, que se han relacionado también, junto a otros genes de esta familia, con el desarrollo de daño en la piel asociado al frío en fruto cítricos (Maul *et al.*, 2008). Los resultados de este trabajo sugieren que la activación de genes que codifican PLDs podría constituir una respuesta asociada al ‘colapso de la corteza’ debido a que se favorecen la de-esterificación de fosfolípidos de membrana afectando a procesos de fosforilación (McCarty y Jagendorf, 1965; Siegenthaler, 1973). En los cítricos se ha comprobado que el aumento en la actividad de PLA₂ durante el desarrollo de síntomas de esta alteración va acompañado de un aumento en la pérdida iónica, lo que reflejaría una pérdida de la integridad estructural de la membrana plasmática (Alférez *et al.*, 2008). Sin embargo, algunos de los mecanismos que participan en la incidencia natural de este desorden en situaciones en las que no se producen cambios de HR probablemente difieren de los que tienen lugar cuando los frutos se deshidratan y rehidratan, donde el ICC se produce antes y de forma más acusada (Alférez *et al.*, 2003).

La disminución de la fluidez de la bicapa lipídica por la degradación de lípidos origina cambios en la conformación de las proteínas de membrana que aumentan su carácter hidrofílico y normalmente preceden a su proteólisis (Duxbury *et al.*, 1991). En concordancia con esta idea, se comprobó que sólo los frutos tratados con 1-MCP almacenados 14 días en aire presentaron una sobrerrepresentación de genes implicados en la degradación de proteínas, aunque esto ocurrió sólo en el albedo (Tabla 29C y Tabla 30). Este hecho se confirmó en el análisis FatiGO+ referente a componente celular, que mostró la activación de proteínas localizadas en los complejos de ubiquitinación y proteosoma (Tabla 31B). Este resultado contrasta con que el etileno favorece la degradación de proteínas durante la senescencia (Kim *et al.*, 2005; van Doorn y Woltering, 2008) mientras que la aplicación de 1-MCP puede retrasarla (Jiang *et al.*, 2002). Los resultados de este trabajo reflejan una vez más una similitud entre procesos de muerte celular y los que podrían tener lugar en condiciones que favoreciesen el ‘colapso de la corteza’ en esta variedad de naranjas tratadas con 1-MCP. El que no se detecten procesos relacionados con la degradación de proteínas en los frutos tratados 4 días con etileno podría ser indicativo de que estos frutos toleran altas dosis de etileno y por tanto, el tratamiento utilizado sería suficiente para inducir mecanismos de protección cruzada sin ser letales para el fruto.

2.8. Metabolismo de carbohidratos.

En relación a los procesos del metabolismo de carbohidratos, aunque el análisis de ontologías génicas no indicó una sobrerrepresentación de éstos entre los inducidos o reprimidos en respuesta a etileno, a nivel de genes individuales se encontraron dos genes inducidos en el flavedo y albedo en los frutos recién acondicionados con etileno que codifican una sacarosa fosfato sintetasa (SPS) (Atg10120) y una cupina (At1g07750), que participa en el metabolismo de azúcares y biosíntesis de pared celular, respectivamente

(Tabla 25 y Fichero Excel '12K' 'Navelate'). Los miembros de esta última familia se han relacionado con las respuestas de defensa frente a estímulos abióticos como el calor o la deshidratación, y algunos de ellos poseen actividad SOD (Dunwell *et al.*, 2000; Khuri *et al.*, 2001). En los frutos tratados con 1-MCP almacenados 14 días en aire, sin embargo, el análisis FatiGO+ mostró una represión de su biosíntesis en el albedo (Tabla 29B y Tabla 30). Entre ellos, varios genes de biosíntesis de celulosa, almidón y de sacarosa (Tabla 38). Además, se encontraron genes de biosíntesis de polisacáridos de la familia de rafinosas (RFOs), como los que codifican galactinol sintasas, y genes *CP12* que participan en el metabolismo primario de fijación del carbono en una reacción acoplada a la síntesis de poder reductor NADPH. Conviene señalar que, aunque el análisis de ontologías génicas tampoco mostró ninguno de estos procesos inducidos o reprimidos en los frutos tratados con 1-MCP a los 4 días de almacenamiento, se encontraron genes, como los que codifican varias UDP-glucosil transferasas o una SPS, que se indujeron en el albedo por etileno y se reprimieron en el de los tratados con el inhibidor de su acción. Otros genes también reprimidos en el albedo de estos últimos frutos codifican enzimas de pared celular como una proteína rica en residuos de glicina e hidroxiprolina implicada en refuerzo de pared celular (Fichero Excel 'Navelate'). No obstante, a este tiempo de almacenamiento el análisis FatiGO+ mostró una sobrerrepresentación de procesos de transporte de carbohidratos entre los inducidos en estos frutos (Tabla 32B). En las plantas y animales, las concentraciones de ATP y NADPH disponibles así como el pH intracelular son los factores que regulan los procesos de biosíntesis de carbohidratos que requieren energía y la participación de sistemas de transporte (Peretó *et al.*, 1996b). El que estos procesos de biosíntesis se repriman en los frutos tratados con 1-MCP desde el principio de su almacenamiento mientras que otros de degradación de metabolitos, como lípidos o proteínas, se activen podría reflejar que existe un déficit de energía y una necesidad de obtención de la misma para el mantenimiento de la viabilidad celular.

2.9. Respuestas de defensa a hongos.

La alteración de la membrana por la degradación de los constituyentes que las forman activa el transporte de iones Ca^{2+} y H^+ favoreciendo su entrada al citoplasma. Estos fenómenos se han relacionados con las primeras respuestas de defensa a la infección por hongos patógenos (Hammond-Kosack y Jones, 2000; Zhao *et al.*, 2005). Aunque se encontraron varios genes que codifican proteínas de unión a calcio implicados en su transporte o señalización cuya expresión se indujo por el tratamiento con etileno, fundamentalmente en el albedo, la mayoría lo hicieron en los frutos tratados con el inhibidor de su acción a los 14 días de almacenamiento (Anexo III Tabla 71). El desarrollo de daños en los frutos tratados con 1-MCP en el albedo se relacionó también con cambios en la expresión de genes que participan en procesos característicos de la respuesta de defensa a hongos (Tabla 29B), lo que fue confirmado en el análisis FatiGO+ de la comparación entre tejidos en estos frutos (Tabla 41B). Aunque se ha descrito que la inhibición de la acción del etileno por la aplicación de 1-MCP puede favorecer la infección por hongos patógenos en los frutos cítricos (Mullins *et al.*, 2000; Marcos *et al.*, 2005), en las condiciones ensayadas no se observó incidencia de podridos. En plantas de *A. thaliana* se ha demostrado que pueden existir respuestas comunes en procesos de senescencia y en respuesta a la infección por patógenos (Lim y Nam, 2005; Espinoza *et al.*, 2007). Estas respuestas incluyen la inducción de genes implicados en procesos de ubiquitinación y degradación de proteínas, de degradación de lípidos y componentes de la pared celular, de proteínas PR y de enzimas del sistema antioxidante incluyendo genes que codifican enzimas CAT, APX, GST o DHAR (Espinoza *et al.*, 2007). En el presente estudio dentro de la

categoría funcional ‘respuesta de defensa a hongos’, además de genes que codifican proteínas implicadas en procesos de ubiquitinación y degradación vía proteosoma, como una proteína ubiquitina ligasa SGT1 o la proteína COP10, se encontró un gen de resistencia (R) y otro que codifica una proteína inducida tras el reconocimiento activo del producto de un gen de avirulencia (*avr*) del patógeno (Tabla 36). Otro codifica una quitinasa cuya expresión aumentó más de 4 veces en el albedo de estos frutos y no varió en el resto de condiciones de almacenamiento estudiadas con respecto a los frutos RTC. La inducción de genes que codifican quitinasas en plantas se ha relacionado con la defensa frente a la infección por hongos patógenos (Jach *et al.*, 1995; Ebel, 1998), aunque también se ha descrito en situaciones de estrés abiótico como la deshidratación, temperaturas extremas de calor y frío o el estrés osmótico (Sanchez-Ballesta *et al.*, 2003; Kwon y Kim, 2007). Sin embargo, hasta el momento no existe ningún estudio que relacione las quitinasas con el desarrollo de esta alteración fisiológica. Se ha comprobado que su deficiencia en mutantes de *Arabidopsis* origina una deficiencia en celulosa y una alteración de la membrana plasmática (Kwon y Kim, 2007). Sin embargo, recientemente se ha comprobado que la expresión de otro gen que codifica una proteína PR, concretamente una glucanasa, aumentaba en esta variedad de frutos cítricos al inicio de los primeros síntomas de ‘colapso de la corteza’, lo que se consideró una respuesta asociada al daño celular (Sanchez-Ballesta *et al.*, 2008). Los resultados obtenidos apoyarían la idea planteada originalmente que atribuye al grupo de proteínas PR un papel como marcadores del grado de susceptibilidad al desarrollo de esta alteración en los frutos cítricos (Sanchez-Ballesta *et al.*, 2008).

2.10. Procesos de traducción, transducción de señal y regulación de la transcripción.

Otros procesos reprimidos, según el análisis FatiGO+, en los frutos tratados con 1-MCP tanto a 4 como a 14 días de almacenamiento en aire están relacionados con la traducción y la transcripción. Así, se encontró una elevada proporción de genes reprimidos que codifican proteínas constituyentes estructurales del ribosoma, proteínas de unión a RNA y factores de transcripción (Tabla 32B, C). La represión de estos procesos indicaría una disminución de la actividad anabólica del tejido lo que podría contribuir al desarrollo del ‘colapso de la corteza’.

En base a los resultados del análisis de ontologías génicas que indicaron que el etileno favorece la expresión en el albedo respecto del flavedo de genes que codifican factores de transcripción (Tabla 421B) y que el tratamiento con el inhibidor de su acción redujo su expresión en el albedo a los 4 días de almacenamiento en aire respecto a los controles (Tabla 32B), se realizó un análisis más detallado de este conjunto de genes y de otros que codifican proteínas implicadas en la transducción de señales. Este análisis mostró que el mayor número de diferencias significativas de expresión tuvo lugar en los frutos tratados 4 días con etileno y en los tratados con 1-MCP almacenados 14 días en aire (Tabla 39), siendo la mayor parte de las respuestas específicas del albedo (Tabla 40). Entre los genes que codifican componentes de transducción de señal se encontraron dos genes diferentes que codifican MAPK4 (At3g52430 y At4g01370), uno de ellos se indujo en el flavedo y albedo en los frutos recién acondicionados con etileno (Anexo III Tabla 72), mientras que ambos lo hicieron en los dos tejidos de los frutos tratados con 1-MCP almacenados 14 días en aire (Anexo III Tabla 73). En *A. thaliana*, la proteína MAPK 4 se ha relacionado con funciones de regulación en la defensa frente a patógenos (Peterson *et al.*, 2000). Además, la ausencia de inducción de genes de defensa en respuesta a etileno y al ácido jasmónico en mutantes *mpk4* de *A. thaliana* indica que esta proteína está implicada en la señalización de dicha hormona, aunque es independiente de ERF1 (Brodersen *et al.*, 2006). En respuesta a etileno, además, se encontró una quinasa AFC1 / AME2 inducida en

ambos tejidos inmediatamente después del tratamiento (Anexo III Tabla 72). En levaduras, esta proteína, junto al activador transcripcional STE12, se ha relacionado con la regulación de genes inducidos por feromonas (Bender y Fink, 1994; Breitzkreutz *et al.*, 2003). Es interesante señalar que el etileno indujo específicamente en el albedo la expresión de un gen que codifica la enzima PIP-PLC (del inglés ‘monophosphatidylinositol specific phospholipase C’) que se ha relacionado con la activación de respuestas de defensa durante los procesos que conducen a la muerte celular (Andersson *et al.*, 2006). En estos frutos recién acondicionados con etileno se encontraron 3 genes inducidos que codifican factores de transcripción de respuesta a etileno, dos de los cuales (ERF5 y DDF1) fueron específicos de esta condición (Anexo III Tabla 72). Por otro lado, en los frutos tratados con 1-MCP al final de su almacenamiento también se activaron genes de respuesta a etileno cuya expresión no varió por el tratamiento con el mismo en los frutos recién acondicionados (Anexo III Tabla 73). Además de dos receptores, uno de los cuales (At2g40940) se indujo más de 3 veces, se identificó un gen que codifica una proteína EIN3 que aumentó su expresión específicamente en el flavedo de estos frutos y no varió en ninguna otra condición de almacenamiento. Este gen constituye un regulador positivo en la transducción de la señal de etileno (Guo y Ecker, 2003). En cítricos, la expresión de una proteína homóloga a esta última (EIN2) se ha relacionado con la respuesta al estrés de frío, comprobándose que el acondicionamiento a altas temperaturas reduce sus niveles de expresión (Cubells, 1998; Sapitnitskaya *et al.*, 2006). Por otro lado, en el albedo de estos frutos tratados con 1-MCP almacenados 14 días en aire se indujeron un elevado número de factores de transcripción de respuesta a etileno, como dos ERFs o una proteína EREBP-4. Sin embargo, el análisis del patrón de expresión por hibridación Northern de un gen que codifica un ERF aislado de la biblioteca de cDNA mostró una disminución en su expresión en los frutos acondicionados con etileno durante el tratamiento y posteriormente a lo largo de su almacenamiento en aire. Sin embargo, su expresión no varió en los frutos expuestos a 1-MCP acondicionados o no posteriormente con etileno ni en los controles mantenidos en aire (Tabla 47 y Tabla 48). El conjunto de estos resultados podrían apoyar la idea que se ha venido planteando a lo largo de esta discusión que sugiere que las respuestas comunes que se producen en los frutos tratados con 1-MCP a los 14 días de almacenamiento en aire y en los frutos recién acondicionados con etileno, antes de su transferencia a aire, podrían haberse inducido por una vía dependiente de etileno. En los frutos más dañados estas respuestas se produjeron cuando ya se habían manifestado los daños del ‘colapso de la corteza’ aunque podrían haberse inducido para frenar o reducir la severidad de los mismos durante el almacenamiento de los frutos. De hecho, se observó un incremento brusco del daño hasta los 7 días de almacenamiento y después de este periodo, la severidad del daño apenas se vio afectada.

Otros genes que codifican miembros de las familias WRKY, NAM/NAC/ARF o MYC/MYB y diversas proteínas tipo ‘zinc finger’, bZIP, bHLH o HD-ZIP, se indujeron también en respuesta al tratamiento con etileno aunque el aumento de expresión de muchos de ellos fue mayor en los frutos tratados con 1-MCP (Tabla 40). En relación a los genes WRKY, 6 se indujeron por etileno aunque ninguno de ellas fue específico de esta condición induciéndose mucho más en los frutos con el mayor ICC (Anexo III Tabla 72 y Tabla 73). Un comportamiento similar lo presentó el gen que codifica una WRKY4 aislado de la biblioteca de cDNA FlavCurFr1 cuyo patrón de expresión se estudió por hibridación Northern (Tabla 47 y Tabla 48). Así, aunque se indujo transitoriamente en el albedo de los frutos control y en los frutos tratados con etileno, su inducción en los frutos tratados con 1-MCP, acondicionados o no posteriormente con etileno, fue muy superior (4 veces) y se mantuvo durante todo el almacenamiento. En plantas de tabaco, se ha relacionado con la respuesta de defensa a la infección por el virus del mosaico del tabaco (TMV) y se ha

observado que se induce en respuesta al ácido salicílico (Chen y Chen, 2000). Otros dos genes de esta familia analizados también mediante hibridación Northern mostraron un comportamiento muy diferente. Uno de ellos se indujo en respuesta al tratamiento con etileno y no varió en el resto de condiciones aunque en el flavedo de los frutos control, se observó un aumento transitorio a los 4 días de almacenamiento. El tercero, sin embargo no modificó su expresión en ninguna de las condiciones de almacenamiento estudiadas. Estas proteínas WRKY se han relacionado en plantas con respuestas de defensa a la infección por patógenos y en respuesta a otros tipos de estrés, como la herida (Eugelm *et al.*, 2005). El mayor número de estos genes y su mayor inducción observada en los frutos inicialmente tratados con 1-MCP podría indicar un efecto protector en la reducción de daños. Aunque los genes diana de estas proteínas no se conocen en su mayoría, algunos de ellos se han relacionado con la regulación de procesos de senescencia. Así, el factor WRKY6 regula la expresión de genes que codifican proteínas asociadas con senescencia como la proteasa SEN1, una proteína NAC2 reguladora de ácido jasmónico o una GST. (Robatzek y Somssich, 2002). Otras, como WRKY53, se unen a genes que codifican proteínas PR, genes de respuesta a estrés u otros factores de transcripción incluyendo otros miembros WRKY (Miao *et al.*, 2004).

La familia de factores de transcripción NAC (NAM, ATAF y CUC), que es específica de plantas, se ha relacionado con el control de la expansión celular de órganos florales o con la formación de raíces laterales mediada por auxinas. En plantas de *A. thaliana* y de arroz, además, algunos miembros de esta familia, como AtNAC072 (RD26), se han asociado con la respuesta a diferentes tipo de estrés, como el estrés salino o de deshidratación (Fujita *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2006). En relación a esta familia de genes y otros inducibles por auxinas, se encontraron 4 genes que aumentaron su expresión en el flavedo y/o albedo a los 4 días en respuesta a etileno, dos de los cuales también se indujeron en el flavedo de los frutos control, aunque ninguno modificó su expresión en los frutos tratados con 1-MCP. Sin embargo, a los 14 días de almacenamiento, a excepción de uno de ellos que codifica una proteína RD26 (unigen 6913) cuya función en plantas de *A. thaliana* se ha relacionado con la regulación de la expresión de genes por una vía dependiente de ABA (Fujita *et al.*, 2004), el resto se indujeron en el albedo de los frutos tratados con el inhibidor de la acción del etileno y no variaron en los frutos acondicionados con la hormona o mantenidos en aire (Anexo III Tabla 72 y Tabla 73). Por otro lado, de un total de 8 genes de estas familias inducidos en el flavedo y/o albedo de los frutos tratados con 1-MCP, 5 fueron específicos de esta condición. Entre ellos, el gen que codifica una proteína homóloga a NAC2 de *A. thaliana* (Anexo III Tabla 73). Aunque el tratamiento con ACC incrementa los niveles de acumulación relativa de este gen en *A. thaliana* (He *et al.*, 2005), su expresión no se indujo en respuesta al tratamiento con etileno en la piel de la naranja 'Navelate'. En los frutos cítricos, el aumento en la expresión de algunos miembros de esta familia de factores de transcripción se ha relacionado con la respuesta al estrés de frío (Maul *et al.*, 2008) o con el desarrollo de daños en la piel a temperaturas por encima de las que causan 'daños de frío' (Gao *et al.*, 2007). Además, se ha comprobado que estos genes NAC también se inducen durante la senescencia en algunos tejidos, aunque su función no ha sido todavía esclarecida (Guo y Gan, 2006; van Doorn y Woltering, 2008).

En relación a genes de respuesta a auxinas, se encontraron 2 cuya expresión se indujo específicamente en el albedo de los frutos tratados con 1-MCP y almacenados 14 días en aire (Anexo III Tabla 73). Uno de ellos codifica una proteína GH3 implicada en la regulación de los niveles endógenos de auxinas, y el otro presenta homología con un ARF. En plantas de *A. thaliana*, se ha comprobado que el gen *GH3* puede modular la señalización mediada por auxinas y ácido salicílico en la respuesta frente a la infección por patógenos. La sobreexpresión de este gen origina un aumento en la acumulación de ácido salicílico y en

la expresión de PR-1, mientras que su delección incrementa los niveles de IAA y la susceptibilidad a la infección (Park *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007). Otros autores comprobaron que su expresión aumentaba al disminuir la concentración de auxinas, que aumentan la sensibilidad al etileno, y que la aplicación de 1-MCP reprimía su expresión (Liu *et al.*, 2005).

En relación a la familia de factores de transcripción MYB/MYC, 5 se indujeron en respuesta a etileno, aunque ninguno de forma específica (Tabla 40 y Anexo III Tabla 72). Sin embargo, de un total de 11 genes de esta familia inducidos en los frutos tratados con 1-MCP y almacenados 14 días en aire, 6 lo hicieron de manera específica en estos frutos (Tabla 40 y Anexo III Tabla 73). Asimismo, uno de los genes que codifica un factor MYC analizado por Northern se indujo en todas las condiciones de almacenamiento aunque la mayor expresión se observó a los 4 días del tratamiento con etileno (con una inducción de más de 5 veces) y en los frutos tratados con el inhibidor a los 14 días de almacenamiento en aire (más de 4 veces) (Tabla 47 y Tabla 48). Estas familias se han relacionado con la tolerancia a diferentes tipos de estrés y con la senescencia (Dai *et al.*, 2007) y, en algunos casos, se ha comprobado que interactúan con genes del metabolismo de fenilpropanoides favoreciendo la síntesis de compuestos fenólicos (Moyano *et al.*, 1996; Hartmann *et al.*, 2005). Además, los resultados obtenidos en ensayos de sobreexpresión de algunos genes MYC en *A. thaliana* o tomate han sugerido que tienen un papel esencial en la señalización mediada por ácido jasmónico para la activación de genes de defensa (Boter *et al.*, 2004). De acuerdo con estas observaciones, los resultados obtenidos podrían sugerir que esta familia de reguladores de la transcripción podría participar en las respuestas de defensa de los frutos de 'Navelate' frente al 'colapso de la corteza'. Además, su inducción podría depender de etileno o podría producirse por una vía independiente de esta hormona como consecuencia del daño.

Entre los genes que codifican factores de transcripción cuya expresión aumentó en los frutos tratados con 1-MCP al final de su almacenamiento pero no se vio modificada por el tratamiento con etileno se encontró una abundancia de factores tipo 'zinc finger', bZIP, bHLH, y otros que codifican HSFs y proteínas de la familia YABBY (Tabla 40 y Anexo III Tabla 73). Entre los factores 'zinc finger', además de dos genes de tipo 'C3HC4 RING' o 'GATA', se encontró un factor con dominio BTB/POZ. Este último participa en la regulación de procesos de degradación de proteínas vía interacción con proteínas culina para formar ligasas E3 (Weber *et al.*, 2005). En relación a los factores bZIP, diversos estudios han relacionado a esta familia con la regulación de diferentes procesos del desarrollo y otros de respuesta a estrés, incluyendo la defensa frente a patógenos (Jakoby *et al.*, 2002). En plantas de *A. thaliana* y en tabaco también se han asociado con la regulación de procesos de senescencia foliar (Yang *et al.*, 2001; Jakoby *et al.*, 2002). Por otro lado, cabe destacar que de un total de 6 genes que codifican HSFs, 5 se indujeron específicamente en el albedo de estos frutos y ninguno de ellos modificó su expresión en los frutos acondicionados o en los controles mantenidos en aire. A diferencia de éstos, el gen analizado por Northern que codifica un HSF5 se indujo de forma muy acusada en el albedo, tanto en los frutos tratados con etileno como con 1-MCP almacenados posteriormente en aire, aunque dicho incremento fue mucho mayor en los tratados conjuntamente con el inhibidor y etileno. No obstante, en el flavedo la inducción en respuesta a etileno fue transitoria y disminuyó al transferir al aire mientras que ésta se mantuvo elevada en los frutos tratados con el inhibidor hasta el final del almacenamiento (Tabla 47 y Tabla 48). Los HSF5 se han descrito como represores específicos de factores HSF4 que constituyen factores antiapoptóticos (von Koskull-Döring *et al.*, 2007), lo que sugiere que su inducción en los frutos tratados con 1-MCP podría estar relacionada con la muerte celular. Esta familia de proteínas reguladoras se han asociado con las respuestas de

defensa a situaciones de estrés como la infección por patógenos, concentraciones elevadas de metales pesados o condiciones de estrés oxidativo (Wu, 1995; Miller y Mittler, 2006). De acuerdo a estas observaciones, podría considerarse que la inducción de esta familia de factores de transcripción constituye un mecanismo de protección que reduce la severidad del ‘colapso de la corteza’. Por otro lado, también inducidos específicamente en el albedo de los frutos tratados con 1-MCP al final de su almacenamiento se encontraron 2 miembros de la familia YABBY (Anexo III Tabla 73. Esta familia de factores de transcripción, que controlan el crecimiento de órganos laterales (Waites y Hudson, 1995; Bowman, 2000), no se ha relacionado por el momento con las respuestas a situaciones de estrés o la senescencia.

Entre los genes analizados por Northern en este trabajo, se encontró que la expresión de un gen que codifica un factor KNAT1 aumentó de forma específica en el albedo de los frutos inicialmente tratados con el inhibidor, acondicionados o no posteriormente con etileno a los 3 y 4 días de almacenamiento en aire (Tabla 47 y Tabla 48). Esta familia de genes con dominio homeobox, que interviene en el control de la identidad de las células meristemáticas, se ha relacionado con el metabolismo de citoquininas y se ha comprobado que la sobreexpresión de algunos de ellos retrasa la senescencia y muerte celular (Ori *et al.*, 1999; Hoeberichts *et al.*, 2007; van Doorn y Woltering, 2008). Otro, con un perfil de expresión similar, codifica un activador transcripcional CBF1, aunque, a diferencia del anterior, éste se indujo también a los 14 días en los frutos control pero no en los frutos acondicionados con etileno (Tabla 47 y Tabla 48). La sobreexpresión de estos genes CBF en plantas de *A. thaliana* aumenta la tolerancia a la congelación (Thomashow, 1999; Novillo *et al.*, 2007), pero también induce la expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo aumentando la tolerancia al frío en plantas como el tomate (Hsieh *et al.*, 2002b) o al déficit hídrico (Hsieh *et al.*, 2002a). De acuerdo con estos estudios, la mayor expresión de estos dos genes en los frutos tratados con 1-MCP y en el caso del gen CBF1, también en los controles, sugiere que pueden tener un papel como marcadores de daños celulares aunque no conocemos si su función es de defensa o contribuyen al desarrollo de estos daños.

Entre los genes reprimidos en los frutos tratados con 1-MCP a los 14 días de almacenamiento, además de genes que codifican ARFs, se detectó una abundancia de genes en el albedo que codifican proteínas MADS-box (Tabla 40 y Anexo III Tabla 75). Esta familia de proteínas están implicadas en la regulación de procesos del desarrollo, fundamentalmente en la floración, aunque en frutos como el tomate podría participar en la regulación de la maduración o la abscisión (Shore y Sharrocks, 1995; Theissen *et al.*, 2000; Mao *et al.*, 2000; Vrebalov *et al.*, 2002). En un estudio reciente se comprobó que la sobreexpresión de un gen de esta familia en plantas de *Arabidopsis* y arroz inducía la expresión de genes de biosíntesis de ácido jasmónico, etileno y de otros de respuesta a estrés además de un incremento en ROS (Lee *et al.*, 2008). En frutos de pomelo almacenados a 5 °C, se encontró un miembro de esta familia asociado al daño originado por el frío mientras que otro se indujo en los frutos previamente acondicionados donde la incidencia de daños fue mucho menor (Maul *et al.*, 2008), lo que indica sistemas de regulación y funciones muy diversas entre los miembros de esta familia de factores de transcripción.

El presente estudio pone de manifiesto que el albedo es el tejido más afectado cuando el desarrollo del ‘colapso de la corteza’ se produce en frutos no estresados almacenados a una HR alta (90-95%RH) y constante y a 22°C. Este hecho se diferencia de observaciones morfológicas previas que indican que las células de las zonas de transición entre el flavedo y albedo son las más afectadas cuando esta alteración se produce como consecuencia de la exposición de los frutos a cambios bruscos de humedad (deshidratación-rehidratación). Dichas diferencias podrían ser debidas a que en los frutos no estresados no se produciría el daño en la zona de transición como consecuencia de la demanda de agua al flavedo desde las células adyacentes del albedo. Las diferencias encontradas entre ambos tejidos en las condiciones experimentales utilizadas en el presente estudio podrían estar relacionadas con sus diferencias morfológicas y composicionales y con su distinta capacidad para inducir respuestas de defensa frente a situaciones adversas. Así, por ejemplo, el análisis comparativo de los cambios de expresión entre los dos tejidos de la corteza del fruto reveló que el flavedo es un tejido más enriquecido en genes del metabolismo de fenilpropanoides y en genes que participan en la biosíntesis de ácido jasmónico (Tabla 41). Otros genes más expresados en este tejido están implicados en procesos de transporte de electrones, transporte de lípidos, metabolismo del triptófano e indolalquilaminas, así como implicados en la biosíntesis de aminoácidos aromáticos. El ácido jasmónico actúa como señal para la activación de respuestas de defensa a estrés (Blée, 2002; Porta y Rocha-Sosa, 2002) y los compuestos con carácter fenólico poseen actividad antioxidante y en algunos casos se ha descrito su actividad inhibidora de enzimas de degradación de lípidos (Lindahl y Tagesson, 1997). Este grupo de compuestos parece estar implicado en el mecanismo protector del etileno frente al desarrollo del ‘colapso de la corteza’ en los frutos cítricos (Cajuste y Lafuente, 2007). Por otro lado, la activación de procesos de transporte de electrones y de transporte de lípidos constituirían respuestas asociadas con procesos de generación de energía y movilización de nutrientes y reflejarían un aumento de la tasa del metabolismo necesaria para el mantenimiento de la viabilidad celular (Peretó *et al.*, 1996a). Todas estas observaciones podrían explicar por qué en las condiciones ensayadas fue el albedo el tejido que se vio más afectado por esta alteración. De hecho en este tejido, se observó en los frutos tratados con 1-MCP al final del almacenamiento una mayor abundancia de genes de respuesta a estrés incluyendo genes de degradación de proteínas y otros de respuesta a patógenos y de protección frente al estrés oxidativo, fundamentalmente GSTs. Todas estas respuestas estarían asociadas al daño y constituirían respuestas de protección para frenar el avance del mismo.

En resumen, se propone la idea de que el tratamiento con etileno induce un mecanismo de protección cruzada que implica la activación de respuestas de defensa a estrés que protegerían al fruto frente a las condiciones que favorecen el desarrollo del ‘colapso de la corteza’. Esta respuesta incluye la inducción de genes relacionados con la defensa al estrés oxidativo, de transporte electrónico hasta otros que participan en el metabolismo de fenilpropanoides. Además, el etileno indujo procesos biológicos relacionados con su propia síntesis y la de ácido jasmónico. Algunas de estas respuestas fueron comunes a las observadas en los frutos tratados con 1-MCP, aunque éstas se produjeron en estos frutos después de periodos prolongados de almacenamiento, cuando los síntomas de daño de ‘colapso de la corteza’ eran muy evidentes. En estos frutos éstas podrían tener un efecto protector frenando el desarrollo de daños de esta fisiopatía. Otras respuestas inducidas en los frutos tratados con 1-MCP están asociadas con el daño e incluyen la degradación de proteínas y lípidos y la represión de genes implicados en biosíntesis de carbohidratos, traducción y transcripción.

3. COMPARACIÓN DE LOS MECANISMOS ASOCIADOS AL EFECTO DEL CALOR, EL FRÍO O LA COMBINACIÓN DE CALOR Y FRÍO EN FRUTOS DE MANDARINA 'FORTUNE' Y AL EFECTO DEL TRATAMIENTO CON ETILENO Y 1-MCP EN FRUTOS DE NARANJA 'NAVELATE'.

El análisis transcriptómico de las respuestas inducidas por el curado en los frutos de mandarina 'Fortune' almacenados en frío y las que se producen en respuesta al tratamiento con etileno en los frutos de 'Navelate' antes de su transferencia a aire, puso de manifiesto que la mayor parte de los mecanismos moleculares implicados en ambos tipos de tratamientos son diferentes. Así, tanto al emplear réplicas técnicas como biológicas el porcentaje de genes inducidos tanto por la combinación de calor y frío en el flavedo de los frutos de 'Fortune' (C+F vs RTC) como en respuesta al tratamiento con etileno en el flavedo y albedo de los frutos de 'Navelate' (4d E vs RTC) fue inferior al 10% de los genes inducidos en 'Fortune'. No obstante, en relación al número de genes que se indujeron en el flavedo (220) y en el albedo (280) de los frutos de 'Navelate' tratados 4 días con etileno, este porcentaje fue del 25% (Anexo IV Tabla 76 y Tabla 77). Este resultado podría concordar con el hecho de que el curado inhibe la producción de etileno en frutos de mandarina 'Fortune' almacenados en frío (Martínez-Téllez y Lafuente, 1997). Dentro de este grupo de genes inducidos en ambas condiciones, un 40% mostró a los 20 días de almacenamiento a 2 °C mayor expresión en los frutos previamente acondicionados con respecto a los almacenados directamente a dicha temperatura. Entre ellos, en la micromatriz '7K' se encontraron dos genes implicados en la biosíntesis de ácido jasmónico y codifican una AOS y una OPDA reductasa. Estos genes inducidos, específicamente en respuesta a la combinación de calor y frío, aumentaron su expresión en el flavedo y en el albedo de los frutos recién acondicionados con etileno pero no variaron en los tratados con el inhibidor de su acción a los 4 y 14 días de almacenamiento en aire (Fichero Excel adjunto 'Fortune' '7K' vs 'Navelate'). Aunque se ha descrito que el ácido jasmónico y el etileno cooperan en la regulación de diferentes respuestas a estrés, incluyendo la defensa frente a patógenos (Lorenzo *et al.*, 2003), no se encontraron más genes de esta ruta con este perfil de expresión. Por otro lado, en la micromatriz '12K' se encontraron 7 genes que codifican LOX cuya expresión se reprimió en respuesta al frío y a la combinación de calor y frío, algunos de los cuales hasta 8 veces con respecto a los frutos RTC, aunque no se detectaron diferencias significativas entre ambos tipos de frutos acondicionados o almacenados directamente a 2 °C. En respuesta al calor no modificaron su expresión. Sin embargo, la mayoría de estos genes se indujo en el flavedo de los frutos de 'Navelate' tratados 4 días con etileno y su expresión se mantuvo elevada hasta finalizado su almacenamiento (4d E + 10d A). Conviene señalar que la expresión de algunos de ellos también aumentó de forma similar a los 4 días de almacenamiento en el flavedo de los frutos control y de los tratados con 1-MCP, y a los 14 días en el flavedo de los controles, aunque dicho incremento no fue significativo. No obstante, en los frutos tratados con 1-MCP almacenados 14 días en aire ninguno de ellos aumentó su expresión en el flavedo y solamente uno lo hizo en el albedo de estos frutos.

En la micromatriz '12K' se encontraron otros genes LOX o que codifican OPDA reductasas cuya expresión aumentó de forma significativa tanto en el flavedo y albedo de los frutos de 'Navelate' tratados 4 días con etileno como en el albedo de los tratados con 1-MCP almacenados 14 días en aire, aunque no variaron su expresión en respuesta al frío en los frutos de mandarina 'Fortune'. Algunos, además, aumentaron su expresión en los frutos control mantenidos 4 y 14 días en aire aunque dicho incremento no fue significativo. Estos resultados sugieren que las rutas de señalización que implican la participación de oxilipinas para la activación de respuestas de defensa frente a los 'daños de frío' difieren de las que se

activan durante el desarrollo del ‘colapso de la corteza’, aunque en ambos casos el etileno parece jugar un papel importante.

La aplicación de etileno durante el almacenamiento en frío reduce, aunque en menor medida que el curado, la incidencia de ‘daños de frío’, lo que se ha relacionado con su efecto inductor de la actividad PAL (Martínez-Téllez y Lafuente, 1997; Lafuente *et al.*, 2001b; Lafuente *et al.*, 2004). Sin embargo, sólo dos genes de esta ruta, que codifican una hidroxicinamil transferasa y una reductasa del ácido fenilcumaran bencílico, se indujeron tanto en respuesta a la combinación de calor y frío como en respuesta a etileno en el flavedo de los frutos de ‘Navelate’. El análisis de la expresión no mostró ningún gen *PAL* ni otros genes de la ruta subsiguiente de fenilpropanoides inducidos simultáneamente en las dos condiciones de almacenamiento. Estos resultados sugieren que ambos tratamientos tienen un efecto marcado en la inducción de genes del metabolismo de fenilpropanoides aunque los mecanismos que operan en cada uno de ellos son independientes. Este hecho podría explicar las diferencias en la eficacia de ambos tratamientos reduciendo los daños (Lafuente *et al.*, 2004). En cambio, en ambas micromatrices la mayoría de los genes inducidos en respuesta al frío ‘per se’ en los frutos de ‘Fortune’, como los que codifican una PAL, una 4CH o diversas OMTs, se indujeron también en el flavedo de los frutos de ‘Navelate’ recién acondicionados con etileno y en el albedo de los tratados con 1-MCP almacenados 14 días en aire. Teniendo en cuenta que durante el almacenamiento en frío en frutos no acondicionados se produce un aumento en la producción de etileno de forma paralela al desarrollo de ‘daños de frío’ (McCollum y McDonald, 1991; Martínez-Téllez y Lafuente, 1997; Lafuente *et al.*, 2003), los resultados sugieren que la expresión de estos genes inducidos en respuesta al frío está regulada por una vía dependiente de etileno. Por último, se encontraron genes que se indujeron en el flavedo y/o albedo de los frutos de ‘Navelate’ tratados 4 días con etileno y en el albedo de los tratados con el inhibidor de su acción almacenados 14 días en aire cuya expresión no varió en los frutos de ‘Fortune’ en respuesta al calor, al frío y a la combinación de calor y frío. Estos genes podrían tener un papel protector frente al desarrollo del ‘colapso de la corteza’ aunque no parecen estar implicados en las respuestas de defensa frente al estrés de frío.

En numerosos sistemas vegetales se ha propuesto que el etileno actúa como señal en la activación de quitinasas y β -1,3-glucanasas ya que: 1) estas proteínas se inducen en respuesta al tratamiento con etileno (Boller *et al.*, 1983; Boller, 1988; Keefe *et al.*, 1990); 2) la aplicación de inhibidores de la síntesis de esta hormona reduce su acumulación; 3) su inducción en respuesta a la infección por patógenos o a tratamientos con elicitores va acompañada de un aumento en la producción de etileno (Roby *et al.*, 1986; Broglie *et al.*, 1989). Sin embargo, en algunas plantas como el tabaco o el guisante también se ha observado su inducción por una vía independiente de etileno (Mauch *et al.*, 1984; Lotan y Fluhr, 1990). En la micromatriz ‘12K’ se encontró un gen que codifica una quitinasa (unigen 5509) inducido en respuesta al calor, al frío y a la combinación de calor y frío, que también aumentó su expresión en el flavedo de los frutos de ‘Navelate’ recién acondicionados con etileno y en el albedo de los tratados con 1-MCP almacenados 14 días en aire. Este gen podría constituir un buen candidato implicado en el efecto beneficioso del curado reduciendo los ‘daños de frío’ en esta variedad de mandarinas y su regulación en esta situación concreta no parece ser dependiente de etileno. Además, se encontraron otros genes que codifican quitinasas inducidos en respuesta al frío y al tratamiento con etileno. Destaca uno de ellos en la micromatriz ‘12K’ (C34101G09) que codifica una endoquitinasa cuya expresión se indujo más de 8 veces en respuesta al frío ‘per se’ y dos veces en el flavedo y en el albedo de los frutos de ‘Navelate’ tratados 4 días con etileno. Además, aumentó más de 16 veces en el albedo de los frutos tratados con 1-MCP almacenados 14 días en aire. Sin embargo, también se encontró otro gen que codifica una quitinasa de clase

IV cuya expresión no varió a los 4 días del tratamiento con etileno en el flavedo ni en el albedo de los frutos de 'Navelate'. Sin embargo, su expresión se indujo en el albedo de los frutos tratados con 1-MCP a los 14 días de almacenamiento. Este gen podría haberse inducido a tiempos más cortos durante el tratamiento con etileno por lo que no se descarta la posibilidad de que el etileno pudiese actuar como señal reguladora en la activación de dicho gen y de otros miembros de la misma familia que codifican quitinasas.

El análisis de genes relacionados con el estrés oxidativo comunes a ambas micromatrices reveló que, a excepción de un gen que codifica una GST, ninguno de los genes inducidos en el flavedo de los frutos de mandarina 'Fortune' curados y almacenados en frío, se indujo en el flavedo ni en el albedo de los frutos de 'Navelate' en respuesta al tratamiento con etileno. En este grupo se incluyen un gen que codifica una AOS y otros correspondientes a una CAT, una SOD, dos APX, una GST u otras proteínas, como 4 nodulinas o una metalotioneína, que se han relacionado con el estrés oxidativo. Otros genes que protegen a las plantas frente a la acumulación de ROS se indujeron en el flavedo y/o albedo en respuesta al tratamiento con etileno pero no modificaron su expresión en respuesta al calor o a la combinación de calor y frío. Entre ellos, se encontraron diversos genes que codifican GST cuya expresión también se indujo en el flavedo y el albedo de los frutos de tratados con 1-MCP almacenados 14 días en aire. Aunque no se conoce con exactitud la función de estas proteínas, se han relacionado con la eliminación de ROS, con la conjugación de fenilpropanoides para ser transferidos a las vacuolas y con la del IAA disminuyendo su contenido en forma libre (Zhou y Goldsbrough, 1993; Mueller *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2003). Cabe señalar que en el albedo de estos últimos frutos, las proteínas GST fueron muy abundantes. Sin embargo, solamente 8 de un total de 22, se indujeron también en el albedo de los frutos de 'Navelate' recién acondicionado con la hormona. Aunque la regulación de este tipo de enzimas por etileno ya ha sido descrita en plantas de *A. thaliana* (Mang *et al.*, ; Lorenzo *et al.*, 2003), diferentes estudios han comprobado que existe una gran diversidad de mecanismos de regulación entre los miembros de esta familia de proteínas, algunas de las cuales pueden estar reguladas por otras hormonas como el ácido jasmónico, el ácido salicílico o el ABA (Moons, 2005). El conjunto de estos resultados sugiere que aunque el sistema antioxidante parece estar implicado tanto en el efecto protector del curado y del tratamiento con etileno frente al desarrollo de los 'daños de frío' y del 'colapso de la corteza', los mecanismos que se activan para evitar la acumulación de ROS en cada uno de estos tratamientos son diferentes. Además, algunos de ellos están regulados por etileno mientras que otros podrían ser independientes de esta hormona.

En los frutos cítricos se ha comprobado que la producción de etileno aumenta durante curado, antes de transferir los frutos al frío (Holland, 1998). Por lo tanto, cabría esperar que muchas de las respuestas que se inducen durante este tratamiento fueran dependientes de esta hormona. Sin embargo, menos del 12% de los genes que aumentaron su expresión en el flavedo de los frutos de 'Fortune' a los 3 días de exposición a 37 °C en la micromatriz '7K' y '12K', lo hicieron también en el flavedo y/o albedo de los frutos de 'Navelate' tratados 4 días con etileno (Anexo IV Tabla 76 y Tabla 77). Entre ellos, se encontraron genes con funciones muy diversas como una HSP70 asociada a membrana plasmática, una GST o diversos factores de transcripción como un WRKY o un MYC, aunque en ningún caso se observó un grupo de genes claramente definido de la misma familia o implicados en una misma ruta metabólica.

Aunque la producción de etileno en los frutos cítricos aumenta con el desarrollo de 'daños de frío' durante el almacenamiento en frío y se ha sugerido que dicho incremento podría constituir un mecanismo de protección para tratar de frenar el desarrollo de la lesión causada por este tipo de estrés (Lafuente *et al.*, 2001b), el porcentaje de genes que en ambas

micromatrices se indujeron en respuesta al frío ‘per se’ en los frutos de ‘Fortune’ y que a su vez aumentaron su expresión en el flavedo o el albedo de los frutos de ‘Navelate’ tratados 4 días con etileno fue reducido. Así, en ambas micromatrices aproximadamente menos del 10 y 15% de los genes inducidos en los frutos sin acondicionar se indujeron en el flavedo y el albedo de los frutos de ‘Navelate’ en respuesta al tratamiento con etileno, respectivamente. (Anexo IV Tabla 76 y Tabla 77). Entre ellos, en la micromatriz ‘12K’ se encontró un elevado número de genes que codifican oxidorreductasas con dominio de unión a FAD, incluyendo una proteína NEC5, una ácido tetrahidrocanabinólico sintasa y diversas CPRD2. La expresión de estos genes aumentó más de 6 veces específicamente en respuesta al frío ‘per se’ en el flavedo de los frutos de mandarina ‘Fortune’ y al menos 1,7 en el flavedo y el albedo de los frutos de ‘Navelate’ tratados 4 días con etileno. Además, todos ellos también se indujeron, y en mayor grado, en los dos tejidos de los frutos tratados con 1-MCP almacenados 14 días en aire, que son los que mostraron el mayor ICC y una producción de etileno elevada. En el albedo de estos últimos frutos, destaca la proteína NEC5 (unigen 5894), que se indujo 32 veces, y dos CPRD2 (unigenes 805 y 3167), que aumentaron 8 veces su expresión con respecto a la de los frutos RTC. Hasta el momento no se conoce la función de estas proteínas en las plantas ni su posible relación con el etileno. La activación de otros genes que codifican proteínas CPRD se ha relacionado con el estrés hídrico pero además se ha comprobado que algunos de ellos también se inducen en respuesta al tratamiento con ABA y por el estrés salino (Iuchi *et al.*, 1996). Sin embargo, a diferencia de los resultados del presente trabajo, ninguno de los genes analizados por Iuchi *et al.* (1996) en frijoles se indujeron en respuesta al frío o al calor. Teniendo en cuenta que estos genes no modificaron su expresión en el flavedo de los frutos de mandarina ‘Fortune’ almacenados en frío previamente curados, estas proteínas parecen estar más relacionadas con el daño y su regulación podría ser dependiente de etileno.

