

*A mi **madre...** por y para ella.
A mi **padre...** que no llegó a tiempo...*

*A **Cue...** mi apoyo incondicional,*

'La curiosidad es el motor que mueve el conocimiento'
(Un buen amigo)

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quisiera dar las gracias a mis dos directores, los Doctores Lorenzo Zacarías y M^a Jesús Rodrigo, por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo, por todo lo que me han enseñado y aportado en estos años y por estar ahí como dos campeones aguantando el chaparrón que les cayó conmigo. Muchas graSias!!!! Por supuesto, al que en su momento era el Ministerio de Educación y Ciencia, sin cuyo aporte económico tampoco hubiese sido posible.

Agradecer también a Miguel Sabater, por dejarme sus maravillosas 'Navelinas' y al Dr. José L. Navarro, por prestarme el resto de los frutos utilizados en esta Tesis, permitirme realizar experimentos en su campo y mantenerme informada del R. Betis Balompié. A Sonia Rodríguez, responsable del extraordinario servicio de proteómica del IATA, muchas gracias por 'currarte' tanto el protocolo de extracción (Felicidades por la nena!!!). A la que fue mi tutora, Ajo, que estuvo atenta de toda la burocracia en todo momento, a la que es ahora mi nueva tutora, Nuria Martínez y a Juan Rodríguez del Departamento, por su ayuda y disponibilidad, muchas gracias por facilitarme el proceso.

A mis compañeros y, sobre todo, amigos con los que he tenido la suerte de compartir buenos momentos (y no tan buenos...), y de los que me siento muy orgullosa de haber conocido... A mi *Mona* y a Beatriz, por estar ahí al comienzo (sólo ellas saben lo duro que fue), por apoyarme,... *Mona*, gracias por ejercer de hermana mayor y por tantas otras cosas..., pero sobretodo por quererme como sé que me quieres. A la ya 'dotora Ber' (que mayor eres eh??) por enseñarme 'cositas guays' y más y más y más..., por querer compartir a *Dioni* y estar siempre ahí, ya estoy aquí... Belén, gracias por tu paciencia, yo no hubiera podido... nos vemos en BCN! A la Dra. Lluch, por sus escasos pero muy buenos ratos compartidos. A los que fueron mis *hombres del lab*, Santi, Anibal y Alberto, por los buenos momentos y por los bailoteos! Y al *hombre de mi casa*, Mario, por su santa paciencia para aguantarme tanto tiempo dentro y fuera del lab... (y porque es el único valenciano que conozco que se ríe con el 'gulifriski'). Por supuesto, agradecer a mis compañeros 'nuevos' que les tocó soportarme en esta última etapa, a Pacorro, *el hombre del 004*, por hacerme el 'Homer' como nadie y porque sé que soy su 'flor de primavera'. A mi *guaca* particular, Eleo, y a Moni, *la supermamá*, gracias por estar ahí, sólo os digo que YAP estoy aquí!!! A Pilarseta por darle vida al 004 y porque 700 mL, no son nada para ella... Por supuesto al resto de postcosecha... A los 'jefes', Tere, Luis y Jose, por su gran comprensión, infinita paciencia y

confianza que han puesto en mí,... Y a las 'jefas' porque sin ellas el lab no iría a ningún lado... Amparo, muchas gracias por las extracciones de carotenoides. Ana I. por tus conversaciones *a lo bajini*. A Lolita y M^a José, por mimarme, alegrarme las mañanas, traerme 'xuxerías'... pero, sobre todo, por vuestro cariño.

Al resto de personal del IATA, a los del almacén, secretaría, seguridad... que directa o indirectamente han estado ahí ayudándome y facilitándome las cosas día a día... Probablemente me deje a mucha gente..., a ell@s, gracias por todo!!

A las chicas de Burjasot, Auro y Mayte, con las que compartí un mes de convivencia y las que aún siguen ahí (Auro, felicidades por Isaac!!!). A Nacho, por estar a mi lado todos estos años. Gracias por las terapias!!! Y a la agregada recientemente, 'Aurora la Fenomenal', por ayudarme con el mono de Sevilla... y porque sí, ea!!

Y fuera de VLC... a mis niñ@s Sevillanos, los de siempre..., por recargarme las pilas en cada visita a mi tierra, porque, a pesar de la distancia, siguen teniendo esa capacidad de llenarme de alegría y felicidad... y por lo mucho que sé que me queréis!! Sois geniales!!! La próxima en la boda!! Que fuerte!! 'Forsa pá viví'!!!! A Ángel de la Torre, mi eterno 'mentor', por sus consejos y continua preocupación, los constantes ánimos y confianza, muchísimas gracias. Angelito, ya estoy aki!!!

Y por último, por ser los más importantes, a toda mi familia.

A mi hermana, **Cue**, por ayudarme, apoyarme, quererme..., por tantas, tantas y tantas cosas..., por estar siempre ahí, porque sé que siempre estarás... Talov vida!!

Y a mis **padres**... Mamá, gracias por darme vida y fuerzas para seguir. A pesar de todo, fuiste y eres, aún sin estar, la única capaz de llenarme de energías y ganas para continuar adelante... Ya estoy aquí, lo conseguí, SÓLO POR TÍ... A mi padre, por quererme como sé que me quería y por darme esa sonrisa orgullosa cuando hablaba de esta Tesis, aún en el final... Os quiero, siempre os querré, os llevo en mi corazón. Mientras yo siga aquí, estaréis conmigo...

A veces el hombre más pobre deja a sus hijos la herencia más rica. Por eso, a mis padres se lo debo todo, desde mis fracasos hasta mis triunfos.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

| | |
|-----------------|---|
| ABA: | Ácido abcísico |
| ACC: | Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico |
| ACO: | ACC oxidasa |
| ACS: | ACC sintasa |
| β CHX: | β -Caroteno hidroxilasa |
| β LCY: | β -Licopeno ciclasa |
| BrEt: | Bromuro de etidio |
| CCD: | Dioxigenasa de corte de carotenoides |
| CCS: | Capsantina capsorrubina sintasa |
| CFGP: | <i>Citrus</i> Functional Genomics Project |
| CRTISO: | Caroteno isomerasa |
| CXS: | Carboxilesterasa |
| DF: | Daños por frío |
| DMAPP: | Dimetil-alil pirofosfato |
| DNA: | Ácido desoxirribonucleico |
| DTT: | Ditiotreitol |
| DXP: | 1-deoxi-D-xilulosa-5 fosfato |
| DXS: | 1-deoxi-D-xilulosa-5 fosfato sintasa |
| ϵ CHX: | ϵ -Caroteno hidroxilasa |
| ϵ LCY: | ϵ -Licopeno ciclasa |
| GA: | Giberelina |
| HDR: | Hidroximetilbutenil difosfato reductasa |
| HDS: | Hidroximetilbutenil difosfato sintasa |
| HMBPP: | Hidroximetilbutenil difosfato |
| HPLC: | Cromatografía líquida de alta resolución |
| IPP: | Isopentil pirofosfato |
| MEP: | Metil-eritritol-pirofosfato |
| MPTA: | Hidrocloreuro de 2-(4-metilfenoxi) trietilamina |
| Nº Acc.: | Número de acceso a la base de datos correspondiente |
| NCBI: | Nacional Center for Biotechnological Information |
| NCED: | 9- <i>cis</i> -epoxycarotenoide dioxigenasa |
| NSY: | Neoxantina sintasa |
| PCR: | Reacción en cadena de la polimerasa |
| PDA: | Detector de fotodiodos |

PDS: Fitoeno desaturasa

PTOX: Oxidasa terminal de plastidos.

PSY: Fitoeno sintasa

RNA: Ácido ribonucleico

RT-PCR: Transcripción reversa y amplificación en cadena de la polimerasa

RT-qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real

SS: Sólidos solubles

STS: Tiosulfato de plata

ZDS: ζ -Caroteno desaturasa

ZEP: Zeaxantina epoxidasa

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. Frutos cítricos

1.1. Importancia e interés

Los cítricos son el principal cultivo frutal en el mundo, cuya producción mundial ha experimentado un crecimiento continuo en las últimas décadas. Actualmente, según datos de la FAO (<http://faostat.fao.org>), en el año 2007 se produjeron 115 millones de toneladas, siendo los principales productores de frutos cítricos Brasil, Estados Unidos y China, que representan aproximadamente el 50% de la producción mundial, seguido de la cuenca Mediterránea (30%). Su cultivo se extiende a la mayoría de regiones tropicales y subtropicales, ocupando una extensión total de más de 7 millones de hectáreas. En el marco de la producción y exportación de frutos cítricos, los países mediterráneos son los principales proveedores de frutos cítricos para su consumo en fresco, de los cuales, España es el principal país productor y exportador. Por ello, el comercio exterior de los frutos cítricos constituye un pilar básico de la citricultura española. La producción total en nuestro país es próxima a los 6 millones de Tm, de las que la gran mayoría se destina a exportación y consumo en fresco (<http://faostat.fao.org>).

En la Comunidad Valenciana la producción total de cítricos durante la campaña 2007-08 fue próxima a 3,20 millones de Tm (www.qva.es). El 51,10% de esta producción fue de mandarinas, siendo casi el 39% del total 'Clemenules', el 44,70% de naranjas, el 4,12% pertenece a la producción de limones y el 0,15% restante lo constituyó la producción de pomelos. De la distribución de superficie cultivada el 50% del total se destinó al cultivo de mandarinas, el 41% al cultivo de naranjas, el 7,50% al limón y el resto a otros cítricos (www.qva.es). En base a estos datos, se puede observar la importancia del cultivo de mandarinas y la transcendencia que tienen tanto en la producción citrícola como en la exportación, dado que, además, España es el mayor exportador mundial de mandarinas a países como Alemania, Francia o Reino Unido.

1.2. Origen, dispersión y desarrollo

El origen de los cítricos se localiza probablemente en las regiones tropicales y subtropicales de Asia y está datado en unos 20 millones de años. En España las primeras referencias del naranjo dulce (*Citrus sinensis* L.) se remontan al siglo XV, posiblemente fue introducido por los genoveses a través de sus rutas comerciales con Oriente, mientras que el mandarino (*Citrus reticulata* Blanco) y el

pomelo (*Citrus paradisi* Macf.) se introdujeron más recientemente a mediados del siglo XIX y principios del XX, respectivamente (Agustí, 2000).

Las especies de cítricos con interés comercial pertenecen a la familia de las Rutaceas, subfamilia Aurantoideas. Los diferentes géneros presentan un alto nivel de poliembriónía y una alta tasa de mutación somática. Actualmente, se considera que las tres especies originales de cítricos son: *Citrus medica* (cidros), *Citrus reticulata* Blanco (mandarinas) y *Citrus grandis* Osbeck (pumelos), a partir de las cuales se originaron las especies actuales mediante hibridaciones sexuales y diferentes mutaciones gemarias espontáneas (Saunt, 2000; Moore, 2001).

El fruto de los cítricos es una baya típica denominada hesperidio que se caracteriza por presentar una corteza y una parte carnosa. La corteza está formada por dos tejidos, el exocarpo, tejido más externo, compacto y coloreado denominado flavedo, y la parte más interna, el mesocarpo o albedo. La parte interna del fruto se denomina pulpa y está compuesta por segmentos o gajos que rodean al eje central del fruto y que contienen las vesículas de zumo (Agustí *et al.*, 2003; Tadeo *et al.*, 2003). El crecimiento del fruto durante su desarrollo y maduración sigue una curva sigmoide, caracterizada por tres fases bien diferenciadas. La Fase I se caracteriza por el crecimiento del fruto provocado por división celular, desde la anthesis hasta el final del cuajado del fruto. En la Fase II donde predomina la elongación celular, expandiéndose los tejidos hasta alcanzar su tamaño máximo. La Fase III o 'periodo de maduración' se caracteriza por una reducida tasa de crecimiento, mientras el fruto se mantiene en el árbol y comprende todos los cambios asociados a la maduración, como el incremento de sólidos solubles, azúcares principalmente y el descenso en la acidez total. Asimismo, también se produce en esta fase la coloración de la corteza de los frutos. La pigmentación de la corteza es consecuencia de la degradación enzimática de las clorofilas del flavedo y de la síntesis de carotenoides (Bain, 1958; Agustí, 2000; Agustí *et al.*, 2003; Tadeo *et al.*, 2003).

Durante la maduración de los frutos cítricos en el árbol, los azúcares, especialmente la sacarosa, aumentan en el zumo (Ting y Attaway, 1971). La evolución de la acidez total muestra una evolución diferente durante la maduración según las variedades. Así, mientras en naranjas, mandarinas y pomelos disminuye, en limones se incrementa, siendo el principal responsable de la acidez en el zumo de los cítricos el ácido cítrico (Shaked y Hasdai, 1985). En naranjas, mandarinas y pomelos los ácidos libres aumentan en el fruto durante los primeros estadios del desarrollo y permanecen constantes hasta la maduración, momento en el que

desciende su nivel (Agustí, 2000). La relación entre los sólidos solubles totales (SST) y el porcentaje de acidez se utiliza como parámetro de índice de madurez interna. Generalmente, es aceptado un índice de maduración interna entre 7 y 10 como el mínimo valor de madurez para naranjas y mandarinas, respectivamente, y entre 10 y 16 se considera de calidad aceptable (Baldwin, 1993; Rodrigo y Zacarías, 2006). En general, los cítricos aportan vitamina C, flavonoides, carotenoides y otros compuestos nutricionales a la dieta, de gran importancia para la prevención de diversas enfermedades como las cardiovasculares o el cáncer (Rodrigo y Zacarías, 2006).

2. Carotenoides

2.1. Estructura química y diversidad en la naturaleza

Los carotenoides son pigmentos isoprenoides identificados por primera vez en 1907 (Gross, 1987), que adquieren su nombre del pigmento más representativo del grupo, el β -caroteno, descubierto por Wackenroder en 1831. Los carotenoides se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, se localizan en mayor concentración y variedad en los vegetales aunque también se acumulan en algunas bacterias, algas y hongos, así como en algunos animales, aunque éstos no pueden sintetizarlos (Britton *et al.*, 1998).

La estructura básica de los carotenoides es un tetraterpeno lineal, de 40 átomos de carbono, cuya porción central presenta dobles enlaces conjugados y una simetría entorno al doble enlace central (**Figura 1**). Esta estructura básica puede modificarse generando una familia de más de 600 compuestos. Los carotenoides hidrocarbonados se denominan carotenos y aquellos que contienen oxígeno se denominan xantofilas (Gross, 1987; Britton *et al.*, 1998). Los carotenoides, ya sean carotenos o xantofilas, pueden ser acíclicos, monocíclicos o bicíclicos (**Figura 1**). La ciclación ocurre en uno o ambos extremos de la molécula formando anillos β - o anillos ϵ - (Gross, 1987; Britton *et al.*, 1998; Fraser y Bramley, 2004). El rasgo característico de los carotenoides es su cadena poliénica, que es un sistema extenso de dobles enlaces conjugados. Esta cadena actúa como cromóforo y es la responsable de la capacidad de estos pigmentos de absorber luz en el visible y, en consecuencia, de su color. La longitud de onda a la que absorben los carotenoides aumenta con el número de dobles enlaces conjugados (Meléndez-Martínez *et al.*, 2007a). La ciclación también influye en el grado de coloración y, por tanto, el β -caroteno, aunque tiene el mismo número de dobles enlaces conjugados que el licopeno, es de color naranja, mientras que el licopeno

es rojo. Debido a la existencia de estos dobles enlaces conjugados, todos los carotenoides presentan el fenómeno de isomerización *cis-trans*. En general, la forma predominante en la naturaleza son los isómeros *trans*, aunque para otros carotenoides, como el fitoeno, los isómeros *cis* son los más abundantes (Britton *et al.*, 1998).

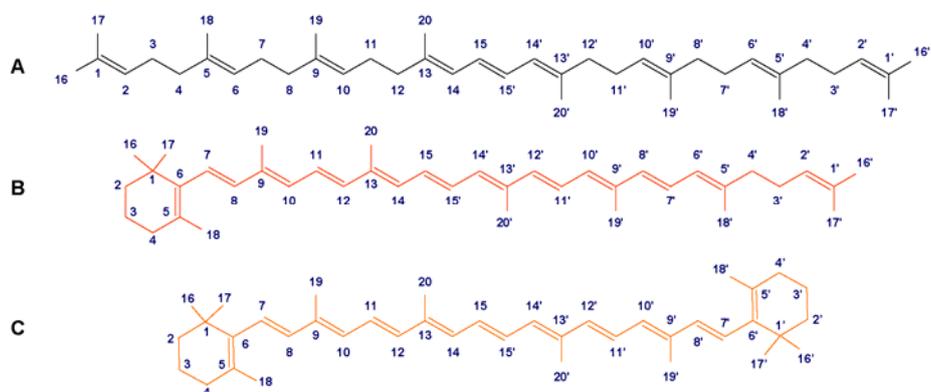


Figura 1. Ejemplos de tipos estructurales de carotenoides. **A:** Estructura de caroteno lineal, correspondiente al fitoeno. **B:** Estructura de caroteno monocíclico, correspondiente al γ -caroteno. **C:** Estructura de caroteno bicíclico, correspondiente al β -caroteno. En las tres figuras se indica el sistema de carbonos empleado en la nomenclatura de los carotenoides.