En el presente trabajo se ha observado que el curado tiene un efecto muy marcado en la expresión de genes que codifican lipasas, evitando su inducción durante el almacenamiento en frío. Al estudiar la expresión de este grupo de genes inducidos de forma específica en respuesta al frío se observó que la mayoría no modificaron su expresión en el flavedo ni en el albedo de los frutos de ‘Navelate’ tratados 4 días con etileno. Así, en la micromatriz ‘12K’ destaca un gen que codifica una PLD (unigen 4878) que se indujo 5 veces en respuesta al frío ‘per se’ y 3 veces en el albedo de los frutos tratados con 1-MCP almacenados 14 días en aire. Este gen, además, no modificó su expresión en respuesta al calor, a la combinación de calor y frío ni al tratamiento con etileno. Este hecho indica que ambos tratamientos tienen un efecto protector frente a procesos de degradación de fosfolípidos, que constituirían una respuesta asociada al desarrollo tanto de los ‘daños de frío’ en la mandarina ‘Fortune’ como del ‘colapso de la corteza’ en los frutos de ‘Navelate’. No obstante, también se encontraron otros genes que codifican lipasas inducidas en el albedo de los frutos tratados con 1-MCP almacenados 14 días en aire, y en menor número inducidos en el flavedo y/o albedo de los frutos de ‘Navelate’ recién acondicionados con etileno, cuya expresión no varió en respuesta al calor, al frío o a la combinación de calor y frío, lo que indica que podrían ser respuestas específicas de condiciones que favorecen el ‘colapso de la corteza’.

En el albedo de los frutos tratados con 1-MCP al final de su almacenamiento se encontró una abundancia de genes inducidos que codifican enzimas de degradación de proteínas. Algunos de ellos están implicados en los procesos de degradación de proteínas almacenadas en las vacuolas como los que codifican cistein proteasas (Alonso y Granell, 1995). Este último grupo de enzimas se ha relacionado con la regulación de procesos de PCD (Solomon *et al.*, 1999). En cítricos, Lliso *et al.* (2007) observaron en el albedo de frutos del híbrido ‘Murcott’ que la actividad cistein proteasa aumentaba de forma

significativa en respuesta al frío (4 °C), sugiriendo un posible papel de estas enzimas en la regulación y reciclado de proteínas dañadas durante la aclimatación al frío. Estos procesos se producirían de forma coordinada con los procesos de síntesis de nuevas proteínas (Grudkowska y Zagdanska, 2004). Los genes que codifican cistein proteasas inducidos en la micromatriz '12K' a los 14 días en el albedo de los frutos tratados con 1-MCP, sin embargo, no modificaron su expresión en respuesta al frío en los frutos de 'Fortune'. No obstante, se encontraron 3 genes de esta familia inducidos específicamente en los frutos almacenados 30 días directamente a 2 °C cuya expresión no varió en el flavedo ni el albedo de los frutos de 'Navelate' en ninguna condición de almacenamiento. Estos resultados sugieren que estas proteínas actúan de forma específica en uno u otro tipo de alteración y que sus mecanismos de regulación son diferentes. Otros genes de degradación de proteínas que se indujeron en el albedo de los frutos con el mayor ICC codifican enzimas del complejo de ubiquitinación y proteasoma. Así, se encontraron un total de 33 genes y, a excepción de uno de ellos que codifica una ubiquitin proteasa, ninguno se indujo en respuesta al frío 'per se' en el flavedo de los frutos de 'Fortune' a los 30 días de almacenamiento a 2 °C. Asimismo, en estos últimos frutos fueron 6 los genes inducidos por el el frío y todos ellos codifican proteínas de ubiquitinación. Además, ninguno se indujo en respuesta al tratamiento con etileno en el flavedo ni albedo de los frutos de 'Navelate'. El hecho de que los procesos de degradación de proteínas parezcan estar más activados durante el desarrollo del 'colapso de la corteza' en los frutos de 'Navelate' que durante el de los 'daños de frío' en los frutos de 'Fortune' almacenados directamente en frío podría estar influenciado por la menor proporción de tejido dañado en estos últimos. No obstante, en la mayoría de los casos, éstos parecen estar regulados por una vía no dependiente de etileno.

Algunos de los genes que más se indujeron en respuesta al frío 'per se' en las dos micromatrices de cDNA codifican transportadores ABC. Estos genes también fueron muy abundantes entre los que se indujeron en el albedo de los frutos tratados con 1-MCP almacenados 14 días en aire. Muchos de ellos, además, se indujeron en estas dos condiciones de almacenamiento y también en respuesta al tratamiento con etileno en el flavedo y/o albedo en los frutos de 'Navelate' recién acondicionados. Sin embargo, en respuesta al calor o a la combinación de calor y frío en su mayoría no variaron su expresión. Los resultados indican que esta familia de transportadores transmembrana, que participan en procesos de detoxificación (Yazaki, 2005; Yazaki, 2006), podrían jugar un papel importante en la protección de ambas alteraciones, probablemente por una vía dependiente de etileno.

El porcentaje de genes en ambas micromatrices con mayor expresión en los frutos curado y almacenados en frío con respecto a los frutos sin acondicionar (C+F>F), que a su vez se reprimieron a los 4 y 14 días en el flavedo o en el albedo de los frutos tratados con etileno o con 1-MCP fue pequeño (Anexo IV Tabla 76 y Tabla 77). Asimismo, se encontraron pocos genes más expresados en los frutos almacenados directamente en frío respecto a los previamente curados (F>C+F), que disminuyeran su expresión a los 4 días en los frutos tratados con etileno o con 1-MCP. Sin embargo, en la micromatriz '7K' un 26% de los genes que se expresaron más en respuesta al frío que a la combinación de calor y frío, reprimieron su expresión en el albedo de los frutos de 'Navelate' tratados con 1-MCP al final de su almacenamiento (14 días); mientras que un 11% lo hicieron en el flavedo de estos frutos. En la micromatriz '12K', estos porcentajes fueron más reducidos (8% y 6%, respectivamente) (Anexo IV Tabla 76 y Tabla 77). Así, reprimidos en el albedo en ambas micromatrices, se encontró un número alto de genes que codifican proteínas cor15 y LEA. Otros codifican enzimas de pared celular, como una pectato liasa, una poligalacturonasa, una expansina o una celulosa sintasa. Además, reprimidos también en el

albedo se encontraron genes que codifican enzimas de degradación de carbohidratos como una enzima de degradación de almidón o una invertasa. Esta última, se reprimió en la micromatriz '7K' en respuesta a la combinación de calor y frío lo que podría relacionarse con la idea de que el curado favorece el mantenimiento del contenido de sacarosa durante la exposición de los frutos al frío (Holland *et al.*, 1999). La represión de estos genes de degradación de pared celular en los frutos tratados con 1-MCP concordaría con resultados previos de microscopía obtenidos en el laboratorio que indican que estos frutos mantenían la estructura de sus paredes celulares. Teniendo en cuenta este hecho y que la producción de etileno aumenta con el desarrollo de los 'daños de frío', aunque la mayoría de estos genes disminuyeron su expresión a los 4 días de tratamiento con etileno en el flavedo y el albedo de los frutos de 'Navelate', no podemos descartar la posibilidad de que se hubiesen inducido a tiempos más cortos de tratamiento disminuyendo posteriormente. El conjunto de estos resultados sugieren que la expresión de estos genes está más asociada al desarrollo de 'daños de frío' que al 'colapso de la corteza'.

La comparación del perfil de expresión de los factores de transcripción aislados de la biblioteca de cDNA y analizados por hibridación Northern, reveló que algunos de ellos, como el factor WRKY correspondiente al clon C06009F11, podrían participar en la protección frente al desarrollo de 'daños de frío' y del 'colapso de la corteza' mientras que otros, como los 2 WRKYs restantes, en relación al curado, o el factor HSF, en relación al acondicionamiento con etileno, eran específicos de cada una de estas alteraciones. Asimismo, se estudió su relación en respuesta al estrés por herida en los frutos de mandarina 'Fortune'. Así, algunos de los que se indujeron en respuesta al frío 'per se', como el factor 'zinc finger' LSD1, relacionado con la muerte celular programada (Wang *et al.*, 2005a), o el factor MYC, relacionado con diversos tipos de estrés como el de deshidratación (Dai *et al.*, 2007), aumentó también su expresión en respuesta a la herida y no varió en ninguna condición de almacenamiento en los frutos de 'Navelate'. Por otro lado, aunque muchos factores WRKY se han relacionado con la defensa de las plantas frente al estrés por herida (Hara *et al.*, 2000), ninguno de los analizados por hibridación Northern modificó su expresión en el flavedo de frutos de mandarina 'Fortune' heridos. Numerosos trabajos indican la existencia de elementos comunes ('crosstalk') entre las rutas de señalización activadas en respuesta a diferentes tipos de estrés en las plantas (Fujita *et al.*, 2006). Los resultados del presente trabajo, de acuerdo a esta idea, sugieren que algunas de las respuestas de defensa que se activan en respuesta al frío y que implican la participación de factores de transcripción, son comunes a las que se producen en respuesta al estrés de herida o el 'colapso de la corteza' mientras que otras son específicas de cada una de estas situaciones.

En resumen, los resultados obtenidos en este trabajo ponen de manifiesto que los mecanismos asociados al efecto protector del curado evitando la incidencia de 'daños de frío' en la mandarina 'Fortune' son en su mayoría independientes de etileno. Sin embargo, muchas de las respuestas inducidas por el frío 'per se' podrían estar reguladas por esta hormona. Asimismo, algunas de las respuestas asociadas al daño originado por el estrés de frío son comunes a las que se producen por el 'colapso de la corteza', aunque la mayoría son específicas de cada una de estas alteraciones.

CONCLUSIONES

1. La eficacia del curado reduciendo la incidencia de ‘daños de frío’ en frutos de mandarina ‘Fortune’ parece estar más relacionada con su efecto sobre la expresión de genes implicados en la degradación de lípidos, evitando su inducción durante el almacenamiento en frío (2 °C), que con cambios en la expresión de genes que codifican enzimas del metabolismo de ácidos grasos que afectan al grado de insaturación de los mismos o a la síntesis de ceras.
2. El conjunto de resultados sugiere que el estrés oxidativo puede favorecer el desarrollo de ‘daños de frío’ en los frutos cítricos y que el tratamiento previo de curado es capaz de desencadenar respuestas de defensa que previenen la formación de especies tóxicas o que reducen su impacto una vez formadas. Asimismo, en la biblioteca de cDNA ‘FlavCurFr1’, que reúne las etapas del proceso que conllevan al aumento de tolerancia al frío, se encontró una elevada representación de genes que codifican proteínas implicadas en el mantenimiento de la homeóstasis de metales y otros del sistema antioxidante.

En respuesta al frío ‘per se’ también se indujeron genes relacionados con el estrés oxidativo, incluyendo genes que participan en la biosíntesis de tocoferol. Además, se produjo una activación de genes *LOX* y otros implicados en la biosíntesis de ácido jasmónico. Estos genes actuarían en la activación de respuestas de defensa para tratar de frenar la propagación de la lesión asociada a la acumulación de ROS. La activación de genes de degradación de lípidos, como PLDs, y de los genes que codifican las oxidoreductasas dependientes de FAD CPRD2 y nectarina 5 favorecerían la acumulación de ROS.

3. El curado y posterior almacenamiento en frío, además, favoreció la expresión de genes que codifican otras proteínas de respuesta a estrés en plantas, entre los que destacaron quitinasas, glucanasas y otros implicados en la biosíntesis de flavonoides y de diversos compuestos metilados de la ruta de fenilpropanoides mediante la inducción de OMTs. En los frutos almacenados directamente a 2 °C se encontró una abundancia de genes *cor15* y otros que codifican proteínas LEA5, CYP79A2 y transportadores ABC, muchos de ellos relacionados con la tolerancia al estrés oxidativo. Otros procesos asociados al desarrollo de ‘daños de frío’ incluyen la degradación de lípidos, la de proteínas y componentes de la pared celular.
4. Del análisis transcriptómico con las micromatrices de cDNA y del análisis Northern se deduce que varios factores de transcripción de las familias NAM/NAC, WRKY, MYB/MYC y otros genes implicados en la señalización, como EIN4 o EIN3, o que codifican factores de transcripción de respuesta al etileno, podrían estar asociados al efecto beneficioso del curado. Por otro lado, la exposición directa al frío también favoreció la expresión de factores de transcripción de respuesta a etileno, HSFs, YABBYs y un ARF.
5. El estudio transcriptómico de los mecanismos implicados en la tolerancia al ‘colapso de la corteza’ inducida por el acondicionamiento con etileno en naranjas ‘Navelate’ indica que los cambios más relevantes se produjeron al finalizar el tratamiento y a los 14 días en los frutos previamente tratados con 1-MCP, que presentaron daños muy evidentes. En ambas condiciones el albedo fue el tejido más afectado.

6. El etileno aplicado a dosis altas, pero no letales, favorece la inducción de señales de defensa que podrían reducir la incidencia del ‘colapso de la corteza’. Entre estas señales se incluye la inducción del transporte electrónico, de mecanismos relacionados con el estrés oxidativo y del metabolismo de derivados de aminoácidos, incluyendo el de fenilpropanoides. Además, el etileno indujo procesos biológicos relacionados con la síntesis de etileno y ácido jasmónico. A pesar de que se produjo una disminución generalizada de la expresión de genes inducidos por etileno al transferir los frutos a aire, la de los implicados en la síntesis de esta última hormona se mantuvo alta hasta finalizar el almacenamiento (14 días).
7. El ‘colapso de la corteza’ en los frutos tratados con 1-MCP aumentó rápidamente después de 4 días de almacenamiento en aire. En estos frutos se detectó un aumento en la expresión de genes que codifican GSTs, reflejando la acumulación de ROS. Además, se observó la represión de genes relacionados con traducción y transcripción y de otros que codifican proteínas de estrés, como varias del metabolismo de fenilpropanoides, cor15 o LEA.
8. Muchos de los cambios en expresión génica que se produjeron a los 14 días en los frutos tratados con 1-MCP fueron muy acusados. Muchos de éstos fueron comunes a los inducidos por el tratamiento con etileno, hecho que podría estar relacionado con la inducción de genes implicados en su síntesis y de otros que codifican receptores de etileno y proteínas implicadas en su señalización. La expresión de otros genes que no se inducían por etileno podría asociarse al daño del ‘colapso de la corteza’, incluyendo genes de degradación de proteínas y lípidos, así como otros implicados en la traducción y transcripción. Destaca también la inducción de un elevado número de genes del estrés oxidativo, principalmente de GSTs. Aunque algunos de éstos se indujeron por el tratamiento con etileno, la inducción de la mayoría se produjo específicamente en estos frutos.
9. Aunque el curado induce protección cruzada frente al ‘daño de frío’ y el etileno frente al ‘colapso de la corteza’, y que tanto durante el tratamiento de curado como durante el almacenamiento en frío se favorece la biosíntesis de etileno, los mecanismos inducidos por estos tratamientos son en su mayoría diferentes. La combinación de calor y frío y el tratamiento con etileno tuvieron un efecto marcado en la inducción de procesos del metabolismo de fenilpropanoides y en la activación de respuestas de defensa al estrés oxidativo, aunque los genes implicados en estos procesos fueron diferentes en ambos tratamientos.

Entre los genes inducidos por etileno y cuya expresión aumentó en los frutos que presentan ‘daños de frío’ y ‘colapso de la corteza’ destacan varios que codifican las oxidoreductas dependientes de FAD CPRD2 y una necatarina 5, así como otros que codifican transportadores ABC y quitinasas.

BIBLIOGRAFÍA

- Afek, U. y Szejnberg, A. (1988) Accumulation of scoparone, a phytoalexin associated with resistance of citrus to *Phytophthora citrophthora*. *Phytopathology* 78: 1678-1682.
- Agustí, J., Zapater, M., Iglesias, D. J., Cercós, M., Tadeo, F. R., y Talón, M. (2007) Differential expression of putative 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenases and abscisic acid accumulation in water stressed vegetative and reproductive tissues of citrus. *Plant Science* 172 (1): 85-94.
- Agustí, M. y Almela, V. (1989) El cultivo de la mandarina Fortune en España. Problemas y perspectivas. *Fruticultura Profesional* 25: 39-48.
- Agustí, M., Almela, V., Juan, M., Alferez, F., Tadeo, F. R., y Zacarias, L. (2001) Histological and physiological characterization of rind breakdown of 'Navelate' sweet orange. *Annals of Botany* 88 (3): 415-422.
- Agustí, M., Almela, V., Juan, M., Mesejo, C., y Martínez-Fuentes, A. (2003) Rootstock influence on the incidence of rind breakdown in 'Navelate' sweet orange. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 78 (4): 554-558.
- Al-Shahrour, F., az-Uriarte, R., y Dopazo, J. (2004) FatiGO: a web tool for finding significant associations of Gene Ontology terms with groups of genes. *Bioinformatics* 20 (4): 578-580.
- Albrigo, L. G. (1972b) Distribution of stomata and epicuticular wax on oranges as related to stem end rind breakdown and water loss. *Journal of American Society of Horticultural Science* 97: 220-223.
- Albrigo, L. G. (1972a) Variation in surface wax on oranges from selected groves in relation to fruit moisture loss. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 85: 262-263.
- Albrigo, L. G. y Brown, G. E. (1970) Orange peel topography as affected by a preharvest plastic spray. *HortSciencia* 5: 470-472.
- Alferez, F., Agustí, M., y Zacarias, L. (2003) Postharvest rind staining in Navel oranges is aggravated by changes in storage relative humidity: effect on respiration, ethylene production and water potential. *Postharvest Biology and Technology* 28 (1): 143-152.
- Alferez, F. y Burns, J. K. (2004) Postharvest peel pitting at non-chilling temperatures in grapefruit is promoted by changes from low to high relative humidity during storage. *Postharvest Biology and Technology* 32 (1): 79-87.
- Alferez, F., Lluch, Y., y Burns, J. K. (2008) Phospholipase A₂ and postharvest peel pitting in citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology* (in press)
- Alferez, F., Sala, J. M., Sanchez-Ballesta, M. T., Mulas, M., Lafuente, M. T., y Zacarias, L. (2005a) A comparative study of the postharvest performance of an ABA-deficient mutant of oranges I. Physiological end quality aspects. *Postharvest Biology and Technology* 37: 222-231.
- Alferez, F. y Zacarias, L. (2001) Postharvest pitting in Navel oranges at non-chilling temperature: influence of relative humidity. *Proceedings of 4th International Conference on Postharvest. Acta Horticulturae*. 553: 307-308.
- Alferez, F., Zacarias, L., y Burns, J. K. (2005b) Low relative humidity at harvest and before storage at high humidity influence the severity of postharvest peel pitting in citrus. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 130 (2): 225-231.
- Almela, V., Segura, V., Gariglio, N., González-Primo, D., Juan, M., y Agustí, M. (2000) El colapso de la corteza de las naranjas Navel. *Phytoma* 119: 43-52.
- Alonso, J. M. y Granell, A. (1995) A putative vacuolar processing protease is regulated by ethylene and also during fruit ripening in citrus fruit. *Plant Physiology* 109: 541-547.

Andersson, M. X., Kourtchenko, O., Dangl, J. L., Mackey, D., y Ellerström, M. (2006) Phospholipase-dependent signalling during the AvrRpm1- and AvrRpt2-induced disease resistance responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 47 (6): 947-959.

Antikainen, M. y Griffith, M. (1997) Antifreeze protein accumulation in freezing-tolerant cereals. *Physiologia Plantarum* 99: 423-432.

Apel, K. y Hirt, H. (2004) Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55: 373-399.

Ariizumi, T., Kishitani, S., Inatsugi, R., Nishida, I., Murata, N., y Toriyama, K. (2002) An increase in unsaturation of fatty acids in phosphatidylglycerol from leaves improves the rates of photosynthesis and growth at low temperatures in transgenic rice seedlings. *Plant and Cell Physiology* 43 (7): 751-758.

Artes, F. (1999) Innovaciones tecnológicas para mejorar la calidad de la naranja y mandarina en la postrecolección. *IV Congreso de Citricultura*. La Plana.Edit.Promociones LAV. 181-205.

Artes, F. (1995) Revisión: Innovaciones en los tratamientos físicos modulados para preservar la calidad de los productos hortofrutícolas en la postrecolección. II. Tratamientos térmicos cíclicos. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos* 35: 139-149.

Artes, F. (2000) Tratamientos alternativos para preservar mejor la calidad de los cítricos refrigerados. *Levante Agrícola* 352: 229-238.

Artes, F., Escriche, A., y Marín, J. A. (1993) Treating 'Primofiori' lemons in cold storage with intermittent warming and carbon dioxide. *HortScience* 28: 819-821.

Bajwa, B. E. y Anjum, F. M. (2007) Improving storage performance of *Citrus reticulata* Blanco mandarins by controlling some physiological disorders. *International Journal of Food Science and Technology* 42 (4): 495-501.

Baker, J., Steele, C., y Dure, L. (1988) Sequence and characterization of 6 Lea proteins and their genes from cotton. *Plant Molecular Biology* 11: 277-291.

Ballester, A. R. (2007) Resistencia frente a la infección por *Penicillium digitatum* durante la postcosecha de los frutos cítricos. Bases moleculares y metabolismo de fenilpropanoides. Tesis Doctoral.Universidad de Valencia, España.

Ben Yehoshua, S. y Biggs, R. H. (1970) Effects of Iron and Copper Ions in Promotion of Selective Abscission and Ethylene Production by Citrus Fruit and the Inactivation of Indoleacetic Acid. *Plant Physiology* 45 (5): 604-607.

Ben Yehoshua, S., Peretz, J., Moran, R., Lavie, B., y Kim, J. J. (2001) Reducing the incidence of superficial flavedo necrosis (noxan) of 'Shamouti' oranges (*Citrus sinensis*, Osbeck). *Postharvest Biology and Technology* 22 (1): 19-27.

Ben-Amor, M., Flores, B., Latché, A., Bouzayen, M., Pech, J. C., y Romojaro, F. (1999) Inhibition of ethylene biosynthesis by antisense ACC oxidase RNA prevents chilling injury in Charentais cantaloupe melons. *Plant Cell and Environment* 22: 1579-1586.

Benaroudj, N. y Goldberg, A. (2006) Proteasomes and their associated ATPases: A destructive combination. *Journal of Structural Biology* 146 (1-2): 2-10.

Bender, J. y Fink, G. R. (1994) AFC1, a LAMMER kinase from *Arabidopsis thaliana*, activates STE12-dependent processes in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (25): 12105-12109.

- Berberich, T., Harada, M., Sugawara, K., Kodama, H., Iba, K., y Kusano, T. (1998) Two maize genes encoding omega-3 fatty acid desaturase and their differential expression to temperature. *Plant Molecular Biology* 36: 297-306.
- Berkel, J. V., Salamini, F., y Gebhardt, C. (1994) Transcripts accumulating during cold storage of potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers are sequence related to stress-responsive genes. *Plant Physiology* 104: 445-452.
- Blankenship, S. M. y Dole, J. M. (2002) 1-Methylcyclopropene: a review. *Postharvest Biology and Technology* 28: 1-25.
- Blée, E. (2002) Impact of phyto-oxylipins in plant. *Trends in Plant Science* 7(7): 315-321.
- Bohnert, H. J., Nelson, D. E., y Jensen, R. G. (1995) Adaptations to Environmental Stresses. *The Plant Cell* 7 (7): 1099-1111.
- Bol, J. F., Linthorst, H. J. M., y Cornelissen, B. J. C. (1990) Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection. *Annual Review of Phytopathology* 28: 113-138.
- Boller, T. (1988) Ethylene and the regulation of antifungal hydrolases in plants. *Surveys of Plant Molecular and Cell Biology* 5, Miflin, B.J., (ed.), Oxford: Oxford University Press. pp. 145-174.
- Boller, T., Gehri, A., Mauch, F., y Vögeli, U. (1983) Chitinase in bean leaves: induction by ethylene, purification, properties, and possible function. *Planta* 157: 22-31.
- Borochoy, A. y Woodson, W. R. (1989) Physiology and biochemistry of flower petal senescence. *Horticultural Reviews* 11: 15-43.
- Boter, M., Ruiz-Rivero, O., Abdeen, A., y Prat, S. (2004) Conserved MYC transcription factors play a key role in jasmonate signaling both in tomato and Arabidopsis. *Genes and Development* 18 (3): 1577-1591.
- Bowman, J. (2000) The YABBY gene family and abaxial cell fate. *Current Opinion in Plant Biology* 3: 17-22.
- Brader, G., Mikkelsen, M. D., Halkier, B. A., y Tapio Palva, E. (2006) Alterating glucosinolate profiles modulates disease resistance in plants. *The Plant Journal* 46 (5): 758-767.
- Bray, E. A. (1993) Molecular responses to water-deficit. *Plant Physiology* 103: 1035-1040.
- Breitkreutz, A., Boucher, L., Breitkreutz, B. J., Sultan, M., Jurisica, I., y Tyers, M. (2003) Phenotypic and transcriptional plasticity directed by a yeast mitogen-activated kinase network. *Genetics* 165 (3): 997-1015.
- Britton, G., Lianaen-Jensen, S., y Pfander, H. (1998) Overview of carotenoid biosynthesis.
- Brodersen, P., Petersen, M., Bjorn-Nielsen, H., Zhu, S., Newman, M. A., Shokat, K. M., Rietz, S., Parker, J., y Mundy, J. (2006) Arabidopsis MAP kinase 4 regulates salicylic acid- and jasmonic acid/ethylene-dependent responses via EDS1 and PAD4. *Plant Journal for Cell and Molecular Biology* 47 (4): 532-546.
- Brogliè, K. E., Biddle, P., Cressman, R., y Brogliè, R. (1989) Functional analysis of DNA sequences responsible for ethylene regulation of a bean chitinase promoter in transgenic tobacco. *The Plant Cell* : 599-607.
- Buchanan-Wollaston, V., Earl, S., Harrison, E., y et al. (2003) The molecular analysis of leaf senescence - a genomics approach. *Plant Biotechnology* 1: 3-22.

- Cai, Q., Moore, G. A., y Guy, C. L. (1995) An unusual group 2 LEA gene family in citrus responsive to low temperature. *Plant Molecular Biology* 29: 11-23.
- Cairo, G., Tacchini, L., Pogliaghi, G., Anzon, E., Tomasi, A., y Bernelli-Zazzera, A. (1995) Induction of Ferritin Synthesis by Oxidative Stress. Transcriptional and post-transcriptional regulation by expansion of the "free" iron pool. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology* 270 (2): 700-703.
- Cajuste, J. F. y Lafuente, M. T. (2007) Ethylene-induced tolerance to non-chilling peel pitting as related to phenolic metabolism and lignin content in 'Navelate' fruit. *Postharvest Biology and Technology* 45: 193-203.
- Cajuste, J. F. y Lafuente, M. T. (2005) Phenylalanine-ammonio-lyase and accumulation of phenolic compounds in the ethylene-induced tolerance to rindstaining in 'Navelate' fruit. *Acta Horticulturae* 682: 1165-1170.
- Carmona, L., Zacarias, L., y Rodrigo, M. J. (2006) Efecto del acondicionamiento térmico en el color y acumulación de carotenoides en la piel de los frutos cítricos. En: *Innovaciones fisiológicas y tecnológicas de la maduración y post-recolección de frutas y hortalizas.*, Valero, D. y Serrano, M. (eds.), pp. 49-52.
- Carmona, L., Zacarias, L., y Rodrigo, M. J. (2007) Efecto de la temperatura de conservación en la síntesis y acumulación de carotenoides en frutos cítricos. *Acta V Congreso Iberoamericano de Tecnología Postcosecha y Agroexportaciones*, Orihuela. pp. 453-461.
- Carter, C. J. y Thornburg, R. W. (2004) Tobacco Nectarin V Is a Flavin-Containing Berberine Bridge Enzyme-Like Protein with Glucose Oxidase Activity. *Plant Physiology* 134: 460-469.
- Casas, A. y García-Bataller, L. (1986) Manchas en las naranjas Navelina. *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.* 26: 309-317.
- CFGP. (2006). Citrus Functional Genomics Project [On-line]. Disponible en: <http://bioinfo.ibmcp.upv.es/genomics/cfgpDB/>.
- Chalutz, E., Waks, J., y Schiffmann-Nadel, M. (1985) Reducing susceptibility of grapefruit to chilling injury during cold treatment. *HortScience* 20: 226-228.
- Chen, C. y Chen, Z. (2000) Isolation and characterization of two pathogen- and salicylic acid-induced genes encoding WRKY DNA-binding proteins in tobacco. *Plant Molecular Biology* 42: 387-396.
- Chen, S. R., Vaghchhipawala, Z., Li, W., Asard, H., y Dickman, M. B. (2004) Tomato phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase inhibits cell death induced by Bax and oxidative stresses in yeast and plants. *Plant Physiology* 135 (3): 1630-1641.
- Chen, X., Goodwin, S. M., Boroff, V. L., Liu, X., y Jenks, M. (2003) Cloning and characterization of the WAX2 gene of Arabidopsis involved in cuticle membrane and wax production. *The Plant Cell* 15 (5): 1170-1185.
- Close, T. J. (1997) Dehydrins: A commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiologia Plantarum* 100 (2): 291-296.
- Cohen, E. (1988) Commercial use of long-term storage of lemon with intermittent warming. *HortScience* 23 (2): 400
- Cohen, E., Shapiro, B., Shalom, Y., y Klein, J. D. (1994) Water-Loss - A Nondestructive Indicator of Enhanced Cell-Membrane Permeability of Chilling-Injured Citrus-Fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 119 (5): 983-986.

- Cohen, E., Shuali, M., y Shalom, Y. (1983) Effect of intermittent warming on the reduction of chilling injury of 'Villa franca' lemon fruit stored at cold temperature. *Journal of Horticultural Science* 58: 593-598.
- Collinge, D. B., Kragh, K. M., Mikkelsen, J. D., Nielsen, K. K., Rasmussen, U., y Vad, K. (1993) Plant Chitinases. *Plant Journal* 3 (1): 31-40.
- Conn, E. E. (1995) The world of phytochemicals. *Phytochemicals and Health* 15: 1-14.
- Cooper, W. C. y Ho, T. H. D. (1987) Intracellular localization of heat shock proteins in maize. *Plant Physiology* 84: 1197-1203.
- Cooper, W. C., Rasmussen, G. K., y Waldon, E. S. (1969) Ethylene Evolution Stimulated by Chilling in Citrus and Persea Sp. *Plant Physiology* 44 (8): 1194-1196.
- Creelman, R. y Mullet, J. E. (1997) Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 355-381.
- Cubells, M. (1998) Notaries, marriages and fortunes in the area around Toulouse. *Revue Historique* 608: 936-937.
- Dai, X., Xu, Y., Ma, Q., Xu, W., Wang, T., Xue, Y., y Chong, K. (2007) Overexpression of an R1R2R3 MYB Gene, OsMYB3R-2, Increases Tolerance to Freezing, Drought, and Salt Stress in Transgenic Arabidopsis. *Plant Physiology* 143 (4): 1739-1751.
- Davis, P. L. y Hofmann, R. C. (1973) Reduction of chilling injury of citrus fruits in cold storage by intermittent warming. *Journal of Food Science* 38: 871-873.
- Davletova, S., Rizhsky, L., Liang, H. J., Zhong, S. Q., Oliver, D. J., Coutu, J., Shulaev, V., Schlauch, K., y Mittler, R. (2005) Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of Arabidopsis. *The Plant Cell* 17 (1): 268-281.
- Desikan, R., Neill, S. J., y Hancock, J. T. (2000) Hydrogen peroxide-induced gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Free Radic. Biol. Med.* 28: 773-778.
- Ding, C. K., Wang, C. Y., Gross, K. C., y Smith, D. L. (2001) Reduction of chilling injury and transcript accumulation of heat shock proteins in tomato fruit by methyl jasmonate and methyl salicylate. *Plant Science* 161 (6): 1153-1159.
- Ding, C. K., Wang, C. Y., Gross, K. C., y Smith, D. L. (2002) Jasmonate and salicylate induce the expression of pathogenesis-related-protein genes and increase resistance to chilling injury in tomato fruit. *Planta* 214 (6): 895-901.
- Dixon, D. P., Laphorn, A., y Edwards, R. (2002) Plant glutathione transferases. *Genome Biology* 3: reviews: 3004.1-3004.10.
- Dixon, R. A. y Paiva, N. L. (1995) Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *The Plant Cell* 7 (7): 1085-1097.
- Dong, J. X., Chen, C. H., y Chen, Z. X. (2003) Expression profiles of the Arabidopsis WRKY gene superfamily during plant defense response. *Plant Molecular Biology* 51 (1): 21-37.
- Dörmann, P. (2007) Functional diversity of tocochromanols in plants. *Planta - Review* 225: 269-276.
- Dou, H. (2004) Effect of coating application on chilling injury of grapefruit cultivars. *HortScience* 39 (3): 558-561.

Dou, H., Jones, S., y Ritenour, M. (2005) Influence of 1-MCP application and concentration on post-harvest peel disorders and incidence of decay in citrus fruit. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 80: 786-792.

Drolet, G., Dumbroff, E. B., Legge, R. L., y Thompson, J. E. (1986) Radical scavenging properties of polyamines. *Phytochemistry* 25: 367-371.

Du, L. y Chen, Z. (2000) Identification of genes encoding receptor-like kinases as possible targets of pathogen- and salicylic acid-induced WRKY DNA-binding proteins in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 24: 837-847.

Dunwell, J. M., Khuri, S., y Gane, P. J. (2000) Microbial relatives of the seed storage proteins of higher plants: conservation of structure and diversification of function during evolution of the cupin superfamily. *Microbiol Mol Biol Rev* 64 (1): 153-179.

Duxbury, C. L., Legge, R. L., Paliyath, G., y Thompson, J. E. (1991) Lipid breakdown in smooth microsomal membranes from bean cotyledons alters membrane proteins and induces proteolysis. *Journal of Experimental Botany* 42: 103-112.

Ebel, J. (1998) Oligoglucoside elicitor-mediated activation of plant defense. *Bioassay* 20: 569-576.

Echeverria, E., Burns, J., y Felle, H. (1992) Compartmentation and cellular conditions controlling sucrose breakdown in mature acid lime fruits. *Phytochemistry* 31 (12): 4091-4092.

Echeverria, E. y Valich, J. (1988) Carbohydrate and Enzyme Distribution in Protoplasts from Valencia Orange Juice Sacs. *Phytochemistry* 27 (1): 73-76.

El-Otmani, M., Arpaia, M. L., Coggins Jr, Ch. W., Pehrson Jr, J. E., y O'Connell, N. V. (1989) Developmental changes in Valencia oranges fruit epicuticular wax in relation to fruit position on tree. *Scientia Horticulturae* 41: 69-81.

Erkan, M., Pekmezci, M., y Wang, C. Y. (2005) Hot water and curing treatments reduce chilling injury and maintain post-harvest quality of 'Valencia' oranges. *International Journal of Food Science and Technology* 40 (1): 91-96.

Espinoza, C., Medina, C., Somerville, S., y Arce-Johnson, P. (2007) Senescence-associated genes induced during compatible viral interactions with grapevine and *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 58 (12): 3197-3212.

Eugelm, T., Rushton, P. J., Robatzek, S., y Somssich, I. E. (2005) The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends in Plant Science* 5 (5): 199-206.

Eugelm, T., Rushton, P. J., Schmelzer, E., Hahlbrock, K., y Somssich, I. E. (1999) Early nuclear events in plant defence signalling: rapid gene activation by WRKY transcription factors. *Embo Journal* 18: 4689-4699.

Fan, J., Gao, X., Yang, Y. W., y Deng, W. (2007) Molecular Cloning and Characterization of a NAC-like Gene in "Navel" Orange fruit Response to Postharvest Stresses. *Plant Molecular Biology Reporter* 25: 145-153.

Fedoroff, N. (2006) Redox Regulatory Mechanisms in Cellular Stress Responses. *Annals of Botany* 98: 289-300.

Fischer, A. M. (2006). Nutrient remobilization during leaf senescence. En: *Senescence Processes in Plants - Annual Plant Reviews* S. Gan (eds.), Vol 26, pp. 88-106.

Forment, J., Gadea, J., Huerta, L., Abizanda, L., Agusti, J., Alamar, S., Alos, E., Andres, F., Arribas, R., Beltran, J. P., Berbel, A., Blazquez, M. A., Brumos, J., Canas, L. A., Cercos, M., Colmenero-Flores, J. M., Conesa, A., Estables, B., Gandia, M., Garcia-Martinez, J. L., Gimeno, J., Gisbert, A., Gomez, G., Gonzalez-Candelas, L., Granell, A., Guerri, J., Lafuente, M. T., Madueno, F., Marcos, J. F., Marques, M. C., Martinez, F., Martinez-Godoy, M. A., Miralles, S., Moreno, P., Navarro, L., Pallas, V., Perez-Amador, M. A., Perez-Valle, J., Pons, C., Rodrigo, I., Rodriguez, P. L., Royo, C., Serrano, R., Soler, G., Tadeo, F., Talon, M., Terol, J., Trenor, M., Vaello, L., Vicente, O., Vidal, C., Zacarias, L., y Conejero, V. (2005) Development of a citrus genome-wide EST collection and cDNA microarray as resources for genomic studies. *Plant Molecular Biology* 57 (3): 375-391.

Fowler, S. y Thomashow, M. F. (2002) Arabidopsis transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. *The Plant Cell* 14: 1675-1690.

Foyer, C. H., Descourvières, P., y Kunert, K. J. (1994) Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants. *Plant Cell and Environment* 17: 507-523.

Franks, R. G., Wang, C. X., Levin, J. Z., y Liu, Z. C. (2002) SEUSS, a member of a novel family of plant regulatory proteins, represses floral homeotic gene expression with LEUNIG. *Development* 129 (1): 253-263.

Frova, C. (2003) Minireview. The plant glutathione transferase gene family: genomic structure, functions, expression and evolution. *Physiologia Plantarum* 119 (4): 469-479.

Fry, S. C., Miller, J. G., y Dumville, J. C. (2002) A proposal role for copper ions in cell wall loosening. *Plant and Soil* 247: 57-67.

Fu, Y., Porres, J. M., y Lei, X. G. (2001) Comparative impacts of glutathione peroxidase-1 gene knockout on oxidative stress induced by reactive oxygen and nitrogen species in mouse hepatocytes. *Biochemical Journal* 359: 687-695.

Fujii, H., Shimada, T., Sugiyama, A., Nishikawa, F., Endo, T., Nakano, M., Ikoma, Y., Shimizu, T., y Omura, M. (2007) Profiling ethylene-responsive genes in mature mandarin fruit using a citrus 22K oligoarray. *Plant Science* 173 (3): 340-348.

Fujita, J. (1999) Cold shock response in mammalian cells. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 1: 243-255.

Fujita, M., Fujita, Y., Maruyama, K., Seki, M., Hiratsu, K., Ohme-Takagi, M., Tran, L. S. P., Yamaguchi-Shinozaki, K., y Shinozaki, K. (2004) A dehydration-induced NAC protein, RD26, is involved in a novel ABA-dependent stress-signalling pathway. *Plant Journal* 39 (6): 863-876.

Fujita, M., Fujita, Y., Noutoshi, Y., Takahashi, F., Narusaka, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., y Shinozaki, K. (2006) Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Current Opinion in Plant Biology* 9 (4): 436-442.

Fukuchi-Mizutani, M., Tasaka, Y., Tamaka, Y., Ashikari, T., Kusumi, T., y Murata, N. (1998) Characterization of delta 9 acyl-lipid desaturase homologues from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology* 39: 247-253.

Fung, R. W. M., Wang, C. Y., Smith, D. L., Gross, K. C., Tao, Y., y Tian, M. S. (2006) Characterization of alternative oxidase (AOX) gene expression in response to methyl salicylate and methyl jasmonate pre-treatment and low temperature in tomatoes. *Journal of Plant Physiology* 163 (10): 1049-1060.

Fung, R. W. M., Wang, C. Y., Smith, D. L., Gross, K. C., y Tian, M. S. (2004) MeSA and MeJA increase steady-state transcript levels of alternative oxidase and resistance against chilling injury in sweet peppers (*Capsicum annuum* L.). *Plant Science* 166 (3): 711-719.

Gao, M. y Showalter, A. M. J. (1999) Yariv reagent treatment induces programmed cell death in *Arabidopsis* cell cultures and implicates arabinogalactan protein involvement. *Plant Journal* 19: 321-331.

Gao, X., Li, Z. G., Fan, J., y Yang, Y. W. (2007) Construction and preliminary analysis of subtractive library for peel pitting of 'Fengjie' navel orange fruit. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology* 46: 601-612.

Gao, X., Li, Z. G., Fan, J., y Yang, Y. W. (2006) Screening and expression of differentially expressed genes for peel pitting of citrus fruit. *Acta Horticulturae* 712: 473-9

Ghasemnezhad, M., Marsh, K., Shilton, R., Babalar, M., y Woolf, A. (2008) Effect of hot water treatments on chilling injury and heat damage in 'satsuma' mandarins: Antioxidant enzymes and vacuolar ATPase, and pyrophosphatase. *Postharvest Biology and Technology* 48: 364-371.

Goldschmidt, E. E., Goren, R., Even-Chen, Z., y Bittner, S. (1973) Increase in free and bound abscisic acid during natural and ethylene-induced senescence of citrus peel. *Plant Physiology* 51: 879-882.

Gomès, E., Jakobsen, M. K., Axelsen, K. B., Geisler, M., y Palmgren, M. G. (2000) Chilling tolerance in *Arabidopsis* involves ALA1, a member of a new family of putative aminophospholipid translocases. *The Plant Cell* 12: 2441-2454.

Gonzalez-Aguilar, G. A., Tiznado-Hernandez, M. E., Zavaleta-Gatica, R., y Martinez-Tellez, M. A. (2004) Methyl jasmonate treatments reduce chilling injury and activate the defense response of guava fruits. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 313 (3): 694-701.

Gonzalez-Aguilar, G. A., Zacarias, L., y Lafuente, M. T. (1998) Ripening affects high-temperature-induced polyamines and their changes during cold storage of hybrid fortune mandarins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46 (9): 3503-3508.

Gonzalez-Aguilar, G. A., Zacarias, L., Mulas, M., y Lafuente, M. T. (1997) Temperature and duration of water dips influence chilling injury, decay and polyamine content in 'Fortune' mandarins. *Postharvest Biology and Technology* 12 (1): 61-69.

Gonzalez-Aguilar, G. A., Zacarias, L., Perez-Amador, M. A., Carbonell, J., y Lafuente, M. T. (2000) Polyamine content and chilling susceptibility are affected by seasonal changes in temperature and by conditioning temperature in cold-stored 'Fortune' mandarin fruit. *Physiologia Plantarum* 108 (2): 140-146.

Gosalbes, M. J., Zacarias, L., y Lafuente, M. T. (2004) Characterization of the expression of an oxygenase involved in chilling-induced damage in citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology* 33 (3): 219-228.

Grierson, W. (1971) Chilling injury in tropical and subtropical fruits IV. The role of packaging and waxing in minimizing chilling injury of grapefruit. *Proceedings of Tropical Regional American Society of Horticultural Science* 15: 76-88.

Grierson, W. (1986) Physiological Disorders. *The Biochemistry of Plants* 7: 577-625.

Griffiths, A., Barry, C., Alpuche-Solis, A. G., y Grierson, D. (1999) Ethylene and development signals regulate expression of lipoxygenase genes during tomato fruit ripening. *Journal of Experimental Botany* 50: 793-798.

Grudkowska, M. y Zagdanska, B. (2004) Multifunctional role of plant cysteine proteinases. *Acta Biochimica Polonica Review* 51 (3): 609-624.

Guo, H. y Ecker, J. R. (2003) Plant responses to ethylene gas are mediated by SCF(EBF1/EBF2) dependent proteolysis of EIN3 transcription factor. *Cell* 115: 667-677.

Guo, Y. y Gan, S. (2006) AtNAP, a NAC family transcription factor, has an important role in leaf senescence. *Plant Journal* 46: 601-612.

Gupta, R. K., Dobritsa, S. V., Stiles, C. A., Essington, M. E., Liu, Z., Chen, C. H., Serpersu, E. H., y Mullin, B. C. (2002) Metallothioneins: A New Class of Plant Metal-Binding Proteins. *Journal of Protein Chemistry* 21 (8): 529-536.

Hall, J. (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany* 53: 1-11.

Halliwell, B. y Gutteridge, J. M. C. (1986) Iron and free radical reactions: two aspects of antioxidant protection. *Trends in Biochemical Science* 11 (9): 372-375.

Hammond-Kosack, K. E. y Jones, J. D. G. (2000). Responses to plant pathogens. En: *Biochemistry and molecular biology of plants*, Buchanan, B.B., Gruissem, W., y Jones, R. L. (eds.), American Society of Plant Physiologists. Rockville - Maryland - USA. pp. 1102-1156.

Hara, K., Yagi, M., Kusano, T., y Sano, H. (2000) Rapid systematic accumulation for transcripts encoding a tobacco WRKY transcription factor upon wounding. *Mol.Gen.Genet* 263: 30-37.

Hara, M., Fujinaga, M., y Kuboi, T. (2004) Radical scavenging activity and oxidative modification of citrus dehydrin. *Plant Physiology and Biochemistry* 42: 657-662.

Hara, M., Fujinaga, M., y Kuboi, T. (2005) Metal binding by citrus dehydrin with histidine-rich domains. *Journal of Experimental Botany* 56: 2695-2703.

Hara, M., Terashima, S., Fukaya, T., y Kuboi, T. (2003) Enhancement of cold tolerance and inhibition of lipid peroxidation by citrus dehydrin in transgenic tobacco. *Planta* 217 (2): 290-298.

Hara, M., Wakasugi, Y., Ikoma, Y., Yano, M., Ogawa, K., y Kuboi, T. (1999) cDNA sequence and expression of a cold-responsive gene in *Citrus unshiu*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 63: 433-437.

Hariyadi, P. y Parkin, K. L. (1991) Chilling-induced oxidative stress in cucumber fruits. *Postharvest Biology and Technology* 1: 33-45.