Las funciones de los carotenoides vienen determinadas por sus propiedades físicas y químicas, definidas por su estructura molecular. Así pues, por un lado, su geometría garantiza la correcta integración en estructuras celulares, permitiendo de esta forma su buen funcionamiento. Por otro lado, el conjunto de dobles enlaces conjugados determinan sus propiedades fotoquímicas que permiten llevar a cabo sus funciones básicas (Britton, 1995). Las propiedades físicas y químicas de los carotenoides se ven influenciadas por las interacciones con otras moléculas *in vivo*. Así, por ejemplo, aquellos carotenoides que se encuentran interaccionando con proteínas o en medios lipídicos son más estables que aquellos que están en diluciones acuosas (Britton *et al.*, 1998).

2.2. Propiedades e importancia de los carotenoides

Los carotenoides son los responsables de la coloración de muchas flores y frutos (Goodwin, 1980; Dawson, 2009) y presentan propiedades funcionales importantes. Además tienen un importante papel en la fotosíntesis, ya que son componentes esenciales del aparato fotosintético, donde están implicados en el ensamblaje de los fotosistemas, en la captación de la luz y, además, tienen una gran importancia en la disipación del exceso de energía luminosa, evitando el daño

en las membranas (Howitt y Pogson, 2006). Los carotenoides presentan, además de actividad antioxidante, la capacidad de protección frente a la radiación UV, dado que pueden absorber en este rango de longitud de onda (Fraser y Bramley, 2004; Meléndez-Martínez *et al.*, 2004). Sin embargo, la primera función asignada a los carotenoides en los animales fue como precursores de la vitamina A. Esta propiedad de los carotenoides es debida a la presencia de un anillo β - no sustituido que les confiere actividad provitamina A y que está presente en aproximadamente 50 carotenoides de los más de 700 identificados hasta el momento. La vitamina A se ingiere en la dieta básicamente en dos formas: como vitamina A preformada (retinil éster, retinol, retinal, 3-dehidroretinol y ácido retinoico) a partir de alimentos de origen animal, o como carotenoides (provitaminas A), que se pueden transformar biológicamente en vitamina A, generalmente a partir de alimentos de origen vegetal. La provitamina A tiene la ventaja de convertirse en vitamina A sólo cuando el cuerpo lo requiere, evitando así la toxicidad potencial de una sobredosis de vitamina (Van den Berg *et al.*, 2000; Fraser y Bramley, 2004; Meléndez-Martínez *et al.*, 2004; Edem, 2009). Asociada a su actividad provitamina A, los carotenoides desempeñan en el organismo de los animales una función importante en la prevención de la degeneración macular de la retina, la disminución del riesgo de formación de cataratas y la formación y proliferación de epitelios, así como en la prevención de la osteoporosis (Snodderly, 1995; Van den Berg *et al.*, 2000; Fraser y Bramley, 2004; Meléndez-Martínez *et al.*, 2004; Yamaguchi y Uchiyama, 2009). Además, algunos carotenoides, como zeaxantina y luteína forman parte del sistema ocular de los mamíferos. Los carotenoides también se han relacionado con una disminución del riesgo de padecer enfermedades degenerativas como cáncer o enfermedades cardiovasculares (Lichtenstein, 2009; Nishino *et al.*, 2009).

2.3. Biosíntesis de carotenoides en plantas superiores

En las plantas, los carotenoides se sintetizan en los plastidios, aunque las enzimas están codificadas por genes nucleares (Cunningham y Gantt, 1998). En los últimos años, la biosíntesis de carotenoides en plantas superiores ha sido bien caracterizada por diversos grupos, determinándose además las diferencias con la ruta operativa en los microorganismos (Sandmann, 1994; Cunningham y Gantt, 1998; Hirschberg, 2001; Sandmann, 2001; Cunningham, 2002; Sandmann, 2002; Fraser y Bramley, 2004; Romer y Fraser, 2005; Taylor y Ramsay, 2005; Howitt y Pogson, 2006; DellaPenna y Pogson, 2006; Tanaka *et al.*, 2008). Un esquema general de la ruta de biosíntesis de carotenoides en plantas superiores se representa en la **Figura 2**.

La biosíntesis de carotenoides está vinculada a la de otros isoprenoides como giberelinas (GA), tocoferoles o clorofilas, vía isopentil bifosfato (IPP) o de su isómero dimetilalil bifosfato (DMAPP). Ambos constituyen las unidades fundamentales y son sintetizados por rutas independientes y compartimentalizadas. La ruta del ácido mevalónico (MVA), de la que derivan los isoprenoides mitocondriales y citosólicos, tiene lugar en el citosol y/o en el retículo endoplasmático. Los carotenoides derivan de IPP plastídico, cuya biosíntesis es a partir de una ruta independiente de MVA, denominada ruta del metil-eritritol fosfato (o MEP, por su singlas en inglés) (Romer *et al.*, 1993; Rodríguez-Concepción y Boronat, 2002). El uso de las herramientas de genómica funcional ha permitido la elucidación de la ruta independiente de MVA, tanto en plantas como en bacterias, determinándose que entre ambas rutas existe un intercambio de metabolitos en ciertas condiciones ambientales y preferentemente del plastidio al citosol (Rodríguez-Concepción y Boronat, 2002).

El geranilgeranil pirofosfato (GGPP, C₂₀) es el precursor inmediato de carotenoides, así como de clorofilas y GA. La condensación de una molécula de IPP (C₅) con una molécula de DMAPP (C₅), da lugar al intermediario geranil pirofosfato (GPP, C₁₀) que se condensa secuencialmente con otras dos moléculas adicionales de IPP, formando GGPP, vía farnesil pirofosfato (FPP, C₁₅). Cada una de estas reacciones está mediada por la GGPP sintasa (GGPS), la cual ha sido aislada de distintas plantas como pimiento, tomate y *Arabidopsis thaliana* (Dogbo y Camara, 1987; Kuntz *et al.*, 1992; Romer *et al.*, 1993; Okada *et al.*, 2000). La reacción que cataliza esta enzima constituye un paso importante en la ruta de biosíntesis de isoprenoides. Se ha identificado una GGPS específica que parece estar implicada en la biosíntesis de monoterpenos (Bouvier *et al.*, 2000), lo que sugiere la existencia de otras específicas para la síntesis de carotenoides (Rodríguez-Concepción, 2006).

a. Síntesis de carotenoides lineales

La formación de fitoeno a partir de GGPP es el primer paso específico de la ruta de biosíntesis de carotenoides (**Figura 2**), llevado a cabo por la fitoeno sintasa (PSY) en dos pasos. Se han aislado e identificado genes que codifican PSY, por ejemplo, en *A. thaliana* parece presentar una sola isoforma, mientras que en tomate y tabaco existen dos (Fraser *et al.*, 1999). La caracterización bioquímica de la PSY se ha llevado a cabo en pimiento y tomate (Dogbo y Camara, 1987; Fraser *et al.*, 2000). En el caso del tomate, la isoforma PSY-1 es la responsable de la síntesis en el cromoplasto, mientras que la PSY-2 lo es en el cloroplasto (Fraser *et al.*, 1999). El producto mayoritario de PSY en plantas es el 15-*cis*-fitoeno (Goodwin, 1983).

Como se ha comentado anteriormente, los carotenoides presentan una función de cromóforos gracias a una serie de dobles enlaces carbono-carbono que se introducen en la molécula de fitoeno para formar la molécula coloreada de licopeno. En plantas, la producción de licopeno se realiza a partir de 4 desaturaciones sucesivas llevadas a cabo por dos enzimas, la fitoeno desaturasa (PDS) y la ζ -caroteno desaturasa (ZDS). Las enzimas PDS y ZDS presentan un dominio de unión a FAD/NADP en su extremo amino y sus secuencias son similares en un 33-35% (Fraser y Bramley, 2004). La enzima PDS es la responsable de la introducción secuencial de dos dobles enlaces en los carbonos 11 y 11' en la molécula de fitoeno. Las siguientes desaturaciones son llevadas a cabo por la ZDS, que introduce los dobles enlaces en los carbonos 7 y 7', formándose neurosporeno (7,9,9'-triscis-neurosporeno) y prolicopeno (7,9,7',9'-tetracis-licopeno) (Breitenbach y Sandmann, 2005) (**Figura 2**). La eliminación de los átomos de hidrógeno en cada reacción de desaturación requiere el acoplamiento de estas reacciones a una cadena de transporte electrónico que utiliza oxígeno como aceptor de electrones. Algunos componentes de esta cadena de transporte se han identificados en mutantes de *Arabidopsis* y de tomate como una ubiquinona y una oxidasa terminal de plastidio (PTOX) (Carol y Kuntz, 2001; Barr *et al.*, 2004). En plantas, el fitoeno existe predominantemente en forma 15-*cis*, mientras que el isómero geométrico del licopeno es *all-trans*, lo que conlleva una isomerización del prolicopeno a la forma *trans* mediada por la enzima caroteno isomerasa (CRTISO) (Isaacson *et al.*, 2002).

b. Ciclación del licopeno

La ciclación de carotenoides está limitada a la formación de anillos en uno o en ambos extremos de la molécula de licopeno y, además, determina la

bifurcación en la ruta de biosíntesis de carotenoides dependiendo del tipo de ciclación que sufran los extremos de la molécula. Existen dos tipos de anillos que difieren por la posición del doble enlace del ciclohexano, ϵ - o β -. En plantas existen dos enzimas, β -licopeno-ciclasa (β LCY), que introduce anillos β -, y ϵ -licopeno-ciclasa (ϵ LCY), que introduce anillos ϵ - (Pecker *et al.*, 1996; Cunningham y Gantt, 2001) (**Figura 2**). La β LCY puede catalizar la introducción de dos anillos β -, dando lugar a la formación de β -caroteno, vía γ -caroteno. Sin embargo, ϵ LCY sólo puede incorporar un anillo ϵ -, formando δ -caroteno. Se han identificado genes que codifican β LCY en diversas especies, entre ellas *Arabidopsis*, narciso, tabaco y pimiento (Hugueney *et al.*, 1995; Cunningham *et al.*, 1996). Por ejemplo, en tomate existen dos enzimas β LCY, una de ella específica de cromoplastos (β LCY2) que presenta un 53% de similitud en su secuencia de aminoácidos a la β LCY cloroplástica. Genes que codifican ϵ LCY han sido aislados en *Arabidopsis* (Cunningham y Gantt, 2001) y tomate (Ronen *et al.*, 1999), entre otras plantas.

c. Formación de xantofilas

El siguiente paso en la ruta de biosíntesis de carotenoides en plantas superiores es la formación enzimática de las xantofilas, que se caracterizan por presentar carbonos oxigenados (Gross, 1987). Esta reacción consiste en la hidroxilación de los carbonos 3 y 3' de los anillos del α - y β -caroteno, produciéndose luteína y zeaxantina, vía α - y β -criptoxantina, respectivamente (**Figura 2**). Estas reacciones se catalizan por dos tipos de enzimas, una específica de los anillos ϵ -, la α -caroteno hidroxilasa (ϵ CHX), y otra para los anillos β -, que recibe el nombre de β -caroteno hidroxilasa (β CHX) (Sun *et al.*, 1996; Pogson *et al.*, 1996). En *Arabidopsis* se han identificado dos β CHX, y en tomate y pimiento se han encontrado sus respectivos genes homólogos (Sun *et al.*, 1996; Bouvier *et al.*, 1998; Hirschberg, 2001; Lange y Ghassemian, 2003). Respecto a la enzima ϵ CHX, hasta la fecha únicamente se ha caracterizado en *Arabidopsis*, siendo una enzima dependiente del citocromo P-450 (Tian *et al.*, 2004).

Las xantofilas de la rama β,β - de la ruta de biosíntesis de carotenoides sufren una serie de modificaciones, a diferencia de las de la rama α,β -, donde el pigmento final es la luteína (**Figura 2**). La violaxantina se forma a partir de la zeaxantina mediante una serie de dos epoxidaciones secuenciales en los carbonos 5,6 y 5',6' de sus anillos hidroxilados. La reacción se realiza a través del intermediario anteraxantina, por la acción de la zeaxantina epoxidasa (ZEP), dependiente de ferredoxina (Bouvier *et al.*, 1996) (**Figura 2**). La secuencia de esta epoxidasa se ha identificado en *Arabidopsis*, albaricoque, tomate, tabaco y

pimiento (Bouvier *et al.*, 1996; Fraser y Bramley, 2004). La secuencia de epoxidaciones realizada por ZEP es reversible, de tal forma que de-epoxidaciones de la violaxantina, mediadas por la enzima violaxantina de-epoxidasa (VDE), conllevan de nuevo la formación de zeaxantina. Estas reacciones se conocen como el ciclo de las xantofilas (Yamamoto, 1985; Gross, 1987; Demmig Adams *et al.*, 1996). A partir de la violaxantina se forma la neoxantina, que constituye la última xantofila de la rama β,β - de la biosíntesis de carotenoides, y cuya formación la lleva a cabo la neoxantina sintasa (NSY) (Fraser y Bramley, 2004) (**Figura 2**).

2.4. Regulación de carotenoides en plantas superiores

Las plantas han desarrollado mecanismos de regulación muy complejos para controlar la biosíntesis y acumulación de estos pigmentos, permitiendo una amplia variación de carotenoides entre tejidos y órganos (Lu y Li, 2008). El papel que juegan estos pigmentos en el desarrollo y la adaptación de las plantas sugieren que su síntesis y acumulación están coordinadas con diferentes procesos como la biogénesis del plastidio. La biosíntesis y acumulación de carotenoides en los cromoplastos está determinada por mecanismos de regulación transcripcional y post-transcripcional, por la presencia de estructuras capaces de almacenar o estabilizar los carotenoides, y por el catabolismo de los mismos (Fraser y Bramley, 2004; Howitt y Pogson, 2006).

a. Regulación transcripcional de la biosíntesis de carotenoides

La caracterización de la regulación de la biosíntesis de carotenoides *in vivo* se ha estudiado en plantas y frutos modelos como *Arabidopsis*, o tomate y pimiento, que, además de su interés agronómico, presentan características genéticas adecuadas para su estudio (Bramley, 2002; Fraser y Bramley, 2004; Giuliano *et al.*, 2008; Fraser *et al.*, 2009). La disponibilidad de mutantes de estas especies permite llevar a cabo la elucidación de los principales pasos que regulan la biosíntesis de carotenoides. Trabajos realizados inicialmente en tomates parecían indicar que el primer paso limitante en la biosíntesis de carotenoides lo constituía la DXS (1-deoxi-D-xilulosa-5 fosfato sintasa), enzima implicada en la síntesis de los precursores (Lois *et al.*, 2000; Rodríguez-Concepción *et al.*, 2001; Rodríguez-Concepción *et al.*, 2003; Botella-Pavía *et al.*, 2004). La sobreexpresión del gen (Esteve *et al.*, 2001; Enfissi *et al.*, 2005; Crowell *et al.*, 2009) y el tratamiento con DXP (Lois *et al.*, 2000) han confirmado su papel en la carotenogénesis de tomates. El segundo paso limitante en la biosíntesis de IPP lo

constituye la HDR (hidroximetilgeranil pirofosfato sintasa) cuando la concentración de DXP no es restrictiva (Botella-Pavía *et al.*, 2004).

En frutos de pimiento rojo la expresión del gen *DXS* se incrementa desde estadios tempranos del desarrollo del fruto y, además, durante el momento de viraje de color del fruto, junto con los genes *GGPS*, *PSY* y *PDS* (Kuntz *et al.*, 1992; Huguenev *et al.*, 1992; Romer *et al.*, 1993; Bouvier *et al.*, 1994; Bouvier *et al.*, 1998). Al inicio del cambio de coloración, se produce un incremento de la expresión de los genes capsorubina sintasa (*CCS*), *β CHX* y *ZEP*, implicados en la síntesis de xantofilas y capsantina (Huguenev *et al.*, 1992; Bouvier *et al.*, 1994; Bouvier *et al.*, 1996; Bouvier *et al.*, 1998). Sin embargo, la expresión de *β LCY* es constitutiva a lo largo de todo el proceso, de ahí que se considere a la enzima CCS responsable del redireccionamiento del flujo de la ruta hacia la rama β,β - (Huguenev *et al.*, 1995).

En tomates, el cambio de coloración conlleva un incremento del contenido de licopeno, asociado a una importante acumulación de transcritos de los genes *PSY-1* y de *PDS* (Giuliano *et al.*, 1993; Pecker *et al.*, 1996) y a un descenso de los genes de ambas licopeno ciclasas (*ϵ LCY* y *β LCY*) (Pecker *et al.*, 1996; Ronen *et al.*, 1999; Ronen *et al.*, 2000). Estos resultados muestran que el contenido y composición de carotenoides en frutos de tomate están principalmente regulados a nivel transcripcional. Esta hipótesis está apoyada también por los resultados obtenidos de la caracterización de diversos mutantes de tomate. La enzima PSY ejerce el mayor control en la ruta de la biosíntesis de carotenoides (Fraser *et al.*, 2002), sin embargo, la sobreexpresión de otras enzimas como la *β LCY* provocó el incremento de los carotenoides totales (Ronen *et al.*, 2000; Rosati *et al.*, 2000). Además, la sobreexpresión de una PSY bacteriana en cromoplastos de tomate aumentó la acumulación de carotenoides (Fraser *et al.*, 2002). Estos resultados sugieren que la ruta de carotenoides puede compensar las fluctuaciones en el equilibrio precursor/producto y redistribuir el control del balance en la ruta (Botella-Pavía *et al.*, 2004).

b. Acumulación de carotenoides en frutos

En los cloroplastos, los carotenoides se encuentran asociados a proteínas unidas a clorofilas, mientras que en los cromoplastos están formando parte de estructuras lipoproteicas (Vishnevetsky *et al.*, 1999a). Se han aislado y caracterizado diferentes genes de proteínas asociadas a carotenoides implicadas, además, en la formación de complejos membranosos (Smirra *et al.*, 1993; Libal-Weksler *et al.*, 1997; Vishnevetsky *et al.*, 1999a). Se cree que estas proteínas

pueden ser un instrumento para secuestrar no sólo carotenoides, sino también lípidos (Vishnevetsky *et al.*, 1999a); de hecho existen evidencias de que la síntesis de carotenoides afecta a la síntesis de las proteínas asociadas a carotenoides (Vishnevetsky *et al.*, 1999b).

Las xantofilas incrementan el grado de esterificación con la maduración, aumentando con ello su hidrofobicidad, favoreciéndose de esta forma la integración en las estructuras proteolipídicas (Gross, 1987; Britton *et al.*, 1998). El grado de esterificación de las xantofilas podría estar determinado por la disponibilidad de ácidos grasos, así como por la abundancia y actividad de las enzimas implicadas en la esterificación (Stalberg *et al.*, 2003). El contenido de xantofilas esterificadas varía según la variedad y estadio de maduración. Por ejemplo, mientras que en manzanas los carotenoides son inmediatamente esterificados conforme se sintetizan (Knee, 1988), en pimientos la esterificación de xantofilas se inicia con la maduración, de forma que en los frutos maduros están total o parcialmente esterificados (Hornero-Méndez *et al.*, 2002). En cítricos, el total de xantofilas varía según la variedad y el tejido, en naranjas y mandarinas el contenido de xantofilas esterificadas es de 60% y 86% en flavedo y pulpa, respectivamente, mientras que en limones es sólo el 5% (Yokoyama y Vandercook, 1967; Eilati *et al.*, 1972; Gross, 1987).

c. Catabolismo de carotenoides

En los últimos años se han caracterizado genes que codifican unas enzimas denominadas 'dioxigenasas de corte de carotenoides' (CCDs, del inglés Carotenoids Cleavage Dioxygenase) (Giuliano *et al.*, 2003; Camara y Bouvier, 2004; Lewinsohn *et al.*, 2005; Auldridge *et al.*, 2006b) en diferentes frutos, como uva (Mathieu *et al.*, 2005), fresa (García-Limones *et al.*, 2008), tomate (Simkin *et al.*, 2004), melón (Ibdah *et al.*, 2006), manzana (Huang *et al.*, 2009) y algunos cítricos (Rodrigo *et al.*, 2005; Kato *et al.*, 2006; Agustí *et al.*, 2007); y en plantas, como en azafrán (Bouvier *et al.*, 2003), *Arabidopsis* (Schwartz *et al.*, 2001; Auldridge *et al.*, 2006a), maíz (Vogel *et al.*, 2008), arroz (Ilg *et al.*, 2009), trigo o cebada (Fester *et al.*, 1999). Estas enzimas están implicadas en la formación de apocarotenoides, compuestos derivados de carotenoides que han sido aislados de cianobacterias, algas y de plantas superiores (Camara y Bouvier, 2004). A pesar de ello, algunos autores han propuesto que éstas no parecen influir en el contenido de carotenoides (Simkin *et al.*, 2004; Mathieu *et al.*, 2005; Kato *et al.*, 2006; Ibdah *et al.*, 2006). En pétalos de crisantemo se ha identificado un gen, *CCD4a*, cuyos niveles de expresión son inversos al contenido de carotenoides ya que cuando este

gen es deletado o suprimido, se observa una acumulación de carotenoides (Ohmiya *et al.*, 2006). En fresas se ha caracterizado una *CCD1* (*FaCCD1*) que parece estar implicada en la rotura de zeaxantina, luteína y β -apo-8'-carotenal *in vitro*, y de β -caroteno en *in vivo* (García-Limones *et al.*, 2008). Además, el análisis del patrón de carotenoides de fresa reveló una correlación entre el incremento de expresión de *FaCCD1* y la disminución del contenido de luteína, sugiriendo que esta xantofila podría ser su principal sustrato *in vivo*. Por tanto, esta enzima podría estar implicada en el catabolismo de carotenoides, más concretamente en la degradación de luteína.

En cítricos, se han identificados dos *CCDs*, aunque sólo se ha confirmado la actividad catalítica en una de ellas (Kato *et al.*, 2006; Agustí *et al.*, 2007). Existen apocarotenoides específicos del género, como el β -apo-8'-carotenal o la β -citrurina (**Figura 3**), cuyos precursores se ha sugerido que son la zeaxantina y β -criptoxantina (Yokoyama y White, 1966; Farin *et al.*, 1983; Rodrigo *et al.*, 2004; Rodrigo y Zacarías, 2007). Sin embargo, la enzima que cataliza esta actividad aún no se ha aislado. Por el contrario, sí se han caracterizado dos *NCEDs* implicadas en la formación de ABA, cuyos patrones de expresión difieren durante la maduración natural, en condiciones de estrés o con tratamientos con etileno (Rodrigo *et al.*, 2005; Kato *et al.*, 2006; Agustí *et al.*, 2007; Matsumoto *et al.*, 2009).

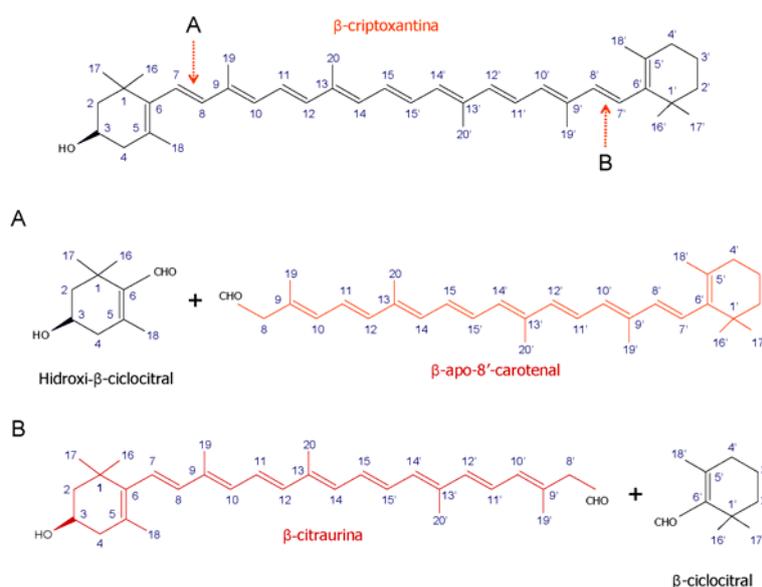


Figura 3. Estructuras de apocarotenoides característicos de cítricos resultantes de la rotura de la β -criptoxantina. **A.** β -apo-8'-carotenal e hidroxi- β -ciclocitral. **B.** β -citaurina y β -ciclocitral.

d. Otros mecanismos de regulación

En cítricos, al igual que en otras plantas, algunos autores han propuesto diferentes mecanismos de regulación de la biosíntesis de carotenoides, además de la regulación transcripcional, como la regulación post-transcripcional y traduccional, importación de enzimas a orgánulos, la actividad catalítica o complejos asociados a membranas (al-Babili *et al.*, 1996; Cunningham y Gantt, 1998; Bramley, 2002; Fanciullino *et al.*, 2008). Por ejemplo, entre estos mecanismos, está la regulación de los genes por sustrato (Rodríguez-Concepción *et al.*, 2001) o por la luz (Hsieh y Goodman, 2005). Un punto clave en la regulación de la biosíntesis de carotenoides es la formación de complejos multienzimáticos, un ejemplo lo constituyen las enzimas PSY y PDS que pueden encontrarse en forma inactiva (solubles en el estroma) o en forma activa (unida a membrana), lo que sugiere que el control del equilibrio entre las fracciones de proteínas libres/unidas a membrana es un mecanismo post-transcripcional que regula la actividad de estas enzimas (Schledz *et al.*, 1996; al-Babili *et al.*, 1996; Bonk *et al.*, 1996; Welsch *et al.*, 2000; López *et al.*, 2008). En el caso de PDS, dicho mecanismo parece que está asociado al estado redox, dado que esta enzima y la ZDS necesitan una plastoquinona y una oxidasa plastidial como receptores de electrones para poder catalizar la reacción (Hirschberg, 2001). Las modificaciones post-transcripcionales de las enzimas constituyen otro mecanismo de regulación, como ocurre con β LCY, cuya actividad estaría regulada por el procesamiento del precursor (60 KDa) a su forma activa (45 KDa) (Inoue *et al.*, 2006).

3. Carotenoides en frutos cítricos

Los cítricos son una de las fuentes más importantes de carotenoides, debido principalmente a su elevado consumo, tanto en fresco como en zumos. El contenido y composición de carotenoides en los frutos cítricos se ha estudiado durante años en diferentes especies y cultivares y, más recientemente, estos estudios se han completado con el análisis molecular de la ruta de biosíntesis. En general, los cítricos son una compleja fuente de carotenoides en los que se han identificado hasta 110 componentes distintos (Stewart y Wheaton, 1973a).

En los frutos cítricos la coloración externa de la piel varía del amarillo de los limones y pomelos, al naranja intenso de algunas variedades de mandarina o al rojo intenso de algunos pomelos y pumelos. El color de la corteza de los frutos cítricos constituye un criterio importante de selección por los consumidores. Durante la maduración de los cítricos el cambio de color se debe a una disminución

del contenido de clorofilas junto con un incremento del contenido de carotenoides y un cambio en la composición de éstos (Young y Jahn, 1972; Stewart y Wheaton, 1972; Stewart y Wheaton, 1973a; Purvis y Barmore, 1981; Gross, 1981; Goldschmidt *et al.*, 1993; Trebitsh *et al.*, 1993; Jacob-Wilk *et al.*, 1999; Rodrigo y Zacarías, 2003; Rodrigo *et al.*, 2004; Kato *et al.*, 2004). El contenido y composición de carotenoides proporciona colores característicos a frutos de distintas variedades de cítricos (Gross, 1987). Así, la violaxantina, que generalmente se encuentra en gran proporción en los cítricos, es de color amarillo, la β -criptoxantina y el β -caroteno son de color naranja, mientras que la β -citraurina, un apocarotenoide C_{30} exclusivo de frutos cítricos, proporciona la coloración naranja-rojiza a algunas variedades (Stewart y Wheaton, 1973b; Gross, 1987; Casas y Mallent, 1988; Oberholster *et al.*, 2001).

En general, en los frutos cítricos el contenido en carotenoides es mayor en la corteza que en la pulpa, acumulándose en el flavedo (parte más externa de la corteza) aproximadamente el 70% de los carotenoides del fruto (Gross, 1987). La composición de carotenoides varía con el desarrollo y la maduración del fruto, tanto en el flavedo como en la pulpa (Alquézar, 2008). En el flavedo de frutos verdes inmaduros los carotenoides predominantes son la luteína y la *trans*-violaxantina, además de otros característicos de tejido cloroplástico (β -caroteno, neoxantina y zeaxantina). En frutos verdes maduros aumenta considerablemente la proporción de fitoeno, de *cis*-violaxantina y zeaxantina, mientras que durante el cambio de color comienza la acumulación de β -criptoxantina. En el flavedo de frutos cítricos totalmente coloreados el principal carotenoide es la *cis*-violaxantina y se produce un aumento del fitoeno, así como la acumulación de apocarotenoides (Rodrigo *et al.*, 2004; Kato *et al.*, 2004). En zumo o pulpa, la composición es distinta de la del flavedo, siendo los carotenoides más abundantes α -caroteno, β -criptoxantina, luteína, zeaxantina, anteraxantina y violaxantina (Farin *et al.*, 1983; Pascual *et al.*, 1993; Pupin *et al.*, 1999; Gama y Sylos, 2005). El porcentaje de xantofilas es menor en aquellos cítricos no coloreados como el limón o el pomelo, donde se acumulan carotenoides incoloros como el fitoeno y el fitoflueno durante su maduración. Las variedades de pomelo coloreadas presentan también una concentración de xantofilas muy baja, sin embargo, a diferencia de las variedades no coloreadas, éstas acumulan licopeno, proporcionándole la tonalidad roja o rosada característica (Gross y Timberg, 1983). Las variaciones cuantitativas y cualitativas en los frutos de las distintas variedades de cítricos se han revisado recientemente por Alquézar *et al.* (2008a).

3.1. Biosíntesis de carotenoides y su regulación en frutos cítricos

Recientemente se han aislado y caracterizado un importante número de genes implicados en la ruta de biosíntesis de carotenoides en cítricos (Rodrigo *et al.*, 2004; Kato *et al.*, 2004). La mayoría de los estudios correlacionan la evolución del contenido de carotenoides durante la maduración del fruto con la acumulación de transcritos de los genes de la biosíntesis de carotenoides. Se han aislado dos genes que codifican dos PSY y, aunque las secuencias aisladas son idénticas en un 97,0-99,5%, se consideran dos isoformas diferentes (Ikoma *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2003; Fanciullino *et al.*, 2007). La actividad catalítica de PSY se ha caracterizado (Kim *et al.*, 2003) y se sabe que están asociadas a membranas de los plastos (Inoue *et al.*, 2006). La reacción catalizada por PSY determina la entrada de precursores en la ruta de biosíntesis de carotenoides, por ello, se considera un importante paso regulador de la ruta durante la maduración de los frutos. De hecho, la acumulación de transcritos de PSY es menor en la pulpa que en el flavedo, correlacionándose con las diferencias en el contenido de carotenoides (Rodrigo *et al.*, 2004; Kato *et al.*, 2004; Tao *et al.*, 2007; Fanciullino *et al.*, 2008; Alquézar, 2008).

El gen que codifica la PDS de cítricos parece ser que pertenece a una pequeña familia génica (Kita *et al.*, 2001; Fanciullino *et al.*, 2007). Se ha aislado la secuencia parcial o completa de PDS de distintas variedades de cítricos, cuyas secuencias presentan una identidad del 98-100% a nivel de aminoácidos. Ensayos *in vitro* indican que dos formas procesadas de PDS se encuentran en la fracción soluble del plastidio, mientras que otra forma sin procesar aparece en menor proporción asociada a membrana (Inoue *et al.*, 2006). La expresión del gen PDS durante la maduración se ha estudiado en diferentes cultivares de naranjas (Rodrigo *et al.*, 2004; Kato *et al.*, 2004; Fanciullino *et al.*, 2008; Alquézar, 2008), en mandarinas 'Satsuma' (Kita *et al.*, 2001; Kato *et al.*, 2004) y en limones 'Lisbon' (Kato *et al.*, 2004). En general, tanto en flavedo como en pulpa, la expresión de *PSD* fue menor que la de *PSY* y aumenta con la maduración del frutos, tanto en la piel como en la pulpa. En cuanto a la segunda desaturasa implicada en la ruta de biosíntesis de carotenoides, la *ZDS*, se cree que existen 3 copias en el genoma de cítricos (Fanciullino *et al.*, 2007). Además, los estudios realizados en el mutante de coloración amarilla 'Pinalate', sugieren que existen dos isoformas de la enzima, una específica de cloroplastos y otra de cromoplastos (Rodrigo *et al.*, 2003). La expresión de *ZDS* aumenta progresivamente en el flavedo y en la pulpa de naranjas, mandarinas y limones durante la maduración (Rodrigo *et al.*, 2004; Kato

et al., 2004; Fanciullino *et al.*, 2008). Además, para la desaturación completa y correcta del fitoeno a licopeno se requiere la acción de PTOX y de las isomerasas CRTISO, cuya expresión es baja en frutos verdes. Durante la maduración, la acumulación de mRNA de *PTOX* es paralela a la de *PDS* y *ZDS* (Rodrigo *et al.*, 2004; Alquézar *et al.*, 2008a), mientras que la de *CRTISO* permanece constante o incluso disminuye (Kato *et al.*, 2004). El incremento de la expresión de estos genes durante la maduración contribuye al incremento de la síntesis de carotenoides lineales.

En cítricos se han identificado tres genes que codifican LCYs: uno codifica una ϵ LCY y los otros dos β LCYs, cuyas secuencias proteicas muestran un 55-56% de identidad. La capacidad de ciclar licopeno de estas enzimas se ha confirmado recientemente: β LCY forma dos anillos β -, formando β -caroteno, mientras que ϵ LCY introduce sólo uno para generar δ -caroteno (Inoue *et al.*, 2006). En la maduración de los frutos cítricos, la expresión de ϵ LCY disminuye, mientras que la de β LCY incrementa visiblemente, redireccionando la ruta hacia la formación de β , β -xantofilas (Rodrigo *et al.*, 2004; Kato *et al.*, 2004; Fanciullino *et al.*, 2008; Alquézar *et al.*, 2008a). Recientemente, se ha aislado un gen con una gran homología al gen específico de cromoplasto de tomate (Ronen *et al.*, 2000) y que codifica una proteína capaz de ciclar el licopeno y formar β -caroteno. De hecho, Alquézar *et al.* (2009) han aislado y caracterizado, mediante expresión heteróloga, un nuevo gen que codifica una β LCY2 con actividad licopeno ciclasa y que presenta expresión específica de tejido cromoplástico. Este gen se ha estudiado en distintas variedades de cítricos donde se ha observado que presenta dos alelos, los cuales se expresan de forma diferencial. Así, en naranjas 'Navel' se transcribe preferentemente el alelo β LCY2a, que codifica una proteína con actividad licopeno ciclasa, mientras que en pomelos rojos 'Star Ruby' se expresa única o mayoritariamente el alelo β LCY2b, que codifica para una proteína con muy poca o nula actividad licopeno ciclasa, lo que explica la mayor acumulación de licopeno en esta variedad (Alquézar *et al.*, 2009).