Hartmann, U., Sagasser, M., Mehrtens, F., Stracke, R., y Weisshaar, B. (2005) Differential combinatorial interactions of cis-acting elements recognized by R2R3-MYB, BZIP, and BHLH factors control light-responsive and tissue-specific activation of phenylpropanoid biosynthesis genes. *Plant Molecular Biology* 57 (2): 155-171.

Hashimoto, T. y Yamada, Y. (1994) Alkaloid biogenesis: molecular aspects. *Annual Review of Plant Physiology* 45: 257-285.

Hatton, T. T., Cubbedge, R. H., y Grierson, W. (1975) Effects of prestorage carbon dioxide treatments and delayed storage on chilling injury of 'Marsh' grapefruit. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 88: 335-338.

He, X. J., Mu, R. L., Cao, W. H., Zhang, Z. G., Zhang, J. S., y Chen, S. Y. (2005) AtNAC2, a transcription factor downstream of ethylene and auxin signaling pathways, is involved in salt stress response and lateral root development. *Plant Journal* 44: 903-16.

Heino, P. y Palva, E. T. (2003) Signal transduction in plant cold acclimation. *Topics in Current Genetics* 4: 151-185.

Henriod, R. E. (2006) Postharvest characteristics of navel oranges following high humidity and low temperature storage and transport. *Postharvest Biology and Technology* 42: 57-64.

Henriod, R. E., Gibberd, M. R., y Treeby, M. T. (2005) Storage temperature effects on moisture loss and the development of chilling injury in Lanes Late navel orange. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 45: 453-458.

Herrero, J., az-Uriarte, R., y Dopazo, J. (2003) Gene expression data preprocessing. *Bioinformatics* 19 (5): 655-656.

Hinderhofer, K. y Zentgraf, U. (2001) Identification of a transcription factor specifically expressed at the onset of leaf senescence. *Planta* 213 (3): 469-473.

Hockema, B. R. y Etxeberria, E. (2001) Metabolic contributors to drought-enhanced accumulation of sugars and acids in oranges. *Journal of American Society of Horticultural Science* 126: 599-605.

Hoeberichts, F. A., van Doorn, W. G., Vorst, O., Hall, R. D., y van Wordragen, M. F. (2007) Sucrose prevents upregulation of senescence-associated genes in carnation petals. *Journal of Experimental Botany* 58: 2873-2885.

Hoeberichts, F. A. y Woltering, E. J. (2002) Multiple mediators of plant cell death: interplay of conserved cell death mechanisms and plant-specific regulators. *Bioessays* 25: 47-57.

Holland, N. (1998) Carbohydrate metabolism and chilling tolerance of citrus fruit. *Universidade de Estadual de Campinas, Brasil*

Holland, N., Menezes, H. C., y Lafuente, M. T. (2002) Carbohydrates as related to the heat-induced chilling tolerance and respiratory rate of 'Fortune' mandarin fruit harvested at different maturity stages. *Postharvest Biology and Technology* 25 (2): 181-191.

Holland, N., Menezes, H. C., y Lafuente, M. T. (2005) Carbohydrate metabolism as related to high-temperature conditioning and peel disorders occurring during storage of citrus fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (22): 8790-8796.

Holland, N., Sala, J. M., Menezes, H. C., y Lafuente, M. T. (1999) Carbohydrate content and metabolism as related to maturity and chilling sensitivity of cv. Fortune mandarins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47 (7): 2513-2518.

Hon, W. C., Griffith, M., Chong, P., y Yang, D. S. C. (1994) Extraction and isolation of antifreeze proteins from winter rye (*Secale cereale* L.) leaves. *Plant Physiology* 104: 971-980.

Hon, W. C., Griffith, M., Mlynarz, A., Kwok, Y. C., y Yang, D. S. C. (1995) Antifreeze Proteins in Winter Rye Are Similar to Pathogenesis-Related Proteins. *Plant Physiology* 109 (3): 879-889.

Hopkins, M., McNamara, L., Taylor, C., Wang, T. W. y Thomson, J. (2008). Membrane dynamics and regulation of subcellular changes during senescence. En: *Senescence Processes in Plants - Annual Plant Reviews*, S. Gan (eds.), Vol 26, pp. 39-68.

Hopkins, M., Taylor, C., Liu, Z., Ma, F., McNamara, L., Wang, T. W., y Thompson, J. E. (2007) Regulation and execution of molecular disassembly and catabolism during senescence. *New Phytologist* 175: 201-214.

Hossain, M. M. y Nakamoto, H. (2003) Role for the cyanobacterial HtpG in protection from oxidative stress. *Current Microbiol* 46 (1): 70-76.

Hoult, J. R. S. y Paya, M. (1996) Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: Natural products with therapeutic potential. *General Pharmacology* 27: 713-722.

- Howarth, C. J. y Skot, K. P. (1994) Detailed Characterization of Heat-Shock Protein-Synthesis and Induced Thermotolerance in Seedlings of Sorghum-Bicolor l. *Journal of Experimental Botany* 45 (279): 1353-1363.
- Howitt, C. A. y Pogson, B. J. (2006) Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues. *Plant, Cell and Environment*
- Hsieh, T. H., Lee, J. T., Charng, Y. Y., y Chan, M. T. (2002a) Tomato plants ectopically expressing Arabidopsis CBF1 show enhanced resistance to water deficit stress. *Plant Physiology* 130 (2): 618-626.
- Hsieh, T. H., Lee, J. T., Yang, P. T., Chiu, L. H., Charng, Y. Y., Wang, Y. C., y Chan, M. T. (2002b) Heterology expression of the Arabidopsis C-repeat/dehydration response element binding factor 1 gene confers elevated tolerance to chilling and oxidative stresses in transgenic tomato. *Plant Physiology* 129 (3) (2): 1086-1094.
- Hu, H., Dai, M., Yao, J., Xiao, B., Li, X., Zhang, Q., y Xiong, L. (2006) Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. *PNAS* 103 (35): 12987-12992.
- Hughes, S. E., Dunn, M. A., Pearce, R. S., White, A. J., y Zhang, L. (1992) An abscisic-acid-responsive, low-temperature barley gene has homology with a maize phospholipid transfer protein. *Plant Cell and Environment* 15: 861-865.
- Hugly, S., Kunst, L., Browse, J., y Somerville, C. (1989) Enhanced Thermal Tolerance of Photosynthesis and Altered Chloroplast Ultrastructure in A Mutant of Arabidopsis Deficient in Lipid Desaturation. *Plant Physiology* 90 (3): 1134-1142.
- Hugly, S. y Somerville, C. (1992) A role for membrane lipid polyunsaturation in chloroplast biogenesis at low temperature. *Plant Physiology* 99: 197-202.
- Hwang, E. W., Kim, K. A., Park, S. C., Jeong, M. J., Byun, M. O., y Kwon, H. B. (2005) Expression profiles of hot pepper (*Capsicum annuum*) genes under cold stress conditions. *Journal of Biosciences* 30 (5): 657-667.
- Hyodo, H., Kuroda, H., y Yang, S. F. (1978) Induction of phenylalanine ammonia-lyase and increase in phenolics in lettuce leaves in relation to the development of russet spotting caused by ethylene. *Plant Physiology* 62: 31-35.
- Iba, K. (2002) Acclimative response to temperature stress in higher plants: Approaches of gene engineering for temperature tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 53: 225-245.
- Imai, R., Ali, A., Pramanik, H. R., Nakaminami, K., Sentoku, N., y Kato, H. (2004) A distinctive class of spermidine synthase is involved in chilling response in rice. *Plant Physiology* 161: 883-886.
- Imlay, J. A., Chin, S. M., y Linn, S. (1988) Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction *in vivo* and *in vitro*. *Science* 240: 640-642.
- In, O., Berberich, T., Romdhane, S., y Feierabend, J. (2005) Changes in gene expression during dehardening of cold-hardened winter rye (*Secale cereale* L.) leaves and potential role of a peptide methionine sulfoxide reductase in cold-acclimation. *Planta* 220 (6): 941-950.
- Ishizaki-Nishizawa, O., Fujii, T., Azuma, M., Sekiguchi, K., Murata, N., Ohtani, T., y Toguri, T. (1996) Low-temperature resistance of higher plants is significantly enhanced by a nonspecific cyanobacterial desaturase. *Nature Biotechnology* 14 (8): 1003-1006.

- Ismail, M. A. y Brown, G. E. (1979) Postharvest wound healing in citrus fruit: Induction of phenylalanine ammonia-lyase in injured 'Valencia' orange flavedo. *Journal of American Society of Horticultural Science* 104: 126-129.
- Ismail, M. A. y Grierson, W. (1977) Seasonal Susceptibility of Grapefruit to Chilling Injury As Modified by Certain Growth-Regulators. *HortScience* 12 (2): 118-120.
- Iuchi, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, T., Terao, T., y Shinozaki, K. (1996) Novel Drought-Inducible Genes in the Highly Drought-Tolerant Cowpea: Cloning of cDNA and Analysis of the Expression of the Corresponding Genes. *Plant and Cell Physiology* 37 (8): 1073-1082.
- Jach, C., Gornhardt, B., Mundy, J., Logemann, J., Pinsdorf, E., Leah, R., Schell, J., y Maas, C. (1995) Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. *Plant Journal* 8: 97-109.
- Jacob-Wilk, D., Holland, D., Goldschmidt, E. E., Riov, J., y Eyal, Y. (1999) Chlorophyll breakdown by chlorophyllase: isolation and functional expression of the Chlase1 gene from ethylene-treated Citrus fruit and its regulation during development. *Plant Journal* 20: 653-661.
- Jahn, O. L., Chace, W. G., y Cubbedge, R. H. (1969) Degreening of citrus fruit in response to varying levels of oxygen and ethylene. *Journal of American Society of Horticultural Science* 94: 123-125.
- Jakoby, M., Weisshaar, B., Droge-Laser, W., y et al. (2002) bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science* 7: 106-111.
- Janzik, I., Preiskowski, S., y Kneifel, H. (2005) Ozone has dramatic effects on the regulation of the prechorismate pathway in tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv Bel W3). *Planta* 223 (1): 20-27.
- Jenkins, G. M. y Frohman, M. A. (2005) Phospholipase D: a lipid centric review. *Cell Mol Life Sci.* 62: 2305-2316.
- Jennings, P. y Saltveit, M. E. (1994) Temperature chemical shocks induce chilling tolerance in germinating *Cucumis sativus* (cv. Poinsett 76) seeds. *Physiologia Plantarum* 91: 703-707.
- Jiang, W., Sheng, Q., Zhou, X., Zhang, M., y Liu, X. (2002) Regulation of coriander senescence by 1-methylcyclopropane and ethylene. *Postharvest Biology and Technology* 26: 339-345.
- Jinn, T. L., Wu, S. H., Yeh, C. H., Hsieh, M. H., Yeh, Y. C., Chen, Y. M., y Lin, C. Y. (1993) Immunological Kinship of Class-I Low-Molecular-Weight Heat-Shock Proteins and Thermostabilization of Soluble-Proteins In-Vitro Among Plants. *Plant and Cell Physiology* 34 (7): 1055-1062.
- John, C. F., Morris, K., Jordan, B. R., Thomas, B., y Mackerness, S. (2001) Ultraviolet-B exposure leads to upregulation of senescence-associated genes. *Journal of Experimental Botany* 52: 1367-1373.
- Joo, S. y Kim, W. T. (2007) A Gaseous Plant Hoemone Ethylene: The Signaling Pathway. *Journal of Plant Biology* 50 (2): 109-116.
- Ju, Z., Yuan, Y., Liou, C., Zhang, S., y Xiu, S. (1994) Effects of low temperature on H₂O₂ and heart browning of Chili and Yali pear (*Pyrus bretschneideri*, R.). *Sci. Agric. Sinica* 27: 77-81.
- Kader, A. A. y Arpaia, M. L. (2002) Postharvest handling systems: subtropical fruit. *Postharvest technology of horticultural crops*. Edited by AA Kader. Oakland, CA: Regents of the University of California, Division of Agricultural and Natural Resource : 375-384.
- Kader, A. A., Lyons, J. M., y Morris, L. L. (1974) Postharvest responses og vegetables to preharvest field temperature. *HortScience* 9: 523-527.

Kader, J. C. (1996) Lipid-transfer proteins in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47: 627-654.

Kadyrzhanova, D. K., Vlachonasios, K. E., Ververidis, P., y Dilley, D. R. (1998) Molecular cloning of a novel heat induced/chilling tolerance related cDNA in tomato fruit by use of mRNA differential display. *Plant Molecular Biology* 36 (6): 885-895.

Kanehisa, M., Goto, S., Hattori, M., Iki-Kinoshita, K. F., Itoh, M., Kawashima, S., Katayama, T., Araki, M., y Hirakawa, M. (2006) From genomics to chemical genomics: new developments in KEGG. *Nucleic Acids Research* 34: D354-D357.

Kaplan, F. y Guy, C. L. (2004) Beta-amylase induction and the protective role of maltose during temperature shock. *Plant Physiology* 135 (3): 1674-1684.

Kaplan, F., Kopka, J., Sung, D. Y., Zhao, W., Popp, M., Porat, R., y Guy, C. L. (2007) Transcript and metabolite profiling during cold acclimation of *Arabidopsis* reveals an intricate relationship of cold-regulated gene expression with modifications in metabolite content. *The Plant Journal* 50: 967-981.

Kaplan, F., Sung, D. Y., y Guy, C. L. (2006) Roles of beta-amylase and starch breakdown during temperatures stress. *Physiologia Plantarum* 126: 120-128.

Kasukabe, Y., He, L. X., Nada, K., Misawa, S., Ihara, I., y Tachibana, S. (2004) Overexpression of spermidine synthase enhances tolerance to multiple environmental stresses and up-regulates the expression of various stress regulated genes in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* 45 (6): 712-722.

Kato, A. y Yoshida, H. (2002) Induction of *Lea5*-related genes by cold treatments and its role in cold tolerance of rice seedlings. *Journal of Plant Research* 115: 82-83.

Kato, M., Ikoma, Y., Matsumoto, H., Sugiura, M., Hyodo, H., y Yano, M. (2004) Accumulation of carotenoids and expression of carotenoid biosynthetic genes during maturation in citrus fruit. *Plant Physiology* 134 (2): 824-837.

Kato, M., Matsumoto, H., Ikoma, Y., Okuda, H., y Yano, M. (2006) The role of carotenoid cleavage dioxygenases in the regulation of carotenoid profiles during maturation in citrus fruit. *Journal of Experimental Botany* 57 (10): 2153-2164.

Kato, T., Kawashima, K., Miwa, M., Mimura, Y., Tamaoki, M., Kouchi, H., y Suganuma, N. (2002) Expression of Genes Encoding Late Nodulins Characterized by a Putative Signal Peptide and Conserved Cysteine Residues Is Reduced in Ineffective Pea Nodules. *The American Phytopathological Society* 15: 129-137.

Katz, E., Lagunes, P. M., Weiss, J. R. D., y Goldschmidt, E. E. (2004) Molecular and physiological evidence suggests the existence of a system II-like pathway of ethylene production in non-climacteric Citrus fruit. *Planta* 219: 243-252.

Kawada, K. (1980) Some physiological and biochemical aspects of chilling injury of grapefruit (*Citrus paradisi* Macf) with emphasis on growth regulators. *Ph.D.dissertation.University of Florida, FL, USA*

Kawashima, K., Suganuma, N., Tamaoki, M., y Kouchi, H. (2001) Two types of pea leghemoglobin genes showing different O₂-binding affinities and distinct patterns of spatial expression in nodules. *Plant Physiology* 125: 641-651.

Ke, D. y Saltveit, M. E. (1989) Wound-induced ethylene production, phenolic metabolism and susceptibility to russet spotting in iceberg lettuce. *Physiologia Plantarum* 76: 412-418.

- Ke, D. y Saltveit, M. E. J. (1988) Plant hormone interaction and phenolic metabolism in the regulation of russet spotting in iceberg lettuce. *Plant Physiology* 88: 1136-1140.
- Keefe, D., Hinz, U., y Meins, F. Jr. (1990) The effect of ethylene on the cell-type-specific and intracellular localization of b-1,3-glucanase and chitinase in tobacco leaves. *Planta* 182: 43-51.
- Keinänen, M., Oldham, N., y Baldwin, I. T. (2001) Rapid HPLC screening of jasmonate-induced increases in tobacco alkaloids, phenolics, and diterpene glycosides in *Nicotiana attenuate*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 3553-3558.
- Keller, E. y Steffen, K. L. (1995) Increased chilling tolerance and altered carbon metabolism in tomato leaves following application of mechanical stress. *Physiologia Plantarum* 93: 519-525.
- Kerdnaimongkol, K. y Woodson, W. R. (1999) Inhibition of catalase by antisense RNA increases susceptibility to oxidative stress and chilling injury in transgenic tomato plants. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 124 (4): 330-336.
- Khuri, S., Bakker, F. T., y Dunwell, J. M. (2001) Phylogeny, function, and evolution of the cupins, a structurally conserved, functionally diverse superfamily of proteins. *Molecular of Biology and Evolution* 18(4): 593-605.
- Kim, C. Y. y Zhang, S. (2004) Activation of a mitogen-activated protein kinase cascade induces WRKY family of transcription factors and defense genes in tobacco. *The Plant Journal* 38: 142-151.
- Kim, H. J., Lim, P. O. y Nam, H. G. (2005). Molecular regulation of leaf senescence. En: *Senescence Processes in Plants - Annual Plant Reviews* S. Gan (eds.), Vol 26, pp. 229-255.
- Kim, J. J., Ben Yehoshua, S., Shapiro, B., Henis, Y., y Carmeli, S. (1991) Accumulation of scoparone in heat-treated lemon fruit inoculated with *Penicillium digitatum*. *Plant Physiology* 97: 880-885.
- King, A. I., Joyce, D. C., y Reid, M. S. (1988) Role of carbohydrates in diurnal chilling sensitivity of tomato seedlings. *Plant Physiology* 86: 764-768.
- Kinningham, K. y Kasarskis, E. (1998) Antioxidant function of metallothioneins. *Journal of Trace Elements in Experimental Medicine* 11: 219-226.
- Knight, H., Trewavas, A. J., y Knight, M. R. (1996) Cold calcium signaling in Arabidopsis involves two cellular pools and a change in calcium signature after acclimation. *The Plant Cell* 8 (3): 489-503.
- Kodama, H., Hamada, T., Horiguchi, G., Nishimura, M., y Iba, K. (1994) Genetic enhancement of cold tolerance by expression of a gene for chloroplast w-3 fatty acid desaturase in transgenic tobacco. *Plant Physiology* 105: 601-605.
- Kodama, H., Horiguchi, G., Nishiuchi, T., Nishimura, M., y Iba, K. (1995) Fatty-Acid Desaturation During Chilling Acclimation Is One of the Factors Involved in Conferring Low-Temperature Tolerance to Young Tobacco-Leaves. *Plant Physiology* 107 (4): 1177-1185.
- Kolodziejek, I., Koziol, J., Waleza, M., y Mostowska, A. (2003) Ultrastructure of mesophyll cells and pigment content in senescencing leaves of maize and barley. *Journal of Plant Growth Regulation* 22: 217-227.
- Kovtun, Y., Chiu, W. L., Tena, G., y Sheen, J. (2000) Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (6): 2940-2945.
- Krishna, P. (2003) Plant responses to heat stress. *Topics in Current Genetics* 4: 73-101.

- Krishna, P., Sacco, M., Cheritti, J. F., y Hill, S. (1995) Cold induced accumulation of hsp90 transcripts in *Brassica napus*. *Plant Physiology* 107: 915-923.
- Kunst, L., Clemens, S., y Hooker, T. (2000) Expression of the wax-specific condensing enzyme CUT1 in Arabidopsis. *Biochem Soc Trans* 28 (6): 651-654.
- Kutchan, T. M. (1995) Alkaloid biosynthesis. *The Plant Cell* 7: 1059-1070.
- Kwon, Y. y Kim, S. H. (2007) Arabidopsis *hot2* encodes an endochitinase-like protein that is essential for tolerance to heat, salt and drought stresses. *The Plant Journal* 49 (2): 184-193.
- Lafuente, M. T., Alférez, F., Sánchez-Ballesta, M. T., Sala, J. M., Mulas, M., y Zacarias, L. (2001a) Alteraciones fisiológicas durante la postcosecha de frutos cítricos: Tratamientos de control y mecanismos implicados. *Levante Agrícola* 355: 128-133.
- Lafuente, M. T., Belver, A., Uye, M. G., y Salveir, M. E. (1991) Effect of temperature conditioning on chilling injury of cucumber cotyledons. Possible role of abscisic and heat shock proteins. *Plant Physiology* 95: 443-449.
- Lafuente, M. T., Establés-Ortiz, B., Cajuste, J. F., González-Candelas, L., y Sala, J. M. (2008) Efecto protector del etileno frente al 'colapso de la corteza' durante la manipulación postcosecha en naranjas 'Navelina' y 'Navelate'. *En prensa*
- Lafuente, M. T., Martínez-Tellez, M. A., y Zacarias, L. (1997) Abscisic acid in the response of 'Fortune' mandarins to chilling. Effect of maturity and high-temperature conditioning. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 73 (4): 494-502.
- Lafuente, M. T. y Sala, J. M. (2002) Abscisic acid levels and the influence of ethylene, humidity and storage temperature on the incidence of postharvest rindstaining of 'Navelina' orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) fruit. *Postharvest Biology and Technology* 25 (1): 49-57.
- Lafuente, M. T., Sala, J. M., y Zacarias, L. (2004) Active oxygen detoxifying enzymes and phenylalanine ammonia-lyase in the ethylene-induced chilling tolerance in citrus fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52 (11): 3606-3611.
- Lafuente, M. T. y Zacarias, L. (2006) Postharvest physiological disorders in citrus fruit. *Steward Postharvest Review* 1:2, DOI:10.2212/spr.2006.1.2.
- Lafuente, M. T., Zacarias, L., Martínez-Tellez, M. A., Sánchez-Ballesta, M. T., y Dupille, E. (2001b) Phenylalanine ammonia-lyase as related to ethylene in the development of chilling symptoms during cold storage of citrus fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (12): 6020-6025.
- Lafuente, M. T., Zacarias, L., Martínez-Tellez, M. A., Sánchez-Ballesta, M. T., y Granell, A. (2003) Phenylalanine ammonia-lyase and ethylene in relation to chilling injury as affected by fruit age in citrus. *Postharvest Biology and Technology* 29 (3): 309-318.
- Lafuente, M. T., Zacarias, L., Sala, J. M., Sánchez-Ballesta, M. T., Gosálbes, M. J., Lluch, Y., y Granell, A. (2005) Understanding the Basis of Chilling Injury in Citrus Fruit. En: *Proceedings 5th International Postharvest Symposium*, F. Mencarelli y P. Tonutti. (eds.) Acta Horticulturae 682, ISHS: 831-842.
- Ledesma, N. A., Kawabata, S., y Sugiyama, N. (2004) Effect of high temperature on protein expression in strawberry plants. *Biologia Plantarum* 48 (1): 73-79.
- Lee, J. H., Hubel, A., y Schoffl, F. (1995) Derepression of the Activity of Genetically-Engineered Heat-Shock Factor Causes Constitutive Synthesis of Heat-Shock Proteins and Increased Thermotolerance in Transgenic Arabidopsis. *Plant Journal* 8 (4): 603-612.

Lee, J. H., Van Montagu, M., y Verbruggen, N. (1999) A highly conserved kinase is an essential component for stress tolerance in yeast and plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 5873-5877.

Lee, S., Woo, Y. M., Ryu, S. I., Shin, Y. D., Kim, W. T., Park, K. Y., Lee, I. J., y An, G. (2008) Further characterization of a rice AGL12-group MADS-box gene, OsMADS26. *Plant Physiology* 147 (1): 156-168.

Li, H. Y., Chang, C. S., Lu, L. S., Liu, C. A., Chan, M. T., y Charng, Y. Y. (2003) Over-expression of *Arabidopsis thaliana* heat shock factor gene (*AtHsf1b*) enhances chilling tolerance in transgenic tomato. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 44 (2): 129-140.

Li, Q. B., Haskell, D. W., y Guy, C. L. (1999) Coordinate and non-coordinate expression of the stress 70 family and other molecular chaperones at high and low temperature in spinach and tomato. *Plant Molecular Biology* 39 (1): 21-34.

Li, Y. y Trush, M. A. (1993a) Oxidation of hydroquinone by copper: chemical mechanism and biological effects. *Biochimica et Biophysica Acta* 300: 346-355.

Li, Y. y Trush, M. A. (1993b) DNA damage resulting from the oxidation of hydroquinone by copper: role for a Cu(II)/Cu(I) redox cycle and reactive oxygen generation. *Carcinogenesis* 7: 1303-1311.

Liang, X., Dron, M., Schimid, J., Dixon, R. A., y Lamb, C. J. (1989) Development and environmental regulation of a phenylalanine ammonia-lyase-b-glucuronidase gene fusion in transgenic tobacco plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86: 9284-9288.

Lichtenthaler, H. K. (1999) THE 1-DEOXY-D-XYLULOSE-5-PHOSPHATE PATHWAY OF ISOPRENOID BIOSYNTHESIS IN PLANTS. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50: 47-65.

Lim, P. O. y Nam, H. G. (2005) The molecular and genetic control of leaf senescence and longevity in *Arabidopsis*. *Current Topics in Developmental Biology* 67: 49-83.

Lim, P. O., Woo, H. R., y Nam, H. G. (2003) Molecular genetics of leaf senescence in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science* 8: 272-278.

Lin, C., Guo, W. W., Everson, E., y Thomashow, M. F. (1990) Cold acclimation in *Arabidopsis* and wheat. *Plant Physiology* 94: 1078-1083.

Lindahl, M. y Tagesson, C. (1997) Flavonoids as phospholipase A(2) inhibitors: Importance of their structure inhibition of group II phospholipase A(2). *Inflammation* 21: 347-356.

Liu, K., Kang, B. C., Jiang, H., Moore, S. L., Li, H., Watkins, C. B., Setter, T. L., y Jahn, M. M. (2005) A GH3-like gene, CcGH3, isolated from *Capsicum chinense* L. fruit is regulated by auxin and ethylene. *Plant Molecular Biology* 58: 447-464.

Liso, I., Tadeo, F., Phinney, B., Wilkerson, C., y Talón, M. (2007) Protein Changes in the Albedo of Citrus Fruits on Postharvesting Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 3

Lluch, Y. (2006) Bases moleculares del mecanismo de tolerancia al frío inducido por tratamientos de acondicionamiento a altas temperaturas en frutos cítricos. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia, España

Lois, R., Dietrich, A., y Hahlbrock, K. (1989) A phenylalanine ammonia-lyase gene from parsley: Structure, regulation and identification of elicitor and light responsive *cis*-acting elements. *Embo Journal* 8: 1641-1648.

- Lolle, S. J., Berlyn, G. P., Engstrom, E. M., Krolkowski, K. A., Reiter, W. D., y Pruitt, R. E. (1997) Development regulation of cell interactions in the *Arabidopsis* fiddlehead-1 mutant: a role for the epidermal wall and cuticle. *Developmental Biology* 189 (2): 311-321.
- Lopes, G. K. B., Schulman, H. M., y Hermes-Lima, M. (1999) Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. *Biochemica et Biophysica Acta* 1472: 142-152.
- Lorenzo, O., Piqueras, R., Sánchez-Serrano, J. J., y Solano, R. (2003) ETHYLENE RESPONSE FACTOR 1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *The Plant Cell* 15 (1): 165-178.
- Los, D. A. y Murata, N. (1999) Responses to cold shock in cyanobacteria. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 1: 221-230.
- Lotan, T. y Fluhr, R. (1990) Xylanase, a novel elicitor of pathogenesis-related proteins in tobacco, uses a non-ethylene pathway for induction. *Plant Physiology* 93: 811-817.
- Lu, Y. P., Li, Z. S., Drozdowicz, Y. M., Hörtensteiner, S., Martinoia, E., y Rea, P. A. (1998) AtMRP2, an *Arabidopsis* ATP binding cassette transporter able to transport glutathione *s*-conjugates and chlorophyll catabolites: functional comparisons with AtMRP1. *The Plant Cell* 10: 267-282.
- Lurie, S. (1998) Postharvest heat treatments. *Postharvest Biology and Technology* 14 (3): 257-269.
- Lurie, S. y Klein, J. D. (1991) Acquisition of Low-Temperature Tolerance in Tomatoes by Exposure to High-Temperature Stress. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 116 (6): 1007-1012.
- Lurie, S., Laamim, M., Lapsker, Z., y Fallik, E. (1997) Heat treatments to decrease chilling injury in tomato fruit. Effects on lipids, pericarp lesions and fungal growth. *Physiologia Plantarum* 100 (2): 297-302.
- Lynch, D. V. y Steponkus, P. L. (1987) Thermotropic Phase-Behavior of Glucocerebrosides from Rye Leaves. *Cryobiology* 24 (6): 555-556.
- Lyons, J. M. (1973) Chilling injury in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 24: 445-466.
- Maeda, H., Sage, T. L., Isaac, G., Welti, R., y DellaPenna, D. (2008) Tocopherols Modulate Extraplasmidic Polyunsaturated Fatty Acid Metabolism in *Arabidopsis* at Low Temperature. *The Plant Cell* 20: 452-470.
- Maeshima, M. (2001) TONOPLAST TRANSPORTERS: Organization and Function. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52: 469-497.
- Maldonado, R., Molina-García, A. D., Sánchez-Ballesta, M. T., Escribano, M. I., y Merodio, C. (2002) High CO₂ atmosphere modulating the phenolic response associated with cell adhesion and hardening of *Annona cherimola* fruit stored at chilling temperature. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (26): 7564-7569.
- Maldonado, R., Sánchez-Ballesta, M. T., Alique, R., Escribano, M. I., y Merodio, C. (2004) Malate metabolism and adaptation to chilling temperature storage by pretreatment with high CO₂ levels in *Annona cherimola* fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 4758-4763.
- Malik, M. K., Slovin, J. P., Hwang, C. H., y Zimmerman, J. L. (1999) Modified expression of a carrot small heat shock protein gene, Hsp17.7, results in increased or decreased thermotolerance. *Plant Journal* 20: 89-99.

Mang, H. G., Kang, E. O., Shim, J. H., Kim, S. Y., Park, K. Y., Kim, Y. S., Bahk, Y. Y., y Kim, W. T. A proteomic analysis identifies glutathione S-transferase isoforms whose abundance is differentially regulated by ethylene during the formation of early root epidermis in *Arabidopsis* seedlings. *Biochemica et Biophysica Acta* 1676 (3): 231-239.

Manthey, J. A. (2004) Fractionation of orange peel phenols in ultrafiltered molasses and mass balance studies of their antioxidant levels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 7586-7592.

Mao, L., Begum, D., Chuang, H. W., Budiman, M. A., Szymkowiak, E. J., Irish, E. E., y Wing, R. A. (2000) JOINTLESS is a MADS-box gene controlling tomato flower abscission zone development. *Nature* 406: 910-913.

Mao, L. C., Wang, G. Z., Zhu, C. G., y Pang, H. Q. (2007) Involvement of phospholipase D and lipoxygenase in response to chilling stress in postharvest cucumber fruits. *Plant Science* 172 (2): 400-405.

Marcos, J. F., Gonzalez-Candelas, L., y Zacarias, L. (2005) Involvement of ethylene biosynthesis and perception in the susceptibility of citrus fruits to *Penicillium digitatum* infection and the accumulation of defence-related mRNAs. *Journal of Experimental Botany* 56 (418): 2183-2193.

Marè, C., Mazzucotelli, E., Crosatti, C., Francia, E., Stanca, A. M., y Cattivelli, L. (2004) Hv-WRKY38: a new transcription factor involved in cold- and drought-response in barley. *Plant Molecular Biology* 55 (3): 399-416.

Martin, B. (1986) Arrhenius plots and the involvement of thermotropic phase transitions of the thylakoid membrane in chilling impairment of photosynthesis in thermophilic higher plants. *Plant, Cell and Environment* 9: 323-331.

Martin, C. y Paz-Ares, J. (1997) MYB transcription factors in plants. *Trends in Genetics* 13 (2): 67-73.

Martin, D., Tholl, D., Gershenzon, J., y Bohlmann, J. (2002) Methyl jasmonate induces traumatic resin ducts, terpenoid resin biosynthesis, and terpenoid accumulation in developing xylem of Norway spruce stems. *Plant Physiology* 129: 1003-1018.

Martínez-Jávega, J. M. y Cuquerella, J. (1984) Factors affecting cold storage of Spanish oranges and mandarins. *Proceedings of the International Society of Citriculture* 1: 511-514.

Martínez-Jávega, J. M., Cuquerella, J., Del Río, M. A., y Navarro, P. (1994) High temperature conditioning of 'Fortune' mandarins to reduce chilling injury during low temperature storage. *Proceedings contribution du froid a la preservation de la qualite des fruits, legumes et produits haleientiques*. Lahman Bennami and Messaho (ed). Institut International du Froid. Actes du symposium. Fés (Maroc) Chapitre 8: 87-92.

Martínez-Jávega, J. M., Mateos, M., y Cuquerella, J. (1987) Improving storage life of citrus fruit by temperature management. *XVII Int. Cong. of Ref. C*: 321-326.

Martínez-Jávega, J. M., Navarro, P., Cuquerella, J., y Del Río, M. A. (1999) Aplicaciones del frío en postcosecha de cítricos: panorama actual. *Levante Agrícola, Especial Postcosecha* 348: 253-262.

Martínez-Jávega, J. M., Saucedo, C., Del Río, M. A., y Mateos, M. (1992) Influence of storage temperature and coating on the keeping quality of 'Fortune' mandarins. *Proceedings of the International Society of Citriculture* : 1102-1103.

Martínez-Téllez, M. A. y Lafuente, M. T. (1997) Effects of high temperature conditioning in ethylene, phenylalanine ammonia-lyase, peroxidase and polyphenol oxidase activities in flavedo of Fortune mandarin fruit. *Journal of Plant Physiology* 150: 674-678.

- Martínez-Téllez, M. A. y Lafuente, M. T. (1993) Chilling-induced changes in phenylalanine ammonia-lyase, peroxidase, and polyphenol oxidase activities in citrus flavedo tissue. *Acta Horticulturae* (343): 257-263.
- Martínez-Téllez, M. A., Zacarias, L., y Lafuente, M. T. (1995) Ethylene and phenylalanine ammonia-lyase in relation to chilling injury of 'Fortune' mandarins. En: *Postharvest Physiology, Pathology, Technologies for Horticultural Commodities: Recent Advances*, A.Ait-Oubahou and M.El-Otmani (eds.), Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II: Agadir, Marruecos. pp. 257-262.
- Matile, P. y Winkenbach, F. (1971) Function of lysosomes and lysosomal enzymes in the senescing corolla of the morning glory (*Ipomoea purpurea*). *Journal of Experimental Botany* 22: 759-771.
- Matile, P. H. (1984) Das toxische kompartment der pflanzenzelle. *Naturwissenschaften* 71: 18-24.
- Mauch, F., Hadwiger, L. A., y Boller, T. (1984) Ethylene: symptom, not signal for the induction of chitinase and b-1,3-glucanase in pea pods by pathogens and elicitors. *Plant Physiology* 76: 607-611.
- Maul, P., Mccollum, T. G., Popp, M., Guy, C. L., y Porat, R. (2008) Transcriptome profiling of grapefruit following exposure to low temperature and conditioning treatments uncovers principal molecular components involved in chilling tolerance and susceptibility. *Plant, Cell and Environment* : 1-17.
- McBride, A. G., Borutaite, V., y Brown, G. C. (1999) Superoxide dismutase and hydrogen peroxide cause rapid nitric oxide breakdown, peroxynitrite production and subsequent cell death. *Biochemica et Biophysica Acta* 1454: 275-288.
- McCarty, R. E. y Jagendorf, A. T. (1965) Chloroplasts damage due to enzymatic hydrolysis of endogenous lipids. *Plant Physiology* 40: 725-735.
- McCollum, G. y Maul, P. (2007) 1-Methylcyclopropene Inhibits Degreening But Stimulates Respiration and Ethylene Biosynthesis in Grapefruit. *HortScience* 42(1): 120-124.
- McCollum, G. y McDonald, E. E. (1991) Electrolyte leakage, respiration and ethylene production as indices of chilling injury in grapefruit. *HortScience* 26: 1191-1192.
- McDonald, R. E. (1989) Temperature conditioning affects polyamines of lemon fruits stored at chilling temperatures. *HortScience* 24: 475-477.
- McDonald, R. E., Hatton, T. T., y Cubbedge, R. H. (1985) Chilling Injury and Decay of Lemons As Affected by Ethylene, Low-Temperature, and Optimal Storage. *HortScience* 20 (1): 92-93.
- McDonald, R. E. y Kushad, M. M. (1986) Accumulation of Putrescine during Chilling Injury of Fruits. *Plant Physiology* 82 (1): 324-326.
- McDonald, R. E., Mccollum, T. G., y Nordby, H. E. (1993a) Temperature Conditioning and Surface Treatments of Grapefruit Affect Expression of Chilling Injury and Gas-Diffusion. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 118 (4): 490-496.
- McDonald, R. E., Miller, W. R., Mccollum, T. G., y Brown, G. E. (1991) Thiabendazole and Imazalil Applied at 53C Reduce Chilling Injury and Decay of Grapefruit. *HortScience* 26 (4): 397-399.
- McDonald, R. E., Nordby, H. E., y Mccollum, T. G. (1993b) Epicuticular Wax Morphology and Composition Are Related to Grapefruit Chilling Injury. *HortScience* 28 (4): 311-312.
- McDowell, J. M. y Dangl, J. L. (2000) Signal transduction in the plant immune response. *Trends in Biochemical Science* 25 (2): 79-82.

McKersie, B. D., Chen, Y., de Beus, M., Bowley, S. R., y Bowley, C. (1993) Superoxide dismutase enhances tolerance of freezing stress in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiology* 103: 1155-1163.

McMurchie, E. J., McGlasson, W. B., y Eaks, I. L. (1972) Treatment of fruit with propylene gives information about the biogenesis of ethylene. *Nature* 237: 235-236.

Medina, J., Bargues, M., Terol, J., Pérez-Alonso, M., y Salinas, J. (1999) The Arabidopsis CBF gene family is composed of three genes encoding AP2 domain-containing proteins whose expression is regulated by low temperature but not by abscisic acid or dehydration. *Plant Physiology* 119: 463-470.

Meir, S., PhilosophHadas, S., Lurie, S., Droby, S., Akerman, M., Zauberman, G., Shapiro, B., Cohen, E., y Fuchs, Y. (1996) Reduction of chilling injury in stored avocado, grapefruit, and bell pepper by methyl jasmonate. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique* 74 (6): 870-874.

Miao, Y., Laun, T., Zimmermann, P., y Zentgraf, U. (2004) Targets of the WRKY53 transcription factor and its role during leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* 55: 853-867.

Millar, A. A., Clemens, S., Zachgo, S., Giblin, E. M., Taylor, D. C., y Kunst, L. (1999) CUT1, an Arabidopsis gene required for cuticular wax biosynthesis and pollen fertility, encodes a very-long-chain fatty acid condensing enzyme. *The Plant Cell* 11 (5): 825-838.

Miller, G. y Mittler, R. (2006) Could Heat Shock Transcription Factors Function as Hydrogen Peroxide Sensors in Plants? *Annals of Botany - Invited Review* 98 (2): 279-288.

Miller, G., Shulaev, V., y Mittler, R. (2008) Reactive oxygen signaling and abiotic stress. *Physiologia Plantarum Review - Online Early Articles* doi:10.1111/j.1399-3054.2008.01090.x

Miquel, M., James, D., Dooner, H., y Browse, J. (1993) Arabidopsis requires polyunsaturated lipids for low-temperature survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (13): 6208-6212.

Mittler, R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7: 405-410.

Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., y Van Breusegem, F. (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* 9 (10): 490-498.

Mohammad, A., Miranda-Ríos, J., Navarrete, G. E., Quinto, C., Olivares, J. E., García-Ponce, B., y Sánchez, F. (2004) Nodulin 22 from *Phaseolus vulgaris* protects *Escherichia coli* cells from oxidative stress. *Planta* 219 (6): 993-1002.

Mohapatra, S. S., Poole, R. J., y Dhindsa, R. S. (1988) Abscisic acid-regulated gene-expression in relation to freezing tolerance in Alfalfa. *Plant Physiology* 87: 468-473.

Moller, I. M. (2001) Plant Mitochondria and Oxidative Stress: Electron Transport, NADPH Turnover, and Metabolism of Reactive Oxygen Species. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52: 561-591.

Moller, I. M., Jensen, P. E., y Hansson, A. (2007) Oxidative Modifications to cellular Components in Plants. *Annual Review of Plant Biology* 58: 459-481.

Montaner, D., Tarraga, J., Huerta-Cepas, J., Burguet, J., Vaquerizas, J. M., Conde, L., Mínguez, P., Vera, J., Mukherjee, S., Valls, J., Pujana, M. A. G., Alloza, E., Herrero, J., Al-Shahrour, F., y Dopazo, J. (1-7-2006) Next station in microarray data analysis: GEPAS. *Nucleic Acids Research* 34 (suppl_2): W486-W491.

- Moons, A. (2005) Regulatory and functional interactions of plant growth regulators and plant glutathione S-transferases (GSTs). *Vitaminins and Hormones* 72: 155-202.
- Moran, J. F., Iturbe-Ormaetxe, I., Matamoros, M. A., Rubio, M. C., Clemente, M. R., Brewin, N. J., y Becana, M. (2000) Glutathione and homogluthatione synthetases of legume nodules. Cloning, expression, and subcellular localization. *Plant Physiology* 124: 1381-1392.
- Mowla, S. B., Cuypers, A., Driscoll, S. P., Kiddle, G., Thomson, J., Foyer, C. H., y Theodoulou, F. L. (2006) Yeast complementation reveals a role for an *Arabidopsis thaliana* late embryogenesis abundant (LEA)-like protein in oxidative stress tolerance. *The Plant Journal* 48: 743-756.
- Moyano, E., Martinez-Garcia, J. F., y Martin, C. (1996) Apparent redundancy in myb gene function provides gearing for the control of flavonoid biosynthesis in *Antirrhinum* flowers. *The Plant Cell* 8: 1519-1532.
- Mueller, L. A., Goodman, C. D., Silady, R. A., y Walbot, V. (2000) AN9, a Petunia Glutathione S-Transferase Required for Anthocyanin Sequestration, Is a Flavonoid-Binding Protein. *Plant Physiology* 123 (4): 1561-1570.
- Mulas, M., Lafuente, M. T., y Zacarias, L. (1997) Postharvest temperature conditioning and chilling effects on flavado lipid composition of 'Fortune' mandarin. *Proceedings of the International Society of Citriculture* 2: 1132-1135.
- Mulas, M., Lafuente, M. T., y Zacarias, L. (1996) Chilling effects on fatty acid composition of flavado lipids in stored Fortune mandarins. *Advances in Horticultural Science* 10 (2): 85-90.
- Mullins, E. D., Mccollum, T. G., y McDonald, R. E. (2000) Consequences on ethylene metabolism of inactivating the ethylene receptor sites in diseased non-climacteric fruit. *Postharvest Biology and Technology* 19: 155-164.
- Murata, N., Ishizakinishizawa, Q., Higashi, S., Hayashi, H., Tasaka, Y., y Nishida, I. (1992) Genetically Engineered Alteration in the Chilling Sensitivity of Plants. *Nature* 356 (6371): 710-713.
- Murata, N. y Tasaka, Y. (1997) Glycerol-3-phosphate acyltransferase in plants. *Biochimica et Biophysica Acta-Lipids and Lipid Metabolism* 1348 (1-2): 10-16.
- Murata, T. (1990) Relation of chilling stress to membrane permeability. En: *Chilling injury of horticultural crops*, Wang C.Y.(ed.) CRC Press Inc., Boca Raton, Florida : 201-209.
- Nakashima, K., Tran, L. S. P., Van Nguyen, D., Fujita, M., Maruyama, K., Todaka, D., Ito, Y., Hayashi, N., Shinozaki, K., y Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007) Functional analysis of a NAC-type transcription factor OsNAC6 involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice. *Plant Journal* 51 (4): 617-630.
- Naot, D., Benhayyim, G., Eshdat, Y., y Holland, D. (1995) Drought, Heat and Salt Stress Induce the Expression of A Citrus Homolog of An Atypical Late-Embryogenesis Le5 Gene. *Plant Molecular Biology* 27 (3): 619-622.
- Narusaka, Y., Narusaka, M., Seki, M., Fujita, M., Ishida, J., Nakashima, M., Enju, A., Sakurai, T., Satou, M., Kamiya, A., Park, P., Kobayashi, M., y Shinozaki, K. (2003) Expression profiles of Arabidopsis phospholipase A IIA gene in response to biotic and abiotic stresses. *Plant and Cell Physiology* 44 (11): 1246-1252.
- Narusaka, Y., Narusaka, M., Seki, M., Umezawa, T., Ishida, J., Nakajima, M., Enju, A., y Shinozaki, K. (2004) Crosstalk in the responses to abiotic and biotic stresses in Arabidopsis: Analysis of gene expression in cytochrome P450 gene superfamily by cDNA microarray. *Plant Molecular Biology* 55 (3): 327-342.