La β CHX de cítricos es una proteína integral de membrana (Inoue *et al.*, 2006), cuya expresión se induce de forma importante durante la maduración de diferentes variedades de limones, naranjas y mandarinas (Rodrigo *et al.*, 2004; Kato *et al.*, 2004; Fanciullino *et al.*, 2008; Alquézar *et al.*, 2008b). En pomelos rojos 'Star Ruby' se ha determinado una baja expresión de β CHX, lo que coincide con la acumulación de β -caroteno observada en la pulpa de estos frutos (Alquézar *et al.*, 2009). Además, recientemente se ha visto que la expresión de un gen

putativo de ϵ CHX disminuye durante la maduración (Alquézar *et al.*, 2008b). Por último, la enzima responsable de la formaci3n de violaxantina (ZEP), incrementa a lo largo de la maduraci3n de los frutos, tanto en naranjas, como en limones o mandarinas (Rodrigo *et al.*, 2004; Kato *et al.*, 2004; Fanciullino *et al.*, 2008; Alquézar *et al.*, 2008b).

Los estudios realizados en distintas especies de cítricos indican que la acumulaci3n y composici3n de carotenoides durante la maduraci3n de los frutos está fuertemente regulada a nivel transcripcional (Rodrigo *et al.*, 2004; Kato *et al.*, 2006; Fanciullino *et al.*, 2008; Alquézar, 2008; Alquézar *et al.*, 2009). Por otro lado, un factor importante que determina la diversidad en el color y en el contenido de carotenoides en los frutos cítricos es la relaci3n entre la expresi3n de los genes iniciales y aquellos implicados en la biosíntesis de xantofilas. Así, por ejemplo, diferencias en el balance de expresi3n de los genes de biosíntesis de carotenos y xantofilas están relacionadas con la acumulaci3n de β -criptoxantina. Esto es lo que ocurre en frutos de mandarina 'Satsuma', donde la expresi3n de β LCY aumenta con la maduraci3n, mientras que en frutos de naranja 'Valencia' es constitutiva, lo que genera una mayor acumulaci3n de β -criptoxantina en frutos de mandarina (Kato *et al.*, 2004). Un hecho similar se observa en frutos de mandarina 'Satsuma' tras la aplicaci3n de etileno (Fujii *et al.*, 2007). Otro ejemplo es el observado en limones 'Lisbon', donde se produce una acumulaci3n masiva de fitoeno, lo cual se correlaciona con una disminuci3n en la expresi3n del gen *PDS* (Kato *et al.*, 2004). Sin embargo, en otros casos los fenotipos diferentes en la coloraci3n de los frutos no se explican mediante cambios transcripcionales, lo que sugiere la existencia de otros mecanismos de regulaci3n implicados en la biosíntesis de carotenoides, que hasta el momento son desconocidos (Fanciullino *et al.*, 2008). Se han propuesto mecanismos de regulaci3n transcripcional, postranscripcional o de traducci3n para la regulaci3n de la biosíntesis de carotenoides en otras plantas (Apartado 2.4 de esta Introducci3n, (Cunningham y Gantt, 1998; Bramley, 2002).

Existen diversos ejemplos en los que se ha relacionado los cambios de niveles de expresi3n de *DXS* con la acumulaci3n de β,β -xantofilas (Fanciullino *et al.*, 2008). Alquézar *et al.* (2008a) proponen que en el mutante 'Cara cara' la acumulaci3n de licopeno característica de la pulpa, está relacionada con una mejor expresi3n del gen *HDS* de la ruta MEP. Además, debido a que el gen β LCY incrementa su expresi3n, proponen para este mutante un mecanismo de regulaci3n por producto final (feed-back).

3.2. Cambios en carotenoides durante la conservación postcosecha

El aspecto visual de los frutos cítricos es un parámetro determinante en la comercialización y puede verse comprometido por los diferentes tratamientos postcosecha a los que son sometidos (Pascual *et al.*, 1993; Oberholster *et al.*, 2001; Meléndez-Martínez *et al.*, 2007b). Existen numerosos factores pre- y postcosecha que afectan a la composición de carotenoides y, por ende, al color externo de los frutos cítricos. Si bien la acumulación de carotenoides en frutos cítricos presenta un patrón característico a lo largo de la maduración de la especie y la variedad, existen una serie de factores exógenos y endógenos que influyen, de forma generalizada, en el contenido y composición de carotenoides. Entre los factores precosecha, destaca la influencia de la luz o el posicionamiento de los frutos en el árbol, así como la temperatura o los tratamientos pre-recolección para minimizar las alteraciones fisiológicas (Casas y Mallent, 1988; Casas y Llácer, 1988; Goldschmidt, 1988). Las principales pérdidas postcosecha se deben principalmente a las prácticas inespecíficas e inadecuadas de recolección, manejo, empaquetamiento, transporte y almacenamiento, que provocan el deterioro de los frutos y devalúan su calidad.

3.2.1. Efecto de las bajas temperaturas en la carotenogénesis

La temperatura es el factor postcosecha que más importancia tiene en la conservación frutas y hortalizas, constituyendo el factor más simple e importante para retrasar su deterioro y prolongar su conservación. El almacenamiento de los frutos durante la postcosecha conlleva un compromiso entre temperaturas suficientemente bajas para inhibir los procesos de maduración y otras actividades metabólicas, y lo suficientemente altas como para prevenir los daños por frío (DF) (Couey, 1982).

a. Temperaturas durante la precosecha

La relación entre la temperatura y el color ha sido ampliamente estudiada en los frutos cítricos, siendo, en general, las temperaturas óptimas para la carotenogénesis relativamente bajas. De hecho, en los frutos cítricos la conversión de cloroplastos a cromoplastos está inducida por temperaturas bastante bajas (Gross, 1987). La relación entre el cambio de color y la necesidad de un periodo de frío se ha establecido, coincidiendo la degradación de clorofilas durante la maduración con una temperatura nocturna entorno a 13 °C (Stearns y Young, 1942). Además, se ha establecido que la degradación de las clorofilas se produce cuando la temperatura está por debajo de los 30 °C (Porat *et al.*, 2001), mientras

que el desarrollo del color se produce más rápidamente cuando la temperatura del suelo está aproximadamente a 12 °C (Young y Erickson, 1961). Young y Erickson (1961) postularon que temperaturas nocturnas sobre 7 °C, combinadas con temperaturas diurnas de aproximadamente 20 °C, estimulaban la acumulación de xantofilas. Por ello, en los países tropicales las condiciones relativamente constantes de temperaturas altas no permiten que los frutos alcancen la tonalidad característica de cítricos (Barry y Van Wyk, 2006). Para la formación de licopeno, en pomelos 'Redblush' se necesitan altas temperaturas día/noche (35/30 °C) (Meredith y Young, 1969), mientras que temperaturas superiores a 35 °C inhiben la síntesis del licopeno (Meredith y Young, 1971). Por el contrario, para la formación de carotenoides es necesario temperaturas diurnas y nocturnas bajas (16/5 °C). En naranjas 'Valencia' se observó que los frutos expuestos a bajas temperaturas (20/15 °C) tanto diurnas como nocturnas, presentaban un mayor contenido de carotenoides que los expuestos a altas temperaturas (30/15 °C) (Coggins *et al.*, 1981). En general, los frutos expuestos a las altas temperaturas presentan una alta concentración de clorofilas y un menor contenido de carotenoides (Stearns y Young, 1942; Young y Erickson, 1961; Agustí, 1999), principalmente del apocarotenoide de tonalidad rojiza β -citraurina (Stewart y Leuenberger, 1976). Sin embargo, a pesar de estos requisitos para la óptima coloración de la piel, la pulpa desarrolla su color característico, lo que indica que la biosíntesis de carotenoides y su regulación es diferente en ambos tejidos (Tadeo *et al.*, 2008).

En particular, se ha descrito que la rapidez con que se alcanza la coloración máxima de los frutos cítricos en árbol depende de las diferencias de las temperaturas entre el día y la noche durante el periodo de cambio de color y que la temperatura óptima para la síntesis de los carotenoides β -criptoxantina, β -citraurina y violaxantina se sitúa entre 12 y 14 °C (Sonnen *et al.*, 1979; Casas y Mallent, 1988). Además, se ha propuesto que la necesidad de las bajas temperaturas del suelo para el desarrollo del color puede estar relacionada con las hormonas GAs y citoquininas (Eilati *et al.*, 1969a).

b. Temperaturas durante la postcosecha

Actualmente, la conservación de los frutos a bajas temperaturas (1,5 y 2,5 °C) es la técnica más utilizada para alargar la vida postcosecha y preservar la calidad de los frutos cítricos. La aplicación de frío puede perseguir diversos fines comerciales, como alargar el periodo de comercialización de variedades tardías aprovechando periodos favorables, mantener la calidad durante el transporte a

mercados distantes, abastecer la línea de almacén en momentos en los que las condiciones climatológicas no permiten la recolección, etc. Además, el almacenamiento a bajas temperaturas (entre 0,5 y 2,0 °C) es un requisito impuesto a algunos países (entre los que se encuentra España) para la exportación de frutos cítricos a mercados como el de EE.UU o Japón, como medida preventiva para la eliminación de la mosca del mediterráneo (*Ceratitis capitata* Wied).

La sensibilidad a desarrollar DF varía según la especie y, en general, temperaturas por debajo de 10 °C son críticas en los cítricos, principalmente, para los pomelos, limones y limas, que son los más susceptibles a desarrollarlos. Ciertos híbridos de mandarinas también son muy sensibles, especialmente la mandarina 'Fortune' (Chalutz *et al.*, 1985; Martínez-Jávega y Cuquerella, 1995; Lafuente y Zacarías, 2006; Bajwa y Anjum, 2007). Los DF presentan diversas sintomatologías, aunque los más comunes son la formación de picado o 'pitting', caracterizada por depresiones en la piel, con ligera decoloración que posteriormente pardean. Otra sintomatología característica de DF en frutos cítricos es el 'escaldado', que consiste en un oscurecimiento difuso en la piel, aunque también pueden afectar al albedo (pardeamiento del albedo) (Lafuente *et al.*, 2005; Lafuente y Zacarías, 2006). En la **Figura 4** se puede observar diferentes ejemplos de los DF en distintas variedades de frutos cítricos.

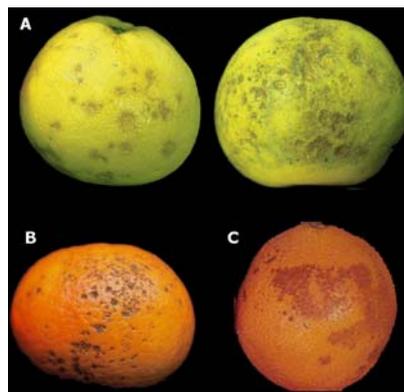


Figura 4. Síntomas de daños por frío en diferentes variedades de frutos cítricos: **A.** Picado en frutos de pomelos en un estadio inicial y en otro más desarrollado, **B.** Picado en frutos de mandarina 'Fortune' y **C.** Escaldado superficial en frutos de naranja 'Navelate'

La gran mayoría de los estudios realizados sobre el efecto de bajas temperaturas en frutos cítricos están enfocados, en el mejor de los casos, a la mejora de la calidad y a la reducción de DF y de podredumbres. Sólo en algunas

variedades de cítricos se ha establecido la relación entre bajas temperaturas y el color de los frutos. Así, por ejemplo, para las variedades de limones 'Eureka' y 'Villa Franca', se ha observado que la temperatura adecuada para conseguir una coloración óptima y una mínima incidencia de DF es 14 °C (Cohen y Schiffmann-Nadel, 1978). En mandarinas 'Ortanique' se obtuvieron resultados similares en frutos almacenados a temperaturas entre 5-11 °C (Cohen *et al.*, 1990). En las variedades de mandarina 'Clemenules' (Barry y Van Wyk, 2006) y de naranjas 'Valencia' (Oberholster, 2001) sometidas a choques de frío se obtuvo una mejora de la coloración externa. De hecho, Barry y van Wyk (2006) proponen el choque de frío como una opción para sustituir parcial o completamente la desverdización por etileno, estableciendo que su aplicación sería más efectiva en los años cálidos donde la temperatura permanece por encima de los 13 °C. Se ha especulado que el choque de frío podría ser el estímulo requerido para la síntesis y acumulación de β -citraurina a partir del corte oxidativo de sus precursores β,β -xantofilas mediado por una dioxigenasa (Oberholster *et al.*, 2001). Recientemente, en estudios realizados en frutos de naranja 'Palmer Navel' se ha caracterizado la evolución de la coloración durante la conservación a distintas temperaturas (Van Wyk *et al.*, 2009). En este estudio observaron que en los frutos almacenados a 20 °C hubo una pérdida de coloración, mientras que ésta permaneció estable en aquellos frutos que se mantuvieron a 4,5 °C, proponiendo las temperaturas intermedias (11 y 15° C) como las más idóneas para limitar los efectos negativos de las bajas temperaturas y para permitir el desarrollo de la coloración (Van Wyk *et al.*, 2009). En mandarinas 'Satsuma', a lo largo de la conservación a bajas temperaturas (5 °C) la acumulación de carotenoides experimentó un importante retraso respecto a los frutos que permanecieron a 20 °C (Matsumoto *et al.*, 2009). Este patrón de acumulación se correspondió con una menor expresión de los genes de biosíntesis de carotenoides, tanto en la piel como en la pulpa de los frutos (Matsumoto *et al.*, 2009).

3.2.2. Efecto del acondicionamiento térmico en la carotenogénesis

El acondicionamiento térmico es el tratamiento que ha demostrado ser más eficaz para incrementar la tolerancia al frío de los frutos cítricos, reduciendo además la incidencia de podredumbres durante el almacenamiento a bajas temperaturas y manteniendo su calidad (Lafuente *et al.*, 1991; Lafuente *et al.*, 1997; Porat *et al.*, 2000; Plaza *et al.*, 2003; Plaza *et al.*, 2004; Erkan *et al.*, 2005b). Los tratamientos térmicos pueden aplicarse mediante tres métodos: 1) agua caliente, 2) aire saturado de vapor y 3) aire caliente (Lurie, 1998). La eficacia de

cada método depende tanto de la especie y la variedad, como de los factores precosecha (estado de maduración, condiciones climáticas o prácticas de cultivo). El tiempo necesario para que un tratamiento sea efectivo disminuye a medida que aumenta la temperatura aplicada, y su eficacia depende del medio utilizado para la transmisión de calor. Los baños en agua caliente se utilizaron inicialmente para el control de hongos, pero su uso se amplió a la desinfección de insectos, en ambos casos son efectivos y requieren tiempos largos (hasta 90 min.). A pesar de que la principal limitación de este sistema es la posible aparición de daños debido a las altas temperaturas, incluso para cortos periodos de tiempo se pueden utilizar como tratamiento de cuarentena (Lafuente *et al.*, 2001a). Una variante de este método es la aplicación de agua caliente atomizada, donde el producto puede ser expuesto a altas temperaturas durante 10-60 segundos. Con este método se consigue reducir los tiempos de aplicación del tratamiento a la vez que se limpia el producto (Porat *et al.*, 2000). Otro tratamiento que se ha usado específicamente para el control de insectos es el choque térmico con vapor, que consiste en aplicar aire saturado con vapor de agua a temperatura de 40-50 °C en tiempos cortos (3 min). Con ello se consigue la desinfección de los huevos y las larvas de los insectos antes de que el producto pase al mercado. El tratamiento térmico o acondicionamiento con aire caliente (entre 12 y 96 horas a temperaturas comprendidas entre 35 y 46 °C) se desarrolló inicialmente para el control de hongos e insectos y para estudiar las respuestas de los productos a las altas temperaturas. Este tratamiento permite pasar los requisitos de cuarentena en frío (14 días a 1,5 °C) a aquellas variedades sensibles a bajas temperaturas (Lurie, 1998; Schirra *et al.*, 2004; Erkan *et al.*, 2005b). Se ha demostrado que los tratamientos de curado son los más efectivos para un control no contaminante de la podredumbre postcosecha de los frutos cítricos (Plaza *et al.*, 2004). Además, el acondicionamiento a altas temperaturas de frutos cítricos a temperaturas superiores a 30 °C durante 2-3 días (curado térmico) ha demostrado ser un método muy eficaz para inducir tolerancia a las bajas temperaturas de conservación y evitar las lesiones que se producen en esas condiciones (Martínez-Tellez y Lafuente, 1997; Lafuente *et al.*, 2005).

Una variante del acondicionamiento térmico es el conocido como curado intermitente, que consiste en someter los frutos conservados en frío a aumentos periódicos de altas temperaturas durante tiempos cortos. Estos tratamientos deben aplicarse antes de que los DF sean irreversibles, de lo contrario, el incremento de la temperatura en lugar de ser beneficioso, aceleraría la degradación del producto

(García *et al.*, 2004). En frutos cítricos, se ha comprobado que la eficacia de este tipo de tratamiento puede variar con la especie y la variedad, y depende de la interacción tiempo-temperatura (Wang y Baker, 1979). Además, la efectividad del curado intermitente frente al desarrollo del hongo azul (*Penicillium italicum* Wehmer) durante la vida comercial ha sido descrita en frutos de mandarina (Pérez *et al.*, 2007).

El pre-acondicionamiento durante 30 s a 60 °C en pomelos 'Star Ruby', en limas 48 h a 13 °C y en mandarina 'Fortune' 3 días de curado térmico a 37 °C redujo los DF (Porat *et al.*, 2000; Holland *et al.*, 2002; Meléndez-Martínez *et al.*, 2008). En naranja 'Valencia' y mandarina 'Clemenules' también se ha estudiado el efecto de diferentes tratamientos de acondicionamiento térmico, demostrándose la efectividad de los mismos tanto para evitar la aparición de DF como para el control de podredumbres (Erkan *et al.*, 2005a; Erkan *et al.*, 2005b; Nunes *et al.*, 2007). Sin embargo, a estas temperaturas el color de los frutos cítricos se puede ver afectado, produciéndose una pérdida de coloración en la piel, sobretodo en los estadios iniciales de la maduración (Plaza *et al.*, 2004). Como se ha descrito previamente, la coloración de los frutos cítricos durante la maduración natural puede verse seriamente comprometida a temperaturas superiores a 30 °C, ya que, aunque prosigue la degradación de clorofilas, no parece que exista una síntesis activa de carotenoides (Stewart y Wheaton, 1971). En pomelos 'Star Ruby' se realizó un estudio de diferentes tratamientos térmicos, concluyéndose que los frutos sometidos a tratamientos térmicos de mayor duración presentaron mejores parámetros de calidad, mientras que los tratamientos térmicos de corta duración fueron los que mantuvieron una mejor coloración, observándose la mayor pérdida de coloración en los frutos curados (Porat *et al.*, 2000). Resultados similares se obtuvieron en frutos de naranja de la variedad 'Valencia' (Erkan *et al.*, 2005b; Nunes *et al.*, 2007), mientras que en frutos de naranjas sangre (Schirra *et al.*, 2004) y en frutos de mandarina 'Clementina' (Erkan *et al.*, 2005a) no se observaron diferencias significativas en la coloración entre los tratamientos térmicos aplicados. El efecto del curado intermitente aplicado a frutos de naranjas 'Navel' y mandarinas 'Clementinas' no ejerció ningún efecto negativo en la coloración de los frutos (García *et al.*, 2004; Pérez *et al.*, 2007).

Estudios realizados en tomates muestran que, al igual que en cítricos, el acondicionamiento térmico retrasa la coloración del fruto, debido a la inhibición de la acumulación de mRNAs de genes implicados en la maduración, como ocurre con *ACS* (ACC sintasa, enzima implicada en la síntesis de etileno) o *PSY* (Lurie *et al.*,

1996). En cítricos, trabajos realizados en frutos de mandarinas 'Satsuma' almacenadas a 30 °C durante 3 semanas, mostraron un importante retraso en la acumulación de carotenoides, que se correspondió con una disminución de la expresión de los genes de biosíntesis (Matsumoto *et al.*, 2009).

3.2.3. Etileno y la maduración de frutos: implicación en la carotenogénesis

La hormona vegetal etileno está implicada en una gran variedad de procesos que comprenden prácticamente todas las fases del crecimiento, desarrollo y senescencia de las plantas, desde la germinación de las semillas, hasta la maduración de los frutos, la abscisión de diferentes órganos o las respuestas a estreses bióticos y abióticos (Abeles *et al.*, 1992). La implicación de esta hormona en la maduración de los frutos se conoce desde hace siglos, de hecho existen numerosas prácticas ancestrales que afectan la maduración de los mismos, es por ello por lo que se le ha denominado durante décadas como 'la hormona de la maduración' (Abeles *et al.*, 1992). Basándose en la evolución de la producción de etileno y de la tasa respiratoria, la maduración de los frutos se ha clasificado clásicamente en dos grandes categorías: climatérica, aquella en la que los cambios característicos de la maduración están asociados a un importante incremento de la producción de etileno y en la tasa respiratoria, como ocurre en los frutos de manzana, plátano, pera, melocotón, albaricoque, melón, caqui, kiwi o tomate, entre otros. La segunda categoría se denomina no climatérica, y es aquella en la que la producción de etileno y la respiración se mantienen constantes o incluso descienden durante toda la maduración del fruto, e incluyen los frutos cítricos, uvas, fresas, cerezas o sandía (Biale y Young, 1981; Lelievre *et al.*, 1997).

McMurchie *et al.* (1972) propusieron la existencia de dos sistemas operativos responsables de la producción de etileno durante las diferentes fases del crecimiento y desarrollo de la planta, incluyendo la maduración del fruto (revisado en Lelièvre *et al.* (1997)), con el fin de explicar los diferentes tipos de maduración de frutos en función de la capacidad de producir etileno. El sistema I es el responsable de mantener los bajos niveles basales de etileno que se emiten durante el desarrollo normal de las plantas y también en respuesta al estrés. Este sistema es de naturaleza autoinhibitoria y es operativo tanto en los frutos climatéricos como en los no climatéricos. El sistema II es el responsable del incremento de la producción de etileno que se produce durante la maduración de los frutos climatéricos o durante la senescencia floral. Este sistema se activa al inicio de la maduración del fruto y, a diferencia del sistema I, es de tipo

autocatalítico, con capacidad de estimularse a partir de una concentración umbral del propio etileno, lo que garantiza una alta tasa de producción de etileno una vez se ha iniciado el proceso de maduración. Este modelo explica muchos de los efectos del etileno en la maduración de los frutos, tanto climatéricos como no-climatéricos y, desde una perspectiva bioquímica, se ajusta a las pautas de producción de etileno por los frutos. Posteriormente, se ha confirmado mediante la caracterización bioquímica y molecular de la síntesis y percepción del etileno que el modelo propuesto, aunque de forma simplificada, se ajusta con bastante exactitud a los procesos operativos en los frutos (Cara y Giovannoni, 2008).

Debido a la enorme importancia y repercusión comercial del etileno en el control de la maduración del fruto y su comportamiento postcosecha, la ruta de biosíntesis de etileno en las plantas superiores, así como los mecanismos de transducción de la señal se han estudiado en profundidad en las últimas décadas y en la actualidad son probablemente los más conocidos y mejor caracterizados entre los distintos reguladores del desarrollo. Además, la disponibilidad de inhibidores específicos y la utilización de plantas y frutos modelo, como *Arabidopsis* y tomate, han permitido la obtención de gran cantidad de mutantes específicos y la generación de plantas transgénicas afectadas en la síntesis y percepción de etileno, lo que ha posibilitado los importantes avances producidos en este campo y que han sido objeto de numerosas y exhaustivas revisiones (Klee, 1993; Bleecker y Kende, 2000; Barry *et al.*, 2000; Ciardi y Klee, 2001; Giovannoni, 2004; Barry y Giovannoni, 2007; Bartley y Ishida, 2007; Giovannoni, 2007; Lin *et al.*, 2009). En plantas, la biosíntesis de etileno se produce a partir del aminoácido metionina y a través del intermediario S-adenosil-L-metionina (SAM). El SAM es un intermediario común en otras reacciones metabólicas y, por lo tanto, su síntesis no constituye una etapa específica de la síntesis de etileno. La conversión de SAM en el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) está catalizada por la enzima ACC sintasa (ACS) y constituye la primera etapa específica de la ruta y es la limitante de la producción de etileno en la mayoría de procesos del desarrollo. La etapa final de la ruta es la oxidación de ACC en etileno, catalizada por la enzima ACC oxidasa (ACO), que genera además cianhídrico y dióxido de carbono, respectivamente (Yang y Hoffman, 1984; Fluhr y Mattoo, 1996; Giovannoni, 2004). Las dos enzimas implicadas en la síntesis de etileno están codificadas por familias multigénicas que, en el caso de la ACS, está compuesta por un gran número de miembros, en cambio, para la ACO sólo la componen un reducido número de genes. Los estudios realizados en las últimas décadas en numerosas especies y procesos del desarrollo

han permitido concluir que la síntesis de etileno está altamente regulada y coordinada mediante la expresión diferencial de los distintos miembros de las familias de ACS y ACO. De esta forma, la producción de etileno que se produce en los diferentes procesos del desarrollo o frente a distintas situaciones de estrés y en cada uno de los tejidos de la planta es el resultado de la expresión de genes específicos de cada enzima que, además, se pueden regular de forma diferente, lo que asegura una respuesta coordinada, controlada y específica frente a cada situación del desarrollo y frente al estrés (Yang y Hoffman, 1984; Barry *et al.*, 1996; Nakatsuka *et al.*, 1997; Mita *et al.*, 1998; Mita *et al.*, 1999). En el caso de la maduración de los frutos climatéricos, se ha comprobado que durante las etapas iniciales del desarrollo del fruto se expresan varios miembros de genes ACS y ACO, los responsables de la emisión basal de etileno y que parecen estar regulados negativamente por el etileno. Alguno de estos miembros son los que también se inducen por herida. En frutos de tomate se ha comprobado que en el momento de la transición a la maduración algunos mRNA correspondientes a las ACS desaparecen, otros se mantienen y se expresa un nuevo gen (en este caso *LeACS2*) que, además, se estimula por el propio etileno, lo que determina la síntesis autocatalítica de etileno característica de la maduración de los frutos climatéricos (Nakatsuka *et al.*, 1998; Barry *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2009). La inducción específica de un gen ACS que se regula positivamente por etileno, constituye la etapa limitante de la producción de etileno durante la maduración del fruto, en la que se adquiere la competencia a madurar y el etileno dispara los distintos procesos bioquímicos y moleculares que acompañan a la maduración del fruto (Cara y Giovannoni, 2008).

En los frutos no-climatéricos, a pesar de que parecen tener un sistema de producción de etileno similar al de los frutos climatéricos en las primeras etapas del desarrollo del fruto o en respuesta al estrés (que correspondería al Sistema I de McMurchie), el inicio de la maduración no está asociado con cambios en la expresión de genes ACS o ACO y las evidencias indican que el etileno carecen de la capacidad de estimular la expresión de genes ACS (responsable de la autocatálisis, sistema II). En el caso de los frutos cítricos, se han aislado dos genes ACS y uno ACO (Mullins *et al.*, 2000) y se ha comprobado que se expresan de forma diferencial por diferentes estreses bióticos (Marcos *et al.*, 2005) o abióticos (Wong *et al.*, 1999), y que por lo general responden a un control autoinhibitorio (Riov y Yang, 1982; Marcos *et al.*, 2005). El estudio de la expresión de estos genes durante el desarrollo y la maduración del fruto de naranja 'Valencia late' demuestra

la existencia de diferentes sistemas de regulación. Así, los frutos verdes inmaduros presentaron mayor tasa de producción de etileno y expresión de los genes *ACS* y *ACO*. Además, la aplicación de etileno o de análogos, y el tratamiento con inhibidores de la percepción de etileno a frutos en distintos estados de maduración demuestra que la producción de etileno en los estadios tempranos es autocatalítica, seguida posteriormente de la producción autoinhibitoria en frutos maduros (Katz *et al.*, 2004). Posiblemente la síntesis de etileno en los frutos inmaduros está relacionada con los procesos de senescencia y abscisión del fruto que se producen durante la 'caída de junio' (Agustí *et al.*, 2008), mientras que en los frutos maduros la síntesis de etileno responde a mecanismos de regulación 'feedback' negativos, es decir, reprimidos por el propio etileno (Riov y Yang, 1982; Zacarías *et al.*, 2002; Marcos *et al.*, 2005), contrariamente a los frutos de maduración climatérica.

A pesar de que la síntesis y acción del etileno juega un papel determinante en la maduración de los frutos climatéricos, la generación de plantas transgénicas afectadas en la síntesis o percepción del etileno, o la utilización de nuevos inhibidores de la acción de la hormona, como el 1-MCP, ha puesto de manifiesto la existencia de procesos de la maduración dependientes e independientes del etileno y que incluso los procesos dependientes de la hormona pueden estar sometidos a diferentes mecanismos de control y niveles de percepción (Lelievre *et al.*, 1997; Giovannoni, 2001; Adams-Phillips *et al.*, 2004; Giovannoni, 2007; Pech *et al.*, 2008) Así, por ejemplo, en melones transgénicos con reducida producción de etileno por un bloqueo en la actividad *ACO*, se ha comprobado que la coloración de la piel, la respiración, la generación de algunos volátiles, la pérdida de firmeza o la estimulación de la actividad *ACS* son procesos dependientes del etileno, mientras que la coloración de la pulpa, la pérdida de acidez o la acumulación de azúcares son independientes de la hormona (Guis *et al.*, 1997; Pech *et al.*, 2008). Por otro lado, no todos los procesos de la maduración dependientes del etileno lo son en igual medida y existen diferentes niveles umbrales de respuesta a la hormona (Flores *et al.*, 2001). Estudios similares se han realizado en otros frutos como pimientos, albaricoques, ciruelas o tomates (Pretel *et al.*, 1995; Golding *et al.*, 1998; Dong *et al.*, 2002; Cara y Giovannoni, 2008). Este conjunto de evidencias indica que la maduración en los frutos climatéricos es un proceso complejo, altamente regulado en el que existen numerosos mecanismos de control, tanto dependientes como independientes del etileno, lo que demuestra que la hormona

es un regulador esencial, pero no el único, de parte de los procesos fisiológicos que acompañan a la maduración del fruto (Giovannoni, 2007; Pech *et al.*, 2008).

El análisis de la maduración del fruto en plantas transgénicas de tomate en las que ha reducido la producción de etileno por inhibición de la ACS, condujo a la conclusión de que el etileno parece actuar como un reostato más que como un disparador de determinados procesos de la maduración, de forma que se requiere su presencia continua para mantener dichos procesos (Theologis, 1992). Estudios posteriores utilizando el inhibidor de la percepción del etileno 1-MCP han corroborado esta hipótesis, confirmándose que se requiere la percepción continua de la hormona para proseguir los diferentes procesos de la maduración controlados por el etileno, como el ablandamiento o la coloración, tanto a nivel fisiológico como molecular (Hoeberichts *et al.*, 2002; Opiyo y Ying, 2005). Sin embargo, otros resultados indican que los efectos del 1-MCP pueden ser dependientes del estado de maduración del fruto e incluso de la variedad considerada (Guillén *et al.*, 2006)

A pesar de que en los frutos no-climatéricos no existe un aumento de la producción de etileno durante la maduración, las evidencias acumuladas durante años indican que la hormona puede desempeñar un papel más revelante en la maduración del que inicialmente le fue asignado. En frutos de fresa, el uso del detector fotoacústico acoplado a la cromatografía de gases, ha permitido detectar cantidades muy reducidas de etileno, evidenciándose un incremento en la producción de etileno durante la maduración (Iannetta *et al.*, 2006). Además, se observó una correlación entre la expresión de genes *FaACO* y de algunos receptores del etileno con la producción de la hormona, tal y como se observa en frutos climatéricos (Trainotti *et al.*, 2005; Iannetta *et al.*, 2006; Trainotti *et al.*, 2007). Por otro lado, la utilización de 1-MCP en otros frutos no climatéricos como la uva también ha permitido evidenciar la implicación del etileno en algunos procesos de la maduración (Tian *et al.*, 2000; Chervin *et al.*, 2004). Así, por ejemplo, la aplicación de 1-MCP a frutos de uva en campo sugiere que la hormona puede estar implicada en la acumulación de antocianos y en la disminución de la acidez que tiene lugar durante la maduración, tanto a nivel fisiológico como controlando la expresión de genes clave de ambos procesos (Tesniere *et al.*, 2004; Chervin *et al.*, 2004).

Los frutos cítricos se han considerado clásicamente como frutos de maduración no climatérica, que se caracterizan por presentar una tasa de respiración que desciende progresivamente, así como muy bajos niveles de producción de etileno durante la ontogenia y maduración de fruto (Eaks, 1960;

Biale y Young, 1981; Baldwin, 1993). Sin embargo, la aplicación de etileno para acelerar el cambio de color en los frutos cítricos es una práctica ampliamente utilizada en los distintos países productores desde hace muchas décadas (Grierson *et al.*, 1986; Cuquerella *et al.*, 1999). A lo largo de los años se han realizado numerosos trabajos sobre las condiciones óptimas para la desverdización de las diferentes variedades de cítricos, donde se han considerado el tiempo y temperatura de tratamiento con la hormona, concentración, estado de maduración del fruto, así como otras condiciones ambientales (Stewart y Wheaton, 1971; Guillén *et al.*, 2006). Esta práctica comercial se suele aplicar en la mayoría de casos a variedades tempranas, en las que se alcanza la coloración interna del fruto cuando la piel todavía no ha adquirido una coloración adecuada, o también en variedades con dificultades para alcanzar una completa coloración externa (como la mandarina 'Hernandina', por ejemplo). A lo largo de los años, la tendencia tecnológica en la desverdización ha sido hacia la reducción de la dosis y del tiempo de aplicación de etileno, para evitar los efectos deteriorantes que se pueden producir por sobre-exposición al gas, especialmente manchados en la piel o infección por hongos (Lafuente *et al.*, 2003; Marcos *et al.*, 2005). En la actualidad y como consecuencia de la aplicación de la normativa de producción integrada en la Comunidad Valenciana, el tratamiento postcosecha con etileno para la coloración de los frutos cítricos se restringe a un máximo de 60 horas a una concentración de 2 $\mu\text{L} / \text{L}$ (www.agricultura.gva.es), lo que ha motivado que se analicen de nuevo las condiciones más adecuadas de desverdización para las distintas variedades, en especial, el color en el momento de la cosecha para que se alcance con dicho tratamiento un color adecuado para la comercialización (Salvador *et al.*, 2006). Estas evidencias experimentales y tratamientos tecnológicos sugieren que el etileno puede estar implicado o controlar al menos algunos de los procesos que acompañan a la maduración de los frutos cítricos, como el cambio de color, pero los mecanismos por los que se ejerce este papel son todavía desconocido.