- Navarre, D. A. y Wolpert, T. J. (1999) Victorian induction of an apoptotic/senescence-like response in oats. *The Plant Cell* 11: 237-249.
- Neven, L. G., Haskell, D. W., Hofig, A., Li, Q. B., y Guy, C. L. (1993) Characterization of spinach gene responsive to low temperature and water stress. *Plant Molecular Biology* 21: 291-305.
- Nordby, H. E., Purvis, A. C., y Yelenosky, G. (1987) Lipids in Peel of Grapefruit and Resistance to Chilling Injury During Cold-Storage. *HortScience* 22 (5): 915-917.
- Novillo, F., Medina, J., y Salinas, J. (2007) Arabidopsis CBF1 and DBF3 have a different function than CBF2 in cold acclimation and define different gene classes in the CBF regulon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 21002-21007.
- Obenland, D. M., Margosan, D. A., Houck, L. G., y Aung, L. H. (1997) Essential oils and chilling injury in lemon. *HortScience* 32 (1): 108-111.
- Ogawa, D., Nakajima, N., Sano, T., Tamaoki, M., Aono, M., Kubo, A., Kanna, M., Ioki, M., Kamada, H., y Saji, H. (2005) Salicylic acid accumulation under O₃ exposure is regulated by ethylene in tobacco plants. *Plant and Cell Physiology* 46 (7): 1062-1072.
- Ogawa, T., Uchimiya, H., y Kawai-Yamada, M. (2007) Mutual Regulation of *Arabidopsis thaliana* Ethylene-responsive Element Binding Protein and a Plant Floral Homeotic Gene, *APETALA2*. *Annals of Botany* 99 (2): 239-244.
- Okuda, T., Matsuda, Y., Sugawara, M., y Sagisaka, S. (1992) Metabolic response to treatment with cold, paraquat, or 3-amino-1,2,4-triazole in leaves of winter wheat. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 56 (12): 1911-1915.
- 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.
- Ori, N., Juarez, M. T., Jackson, D., Yamaguchi, J., Banowitz, G. M., y Hake, G. M. (1999) Leaf senescence is delayed in tobacco plants expressing the maize homeobox gene *Knotted1* under control of a senescence of flower petals. *The Plant Cell* 11: 1073-1080.
- Orth, K., Xu, Z., Mudgett, M. B., Bao, Z. Q., Palmer, L. E., Bliska, J. B., Mangel, W. F., Staskawicz, B., y Dixon, J. E. (2000) Disruption of signaling by Yersinia effector YopJ, a ubiquitin-like protein protease. *Science* 290: 1594-1597.
- Ortuño, A., Botía, J. M., Fuster, M. D., Porrás, I., GarcíaLidon, A., y del Río, J. A. (1997) Effect of scoparone (6,7-dimethoxycoumarin) biosynthesis on the resistance of tangelo Nova, *Citrus paradisi*, and *Citrus aurantium* fruits against *Phytophthora parasitica*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 2740-2743.
- Orzáez, D. y Granell, A. (1997) DNA fragmentation is regulated by ethylene during carpel senescence in *Pisum sativum*. *Plant Journal* 11: 137-144.
- Pan, S. Q., Czarnecka-Verner, E., y Gurley, W. B. (2000) Role of the TATA binding protein-transcription factor IIB interaction in supporting basal and activated transcription in plant cells. *The Plant Cell* 12 (1): 125-135.
- Pantastico, E. B., Soule, J., y Grierson, W. (1968) Chilling injury in tropical and subtropical fruits: limes and grapefruit. *Tropical Regional American Society of Horticultural Science* 12: 171-183.
- Pareek, A., Singla, S. L., y Grover, I. (1995) Immunological evidence for accumulation of two high molecular weight (104 and 90 kDa) HSPs in response to different stresses in rice and in response to high temperature stress in diverse plant genera. *Plant Molecular Biology* 29: 293-301.

- Park, E. J., Jeknic, Z., Sakamoto, A., DeNoma, J., Yuwansiri, R., Murata, N., y Chen, T. H. H. (2004) Genetic engineering of glycinebetaine synthesis in tomato protects seeds, plants, and flowers from chilling damage. *Plant Journal* 40 (4): 474-487.
- Park, J. E., Park, J. Y., Kim, Y. S., Staswick, P. E., Jeon, J., Yun, J., Kim, S. Y., Kim, J., Lee, Y. H., y Park, C. M. (2007) GH3-mediated auxin homeostasis links growth regulation with stress adaptation response in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* 282: 10036-10046.
- Park, S. U. y Facchini, P. J. (2000) Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation of opium poppy, *Papaver somniferum* L., and California poppy, *Eschscholzia californica* cham., root cultures. *Journal of Experimental Botany* 51 (347): 1005-1016.
- Parkin, K. L. y Kuo, S. J. (1989) Chilling-induced lipid degradation in cucumber (*Cucumis sativa* L. cv. Hybrid C) fruit. *Plant Physiology* 90: 1049-1056.
- Parsell, D. A., Taulien, J., y Lindquist, S. (1993) The Role of Heat-Shock Proteins in Thermotolerance. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 339 (1289): 279-286.
- Paull, R. E. (1990). Chilling injury of crops of tropical and subtropical origin. *Chilling injury of horticultural crops* pp. 17-36.
- Pawlowski, K., Twigg, P., Dobritsa, S., Guan, C., y Mullin, B. C. (1997) A nodule-specific gene family from *Alnus glutinosa* encodes glycine- and histidine-rich proteins expressed in the early stages of actinorhizal nodule development. *Mol Plant Microbe Interact* 10 (5): 656-664.
- Payton, P., Webb, R., Kornyejev, D., Allen, R., y Holaday, A. S. (2001) Protecting cotton photosynthesis during moderate chilling at high light intensity by increasing chloroplastic antioxidant enzyme activity. *Journal of Experimental Botany* 52 (365): 2345-2354.
- Peñuelas, J. y Munné-Bosch, S. (2005) Isoprenoids: an evolutionary pool for photoprotection. *Trends in Plant Science* 10 (4): 166-169.
- Peretó, J., Sendra, R., Pamblanco, M. y Bañó, C. (1996a). Panorama del metabolismo. En: *Fonaments de bioquímica*, Universitat de València (eds.), pp. 197-217.
- Peretó, J., Sendra, R., Pamblanco, M. y Bañó, C. (1996b). Metabolisme de glícids. En: *Fonaments de bioquímica*, Universitat de València (eds.), pp. 219-241.
- Peretó, J., Sendra, R., Pamblanco, M. y Bañó, C. (1996c). El flux biològic de l'energia. En: *Fonaments de bioquímica*, Universitat de València (eds.), pp. 163-176.
- Perras, M. y Sarhan, F. (1989) Synthesis of freezing tolerance proteins in leaves, crown, and roots during cold-acclimation of wheat. *Plant Physiology* 89: 577-585.
- Pesis, E., Ackerman, M., Ben-Arie, R., Feygenberg, O., Feng, X., Apelbaum, A., Goren, R., y Prusky, D. (2002) Ethylene involvement in chilling injury symptoms of avocado during cold storage. *Postharvest Biology and Technology* 24: 171-181.
- Peterson, M., Brodersen, P., Naested, H., y et al. (2000) *Arabidopsis* map kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell* 103: 1111-1120.
- Petracek, P. D., Dou, H. T., y Pao, S. (1998a) The influence of applied waxes on postharvest physiological behavior and pitting of grapefruit. *Postharvest Biology and Technology* 14 (1): 99-106.
- Petracek, P. D., Montalvo, L., Dou, H., y Davis, C. (1998b) Postharvest pitting of 'Fallglo' tangerine. *Journal of American Society of Horticultural Science* 123: 130-135.

Plaza, P., Sanbruno, A., Usall, A., Lamarca, N., Torres, R., Pons, J., y Viñas, I. (2004) Integration of curing treatments with degreening to control the main postharvest diseases of clementine mandarins. *Postharvest Biology and Technology* 34(1): 29-37.

Pnueli, L., Liang, H., Rozenberg, M., y Mittler, R. (2003) Growth suppression, altered stomatal responses, and augmented induction of heat shock proteins in cytosolic ascorbate peroxidase (Apx1)-deficient Arabidopsis plants. *Plant Journal* 34: 187-203.

Porat, R., Pasentsis, K., Rozenzvieg, D., Gerasopoulos, D., Falara, V., Samach, A., Lurie, S., y Kanellis, A. K. (2004a) Isolation of a dehydrin cDNA from orange and grapefruit citrus fruit that is specifically induced by the combination of heat followed by chilling temperatures. *Physiologia Plantarum* 120 (2): 256-264.

Porat, R., Pavoncello, D., Ben-Hayyim, G., y Lurie, S. (2002a) A heat treatment induced the expression of a Na⁺/H⁺ antiport gene (cNHX1) in citrus fruit. *Plant Science* 162 (6): 957-963.

Porat, R., Pavoncello, D., Lurie, S., y Mccollum, T. G. (2002b) Identification of a grapefruit cDNA belonging to a unique class of citrus dehydrins and characterization of its expression patterns under temperature stress conditions. *Physiologia Plantarum* 115 (4): 598-603.

Porat, R., Pavoncello, D., Peretz, J., Ben Yehoshua, S., y Lurie, S. (2000a) Effects of various heat treatments on the induction of cold tolerance and on the postharvest qualities of 'Star Ruby' grapefruit. *Postharvest Biology and Technology* 18 (2): 159-165.

Porat, R., Pavoncello, D., Peretz, J., Weiss, B., Daus, A., Cohen, L., Ben Yehoshua, S., Fallik, E., Droby, S., y Lurie, S. (2000b) Induction of resistance to *Penicillium digitatum* and chilling injury in 'Star Ruby' grapefruit by a short hot-water rinse and brushing treatment. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 75 (4): 428-432.

Porat, R., Weiss, B., Cohen, L., Daus, A., y Aharoni, N. (2004b) Reduction of postharvest rind disorders in citrus fruit by modified atmosphere packaging. *Postharvest Biology and Technology* 33 (1): 35-43.

Porat, R., Weiss, B., Cohen, L., Daus, A., y Cohen, E. (2003) Effects of intermittent warming and temperature conditioning on the postharvest quality of 'Oroblanco' citrus fruit following long-term cold storage. *HortTechnology* 13 (1): 70-74.

Porat, R., Weiss, B., Cohen, L., Daus, A., Goren, R., y Droby, S. (1999) Effects of ethylene and 1-methylcyclopropene on the postharvest qualities of 'Shamouti' oranges. *Postharvest Biology and Technology* 15 (2): 155-163.

Porta, H. y Rocha-Sosa, M. (2002) Plant Lipoxygenases. Physiological and Molecular Features. *Plant Physiology* 130: 15-21.

Prandl, R., Hinderhofer, K., Eggers-Schumacher, G., y Schoffl, F. (1998) HSF3, a new heat shock factor from Arabidopsis thaliana, derepresses the heat shock response and confers thermotolerance when overexpressed in transgenic plants. *Molecular Genetics and Genomics* 258: 269-278.

Provart, N. J., Gil, P., Chen, W. Q., Han, B., Chang, H. S., Wang, X., y Zhu, T. (2003) Gene expression phenotypes of Arabidopsis associated with sensitivity to low temperatures. *Plant Physiology* 132 (2): 893-906.

Pruitt, R. E., Vielle-Calzada, J. P., Ploense, S. E., Grossniklaus, U., y Lolle, S. J. (2000) FIDDLEHEAD, a gene required to suppress epidermal cell interactions in Arabidopsis, encodes a putative lipid biosynthetic enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (3): 1311-1316.

- Purvis, A. C. (1984) Importance of Water-Loss in the Chilling Injury of Grapefruit Stored at Low-Temperature. *Scientia Horticulturae* 23 (3): 261-267.
- Purvis, A. C. (2001) Reduction of superoxide production by mitochondria oxidizing NADH in the presence of organic acids. *Journal of Plant Physiology* 158: 159-165.
- Purvis, A. C. y Grierson, W. (1982) Accumulation of Reducing Sugar and Resistance of Grapefruit Peel to Chilling Injury As Related to Winter Temperatures. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 107 (1): 139-142.
- Purvis, A. C., Kawada, K., y Grierson, W. (1979) Relationship Between Midseason Resistance to Chilling Injury and Reducing Sugar Level in Grapefruit Peel. *HortScience* 14 (3): 227-229.
- Purvis, A. C., Shewfelt, R. L., y Gegogee, J. W. (1995) Superoxide Production by Mitochondria Isolated from Green Bell Pepper Fruit. *Physiologia Plantarum* 94 (4): 743-749.
- Qiu, Y. P., Jing, S. J., Fu, J., Li, L., y Yu, D. Q. (2004) Cloning and analysis of expression profile of 13 WRKY genes in rice. *Chinese Science Bulletin* 49 (20): 2159-2168.
- Rabbani, M. A., Maruyama, K., Abe, H., Khan, M. A., Katsura, K., Ito, Y., Yoshiwara, K., Seki, M., Shinozaki, K., y Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003) Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA gel-blot analyses. *Plant Physiology* 133 (4): 1755-1767.
- Raison, J. K., Lyons, J. M., Mehlhorn, R. J., y Keith, A. D. (1971) Temperature-induced phase changes in mitochondrial membranes detected by spin labeling. *Journal of Biological Chemistry* 246: 4039
- Riov, J. y Yang, S. F. (1982) Autoinhibition of ethylene production in citrus peel disks: suppression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthesis. *Plant Physiology* 69: 687-690.
- Rivera, F., Pelayo-Zaldivar, C., Díaz de León, F., Buentello, B., Castillo-Rivera, M., y Pérez-Flores, L. J. (2006) Cold-conditioning treatment reduces chilling injury in mexican limes (*Citrus aurantifolia* S.) stored at different temperatures. *Journal of Food Quality* 30: 121-134.
- Rizhsky, L., Davletova, S., Liang, H. J., y Mittler, R. (2004) The zinc finger protein Zat12 is required for cytosolic ascorbate peroxidase 1 expression during oxidative stress in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry* 279 (12): 11736-11743.
- Rizhsky, L., Liang, H., y Mittler, R. (2002) The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. *Plant Physiology* 130 (3): 1143-1151.
- Robatzek, S. y Somssich, I. E. (2002) Targets of AtWRKY6 regulation during plant senescence and pathogen defense. *Genes and Development* 16: 1139-1149.
- Robatzek, S. y Somssich, I. E. (2001) A new member of the Arabidopsis transcription factor family, AtWRKY6, is associated with both senescence- and defence-related processes. *Plant Journal* 28: 123-133.
- Roby, D., Toppan, A., y Esquerré-Tugayé, M. T. (1986) Cell surfaces in plant-microorganism interactions. VI. Elicitors of ethylene from *Colletotrichum lagenarium* trigger chitinase activity in melon plants. *Plant Physiology* 81: 228-233.
- Rodov, V., Ben Yehoshua, S., Albagli, R., y Fang, D. Q. (1995) Reducing chilling injury and decay of stored citrus fruit by hot water dips. *Postharvest Biology and Technology* 5 (1-2): 119-127.

Rodov, V., Ben Yehoshua, S., Kim, J. J., Shapiro, R., y Ittah, Y. (1992) Ultraviolet illumination induces scoparone production in kumquat and orange fruit and improves decay resistance. *Journal of American Society of Horticultural Science* 117: 788-792.

Rodrigo, M. J., Alquezar, B., y Zacarias, L. (2006) Cloning and characterization of two 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase genes, differentially regulated during fruit maturation and under stress conditions, from orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Journal of Experimental Botany* 57 (3): 633-643.

Rodrigo, M. J., Marcos, J. F., y Zacarias, L. (2004) Biochemical and molecular analysis of carotenoid biosynthesis in flavedo of orange (*Citrus sinensis* L.) during fruit development and maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52 (22): 6724-6731.

Rodrigo, M. J. y Zacarias, L. (2007) Effect of postharvest ethylene treatment on carotenoid accumulation and the expression of carotenoid biosynthetic genes in the flavedo of orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) fruit. *Postharvest Biology and Technology* 43: 14-22.

Ross, C. A., Liu, Y., y Shen, Q. J. (2007) The *WRKY* Gene Family in Rice (*Oryza sativa*). *Journal of Integrative Plant Biology* 49 (6): 827-842.

Routaboul, J. M., Fischer, S. F., y Browse, J. (2000) Trienoic fatty acids are required to maintain chloroplast function at low temperatures. *Plant Physiology* 124 (4): 1697-1705.

Rozenzweig, D., Elmaci, C., Samach, A., Lurie, S., y Porat, R. (2004) Isolation of four heat shock protein cDNAs from grapefruit peel tissue and characterization of their expression in response to heat and chilling temperature stresses. *Physiologia Plantarum* 121 (3): 421-428.

Ruelland, E., Cantrel, C., Gawer, M., Kader, J. C., y Zachowski, A. (2002) Activation of phospholipase C and D is an early response to cold exposure in *Arabidopsis* suspension cells. *Plant Physiology* 130 (2): 999-1007.

Rushton, P. J., Torres, J. T., Parniske, M., Wernert, P., Hahlbrock, K., y Somssich, I. E. (1996) Interaction of elicitor-induced DNA-binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley PR1 genes. *Embo Journal* 15: 5690-5700.

Sabehat, A., Lurie, S., y Weiss, D. (1998a) Isolation and characterization of a heat-induced gene, *hcit2*, encoding a novel 16.5kDa protein: expression coincides with heat-induced tolerance to chilling stress. *Plant Molecular Biology* 36 (6): 935-939.

Sabehat, A., Weiss, D., y Lurie, S. (1996) The correlation between heat-shock protein accumulation and persistence and chilling tolerance in tomato fruit. *Plant Physiology* 110 (2): 531-537.

Sabehat, A., Weiss, D., y Lurie, S. (1998b) Heat-shock proteins and cross-tolerance in plants. *Physiologia Plantarum* 103 (3): 437-441.

Sachs, M. M. y Ho, T. H. D. (1986) Alteration of gene expression during environmental stress in plants. *Rev.Plant Physiol* 37: 363-376.

Saeed, A. I., Sharov, V., White, J., Li, J., Liang, W., Bhagabati, N., Braisted, J., Klapa, M., Currier, T., Thiagarajan, M., Sturn, A., Snuffin, M., Rezantsev, A., Popov, D., Ryltsov, A., Kostukovich, E., Borisovsky, I., Liu, Z., Vinsavich, A., Trush, V., y Quackenbush, J. (2003) TM4: A free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques* 34 (2): 374-378.

Sala, J. M. (1998) Involvement of oxidative stress in chilling injury in cold-stored mandarin fruits. *Postharvest Biology and Technology* 13 (3): 255-261.

Sala, J. M., Cuñat, P., Collado, M., y Moncholi, V. (1992a) Effect on nitrogenous fertilization (quantity and nitrogen form) in precocity of colour change on navelina oranges. *Proceedings of the International Society of Citriculture* : 598-602.

- Sala, J. M. y Lafuente, M. T. (2004) Antioxidant enzymes activities and rindstaining in 'Navelina' oranges as affected by storage relative humidity and ethylene conditioning. *Postharvest Biology and Technology* 31 (3): 277-285.
- Sala, J. M. y Lafuente, M. T. (2000) Catalase enzyme activity is related to tolerance of mandarin fruits to chilling. *Postharvest Biology and Technology* 20 (1): 81-89.
- Sala, J. M. y Lafuente, M. T. (1999) Catalase in the heat-induced chilling tolerance of cold-stored Hybrid Fortune mandarin fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47 (6): 2410-2414.
- Sala, J. M., Lafuente, T., y Cunat, P. (1992b) Content and Chemical-Composition of Epicuticular Wax of Navelina Oranges and Satsuma Mandarins As Related to Rindstaining of Fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 59 (4): 489-495.
- Sala, J. M., Sanchez-Ballesta, M. T., Alferez, F., Mulas, M., Zacarias, L., y Lafuente, M. T. (2005) A comparative study of the postharvest performance of an ABA-deficient mutant of oranges II. Antioxidant enzymatic system and phenylalanine ammonia-lyase in non-chilling and chilling peel disorders of citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology* 37: 232-240.
- Salvador, A., Carvalho, C. P., Monterde, A., y Martinez-Javega, J. M. (2006) Note. 1-MCP effect on chilling injury development in 'Nova' and 'Ortanique' mandarins. *Food Science and Technology International* 12 (2): 165-170.
- Salvador, A., Cuquerella, J., y Navarro, P. (2000) Susceptibility of "Ortanique" citrus fruit harvested in Valencia to chilling injury during storage. *Proceedings of Refrigeration Science and technology: Improving Postharvest Technology of Fruits, Vegetables and Ornamentals*. 2: 498-505.
- Sambrock, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual*, (2^a ed.) Cold Spring Harbour, New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Sanchez-Ballesta, M. T. (1998) Caracterización molecular de los daños por frío en frutos de mandarina Fortune. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia, España
- Sanchez-Ballesta, M. T., Gosalbes, M. J., Rodrigo, M. J., Granell, A., Zacarias, L., y Lafuente, M. T. (2006) Characterization of a [β]-1,3-glucanase from citrus fruit as related to chilling-induced injury and ethylene production. *Postharvest Biology and Technology* 40 (2): 133-140.
- Sanchez-Ballesta, M. T., Lafuente, M. T., Zacarias, L., y Granell, A. (2000a) Involvement of phenylalanine ammonia-lyase in the response of Fortune mandarin fruits to cold temperature. *Physiologia Plantarum* 108 (4): 382-389.
- Sanchez-Ballesta, M. T., Lluch, Y., Gosalbes, M. J., Zacarias, L., Granell, A., y Lafuente, M. T. (2003) A survey of genes differentially expressed during long-term heat-induced chilling tolerance in citrus fruit. *Planta* 218 (1): 65-70.
- Sanchez-Ballesta, M. T., Rodrigo, M. J., Lafuente, M. T., Granell, A., y Zacarias, L. (2004) Dehydrin from citrus, which confers in vitro dehydration and freezing protection activity, is constitutive and highly expressed in the flavedo of fruit but responsive to cold and water stress in leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52 (7): 1950-1957.
- Sanchez-Ballesta, M. T., Zacarias, L., Granell, A., y Lafuente, M. T. (2000b) Accumulation of PAL transcript and PAL activity as affected by heat-conditioning and low-temperature storage and its relation to chilling sensitivity in mandarin fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (7): 2726-2731.
- Sanchez-Ballesta, M. T., Zacarias, L., Granell, A., y Lafuente, M. T. (2008) Beta-1,3-glucanase gene expression as a molecular marker for postharvest physiological disorders in Citrus fruit and its hormonal regulation. *Postharvest Biology and Technology* 48 (1): 146-149.

Sapitnitskaya, M., Maul, P., McCollum, G. T., Guy, C. L., Weiss, B., Samach, A., y Porat, R. (2006) Postharvest heat and conditioning treatments activate different molecular responses and reduce chilling injuries in grapefruit. *Journal of Experimental Botany* 57 (12): 2943-2953.

Saruyama, H. y Tanida, M. (1995) Effect of chilling on activated oxygen-scavenging enzymes in low temperature-sensitive and -tolerant cultivars in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Science* 109: 105-113.

Sattler, S. E., Mène-Saffrané, L., Farmer, E. E., Krischke, M., Mueller, M. J., y DellaPenna, D. (2006) Nonenzymatic Lipid Peroxidation Reprograms Gene Expression and Activities Defense Markers in *Arabidopsis* Tocopherol-Deficient Mutants. *The Plant Cell* 18: 3706-3720.

Scandalios, J. G. (1990) Response of plant antioxidant genes to environmental stress. *Adv Genet* 28: 1-41.

Schaffer, M. A. y Fischer, R. L. (1990) Transcriptional Activation by Heat and Cold of a Thiol Protease Gene in Tomato. *Plant Physiology* 93 (4): 1486-1491.

Schaller, F., Biesgen, C., Müssig, C., Altmann, T., y Weiler, W. (2000) 12-Oxophytodienoate reductase 3 (ODR3) is the isoenzyme involved in jasmonate biosynthesis. *Planta* 210 (6): 979-984.

Scheres, B., van Engelen, F., van der Knaap, E., van de Wiel, C., van Kammen, A., y Bisseling, T. (1990) Sequential induction of nodulin gene expression in the developing pea nodule. *The Plant Cell* 2: 687-700.

Schiffmann-Nadel, M., Chalutz, E., Waks, J., y Dagan, M. (1975) Reduction of chilling injury in grapefruit by thiabendazole and benomyl during long-term storage. *Journal of American Society of Horticultural Science* 100: 270-272.

Schirra, M. (1993) Changes in fatty acid composition of flavedo tissue of 'Star Ruby' grapefruits in response to chilling and non-chilling storage temperatures. *Agricoltura Mediterranea* 123: 286-289.

Schirra, M., Agabbio, M., D'hallevin, G., Pala, M., y Ruggiu, R. (1997) Response of Tarocco oranges to picking date, postharvest hot water dips, and chilling storage temperature. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45 (8): 3216-3220.

Schirra, M. y Ben Yehoshua, S. (1999) Heat treatments: A possible new technology in citrus handling. Challenges and prospects. In: *Advances in postharvest diseases and disorders control of citrus fruit*. Maria Schirra (eds), Research Singnpost : 133-147.

Schirra, M., Cabras, P., Angioni, A., D'hallevin, G., y Pala, M. (2002) Residue uptake and storage responses of tarocco blood oranges after preharvest thiabendazole spray and postharvest heat treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (8): 2293-2296.

Schirra, M. y Cohen, E. (1999) Long-term storage of 'Olinda' oranges under chilling and intermittent warming temperatures. *Postharvest Biology and Technology* 16 (1): 63-69.

Schirra, M. y D'hallevin, G. (1997) Storage performance of fortune mandarins following hot water dips. *Postharvest Biology and Technology* 10 (3): 229-238.

Schirra, M. y Mulas, M. (1995b) Fortune mandarin quality following prestorage water dips and intermittent warming during cold storage. *HortScience* 30 (3): 560-561.

Schirra, M. y Mulas, M. (1995a) Improving Storability of Tarocco Oranges by Postharvest Hot-Dip Fungicide Treatments. *Postharvest Biology and Technology* 6 (1-2): 129-138.

Schirra, M., Mulas, M., Fadda, A., y Cauli, E. (2004) Cold quarantine responses of blood oranges to postharvest hot water and hot air treatments. *Postharvest Biology and Technology* 31 (2): 191-200.

- Schneider, J. C., Nielsen, E., y Somerville, C. (1995) A chilling-sensitive mutant of *Arabidopsis* is deficient in chloroplast protein accumulation at low temperature. *Plant Cell and Environment* 18: 23-32.
- Schulman, Y. y Monselise, S. P. (1970) Some studies of the cuticular wax of citrus fruit. *Journal of Horticultural Science* 45: 471-478.
- Seki, M., Kamei, A., Satou, M., Sakurai, T., Fujita, M., Oono, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., y Shinozaki, K. (2003) Transcriptome analysis in abiotic stress conditions in higher plants. *Topics in Current Genetics* 4: 271-295.
- Seki, M., Narusaka, M., Abe, H., Kasuga, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Carninci, P., Hayashizaki, Y., y Shinozaki, K. (2001) Monitoring the expression pattern of 1300 *Arabidopsis* genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray. *The Plant Cell* 13: 61-72.
- Seki, M., Narusaka, M., Ishida, J., Nanjo, T., Fujita, M., Oono, Y., Kamiya, A., Nakajima, M., Enju, A., Sakurai, T., Satou, M., Akiyama, K., Taji, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Carninci, P., Kawai, J., Hayashizaki, Y., y Shinozaki, K. (2002) Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant Journal* 31 (3): 279-292.
- Senaratna, T., McKersie, B. D., y Stinson, R. H. (1985) Simulation of dehydration injury to membranes from soybean axes by free radicals. *Plant Physiology* 77: 472-477.
- Serrano, M., Martínez-Madrid, M. C., Martínez, G., Riqueime, F., Pretel, M. T., y Romojaró, F. (1996) Review: Role of polyamines in chilling injury of fruit and vegetables. *Food Science and Technology International* 2 (4): 195-199.
- Seve, M., Chimienti, F., y Favier, A. (2002) Role of intracellular zinc in programmed cell death. *Pathologie Biologie (Paris)* 50 (3): 212-221.
- Shao, H. B., Liang, Z. S., y Shao, M. A. (2005) LEA proteins in higher plants: Structure, function, gene expression and regulation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 45: 131-135.
- Shore, P. y Sharrocks, A. D. (1995) The MADS-box Family of Transcription Factors. *European Journal of Biochemistry* 229 (1): 1-13.
- Siegenthaler, P. A. (1973) Change in pH dependence and sequential inhibition of photosynthetic activity in chloroplasts by unsaturated fatty acids. *Biochemical and Biophysical Acta* 305: 153-162.
- Sierra, C. C., Molina, E. B., Zaldívar, C. P., Flores, L. P., y García, L. P. D. (1993) Effect of harvesting season and postharvest treatments on storage life of Mexican limes (*Citrus aurantifolia* Swingle). *Journal of Food Quality* 16 (5): 339-354.
- Silvius, J. R. (1982) Thermotropic phase transitions of pure lipids in model membranes and their modification by membrane proteins. *Lipid-protein interactions*, Jost, P.C. and Griffith, O.H. (eds.). Wiley, New York 2: 239-281.
- Sisler, E. C. y Serek, M. (1997) Inhibitors of ethylene responses in plants at the receptor level: recent developments. *Physiologia Plantarum* 100: 577-582.
- Smith, A. P., Nourizadeh, S. D., Peer, W. A., Xu, J., Bandyopadhyay, A., Murphy, A. S., y Goldsbrough, P. B. (2003) *Arabidopsis* AtGSTF2 is regulated by ethylene and auxin, and encodes a glutathione S-transferase that interacts with flavonoids. *Plant Journal* 36 (4): 433-442.

Solomon, M., Belenghi, B., Delledonne, M., Menachem, E., y Levine, A. (1999) The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. *The Plant Cell* 11: 431-443.

Somerville, C. (1995) Direct tests of the role of membrane lipid composition in low-temperature-induced photoinhibition and chilling sensitivity in plants and cyanobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 6215-6218.

Sorger, P. K. (1991) Heat Shock Factor and Heat Shock Response. *Cell* 65: 363-366.

Spalding, D. H. y Reeder, W. F. (1983) Conditioning 'Tahiti' limes to reduce chilling injury. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 96: 231-232.

Stewart, I. y Wheaton, T. A. (1971) Effects of ethylene and temperature on carotenoid pigmentation of citrus peel. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 84: 264-266.

Stewart, I. y Wheaton, T. A. (1972) Carotenoid in Citrus. Their Accumulation Induced by Ethylene. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 20(2): 448-449.

Strozycki, P. M., Szczurek, A., Lotocka, B., Figlerowicz, M., y Legocki, A. B. (2007) Ferritins and nodulation in *Lupinus luteus*: iron management in indeterminate type nodules. *Journal of Experimental Botany* 58 (12): 3145-3153.

Sung, D. Y., Vierling, E., y Guy, C. L. (2001) Comprehensive expression profile analysis of the *Arabidopsis* HSP70 gene family. *Plant Physiology* 123: 789-800.

Swain, T. (1977) Secondary compounds as protective agents. *Annual Review of Plant Physiology* 28: 479-501.

Tadeo, J. L., Ortiz, J. M., y Estelles, A. (1987) Sugar changes in clementine and orange fruit during ripening. *Journal of Horticultural Science* 62: 531-537.

Takahama, U. (2004) Oxidation of vacuolar and apoplastic phenolic substrates by peroxidase: Physiological significance of the oxidation reactions. *Phytochemistry Reviews* 3: 207-219.

Tapia-Alamos, L. (2002) Función de las metalotioneínas en el metabolismo celular del cobre. Tesis Doctoral. Universidad de Chile, Chile

Theil, E. C. (2008) Ferritin: structure, gene regulation, and cellular function in animals, plants, and microorganisms. *Annual Review of Biochemistry* 56: 289-315.

Theissen, G., Becker, A., Di Rosa, A., Kanno, A., Kim, J. T., Münster, T., Winter, K. U., y Saedler, H. (2000) A short history of MADS-box genes in plants. *Plant Molecular Biology* 42 (1): 115-149.

Thomashow, M. F. (1994) *Arabidopsis thaliana* as a model for studying mechanisms of plant cold tolerance. In: Meyerowitz EM, Somerville CR (eds) *Arabidopsis. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY*: 807-834.

Thomashow, M. F. (1999) PLANT COLD ACCLIMATION: Freezing Tolerance Genes and Regulatory Mechanisms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50: 571-599.

Thomashow, M. F. (2001) So what's new in the field on plant cold acclimation? Lots! *Plant Physiology* 125: 89-93.

Touati, D., Jacques, M., Tardat, B., Bouchard, L., y Despied, S. (1995) Lethal Oxidative Damage and Mutagenesis Are Generated by Iron in *Afur* Mutants of *Escherichia coli*: Protective Role of Superoxide Dismutase. *Journal of Bacteriology* 177 (9): 2305-2314.

- Treeby, M. T., Storey, R., y Bevington, K. B. (1995) Rootstock, seasonal, and fruit size influences on the incidence and severity of albedo breakdown in navel oranges. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 35: 103-108.
- Tusher, V. G., Tibshirani, R., y Chu, G. (2001) Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (9): 5116-5121.
- Ulker, B. y Somssich, I. E. (2004) WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function. *Current Opinion in Plant Biology* 7 (5): 491-498.
- van Breusegem, F., Slooten, L., Stassart, J. M., Botterman, J., Moens, T., Van Montagu, M., y Inze, D. (1999a) Effects of overproduction of tobacco MnSOD in maize chloroplasts on foliar tolerance to cold and oxidative stress. *Journal of Experimental Botany* 50 (330): 71-78.
- van Breusegem, F., Slooten, L., Stassart, J. M., Moens, T., Botterman, J., Van Montagu, M., y Inze, D. (1999b) Overproduction of Arabidopsis thaliana FeSOD confers oxidative stress tolerance to transgenic maize. *Plant and Cell Physiology* 40 (5): 515-523.
- van Doorn, W. G. y Woltering, E. J. (2008) FOCUS REVIEW PAPER. Physiology and molecular biology of petal senescence. *Journal of Experimental Botany* 59 (3): 453-480.
- van Loon, L. C. y Van Strien, E. A. (1999) The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55: 85-97.
- Vanderauwera, S., Zimmermann, P., Rombauts, S., Vandenabeele, S., Langebartels, C., Grissem, W., Inzé, D., y Van Breusegem, F. (2005) Genome-wide analysis of hydrogen peroxide-regulated gene expression in Arabidopsis reveals a high light-induced transcriptional cluster involved in anthocyanin biosynthesis. *Plant Physiology* 139: 806-821.
- Vaquerizas, J. M., Dopazo, J., y az-Urriarte, R. (2004) DNMAID: web-based diagnosis and normalization for microarray data. *Bioinformatics* 20 (18): 3656-3658.
- Vercher, R., Tadeo, F. R., Almela, V., Zaragoza, S., Primo-Millo, E., y Agustí, M. (1994) Rind structure, epicuticular wax morphology, and water permeability of Fortune mandarin fruit affected by peel pitting. *Annals of Botany* 74: 619-625.
- Vierling, E. (1991) The roles of heat shock proteins in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42: 579-620.
- von Koskull-Döring, P., Scharf, K. D., y Nover, L. (2007) The diversity of plant heat stress transcription factors. *Trends in Plant Science* 12 (10): 452-457.
- Vrebalov, J., Ruezinsky, D., Padmanabhan, V., White, R., Medrano, D., Drake, R., Schuch, W., y Giovannoni, J. (2002) A MADS-Box Gene Necessary for Fruit Ripening at the Tomato Ripening-Inhibitor (*Rin*) Locus. *Science* 296 (296): 343-346.
- Waites, R. y Hudson, A. (1995) *phantastica*: a gene required for dorsiventrality of leaves in *Antirrhinum majus*. *Development* 121: 2143-2154.
- Wang, C. Y. (1993) Approaches to reduce chilling injury of fruits and vegetables. *Horticultural Reviews* 15: 63-132.
- Wang, C. Y. (1982) Physiological and Biochemical Responses of Plants to Chilling Stress. *HortScience* 17 (2): 173-186.

Wang, C. Y. (1994) Chilling Injury of Tropical Horticultural Commodities. *HortScience* 29 (9): 986-988.

Wang, C. Y., Bowen, J. H., Weir, I. E., Allan, A. C., y Ferguson, I. B. (2001) Heat-induced protection against death of suspension-cultured apple fruit cells exposed to low temperature. *Plant Cell and Environment* 24 (11): 1199-1207.

Wang, L. J., Pei, Z. Y., Tian, Y. C., y He, C. Z. (2005a) OsLSD1, a rice zinc finger protein, regulates programmed cell death and callus differentiation. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18 (5): 375-384.

Wang, X. (2002) Phospholipase D in hormonal and stress signalling. *Current Opinion in Plant Biology* 5 (5): 408-414.

Wang, Y. J., Wisniewski, M., Meilan, R., Cui, M. G., Webb, R., y Fuchigami, L. (2005b) Overexpression of cytosolic ascorbate peroxidase in tomato confers tolerance to chilling and salt stress. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 130 (2): 167-173.

Wardowski, W. F., Albrigo, L. D., Grierson, W., y Barmore, C. R. (1975) Chilling injury and decay of grapefruit as affected by thiabendazole, benomyl and CO₂. *HortScience* 10: 381-383.

Wardowski, W. F., Grierson, W., y Edwards, G. J. (1973) Chilling injury of stored limes and grapefruit as affected by differentially permeable packing films. *HortScience* 8: 173-175.

Wardowski, W. F., Grierson, W., y Showalter, R. K. (1988) Handling and processing section, FSHS role in the Florida fresh fruit and vegetable industries. *Proceedings of the International Society of Citriculture* Annual meeting of the Florida State Horticulture Society

Watkins, C. B. (2002) Ethylene synthesis, mode of action, consequences and control. In: *Knee, M. (Ed.), Fruit Quality and its Biological Basis. Sheffield Academic Press* : 180-224.

Weber, H., Bernhardt, A., Dieterle, M., Hano, P., Mutlu, A., Estelle, M., Genschik, P., y Hellmann, H. (2005) Arabidopsis AtCUL3a and CUL3b form complexes with members of the BTB/POZ-MATH protein family. *Plant Physiology* 137 (1): 83-93.

Wei, W., Zhang, Y., Han, L., Guan, Z., y Chai, T. (2008) A novel WRKY transcription factor from *Thlaspi caerulescens* negatively regulates the osmotic stress tolerance of transgenic tobacco. *Plant Cell Reports* 27 (4): 795-803.

Welti, R., Li, W., Li, M., Sang, Y., Biesiada, H., Zhou, H. E., Rajashekar, C. B., Williams, T. D., y Wang, X. (2002) Profiling membrane lipids in plant stress responses. Role of phospholipase D alpha in freezing-induced lipid changes in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry* 277 (35): 31994-32002.

Werck-Reichhart, D., Bak, S., y Paquette, S. (2002) Cytochromes P450. *American Society of Plant Biologists. The Arabidopsis Book*

White, A. J., Dunn, M. A., Brown, K., y Hughes, M. A. (1994) Comparative-analysis of genomic sequence and expression of a lipid transfer protein gene family in winter barley. *Journal of Experimental Botany* 45: 1885-1892.

Wild, B. L. (1993) Reduction of chilling injury in grapefruit and oranges stored at 1-degrees-c by prestorage hot-dip treatments, curing, and wax application. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 33 (4): 495-498.

Wise, M. J. (2003) Leaping to conclusions: a computational reanalysis of late embryogenesis abundant proteins and their possible roles. *BMC Bioinform* 4: 52

- Wise, M. J. y Tunnacliffe, A. (2004) POPP the question: what do LEA proteins do? *Trends in Plant Science* 9: 13-17.
- Wise, R. R. y Naylor, A. W. (1987a) Chilling-Enhanced Photooxidation. *Plant Physiology* 83: 272-277.
- Wise, R. R. y Naylor, A. W. (1987b) Chilling-Enhanced Photooxidation : Evidence for the Role of Singlet Oxygen and Superoxide in the Breakdown of Pigments and Endogenous Antioxidants. *Plant Physiology* 83 (2): 278-282.
- Wittstock, U. y Halkier, B. A. (2000) Cytochrome P450 CYP79B2 from *Arabidopsis thaliana* L. Catalyzes the conversion of L-phenylalanine to phenylacetaldoxime in the biosynthesis of benzylglucosinolate. *Journal of Biological Chemistry* 275: 14659-14666.
- Wolter, F. P., Schmidt, R., y Heinz, E. (1992) Chilling sensitivity of *Arabidopsis thaliana* with genetically engineered membrane lipids. *Embo Journal* 11: 4685-4692.
- Wolf, A. B., Watkins, C. B., Bowen, J. H., Lay-Yee, M., Maindonal, J. H., y Ferguson, B. (1995) Reducing external chilling injury in stored 'Hass' avocados with dry treatments. *Journal of American Society of Horticultural Science* 120: 1050-1056.
- Wu, C. (1995) Heat Shock Transcription Factors: Structure and Regulation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 11: 441-469.
- Wu, G. H., Robertson, A. J., Liu, X. J., Zheng, P., Wilen, R. W., Nesbitt, N. T., y Gusta, L. V. (2004) A lipid transfer protein gene BG-14 is differentially regulated by abiotic stress, ABA, anisomycin, and sphingosine in bromegrass (*Bromus inermis*). *Journal of Plant Physiology* 161 (4): 449-458.
- Wu, J. R., Lightner, J., Warwick, N., y Browse, J. (1997) Low-temperature damage and subsequent recovery of *fab1* mutant *Arabidopsis* exposed to 2 degrees C. *Plant Physiology* 113 (2): 347-356.
- Yamagami, T., Tsuchisaka, A., Yamada, K., Haddon, W. F., Harden, L. A., y Theologis, A. (2003) Biochemical Diversity among the 1-Amino-cyclopropane-1-Carboxylate Synthase Isozymes Encoded by the *Arabidopsis* Gene Family. *Journal of Biological Chemistry* 278 (49): 49102-49112.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. y Shinozaki, K. (2006) Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annual Review of Plant Biology* 57: 781-803.
- Yamasaki, K., Kigawa, T., Inoue, M., Tateno, M., Yamasaki, T., Yabuki, T., Aoki, M., Seki, E., Matsuda, T., Tomo, Y., Hayami, N., Terada, T., Shirouzu, M., Tanaka, A., Seki, M., Shinozaki, K., y Yokoyama, S. (1-3-2005) Solution Structure of an *Arabidopsis* WRKY DNA Binding Domain. *The Plant Cell* 17 (3): 944-956.
- Yang, S. H., Berberich, T., Sano, H., y Kusano, T. (2001) Specific association of transcripts of *tbzF* and *tbz17*, tobacco genes encoding basic region leucine zipper-type transcriptional activators, with guard cells of senescing leaves and/or flowers. *Plant Physiology* 127: 23-32.
- Yasuda, E., Ebinuma, H., y Wabiko, H. (1997) A novel glycine-rich/hydrophobic 16 kDa polypeptide gene from tobacco: Similarity to proline-rich protein genes and its wound-inducible and developmentally regulated expression. *Plant Molecular Biology* 33 (4): 667-678.
- Yazaki, K. (2006) ABC transporters involved in the transport of plant secondary metabolites. *Febs Letters - Minireview* 580: 1183-1191.
- Yazaki, K. (2005) Transporters of secondary metabolites. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 301-307.

Yephremov, A., Wisman, E., Huijser, C., Wellesen, K., y Saedler, H. (1999) Characterization of the FIDDLEHEAD gene of Arabidopsis reveals a link between adhesion response and cell differentiation in the epidermis. *The Plant Cell* 11 (11): 2187-2201.

Yokoi, S., Higashi, S., Kishitani, S., Murata, N., y Toriyama, K. (1998) Introduction of the cDNA for Arabidopsis glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT) confers unsaturation of fatty acids and chilling tolerance of photosynthesis on rice. *Molecular Breeding* 4 (3): 269-275.

Yoo, H. Y., Chang, M. S., y Rho, H. M. (1999) The activation of the rat copper/zinc superoxide dismutase gene by hydrogen peroxide through the hydrogen peroxide-responsive element and by paraquat and heat shock through the same heat shock element. *Journal of Biological Chemistry* 274 (34): 23887-23892.

Yoo, S. Y., Kim, Y., Kim, S. Y., Lee, J. S., y Ahn, J. H. (2007) Control of flowering time and cold exposure by a NAC-domain protein in Arabidopsis. *PLoS ONE* 2 doi: 10.1371/journal.pone.0000642

Young, R. y Jahn, O. (1972) Ethylene-induced carotenoid accumulation in citrus fruit rinds. *Journal of American Society of Horticultural Science* 97(2): 258

Youngman, R. J. y Dodge, A. D. (1979) Mechanism of paracuat action: inhibition of the herbicidal effect by a copper chelate with superoxide dismuting activity. *Naturforsch* 34 (11): 1033-1035.

Zacarias, L., Lafuente, M. T., Marcos, J. F., Saladie, M., y Dupille, E. (2003) Regulation of ethylene biosynthesis during cold storage of the chilling-sensitive Fortune mandarin fruit. *Biology and Biotechnology of the Plant Hormone Ethylene*. Vendrell M, Klee H, Pech JC and Romojaro F. (eds.), IOS Press, Amsterdam : 112-117.

Zaragoza, S., Almela, V., Tadeo, F. R., PrimoMillo, E., y Agusti, M. (1996) Effectiveness of calcium nitrate and GA(3) on the control of peel-pitting of 'Fortune' mandarin. *Journal of Horticultural Science* 71 (2): 321-326.

Zaragoza, S. y Alonso, E. (1975) El manchado de la corteza de los agrios. Estudio preliminar en la variedad Navelate. manchas pre-recolección. *Comunicaciones INIA, Servicio de Protección Vegetal* 4: 5-8, 13-14, 19-22, 31-32

Zeevart, J. A. D. y Creelman, R. A. (1988) Metabolism and physiology of abscisic acid. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 39: 439-473.

Zhan, X., Fowler, S. G., Cheng, H., Lou, Y., Rhee, S. Y., Stockinger, E. J., y Thomashow, M. F. (2004) Freezing-sensitive tomato has a functional CBF cold response pathway, but a CBF regulon that differs from that of freezing-tolerant Arabidopsis. *Plant Journal* 39 (6): 905-919.

Zhang, J., Cui, S., Li, J., Wei, J., y Kirkham, M. B. (1995) Protoplasmic factors, antioxidant responses, and chilling resistance in maize. *Plant Physiology and Biochemistry* 33: 567-575.

Zhang, L. S. y Zhao, W. M. (2003) LEA protein functions to tolerance drought of the plant. *Plant Physiol. Commun.* 39 (1): 61-66.