Como se ha mencionado anteriormente, la aplicación exógena de etileno acelera la coloración de los frutos como resultado de la estimulación de los dos procesos implicados, la degradación de clorofilas y la acumulación de carotenoides (Stewart y Wheaton, 1972; Stewart y Wheaton, 1973a; Purvis y Barmore, 1981; Goldschmidt *et al.*, 1993). El efecto del etileno en la coloración final del fruto depende del color en el momento de la cosecha (Grierson *et al.*, 1986; Sala *et al.*, 1988; Cuquerella *et al.*, 1999; Porat, 2009). El etileno incrementa la acumulación del transcrito correspondiente al gen de la clorofilasa y también la actividad

enzimática, sin embargo, no parece existir una correlación entre la actividad clorofilasa y la expresión del gen a lo largo de la maduración natural del fruto (Barmore, 1975; Shimokawa *et al.*, 1978; Trebitsh *et al.*, 1993; Jacob-Wilk *et al.*, 1999). Trabajos recientes indican que parece existir una capacidad de degradación de clorofila no unida a la clorofilasa, lo que podría ayudar a explicar los diferentes resultados que se han encontrado en los distintos estudios (Shemer *et al.*, 2008).

Los estudios del efecto del etileno en los cambios cualitativos y cuantitativos de carotenoides han sido más escasos. Trabajos de la década de los 70 indicaban que el efecto promotor del etileno en el cambio de color en tangelos y mandarinas se debe principalmente a la acumulación de carotenoides específicos, como la β -criptoxantina y el apocarotenoide C_{30} β -citaurina, y en menor medida a la violaxantina (Stewart y Wheaton, 1972). En naranjas 'Shamouti' y mandarinas 'Satsuma' se evidenció que el etileno acelera los cambios en carotenoides que tienen lugar durante la maduración natural del fruto y que los mayores efectos del etileno en frutos en estados de maduración más avanzados se podrían deber a la inducción previa del proceso (Eilati *et al.*, 1975; Sonnen, 1977).

El efecto del etileno en la expresión de genes de la biosíntesis de carotenoides se ha estudiado en los últimos años en naranjas 'Navelate' (Rodrigo y Zacarías, 2007) y mandarinas 'Satsuma' (Matsumoto *et al.*, 2009). En ambos estudios, la aplicación de etileno estimuló la expresión de los genes *PSY*, *ZDS* y *β CHX*, promoviendo con ello la acumulación de los carotenoides iniciales de la ruta e incrementando la formación de las β,β -xantofilas. Además, el etileno incrementa de forma continua o transitoria la expresión de los genes *PDS*, *PTOX*, *β LCY* y *ZEP*, mientras que reduce la expresión del gen *ϵ LCY*. La expresión de un nuevo gen *β LCY2*, que parece desempeñar un papel relevante en la activación de la rama β,β de las xantofilas, también se estimuló de forma importante por la aplicación de etileno (Alquézar *et al.*, 2009). Las variaciones en la expresión de los genes de biosíntesis de carotenoides se correlacionaron bastante bien con los cambios en el contenido y composición de carotenoides (Rodrigo y Zacarías, 2007; Matsumoto *et al.*, 2009). Por otro lado, el efecto del etileno en la expresión de los genes puede cambiar con la temperatura de conservación (Matsumoto *et al.*, 2009). Aunque los efectos del etileno pueden diferir en frutos de distintas variedades, la conclusión general es que el tratamiento con la hormona reproduce y acelera los cambios bioquímicos y moleculares implicados en la biosíntesis de carotenoides que ocurren durante la maduración natural de los frutos cítricos. Sin embargo, si estos procesos también responden durante la maduración natural a los bajos niveles de etileno

endógeno que normalmente producen los frutos cítricos y cómo es su modo de acción, son cuestiones aún desconocidas.

Otras evidencias del papel del etileno en la desverdización de los frutos cítricos se desprenden de la utilización de inhibidores de la percepción del etileno. Los diferentes resultados obtenidos hasta la fecha en frutos de distintas variedades de cítricos son, sin embargo, dispares y en ocasiones contradictorios. Los trabajos iniciales en atmósferas hipobáricas, en las que se reduce la concentración de etileno (Apelbaum *et al.*, 1976) o los realizados por Goldschmidt *et al.* (1993), utilizando los inhibidores de la acción del etileno tiosulfato de plata (STS) o norbornadieno (NBD), demostraron un retraso en el cambio de color de los frutos y en los procesos asociados de pérdida de clorofila o acumulación de carotenoides. La aplicación del potente inhibidor competitivo de la percepción del etileno 1-MCP, ha mostrado resultados diversos. Así, en general, retrasa la desverdización en frutos de limas, naranja 'Shamouti' y mandarina 'Clemenules' (Porat *et al.*, 1999; Kluge *et al.*, 2003; Laamim *et al.*, 2005b). La aplicación del inhibidor en limas retrasó la pérdida de la coloración verde (Mullins *et al.*, 2000) y la actividad de la clorofilasa (Win *et al.*, 2006). Sin embargo, los resultados obtenidos en frutos de pomelos fueron contradictorios y, mientras que en el híbrido 'Oroblanco' el inhibidor no afectó la desverdización de los frutos (Porat *et al.*, 2001), otros autores observaron un retraso en la coloración (Mullins *et al.*, 2000; McCollum, 2007). Dou *et al.* (2005) también obtuvieron resultados diferentes por la aplicación del 1-MCP, dependiendo de la concentración y de la variedad. Este conjunto de resultados puede reflejar que, efectivamente, la acción del etileno desempeña un papel importante en el cambio de color, ya que la mayoría de los resultados apuntan en esa dirección y la eliminación de su percepción retrasa la coloración del fruto y los cambios bioquímicos asociados. Sin embargo, también parece existir un momento del desarrollo/maduración del fruto de mayor sensibilidad a la acción de la hormona, que podría justificar en parte la menor respuesta a la acción de inhibidores de la percepción del etileno que se ha observado en determinadas circunstancias.

Otras evidencias experimentales indican que el etileno juega un papel importante en las respuestas de los frutos cítricos a diferentes condiciones adversas, como las que se pueden producir durante la conservación postcosecha. En concreto, en la conservación de frutos de mandarina 'Fortune' a bajas temperaturas se ha comprobado que la aplicación de etileno reduce los síntomas de DF, mientras que la reducción de la percepción de la hormona, por 1-MCP o la

inhibición de su acción, por STS, la aumenta (Lafuente *et al.*, 2001b). De forma similar, las lesiones que se producen en las naranjas 'Navelate' y 'Navelina' a temperatura de no-frío, conocidas como 'colapso de la corteza', también se reducen por la exposición de los frutos a bajas concentraciones de etileno y se aceleran cuando se inhibe la acción de la hormona (Lafuente y Zacarías, 2006; Lafuente *et al.*, 2008). Además, en las naranjas 'Navelate' se han identificado genes implicados en la tolerancia al 'colapso de la corteza' y muchos de ellos se inducían con la hormona y se reprimían por la aplicación de 1-MCP (Establés, 2008). Una respuesta similar también se ha observado en la infección de frutos de naranja por hongos del género *Penicillium* (Marcos *et al.*, 2005). Este conjunto de resultados indica que el etileno es parte de los mecanismos de defensa desarrollados por los frutos cítricos frente a condiciones de estrés y que los bajos niveles de etileno que éstos producen pueden ser necesarios para mantener la operatividad de diferentes procesos de la maduración u otros mecanismos de protección, tal como se ha sugerido previamente (Porat *et al.*, 1999). Asimismo, se ha demostrado que el tratamiento con etileno induce la expresión de mRNAs en el flavedo de naranja que, si bien no son específicos de este tejido, también se expresan durante la maduración natural del fruto (Alonso *et al.*, 1995; Alonso y Granell, 1995). Estos resultados sugirieron que durante la maduración de los frutos cítricos, a pesar de los bajos niveles de etileno que normalmente producen, se pueden producir cambios en la sensibilidad al etileno que serían los responsables de los distintos procesos bioquímicos y moleculares que tienen lugar.

En conjunto, estos resultados indican que el etileno juega un papel importante en los procesos que acompañan a la maduración de los frutos cítricos, al menos en la coloración, a pesar de los bajos niveles que normalmente generan. Sin embargo, el mecanismo de acción y si el etileno actúa como un inductor del proceso o si se requiere su presencia continua para mantener la carotenogénesis en los frutos, al igual que ocurre en otros frutos, aún no se conoce con exactitud, lo que ha constituido uno de los objetivos de esta Tesis.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo ha sido la caracterización fisiológica y molecular de la biosíntesis y acumulación de carotenoides durante la conservación postcosecha de frutos cítricos. Este objetivo general se ha desarrollado en los siguientes objetivos específicos:

1.- Análisis de la evolución del contenido y composición de carotenoides y de la expresión de genes implicados en la biosíntesis de carotenoides en frutos cítricos durante la conservación postcosecha.

2.- Análisis del efecto del acondicionamiento térmico sobre la evolución del contenido y composición de carotenoides, así como sobre la expresión de genes implicados en la biosíntesis de carotenoides en la piel de frutos de mandarinas y naranjas en diferentes estadios de coloración.

3.- Caracterización del papel del etileno endógeno en la regulación de la carotenogénesis de frutos cítricos.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material vegetal

1.1. Frutos cítricos

Para llevar a cabo los diferentes experimentos de esta Tesis Doctoral se han seleccionado distintas variedades de mandarinas y naranjas con diferencias importantes en el contenido y composición de carotenoides en el flavedo y en la pulpa:

a. Naranjas (*Citrus sinensis* L. Osbeck)

En esta Tesis se han utilizado naranjas del grupo 'Navel', que se distinguen por la presencia de un segundo vertilicio carpelar que, al desarrollarse, origina un segundo fruto, que queda incluido en el fruto principal (Agustí, 2000). Las dos variedades utilizadas en este trabajo son:

'Navelina': Variedad originaria de California (EE.UU.), llegó a España en 1933, donde se le asignó el nombre (Agustí, 2000). Produce frutos de tamaño medio de forma redondeada o alargada. En condiciones climáticas mediterráneas presentan un color naranja intenso. Es una variedad temprana, recolectándose entre los meses de octubre y febrero.

'Navelate': Originaria de España, procede de una mutación de 'Washington navel' (Agustí, 2000). Fruto muy similar a los de la variedad parental, de corteza fina y coloración naranja que se inicia por la zona peduncular. Su recolección se inicia en enero y puede ampliarse hasta mayo.

b. Mandarinas e híbridos de mandarinas

'Clemenules': (*C. clementina*) Variedad temprana procedente de una mutación espontánea de mandarina 'Clementina Fina' originada en Nules, Castellón (España) (Agustí, 2000). Frutos de corteza algo rugosa, fácil de pelar, con elevado contenido en zumo y sin semillas. Se recolecta entre los meses de noviembre y enero.

'Fortune': Híbrido de mandarina 'Clementina' (*C. clementina* x *C. reticulata*) obtenido en 1966 en California (EE. UU.) (Agustí, 2000). Produce frutos de tamaño pequeño, de corteza fina y adherida, de color naranja intenso y sensibles a las bajas temperaturas. Su recolección puede comenzar en febrero y prolongarse hasta abril.

1.2. Toma de muestra de material vegetal

De cada una de las especies y variedades descritas en el Apartado 1.1 de Materiales y Métodos, se cosecharon frutos en los estadíos de coloración adecuados para realizar los tratamientos postcosecha (descritos en el Apartado 1.3 de Materiales y Métodos). Para cada variedad se utilizaron un mínimo de 3 árboles, efectuándose la recolección al azar y alrededor del árbol.

En todos los casos, los frutos se recolectaron de árboles adultos injertados sobre un patrón citrange 'Troyer', en plena producción y con unas condiciones de cultivo adecuadas. Los frutos fueron recolectados en dos parcelas comerciales localizadas en el término municipal de Lliria (Valencia).

Los frutos, similares en tamaño, se recolectaron manualmente descartándose aquellos que presentaban daños mecánicos o defectos en la piel. El número de frutos recolectados para el muestreo varió en función de la disponibilidad de los mismos en las parcelas experimentales, adaptándose la toma de muestra en cada punto experimental a un mínimo de 5 frutos. Se separó con un bisturí el flavedo (parte coloreada de la piel) y la pulpa, y se congelaron inmediatamente en N₂ líquido. Posteriormente, se homogeneizaron utilizando un molinillo sin que se descongelaran las muestras y se almacenaron a -80 °C para su posterior análisis.

2. Estimación del índice de color

El color del flavedo se determinó usando un colorímetro Minolta CR-330, realizándose tres lecturas alrededor de la zona ecuatorial de los frutos. Se midieron las coordenadas Hunter ' *a* ' y ' *b* '. La coordenada denominada ' *a* ' (croma) representa los cambios en el color desde verde (valores negativos) a rojo (valores positivos) y, la coordenada denominada ' *b* ' (tono) representa los cambios en el color desde azul (valores negativos) a amarillo (valores positivos). El color se expresó como la relación de las coordenadas Hunter ' *a* ' y ' *b* ', donde valores negativos corresponden a coloración verde, próximos a cero a amarillo, y positivos a naranja (Stewart y Wheaton, 1972).

3. Tratamientos de los frutos

De los frutos recolectados, previa a la separación en lotes, se escogieron al azar unos 8-10 frutos, que se denominaron tiempo cero o inicial. El resto de frutos fueron divididos en lotes y sometidos a diferentes tratamientos postcosecha que se realizaron en cámaras termostataadas equipadas con sistemas automáticos de

control de temperatura y humedad relativa (HR). La HR en todos los tratamientos fue de 90-95%.

3.1. Conservación refrigerada

Para los tratamientos de conservación refrigerada se utilizaron frutos de las variedades de naranja 'Navelate' y 'Navelina' y frutos de mandarina 'Clemenules' en diferentes estadios de coloración (**Tabla 1**). Los frutos recolectados de cada variedad se dividieron en tres lotes, de los cuales uno de ellos se mantuvo durante 14 días a 20 °C (tratamiento control). Los lotes restantes se almacenaron durante un periodo comprendido entre 7 y 9 semanas a 12 °C (Temperatura de no DF) y a 2 °C (temperatura de DF), respectivamente. A lo largo del periodo de almacenamiento se tomaron muestras de la piel de 5-6 frutos cada semana para su posterior análisis y de la pulpa en determinados experimentos.

Tabla 1. Estadios de coloración de los frutos de las variedades de naranjas y mandarina utilizados en los tratamientos de conservación refrigerada.

| | Variedad | | |
|---|-------------|--------------|--------------|
| | 'Navelate' | 'Navelina' | 'Clemenules' |
| Color externo inicial (Hunter a/b) | | -0,11 ± 0,02 | |
| | | | -0,19 ± 0,03 |
| | 0,26 ± 0,02 | -0,08 ± 0,04 | |
| | | 0,44 ± 0,01 | |
| | | 0,95 ± 0,02 | 0,00 ± 0,02 |

3.2. Conservación refrigerada y tratamiento con 1-MCP

Los frutos de mandarina 'Clemenules' con $a/b \approx 0$ (**Tabla 1**), se dividieron en dos grupos, el primero de ellos se mantuvo como frutos control en aire durante 24 h, mientras que los frutos del segundo grupo se trataron durante 16 h con 1 μ L / L del inhibidor de etileno 1-metilciclopropeno (1-MCP) (Rohn and Haas, Italia S.R.L.). Tras las 24 h de incubación, cada uno de los grupos se almacenó a 12 °C durante 7 semanas. A lo largo del periodo de almacenamiento se tomaron muestras de la piel y de la pulpa de 5-6 frutos cada semana para su posterior análisis. Para garantizar el efecto inhibitorio del 1-MCP, éste se aplicó al inicio y a

los 6 días del periodo de conservación y en desecadores herméticamente cerrados (**Figura 5**).



Figura 5. Frutos en cámara tratados con 1-MCP. Se muestra en la figura un desecador de 25 L utilizado para la aplicación tanto de 1-MCP como de etileno.

3.3. Tratamiento de curado térmico y aplicación de etileno

Para estudiar el efecto del acondicionamiento térmico se utilizaron frutos de naranja de la variedad 'Navelina' y frutos del híbrido de mandarina 'Fortune' en tres estadios de coloración diferentes: frutos virando, frutos coloreados y frutos totalmente coloreados (**Tabla 2**).

Tabla 2. Estadios de coloración de los frutos del híbrido de mandarina 'Fortune' y naranja 'Navelina' sometidos a los tratamientos de acondicionamiento térmico.

| | Variedad | |
|---|--------------|-------------|
| | 'Navelina' | 'Fortune' |
| Color externo inicial (Hunter a/b) | -0,08 ± 0,04 | 0,15 ± 0,03 |
| | 0,59 ± 0,03 | 0,55 ± 0,03 |
| | | 0,75 ± 0,04 |
| | 0,95 ± 0,02 | 1,13 ± 0,02 |

Los frutos recolectados de cada una de las variedades y en cada uno de los estadios de coloración se dividieron en dos grupos que se almacenaron durante 3 días a 20 °C, como tratamiento control, ó a 37 °C (frutos curados) como

tratamiento de acondicionamiento térmico. Tras este periodo de almacenamiento los frutos curados se transfirieron a 20 °C, junto con los frutos control, y cada grupo se dividió en dos lotes cada uno. Uno de los lotes se mantuvo en aire durante 4 días, mientras que el otro se trató con 10 µL / L de etileno durante el mismo periodo de tiempo (**Figura 6**). El tratamiento con etileno se realizó en desecadores de vidrio de 25 L herméticamente cerrados en presencia de Ca(OH)₂ para evitar la acumulación de CO₂ procedente de la respiración de los frutos (**Figura 5**).

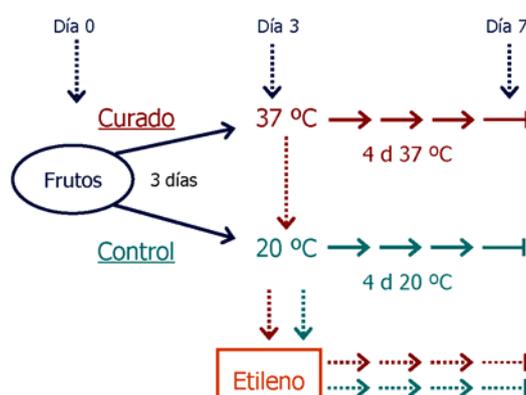


Figura 6. Esquema del tratamiento térmico aplicado a frutos de mandarina 'Fortune' y naranja 'Navelina' y posterior tratamiento con etileno (10 µL / L). El tratamiento se realizó en cámaras al 90-95% de HR. Las flechas continuas representan los frutos que permanecieron en aire y las flechas punteadas los que se mantuvieron en atmósfera de etileno. Se muestran los días de recogida de muestras.

Para el estudio del efecto del curado térmico en la pulpa, se tomaron frutos del híbrido de mandarina 'Fortune' con estadio inicial de coloración externa de $0,75 \pm 0,04$ (estadio en el que se suelen recolectar para su consumo en fresco). Estos frutos fueron sometidos a un tratamiento similar al descrito previamente (**Figura 6**), además, se mantuvieron frutos a 20 y a 37 °C durante 7 días, tras los cuales se tomaron muestras para su posterior análisis.

3.4. Tratamientos con etileno y con 1-MCP

Con el fin de estudiar el efecto del etileno endógeno en la biosíntesis de carotenoides se utilizó un inhibidor de los receptores de la hormona (1-MCP) (Rohn and Haas, Italia S.R.L.). Para cada uno de los experimentos diseñados, se calculó la cantidad de 1-MCP necesaria para obtener la concentración final deseada y se preparó según las instrucciones del fabricante. Se utilizaron frutos de las

variedades de mandarina 'Clemenules' y 'Fortune' en diferentes estadios de coloración (**Tabla 3**).

Tabla 3. Estadios de coloración de los frutos de mandarina 'Fortune' y 'Clemenules' utilizados para los distintos tratamientos con 1-MCP en postcosecha y en campo.

| Color externo inicial (Hunter a/b) | Variedad | | | |
|------------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | 'Fortune' | | 'Clemenules' | |
| | Poscosecha | Campo | Poscosecha | Campo |
| | -0,38 ± 0,01 | -0,44 ± 0,02 | -0,41 ± 0,01 | |
| | | -0,28 ± 0,04 | | |
| | -0,11 ± 0,01 | | -0,10 ± 0,01 | -0,35 ± 0,01 |
| | | -0,02 ± 0,02 | | |
| | 0,26 ± 0,01 | 0,24 ± 0,03 | 0,27 ± 0,01 | |
| | Poscosecha | Campo | Poscosecha | Campo |

El tratamiento con 1-MCP se realizó durante la postcosecha de los frutos y durante la desverdización natural de los frutos en el campo. Los frutos se trataron dos veces con 1-MCP durante 16 y 24 h, en postcosecha y en campo, respectivamente (**Figura 7**), con el fin de garantizar efectividad del inhibidor. Se tomó muestra a lo largo de los 14 días de tratamiento para su posterior análisis.

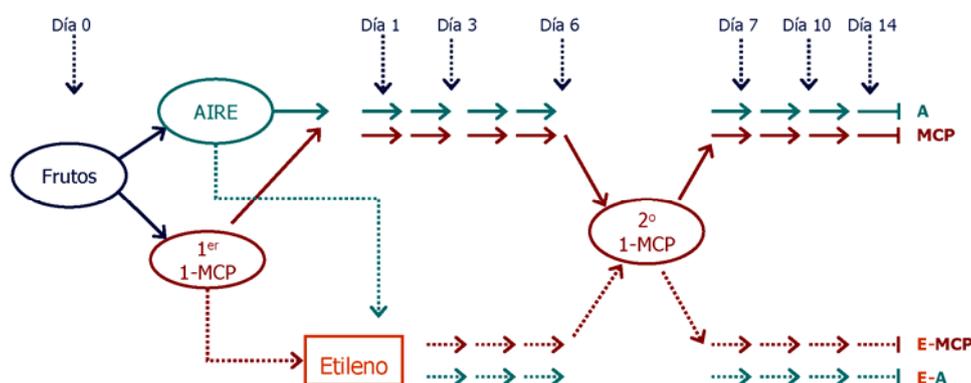


Figura 7. Esquema general de los tratamientos con 1-MCP en postcosecha y en campo. Las muestras en atmósfera de etileno (2 µL / L), se indican con flechas punteadas.

a. Tratamiento postcosecha

Para el estudio del efecto del 1-MCP durante la postcosecha, se tomaron frutos de mandarinas 'Clemenules' y 'Fortune' en tres estadios de coloración diferentes (**Tabla 3**). Para cada uno de los estadios, los frutos se dividieron en dos lotes, uno se incubó durante 16 h con 1 μL / L de 1-MCP en desecadores de 25 L (**Figura 5**), mientras que el otro se mantuvo en aire. La segunda aplicación del inhibidor se realizó al sexto día del inicio del experimento. Tras el periodo de incubación cada uno de los lotes se dividió en dos grupos, uno se mantuvo en aire y el otro se trató con etileno 2 μL / L durante 14 días (**Figura 7**). Todo el tratamiento se llevó a cabo en cámaras termostatadas a 20 °C y al 90-95% HR. A lo largo de todo el tratamiento se tomaron muestras de 5-6 frutos para su posterior análisis (Apartado 1.2 de Material y Métodos).

b. Tratamiento en campo

Con el fin de estudiar el efecto del 1-MCP en la maduración del fruto en el árbol se escogieron frutos de mandarinas de las variedades 'Clemenules' y 'Fortune' de un mínimo de tres árboles distintos. Los frutos se eligieron por parejas y, tras determinar su índice de coloración (**Tabla 3**), se etiquetaron frutos con un cociente *a/b* similar, dejando un fruto de cada pareja como control y siendo el otro tratado con una concentración inicial de 8 μL / L de 1-MCP durante 24 h. Previamente, el 1-MCP se pesó para obtener la concentración final deseada en tubos Vacutainer y se preparó un tubo con el inhibidor por cada tres inyecciones. Una vez pesado el 1-MCP, los tubos se cerraron herméticamente con un tapón de goma para, posteriormente, en el momento de la inyección, añadir el agua. Para la aplicación de 1-MCP los frutos se cerraron herméticamente con bolsas de plástico (con un volumen aproximado de 250 mL) (**Figura 8**) a la que se le colocó un septum de goma para inyectar el inhibidor y evitar pérdidas posteriores (Chervin *et al.*, 2004). Tras 24 h de incubación se quitaron las bolsas a los frutos y, con el fin de corroborar que el tratamiento con el inhibidor en campo fue efectivo, se recolectaron 8 parejas de frutos (control y tratados) que se trataron con 2 μL / L de etileno en cámaras termostatadas a 20 °C y a 90-95% HR. De la misma forma, a los 7 días después del primer tratamiento con 1-MCP en campo, se realizó una segunda aplicación de 1-MCP durante 24 h, y se volvió a comprobar mediante tratamiento postcosecha con etileno la efectividad del tratamiento con 1-MCP (**Figura 5**). A intervalos periódicos durante todo el tratamiento se tomaron muestras de 5 parejas de frutos para su posterior análisis (Apartado 1.2 de Materiales y Métodos)



Figura 8. Pareja de frutos en campo: fruto control etiquetado junto al fruto tratado con 1-MCP.

4. Determinación del índice de madurez

Para determinar el índice de madurez, se exprimieron los frutos con un exprimidor rotatorio y el zumo se filtró a través de un tamiz. El contenido en sólidos solubles totales, expresado como °Brix, se determinó depositando una alícuota del zumo en un refractómetro digital (Atago). La acidez del zumo se valoró titulando 5 mL de zumo con NaOH 0,1 N, utilizando fenolftaleína como indicador y expresando la acidez como porcentaje de ácido cítrico. El índice de madurez se calculó como el cociente entre el contenido en sólidos solubles totales y el porcentaje de acidez.

5. Determinación de etileno por cromatografía de gases

Con objeto de determinar el etileno emitido por los frutos, se cerraron herméticamente 4 frutos en frascos de 5 L durante 3 h. En general, se realizaron 3 réplicas con 4 frutos cada una y, en todos los casos, la incubación se llevó a cabo a la misma temperatura a la que estaban almacenados los frutos durante el experimento (12 °C). El análisis del etileno emitido por los frutos se llevó a cabo tal y como se describe en Alferez *et al.* (2003). Una vez transcurrido el periodo de incubación, se extrajo 1 mL del espacio de cabeza de cada uno de los frascos con una jeringuilla hipodérmica a través de un septum de silicona inserto en su tapa. La concentración de etileno se analizó inyectando la muestra en un cromatógrafo de gases AutoSystem (Perkin-Elmer) equipado con una columna de alúmina activa de 1 m x 2,6 mm (Supelco) y un detector de ionización de llama (FID). Las condiciones empleadas para la cromatografía fueron las siguientes: la temperatura del inyector fue de 160 °C, la de la columna de 140 °C y la del detector de

180 °C. La temperatura de la columna fue constante y el flujo del helio (gas portador) fue de 30 mL / min. Se determinó la concentración de etileno en las muestras a partir del área del pico por referencia a un patrón formado por una mezcla de gases de concentración conocida (1 µL / L). Los datos de producción de etileno se expresan como nL de etileno / g PF h.

6. Extracción y cuantificación de pigmentos

La extracción y cuantificación de clorofilas y carotenoides se llevó a cabo a partir de 0,5 g de flavedo ó 1,5 g de pulpa, siguiendo el método descrito por Rodrigo *et al.* (2003; 2004). El material vegetal, previamente congelado y triturado, se introdujo en tubos de cristal Pyrex con tapón de rosca y se mantuvo en hielo hasta la adición de 2 mL de metanol (pureza HPLC, Carlo Erba), 1,5 mL de Tris-HCl (50 mM, pH 7,5) y NaCl 1M, homogenizándose la mezcla en el vórtex durante 1 min y en agitación magnética a 4 °C durante 5 min. Seguidamente, se añadieron 3 mL de cloroformo (Panreac), se volvió a homogeneizar en el vórtex y se agitó a 4 °C durante 5 min. Posteriormente, se centrifugó a 450 g durante 5 min a 4 °C y se recuperó la fase orgánica en un matraz de fondo redondo. Se adicionaron de nuevo 3 mL de cloroformo y se repitió el proceso de extracción hasta que la fase orgánica fue incolora. El combinado de las fases orgánicas que contiene las clorofilas y los carotenoides se evaporó completamente a 40 °C en evaporador rotatorio (Buchi). El residuo seco se resuspendió en 450 µL de acetona (pureza HPLC, Romil) y se añadieron 6,3 mL de Solución A (éter de petróleo (40-60 °C): éter etílico, 9:1, v/v). La concentración de clorofila *a* y *b* se determinó midiendo la absorbancia de este extracto a 644 y 662 nm, en un espectrofotómetro (Multiskan Spectrum, Thermo Electron Corporation) y aplicando las fórmulas de Smith y Benítez (1955):

$$\text{Clorofila a} = 10.050 \cdot A_{662} - 0.766 \cdot A_{644}$$

$$\text{Clorofila b} = 16,370 \cdot A_{644} - 3,140 \cdot A_{662}$$

Una vez determinadas las clorofilas, las muestras se secaron completamente a 40 °C en evaporador rotatorio y se saponificaron mediante la adición de 3,6 mL de metanol (pureza HPLC) y 400 µL de KOH al 60% (p/v), dejando reposar la muestra durante una noche a temperatura ambiente, en oscuridad y en atmósfera de nitrógeno. Los carotenoides se recuperaron mediante cinco lavados sucesivos, con 2 mL de agua bidestilada, con 2 mL de Solución A, 1 mL de cloroformo, y dos últimos lavados con 2 mL de Solución A, recuperando todos los lavados en un mismo tubo tipo Sarsted de 15 mL con tapón de rosca. Tras homogeneizar la muestra se dejó reposar durante 5 min a temperatura

ambiente para que las fases se separaran, y se recuperó la fase etérea superior pasándola a un nuevo tubo tipo Sarsted de 15 mL con tapón de rosca. Se añadieron de nuevo 2 mL de Solución A y se repitió el proceso de extracción hasta que la fase superior resultó incolora. El conjunto de las fases etéreas se llevaron a un volumen conocido mediante la adición de Solución A y se determinó la concentración de carotenoides midiendo la absorbancia entre 270 y 600 nm en un espectrofotómetro Multiskan Spectrum, (Thermo Electron Corporation) y registrando la absorbancia a 450 nm y a todos los máximos de espectro, así como en la línea base. La concentración de carotenoides se calculó aplicando la fórmula de Davies (1976) y expresando el resultado como μg de β -caroteno por gramo de peso fresco de tejido:

$$\text{g de carotenoides } (\beta\text{-caroteno}) = (E \cdot y) / (E^{1\%}_{1\text{ cm}} \cdot 1000)$$

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

El extracto se llevó a sequedad mediante corriente de nitrógeno, con el fin de precipitar los ácidos grasos copurificados con los carotenoides. El extracto se resuspendió en 1 mL de acetona, se transfirió a un tubo Eppendorf y se incubó durante la noche a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tras centrifugar a 11400 g durante 15 min. a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf y se llevó a sequedad en corriente de nitrógeno. Las muestras se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en oscuridad y atmósfera de nitrógeno hasta el momento de su análisis.

El extracto seco de carotenoides se disolvió en una mezcla 1:1 (v:v) de metanol:acetona (2:1, v:v; ambos de pureza HPLC) y cloroformo (pureza HPLC, Merck). El volumen de las muestras se ajustó a 75 μL para las muestras de tejidos con un bajo contenido de carotenoides totales (frutos virando, $< 80\text{ }\mu\text{g} / \text{g PF}$), entre 100 y 200 μL para aquellas muestras de tejidos con un contenido medio (frutos coloreados, entre 80 y 95 $\mu\text{g} / \text{g PF}$) y entre 200 y 350 μL para aquellas con un alto contenido (frutos muy coloreados, $> 95\text{ }\mu\text{g} / \text{g PF}$).

Durante todo el procedimiento de extracción y posterior preparación de las muestras se tuvo especial atención en evitar la exposición a la luz de las muestras, trabajando en condiciones de baja luminosidad, con el fin de evitar la fotodegradación, isomerización y posibles cambios estructurales de los carotenoides. Todas las muestras fueron extraídas un mínimo de dos veces.

7. Identificación y cuantificación de carotenoides mediante HPLC-PDA

La determinación de los carotenoides individuales se realizó por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de fotodiodos (HPLC-PDA). La separación de carotenoides individuales se llevó a cabo en un sistema de cromatografía líquida Waters, equipado con una bomba 600E, con un detector de fotodiodos modelo 996 y con el programa informático Empower Software (Waters, Barcelona, España) para el registro y análisis. Se utilizó una columna de fase reversa C₃₀ (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) acoplada a una precolumna C₃₀ (20 mm x 4,0 mm, 5 µm) (YMC Europa GMBH, Schermbeck, Alemania). Se empleó un gradiente de elución ternario con metanol, agua y metil tert-butil éter (MTBE), descrito en trabajos anteriores (Britton, 1995; Rodrigo y Zacarías, 2003). Dicho gradiente se detalla en la **Tabla 4**.

El detector de fotodiodos se programó para escanear la absorbancia de la muestra cada 1 nm desde 250 nm hasta 540 nm a lo largo de toda la elución. El volumen de muestra inyectada fue de 20 µL, el flujo de la fase móvil fue de 1 mL / min y la temperatura de 25 °C.