Zhang, W., Yu, L., Zhang, Y., y Wang, X. (2005) Phospholipase D in the signalling networks of plant response to abscisic acid and reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta* 1736 (1): 1-9.

Zhang, Z., Li, Q., Li, Z., Staswick, P. E., Wang, M., Zhu, Y., y He, Z. (2007) Dual Regulation of GH3.5 in Salicylic Acid and Auxin Signalling during Arabidopsis-Pseudomonas syringae Interaction. *Plant Physiology* 145: 450-464.

Zhao, G., Bou-Abdallah, F., Arosio, P., Levi, S., Janus-Chandler, C., y Chasteen, N. D. (2003) Multiple pathways for mineral core formation in mammalian apoferritin. The role of hydrogen peroxide. *Biochemistry* 42: 3142-3150.

Zhao, J., Davis, L. C., y Verpoorte, R. (2005) Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances* 23 (4): 283-333.

Zhao, J., Williams, C. C., y Last, R. L. (1998) Induction of Arabidopsis Tryptophan Pathway Enzymes and Camalexin by Amino Acid Starvation, Oxidative Stress, and an Abiotic Elicitor. *The Plant Cell* 10: 359-370.

Zhou, J. y Goldsbrough, P. B. (1993) An *Arabidopsis* gene with homology to glutathione S-transferase is regulated by ethylene. *Plant Molecular Biology* 22: 517-523.

Zou, X., Seemann, J. R., Neuman, D., y Shen, Q. J. (2004) A WRKY gene from creosote bush encodes an activator of the abscisic acid signaling pathway. *Journal of Biological Chemistry* 279 (53): 55770-55779.

ANEXOS

ANEXO I: Proyecto de Genómica Funcional de Cítricos (CFGP)

Tabla 49: Caracterización de las bibliotecas de cDNA reunidas en el Consorcio de Genómica Funcional de Cítricos (CFGP) (Forment *et al.* 2005; <http://bioinfo.ibmcp.upv.es/genomics/cfgpDB/>).

Bibliotecas cDNA	Organismo	T Tejido vegetal	Condiciones fisiológicas	Clones	EST's alta calidad	Long. media EST	Singletons	Contigs	Unigenes	Redund. (%)	Unigenes específicos	Novedad (%)
AbioticL1	Clemenules	Hojas	Estrés hídrico / Rehidratación / Estrés salino / Estrés salino continuo / Clorosis	960	831	673	125	498	623	25	139	22
AbioticR1	Cleopatra	Raíces	Estrés hídrico / Rehidratación / Estrés salino / Estrés salino continuo / Clorosis	960	903	667	157	531	688	24	168	24
AbsAOv1	Clemenules	Zonas abscisión y explantes de flores con pétalos en caída	Tratamiento de ovarios con etileno	1183	1116	587.1	230	523	753	33	248	33
AbsCFruit1	Navelina	Abscisión: zona C y tejidos circundantes	Prácticas culturales normales	866	814	545.5	230	438	668	18	254	38
AbsCOv1	Clemenules	Zona C abscisión y tejidos circundantes de ovarios	Prácticas culturales normales / Tratamiento de ovarios con etileno	1091	1021	639.8	229	504	733	28	252	34
AbsDev	Clemenules	Zona laminar abscisión y tejidos circundantes de hojas	Prácticas culturales normales	956	924	617.1	220	523	743	20	242	33
AbsLeaSub1	Clemenules	Hojas	Inoculación con zoosporas de <i>Phytophthora citrophthora</i>	768	704	381.6	78	244	322	54	112	35
BiotPhyR1	Aurantium	Raíces	Infeción con viroide exocortis (CEVd)	960	919	681.2	364	401	765	17	407	53
CEVdCidro1	Cidro Eitrog	Hojas	Infeción con CTV	480	465	693.1	111	220	331	29	152	46
CTVClemen1	Clemenules	Brotos	Infeción con CTV	480	453	682.1	62	327	389	14	63	16
CTVLeafMc1	Macrophylla	Hojas	Infeción con CTV	1219	967	434.6	20	85	105	89	59	56
CTVMacrop1	Macrophylla	Hojas	Prácticas culturales normales	480	447	650.6	133	214	347	22	147	42
DevOvary1	Clemenules	Ovarios	Secuencia experimental: 1) Plantas bien irrigadas; 2) Lavado de raíces; 3) Crecimiento en arena seca; 4) Riego 3 veces / 24h	384	296	637.3	27	192	219	26	29	13
DroRLeaf1	Clemenules	Hojas	5, 10 y 24 horas de estrés hídrico	576	560	686.4	136	365	501	11	141	28
Drought1	Clemenules	Raíces	5, 10 y 24 horas de estrés hídrico	722	607	398.1	65	245	310	49	71	23
Drought2	Clemenules	Raíces	5, 10 y 24 horas de estrés hídrico	1574	1401	489.1	470	565	1035	26	515	50

Continuación Tabla 49.

Bibliotecas cDNA	Organismo	Tejido vegetal	Condiciones fisiológicas	Clones	ESTs alta calidad	Long. media EST	Singletons	Contigs	Unigenes	Redund. (%)	Unigenes específicos	Novedad (%)
EHR	Clemenules	Raíces	Secuencia experimental: 1) Plantas bien irrigadas; 2) Lavado de raíces; 3) Crecimiento en arena seca; 4) Riego 3 veces / 24h	850	842	698.9	54	239	293	65	94	32
ExocortL1	Cidro Etróg	Hojas	Infección con viroide exocortis (CEVd)	672	637	647.5	242	341	583	8	253	43
FerrChloL1	Clemenules	Hojas	Crecimiento invernal: deficiencia en Fe / tratamiento 1 año en suelo calcáreo (>20% CaCO ₃)	864	558	559.5	78	344	422	24	83	20
FerrChloR1	Clemenules	Raíces	Crecimiento invernal: deficiencia en Fe / tratamiento 1 año en suelo calcáreo (>20% CaCO ₃)	1056	807	545.1	161	478	639	21	170	27
FlavCurFr1	Fortune	Flavado	37 °C 4, 24 y 72 horas y subsecuente almacenamiento a 1 °C durante 1, 3 y 10 días	1152	1106	600.8	260	697	957	13	263	27
FlavCurFrS	Fortune	Flavado	3 días a 37°C + 1.5°C 7 días (tester) y frutos recién cosechados (driver)	75	75	466	36	37	73	3	37	51
FlavFr1	Clemenules	Flavado	Almacenamiento de frutos 2 °C	2361	2067	531.1	352	976	1328	36	387	29
FlavFrSub1	Fortune	Flavado	Almacenamiento a 2 y 12 °C durante 14 días a 95% RH	824	584	388	70	160	230	61	89	39
FlavRip1	Clemenules	Flavado	Prácticas culturales normales	322	305	474.6	58	209	267	12	59	22
FlavSen1	Clemenules	Flavado	Prácticas culturales normales	225	213	529.7	44	150	194	9	45	23
HSVdMacro1	Macrophylla	Hojas	Infección con viroide HSVd	480	406	654.1	116	209	325	20	128	39
IF1	Clemenules	Inflorescencias: ápices y flores	Prácticas culturales normales	2421	2316	576.9	443	1165	1608	31	556	35
IV1A1	Clemenules	Mezcla compleja de tejidos	Prácticas culturales normales	41460	40484	843.9	5598	7233	12831	68	8980	70
KCl_Salt1	Cleopatra	Raíces	Crecimiento invernal: tratamiento con KCl 50 mM / KCl 100 mM / deficiencia Cl- periodo corto / deficiencia Cl- periodo prolongado + suplemento Cl-	1053	1034	694	225	625	850	18	248	29

Continuación Tabla 49.

Bibliotecas cDNA	Organismo	Tejido vegetal	Condiciones fisiológicas	Clones	ESTs alta calidad	Long. media EST	Singletons	Contigs	Unigenes	Redund. (%)	Unigenes específicos	Novedad (%)
NTLeaf1	Clemenules	Hojas	Prácticas culturales normales	359	319	434.8	61	189	250	22	65	26
OF1	Clemenules	Ovarios y Frutos	Tratamiento de frutos con GA3	168	161	488.3	46	110	156	3	47	30
OF2	Clemenules	Ovario y frutos etapas tempranas de desarrollo	Aplicación de GA3 a ovario no polinizados	1739	1408	505	417	784	1201	15	434	36
PCR	Clemenules	Frutos	Prácticas culturales normales	39	39	631.6	13	23	36	8	14	39
PhIFruit1	Clemenules	Vesículas zumo y frutos	Prácticas culturales normales	576	555	602.5	120	348	468	16	127	27
PhII_IIIIV1	Clemenules		Prácticas culturales normales	1038	1004	688.1	8	163	171	83	38	22
PhyRootC11	Cleopatra	Raíces	Inoculación de raíces por inmersión en suspensión con zoosporas de <i>Phytophthora citrophthora</i> / Obtención de tejido 0, 4 y 8 días después de inoculación	864	835	657.1	172	523	695	17	178	26
PhyRootS11	Aurantium	Raíces	Inoculación de raíces por inmersión en suspensión con zoosporas de <i>Phytophthora citrophthora</i> / Obtención de tejido 0, 4 y 8 días después de inoculación	959	876	485.7	488	342	830	5	495	60
PhyRootSw1	Navelina	Raíces	Inoculación de raíces por inmersión en suspensión con zoosporas de <i>Phytophthora citrophthora</i> / Obtención de tejido 0, 2, 4, 8, 13 y 18 días después de inoculación	1886	1780	548.8	965	630	1595	10	1008	63
PostharvC1	Clemenules	Flavado	Almacenamiento en frío de frutos	960	917	697	134	582	716	22	137	19
PostharveN	Clemenules	Flavado y albedo	Almacén 2°C durante 2, 3.5, 4.5, y 24 horas, y durante 9, 14, 23, 28, 42, y 56 días; e infección con <i>Penicillium digitatum</i>	928	891	683.6	176	561	737	17	185	25

Continuación Tabla 49.

Bibliotecas cDNA	Organismo	Tejido vegetal	Condiciones fisiológicas	Clones	ESTs alta calidad	Long. media EST	Singletons	Contigs	Unigenes	Redund. (%)	Unigenes específicos	Novedad (%)
PostharvP1	Clemenules	Corteza (flavado + albedo)	Infección de frutos con <i>Fenicillium digitatum</i>	1056	1008	684.2	161	640	801	21	169	21
RindPdíg24	Clemenules	Corteza (flavado + albedo)	Infección de frutos con <i>Fenicillium digitatum</i> , 20°C / 24h	1152	1118	566.6	264	674	938	16	278	30
RindPdígS	Navelina	Corteza (flavado + albedo)	Infección de frutos con <i>Fenicillium digitatum</i> , 20°C / 24h	330	295	292.3	37	147	184	38	50	27
Roots1	Carrizo Citrange	Root tips	Semillas cultivadas 1-4 días con paclobutrazol o auxinas (ác.indol butírico)	176	175	510.5	37	104	141	19	40	28
RVDdevelop1	Clemenules	Hojas, flores y menistemas apicales	Prácticas culturales normales	960	759	669.3	60	451	511	33	65	13
RVDdevelopN	Clemenules	Hojas, flores y menistemas apicales	Prácticas culturales normales	960	823	639.7	182	543	725	12	192	26
SaltLeaf1	Clemenules	Hojas	Tratamiento con 150 mM NaCl durante 0, 6, 24 horas y 7 días	738	665	481.1	77	367	444	33	85	19
SLH	Navelina	Hojas	Crecimiento invernal: riego frecuente (3 veces/semana) y tratamiento con 25 mM NaCl:CaCl2 durante 60 días	1048	1040	692.4	255	593	848	18	289	34
StrClemenN	Clemenules	Hojas y raíces	Estrés hídrico / Estrés hídrico y rehidratación / Estrés salino / Estrés salino continuo / Deficiencia en Fe / Infección por virus CTV	960	866	657.7	186	567	753	13	203	27
StrCleopN	Cleopatra	Raíces	Estrés hídrico / Estrés hídrico y rehidratación / Estrés salino / Estrés salino continuo / Deficiencia en Fe / Infección por <i>Phytophthora citrophobora</i>	960	914	693.3	246	594	840	8	254	30
TF	Clemenules	Frutos: Flavado and vesículas zumo	Prácticas culturales normales	4037	3966	610	781	2083	2864	28	819	29
Veg1	Clemenules	Hojas, brotes e internodos	Aplicación foliar de GA3 y Paclobutrazol (PCB)	1771	1689	541.6	427	971	1398	17	439	31

ANEXO II: Estudio transcriptómico de los mecanismos implicados en la tolerancia al frío inducida por el acondicionamiento térmico a altas temperaturas en frutos de mandarina 'Fortune'

Tabla 50: Conjunto de genes de la micromatriz '7K' que se expresan diferencialmente de manera específica en los frutos acondicionados y transferidos al frío o en los frutos no acondicionados y transferidos directamente a 2 °C. Los genes siguen un orden decreciente según el nivel de expresión detectado en C+F ó en F, respectivamente.

MICROMATRIZ 7K - 'Fortune'

Expresión específica en respuesta a C + F		
Proteína más similar	Unigen	Homología en <i>A. thaliana</i>
Homogentisic acid geranylgeranyl transferasa [<i>Triticum aestivum</i>]	3253	At2g18950
Secuencia no disponible	C05006A09	-
Secuencia no disponible	C01005F11	-
Prot. quinesina [<i>A. thaliana</i>]	2016	At3g16630
Ferritina 2, cloroplasto precursor (NtFer2)	6087	At2g40300
No homólogo en <i>A.thaliana</i>	C01006B12	-
Secuencia no disponible	C05006A02	-
No homólogo en <i>A.thaliana</i>	C20004E01	-
Prot. F17A8.30, probable [<i>A. thaliana</i>]	C02018B07	At4g09680
Prot qinesina homóloga a F28P10.150 [<i>A. thaliana</i>]	C02003C07	At3g54870
Citocromo c oxidasa subunidad 1 [<i>Porphyra purpurea</i>]	C08016A01	-
Secuencia no disponible	C04013G04	-
Prot. función desconocida	C18006C09	At3g13130
CPRD49 [<i>Vigna unguiculata</i>]	C01003B08	At3g11210
Prot. F-box [<i>A. thaliana</i>]	3406	At3g07870
Factor de transcripción con dedos de zinc, tipo 'C3HC4-type RING finger' [<i>A. thaliana</i>]	C01005F01	At4g02075
Poliproteína, probable [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)]	C20004F01	At2g14400
Prot. función desconocida	C20003G03	At4g32460
Prot. función desconocida	C08018E01	At4g26180
Prot. nucelina, probable [<i>A. thaliana</i>]	C04016D07	At4g33490
No homólogo en <i>A.thaliana</i>	C08003A02	-
Secuencia no disponible	C20004C05	-
Prot. F2H15.16 [<i>A. thaliana</i>]	2880	At1g73390
Deshidrogenasa de cadena corta Tic32 [<i>Pisum sativum</i>]	5790	At4g23420
Factor de transcripción con dedos de zinc, tipo 'C3HC4-type RING finger' [<i>A. thaliana</i>]	C02003A07	At4g30400
Expresión específica en respuesta a F		
Proteína más similar	Unigen	Homología en <i>A. thaliana</i>
Isopentenil pirofosfato isomerasa IDI2 [<i>Melaleuca alternifolia</i>]	7025	At3g02780
SABRE, probable [<i>A. thaliana</i>]	C18015F09	At1g58250
No homólogo en <i>A.thaliana</i>	C01003C09	-
Secuencia no disponible	C18003D01	-

Tabla 51: Conjunto de genes de la micromatriz '7K' que se reprimen de forma específica en los frutos acondicionados y transferidos al frío (Ver detalles en la Tabla 2).

MICROMATRIZ 7K - 'Fortune'					
Proteína más similar	Unigen	Homología en <i>A. thaliana</i>	LOG2 (C/RTC)	LOG2 (CF/RTC)	LOG2 (F/RTC)
UDP-glucoronosil/UDP-glucosil transferasa	2062	At3g55700	-1.07	-	-0.77
Secuencia no disponible	C02019H12	-	0.03	-	-1.91
Canal iónico regulado por nucleótidos cíclicos	4320	At5g15410	-0.58	-	-0.64
Prot. función desconocida	C02010H03	At3g23820	0.06	-	-1.49
Prot. con dominio BURP [<i>Bruguiera gymnorhiza</i>]	6809	At5g25610	-0.20	-	-0.88
Prot. función desconocida	4347	At2g21740	-0.58	-	-0.82
Prot. de 30 kDa [<i>Homo sapiens</i>]	4405	At4g12590	-0.09	-	-0.26
Glicosil hidrolasa [<i>A. thaliana</i>]	4253	At3g18080	-0.36	-	-0.67
Histona H4 [<i>Citrus jambhiri</i>]	2394	At5g59970	0.01	-	-0.84
Prot. con dominio SAM [<i>A. thaliana</i>]	1691	At2g39670	-0.02	-	-0.61
Lipoxigenasa [<i>Citrus jambhiri</i>]	1746	At3g45140	0.22	-	-0.84
Secuencia no disponible	C05041G07	-	-0.26	-	-0.16
Factor de iniciación de síntesis proteica 4G (EIF4G) [<i>A. thaliana</i>]	2221	At3g60235	0.02	-	-0.47
Secuencia no disponible	C16003G03	-	-0.39	-	-0.20
Secuencia no disponible	C02010A01	-	0.00	-	-0.46
Precursor de proteína de transferencia de lípidos [<i>Gossypium hirsutum</i>]	6113	At2g38540	-0.79	-	0.16
Prot. Intínseca del plasma 2,2 [<i>Juglans regia</i>]	5395	At2g37170	-0.50	-	-0.15
Flavodoxina multimérica WrbA [<i>Geobacter metallireducens</i>]	C08004H04	At5g54500	-0.17	-	-0.17
Secuencia no disponible	C09002F11	-	-0.32	-	-0.09
Secuencia no disponible	C05042D12	-	-0.27	-	-0.05
Prot. resistencia enfermedad (TIR class), probable [<i>A. thaliana</i>]	C20007B01	At1g61100	0.48	-	-0.61
Secuencia no disponible	C05024D07	-	-0.08	-	-0.40
Prot. con dominio PPR [<i>A. thaliana</i>]	C02007E01	At1g02370	-0.16	-	-0.37
Secuencia no disponible	C18003E12	-	-0.19	-	0.29
Secuencia no disponible	C05042A02	-	0.03	-	-0.05
Secuencia no disponible	C05042H01	-	0.01	-	-0.76
Secuencia no disponible	C05042H09	-	0.20	-	-0.56
No homólogo en <i>A.thaliana</i>	C18007D06	-	-0.03	-	-0.07
No homólogo en <i>A.thaliana</i>	C08002F08	-	0.50	-	-0.07
No homólogo en <i>A.thaliana</i>	C08006B03	-	-0.21	-	0.18

Tabla 52: Conjunto de genes de la micromatriz '7K' que se reprimen de forma específica en los frutos no acondicionados expuestos directamente al frío (Ver detalles en la Tabla 2).

MICROMATRIZ 7K - 'Fortune'

Proteína más similar	Unigen	Homología en <i>A. thaliana</i>	LOG2 (C/RTC)	LOG2 (CF/RTC)	LOG2 (F/RTC)
Prot. inducida por Al [<i>Gossypium hirsutum</i>]	6284	At5g19140	-0.17	-0.94	-
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	C03005G02	-	-0.55	-1.32	-
P0710E05.11 [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)]	2860	At3g16490	-0.32	-1.36	-
Prot. rica en residuos de prolina [<i>Capsicum annuum</i>]	4188	At1g51090	-0.04	-0.56	-
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	C08002G10	-	-0.23	-0.63	-
P0698A10.25 [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)]	C20001C10	At1g22882	-0.04	0.12	-
Secuencia no disponible	C03006E11	-	0.03	-0.42	-
Prot. similar a 'transfactor' [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)]	3542	At4g13640	0.35	-0.43	-
Prot. función desconocida [<i>A. thaliana</i>]	4605	At4g00905	-0.32	-0.29	-
Secuencia no disponible	C07008H09	-	0.02	-0.03	-
S-locus lectin proteína quinasa [<i>A. thaliana</i>]	C04013F03	At1g11300	-0.65	-0.31	-
Prot. con dominio PPR [<i>A. thaliana</i>]	C01011B05	At2g32230	-0.18	0.21	-
ATPasa tipo AAA [<i>A. thaliana</i>]	C20010E06	At2g03670	-0.22	-0.20	-
Prot. función desconocida [<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002]	C01005C06	At5g67370	-0.04	-0.23	-
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	C02012B07	-	0.01	0.01	-
Prot. U1 snRNP tipo C, probable [<i>A. thaliana</i>]	C20002F07	At4g03120	0.10	-0.43	-
Prot. Resistencia enfermedad tipo NBS-LRR [<i>Ponirus trifoliata</i>]	C16011B12	At1g12280	0.87	-0.92	-
Prot. NOI de respuesta a nitrato, probable [<i>A. thaliana</i>]	4225	At5g55850	-0.27	-0.62	-
Autofagia 8h (APG8h) [<i>A. thaliana</i>]	C18016G09	At3g06420	-0.14	0.28	-
Secuencia no disponible	C02003E08	Sequence	-0.10	0.03	-
Prot. TEL1S.2 [<i>A. thaliana</i>]	1999	At5g01010	-0.16	-0.61	-
MAP quinasa 4 [<i>Petroselinum crispum</i>]	2030	At4g01370	0.08	-0.39	-
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	4231	-	-0.23	-0.41	-
Palmitil tioesterasa [<i>A. thaliana</i>]	5413	At3g60340	-0.01	-0.44	-
Prot.hipotética MO25	4428	At5g47540	-0.18	-0.15	-
Acetil-CoA sintasa, probable / acetate-CoA ligase, probable	C04010A10	At5g36880	0.21	0.38	-
Prot. PTS, probable [<i>Cicer arietinum</i>]	4323	At5g63140	0.48	-0.21	-
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	1769	-	0.37	-0.20	-
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	C20007A08	-	-0.02	-0.20	-
OSJNBa0035B13.1 [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)]	C02010C10	At1g51610	-0.01	-0.29	-

Tabla 53: Listado de los genes de la micromatriz '12K' cuya expresión sólo se detectó en: A) los frutos acondicionados a los 30 días de almacenamiento a 2 °C (C+F); B) los frutos almacenados 30 días directamente a 2 °C (F). Los genes siguen un orden decreciente según el nivel de expresión detectado en C+F (A) o F (B).

MICROMATRIZ 12K - 'Fortune'		
A) Expresión específica en respuesta a C+F		
Proteína más similar	Unigen	Homología en <i>A. thaliana</i>
Aminotransferasa, probable [<i>A. thaliana</i>]	4144	At2g20610
O-unión N-acetil glucosamina transferasa, probable [<i>A. thaliana</i>]	C21004F06	At3g04240
Prot. exclusión [<i>Bacteriophage lambda</i>]	C05804G09	-
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	566	-
Prot. Ribosomal cyc07, fase S, probable [<i>Lentinula</i> sp]	C08017B05	At4g34670
Secuencia desconocida	C08001A07	
Prot. con dedos de zinc [<i>Oryza sativa</i> (indica cultivar-group)]	7114	At1g51200
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	6343	-
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	2437	-
Prot. función desconocida	C01008G09	At4g27700
B) Expresión específica en respuesta a F		
Proteína más similar	Unigen	Homología en <i>A. thaliana</i>
Prot. función desconocida [<i>Populus tremuloides</i>]	C04028G10	At4g24220
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	C19008A04	-
Prot. B1147A04.28 [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)]	4366	At3g57090
Prot. fosfatasa específica tirosina [<i>A. thaliana</i>]	4996	At1g05000
Secuencia desconocida	3033	-
Catecol O-methyltransferasa (EC 2.1.1.6) III - common tobacco	5970	At5g54160
OSJNBb0026L04.5 [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)]	C31707D05	At5g14600
Prot inducible por siringolido 14-1-1 [<i>Glycine max</i>]	C06020F08	At1g76070
Prot. función desconocida [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)]	3584	At5g63840
Prot. P0463A02.24 [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)]	C08025F07	At1g78550
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	C07009C10	-
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	C08008C10	-
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	C08017F10	-
Prot. ribosomal S21 [<i>Pectinaria gouldii</i>]	C08005D03	At3g53890
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	C08020C09	-
Glicosil transferasa 29 / sialiltransferasa	C18005F10	At3g48820
GTP ciclohrolasa I [<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803]	C08005F02	At3g07270
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	943	-
Celulosa sintasa [<i>A. thaliana</i>]	C05138H07	At1g55850
Prot con dominio forkhead-associated / FHA	C18023A05	At3g54350
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	C05070H02	-
Prot. función desconocida	C08012C01	At4g08850
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	3557	-
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	C08028D05	-
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	C18025E07	-
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	C08011G10	-
Aldehído deshidrogenasa [<i>Staphylococcus aureus</i>]	C08023C01	At1g44170
Epimerasa/deshidratasa depend de NAD [<i>A. thaliana</i>]	C08016H07	At5g28840
Esteroido 22- α -hidroxilasa, probable [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)]	C06006H11	At3g50660
Fosfoinositido fosfatasa [<i>A. thaliana</i>]	C18015C09	At5g20840

Tabla 54: Conjunto de genes que se reprimen de forma específica en los frutos acondicionados y almacenados a 2 °C (Ver detalles en la Tabla 2).

MICROMATRIZ 12K - 'Fortune'

Proteína más similar	Unigen	Homología en <i>A. thaliana</i>	LOG2 (C/RTC)	LOG2 (CF/RTC)	LOG2 (F/RTC)
Prot. con dominio BURP [<i>A. thaliana</i>]	5470	At1g49320	-1.100	-	-0.700
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	C32011D07	-	-0.918	-	-1.306
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	C32202F08	-	-0.697	-	-1.161
Prot. sin asignación de producto [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)]	C32010H10	At4g37170	-0.485	-	-1.507
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	C04035F05	-	0.013	-	-0.365
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	C02026A10	-	-0.517	-	-0.508
Transducina / WD-40	5579	At1g20540	-0.234	-	-0.889
Prot. COP9, subunid. reguladora	C05810D07	At4g14110	-0.544	-	-1.095
Prot. de unión a DNA en cloroplasto, probable [<i>A. thaliana</i>]	1148	At5g10770	-0.273	-	-0.823
Prot. Ribosomal 40S-S18	C08017H06	At4g09800	-0.204	-	-0.264
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	C34005H11	-	-0.213	-	-0.388
Histona H3 [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)]	C20004F11	At5g65360	-0.327	-	-0.463
Prot. receptora quinasa, probable [<i>A. thaliana</i>]	5474	At2g37050	-0.546	-	-0.936
Pirofosfatasa inorgánica, probable	4037	At3g53620	-0.653	-	0.246
Prot. ADL127Cp [<i>Eremothecium gossypii</i>]	5932	At2g18020	-0.381	-	-0.311
Serina carboxipeptidasa S10 [<i>A. thaliana</i>]	C01008E11	At5g08260	0.224	-	-1.225
Prot. función desconocida [<i>A. thaliana</i>]	C02026D03	At3g63510	-0.531	-	-0.284
α/β Hidrolasa [<i>A. thaliana</i>]	4154	At1g11090	-0.426	-	-0.355
Prot. IDI-7 [<i>Podospora anserina</i>]	C08006F10	At4g04620	-0.499	-	-0.086
Prot. función desconocida [<i>A. thaliana</i>]	4110	At5g23530	-0.220	-	-0.576
Prot. Relacionada con defensa [<i>Brassica carinata</i>]	C31107F06	At3g44870	-0.221	-	-0.302
Prot. con dedos de zinc tipo 'C3HC4-type RING finger' [<i>A. thaliana</i>]	C01008H10	At5g60580	-0.259	-	-0.852
Translocon Tic40 [<i>Pisum sativum</i>]	3287	At5g16620	-0.117	-	-0.385
Unidililtransferasa [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	5350	At1g16880	-0.432	-	-0.180
Prot. función desconocida [<i>A. thaliana</i>]	3518	At3g55250	0.336	-	-1.166
Prot. de transporte de cobre [<i>A. thaliana</i>]	C01009A02	At5g59030	-0.434	-	-0.414
Prot. función desconocida [<i>Neurospora crassa</i>]	3943	At5g01470	-0.073	-	-0.651
Prot. con dedos de zinc tipo 'C3HC4-type RING finger' [<i>A. thaliana</i>]	C08033H03	At4g35840	0.188	-	-0.250
Prot. ribosomal L18 [<i>Spodoptera frugiperda</i>]	C08002D11	At5g27850	-0.060	-	-0.882
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	C03005H01	At5g64680	-0.434	-	-0.356

Tabla 55: Conjunto de genes de la micromatriz '12K' que se reprimen de forma específica en los frutos no acondicionados expuestos directamente al frío (Ver detalles en la Tabla 2).

MICROMATRIZ 12K - 'Fortune'					
Proteína más similar	Unigen	Homología en <i>A. thaliana</i>	LOG2 (C/RTC)	LOG2 (CF/RTC)	LOG2 (F/RTC)
Prot. función desconocida [<i>A. thaliana</i>]	1398	At2g44525	-0.300	-1.164	-
Lipasa/hidrolasa con motivo GDSL [<i>A. thaliana</i>]	2029	At5g14450	0.220	-1.059	-
Subunidad proteica de señal para peptidasas [<i>A. thaliana</i>]	1797	At5g27430	-0.276	-0.322	-
Tocoferol ciclasa [<i>Eucalyptus gunnii</i>]	4307	At4g32770	-0.132	-0.866	-
Ribonucleoproteína E pequeña (snRNP-E), probable	4737	At2g18740	-0.052	-0.156	-
No homólogo en <i>A.thaliana</i>	C08021C07	-	-0.032	0.121	-
No homólogo en <i>A.thaliana</i>	C08015H04	-	0.041	0.083	-
Prot. transportadora de azúcar, probable [<i>A. thaliana</i>]	3459	At1g08920	-0.107	-0.082	-
Ca ²⁺ -ATPase de la membrana plasmática [<i>Glycine max</i>]	5780	At1g27770	-0.079	-0.280	-
Biotina sintasa, probable [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)]	2468	At2g43360	-0.242	-0.147	-
SOD (EC 1.15.1.1) (Cu-Zn) - sweet orange	C31305D02	At1g08830	-0.263	-0.260	-
ATP sintasa, cadena [<i>A. thaliana</i>]	6908	At3g52300	-0.019	-0.182	-
Pectato liasa	C05069B11	At2g17820	-0.134	-0.202	-
Glucano endo-1,3-β-D-glucosidase (EC 3.2.1.39) - sweet orange	6800	At1g33090	-0.034	-0.079	-
D-alanina--D-alanina ligasa [<i>A. thaliana</i>]	C02017F01	At3g08830	0.596	-0.308	-
NPTIII_15a	15a	-	-0.101	-0.130	-
OSJNBa0070O11.2 [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)]	4719	At1g15290	0.171	-0.487	-
No homólogo en <i>A.thaliana</i>	C31204C01	-	-0.081	0.064	-
Prot. PHAP2A [<i>Petunia x hybrida</i>]	6044	At4g36920	-0.387	-0.016	-
Prot. de unión a clorofila a/b	3973	At5g54270	-0.604	0.130	-
COG0654: 2-poliprenil-6-metoxifenol hidroxilasa	C08023C09	At5g67030	-0.355	-0.346	-
Adrenodoxina homóloga a F7J7.30 [<i>A. thaliana</i>]	2322	At4g21090	0.316	0.103	-
Prot. Ribosomal 40S-S15 (S12)	C08018A08	At5g09510	-0.027	0.346	-
Prot. T17H7.12 [<i>A. thaliana</i>]	C03009C03	At3g12670	0.199	-0.044	-
No homólogo en <i>A.thaliana</i>	C08007A12	-	0.179	-0.043	-
P23 /PR5	4a	-	0.127	0.147	-
No homólogo en <i>A.thaliana</i>	C04032H03	-	0.374	0.235	-
Factor de transcripción MYB [<i>A. thaliana</i>]	C08036G05	At2g21650	0.603	0.643	-
Prot. quinasa [<i>A. thaliana</i>]	5540	At1g21590	0.508	0.866	-
No homólogo en <i>A.thaliana</i>	C19005E05	-	0.145	2.148	-

ANEXO III: Estudio transcriptómico de los mecanismos implicados en la tolerancia al ‘colapso de la corteza’ inducida por el acondicionamiento con etileno en naranjas ‘Navelate’

Tabla 56: Genes cuya expresión aumentó significativamente a los 14 días de almacenamiento en el flaveado de los frutos almacenados en aire, tratados o no previamente con 1-MCP, pero no en los acondicionados con etileno. Los genes están ordenados según el valor, expresado en escala logarítmica en base 2 (Log₂), correspondiente a la comparación 14d MCP vs RTC en el flaveado (primera columna de datos) (●) genes que también se indujeron en el flaveado de los frutos recién acondicionados con etileno (4d Etileno) (+) genes sin valor de expresión detectable en el primer término de la comparación (Ver detalles en Tabla 25).

Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	FLAVEADO						ALBEDO					
			14 días			4 días			14 días			4 días		
			1-MCP	Aire	Etileno	1-MCP	Aire	Etileno	1-MCP	Aire	Etileno	1-MCP	Aire	Etileno
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	C16000A01(m1)	-	2.51	3.49	2.32	2.09	0.80	0.55	-0.14	-0.75	-0.17	-0.38	-0.535	-0.91
Elongasa de ácidos grasos, probable [<i>A. thaliana</i>]	4317	At2g28630	1.83	2.09	0.64	0.74	1.40	-0.15	0.21	0.03	0.17	0.42	-0.481	-0.61
tRNA/rRNA metiltransferasa SpoU [<i>A. thaliana</i>]	C03007F08	At4g17610	1.76	0.77	1.32	0.01	0.81	1.56	2.37	0.57	0.71	-0.01	0.369	2.01
Prot. Lisofosfolipasa homóloga a F12L6.8 [<i>A. thaliana</i>]	2766	At2g39420	1.74	1.58	1.71	1.29	1.06	0.88	3.09	1.65	1.39	1.15	0.744	0.94
Prot. monoxigenasa MO2, probable [<i>A. thaliana</i>]	6227	At4g38540	1.56	1.34	1.41	0.81	0.87	0.45	1.54	1.29	1.43	0.38	1.284	1.08
3-dehidroquinato deshidratasa (EC 4.2.1.10) / siquimato	C20009A07	At3g06350	1.35	0.85	0.37	0.82	0.83	0.57	0.35	0.34	0.30	0.45	0.252	0.49
D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa / 3-PGDH [<i>A. thaliana</i>]	5938	At1g17740	1.33	1.21	0.94	0.80	0.82	1.10	0.69	0.39	0.54	0.57	0.568	1.10
Elongasa de ácidos grasos / 3-quetoncil-CoA sintasa 1(KCS1) [<i>A. thaliana</i>]	4071	At1g01120	1.12	1.08	0.51	0.45	1.27	1.19	-0.29	-0.52	0.17	-0.14	-0.531	-0.41
Prot. familia de transportadores de azúcares [<i>A. thaliana</i>]	C05057G09	At5g41760	1.08	0.63	0.75	0.09	0.52	1.03	1.21	0.38	0.30	-0.17	0.118	1.05
Hidroquinomona glucosil transferasa [<i>Arabidopsis synthase</i>]	760	At4g01070	1.03	1.03	1.19	0.32	0.43	1.06	1.76	0.55	0.63	0.22	-0.476	0.13
Prot. familia sintasas y ligasas dependientes de AMP [<i>A. thaliana</i>]	C31206D04	At3g16910	1.01	0.81	0.40	0.68	0.32	0.23	1.89	0.07	0.40	0.78	0.605	0.82
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	C06020E02	-	1.01	1.01	1.33	0.86	1.14	0.63	2.36	-0.25	0.33	0.53	-0.201	-0.09
Prot. 'fiddlehead', probable [<i>Gossypium hirsutum</i>]	3510	At2g26250	1.00	1.69	0.64	0.93	0.58	-0.44	1.64	2.39	2.04	1.08	2.181	0.47
OSJNB0065L13.11 [<i>Oryza sativa</i> (japónica cultivar-group)]	C05057H10	At4g32551	0.93	0.75	1.01	0.35	0.57	1.22	1.14	0.23	0.37	-0.19	0.281	1.06
Proteína similar a transportador de proteínas [<i>A. thaliana</i>]	C05076F06	At5g27220	0.87	0.78	0.84	0.58	0.45	0.33	0.69	0.33	0.44	0.37	0.224	0.32
OSJNBa0067K08.3 [<i>Oryza sativa</i> (japónica cultivar-group)]	C01017B10	At3g07565	0.72	0.71	0.51	0.42	0.31	0.26	0.60	0.52	0.56	0.49	0.174	0.20
ε-MAP3K [<i>A. thaliana</i>]	4387	At3g13530	0.69	0.82	0.67	0.67	0.62	0.32	0.20	0.22	0.22	-0.16	0.341	-0.22
Prot. quinasa, probable [<i>A. thaliana</i>]	C02021G02	At3g46290	0.67	0.63	0.59	0.31	0.22	0.10	0.32	0.55	0.65	0.03	0.289	0.14
Prot. rica en residuos de glicina [<i>A. thaliana</i>]	2814	At3g07560	0.62	0.67	0.65	0.34	0.29	0.09	0.14	0.59	0.69	0.36	0.414	0.33
2-isopropilmalato sintasa, probable [<i>A. thaliana</i>]	C31104H11	At1g74040	0.58	0.58	0.50	0.34	0.46	0.20	0.50	0.46	0.52	0.35	0.283	0.19
Prot. familia MurT/nudix [<i>A. thaliana</i>]	C07010F09	At1g68760	0.48	0.45	0.39	0.20	0.18	0.21	0.53	0.87	0.55	0.27	0.574	0.41
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	C01013F08	-	0.46	0.59	0.73	0.46	0.10	0.19	-0.05	0.24	0.17	0.14	0.094	0.22
Prot. ribosomal específica fase S ₁ , probable	3120	At4g34670	+	+	+									

Tabla 57: Genes cuya expresión aumentó significativamente a los 14 días de almacenamiento en el albedo de los frutos almacenados en aire, tratados o no previamente con 1-MCP, pero no en los acondicionados con etileno. (●) genes que se indujeron en el albedo de los frutos recién acondicionados con etileno (4d Etileno) (Ver detalles en Tabla 25 y Tabla 56)

Proteína más similar	FLAVEDO						ALBEDO					
	14 días			4 días			14 días			4 días		
	1-MCP	Aire	Etileno	1-MCP	Aire	Etileno	1-MCP	Aire	Etileno	1-MCP	Aire	Etileno
Hemoglobina II	0.82	-0.25	-0.29	0.74	-0.10	1.26	2.82	1.36	1.38	1.41	0.87	1.80
Exostosa, probable [<i>Oryza sativa</i>]	1.37	0.57	0.46	0.63	0.27	0.34	1.92	1.22	1.27	0.99	0.84	1.17
Receptor quinasa Leck1 [<i>Geopfirum barbatum</i>]	1.10	0.39	0.34	0.62	0.25	0.21	1.57	0.71	0.74	0.91	0.70	0.82
Prot. mucelina, probable [<i>A. thaliana</i>]	0.94	0.68	0.21	1.46	0.64	0.76	1.56	1.29	0.96	1.57	0.37	1.23
Prot. alantoinasa, probable [<i>Colanum tuberosum</i>]	1.26	0.82	0.40	0.81	0.42	-0.16	1.43	1.05	0.97	0.40	1.29	0.91
Transportador ABC [<i>A. thaliana</i>]	0.68	0.62	0.24	0.77	0.34	0.42	1.18	0.89	0.72	1.16	0.27	0.56
Prot. con dominio 'agenet' / 'bromo-adjacent homology' (BAH)	0.84	0.25	0.23	0.44	0.32	0.44	1.17	0.51	0.53	0.72	0.43	0.82
OSJNBa0042H15.5 [<i>Oryza sativa</i> (japónica cultivar-group)]	5948	-0.01	-0.47	0.58	0.57	0.05	1.11	0.63	0.58	0.59	1.84	1.25
Transportador ABC, probable [<i>A. thaliana</i>]	2817	0.35	0.47	0.16	0.76	0.39	1.03	1.01	0.69	1.14	0.27	0.38
Citocromo P450 LXXIA1 - avocado	C05068H02	0.14	-0.56	0.01	-0.43	0.16	1.01	0.99	0.89	0.09	0.76	1.36
OSJNBa0032F06.16 [<i>Oryza sativa</i> (japónica cultivar-group)]	5722	0.39	0.43	0.25	0.33	0.24	1.01	0.52	0.44	0.59	0.41	0.34
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	5773	1.02	-0.40	0.09	-0.05	0.22	0.97	1.07	0.90	0.32	0.21	1.00
Prot. función desconocida [<i>A. thaliana</i>]	6110	0.16	-0.15	-0.17	0.41	0.20	0.96	0.56	0.39	0.46	0.34	0.57
Prot. 'fiber Fb2' [<i>Geopfirum barbatense</i>]	6878	0.56	-	-	-	-	0.91	0.95	-	0.48	0.52	-
Prot. transportadora de respuesta a hierro [<i>A. thaliana</i>]	C02001F04	0.94	0.25	0.37	0.54	-0.03	0.82	0.98	0.72	0.28	0.56	0.19
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	C06021D12	0.25	0.31	0.30	0.23	0.18	0.69	0.79	0.72	0.76	-0.04	0.16
Prot. de unión a DNA, cloroplasto, probable [<i>A. thaliana</i>]	1148	0.74	0.10	-0.07	0.29	1.00	0.68	0.75	0.67	0.74	2.16	0.29
GMFP5 [<i>Cyprine max</i>]	4596	0.87	1.06	0.75	0.56	0.45	0.66	0.74	0.17	0.36	0.35	0.36
Prot. 'undylate' quinasa / undina monofosfato quinasa / UMP kinasa (PYR6)	6846	0.29	1.06	0.72	0.19	0.26	0.64	0.62	0.55	0.18	0.50	0.39
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	C08016H09	0.31	0.10	0.31	0.16	0.28	0.61	0.37	0.56	0.20	0.24	0.23
Prot. función desconocida [<i>A. thaliana</i>]	C03008B02	0.03	0.62	0.54	0.34	0.36	0.59	0.66	0.62	0.46	-0.13	-0.08
Prot. familia 'mob1/phocem' [<i>A. thaliana</i>]	C08033D02	0.53	0.42	0.62	0.57	-0.18	0.57	0.41	0.47	0.31	0.24	-0.08
12-Oxofitodienoato reductasa, probable (EC.1.3.1.42) - Madagascar	C06012C12	0.11	0.31	0.18	0.27	0.26	0.55	0.55	0.52	0.43	0.34	0.47
Prot. MU A22_20 [<i>A. thaliana</i>]	1950	0.69	0.77	0.68	0.18	0.54	0.53	0.57	0.40	0.38	0.41	0.81
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	97	0.40	0.58	0.59	0.44	0.34	0.53	0.49	0.47	0.16	0.11	0.04
Prot. familia Murt/nudix [<i>A. thaliana</i>]	C07010F09	0.48	0.45	0.39	0.20	0.18	0.53	0.87	0.55	0.27	0.57	0.41
Prot. función desconocida [<i>A. thaliana</i>]	1751	0.41	0.20	-0.06	0.33	0.18	0.52	0.71	0.58	0.64	0.66	0.33
Prot. ribosomal L7Ac/L30c/S12c/Gadd44 [<i>A. thaliana</i>]	6532	0.50	0.31	0.30	0.41	0.33	0.52	0.63	0.76	0.39	0.38	0.20
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	C05801C06	0.62	0.88	1.21	0.50	0.38	0.50	0.58	0.59	0.35	0.38	0.05
Prot. 'glucose-inhibited division family A' [<i>A. thaliana</i>]	C04013A01	0.28	0.59	0.50	0.27	0.21	0.50	0.63	0.75	0.44	0.28	0.24
Quinasa / CTL1 [<i>A. thaliana</i>]	5963	0.50	0.34	0.25	0.23	0.30	0.26	0.43	0.36	0.26	0.17	0.23

Tabla 58: Genes relacionados con el estrés oxidativo que aumentaron su expresión en los frutos recién acondicionados con etileno antes de transferirlos a aire respecto a los frutos RTC (escala Log₂). (●): respuesta diferencial en el flavado (F); (●): respuesta diferencial en el albedo (A); (●): respuesta diferencial en ambos tejidos; (●): inducciones; (●): represiones; (+) genes sin valor de expresión detectable en el primer término de la comparación; (-) genes sin valor de expresión detectable en el segundo término de la comparación (Ver detalles en Tabla 25).

Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	4 días						4 días + 14 días Aire					
			Aire		Etileno		I-MCP		Aire		Etileno		I-MCP	
			F	A	F	A	F	A	F	A	F	A	F	A
GST [<i>Cucurbita maxima</i>]	4728	A12g29420	0.8	0.2	1.7	0.7	1.3	1.5	0.3	0.5	0.6	0.2	1.2	3.7
GST [<i>Cucurbita maxima</i>]	3237	A12g29420	0.9	-0.1	1.4	0.5	1.0	1.1	0.2	0.1	0.5	0.3	1.1	3.8
POD [Populus balsamifera subsp. trichocarpa]	1574	A13g32980	0.3	-0.5	1.0	-0.1	0.2	-0.3	-0.2	-0.4	0.3	0.0	1.4	0.3
Prot. precursora de ferredoxin [2Fe-2S] fd1 precursor, no fotosintético	6665	A12g27510	0.4	0.5	0.9	0.5	-0.9	-0.5	-0.5	-0.1	-0.5	0.3	0.5	-0.1
GST [<i>Cucurbita maxima</i>]	C31704E06	A12g29420	0.8	0.3	0.9	0.4	0.9	0.7	0.3	0.3	0.5	0.4	0.9	1.4
Prot. precursora de POD [<i>Quercus suber</i>]	2218	A15g58390	0.1	-0.3	0.9	0.2	0.1	0.0	0.1	0.0	0.5	0.0	1.0	0.5
GR dependiente de NADPH [<i>Vitis vinifera</i>]	2427	A13g54660	0.1	0.0	0.8	0.2	-0.9	-0.9	-0.4	-0.7	-0.7	-0.5	0.3	-0.7
NADPH-TRX reductase, probable [<i>Oryza sativa</i> (japónica)]	1524	A12g17420	0.3	-0.2	0.6	0.5	0.0	-0.4	0.2	0.3	0.1	0.3	0.5	1.1
GST [<i>A. thaliana</i>]	6741	A1g10360	0.2		+		-							+
GST 22 [<i>Glycine max</i>]	C08034B04	A12g30860	0.5	1.4	0.4	1.4	1.3	1.9	0.5	1.2	0.4	1.1	1.4	2.6
GST 22 [<i>Glycine max</i>]	1151	A12g30870	0.4	1.0	0.3	1.1	0.9	1.5	0.1	0.9	0.0	0.9	1.1	2.2
GST, probable [<i>Phaseolus acutifolius</i>]	549	A12g30860	0.5	1.0	0.3	1.1	1.2	1.4	0.5	0.8	0.5	0.9	1.3	2.3
Glutaredoxina [<i>A. thaliana</i>]	C05138D10	A1g28480	2.2	0.1	2.1	0.8	2.3	1.0	1.0	0.9	1.0	0.9	2.9	2.1
GST 14 [<i>Glycine max</i>]	2858	A12g29420	0.3	0.5	0.4	0.6	0.7	1.0	0.4	0.5	0.3	0.3	0.9	1.6
Fosfolípido hidropéroxido glutation POD [<i>Momordica</i> sp]	C31401A05	A12g31570	0.1	0.2	0.5	0.5	0.1	0.2	-0.2	0.1	-0.1	0.1	0.5	1.4
GR citosólica / Grase / GOR2	6541	A13g24170	-0.4	0.0	0.0	0.4	-0.6	-0.3	-0.7	-0.4	-0.6	-0.4	-0.2	0.6
Prot. Precursora de POD, isoenzima 40K catiónico (EC 1.11.1.7)	6411	A1g05260	-0.3	+	0.2	+	-	+	-0.1	+	0.1	+	0.3	+
TRX [<i>Gallus gallus</i>]	C08015E04	A13g02730	-0.1	+	0.3	+	0.0	+	-0.1	+	-0.2	+	0.2	+
GST [<i>A. thaliana</i>]	4853	A15g45020	0.4	0.7	0.6	0.9	-0.2	-0.2	0.2	0.0	0.3	0.0	0.8	0.2
GST 14 [<i>Glycine max</i>]	4840	A12g29420	0.7	0.6	0.6	0.6	1.0	0.9	0.5	0.4	0.5	0.3	0.9	1.4
GST T3 [<i>Lycopersicon esculentum</i>]	1173	A12g29420	0.3	0.2	0.6	0.5	1.1	1.2	0.1	0.4	0.2	0.7	1.4	2.9
TRX tipo M-3, cloroplasto (TRX-M3) [<i>A. thaliana</i>]	2079	A12g15570	0.0	+	0.7	+	0.0	+	-2.2	+	0.2	+	0.3	+

Tabla 59: Genes relacionados con el estrés oxidativo que aumentaron su expresión en los frutos tratados con 1-MCP y almacenados 14 días en aire pero que no se expresan diferencialmente en los frutos tratados 4 días con etileno antes de la transferencia a aire, respecto a los frutos RTC (Ver detalles en Tabla 25 y Tabla 58)

Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	4 días						4 días + 14 días Aire					
			Aire		Etileno		1-MCP		Aire		Etileno		1-MCP	
			F	A	F	A	F	A	F	A	F	A	F	A
Prot. precursora de POD A3a (EC 1.11.1.7)	6327	At5g06730	0.3	-0.3	0.6	-0.1	0.1	-0.4	0.0	-0.1	0.7	0.1	1.1	0.8
GST T3, probable [<i>Lycopersicon esculentum</i>]	C01020B11	At2g29420	0.2	2.1	0.3	2.6	0.6	3.1	0.0	2.6	0.1	2.7	1.1	4.6
GST [<i>Euphorbia esula</i>]	5543	At1g02920	0.3	0.1	0.1	0.2	0.6	1.3	0.2	-0.1	0.4	0.4	0.7	2.1
GST clase z	5855	At2g02390	0.3	0.1	0.2	0.2	0.3	0.1	0.1	-0.1	0.2	0.1	0.6	1.3
GST clase z	C06017H12	At2g02390	0.1	-0.1	0.2	0.1	0.1	0.2	0.2	0.1	0.3	0.0	0.4	1.1
GST microsomal, probable [<i>A. thaliana</i>]	6565	At1g65820	0.1	0.3	0.1	0.4	0.2	0.5	-0.1	0.0	0.0	0.0	0.3	0.9
Glutaredoxina [<i>A. thaliana</i>]	C05803A10	At3g11920	0.3	0.4	0.0	0.4	0.2	0.5	0.3	0.0	0.0	0.4	0.4	0.9
Prot. precursora de Fe-SOD [<i>Medicago sativa</i>]	7042	At5g51100	0.3	0.0	0.1	-0.1	0.4	0.3	0.6	0.2	0.6	0.5	0.4	0.9
GST clase z	3370	At2g02390	0.0	0.1	0.0	0.1	0.1	0.1	-0.2	-0.1	0.0	0.0	0.3	0.8
Fe-SOD	3966	At5g51100	0.4	0.0	0.3	0.0	0.6	0.3	0.4	0.2	0.6	0.4	0.5	0.8
Glutaredoxina [<i>A. thaliana</i>]	1992	At4g08550	0.1	0.4	-0.1	0.2	-0.1	0.2	0.0	-0.1	0.0	0.2	0.3	0.8
MDHA reductasa [<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>]	6753	At3g52880	0.2	0.1	0.2	0.1	0.2	0.0	0.4	-0.2	0.3	0.0	0.4	0.7
GST, probable [<i>A. thaliana</i>]	C20007C12	At2g29420	0.1	-0.1	0.0	0.0	0.1	-1.3	0.3	0.2	0.1	0.2	0.3	0.7
APX (EC 1.11.1.11) - spinach	4495	At1g07890	0.1	0.1	-0.2	-0.2	0.0	0.1	0.3	0.5	0.2	0.5	0.4	0.6
APX, estroma [<i>Retama raetam</i>]	6070	At1g77490	0.0	0.0	0.0	0.0	-0.1	-0.1	0.1	-0.1	-0.2	0.1	0.4	0.6
TRX [<i>A. thaliana</i>]	3799	At2g47470	0.2	-0.2	0.1	0.0	-0.3	-0.6	0.3	-0.5	0.3	-0.3	0.5	0.6
POD [<i>A. thaliana</i>]	C31101F04	At2g71130	0.8	0.9	0.9	0.4	1.0	0.4	1.1	0.8	0.9	0.7	1.3	0.5
Prot. Precursora de Cu-Zn SOD, cloroplasto	1572	At2g28190	0.1	0.2	-0.2	0.0	-0.3	-0.5	-0.1	0.0	0.0	0.1	0.4	0.5
TRX [<i>A. thaliana</i>]	C08037C08	At5g06430	0.4	0.2	0.3	0.0	0.4	0.3	0.5	0.5	0.7	0.5	0.2	0.3
GST 14 [<i>Glycine max</i>]	6484	At3g09270	0.2	0.1	0.1	0.0	0.3	0.3	0.1	0.0	0.1	0.1	0.3	0.3
TRX H [<i>Citrus x paradisi</i>]	7076	At3g51030	-0.2	0.0	0.1	0.3	-0.4	-0.1	-0.6	-0.3	-0.7	-0.2	-0.2	0.3
GST T3, probable [<i>Lycopersicon esculentum</i>]	6918	At2g29420	-0.1	0.0	0.1	0.4	-0.1	-0.1	0.0	-0.1	0.0	-0.2	0.2	0.2
APX	5091	At1g07890	0.5	0.0	0.6	0.1	0.6	0.7	0.7	0.3	0.8	0.9	1.5	2.4
Glutaredoxina [<i>A. thaliana</i>]	C07002C08	At4g33040	-0.1	-0.3	0.1	0.0	0.1	0.4	-0.2	-0.1	-0.1	0.0	0.9	1.1
TRX [<i>A. thaliana</i>]	595	At1g50320	-0.2	0.2	0.1	0.2	-0.1	0.1	0.2	0.2	0.3	0.2	0.5	0.4

Tabla 60: Genes relacionados con el estrés oxidativo que disminuyeron su expresión en los frutos recién acondicionados con etileno antes de transferirlos a aire, respecto a los frutos RTC (Ver detalles en Tabla 25 y Tabla 58)

Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	4 días						4 días + 14 días Aire					
			Aire		Etileno		I-MCP		Aire		Etileno		I-MCP	
			F	A	F	A	F	A	F	A	F	A	F	A
NAD(P)H-quinona oxidoreductasa cad. 3, cloroplasto	4212	-	-0.6	-0.5	-1.0	-0.6	-0.2	-0.1	0.1	-0.2	-0.4	-0.2	-0.9	-1.0
Cu-Zn SOD [<i>Alvencia marina</i>]	1893	At1g08830	-0.2	0.1	-0.7	-0.5	-0.3	0.1	0.0	0.0	0.1	-0.1	0.3	0.1
Catalasa [<i>Helicobacter pylori</i>] 99]	570	-	-0.3	-	-	-	-	-0.8	-	-	-	-	-	-
Fosfolípido hidroxiperóxido GR [<i>Citrus sinensis</i>]	6875	At4g11600	-0.3	-0.6	-0.4	-0.9	-0.4	-0.4	0.2	-0.3	0.1	-0.1	-0.8	-0.3
Catalasa [<i>Prunus persica</i>]	3885	At4g35090	-0.3	-0.5	-0.4	-0.9	-0.1	-0.3	-0.2	-0.4	-0.2	-0.2	-0.3	-0.4
Catalasa [<i>Prunus persica</i>]	3191	At1g20620	-0.3	-0.4	-0.6	-0.8	-0.2	-0.4	0.0	-0.4	-0.2	0.0	-0.1	-0.2
GST 12 [<i>Glycine max</i>]	C05811E06	At5g62480	0.5	0.6	-0.6	-0.8	0.1	-0.4	0.4	0.8	0.5	0.6	-0.4	-1.0
GST [<i>A. thaliana</i>]	6741	At1g10360	0.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Prot. precursora de ferredoxina [2Fe-2S] fd, no fotosintética	C06005A04	At2g27510	-0.1	-0.1	-0.1	-	-0.1	-0.1	-0.3	0.1	-	0.0	-	-0.2
Prot. precursora de POD	C08032B11	At5g05340	0.1	-	0.2	-	-	-	-	-	0.6	0.3	-	-
POD (EC 1.1.1.17) - upland cotton	7179	At4g21960	-0.4	0.0	-1.5	-0.9	0.8	0.1	0.4	0.2	-1.2	-0.7	-2.4	-2.3
Prot. precursora de TRX tipo F, cloroplasto (TRX-F)	3884	At5g16400	-1.0	-0.9	-1.5	-1.0	-1.3	-0.8	-0.8	-0.6	-0.9	-0.7	-0.9	-0.5
MDHA reductasa [<i>Spinacia oleracea</i>]	5068	At1g63940	-0.3	0.0	-0.8	-0.7	0.0	0.1	-0.3	-0.5	-0.7	-0.9	-0.5	-0.8
TRX [<i>A. thaliana</i>]	3097	At5g06690	-0.6	-0.9	-0.7	-1.0	-0.2	-0.7	-0.6	-0.6	-0.6	-0.6	-1.3	-1.4

Tabla 61: Genes relacionados con el estrés oxidativo que disminuyeron su expresión en los frutos tratados con 1-MCP y almacenados 14 días en aire pero que no se expresan diferencialmente en los frutos tratados 4 días con etileno antes de la transferencia a aire, respecto a los frutos RTC. (Ver detalles en Tabla 25 y Tabla 58).

Proteína más similar		Unigen		Homólogo en <i>A. thaliana</i>		4 días						4 días + 14 días Aire							
								Aire		Etileno		I-MCP		Aire		Etileno		I-MCP	
		F	A	F	A	F	A	F	A	F	A	F	A	F	A	F	A	F	A
Glutaredoxina, probable [<i>A. thaliana</i>]																			
Prot. precursora de ferredoxina [2Fe-2S], no fotosintética																			
Cu-Zn SOD (EC 1.15.1.1) (Cu-Zn) - sweet orange																			
TRX tipo H (TRX-H)																			
Ferredoxina, cloroplasto (PETF) [<i>A. thaliana</i>]																			
Prot. con dominio C-terminal GST																			
Ferredoxina / Glutamato sintasa (EC 1.4.7.1)																			
TRX m2, probable [<i>Pisum sativum</i>]																			
DHA reductasa [<i>Nicotiana tabacum</i>]																			
POD clase III [<i>Gossypium hirsutum</i>]																			
Glutaredoxina [<i>A. thaliana</i>]																			
Cu-Zn SOD (EC 1.15.1.1) - sweet orange																			
NADH-ubiquinona oxidoreductasa [<i>A. thaliana</i>]																			
Cu-Zn SOD (EC 1.15.1.1) - sweet orange																			
Ferredoxina-TRX reductasa, subunidad catalítica [<i>Solanum tuberosum</i>]																			
		5991		At5g20500															
		C06005A04		At2g27510															
		C31305D02		At1g08830															
		6538		At3g51030															
		3106		At1g60950															
		C34001G09		At5g4000															
		C05068F04		At5g04140															
		6636		At3g15360															
		6815		At1g75270															
		3912		At5g05340															
		3082		At5g18600															
		3866		At1g08830															
		5688		At5g52840															
		3877		-															
		6133		At2g04700															

Tabla 62: Genes de la micromatriz '12K' incluidos en la categoría FatiGO+ 'Respuesta sistémica dependiente de ácido jasmónico y etileno' (nivel 8) que se indujeron en el flaveado de los frutos de 'Navelate' tratados 4 días con etileno con respecto a RTC. Se muestra el resultado de la comparación de los valores de expresión (escala Log₂) correspondientes a cada condición de almacenamiento con respecto a RTC. (●): inducciones; (●): represiones.

Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	4 días						14 días Aire					
			Aire		Etileno		I-MCP		Aire		Etileno		I-MCP	
			F	A	F	A	F	A	F	A	F	A	F	A
LOX, cloroplasto [<i>Oryza sativa</i> (japonica)]	C02025G09	Atlg17420	1.6	-0.2	1.4	0.0	1.6	-0.7	2.6	0.6	2.7	1.4	0.1	0.1
LOX [<i>Citrus jambhiri</i>]	C20001H03	At3g45140	1.4	-0.2	1.4	0.3	1.6	1.7	2.0	0.7	2.4	1.8	-0.2	0.1
LOX [<i>Nicotiana attenuata</i>]	C05808B05	At3g45140	1.2		1.4		1.9		2.1		2.4		0.2	
LOX [<i>Citrus jambhiri</i>]	C02023C12	At3g45140	1.6	-0.1	1.3	0.1	1.7	1.6	2.2	0.6	2.5	1.7	0.0	0.1
LOX [<i>Citrus jambhiri</i>]	7117	At3g45140	1.4	-0.2	1.2	-0.2	1.4	1.3	2.5	0.4	2.4	1.7	0.0	0.2
4CL, probable	C05075D04	At4g05160	0.0	-0.3	1.1	0.7	-0.4	0.0	-0.7	-0.3	-0.5	-0.6	-0.1	1.4
Cafeína sintasa [<i>Camellia sinensis</i>]	4794	Atlg19640	0.2	0.1	1.1	0.4	1.3	0.9	-0.3	0.2	-0.4	0.2	0.0	0.8
LOX [<i>Citrus jambhiri</i>]	C31103F06	Atlg72520	1.4	-0.5	1.1	-0.2	1.4	0.6	2.3	0.1	2.4	1.0	0.2	0.1
AOS [<i>Citrus sinensis</i>]	2242	At5g42650	0.5	0.9	0.9	1.2	-0.1	0.2	0.4	0.5	0.4	1.0	0.7	0.7
S-adenosil-L-metionina:ácido salicílico metil transferasa [<i>Antirrhinum</i> sp.]	6940	Atlg19640	0.2	-0.1	0.8	0.0	0.6	0.2	-0.2	0.0	-0.3	0.2	-0.1	0.3
AOC [<i>Medicago truncatula</i>]	6832	At3g25780	0.6	0.0	0.8	0.2	0.4	-0.1	1.4	0.4	1.1	0.4	0.0	-0.2
12-oxofitodienato reductasa 3 [<i>Lycopersicon esculentum</i>]	C02008A02	At2g06050	0.6	0.3	0.8	0.6	-0.2	-0.4	0.4	0.0	0.2	0.2	0.5	0.9
Prot. 'mangrin' [<i>Bruguiera sexangula</i>]	1418	At3g25780	0.5	0.5	0.8	0.4	0.1	-0.1	0.4	0.3	0.3	0.2	0.5	0.2
Prot. 'mangrin' [<i>Bruguiera sexangula</i>]	5307	Atlg13280	0.2	0.3	0.6	0.2	-0.1	-0.3	0.2	-0.2	0.1	-0.3	0.2	-0.3
LOX [<i>Nicotiana attenuata</i>]	6320	Atlg72520	0.1	0.1	0.5	0.4	0.0	-0.1	0.0	0.1	0.0	0.2	0.3	0.2
LOX [<i>Nicotiana attenuata</i>]	C31302F07	Atlg72520	0.1	0.1	0.4	0.1	0.1	0.0	0.4	0.2	0.3	0.3	0.3	0.2

Tabla 63: Genes de la micromatriz '12K' incluidos en la categoría FatiGO+ 'Respuesta sistémica dependiente de ácido jasmónico y etileno' (nivel 8) que se incluyeron en el albedo de los frutos de 'Navelate' tratados 14 h con 1-MCP almacenados 14 días en aire con respecto a RTC. Se muestra el resultado de la comparación de los valores de expresión (escala Log₂) correspondientes a cada condición de almacenamiento con respecto a RTC. (●): inducciones; (●): represiones.

Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	4 días						14 días Aire					
			Aire		Etileno		1-MCP		Aire		Etileno		1-MCP	
			F	A	F	A	F	A	F	A	F	A	F	A
LOX inducible por bacterias [<i>Gossypium hirsutum</i>]	At1g55020	721	-0.4	-0.3	0.2	0.5	0.3	1.3	-0.4	0.0	-0.2	0.1	0.7	3.0
Quitinasa [<i>Vitis vinifera</i>]	At3g12500	1061	-0.1	0.1	0.4	0.4	0.1	0.3	-0.2	0.4	-0.2	0.2	0.1	2.0
Treobromina sintasa [<i>Coffea arabica</i>]	At1g19640	C02012G04	0.1	0.1	0.0	0.5	0.8	1.2	-0.1	0.3	0.1	0.1	0.1	1.9
4CL, probable	At4g05160	C05075D04	0.0	-0.3	1.1	0.7	-0.4	0.0	-0.7	-0.3	-0.5	-0.6	-0.1	1.4
Histona deacetilasa [<i>A. thaliana</i>]	At4g38130	C04015H11					1.1							1.1
Tiolasa, probable [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)]	At2g33150	6332	0.2	0.0	0.3	0.4	0.2	0.2	0.3	0.0	0.1	0.1	0.5	0.9
12-oxofitodienoato reductasa 3 [<i>Lycopersicon esculentum</i>]	At2g06050	C02008A02	0.6	0.3	0.8	0.6	-0.2	-0.4	0.4	0.0	0.2	0.2	0.5	0.9
4CL, probable	At4g05160	331	-0.2	-0.2	0.1	-0.3	-0.3	-0.3	-0.4	-0.3	-0.2	-0.4	-0.2	0.8
Caféina sintasa [<i>Camellia sinensis</i>]	At1g19640	4794	0.2	0.1	1.1	0.4	1.3	0.9	-0.3	0.2	-0.4	0.2	0.0	0.8
Prot. de respuesta a auxinas GH3 [<i>A. thaliana</i>]	At2g46370	5497	0.0	0.4	0.1	0.2	0.0	0.1	0.1	-0.1	-0.4	0.0	0.8	0.8
AOS [<i>Citrus sinensis</i>]	At5g42650	2242	0.5	0.9	0.9	1.2	-0.1	0.2	0.4	0.5	0.4	1.0	0.7	0.7
MAPK 4 [<i>Petroselinum crispum</i>]	At4g01370	2030	0.3	0.1	0.4	0.1	0.3	0.2	0.6	0.1	0.6	0.2	0.8	0.7
12-oxofitodienoato reductasa, probable	At1g76690	C06012C12	0.3	0.3	0.4	0.5	0.3	0.4	0.3	0.5	0.2	0.5	0.1	0.6
COII ('coronatine-insensitive 1') (FBL2) [<i>A. thaliana</i>]	At2g39940	C31802B09	0.4	0.9	0.0	0.3	0.2	0.1	0.5	0.4	0.3	0.5	0.7	0.5
Prot. precursora de acetil CoA acil transferasa (EC 2.3.1.16)	At2g33150	6336	0.1	-0.1	-0.1	-0.1	-0.2	0.0	-0.3	-0.2	-0.4	-0.3	-0.1	0.4
MAPK homólogo a NTF6 (P43)	At4g01370	1949	0.0	0.0	0.1	0.1	0.1	0.0	0.2	0.0	0.1	0.0	0.4	0.4
LOX [<i>Nicotiana attenuata</i>]	At3g45140	C05808B05	1.2		1.4		1.9		2.1		2.4		0.2	

Tabla 64: Genes reunidos en la micromatriz '12K' relacionados en procesos de respuesta a de defensa en la interacción incompatible planta-patógeno (nivel 7) que aumentaron su expresión en el flavedo de frutos acondicionados 4 días con etileno antes de su transferencia a aire. (*): se inducen también en el flavedo de los frutos tratados con 1-MCP y almacenados 14 días en aire. Entre paréntesis se indica en número de genes inducidos con respecto al total de genes pertenecientes a esta categoría incluidos en la micromatriz de cDNA.

Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	4 días						4 días + 14 días Aire					
			Aire		Etileno		I-MCP		Aire		Etileno		I-MCP	
			F	A	F	A	F	A	F	A	F	A	F	A
Prot. precursora de LOX del cloroplasto [Oryza sativa (japonica)]	C02025G09	At1g17420	1.6	-0.2	1.4	0.0	1.6	-0.7	2.6	0.6	2.7	1.4	0.1	0.1
LOX [<i>Citrus jambhiri</i>]	C20001H03	At3g45140	1.4	-0.2	1.4	0.3	1.6	1.7	2.0	0.7	2.4	1.8	-0.2	0.1
*LOX [<i>Nicotiana attenuata</i>]	C05808B05	At3g45140	1.2	+	1.4	+	1.9	+	2.1	+	2.4	+	0.2	+
LOX [<i>Citrus jambhiri</i>]	C02023C12	At3g45140	1.6	-0.1	1.3	0.1	1.7	1.6	2.2	0.6	2.5	1.7	0.0	0.1
LOX [<i>Citrus jambhiri</i>]	7117	At3g45140	1.4	-0.2	1.2	-0.2	1.4	1.3	2.5	0.4	2.4	1.7	0.0	0.2
*4CL	C05075D04	At4g05160	0.0	-0.3	1.1	0.7	-0.4	0.0	-0.7	-0.3	-0.5	-0.6	-0.1	1.4
*Cafeína sintasa [<i>Camellia sinensis</i>]	4794	At1g19640	0.2	0.1	1.1	0.4	1.3	0.9	-0.3	0.2	-0.4	0.2	0.0	0.8
LOX [<i>Citrus jambhiri</i>]	C31103F06	At1g72520	1.4	-0.5	1.1	-0.2	1.4	0.6	2.3	0.1	2.4	1.0	0.2	0.1
*Fitoalexina PAD4 ('phytoalexin-deficient 4 protein') [<i>A. thaliana</i>]	C16014C02	At3g52430	0.6	0.6	0.9	0.8	-0.1	-0.1	-0.1	0.4	0.2	0.2	0.6	1.5
*AOS [<i>Citrus sinensis</i>]	2242	At5g42650	0.5	0.9	0.9	1.2	-0.1	0.2	0.4	0.5	0.4	1.0	0.7	0.7
S-adenosil-L-metionina:ácido salicílico metiltransferasa [<i>Antirrhinum</i> sp.]	6940	At1g19640	0.2	-0.1	0.8	0.0	0.6	0.2	-0.2	0.0	-0.3	0.2	-0.1	0.3
AOS [<i>Medicago truncatula</i>]	6832	At3g25780	0.6	0.0	0.8	0.2	0.4	-0.1	1.4	0.4	1.1	0.4	0.0	-0.2
*Prot. similar a osmotina [<i>Fagus sylvatica</i>]	C05134C10	At1g75040	0.0	-0.3	0.8	0.1	0.2	0.0	0.0	0.1	-0.1	-0.1	0.2	0.5
*12-oxophytodienoate reductase 3 [<i>Lycopersicon esculentum</i>]	C02008A02	At2g06050	0.6	0.3	0.8	0.6	-0.2	-0.4	0.4	0.0	0.2	0.2	0.5	0.9
Prot. 'mangrin' [<i>Bruguiera sexangula</i>]	1418	At3g25780	0.5	0.5	0.8	0.4	0.1	-0.1	0.4	0.3	0.3	0.2	0.5	0.2
Prot. 'mangrin' [<i>Bruguiera sexangula</i>]	5307	At1g13280	0.2	0.3	0.6	0.2	-0.1	-0.3	0.2	-0.2	0.1	-0.3	0.2	-0.3
LOX [<i>Nicotiana attenuata</i>]	6320	At1g72520	0.1	0.1	0.5	0.4	0.0	-0.1	0.0	0.1	0.0	0.2	0.3	0.2
LOX [<i>Nicotiana attenuata</i>]	C31302F07	At1g72520	0.1	0.1	0.4	0.1	0.1	0.0	0.4	0.2	0.3	0.3	0.3	0.2

Tabla 65: Genes reunidos en la micromatriz '12K' relacionados en procesos de respuesta a de defensa en la interacción incompatible planta-patógeno (nivel 7) que aumentaron su expresión en el albedo de los frutos tratados 14 h con 1-MCP y almacenados 14 días en aire (*): se inducen también en el flavedo y/o albedo de los frutos tratados 4 días con etileno. Entre paréntesis se indica en número de genes inducidos con respecto al total de genes pertenecientes a esta categoría incluidos en la micromatriz de cDNA.

FatiGO+ - Respuesta de defensa, interacción incompatible (nivel 7) (21/41) († 14h 1-MCP + 4 días Aire - Albedo)			4 días			14 días								
			Aire		Etileno		1-MCP		Aire		Etileno		1-MCP	
Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	F	A	F	A	F	A	F	A	F	A	F	A
*LOX [<i>Nicotiana attenuata</i>]	C05808B05	At3g45140	1.2	+	1.4	+	1.9	+	2.1	+	2.4	+	0.2	+
Quitinasa [<i>Vitis vinifera</i>]	1061	At3g12500	-0.1	0.1	0.4	0.4	0.1	0.3	-0.2	0.4	-0.2	0.2	0.1	2.0
Treobromina sintasa [<i>Coffea arabica</i>]	C02012G04	At1g19640	0.1	0.1	0.0	0.5	0.8	1.2	-0.1	0.3	0.1	0.1	0.1	1.9
Prot. unión a DNA 3 [<i>Nicotiana tabacum</i>]	3964	At3g56400	-0.6	-0.6	-0.1	0.6	1.1	1.8	-0.2	-0.3	-0.2	-0.1	0.3	1.7
*Fitoalexina PAD4 (phytoalexin-deficient 4 protein) [<i>A. thaliana</i>]	C16014C02	At3g52430	0.6	0.6	0.9	0.8	-0.1	-0.1	-0.1	0.4	0.2	0.2	0.6	1.5
PLD [<i>A. thaliana</i>]	4878	At2g42010	0.2	0.1	0.2	0.3	0.3	0.5	0.1	0.2	0.5	0.2	0.7	1.5
*4CL ,probable putative	C05075D04	At4g05160	0.0	-0.3	1.1	0.7	-0.4	0.0	-0.7	-0.3	-0.5	-0.6	-0.1	1.4
Histona deacetilasa [<i>A. thaliana</i>]	C04015H11	At4g38130	-	-	-	-	1.1	-	-	-	-	-	1.1	-
Histona deacetilasa [<i>A. thaliana</i>]	C04015H11	At4g38130	-	-	-	-	1.1	-	-	-	-	-	1.1	-
Tiolasa, probable [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)]	6332	At2g33150	0.2	0.0	0.3	0.4	0.2	0.2	0.3	0.0	0.1	0.1	0.5	0.9
*12-oxifitodienato reductasa 3 [<i>Lycopersicon esculentum</i>]	C02008A02	At2g06050	0.6	0.3	0.8	0.6	-0.2	-0.4	0.4	0.0	0.2	0.2	0.5	0.9
Prot. similar a EDS1 [<i>Nicotiana benthamiana</i>]	C31010G02	At3g48090	0.3	0.7	0.0	0.6	0.5	0.5	0.4	0.5	0.3	0.6	0.4	0.8
4CL ,probable putative	331	At4g05160	-0.2	-0.2	0.1	-0.3	-0.3	-0.3	-0.4	-0.3	-0.2	-0.4	-0.2	0.8
Avr9/Cf-9 rapidly elicited protein 276 [<i>Nicotiana tabacum</i>]	C34202B10	At1g29340	-0.1	0.0	-0.1	0.3	-0.1	0.2	-0.4	0.2	-0.2	0.3	0.2	0.8
*Cafeína sintasa [<i>Camellia sinensis</i>]	4794	At1g19640	0.2	0.1	1.1	0.4	1.3	0.9	-0.3	0.2	-0.4	0.2	0.0	0.8
Prot. respuesta a auxinas GH3 [<i>A. thaliana</i>]	5497	At2g46370	0.0	0.4	0.1	0.2	0.0	0.1	0.1	-0.1	-0.4	0.0	0.8	0.8
*AOS [<i>Citrus sinensis</i>]	2242	At5g42650	0.5	0.9	0.9	1.2	-0.1	0.2	0.4	0.5	0.4	1.0	0.7	0.7
MAPK4 4 [<i>Petroselinum crispum</i>]	2030	At4g01370	0.3	0.1	0.4	0.1	0.3	0.2	0.6	0.1	0.6	0.2	0.8	0.7
Prot. resistencia enfermedad, clase NBS-LRR, probable [<i>A. thaliana</i>]	2142	At4g16890	-0.1	0.3	0.1	0.2	0.1	0.5	-0.1	0.3	0.1	0.4	0.2	0.6
*12-oxifitodienato reductasa, probable - Madagascar	C06012C12	At1g76690	0.3	0.3	0.4	0.5	0.3	0.4	0.3	0.5	0.2	0.5	0.1	0.6
*Prot. similar a osmotina [<i>Fagus sylvatica</i>]	C05134C10	At1g75040	0.0	-0.3	0.8	0.1	0.2	0.0	0.0	0.1	-0.1	-0.1	0.2	0.5
COI1 ('coronatine-insensitive 1') / FBL2 [<i>A. thaliana</i>]	C31802B09	At2g39940	0.4	0.9	0.0	0.3	0.2	0.1	0.5	0.4	0.3	0.5	0.7	0.5
Acetil CoA aciltransferasa (EC 2.3.1.16)	6336	At2g33150	0.1	-0.1	-0.1	-0.1	-0.2	0.0	-0.3	-0.2	-0.4	-0.3	-0.1	0.4
MAPK homóloga a NTF6 (P43)	1949	At4g01370	0.0	0.0	0.1	0.1	0.1	0.0	0.2	0.0	0.1	0.0	0.4	0.4
MEK / MAPK kinsae [<i>Medicago sativa</i> subsp. x varia]	C07005E02	At3g21220	-0.7	-0.3	0.0	0.3	-0.1	0.5	0.2	0.1	-0.2	0.1	-0.3	0.2

Tabla 66: Genes que variaron su expresión en los frutos tratados 4 días con etileno antes de la transferencia a aire respecto a los frutos RTC, y que codifican proteínas que participan en la biosíntesis de ácido jasmónico, degradación de lípidos de membrana o implicados en procesos de biosíntesis, elongación y β -oxidación de ácidos grasos. Los valores de cada comparación se expresan en escala logarítmica en base 2 (Log_2) (*): se inducen o reprimen en los frutos tratados con 1-MCP y almacenados 14 días en aire (●): específicos de flavedo; (●) específicos de albedo (●) comunes a ambos tejidos; (+) valor de expresión no detectable en el primer término de la comparación; (-) valor de expresión no detectable en el segundo término de la comparación (Ver detalles en Tabla 25).

			Metabolismo Lípidos											
			Inducción 4 días Etileno (\uparrow 4dE)			4 días			4 días + 14 días Aire					
Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	Aire		Etileno		1-MCP		Aire		Etileno		1-MCP	
			F	A	F	A	F	A	F	A	F	A	F	A
Prot. precursora LOX, cloroplasto [<i>Oryza sativa</i> (japónica)]	C02025G09	At1g17420	1.6	-0.2	1.4	0.0	1.6	-0.7	2.6	0.6	2.7	1.4	0.1	0.1
LOX [<i>Citrus jambhiri</i>]	C20001H03	At3g45140	1.4	-0.2	1.4	0.3	1.6	1.7	2.0	0.7	2.4	1.8	-0.2	0.1
Lipasa, clase 3 [<i>A. thaliana</i>]	C31602F04	At1g51440	0.4	0.2	1.3	0.1	0.3	0.3	0.7	0.4	0.9	0.3	0.4	0.5
LOX [<i>Citrus jambhiri</i>]	C02023C12	At3g45140	1.6	-0.1	1.3	0.1	1.7	1.6	2.2	0.6	2.5	1.7	0.0	0.1
LOX inducida por bacterias [<i>Gossypium hirsutum</i>]	C08007A11	-	1.2	-0.7	1.3	-0.2	1.8	1.5	1.3	0.0	2.0	0.2	0.8	2.9
LOX [<i>Citrus jambhiri</i>]	7117	At3g45140	1.4	-0.2	1.2	-0.2	1.4	1.3	2.5	0.4	2.4	1.7	0.0	0.2
*Elongasa de ác. grasos 3-ketoacil-CoA sintasa 1 (KCS1) [<i>A. thaliana</i>]	4071	At1g01120	1.3	-0.5	1.2	-0.4	0.4	-0.1	1.1	-0.5	0.5	0.2	1.1	-0.3
S-adenosil-L-metionina: ácido jasmónico carboximetiltransferasa	719	At1g19640	0.2	0.1	1.1	0.4	1.3	0.9	-0.3	0.2	-0.4	0.2	0.0	0.8
LOX [<i>Citrus jambhiri</i>]	C31103F06	At1g72520	1.4	-0.5	1.1	-0.2	1.4	0.6	2.3	0.1	2.4	1.0	0.2	0.1
*Prot. F12L6.8 homóloga a lisofosfolipasa [<i>A. thaliana</i>]	2766	At2g39420	1.1	0.7	0.9	0.9	1.3	1.1	1.6	1.6	1.7	1.4	1.7	3.1
S-adenosil-L-metionina: ácido jasmónico carboximetiltransferasa	720	At1g19640	0.2	-0.1	0.8	0.0	0.6	0.2	-0.2	0.0	-0.3	0.2	-0.1	0.3
Aleno oxido ciclasa (AOS) [<i>Medicago truncatula</i>]	6832	At3g25780	0.6	0.0	0.8	0.2	0.4	-0.1	1.4	0.4	1.1	0.4	0.0	-0.2
ACPI, precursor cloroplasto	6334	At4g25050	0.4	0.1	0.7	0.0	-0.4	-0.3	0.5	-0.1	0.2	0.0	0.2	-0.2
Enoil-ACP reductasa (NADH2) (EC 1.3.1.9)	5404	At2g05990	0.2	0.2	0.7	0.2	-0.4	-0.2	0.3	-0.1	-0.1	-0.2	0.1	-0.5
Acetil-CoA C-acetiltransferasa [<i>A. thaliana</i>]	4150	At5g48230	0.4	0.0	0.5	-0.1	0.1	0.0	0.4	-0.2	0.2	-0.1	0.4	-0.4
LOX [<i>Nicotiana attenuata</i>]	6320	At1g72520	0.1	0.1	0.5	0.4	0.0	-0.1	0.0	0.1	0.0	0.2	0.3	0.2
Prot. de unión a acil-CoA (ACPB), probable [<i>A. thaliana</i>]	C20005F11	At4g24230	0.2	-0.1	0.5	0.4	-0.3	0.1	-0.1	0.0	-0.1	0.0	0.3	0.7
Prot. 'very-long-chain fatty acid condensing enzyme', probable [<i>A. thaliana</i>]	C05073G02	At1g19440	0.2	0.1	0.4	0.3	0.2	0.4	0.3	0.3	0.4	0.3	0.4	0.6
Enoil-CoA hidrataasa/isomerasa [<i>A. thaliana</i>]	2598	At1g06550	0.2	-0.1	0.4	0.3	0.1	0.1	-0.1	-0.3	0.1	0.0	0.6	0.7
LOX [<i>Nicotiana attenuata</i>]	C31302F07	At1g72520	0.1	0.1	0.4	0.1	0.1	0.0	0.4	0.2	0.3	0.3	0.3	0.2
*Lipasa 1 extracelular (EXL1), familia II [<i>A. thaliana</i>]	1667	At1g75880	0.1	+	0.2	+	0.4	+	0.8	+	0.5	+	0.5	+
Prot. palmitoil tioesterasa, probable [<i>Tropaeolum majus</i>]	C20006F06	At3g60340				+						+		
*Prot. 'very-long-chain fatty acid condensing enzyme' CUT1 [<i>A. thaliana</i>]	5421	At1g68530	0.2	+	-0.4	+	0.2	+	0.9	+	0.3	+	0.4	+
Prot. familia lipasa/hidrolasa con motivo GDSL [<i>A. thaliana</i>]	C07002G04	At2g04570	0.1	1.3	0.3	1.3	-0.3	0.0	0.2	0.9	0.3	0.7	-0.2	-0.1
*Prot. familia α/β -hidrolasa [<i>A. thaliana</i>]	3876	At3g10870	0.3	0.4	0.5	0.9	0.4	0.1	-0.1	0.0	0.2	0.1	1.1	1.3
*Prot. familia α/β -hidrolasa [<i>A. thaliana</i>]	C31205H05	At5g16120	0.1	0.7	0.4	0.9	0.1	0.6	0.0	0.6	0.0	0.4	0.7	1.4
*Esterasa/Lipasa/Thioesterasa [<i>A. thaliana</i>]	C05072C08	At3g03990	0.0	-0.1	0.4	0.8	0.0	0.0	0.1	0.2	0.3	0.1	0.2	0.7
β -ketoacil-ACP sintasa I-2 [<i>Glycine max</i>]	C32104F10	At5g46290	0.1	0.6	0.2	0.5	-0.5	-0.4	-0.2	-0.3	-0.3	0.0	-0.3	-0.7
*12-oxofitodienoato reductasa, probable (EC 1.3.1.42) - Madagascar	C06012C12	At1g76690	0.3	0.3	0.4	0.5	0.3	0.4	0.3	0.5	0.2	0.5	0.1	0.6
Prot. familia α/β -hidrolasa [<i>A. thaliana</i>]	1346	At3g50440	-0.2	-0.5	1.6	0.9	-1.5	-1.2	-1.4	-1.0	-1.0	-0.7	0.1	0.0
LOX [<i>Nicotiana attenuata</i>]	C05808B05	At3g45140	1.2	+	1.4	+	1.9	+	2.1	+	2.4	+	0.2	+
12-oxofitodienoato reductasa 3 [<i>Lycopersicon esculentum</i>]	C02008A02	At2g06050	0.6	0.3	0.8	0.6	-0.2	-0.4	0.4	0.0	0.2	0.2	0.5	0.9
*Esterasa/Lipasa/Thioesterasa [<i>A. thaliana</i>]	1075	At1g52760	0.6	0.3	0.6	0.6	-0.1	-0.1	0.6	0.4	0.7	0.8	1.1	0.6

			Metabolismo Lípidos											
			Represión 4 días Etileno (\downarrow 4dE)			4 días			4 días + 14 días Aire					
Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	Aire		Etileno		1-MCP		Aire		Etileno		1-MCP	
			F	A	F	A	F	A	F	A	F	A	F	A
Prot. precursora fosfolipasa D α -1 (PLD 1) (<i>Choline</i>)	6488	At1g52570	-0.1	-0.4	-0.5	-0.8	-0.1	-0.6	0.4	-0.6	0.2	-0.5	-0.2	-0.4
Lipasa, probable [<i>A. thaliana</i>]	1222	At2g42690	0.0	-0.3	-0.4	-0.7	0.1	-0.2	0.4	0.1	0.2	0.3	0.0	0.0
Prot. familia α/β -hidrolasa [<i>A. thaliana</i>]	5176	At3g10870	0.1	-0.1	-0.3	-0.4	0.3	0.1	0.2	0.0	0.3	0.0	-0.4	-0.2
Acetil-CoA sintasa [<i>Solanum tuberosum</i>]	C07005B01	At5g36880	-0.9	-0.6	-0.7	-1.1	-0.8	-1.2	-0.7	-0.8	-1.1	-0.9	-0.8	-1.7
Acil-CoA oxidasa (ACX3) [<i>A. thaliana</i>]	2341	At1g06300	0.4	0.5	-0.6	-0.6	0.0	-0.1	0.3	0.7	0.4	0.4	0.0	-0.7

Tabla 67: Genes cuya expresión aumentó en los frutos tratados con 1-MCP y almacenados 14 días en aire con respecto a los frutos RTC, pero no en los tratados 4 días con etileno, y que codifican proteínas que participan en la biosíntesis de ácido jasmónico, degradación de membrana o implicados en procesos de biosíntesis, elongación y β -oxidación de ácidos grasos. (Ver detalles en Tabla 25 y Tabla 66).

Proteína más similar	Metabolismo Lípidos																			
	Inducción 14 días 1-MCP pero no 4 días Etileno (\uparrow 14 MCP)						4 días						4 días + 14 días Aire							
	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	Aire	Etileno	I-MCP	Aire	Etileno	I-MCP	Aire	Etileno	I-MCP	Aire	Etileno	I-MCP	Aire	Etileno	I-MCP			
Elongasa de ác. grasos, probable [<i>A. thaliana</i>]	4317	At2g28630	1.4	-0.5	-0.1	-0.6	0.7	0.4	2.1	0.0	0.6	0.2	1.8	0.2	0.6	0.2	1.8	0.2		
Prot. 'fiddlehead' [<i>Gossypium hirsutum</i>]	3510	At2g26250	0.6	2.2	-0.4	0.5	0.9	1.1	1.7	2.4	0.6	2.0	1.0	1.6	0.6	2.0	1.0	1.6		
Prot. CER / WAX2, probable [<i>A. thaliana</i>]	4288	At5g57800	0.7	0.1	0.3	-0.8	-0.1	-0.2	1.0	0.7	0.9	0.7	0.5	-0.6	0.7	0.9	0.7	0.5	-0.6	
LOX inducida por bacterias [<i>Gossypium hirsutum</i>]	721	At1g55020	-0.4	-0.3	0.2	0.5	0.3	1.3	-0.4	0.0	-0.2	0.1	0.7	3.0	0.0	-0.2	0.1	0.7	3.0	
LOX inducida por bacterias [<i>Gossypium hirsutum</i>]	C08007A11	-	1.2	-0.7	1.3	-0.2	1.8	1.5	1.3	0.0	2.0	0.2	0.8	2.9	0.0	2.0	0.2	0.8	2.9	
S-adenosil-L-metionina: ácido jasmónico carboxilmetiltransferasa	10385	At1g19640	0.1	0.1	0.0	0.5	0.8	1.2	-0.1	0.3	0.1	0.1	0.1	1.9	0.1	0.1	0.1	0.1	1.9	
Prot. 'short-chain acyl-CoA oxidase' [<i>A. thaliana</i>]	5277	At3g51840	0.0	-0.3	-0.2	0.1	0.2	-0.1	0.0	-0.2	0.1	-0.2	0.6	1.2	0.0	-0.2	0.6	1.2		
Prot. 'short-chain acyl-CoA oxidase' [<i>A. thaliana</i>]	C31105C08	At3g51840	0.0	-0.2	0.0	0.0	0.1	-0.1	0.0	-0.1	0.0	-0.2	0.6	0.9	0.0	-0.1	0.0	-0.2	0.6	0.9
Prot. 'long-chain-fatty-acid--CoA ligase' / 'long-chain acyl-CoA synthetase',	4506	At4g23850	-0.1	0.1	0.1	0.2	0.0	0.1	0.0	-0.1	0.0	-0.1	0.1	0.5	0.9	0.1	0.1	0.5	0.9	
Acil-ACP tioesterasa [<i>Garcinia mangostana</i>]	6064	At1g08510	-0.4	-0.3	-0.1	0.2	-0.4	0.4	0.1	-0.5	0.0	-0.5	0.9	0.9	0.0	-0.5	0.0	-0.5	0.9	
Acil-ACP tioesterasa [<i>Garcinia mangostana</i>]	6064	At1g08510	-0.4	-0.3	-0.1	0.2	-0.4	0.4	0.1	-0.5	0.0	-0.5	0.9	0.9	0.0	-0.5	0.0	-0.5	0.9	
Acil-CoA oxidasa [<i>Glycine max</i>]	C31302F10	At4g16760	0.2	-0.1	0.3	0.4	0.0	-0.1	0.3	0.3	0.3	0.4	0.4	0.8	0.3	0.3	0.4	0.4	0.8	
Prot. 'very-long-chain fatty acid condensing enzyme', probable [<i>A. thaliana</i>]	C04027A09	At1g19440	0.0	-0.1	0.1	0.3	0.0	0.2	-0.1	0.3	0.0	0.3	0.5	0.8	0.0	0.3	0.0	0.3	0.5	0.8
Prot. de unión a acil-CoA (ACPP), probable [<i>A. thaliana</i>]	C20005F11	At4g24230	0.2	-0.1	0.5	0.4	-0.3	0.1	-0.1	0.0	-0.1	0.0	0.3	0.7	0.0	-0.1	0.0	0.3	0.7	
Enoil-CoA hidratasa/isomerasa [<i>A. thaliana</i>]	2598	At1g06550	0.2	-0.1	0.4	0.3	0.1	0.1	-0.1	-0.3	0.1	0.0	0.6	0.7	0.1	-0.3	0.1	0.0	0.6	0.7
Prot. familia lipasa/hidrolasa con motivo GDSL [<i>A. thaliana</i>]	C32104G09	At5g45910	0.0	-0.1	0.1	0.0	0.1	0.5	0.4	0.4	0.1	0.4	0.2	0.7	0.4	0.4	0.1	0.4	0.2	0.7
Enoil CoA hidratasa/isomerasa [<i>A. thaliana</i>]	C31802B06	At4g31810	0.1	0.0	0.2	0.2	0.2	0.6	0.0	0.2	0.3	0.2	0.6	0.7	0.0	0.2	0.3	0.2	0.6	0.7
Prot. familia α/β -hidrolasa [<i>A. thaliana</i>]	3843	At4g24160	0.2	0.0	0.5	0.4	0.0	0.1	0.1	0.5	0.1	0.5	0.1	0.3	0.7	0.1	0.5	0.1	0.3	0.7
Prot. 'very-long-chain fatty acid condensing enzyme', probable [<i>A. thaliana</i>]	C05073G02	At1g19440	0.2	0.1	0.4	0.3	0.2	0.4	0.3	0.3	0.4	0.3	0.4	0.6	0.3	0.3	0.4	0.3	0.4	0.6
Enoil CoA hidratasa [<i>A. thaliana</i>]	5819	At4g16800	0.2	0.1	0.0	0.0	0.3	0.3	0.3	-0.1	0.2	0.1	0.1	0.5	0.2	0.1	0.1	0.1	0.5	
β -ketoacil-CoA sintasa, probable [<i>A. thaliana</i>]	C03006F10	At1g04220	0.1	0.2	0.3	0.3	0.1	0.3	0.1	0.3	0.0	0.1	0.2	0.5	0.3	0.0	0.1	0.2	0.5	
Prot. familia α/β -hidrolasa [<i>A. thaliana</i>]	2108	At3g48410	0.3	0.2	-0.1	-0.2	0.5	0.2	0.8	0.5	0.8	0.6	0.7	0.5	0.8	0.6	0.7	0.5	0.5	
Prot. 'acyl-activating enzyme 18' [<i>A. thaliana</i>]	C05001H07	At1g55320	0.3	-0.1	0.2	0.0	0.2	0.6	0.3	0.3	0.3	0.4	0.5	0.4	0.4	0.5	0.4	0.5	0.4	0.4
Acetil-CoA C-aciltransferasa (EC 2.3.1.16) precursor - cucurbit	6336	At2g33150	0.1	-0.1	-0.1	-0.1	-0.2	0.0	-0.3	-0.2	-0.4	-0.3	-0.1	0.4	0.4	-0.3	-0.1	0.4	0.4	
ACP mitocondrial, mitocondrial / NADH-ubiquinona	C03009A12	At2g44620	-0.1	-0.1	0.0	-0.1	0.1	0.2	0.0	0.2	0.0	0.2	-0.1	0.0	-0.3	0.0	-0.3	0.3	0.3	
Esteroido 5- α reductasa [<i>Cicer arietinum</i>]	3250	At3g55360	0.2	0.1	0.0	0.0	0.1	-0.2	0.3	0.0	0.1	0.3	0.2	0.3	0.0	0.1	0.3	0.2	0.3	
Enoil CoA hidratasa, probable [<i>Cicer arietinum</i>]	C31105C03	At4g16210	0.2	0.4	0.1	0.4	-0.2	0.0	-0.2	0.0	-0.4	0.0	0.3	0.2	0.0	-0.4	0.0	0.3	0.2	
Fosfolipasa D [<i>A. thaliana</i>]	4878	At2g42010	0.2	0.1	0.2	0.3	0.3	0.5	0.1	0.2	0.5	0.2	0.7	1.5	0.1	0.2	0.5	0.2	0.7	1.5

Tabla 68: Genes cuya expresión disminuyó en los frutos tratados con 1-MCP y almacenados 14 días en aire con respecto a los frutos RTC, pero no en los tratados 4 días con etileno, y que codifican proteínas que participan en la biosíntesis de ácido jasmónico, degradación de lípidos de membrana o implicados en procesos de biosíntesis, elongación y β -oxidación de ácidos grasos. (Ver detalles en Tabla 25 y Tabla 66).

Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	4 días			4 días + 14 días Aire		
			Aire	Etileno	1-MCP	Aire	Etileno	1-MCP
			F A	F A	F A	F A	F A	F A
Hidroperóxido liasa [<i>Citrus jambhiri</i>]	4579	At4g15440	0.4 -0.4	0.1 -0.3	-0.3 -0.1	0.4 -0.2	0.3 -0.1	-1.1 -0.4
Hidroperóxido liasa de ácidos grasos [<i>Citrus sinensis</i>]	3923	At5g42650	0.4 0.1	0.4 -0.5	0.0 0.1	1.1 0.4	0.6 0.6	-1.0 -0.3
Prot. familia lipasa/hidrolasa, con motivo GDSL [<i>A. thaliana</i>]	6623	At3g48460	-0.1 -0.1	-0.1 -0.1	-0.6 0.0	-0.5 0.1	-0.6 0.1	-0.6 0.0
β-oxoacil-ACP reductasa [<i>Brassica napus</i>]	301	At1g24360	-0.2 -0.1	0.0 -0.1	-0.2 -0.1	-0.1 0.0	-0.1 -0.3	0.0 -0.3
Esterasa/Lipasa/Thioesterasa [<i>A. thaliana</i>]	C01019C05	At1g54570	-0.5 -0.3	-0.3 -0.3	-0.4 -0.6	0.0 -0.1	0.0 -0.2	-0.4 -1.0
Prot. familia lipasa/hidrolasa, con motivo GDSL [<i>A. thaliana</i>]	C03005B04	At1g71691	0.1 -0.5	0.0 -0.4	-0.2 -0.5	-0.3 -0.5	-0.3 -0.5	-0.3 -0.5
3-ketoacil-ACP sintasa [<i>Cuphea pulcherrima</i>]	1919	At1g74960	0.0 0.1	-0.1 -0.2	0.1 -0.2	0.4 0.1	0.3 0.2	0.0 -0.4
Prot. 'long-chain-fatty-acid--CoA ligase'	C31504H07	At2g04350	-0.3 -0.3	-0.2 -0.5	-0.3 -0.4	-0.3 -0.4	-0.4 -0.3	-0.1 -0.4
Enoil-ACP reductasa (NADH2) (EC 1.3.1.9)	5404	At2g05990	0.2 0.2	0.7 0.2	-0.4 -0.2	0.3 -0.1	-0.1 -0.2	0.1 -0.5
Acil-ACP desaturasa, precursor cloroplasto	1801	At2g43710	0.2 0.8	0.3 0.6	-0.9 -1.0	-0.2 -0.3	-0.2 -0.4	0.2 -1.3
Fosfolipasa D, clase z (PLDP1) [<i>A. thaliana</i>]	C08039F03	At3g05630	-0.1 0.0	-0.3 -0.2	-0.3 -0.2	-0.4 -0.1	-0.4 -0.2	-0.2 -0.5
Prot. Epóxido hidrolasa [<i>Nicotiana tabacum</i>]	5375	At4g02340	-0.4 -0.2	-0.2 -0.2	0.0 -0.1	-0.1 -0.1	-0.2 -0.1	-0.4 -0.3
Prot. familia α/β-hidrolasa [<i>A. thaliana</i>]	5971	At4g37470	-0.4 -0.3	-0.5 -0.9	-0.3 -0.6	-0.6 -0.8	-1.1 -1.0	-0.5 -1.3
Acetil-CoA carboxilasa (EC 6.4.1.2)	C32107C09	At5g35360	0.1 0.0	0.3 0.0	-0.2 -0.3	0.0 -0.2	0.0 -0.1	0.1 -0.3
Acetil-CoA sintasa [<i>Solanum tuberosum</i>]	C07005B01	At5g36880	-0.9 -0.6	-0.7 -1.1	-0.8 -1.2	-0.7 -0.8	-1.1 -0.9	-0.8 -1.7
Esterasa/Lipasa/Thioesterasa [<i>A. thaliana</i>]	C34004H09	At5g41130	0.4 0.0	0.3 0.2	-0.1 -0.3	0.1 -0.3	0.0 0.2	0.0 -0.6
β-ketoacil-ACP sintasa I-2 [<i>Glycine max</i>]	C32104F10	At5g46290	0.1 0.6	0.2 0.5	-0.5 -0.4	-0.2 -0.3	-0.3 0.0	-0.3 -0.7
3-oxoacil-ACP sintasa (EC 2.3.1.41) precursor	197	At5g46290	-0.2 -0.1	-0.1 -0.1	-0.4 0.1	-0.5 -0.1	-0.5 -0.3	-0.6 -0.6
Acetil-CoA C-acetiltransferasa [<i>A. thaliana</i>]	4150	At5g48230	0.4 0.0	0.5 -0.1	0.1 0.0	0.4 -0.2	0.2 -0.1	0.4 -0.4

Tabla 69: Genes relacionados con el transporte de metabolitos cuya expresión se indujo en el albedo de los frutos recién acondicionados 4 días con etileno con respecto a los frutos RTC. (*): se inducen también en el albedo de los frutos tratados con 1-MCP y almacenados 14 días en aire. (●): inducción (●): represión. Los genes se disponen en la tabla por orden de inducción. Los valores se expresan en escala logarítmica en base 2 (Log₂) (Ver detalles en Tabla 25).

Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	4 días						14 días						
			Aire		Etileno		1-MCP		Aire		Etileno		1-MCP		
			F	A	F	A	F	A	F	A	F	A	F	A	
Transportador ABC MRP, probable [<i>Oryza sativa</i> (japonica)]	2459	At3g13080	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-
Transportador de sulfatos [<i>Brassica oleracea</i>]	C19008G08	At3g51895	0.2	1.1	0.8	1.5	-1.4	-0.8	-0.5	-2.1	-0.9	0.6	0.4		
*Transportador de sulfatos ATST1 [<i>Oryza sativa</i> (japonica)]	C34107H08	At3g51895	0.6	1.2	0.9	1.5	-1.6	-1.0	-0.8	-0.7	-2.0	-0.8	1.1	0.7	
Transportador de azúcares, probable [<i>A. thaliana</i>]	C31803D02	At5g18840	0.2	1.1	0.2	1.2	-0.2	-0.7	-0.1	-0.2	-0.3	-0.4	0.6	0.2	
*Factor 2 de transporte nuclear NTF2 / reconocimiento de RNA	C02025E03	At5g43960	0.4	0.3	1.1	1.2	-0.2	-0.1	0.4	0.0	0.6	0.2	1.2	1.5	
*Prot. relacionada con transporte [<i>A. thaliana</i>]	3103	At5g13750	-0.2	0.1	0.2	1.1	0.9	1.3	-0.7	0.0	-0.8	-0.1	0.5	1.7	
*Transportador de nucleótidos-azúcares [<i>A. thaliana</i>]	C05057G09	At5g41760	0.5	0.1	1.0	1.1	0.1	-0.2	0.6	0.4	0.8	0.3	1.1	1.2	
Transportador de oxalacetato de la membrana interna mitocondrial	C18020E02	At5g58970	-0.3	-0.2	1.3	1.0	-0.5	-0.5	-1.7	-0.4	-0.5	-0.4	-0.2	0.1	
Transportador de iones hierro de la raíz IRT1 [<i>Malus xiaojinensis</i>]	C34108F04	At4g19690	0.3	0.4	0.7	0.9	-0.3	-0.7	-0.2	0.0	0.1	0.3	0.2	0.3	
Transportador de membrana, probable [<i>Schizosaccharomyces pombe</i>]	C18020A02	At1g16390	-0.5	-0.8	1.6	0.9	-2.0	-0.6	-2.1	-1.4	-1.3	-1.1	-0.2	-0.4	
*Transportador ABC [<i>A. thaliana</i>]	5232	At3g13080	0.3	-0.1	0.7	0.8	0.8	1.7	-0.5	-0.1	0.2	0.2	1.1	3.2	
*Transportador de fosfatos PT2 [<i>A. thaliana</i>]	C31200C03	At2g38940	0.5	0.2	0.6	0.8	0.4	1.1	0.5	0.2	0.3	0.3	0.0	1.6	
*Transportador de sulfatos 1 [<i>Lycopersicon esculentum</i>]	3444	At1g22150	0.3	0.3	0.8	0.8	-0.1	-0.1	0.2	0.1	0.2	0.3	0.6	1.1	
*Transportador de metales ZIP6, probable [<i>A. thaliana</i>]	3909	At2g30080	0.2	0.5	0.6	0.8	0.3	0.0	0.5	0.5	0.5	0.6	0.7	0.8	
*Transportador de azúcares [<i>A. thaliana</i>]	3401	At2g43330	-0.1	0.3	0.2	0.7	-0.9	0.1	-0.9	-0.4	-0.5	-0.4	0.0	0.6	
*Transportador de nitratos NRT1-2 [<i>Glycine max</i>]	457	At5g62680	0.1	0.1	-0.2	0.7	0.2	0.6	-0.2	-0.5	-0.4	-0.6	0.6	0.8	
*Prot. de transporte de metales [<i>Medicago truncatula</i>]	3898	At1g55910	0.7	0.2	0.8	0.6	0.6	0.3	0.0	0.2	0.4	0.2	1.1	0.8	
*Transportador ABC [<i>A. thaliana</i>]	6518	At1g66950	0.3	0.3	0.3	0.6	0.7	0.9	0.1	0.6	-0.2	0.3	0.3	1.2	
*Transportador plástidico de ATP/ADP [<i>Citrus hybrid</i> cultivar]	6663	At1g80300	0.1	0.0	0.4	0.6	-0.2	-0.1	0.3	-0.1	0.0	0.0	0.1	0.4	
*Prot. relacionada con transporte [<i>A. thaliana</i>]	C34005E02	At5g13750	0.0	0.0	0.3	0.5	0.9	1.0	0.2	0.0	0.1	0.1	0.9	1.5	
*Transportador ABC [<i>A. thaliana</i>]	C05065C05	At3g10670	0.4	0.4	0.4	0.5	0.4	0.4	0.4	-0.1	0.2	0.0	0.7	0.6	

Tabla 70: Genes relacionados con el transporte de metabolitos cuya expresión se indujo en el albedo de los frutos tratados con 1-MCP y almacenados 14 días en aire con respecto a los frutos RTC. (*): se inducen también en el albedo de los frutos recién acondicionados con etileno (Ver detalles en Tabla 25 y Tabla 69).

Transporte - ↑ 4 horas 1-MCP + 14 días Aire Albedo 'Navelate'			4 días			14 días								
Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	Aire		Etileno		1-MCP		Aire		Etileno		1-MCP	
			F	A	F	A	F	A	F	A	F	A	F	A
Transportador ABC-1 [<i>A. thaliana</i>]	4532	At4g04770	1.6	-	-	+	-	0.2	1.0	+				
*ABC transporter family protein [<i>A. thaliana</i>]	5232	At3g13080	0.3	-0.1	0.7	0.8	0.8	1.7	-0.5	-0.1	0.2	0.2	1.1	3.2
Transportador ABC - MDR ('multidrug resistant'), probable [<i>A. thaliana</i>]	4736	At3g62150	0.1	1.0	0.6	1.5	0.2	1.6	0.3	1.6	0.3	1.3	0.7	2.2
Transportador de oligopéptidos dependiente de protones - POT	C34110F08	At5g46050	0.4	0.0	0.8	0.2	0.5	0.9	1.0	0.2	1.4	0.2	1.0	2.2
Transportador de azúcares, probable [<i>A. thaliana</i>]	3130	At1g77210	0.0	-0.7	0.2	-0.5	0.2	0.0	-0.1	-0.5	0.1	-0.6	1.1	1.8
Transportador de fosfato inorgánico PHT5 [<i>A. thaliana</i>]	5873	At2g32830	0.3	-0.2	0.3	0.1	0.8	1.2	0.3	0.3	0.4	0.4	0.4	1.7
*Prot. relacionada con transporte [<i>A. thaliana</i>]	3103	At5g13750	-0.2	0.1	0.2	1.1	0.9	1.3	-0.7	0.0	-0.8	-0.1	0.5	1.7
*phosphate transporter (PT2) [<i>A. thaliana</i>]	C31200C03	At2g38940	0.5	0.2	0.6	0.8	0.4	1.1	0.5	0.2	0.3	0.3	0.0	1.6
*Factor 2 de transporte nuclear NTF2 / reconocimiento de RNA	C02025E03	At5g43960	0.4	0.3	1.1	1.2	-0.2	-0.1	0.4	0.0	0.6	0.2	1.2	1.5
*Prot. relacionada con transporte [<i>A. thaliana</i>]	C34005E02	At5g13750	0.0	0.0	0.3	0.5	0.9	1.0	0.2	0.0	0.1	0.1	0.9	1.5
Transportador de oligopéptidos dependiente de protones - POT	3698	At3g54140	0.1	0.2	0.2	0.4	0.1	0.4	0.3	0.0	0.4	0.4	0.7	1.2
*Transportador de nucleótidos-azúcares [<i>A. thaliana</i>]	C05057G09	At5g41760	0.5	0.1	1.0	1.1	0.1	-0.2	0.6	0.4	0.8	0.3	1.1	1.2
*Transportador ABC [<i>A. thaliana</i>]	6518	At1g66950	0.3	0.3	0.3	0.6	0.7	0.9	0.1	0.6	-0.2	0.3	0.3	1.2
Transportador ABC [<i>A. thaliana</i>]	C34101E02	At2g36380	0.3	0.3	0.4	0.6	0.8	1.2	0.6	0.9	0.2	0.7	0.7	1.2
*Transportador de sulfato 1 [<i>Lyopersicon esculentum</i>]	3444	At1g22150	0.3	0.3	0.8	0.8	-0.1	-0.1	0.2	0.1	0.2	0.3	0.6	1.1
ATPasa de transporte de protones H ⁺ (EC 3.6.3.14)	2566	-	0.5	-0.6	0.3	-0.1	0.2	0.6	1.0	0.9	1.0	0.7	0.5	1.1
Transportador de hexosas [<i>Vitis vinifera</i>]	1254	At1g11260	0.2	-0.1	0.2	0.1	0.4	0.7	0.2	0.0	0.2	0.0	0.3	1.1
Transportador ABC [<i>A. thaliana</i>]	2817	At2g36380	0.4	0.3	0.3	0.4	0.8	1.1	0.5	1.0	0.2	0.7	0.3	1.0
Port. de transporte del tripeptidos periplasmático mureína [<i>Salmonella</i> sp]	C08016C04	-	-0.8	-0.5	-0.3	0.2	-1.0	-0.1	-1.1	-0.2	-0.7	-0.4	0.5	1.0
Transportador ABC, probable [<i>Oryza sativa</i> (japónica)]	4975	At1g17840	0.9	-0.2	1.1	0.4	0.2	-0.6	1.5	-0.9	1.6	-0.2	0.8	1.0
Transportados de UDP-galactosa/UDP-glucosa, probable [<i>A. thaliana</i>]	C31502D05	At1g14360	0.1	0.2	0.1	-0.3	0.1	0.0	0.6	0.3	0.2	0.5	0.4	0.9
Transportador de amonio AMT1.1 [<i>Lotus corniculatus</i> var. japonicus]	3617	At4g13510	0.2	0.4	0.7	0.3	0.1	0.4	0.5	0.1	0.0	0.2	0.6	0.9
*Transportador de metales ZIP6, probable [<i>A. thaliana</i>]	3909	At2g30080	0.2	0.5	0.6	0.8	0.3	0.0	0.5	0.5	0.5	0.6	0.7	0.8
*Prot. transportadora de metales [<i>Medicago truncatula</i>]	3898	At1g55910	0.7	0.2	0.8	0.6	0.6	0.3	0.0	0.2	0.4	0.2	1.1	0.8
Prot. relacionada con el transporte de hierro [<i>A. thaliana</i>]	C02001F04	At5g03570	0.0	0.6	-0.1	0.2	0.5	0.3	0.2	1.0	0.4	0.7	0.9	0.8
Factor 2 de transporte nuclear (NTF2), probable [<i>A. thaliana</i>]	6048	At1g27970	0.7	0.7	0.4	0.3	1.0	0.7	1.1	1.2	1.0	1.3	1.1	0.8
*Transportador de nitratos NRT1-2 [<i>Glycine max</i>]	457	At5g62680	0.1	0.1	-0.2	0.7	0.2	0.6	-0.2	-0.5	-0.4	-0.6	0.6	0.8
Prot. G7 transportadora de fosfatos mitocondrial	6997	At5g14040	0.3	0.2	0.0	0.3	-0.1	0.2	0.0	-0.2	-0.3	-0.1	0.1	0.7
Prot. transportadora de metales [<i>Medicago truncatula</i>]	2926	At1g05300	0.1	-0.6	0.7	0.1	0.9	0.7	0.1	-0.3	0.1	-0.2	0.6	0.7
Transportador de aminoácidos [<i>A. thaliana</i>]	C02004B05	At3g56200	0.4	0.2	0.5	0.1	0.7	0.5	0.8	0.2	0.4	0.6	0.8	0.7

Continuación de la Tabla 70.

Transporte - ↑ 4 horas 1-MCP + 14 días Aire Albedo 'Navelate'			4 días			14 días								
Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	Aire		Etileno		1-MCP		Aire		Etileno		1-MCP	
			F	A	F	A	F	A	F	A	F	A	F	A
Transportador ABC 'glutathione S-conjugate' (MRP2) [<i>A. thaliana</i>]	C18021E02	At2g34660	0.3	-0.1	0.4	-0.1	0.5	0.5	0.1	0.0	0.1	0.0	0.3	0.7
*Putative sulfato transporter ATST1 [<i>Oryza sativa</i> (japonica)]	C34107H08	At3g51895	0.6	1.2	0.9	1.5	-1.6	-1.0	-0.8	-0.7	-2.0	-0.8	1.1	0.7
Transportador de proteínas [<i>A. thaliana</i>]	C05076F06	At5g27220	0.4	0.2	0.3	0.3	0.6	0.4	0.8	0.3	0.8	0.4	0.9	0.7
*Transportador ABC [<i>A. thaliana</i>]	C05065C05	At3g10670	0.4	0.4	0.4	0.5	0.4	0.4	0.4	-0.1	0.2	0.0	0.7	0.6
Transportador ABC [<i>A. thaliana</i>]	C08002F04	At2g26910	-0.3	0.3	-0.1	0.1	0.2	0.3	0.2	0.3	0.0	0.3	0.2	0.6
Transportador de hexosas [<i>Lycopodium esculentum</i>]	5155	At5g26340	0.0	0.3	-0.1	0.3	-0.2	0.2	-0.5	-0.4	-0.5	-0.2	0.1	0.6
*Transportador de azúcares [<i>A. thaliana</i>]	3401	At2g43330	-0.1	0.3	0.2	0.7	-0.9	0.1	-0.9	-0.4	-0.5	-0.4	0.0	0.6
Prot. relacionada con transporte [<i>A. thaliana</i>]	C06052A04	At1g21070	0.4	0.0	0.5	0.2	0.3	-0.1	0.2	0.0	0.3	0.3	0.4	0.5
Transportador de metales [<i>A. thaliana</i>]	C31708B10	At3g08650	0.0	0.4	0.2	0.5	0.1	0.3	0.0	0.2	0.2	0.5	0.3	0.5
Prot. transporte familia sec23/sec24 [<i>A. thaliana</i>]	C02010H09	At2g27460	0.2	0.1	-0.1	0.1	0.1	0.2	0.3	0.0	0.3	0.2	0.3	0.5
Transportador ABC [<i>A. thaliana</i>]	7004	At1g15520	0.0	0.1	-0.1	0.2	0.0	0.2	0.1	0.2	0.1	0.2	0.1	0.5
Transportador de manitol, probable [<i>A. thaliana</i>]	C34105G06	At2g20780	0.3	0.0	0.1	0.0	0.2	0.1	0.2	0.1	0.2	-0.1	0.1	0.5
ATPasa de transporte de cobre tipo P [<i>Brassica napus</i>]	3606	At5g44790	0.0	0.0	0.3	0.0	-0.1	-0.1	-0.2	0.0	-0.1	-0.1	0.2	0.5
Transportador de UDP-azúcar [<i>A. thaliana</i>]	530	At4g32270	0.1	0.1	0.0	0.1	0.0	0.1	-0.1	0.1	-0.1	0.1	0.2	0.4
Transportador ABC [<i>A. thaliana</i>]	6004	At2g36380	0.2	0.5	0.1	0.5	0.4	0.7	0.0	0.6	-0.2	0.6	-0.1	0.4
copper transporter 1 (COPT1) [<i>A. thaliana</i>]	C20010G05	At5g59030	-0.1	-0.1	0.2	0.2	-0.1	-0.1	0.1	0.0	0.2	0.1	0.3	0.4
Transportador específico de lisina e histidina, probable [<i>A. thaliana</i>]	4788	At5g40780	0.1	-0.2	0.0	0.1	0.2	0.1	0.3	-0.3	-0.4	-0.4	-0.1	0.4
Transportador de potasio, probable [<i>Oryza sativa</i> (japonica)]	C04027F10	At2g30070	0.2	0.5	-0.1	0.1	0.1	0.4	0.4	0.9	0.4	0.8	0.2	0.4
*Transportador plástico de ATP/ADP [<i>Citrus hybrid cultivar</i>]	6663	At1g80300	0.1	0.0	0.4	0.6	-0.2	-0.1	0.3	-0.1	0.0	0.0	0.1	0.4
Prot. similar a un transportador de fosfolípidos-ATPase 6	C31804B05	At1g54280	0.2	0.0	0.3	0.2	0.1	0.2	-0.1	0.0	0.1	0.1	0.3	0.3
Prot. relacionada con el transporte de hierro [<i>A. thaliana</i>]	C34009G11	At5g03570	0.0	0.3	0.0	0.0	0.2	0.0	0.3	0.4	0.0	0.3	0.3	0.3
Transportador ABC [<i>A. thaliana</i>]	C08005C06	At2g01320	-0.1	-0.2	0.2	0.1	0.0	-0.5	-	-0.1	-0.2	-0.1	0.1	0.3
Transportador de metales [<i>A. thaliana</i>]	309	At3g20870	0.0	-0.1	0.0	-0.1	-0.1	-0.1	-0.2	-0.1	0.0	-0.1	-0.1	0.3
TIR1 ('transport inhibitor response 1') (FBL1) [<i>A. thaliana</i>]	2093	At3g62980	-0.1	0.0	0.2	0.4	0.2	0.5	0.3	0.3	0.3	0.4	0.1	0.3
Prot. relacionada con transporte [<i>A. thaliana</i>]	C34106C01	At3g13050	-0.2	0.2	-0.2	0.1	-0.4	0.0	-0.5	-0.2	-0.6	-0.2	0.0	0.3
Transportador de membrana, probable [<i>A. thaliana</i>]	5778	At2g43330	0.0	0.2	0.1	0.3	0.0	0.0	-0.3	-0.3	-0.2	-0.2	0.3	0.3

Tabla 71: Genes que codifican proteínas de unión a calcio relacionados con su transporte o señalización cuya expresión se indujo (●) o se reprimió (●) en el albedo de los frutos tratados con 1-MCP y almacenados 14 días en aire. (*): inducción o represión también en el albedo de los frutos tratados 4 días con etileno (Ver detalles en Tabla 25 y Tabla 70).

Proteínas de unión a calcio - ↑ 14 horas 1-MCP + 14 días Aire			4 días			14 días								
Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	Aire		Etileno		1-MCP		Aire		Etileno		1-MCP	
			F	A	F	A	F	A	F	A	F	A	F	A
*Prot. EF de unión a calcio [<i>Oryza sativa</i> (japonica)]	2489	At2g44310	-0.4	+	-0.8	+	-	+	-0.4	+	-0.5	+	-0.4	+
*Prot. EF de unión a calcio [<i>A. thaliana</i>]	C31108F11	At4g13440	-0.1	0.2	0.4	1.3	0.9	2.4	-0.4	0.5	-0.2	0.5	2.7	3.9
*Prot. alergénica de unión a calcio Bet v 3 (Bet v III)	2720	At4g20780	0.5	0.6	0.7	1.1	0.9	1.0	-0.3	1.4	0.1	1.4	1.1	2.4
*Prot. unión a calcio inducible por sodio (ACPI)	4664	At5g49480	0.3	-0.2	1.3	1.1	0.0	0.5	0.1	0.5	-0.4	0.4	0.3	1.7
Prot. de unión a calcio, probable	C18020D09	At4g38810	0.2	0.4	0.4	0.3	-0.1	-0.1	0.4	0.5	0.2	0.3	0.9	1.0
Prot. de unión a calcio, probable	C34105C07	At4g38810	0.4	0.3	0.4	0.0	0.2	-0.1	0.7	0.3	0.6	0.3	1.0	0.8
Prot. quinasa dependiente de calcio (CDPK) (EC 2.7.1.-)	C01017B05	At5g04870	0.3	0.2	0.3	0.3	0.4	0.2	0.6	0.2	0.6	0.3	0.9	0.7
Prot. de unión a calcio, probable [<i>A. thaliana</i>]	2917	At2g46600	-0.4	-0.3	0.0	0.0	0.5	0.8	-0.1	0.0	0.0	-0.1	0.3	0.7
Prot. EF de unión a calcio [<i>A. thaliana</i>]	C34202F06	At3g59820	0.1	0.2	0.3	0.2	-0.1	-0.1	0.0	-0.1	-0.1	-0.2	0.3	0.7
Prot. EF de unión a calcio [<i>A. thaliana</i>]	2955	At5g39670	-0.3	0.1	0.1	0.3	0.1	0.5	-0.2	0.1	-0.3	0.1	0.2	0.5
Prot. sensora de calcio, probable [<i>Oryza sativa</i> (japonica)]	5989	At4g33000	-0.1	0.1	-0.2	0.2	0.2	0.6	0.1	0.4	0.0	0.4	0.5	0.4
*Prot. EF de unión a calcio [<i>A. thaliana</i>]	C08007C09	At3g10300	0.2	0.7	0.1	0.7	-0.1	0.0	-0.4	0.2	-0.8	0.0	1.0	0.4
Prot. EF de unión a calcio [<i>A. thaliana</i>]	C01011G02	At1g20760	0.0	0.1	0.1	0.0	0.2	0.2	0.4	0.1	0.5	0.4	0.5	0.3
Prot. quinasa dependiente de calcio 19 (CDPK19) [<i>A. thaliana</i>]	5450	At5g19450	-0.1	-0.2	0.0	0.2	-0.4	-0.1	-0.1	0.0	0.0	-0.2	0.1	0.3
Prot. EF de unión a calcio [<i>A. thaliana</i>]	368	At1g64850	0.1	0.1	0.2	0.1	0.3	0.0	0.1	-0.1	0.1	-0.1	0.2	0.2
Prot. EF de unión a calcio [<i>A. thaliana</i>]	C02026D09	At3g59820	0.1	0.1	0.1	0.0	-0.1	0.0	-0.1	0.0	-0.1	-0.2	0.1	0.2
Prot. EF de unión a calcio [<i>A. thaliana</i>]	6713	At4g32060	0.3	0.2	0.1	-0.1	0.5	0.5	0.5	0.3	0.4	0.3	0.5	0.2
Prot. Alergénica de unión a calcio 'polcalcin', probable	3322	At1g24620	-0.6	-0.6	0.3	-0.8	-0.3	0.0	-0.3	-0.6	-0.3	-0.7	0.0	-1.6
*ATPasa de transporte de calcio de membrana plasmática, probable	C18021G04	At3g22910	-1.2	-1.3	-0.9	-1.3	-0.8	-1.1	-1.1	-1.1	-1.1	-1.2	-1.2	-1.4
*ATPasa de transporte de calcio de membrana plasmática, probable	C31103C11	At3g21180	-0.6	-1.1	-0.9	-1.1	-0.9	-1.9	-0.6	-1.4	-0.7	-1.3	-1.2	-1.2
*canal de calcio TPC1 ('two-pore calcium channel') [<i>A. thaliana</i>]	C05075C09	At4g03560	-0.4	-0.6	-0.8	-0.9	-0.2	-0.4	0.5	-0.2	0.3	-0.4	-0.5	-0.9
*Prot. quinasa dependiente de calcio (CDPK), probable [<i>Oryza sativa</i> (japonica)]	1204	At4g23650	-0.4	-0.3	-0.4	-0.6	-0.7	-0.4	-0.5	-0.5	-0.5	-0.6	-0.8	-0.9
Prot. unión a calcio [<i>Fagus sylvatica</i>]	C18011D06	At1g70670	-0.1	-0.2	0.3	-0.2	-0.1	-0.4	-0.2	-0.4	-0.4	-0.6	-0.3	-0.6
*Prot. de unión a calcio, probable [<i>A. thaliana</i>]	2642	At1g21550	-1.0	-0.9	-0.7	-0.7	-0.6	-0.4	-1.0	-0.9	-1.0	-0.8	-1.1	-0.6
Prot. quinasa dependiente de calcio (CDPK) (EC 2.7.1.-)	C31405E02	At3g56760	0.1	-0.1	0.1	-0.2	0.3	0.1	0.4	0.0	0.2	0.1	0.0	-0.5
Prot. EF de unión a calcio [<i>A. thaliana</i>]	2638	At3g20290	-0.1	-0.1	0.0	-0.1	0.0	-0.1	0.0	-0.4	0.0	-0.2	-0.1	-0.4

Tabla 72: Genes que codifican proteínas de señalización y factores de transcripción que aumentaron su expresión en los frutos tratados 4 días con etileno antes de la transferencia a aire respecto a los frutos RTC. (●): genes específicos de flaveado; (●): genes específicos de albedo; (●): genes comunes en flaveado y albedos. (●): inducción significativa; (●): represión significativa; (+): valor de expresión no detectable en el primer término de la comparación; (-): valor de expresión no detectable en el segundo término de la comparación (Ver detalles en Tabla 25).

Proteína más similar		Unigen		Homólogo en <i>A. thaliana</i>		4 días				4 días + 10 días Aire							
						4d E		14h I-MCP + 4d A		4d E + 10 d A		14h I-MCP + 14d A					
						A	F	A	F	A	F	A	F				
1. SENALIZACIÓN																	
MAPK / MAPKK																	
Prot. activadora de MAPK, probable / ¹ transformer-2 alpha ('htra-2 alpha')		C08018G05		At3g08000	+ 0.7	-0.9	-	-	-	-	-	-	-				
MAPK19 (mitogen-activated protein kinase 9), probable		3289		At1g73500	0.7	0.2	0.4	0.6	0.6	0.3	0.6	-0.3	0.4	0.5	0.6	0.2	
MAPK (mitogen-activated protein kinase) [<i>A. thaliana</i>]		C18017E11		At2g01450	0.7	0.4	-0.6	-0.7	-0.1	0.0	-0.4	-0.4	-0.4	-0.4	-0.1	-0.5	-0.6
*MAPK (mitogen-activated protein kinase) [<i>Triticum aestivum</i>]		5373		At3g51630	0.7	0.7	-0.5	-0.2	0.4	0.0	0.0	0.1	0.2	0.9	0.2	-0.3	-0.2
MAPK20 (mitogen-activated protein kinase 20), probable		C02014C05		At2g42880	0.0	0.6	-0.3	-0.1	-0.1	0.2	0.0	-0.1	0.1	0.2	0.0	0.3	
MAPK (mitogen-activated protein kinase) [<i>Prunus armeniaca</i>]		3658		At2g18170	0.7	0.5	-0.2	-0.1	0.5	0.3	0.0	0.1	0.2	0.5	0.0	0.1	
*Prot. PAD4 / MAP kinase 4 [<i>A. thaliana</i>]		C16014C02		At3g52430	0.8	0.9	-0.1	-0.1	0.6	0.6	0.2	0.2	1.5	0.6	0.4	-0.1	
Otros																	
*Receptor quinasa [<i>Nicotiana tabacum</i>]		C05807H04		At2g31880	1.0	0.3	1.1	0.6	0.1	0.3	1.3	0.2	2.5	1.2	1.2	0.5	
*Receptor quinasa [<i>Nicotiana tabacum</i>]		C05804H08		At2g31880	0.5	0.1	0.2	-0.1	0.4	0.0	0.3	-0.2	0.6	0.0	0.2	-0.2	
*Prot. RAB1C [<i>Lactuca scariolaris</i> var. japonicus]		6293		At1g02130	0.4	0.3	-0.3	-0.3	0.1	-0.1	-0.1	-0.3	0.4	0.4	-0.3	-0.3	
Prot. 1-fosfatidilinositol fosfolipasa [<i>A. thaliana</i>] / (PI PLC)		C31808H04		At4g38690	0.7	0.4	-0.7	-0.5	0.4	0.1	-0.1	-0.3	0.0	0.1	-0.2	-0.4	
*Prot. quinasa transmembrana nca en residuos de leucina, probable		C34104D04		At1g74360	1.5	1.7	0.8	0.6	0.4	0.4	0.3	0.0	2.1	1.3	0.3	-0.2	
*Prot. quinasa (AFCL) (AME2) [<i>A. thaliana</i>]		5629		At3g53570	0.8	0.7	-0.3	-0.6	0.3	0.4	0.1	0.3	0.7	0.8	-0.1	0.3	
2. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN																	
Complejo TFIID																	
*Factor de transcripción TFIIF subunidad β, complejo TFIID		C08023G02		At3g52270	+ -0.2	+ 0.0	+ 0.0	+ -0.1	+ -0.1	+ -0.2	+ -0.1	+ -0.2	+ -0.1	+ 0.0	+ 0.0		
Factores de transcripción de respuesta a etileno																	
ERF5 [<i>Vitis aestivalis</i>]		6948		At5g47230	0.8	0.3	1.0	1.0	0.0	0.2	0.6	0.0	0.5	0.6	0.9	-0.2	
Prot. con dominio de unión 1 de respuesta a deshidratación/ DREB A-1-ERF/AP2/DDF1, DWARF AND DELAYED FLOWERING 1, TL2C24.14, TL2C24_14		5615		At1g12610	0.2	0.7	-0.4	0.0	0.1	0.5	0.2	0.5	0.5	0.4	0.7	0.3	
*ERF [<i>Cucumis melo</i>]		6160		At3g16770	0.9	0.9	0.3	0.6	0.2	0.3	1.3	0.8	1.2	1.0	1.1	0.6	
Factores de transcripción WRKY																	
*Factor de transcripción WRKY 30 [<i>Vitis aestivalis</i>]		2629		At4g23810	0.9	0.6	1.7	1.5	0.1	0.6	1.3	0.9	2.1	1.1	0.9	0.5	
*Factor de transcripción WRKY3 - parsley		2730		At2g23320	0.5	0.4	0.4	0.4	0.5	0.5	0.4	0.4	0.6	0.8	0.3	0.3	
Factor de transcripción WRKY, probable [<i>A. thaliana</i>]		5635		At4g31550	0.4	0.5	0.8	0.4	-0.1	0.3	0.8	0.3	2.0	0.7	0.7	0.2	
*Factor de transcripción WRKY [<i>A. thaliana</i>]		C31810B09		At1g29280	0.3	0.5	0.6	0.5	0.3	0.3	0.6	0.4	1.2	0.9	0.5	0.3	
Factor de transcripción WRKY, probable [<i>A. thaliana</i>]		5635		At4g31550	0.4	0.5	0.8	0.4	-0.1	0.3	0.8	0.3	2.0	0.7	0.7	0.2	
*Factor de transcripción WRKY [<i>A. thaliana</i>]		2313		At1g62300	1.8	1.2	0.6	-0.1	1.2	0.6	0.9	-0.4	2.2	0.6	1.1	-0.6	

Continuación de Tabla 72.

Genes que se inducen por el tratamiento con etileno (↑ 4d E)		4 días						4 días + 10 días Aire						
		4d E		14h I-MCP + 4d A		4d A		4d E + 10 d A		14h I-MCP + 14d A		14d A		
Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	A	F	A	F	A	F	A	F	A	F	A	F
2. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN														
No apical meristem (NAM) / NAC / respuesta a auxinas														
Prot. NAM ('no apical meristem') [<i>A. thaliana</i>]	6041	At3g04070	0.7	0.4	0.0	0.0	0.4	0.2	0.0	0.0	0.2	0.6	0.2	0.0
Prot. NAM ('no apical meristem') [<i>A. thaliana</i>]	6913	At4g27410	0.1	1.1	-0.6	0.0	0.7	0.7	-0.1	-0.2	0.0	0.5	-0.1	-0.2
*Prot. NAM ('no apical meristem') RD26 [<i>A. thaliana</i>]	5203	At5g61430	-0.1	0.8	-0.3	0.2	0.2	0.6	-0.4	0.3	0.1	0.9	-0.3	-0.1
*Prot. NAM ('no apical meristem') 10 [<i>Petunia x hybrida</i>]	3380	At1g01720	1.4	1.0	0.9	0.7	1.2	0.8	0.8	0.6	1.6	1.8	0.8	0.7
Factor de transcripción XI [<i>A. thaliana</i>]	C16013C04	At3g12550	0.7	0.6	-0.4	-0.8	-0.1	-0.1	-0.4	0.1	-0.8	0.1	-0.5	-0.1
Factores de transcripción Myb/Myc														
*Factor transcripcional [<i>Nicotiana tabacum</i>] / Myb [<i>A. thaliana</i>]	2013	At5g29000	0.4	0.1	0.0	0.1	0.5	0.2	0.4	0.3	0.6	0.9	0.2	0.2
*Prot. con motivo de unión de respuesta a sacrosa y 'tuber-specific' [<i>Solanum tuberosum</i>] / Myb 73	2695	At4g37260	1.4	1.3	0.9	1.4	0.8	1.3	1.0	0.9	1.8	1.7	0.7	0.7
*Prot. P0013F10.12 (Myb family) [<i>Oryza sativa</i> (japonesa cultivar-group)]	C05076A08	At2g03500	1.3	0.9	-0.1	-0.5	0.2	0.1	0.3	0.5	1.7	1.0	0.2	0.0
*Factor de transcripción Myb putative [<i>Oryza sativa</i> (japonesa)]	6578	At1g25340	0.7	0.7	-0.6	-0.4	0.5	0.5	0.1	0.0	1.1	1.2	0.0	0.3
*Factor de transcripción MYC [<i>Solanum tuberosum</i>]	C04028A10	At1g32640	0.8	0.8	0.4	0.6	0.2	0.5	0.6	0.4	1.0	0.7	0.6	0.4
Factores de transcripción Zinc Finger														
C₂H₂, RING finger														
*Prot. 'zinc finger' AT1L6, tipo 'C3HC4 RING finger'	1192	At3g05200	0.8	0.4	0.5	0.3	0.2	0.2	0.9	-0.5	1.2	0.4	0.8	-0.5
*Prot. 'zinc finger', tipo 'C3HC4 RING finger' [<i>A. thaliana</i>]	C08031D11	At5g24870	0.8	0.5	-0.1	-0.1	0.8	0.4	0.6	0.0	0.8	0.9	0.1	-0.1
GATA														
*Prot. 'zinc finger', tipo GATA [<i>A. thaliana</i>]	5376	At3g54810	0.5	0.7	0.1	0.3	-0.2	0.5	0.9	0.1	1.4	1.1	0.8	-0.4
RING-H₂														
*Factor de transcripción 'zinc finger', tipo RING-H ₂ , probable [<i>Oryza sativa</i>]	C31404E10	At2g39720	0.5	0.1	0.3	0.5	-0.5	0.2	0.6	-0.1	0.9	0.6	0.7	0.1
Otros														
*Prot. 'zinc finger' tipo CCCH [<i>A. thaliana</i>]	1836	At3g55980	0.7	0.4	0.8	0.6	0.3	0.7	0.7	0.3	1.2	0.6	0.6	0.2
*Prot. 'zinc finger' 1 [<i>Datisca glomerata</i>]	6609	At1g27730	1.2	0.5	0.8	0.5	0.7	0.5	1.0	-0.9	1.5	1.2	1.0	-0.2
*Prot. 'zinc finger' 1 [<i>Datisca glomerata</i>]	5851	At3g49930	0.9	0.5	0.6	0.2	0.0	0.1	0.8	-0.8	1.1	0.5	0.8	-0.8
Factores de transcripción bZIP														
*Factor de transcripción bZIP BZ1-4 [<i>Nicotiana tabacum</i>]	C08006F12	At3g62420	0.9	0.4	0.1	0.1	0.9	0.0	0.0	-0.3	1.6	0.5	0.3	-0.2
*Factor de transcripción bZIP [<i>A. thaliana</i>]	6141	At3g62420	0.8	0.5	0.5	0.4	0.3	0.3	0.6	0.0	0.9	0.8	0.8	-0.1
Factores de transcripción bHLH														
*Prot. de función desconocida / Factor de transcripción bHLH ('basic helix-loop-helix') [<i>A. thaliana</i>]	C05808E08	At4g29930	1.2	0.1	2.0	1.1	-0.5	-0.2	0.0	-0.4	2.8	0.4	0.0	-0.4
Factor de transcripción bHLH ('basic helix-loop-helix') [<i>A. thaliana</i>]	4670	At1g05805	-0.3	0.6	0.1	0.7	-0.4	0.3	0.2	0.9	-0.1	0.2	0.3	1.2
Factores de transcripción HD-ZIP														
Prot. 'homeodomain HB2' [<i>Populus tremulata</i>] / 'homeobox-leucine zipper protein' (1)	3002	At4g35550	0.6	0.3	-0.1	-0.3	1.7	0.6	0.6	0.2	0.0	0.5	0.9	0.3
Prot. HB2 homeodomain [<i>Populus tremula</i> x <i>Populus tremuloides</i>] / 'homeobox-leucine zipper protein' (1)	5895	At4g35550	0.9	0.5	0.1	0.0	2.0	0.8	1.1	0.5	0.1	0.5	1.1	0.9
Factores de transcripción familia YABBY														
*Factor de transcripción CRABS similar a YABBY / CRABS	C02019G10	At1g69180	+	0.0	+	0.1	+	-0.1	+	-0.1	+	-	+	0.1
Complejo CCR4+NOT														
*Prot. complejo transcripción CCR4-NOT, probable [<i>A. thaliana</i>]	6553	At3g44260	0.7	0.3	1.1	0.5	0.0	0.1	0.7	-0.4	0.9	0.7	0.8	-0.5

Tabla 73: Genes que codifican proteínas de señalización y factores de transcripción que aumentaron su expresión en los frutos tratados con 1-MCP almacenados 14 días en aire y no variaron en los tratados 4 días con etileno respecto a los frutos RTC (Ver detalles Tabla 25 y Tabla 72).

Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	4 días						4 días + 10 días Aire					
			4d E		14h 1-MCP + 4d A		4d A		4d E + 10 d A		14h 1-MCP + 14d A		14d A	
			A	F	A	F	A	F	A	F	A	F	A	F
I. SENALIZACIÓN														
MAPK / MAPKK														
MAPK (mitogen-activated protein kinase) fosfatasa [<i>Nicotiana tabacum</i>]	C34105D09	At3g55270	0.1	0.0	0.7	0.5	0.0	0.1	0.4	0.1	0.9	0.3	0.4	0.3
MAPK1 (mitogen-activated protein kinase 1) (EC 2.7.1.-) - parsley	1310	At3g45640	0.4	0.5	-0.1	0.2	0.0	0.3	0.3	0.0	0.6	0.6	0.2	0.0
MAPK (mitogen-activated protein kinase) homólogo a NTF4 (P45)	3774	At2g43790	0.3	0.3	0.1	0.0	0.5	0.2	0.3	0.2	0.6	0.5	0.2	0.3
MAPK (mitogen-activated protein kinase) homólogo a NTF6 (P43)	1949	At4g01370	0.1	0.1	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.1	0.4	0.4	0.0	0.2
MAPKK (mitogen-activated protein kinase kinase), probable [<i>Vitis aestivalis</i>]	C31008C07	At4g29810	0.0	0.1	0.2	0.3	0.0	0.1	0.1	0.1	0.3	0.3	-0.1	0.1
MEK (map kinase kinase) [<i>Medicago sativa</i> subsp. x varia]	C07005E02	At3g21220	0.3	0.0	0.5	-0.1	-0.3	-0.7	0.1	-0.2	0.2	-0.3	0.1	0.2
ε-MAP3K (mitogen-activated protein kinase 3 epsilon) [<i>A. thaliana</i>]	4387	At3g13530	-0.2	0.3	-0.2	0.7	0.3	0.6	0.2	0.7	0.2	0.7	0.2	0.8
MAPK4 (mitogen-activated protein kinase 4) [<i>Petroselinum crispum</i>]	2030	At4g01370	0.1	0.4	0.2	0.3	0.1	0.3	0.2	0.6	0.7	0.8	0.1	0.6
Receptores de etileno														
Receptor de etileno, probable [<i>Pyrus communis</i>]	2355	At3g04580	0.0	-0.3	-0.3	-0.1	0.7	-0.1	0.2	-0.3	0.6	1.1	0.0	-0.1
Prot. EIN3 [<i>Cucumis melo</i>]	1839	At2g27050	0.4	-0.2	0.2	0.4	0.7	0.3	0.7	0.3	0.4	1.0	0.4	0.4
Otros														
Prot. quinasa transmembrana rica en residuos de leucina, probable [<i>Oryza sativa</i>]	C31605A10	At3g47090	0.5	0.2	0.4	0.1	0.1	-0.2	-0.1	-0.3	1.4	0.2	-0.1	-0.6
Prot. quinasa transmembrana rica en residuos de leucina, probable	1709	At2g16250	-0.1	-0.1	0.1	0.0	-0.2	-0.4	-0.1	-0.7	0.9	-0.3	-0.2	-0.5
Prot. quinasa transmembrana rica en residuos de leucina, probable	4693	At2g31880	0.1	-0.1	0.0	0.1	0.3	0.1	0.6	-0.2	0.9	0.4	0.2	-0.3
Prot. quinasa transmembrana rica en residuos de leucina, probable	3044	At1g27190	0.3	0.2	0.4	0.4	0.3	0.5	0.4	0.4	0.7	0.6	0.4	0.6
Prot. quinasa transmembrana rica en residuos de leucina, probable	C08031A04	At1g79620	0.1	0.5	0.2	0.5	0.3	0.5	0.1	0.7	0.5	0.6	0.3	0.6
Prot. quinasa transmembrana rica en residuos de leucina, probable	5227	At5g01950	-0.1	-0.1	0.1	0.4	0.0	0.3	-0.1	0.2	0.4	0.6	0.0	0.3
Prot. receptora quinasa [<i>Nicotiana tabacum</i>]	C08034D01	At2g31880	2.7	-0.1	2.7	0.1	1.6	-0.3	2.5	0.1	3.8	0.6	2.6	-2.8
Prot. receptora quinasa, probable [<i>A. thaliana</i>]	4090	At2g02220	-0.2	1.9	0.2	2.1	0.3	1.7	0.0	2.0	0.7	2.3	0.2	2.2
Prot. rica en residuos de prolina [<i>A. thaliana</i>]	1421	At1g63830	0.2	0.0	0.4	0.1	0.2	-0.1	0.2	-0.1	0.7	0.2	0.0	0.0
Prot. quinasa homóloga a F5F16.70 [<i>A. thaliana</i>]	5483	At4g31250	0.3	0.0	0.0	-0.2	0.1	-0.1	-0.3	-0.5	0.5	0.4	-0.3	-0.5
RAB1C [<i>Lotus corniculatus</i> var. japonicus]	4902	At1g02130	0.3	0.1	-0.4	-0.2	0.1	0.0	-0.1	-0.2	0.4	0.3	0.0	-0.1
Prot. grande de unión a GTP [<i>A. thaliana</i>]	2326	At2g23460	-0.2	0.3	0.3	0.0	-0.5	0.0	0.2	0.4	0.5	0.3	0.5	0.2
Prot. 3'(2'),5'-bisfosfato nucleotidasa / inositol polifosfato	C31802A03	At5g63980	0.2	0.3	0.3	0.5	0.2	0.5	0.1	0.4	1.1	0.6	0.0	0.4

Continuación de Tabla 73.

Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	4 días						4 días + 10 días Aire					
			4d E		14h I-MCP + 4d A		4d A		4d E + 10 d A		14h I-MCP + 14d A		14d A	
			A	F	A	F	A	F	A	F	A	F	A	F
2. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN														
Factores de transcripción de respuesta a etileno														
ERF (ethylene-responsive element binding factor) [<i>Lycopodium</i> sp]	804	Atg23240	0.3	-0.1	1.1	1.0	0.4	0.0	0.4	-0.2	0.9	0.7	0.8	0.5
ERF (ethylene-responsive element binding factor) ERF3a [<i>Vitis rotundifolia</i>]	1582	At5g44210	0.5	-0.1	0.5	0.2	0.3	0.4	0.9	-0.2	0.9	0.6	0.9	0.0
Factor de transcripción con dominio AP2, probable [<i>A. thaliana</i>]	C16018F01	At5g64750	0.1	0.0	0.4	0.4	0.1	-0.2	0.0	0.0	0.6	0.0	0.0	-0.2
Factor de transcripción con dominio AP2, probable [<i>A. thaliana</i>]	4888	At1g78080	0.0	0.1	0.2	0.1	0.0	0.2	0.7	0.3	0.5	0.6	0.5	0.3
Factor de transcripción con dominio AP2, probable [<i>A. thaliana</i>]	C16013F11	At3g61630	0.2	0.2	0.2	0.6	0.0	0.1	0.0	0.3	0.4	0.3	0.2	0.2
Prot. con dominio AP2 - potato	C04027F08	At3g16770	0.1	-0.3	0.3	0.1	0.7	0.2	0.7	0.3	0.3	0.5	0.6	0.3
Prot. Cbc2, probable [<i>A. thaliana</i>]	5605	At3g16770	0.0	0.0	0.2	0.4	0.6	0.2	0.6	0.4	0.3	0.7	0.3	0.4
EREBP-4, probable [<i>A. thaliana</i>]	C31703D04	At4g17486	0.1	0.4	0.3	0.4	0.1	0.1	0.5	0.4	0.4	0.6	0.3	0.6
Factores de transcripción WRKY														
Prot. de unión a DNA 3 [<i>Nicotiana tabacum</i>] / WRKY70 (WRKY DNA-binding protein 70) [<i>A. thaliana</i>]	3964	At3g56400	0.6	-0.1	1.8	1.1	-0.6	-0.6	-0.1	-0.2	1.7	0.3	-0.3	-0.2
Factor de transcripción WRKY 1 [<i>Cosyrium arboresum</i>]	6207	At1g80840	0.2	0.0	0.9	0.4	-0.2	-0.2	0.0	-0.4	0.9	-0.2	0.1	-0.5
Factor de transcripción WRKY [<i>Solanum tuberosum</i>]	2538	At5g13080	0.5	0.4	0.5	0.2	0.5	0.4	0.3	0.3	0.7	0.7	0.3	0.3
No apical meristem (NAM) / NAC / respuesta a auxinas														
Prot. NAM (no apical meristem) [<i>A. thaliana</i>]	6916	At1g69490	-0.2	0.1	-0.5	0.1	0.3	0.2	-0.4	-0.4	0.5	1.0	-0.3	-0.1
Prot. de la familia GH3, de respuesta a auxinas [<i>A. thaliana</i>]	5497	At2g46370	0.2	0.1	0.1	0.0	0.4	0.0	0.0	-0.4	0.8	0.8	-0.1	0.1
Prot. regulada por auxinas [<i>Populus tremula</i> x <i>Populus tremuloides</i>]	4620	At3g04730	0.1	0.0	0.2	-0.2	0.1	-0.1	0.2	0.1	0.4	0.0	0.1	0.0
Prot. NAM (no apical meristem) NAC2 [<i>A. thaliana</i>]	C18025G09	At3g15510	0.2	0.3	-0.3	0.3	0.2	0.3	0.2	0.3	-0.1	0.8	0.1	0.3
Prot. NAM (no apical meristem) [<i>Glycine max</i>]	C34005A02	At5g61430	0.2	0.4	-0.2	0.3	0.3	0.3	-0.1	0.4	0.8	1.3	-0.1	0.3
Factores de transcripción Myb/Myc														
Factor de transcripción Myb [<i>Nicotiana tabacum</i>]	1760	-	0.3	0.4	0.0	-0.1	-0.1	0.2	0.0	-0.9	0.9	0.5	0.0	-0.9
Activador transcripcional relacionado con Myb (MybSt1) [<i>A. thaliana</i>]	3991	At3g16350	0.2	-0.3	0.6	0.0	0.0	-0.1	0.1	-0.5	0.6	0.3	-0.2	-0.4
Factor de transcripción Myb [<i>A. thaliana</i>]	3512	At5g47390	0.2	0.3	0.3	0.4	0.0	0.4	0.1	-0.3	0.4	0.1	0.1	-0.2
Factor de transcripción Myb10, GHMYB10 [<i>Cosyrium bursatum</i>]	C32102B08	At1g22640	0.1	0.2	0.0	0.3	0.0	-0.1	0.2	0.4	0.4	0.2	0.3	0.1
Factor de transcripción Myb1 [<i>Malus sinajouensis</i>]	1455	At1g74840	0.0	-0.2	0.4	0.4	0.3	0.4	0.4	0.4	0.4	0.1	0.7	0.7
Prot. Ph2 relacionada con Myb - garden penumia	C05146C04	At3g23250	0.3	0.5	0.2	0.5	0.3	0.6	0.3	0.4	0.6	1.2	0.4	0.7

Continuación de Tabla 73.

Genes que se inducen en los frutos tratados con 1-MCP a los 14 días de almacenamiento en Aire pero no en los tratados con Etileno a los 4 días (↑ 14h 1-MCP + 14d A)		4 días						4 días + 10 días Aire									
		4d E A F	14h 1-MCP + 4d A A F	4d A A F	4d E + 10 d A A F	14h 1-MCP + 14d A A F	14d A A F	4d E A F	14h 1-MCP + 4d A A F	4d A A F	4d E + 10 d A A F	14h 1-MCP + 14d A A F	14d A A F				
Proteína más similar		Unigen		Homólogo en <i>A. thaliana</i>													
2. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN																	
Factores de transcripción Zinc Finger																	
C₃HC₄ RING finger																	
Prot. 'zinc finger', tipo 'C3HC4 RING finger' [<i>A. thaliana</i>]		6257	At5g56340	0.1	0.0	0.2	0.3	0.0	-0.1	0.5	0.4	0.3	0.4	0.4			
Prot. 'zinc finger', tipo 'C3HC4 RING finger' [<i>A. thaliana</i>]		1984	At5g41350	0.4	0.2	-0.3	0.0	0.3	0.2	0.2	0.1	0.3	0.5	0.0			
GATA																	
Prot. 'zinc finger', tipo GATA [<i>A. thaliana</i>]		5842	At3g21175	0.1	0.1	0.3	0.2	0.0	-0.1	0.1	0.3	0.3	0.4	0.2			
Prot. 'zinc finger', tipo GATA 1 [<i>A. thaliana</i>]		3929	At3g24050	0.1	-0.1	0.1	0.0	0.6	0.2	0.6	0.1	0.4	0.4	0.6			
Otros																	
Prot. 'zinc finger' tipo CCGH [<i>A. thaliana</i>]		1320	At2g40140	0.4	0.2	0.4	0.5	0.1	0.5	0.3	0.1	0.5	0.5	0.3			
Prot. 'zinc finger', tipo RING3, probable [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)]		4643	At3g01770	0.0	0.1	0.3	0.3	0.0	0.1	0.4	0.2	0.5	0.4	0.4			
Prot. 'zinc finger', tipo B-box [<i>A. thaliana</i>]		3855	At5g57660	0.1	0.0	-0.1	-0.2	-0.1	0.0	0.2	0.1	0.4	0.2	-0.1			
Prot. 'zinc finger', tipo B-box [<i>A. thaliana</i>]		C07012B10	At3g21150	0.1	0.0	0.2	0.1	0.1	0.0	0.5	0.3	0.4	0.4	0.3			
Prot. 'zinc finger' TAZ. / con dominio BTB / POZ		1158	At1g05690	0.1	0.1	0.1	0.3	0.0	0.3	0.2	0.4	0.3	0.2	0.1			
Prot. Dof zinc finger protein - common tobacco		C18011C08	At5g62940	0.2	-0.1	0.0	-0.3	0.1	0.0	-0.2	-0.6	0.3	0.2	-0.2			
Prot. 'zinc finger', tipo ZPT2-14 [<i>Petunia x hybrida</i>]		C06002G11	At2g28710	0.0	-0.2	0.0	0.2	-0.2	-0.3	0.1	0.2	0.4	0.2	0.3			
Factores de transcripción PHD finger																	
Prot. PHD finger [<i>A. thaliana</i>]		5891	At5g26210	0.0	-0.1	0.2	0.3	-0.1	0.9	0.7	0.5	0.5	0.5	0.3			
Prot. PHD finger [<i>A. thaliana</i>]		3213	At5g05610	0.0	0.0	-0.2	-0.1	0.2	0.2	0.1	0.1	0.3	0.1	0.1			
Prot. PHD finger [<i>A. thaliana</i>]		448	At1g14510	0.2	0.0	0.0	-0.2	0.2	0.1	0.1	0.1	0.2	-0.1	0.2			
Factores de transcripción bZIP																	
Activador transcripcional bZIP RSG [<i>Nicotiana tabacum</i>]		C34202A06	At1g43700	0.1	+	0.1	+	0.1	+	0.0	+	0.1	+	0.2			
Factor de transcripción bZIP [<i>A. thaliana</i>]		5848	At1g42990	0.4	0.2	-0.1	-0.2	-0.2	-0.2	0.1	-0.2	0.7	0.2	0.1			
Factor de transcripción bZIP [<i>A. thaliana</i>]		C05076H09	At3g49760	0.1	0.1	0.1	0.1	0.4	0.0	-0.1	-0.3	0.6	0.1	0.2			
Factor de transcripción bZIP [<i>A. thaliana</i>]		2948	At1g42990	0.2	0.0	-0.1	-0.1	-0.3	-0.3	0.0	-0.2	0.4	0.1	0.0			
Factor de transcripción bZIP [<i>Oryza sativa</i> (japonica)]		C03007H07	At4g35240	0.0	0.1	0.5	0.4	-0.1	0.1	0.1	0.2	0.4	0.1	0.2			
Factor de transcripción bZIP [<i>A. thaliana</i>]		5601	At2g40950	-0.1	-0.1	0.3	0.1	-0.2	-0.1	0.2	0.0	0.3	0.0	0.2			
Prot. de maduración relacionada con prot. bZIP, probable [<i>Vitis vinifera</i>]		1467	At3g19290	0.0	0.4	0.0	0.0	-0.2	0.4	0.0	0.4	0.2	0.5	-0.1			
Factor de transcripción bZIP ATB2 [<i>Glycine max</i>]		4437	At1g75390	0.2	0.1	-0.1	0.1	1.2	0.5	-0.1	-0.2	0.8	1.2	-0.1			

Continuación de Tabla 73.

Genes que se inducen en los frutos tratados con 1-MCP a los 14 días de almacenamiento en Aire pero no en los tratados con Etileno a los 4 días (↑ 14h 1-MCP + 14d A)		4 días						4 días + 10 días Aire					
		4d E	14h 1-MCP + 4d A	4d A	4d E + 10 d A	14h 1-MCP + 14d A	14d A	A	F	A	F	A	F
Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>		A	F	A	F	A	F	A	F	A	F
2. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN													
Factores de transcripción bHLH													
Factor de transcripción bHLH [<i>A. thaliana</i>]	C05133A11	At5g43650	0.7	0.6	0.5	0.2	0.3	0.6	0.3	0.7	0.1	0.9	0.3
Factor de transcripción bHLH [<i>A. thaliana</i>]	1632	At5g54680	0.2	0.1	0.1	0.2	0.3	0.4	0.2	0.5	0.5	0.3	0.3
Factor de transcripción bHLH GBOF-1 [<i>Tulipa gesneriana</i>]	C05071B07	At1g68920	0.1	0.0	-0.1	0.0	0.1	0.0	-0.1	0.5	0.3	0.0	0.2
Factor de transcripción bHLH [<i>A. thaliana</i>]	C04010D11	At4g14410	0.0	0.2	0.3	0.2	0.0	0.5	0.5	0.4	0.2	0.4	0.6
Factor de transcripción HLH [<i>Cucumis melo</i>]	2633	At1g72210	-0.2	-0.1	0.0	0.2	0.1	0.0	0.1	0.3	-	0.1	0.5
Prot. similar a factor de transcripción bHLH GBOF-1 [<i>Tulipa gesneriana</i>]	C16016H12	At1g05805	0.5	0.1	1.0	1.1	1.2	0.4	0.7	0.3	1.4	0.8	0.4
Factores HD-ZIP													
Prot. de unión a DNA [<i>Daucus carota</i>] / Prot. HDZip, clase 1 ("homeodomain-leucine zipper") [<i>A. thaliana</i>]	2681	At5g05310			+			+		+		+	+
MADS-box													
Prot. MADS-box [<i>Malus × domestica</i>]	C20007B02	At5g20240	0.3	0.4	0.9	0.4	0.5	0.4	1.1	0.3	0.6	0.4	0.8
HSF ("Heat shock responsive factor")													
Factor de transcripción "heat shock" (HSF) [<i>Phaseolus acutifolius</i>]	C31704F01	At4g18880	0.1	-0.4	0.6	0.3	0.2	0.0	0.4	-0.1	0.8	0.3	0.5
Factor de transcripción "heat shock" 4 (HSF4) [<i>A. thaliana</i>]	6445	At4g36990	0.3	0.2	0.3	-0.2	-0.1	0.0	0.2	0.0	0.7	0.2	0.4
Factor de transcripción "heat shock" 30 (HSF30)	C16012C10	-	-0.4	-0.1	-0.1	0.2	-0.5	-0.4	0.7	0.1	0.4	-0.1	0.7
Factor de transcripción "heat shock" (HSF) [<i>A. thaliana</i>]	C31403D06	At4g13980	0.2	0.4	0.3	0.4	0.1	0.1	0.4	0.5	0.3	0.5	0.4
Factor de transcripción "heat shock" (HSF), probable [<i>A. thaliana</i>]	4180	At4g11660	0.3	0.2	0.1	-0.1	0.0	0.0	0.2	-0.1	0.3	0.0	-0.3
Factores de transcripción GT													
Factor GT-2 [<i>Glycine max</i>]	C06015G02	At1g76890	0.3	0.0	0.2	0.0	0.1	0.0	0.3	0.1	0.5	0.2	0.3
Factor GT-2 [<i>A. thaliana</i>]	C31801B10	At2g33550	0.2	0.2	0.3	0.4	0.2	0.2	0.4	0.6	0.4	0.6	0.3
Factores de transcripción familia YABBY													
Factor de transcripción GRAMINIFOLIA, YABBY [<i>Azadirachta indica</i>]	C31702D12	At2g45190	0.0	0.1	0.2	0.3	0.0	0.2	0.1	0.2	0.3	0.2	0.0
Factor de transcripción YAB2 similar a YABBY2 [<i>Azadirachta indica</i>]	4223	At4g00180	0.1	0.1	0.2	0.2	0.1	0.2	0.1	0.1	0.3	0.1	0.1

Tabla 74: Genes que codifican proteínas de señalización y factores de transcripción que disminuyeron su expresión en los frutos tratados 4 días con etileno antes de su transferencia a aire (Ver detalles Tabla 25 y Tabla 72).

Genes que se reprimen por el tratamiento con etileno (↓ 4d E)			4 días						4 días + 10 días Aire					
Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	4d E		14h 1-MCP + 4d A		4d A		4d E + 10 d A		14h 1-MCP + 14d A		14d A	
			A	F	A	F	A	F	A	F	A	F	A	F
1. SENALIZACION														
Calmodulina 4 [<i>Daucus carota</i>]	6486	At3g43810	-0.5	-0.6	-0.3	0.0	-0.4	-0.2	-0.3	0.0	-0.2	0.0	-0.5	0.1
Prot. quinasa [<i>A. thaliana</i>]	1850	At3g06620	-0.4	-0.7	-0.1	-0.1	-0.1	-0.4	-0.1	0.0	-0.3	0.0	0.0	0.0
Prot.1 rica en residuos de prolina [<i>Vitis vinifera</i>]	2627	At3g22120	-0.6	-0.6	0.2	-0.2	-0.3	-0.8	0.1	-0.2	0.2	-0.7	0.0	-0.4
Prot. rica en residuos de hidroxiprolina [<i>A. thaliana</i>]	5041	At4g01050	-0.8	-1.0	-0.5	-0.1	-0.5	-0.4	0.3	0.4	-0.3	-0.1	-0.1	0.5
2. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN														
Complejo TFIID														
polymerase	5682	At3g21350	-3.3		-4.0	+	-	+	-	-	-	-	-	-
*Prot. P0487B11.18 [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar group)] (TFIID)	127	At1g02680	-0.7	-0.5	-0.2	-0.1	0.6	0.3	0.7	0.5	-0.8	-0.4	0.8	0.4
Factores de transcripción de respuesta a etileno														
ERF1 (ethylene-responsive element binding factor)	3932	At4g17500	-	-0.6	-	-	-	-	-	-	-1.2	-0.4	-	-
*Factor de transcripción con dominio AP2	4713	At5g13330	-0.5	-0.1	-0.9	-0.3	0.0	0.0	-0.1	0.2	-0.6	0.0	-0.1	0.3
Factores de transcripción WRKY														
Factor de transcripción WRKY 1(NtWRKY1) [<i>Nicotiana tabacum</i>]	C31601G01	At2g38470	-0.8	-0.1	0.5	0.4	-0.9	-0.3	-0.2	0.4	-0.3	-1.0	0.1	0.0
No apical meristem (NAM) / NAC														
Prot. NAM (no apical meristem) [<i>A. thaliana</i>]	C05068G11	At5g18270	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Factores de transcripción Myb/Myc														
*Factor de transcripción Myb [<i>A. thaliana</i>]	C08036G05	At2g21650	-1.0	-0.6	-0.4	-	0.1	0.2	0.3	0.2	-0.6	0.0	0.4	0.2
*Factor de transcripción Myb103 [<i>A. thaliana</i>]	C01006C11	At1g63910	-0.6	-0.7	-0.3	0.2	0.6	0.4	0.6	0.7	-0.7	-0.1	0.8	0.5
*Factor de transcripción Myb33 [<i>A. thaliana</i>]	C18020D12	At5g06100	-0.4	-0.5	-0.6	-0.6	-0.4	-0.3	-0.5	-0.6	-0.3	-0.3	-0.5	-0.4
*Factor de transcripción Myb, probable [<i>Populus x canadensis</i>]	C18004B12	At4g21440	-0.9	-0.5	-0.6	-0.6	-0.6	-0.3	-0.9	-0.5	-1.6	-1.4	-0.7	-0.5
*Factor de transcripción Myb 306 - garden snapdragon	C07011D01	At3g47600	-	-	-	-	-	-	0.2	-	-	-	-	-
*Factor de transcripción Myb [<i>A. thaliana</i>]	C08002B11	At2g01060	-	-	-	-0.4	-	-0.4	-	-	-	-	-	-
Factores de transcripción Zinc Finger														
C₂HC₄ RING finger														
*Prot. 'zinc finger', tipo 'C3HC4 RING finger' [<i>A. thaliana</i>]	3090	At1g15100	-0.9	-0.6	-0.6	-0.5	0.1	-0.3	0.2	-0.4	-0.6	-0.5	0.0	-0.1
Otros														
*Prot. 'zinc finger' [<i>A. thaliana</i>]	C31703G06	At5g54630	-2.2	-0.4	-1.7	-0.8	-1.1	-0.3	-1.5	-0.2	-4.2	-1.7	-1.2	-0.4
*Prot. 'zinc finger' tipo 'ZF-HD homeobox'	2504	At1g74660	-0.7	-0.4	-0.1	-0.1	-0.5	-0.4	0.3	0.1	-0.5	-0.2	0.0	0.1
*Prot. 'zinc finger', tipo C2H2 [<i>A. thaliana</i>]	C34203F07	At5g40710	-0.4	-0.4	-0.2	-0.4	-0.4	-0.7	-0.1	-0.5	-0.7	-1.1	0.4	-0.1
Prot. con dominio 'zinc finger' XH/XS	C08023A09	At1g15910	-	-0.3	0.1	-0.4	-	0.0	0.0	0.2	-0.1	0.3	0.0	0.2
Prot. 'zinc finger' 5, ZFP5 [<i>A. thaliana</i>]	3312	At1g10480	0.0	-	0.1	2.9	-0.1	-0.4	-0.1	0.0	-0.1	-0.1	0.2	0.6
Factor de transcripción 'junonji (jmyC)'	C18022F12	At5g63080	-0.2	-	-0.1	-0.2	-0.1	-0.4	0.0	0.0	-0.1	-0.1	0.1	0.0
*Prot. 'zinc finger', tipo B-box / resistencia a estrés salino	3497	At2g31380	-0.7	-0.8	-0.9	-0.8	-0.7	-1.0	-0.4	-0.5	-0.8	-0.8	-0.7	-0.5
Factores de transcripción bZIP														
Factor de transcripción bZIP [<i>A. thaliana</i>]	C02020B07	At3g58120	-0.5	-0.6	-0.6	-0.5	-0.6	-0.4	-0.5	-0.1	-0.8	-0.1	-0.5	-0.1
*Factor de transcripción bZIP, probable [<i>A. thaliana</i>]	C04027A02	At1g52320	-0.6	-0.9	-0.5	-0.6	-0.4	-0.4	-0.3	-0.4	-1.3	-1.1	-0.4	-0.5
Factores de transcripción con dominio homeobox														
*Factor de transcripción homeobox Hox7	C34201G01	At4g12750	-0.7	-0.2	-0.2	0.2	-0.3	0.2	-0.3	0.0	-0.7	-0.3	-0.5	0.0
Prot. 'homeobox-leucine zipper' h1 - soybean	3371	At4g16780	-0.6	-0.6	0.2	0.3	-0.3	-0.2	0.4	0.2	-0.3	-0.1	0.0	0.2
MADS-box														
Prot. PHCLF3 [<i>Patunia x hybrida</i>]-repressor of AGAMOUS	4262	At4g02020	-0.2	-0.4	-0.2	0.0	0.0	-0.2	0.3	0.0	-0.5	-0.5	-0.1	0.0
Factor de transcripción de unión a CCAAT-box (CBF)														
Factor de transcripción de unión a CCAAT, probable [<i>Oryza sativa</i> (japonica)]	4016	At5g12840	-0.7	-0.6	0.1	0.6	0.2	0.2	-0.5	-0.4	0.1	0.1	-0.3	0.2
Factores de transcripción familia YABBY														
*Prot. 'phantastica' [<i>Nicotiana tabacum</i>]	C20006B02	At2g37630	-1.5	-1.1	-1.2	-0.9	-0.7	-0.6	-1.1	-0.2	-2.1	-1.6	-0.9	-0.3

Tabla 75: Genes que codifican proteínas de señalización y factores de transcripción que disminuyeron su expresión en los frutos tratados con 1-MCP almacenados 14 días en aire, pero que se reprimieron en los tratados 4 días con etileno, respecto a los frutos RTC (Ver detalles Tabla 25 y Tabla 72).

Genes que se reprimen en los frutos tratados con 1-MCP a los 14 días de almacenamiento en Aire pero no en los tratados con Etileno a los 4 días (↓ 14h 1-MCP + 14d A)	4 días						4 días + 10 días Aire					
	4d E		14h 1-MCP + 4d A		4d A		4d E + 10 d A		14h 1-MCP + 14d A		14d A	
	A	F	A	F	A	F	A	F	A	F	A	F
1. SEÑALIZACIÓN												
MAPK / MAPKK - Transducción señal												
MAPK ('mitogen-activated protein kinase') [<i>A. thaliana</i>]	0.7	0.4	-0.6	-0.7	-0.1	0.0	-0.4	-0.4	-0.4	-0.1	-0.5	-0.6
Prot. activadora de MAPK, probable / 'transformer-2 alpha; hra-2 alpha'	+	0.7		-0.9		-						
Otros												
Receptor quinasa [<i>Nicotiana tabacum</i>]	1.2		-		-							
Prot. quinasa transmembrana rica en residuos de leucina, probable	-0.5	-0.3	-0.6	-0.2	-0.5	-0.4	-0.5	0.1	-0.8	0.1	-0.5	0.1
Prot. histidina quinasa (AHK2) [<i>A. thaliana</i>]	-0.1	-0.3	-0.3	-0.2	0.2	0.1	0.1	0.2	-0.6	-0.3	0.1	0.0
Fosfolipasa D zeta1 / PLDzeta1 (PLDPT) [<i>A. thaliana</i>]	-0.2	-0.3	-0.2	-0.3	0.0	-0.1	-0.2	-0.4	-0.5	-0.2	-0.1	-0.4
Prot. PDI ('protein disulfide isomerase') [<i>Oryza sativa</i> (japonesa cultivar-group)] - Signalling induced by ROS	0.3	0.0	-0.6	-0.8	0.1	-0.1	-0.7	-0.7	-0.4	-0.1	-0.5	-0.7
Prot. rica en residuos de hidroxiprolina [<i>A. thaliana</i>]	-0.2	-0.5	-0.1	-0.3	-0.2	-0.3	0.2	0.0	-0.3	-0.2	0.2	0.0
2. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN												
Complejo TFIIID												
Factor de transcripción TFIIID subunidad 31 kDa, complejo TFIIID	-0.2	-0.3	0.1	0.2	0.1	0.0	0.2	0.2	-0.3	0.0	0.1	0.2
Factor de transcripción TFIIID subunidad 23-30 kDa, complejo TFIIID	0.1	0.1	-0.1	-0.2	0.0	0.0	-0.2	-0.2	-0.2	0.1	-0.2	-0.2
Factores de transcripción de respuesta a etileno												
ERF5 ('ethylene-responsive element binding factor') [<i>Lyopersicon esculentum</i>]	0.2	-0.2	-0.2	-0.3	0.3	-0.2	0.0	-0.2	-1.0	-0.2	0.2	0.1
Factor de transcripción con dominio AP2 / ERF [<i>Brassica</i> sp]	0.1	-0.3	0.0	0.6	0.0	-0.1	0.1	0.0	-0.6	-0.1	0.5	0.6
Prot. de respuesta a etileno [<i>A. thaliana</i>]	0.1	-0.1	0.1	-0.1	0.2	-0.1	0.4	0.2	-0.6	-0.2	0.3	0.2
OSJNBa0010D21.13 [<i>Oryza sativa</i> (japonesa cultivar-group)] / APETALA2 [<i>A. thaliana</i>]	-0.4	-0.4	-0.5	-0.6	-0.4	-0.2	0.0	0.0	-0.6	-0.2	-0.4	-0.1
AP2 SCARECROW-like protein [<i>A. thaliana</i>]	-0.1	0.0	-0.1	0.0	-0.1	-0.3	-0.2	-0.3	-0.4	-0.1	-0.1	-0.5
Factores de transcripción WRKY												
Factor de transcripción WRKY [<i>A. thaliana</i>]	-0.4	-0.6	-0.2	0.2	-0.4	-0.4	-0.2	0.2	-0.6	-0.3	-0.3	0.2
Factor de transcripción WRKY [<i>A. thaliana</i>]	0.0	-1.7	-	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-
Prot. T15B16.12 de unión a DNA, probable [<i>A. thaliana</i>]	0.0	-0.3	0.0	0.0	0.0	-0.2	0.0	0.0	-0.6	-0.2	-0.1	-0.1
Factor de transcripción WRKY [<i>A. thaliana</i>]	-0.3	-0.2	-0.1	-0.3	-0.2	-0.2	-0.2	-0.4	-0.1	-0.4	-0.1	-0.4

Continuación de Tabla 75.

Genes que se reprimen en los frutos tratados con 1-MCP a los 14 días de almacenamiento en Aire pero no en los tratados con Etileno a los 4 días (↓ 14h 1-MCP + 14d A)	Proteína más similar		4 días						4 días + 10 días Aire					
	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	4d E	14h 1-MCP + 4d A		4d A		4d E + 10 d A		14h 1-MCP + 14d A		14d A		
			A	F	A	F	A	F	A	F	A	F	A	F
2. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN														
No apical meristem (NAM) / NAC / respuesta a auxinas														
Prot. aux/IAA [<i>Populus tremula</i> x <i>Populus tremuloides</i>]	1501	At5g65670	-0.5	-0.1	0.2	0.5	0.1	0.7	0.4	1.0	-0.9	0.4	0.4	1.3
Prot. de la familia AUX/IAA, de respuesta a auxinas [<i>A. thaliana</i>]	G01014A04	At3g16500	-0.5	-0.3	-0.1	0.8	-0.6	0.2	-0.4	0.1	-0.8	-2.2	-0.4	-0.1
ARF2 ('auxin response factor 2') [<i>Oryza sativa</i>]	C04033A05	At5g62010	0.1	0.4	-0.2	-0.6	0.3	-0.1	-0.2	-0.2	-0.6	-0.5	-0.1	-0.4
ARF6 ('auxin response factor 6') [<i>A. thaliana</i>]	C03006F12	At1g30330	-0.2	-0.3	-0.4	-0.4	-0.2	-0.7	-0.3	-0.3	-0.5	-0.7	-0.3	-0.4
Prot. AUX/IAA [<i>Populus tremula</i> x <i>Populus tremuloides</i>]	3530	At4g28640	-0.1	0.0	0.0	-0.2	-0.2	-0.1	-0.1	-0.1	-0.4	-0.2	-0.2	-0.1
Factor de transcripción X1 [<i>A. thaliana</i>]	C16013C04	At3g12550	0.7	0.6	-0.4	-0.8	-0.1	0.1	-0.4	0.1	-0.8	0.1	-0.5	-0.1
Prot. NAM ('no apical meristem') 3 [<i>Pectonia x hybrida</i>]	4666	At1g01720	-0.2	2.0	0.3	-	-	-	-	-	0.0	-	-	-
Factores de transcripción Myb/Myc														
Factor de transcripción Myc [<i>A. thaliana</i>]	C04033B02	At5g08130	0.0	0.1	-0.6	-0.8	0.8	0.0	-0.1	-0.1	-1.2	-0.5	-0.2	-0.3
Factor de transcripción Myb121 [<i>A. thaliana</i>]	6711	At3g30210	0.0	0.0	0.0	-0.3	-0.2	0.0	-0.3	-0.4	-0.6	-0.6	-0.1	-0.4
Factor de transcripción Myb [<i>A. thaliana</i>]	3684	At1g49010	-0.1	0.0	-0.1	-0.1	-0.1	-0.1	-0.2	-0.1	-0.4	-0.4	-0.1	-0.1
Factores de transcripción Zinc Finger														
Prot. 'zinc finger', tipo B-box [<i>A. thaliana</i>]	3016	At2g21320	-0.5	-0.2	-0.6	-0.2	-0.3	-0.3	-0.1	0.3	-0.4	0.4	-0.1	0.5
Prot. PHD finger [<i>A. thaliana</i>]	5052	At1g77800	-0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	-0.1	-0.1	-0.1	-0.4	-0.2	-0.1	-0.1
Prot. 'zinc finger', tipo GATA [<i>A. thaliana</i>]	C02007B05	At3g54810	0.3	0.5	-0.1	0.4	0.1	-0.5	-0.1	0.3	0.1	-	0.1	0.3
Factores de transcripción bZIP														
Factor de transcripción bZIP, probable [<i>A. thaliana</i>]	C20003D08	At5g25590	-0.2	-0.3	0.1	0.4	0.1	-0.1	0.1	0.3	-0.4	0.1	0.0	0.4
Factores de transcripción HLH														
Factor de transcripción HLH [<i>Cucumis melo</i>]	2633	At1g72210	-0.2	-0.1	0.0	0.2	0.1	0.0	0.1	0.3	0.3	-	0.1	0.5
MADS-box														
Prot. MADS-box GHMADS-2 [<i>Cosyrium bursatum</i>]	C34106B08	At4g09960	0.0	-0.1	-0.5	-0.4	-0.1	0.0	-0.3	-0.1	-0.7	0.1	-0.3	0.1
Prot. MADS-box 26 [<i>Cucumis sativus</i>]	2100	At5g20240	0.0	0.0	-0.5	-0.2	0.1	-0.1	-0.3	0.4	-0.6	0.1	-0.3	0.2
Prot. MADS-box PTM5 [<i>Populus tremuloides</i>]	6072	At4g22950	0.1	-0.2	-0.7	-0.2	0.1	0.0	-0.3	0.3	-0.6	0.0	-0.2	0.2
Prot. MADS-box 3 [<i>Vitis vinifera</i>]	C03011D02	At2g45650	0.1	-0.1	-0.6	-0.3	0.1	0.0	-0.1	0.1	-0.6	0.3	-0.2	0.2
Prot. MADS-box 2 [<i>Vitis vinifera</i>]	C02026F05	At5g15800	0.1	-0.1	-0.7	-0.2	0.2	0.0	-0.1	0.2	-0.5	0.3	-0.3	0.2
Prot. MADS-box 5 protein [<i>Betula pendula</i>]	5546	At1g69120	-0.1	-0.2	0.0	0.2	0.0	0.2	0.5	0.5	-0.4	0.3	0.2	0.5
Prot. MADS-box PTM5 [<i>Populus tremuloides</i>]	5996	At5g62165	0.0	0.0	-0.3	-0.1	0.1	0.0	-0.1	0.1	-0.3	0.1	-0.1	0.1
Activador transcripcional [<i>Pimpinella brachycarpa</i>] / AGL20 (AGAMOUS-LIKE 20); transcription factor [<i>A. thaliana</i>]	C31703B03	At2g45660	0.0	0.0	-0.6	-0.3	0.1	0.0	-0.3	-0.1	-0.6	0.0	-0.4	0.1

Continuación de Tabla 75.

Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	4 días			4 días + 10 días Aire		
			4d E	14h I-MCP + 4d A	4d A	4d E + 10 d A	14h I-MCP + 14d A	14d A
			A F	A F	A F	A F	A F	A F
Genes que se reprimen en los frutos tratados con I-MCP a los 14 días de almacenamiento en Aire pero no en los tratados con Etileno a los 4 días (↓ 14h I-MCP + 14d A)								
2. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN								
HSF (Heat shock responsive factor)								
Factor de transcripción 'heat shock' (HSF) [<i>A. thaliana</i>]	C16014H07	At3g24520	-0.2 -0.1	-0.2 -0.1	-0.2 -0.1	-0.3 0.0	-0.3 -0.2	-0.1 -0.1
Factor de transcripción de unión a CCAAT-box (CBF)								
CCAAT-box binding transcription factor, putative [<i>A. thaliana</i>]	2429	At3g53340	-0.1 -0.1	-0.4 -0.5	-0.1 -0.1	0.0 -0.2	-0.6 -0.2	0.0 -0.4
CCAAT-box binding transcription factor subunit B (NF-YB) (HAP3)	C08033F08	At4g14540	-0.3 -0.1	0.0 -0.3	-0.4 -0.5	0.0 -0.2	-0.4 -0.8	-0.1 -0.4
Factor de transcripción familia B3								
Factor transcripcional familia B3 [<i>A. thaliana</i>]	1675	At4g01580	-0.3 -0.2	-0.6 -1.0	-0.3 -0.3	-0.5 -0.7	-0.9 -0.4	-0.6 -0.6
Factor transcripcional B3 [<i>A. thaliana</i>]	C34207B03	At5g66980	-0.4 -0.3	-0.3 -0.5	-0.3 -0.2	-0.4 -0.4	-0.4 -0.4	-0.3 -0.3
Factores de transcripción familia YABBY								
Factor de transcripción CRABS similar a YABBY	C02019G10	At1g69180	+ 0.0	+ 0.1	+ -0.1	+ -0.1	+ -	+ 0.1
Otros								
PHAP2A protein [Petunia x hybrida]	6044	At4g36920	-0.2 -0.2	-0.3 -0.4	-0.4 -0.3	-0.3 -0.2	-0.5 -0.2	-0.3 -0.2
Factor sigma [<i>Synchia oleacea</i>]	C16017D12	At3g53920	0.0 -0.1	-0.1 0.2	0.2 0.3	-0.2 0.0	-0.5 -0.1	-0.1 -0.1
Regulador positivo de señalización vía brassinosteroides (BZR1) [<i>A. thaliana</i>]	C06003A10	At1g75080	-0.2 -0.1	-0.2 -0.2	0.1 -0.2	0.0 -0.2	-0.4 -0.2	0.0 -0.1
Prot. 30 homeótica BEL1 [<i>Solanum tuberosum</i>]	C32101G08	At2g16400	-0.1 -0.1	0.2 0.1	-0.1 -0.2	0.0 0.0	-0.3 -0.1	0.0 0.0
Prot. SSXT / coactivador transcripcional	6261	At1g01160	-0.1 -0.3	-0.1 -0.2	0.0 -0.2	-0.2 -0.7	-0.3 -0.5	-0.1 -0.6

ANEXO IV: Comparación de los mecanismos implicados en la tolerancia inducida por el curado a los ‘daños de frío’ y por el etileno al ‘colapso de la corteza’

Tabla 76: Estudios de la expresión de los genes de la micromatriz ‘7K’ incluidos en la micromatriz ‘12K’ en respuesta al calor, al frío y a la combinación de calor y frío en frutos de ‘Fortune’ y en respuesta al tratamiento con etileno y 1-MCP a los 4 y 14 días de almacenamiento en el flavedo (F) y albedo (A) de frutos de ‘Navelate’. En cada comparación se muestra al número de genes. (Σ): sumatorio total.

	4 días Etileno						4 días Etileno + 10 días Aire					
	Inducción			Represión			Inducción			Represión		
	F	A	F+A	F	A	F+A	F	A	F+A	F	A	F+A
(Σ ^{total} =4408)	(Σ=220)	(Σ=280)	(Σ=115)	(Σ=230)	(Σ=266)	(Σ=116)	(Σ=48)	(Σ=131)	(Σ=12)	(Σ=133)	(Σ=150)	(Σ=46)
'Navelate'	39	48	24	25	29	12	9	17	2	18	9	3
'Fortune'	61	72	38	42	40	21	12	13	0	29	21	8
C+F > F (Σ=515)												
C+F > RTC (Σ=732)												
F > C+F (Σ=422)	42	45	23	47	54	32	6	11	3	25	45	11
F > RTC (Σ=351)	32	46	21	30	33	17	7	2	0	20	23	8
C > RTC (Σ=419)	23	34	14	24	34	15	13	25	2	11	10	4
	14 horas 1-MCP + 4 días Aire						14 horas 1-MCP + 14 días Aire					
	Inducción			Represión			Inducción			Represión		
	F	A	F+A	F	A	F+A	F	A	F+A	F	A	F+A
	(Σ=15)	(Σ=65)	(Σ=1)	(Σ=186)	(Σ=119)	(Σ=34)	(Σ=143)	(Σ=729)	(Σ=105)	(Σ=221)	(Σ=580)	(Σ=124)
'Navelate'	5	9	0	22	18	6	33	125	23	29	55	14
'Fortune'	5	9	0	31	26	10	40	175	34	37	79	23
C+F > F (Σ=515)												
C+F > RTC (Σ=732)												
F > C+F (Σ=422)	1	8	0	19	27	6	18	84	16	47	112	38
F > RTC (Σ=351)	1	2	0	19	19	5	18	81	16	25	57	20
C > RTC (Σ=419)	4	5	0	9	8	1	24	92	19	24	62	13