Tabla 4. Gradiente de elución utilizado para la separación de carotenoides mediante HPLC. Los cambios de gradiente se realizaron de forma lineal.

| Tiempo (min) | 0 | 12 | 20 | 30 | 50 | 62 |
|------------------|----|----|----|----|----|----|
| MTBE | 5 | 5 | 14 | 25 | 50 | 5 |
| H ₂ O | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 |
| MeOH | 90 | 95 | 86 | 75 | 50 | 90 |

Los carotenoides se identificaron por comparación del espectro y del tiempo de retención con los estándares disponibles o con los datos de espectros y tiempos de retención en las mismas condiciones cromatográficas descritos en la literatura (Rouseff *et al.*, 1996; Meléndez-Martínez *et al.*, 2003; Rodrigo *et al.*, 2004). Además para la identificación se utilizó también la notación numérica (%III/II) (**Tabla 5**), la cual describe el porcentaje del cociente entre la altura del pico de máxima longitud de onda (banda III) y la altura del pico medio (II) (Britton, 1995).

Tabla 5. Características espectroscópicas de los carotenoides más relevantes identificados a lo largo de esta Tesis.

| Carotenoide | Observado | | Literatura | | Referencias |
|----------------------------|------------------------------------|----------|------------------------------------|----------|----------------|
| | λ_{\max} (nm) ^a | % III/II | λ_{\max} (nm) ^a | % III/II | |
| <i>all-E</i> -violaxantina | 411,437,468 | 92 | 416,438,467 | 87 | Britton, 1995 |
| β -Citaurina | 458 | 0 | 456 | 0 | Malachi, 1974 |
| (<i>9Z</i>)-Violaxantina | <i>cis</i> 326,410,434,463 | 95 | <i>cis</i> 326,416,440,465 | 98 | Britton, 1995 |
| Luteína | 418,444,472 | 65 | 421,445,474 | 60 | Britton, 1995 |
| Zeaxantina | 430,450,478 | 35 | 428,450,478 | 26 | Britton, 1995 |
| Anteraxantina ^c | 440,467 | 58 | 422,444,472 | 55 | Britton, 1995 |
| Mutatoxantina ^c | 424,448 | 74 | 409,427,457 | 50 | Britton, 1995 |
| α -Criptoxantina | 419,445,473 | 72 | 421,445,475 | 60 | Britton, 1995 |
| Fitoeno | 273,285,300 | 10 | 276,286,297 | 10 | Britton, 1995 |
| Fitoflueno | 331,346,364 | 91 | 331,348,367 | 90 | Britton, 1995 |
| β -Criptoxantina | 423,450,479 | 30 | 428,450,478 | 27 | Britton, 1995 |
| β -Caroteno | 426,451,478 | 31 | 425,450,477 | 25 | Britton, 1995 |
| α -Caroteno | <i>cis</i> 295,376,397,423 | 75 | <i>cis</i> 296,374,395,419 | 71 | Cunnigham,1985 |
| ζ -Caroteno | <i>cis</i> 295,376,397,423 | 75 | <i>cis</i> 296,374,395,419 | 71 | Cunnigham,1985 |

^a Longitud de onda máxima^b % III/II de cada carotenoide, establecido por Britton *et al.* (1995)^c Identificado de forma tentativa

Para cada inyección se obtuvo un cromatograma 'Maxplot' que representa el tiempo frente a la absorbancia máxima en el rango de longitudes de ondas registradas. Los picos cromatográficos correspondientes a cada carotenoide se integraron en su longitud de onda máxima y su contenido se calculó utilizando diferentes curvas de calibrado. Se prepararon curvas de calibrado para la luteína (Sigma), el β -caroteno (Sigma), la β -criptoxantina (Extrasynthese), el β -apo-8'-carotenal (Hoffman-LaRoche), el fitoeno y el fitoflueno (ambos purificados previamente como se describe en Pascual *et al.* (1993) y la zeaxantina (Extrasynthese). La cuantificación de *trans*- y *cis*-violaxantina se llevó a cabo utilizando la curva de calibrado de la luteína, ya que ambos presentan un coeficiente de absorción muy similar (Britton *et al.*, 1998), de la misma forma se usó la curva de calibrado del β -caroteno para cuantificar α -caroteno, la de β -criptoxantina para la cuantificación de la mutatoxantina, la de zeaxantina para la anteraxantina y la curva de β -apo-8'-carotenal para el apocarotenoide C₃₀ β -citaurina. En la **Tabla 6** se indican las ecuaciones de las rectas de calibrado obtenidas para cada compuesto y el límite de detección en el sistema cromatográfico utilizado.

Tabla 6. Límite de detección y ecuaciones de las rectas obtenidas para la cuantificación de distintos carotenoides.

| Carotenoide | Límite de detección | Recta de calibrado | |
|---------------------------|---------------------|--|--------------|
| Fitoeno | 20 ng | $\mu\text{g} = 3.73158 \cdot 10^{-7} \text{ Area}$ | $r^2=0.9944$ |
| Fitoflueno | 8 ng | $\mu\text{g} = 1.79116 \cdot 10^{-7} \text{ Area}$ | $r^2=0.9944$ |
| β -caroteno | 9 ng | $\mu\text{g} = 8.34097 \cdot 10^{-8} \text{ Area}$ | $r^2=0.9922$ |
| B-criptoxantina | 11 ng | $\mu\text{g} = 1.21613 \cdot 10^{-7} \text{ Area}$ | $r^2=0.9866$ |
| β -apo-8'-carotenal | 32 ng | $\mu\text{g} = 3.24695 \cdot 10^{-8} \text{ Area}$ | $r^2=0.9370$ |
| Luteína | 7 ng | $\mu\text{g} = 8.24810 \cdot 10^{-8} \text{ Area}$ | $r^2=0.9900$ |
| Zeaxantina | 10 ng | $\mu\text{g} = 1.13798 \cdot 10^{-7} \text{ Area}$ | $r^2=0.9811$ |

Cada extracción, inyección y análisis de las muestras se hizo al menos por duplicado. La manipulación de las muestras se realizó en condiciones de baja luminosidad para evitar la foto-oxidación e isomerización de los carotenoides.

8. Extracción y purificación de RNA total

Para la extracción de RNA se pesaron 2 g de tejido (flavado o pulpa), congelados a -80 °C en nitrógeno líquido y triturado finalmente en molinillo, en un tubo de 50 mL. El tejido se mezcló con 5 volúmenes (mL / g PF) de tampón de extracción [Tris-HCl 200mM (pH 8.0), NaCl 400mM, EDTA 50mM (pH 8,8), Sarkosyl 2% (p/v), polivinil pirrolidona 40 (PVP-40) 1% (p/v), β -mercaptoetanol 1% (v/v)] y 2,5 volúmenes (mL / g PF) de fenol equilibrado con Tris-HCl. Tras incubar durante 15 min a 65 °C, se dejó enfriar en hielo y se añadieron 2,5 volúmenes (mL / g PF) de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1; v/v). Los restos vegetales fueron eliminados por centrifugación durante 20 min a 4000 g a 4 °C y el sobrenadante se reextrajo con 1 volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1; v/v/v). Tras centrifugar a 4 °C durante 20 min a 4000 g se recuperó la fase superior y se precipitaron los ácidos nucleicos con 1,5 volúmenes de etanol 100% (v/v) frío. Inmediatamente se centrifugó a 4 °C durante 20 min a 26900 g, y se lavó el precipitado con 5 mL de etanol al 70% (v/v). El sedimento se resuspendió en 7,5 mL de TESa (Tris-HCl 10 mM (pH 8.0); Na₂EDTA 5 mM; Sarkosyl 0.1% (p/v)) calentando a 65 °C durante 15 min. A continuación se añadieron 7,5 mL de agua mili-Q estéril y 5 mL de LiCl 12 M. Después de incubar durante 16 h a 4 °C se centrifugó a 26900 g durante 1 h. El RNA precipitado se

lavó con 1,5 mL de etanol 70% (v/v) frío y se resuspendió en 1 mL de acetato sódico 3 M (pH 6.0). Tras centrifugar a 11400 g durante 5 min a temperatura ambiente se realizó un lavado con etanol 70% (v/v) frío. Se centrifugó a temperatura ambiente a 11400 g 5 min y se resuspendió el sedimento en 50 μ L de agua mili-Q estéril. La concentración y la calidad del RNA se determinó espectrofotométricamente mediante el detector MultiScan Spectrum (Thermo Electrón Corporation) midiendo la absorbancia a 230, 260, 280 y 320 nm. Se verificó su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) con bromuro de etidio.

9. RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR) a tiempo real

9.1. Diseño de cebadores para la RT-qPCR a tiempo real

El diseño de los cebadores se llevó a cabo utilizando el programa DNAMAN (Versión 4.03, Lynnon BioSoft). Se realizó a partir de la secuencia parcial o completa de las secuencias codificantes de *Citrus* aisladas de frutos, según su disponibilidad en la base de datos o en nuestro laboratorio (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=pubmed>). Se estableció una longitud entre 15-20 pares de bases (pb) para los cebadores y de un máximo de aproximadamente 200 pb para el amplicón, así como un porcentaje mínimo de GC del 50% y una temperatura de fusión próxima a 62 °C. Las secuencias de los cebadores utilizados y la longitud de la secuencia amplificada se muestran en la **Tabla 7**.

9.2. Análisis de expresión mediante RT-qPCR a tiempo real

a. Curvas de calibrado

Con el fin de analizar la expresión de diferentes genes de la ruta biosintética de carotenoides se cuantificó la expresión por RT-qPCR a tiempo real. Para convertir las medidas de intensidad de fluorescencia en número de copias de mRNA, se utilizaron curvas estándar para cada gen. Para la preparación de las curvas de calibrado, se amplificó mediante PCR una secuencia parcial del gen de *PSY* y cDNA completos de β *LCYs* y β *CHX*. La concentración de los productos amplificados se determinó midiendo su absorbancia a 230, 260, 320 y 380 nm en un espectrofotómetro (Multiskan Spectrum, Thermo Electron Corporation). Posteriormente se realizaron diluciones seriadas (1:10) para cada uno de los genes que se utilizaron como curvas estándar, representando la concentración final del cDNA del gen correspondiente frente al número de ciclos necesarios para obtener

señal de fluorescencia (Cp). Los valores de cada una de las curvas son la media de al menos 3 análisis independientes. La normalización de los datos adquiridos se realizó frente a la concentración de RNA total, medida en un ensayo fluorimétrico con RiboGreen (Molecular Probes) y no frente a la abundancia de rRNA 18S, dada la limitación técnica descrita previamente (Bustin, 2002; Hashimoto *et al.*, 2004).

b. Reacción de RT-qPCR a tiempo real

La concentración de RNA de las muestras analizadas se determinó mediante ensayos fluorimétricos con el kit 'RiboGreen RNA Quantification Kit' (Molecular Probes) y con el fluorímetro (Fluorescan Ascent FL, Labsystems). El análisis de expresión de los genes se realizó mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real en un solo paso, con un termociclador LightCycler 2.0 de Roche (Penzberg, Alemania) y el software LightCycler versión 4.0. para el registro de los datos. En cada reacción se utilizó 100 ng de RNA total de cada muestra y cebadores específicos para cada gen en una concentración optimizada (**Tabla 7**). El volumen total de la reacción fue de 10 μL y consistió en 2 μL de muestra; 4,9 μL de agua; 2 μL de Master Mix (LC FastStar DNA MasterPLUS SYBER Green I, Roche); 0,5 μL de cada uno de los cebadores; 0,05 μL de RNase Inhibitor (40 U/ μL ; Applied Biosystems) y 0,05 μL de transcriptasa reversa 'MultiScribe Reverse Transcriptase' (50 U / μL ; Applied Biosystem).

Las condiciones de reacción fueron 48 °C 30 min (retrotranscripción), 95 °C 10 min (desnaturalización), 35 ciclos de amplificación a 95/T/72 °C durante 10/5/10 s, respectivamente, siendo T una temperatura específica de hibridación para cada gen (**Tabla 7**). Los valores de intensidad de la fluorescencia fueron adquiridos durante los pasos de extensión a 72 °C. La especificidad de la reacción se comprobó mediante el análisis de las curvas de disociación. Para la normalización de los datos obtenidos se utilizaron las curvas de calibrado detalladas previamente.

Tabla 7. Relación de cebadores utilizados en la amplificación por RT-qPCR a tiempo real. S, sentido; AS, antisentido.

| Gen | Nº Acc. | Cebador | | | T. H. ^a (°C) | Conc. Cebador (µM) ^b | Amplión (bp) |
|--------------|----------|---------|------------------------------|-------------|----------------------------|---------------------------------------|-----------------|
| | | Nombre | Secuencia | Orientación | | | |
| <i>PSY</i> | AY204550 | MJ134 | 5'-GGTCGTCCATTTGATATGCTTG-3' | S | 64 | 0,25 | 157 |
| | | MJ135 | 5'-CCTAAGGTCCATCCTCATTCT-3' | AS | 66 | | |
| <i>βLCY1</i> | AY094582 | MJ136 | 5'-GAACCAGGAGCTTAGGTCTG-3' | S | 62 | 0,5 | 174 |
| | | MJ137 | 5'-GCTAGGTCTACAACAAGGCC-3' | AS | 62 | | |
| <i>βLCY2</i> | AF169241 | MJ130 | 5'-CCCTATTTCCATTAGGCCGC-3' | S | 62 | 0,5 | 158 |
| | | MJ138 | 5'-CACGTCATATCGAATACGATC-3' | AS | 60 | | |
| <i>βCHX</i> | DQ228870 | MJ126 | 5'-GGCTCATAAAGCTCTGTGGC-3' | S | 62 | 0,15 | 184 |
| | | MJ127 | 5'-CCAGCACCAAAACAGAGACC-3' | AS | 62 | | |

^a Temperatura de hibridación^b Concentración final optimizada de cada cebador

10. Análisis del proteoma mediante electroforesis bidimensional

10.1. Diseño experimental

El análisis del proteoma se llevó a cabo en la piel y pulpa de frutos de naranja 'Navelina' con un color externo inicial de $a/b = -0,11 \pm 0,02$ recién cosechados, y tras un almacenamiento de 21 días a 2 y 12 °C. Para el estudio proteómico de cada una de las tres muestras de piel y pulpa seleccionadas se realizaron tres extracciones independientes, y dos geles de cada una de las extracciones.

10.2. Extracción de proteínas totales

Las extracciones de proteínas se realizaron a partir de 2,5 g de flavedo y de 3 g de pulpa finamente triturado y almacenado a -80 °C. El tejido se resuspendió con 7,5 mL de tampón de extracción (PVPP 1%; sacarosa 0,7 M; PMSF 0,1 M y β-mercaptoetanol 2%; (v/v)) y se homogeneizó con un disruptor Polytrón (Kinematica) durante 1 min en dos intervalos de 30 s en los que se mantuvo en hielo. Tras la homogenización se añadió un volumen (7,5 mL) de fenol (equilibrado con Tris-pH 8) y se mantuvo durante 30 min en agitación suave a 4 °C. Se centrifugó a 9200 g durante 15 min, y se recuperó la fase fenólica. La extracción con fenol se repitió dos veces recuperándose la fase fenólica. Al volumen total recogido de la fase fenólica se le añadió un volumen de tampón de extracción y se dejó en agitación suave a 4 °C durante 30 min, tras lo cual se centrifugó de nuevo a 9200 g durante 15 min, para recuperar posteriormente la fase fenólica.

El extracto fenólico se precipitó con 5 volúmenes de acetato amónico 100 mM en metanol frío (-20 °C) durante una noche, tras la cual se centrifugó a 4 °C a 18000 g durante 20 min. Posteriormente, se procedió a lavar el precipitado mediante tres lavados con metanol frío (-20 °C) seguido de otros tres lavados con acetona fría (-20 °C), en cada lavado se centrifugó a 18000 g durante 15 min a 4 °C. El último lavado con acetona se hizo con un volumen de 1,5 mL y se recogió en tubos de 2 mL. El precipitado se resuspendió con un tampón pre-IEF (Urea 7 M; Tiourea 2 M y Nonidet P-40 1%; (p/v)) y se determinó espectrofotométricamente la concentración de proteínas mediante el detector MultiScan Spectrum (Thermo Electrón Corporation) midiendo su absorbancia a 480 nm, utilizando el 2D-Quant Kit (GE Healthcare), según las instrucciones del fabricante.

10.3. Electroforesis de proteínas en dos dimensiones y tinción de plata

Para la separación de las proteínas en la primera dimensión (por punto isoelectrico) se cargaron, mediante rehidratación durante una noche, 20 µg de proteínas totales en Immobiline DryStrip Gels (GE Healthcare) de 24 cm con un rango de pH de 4 a 7. El isoelectroenfoque se realizó en el sistema Ettan IPGPhor II utilizando el siguiente programa: un incremento lineal de 0 hasta 500 V durante 2 h, de 500 a 1000 V durante 2 h, de 1000 a 5000 V en 2 h, de 5000 hasta 8000 V durante 4 h y, posteriormente, se mantuvo a 8000 V hasta obtener un total de 64000 Vh. Tras el isoelectroenfoque, se realizó la segunda dimensión en SDS-PAGE, para ello se utilizó un sistema Ettan DALTTsix Large Vertical System y se hicieron geles de acrilamida-bisacrilamida (12,5T; 2,2 C). La SDS-PAGE se desarrollo durante 16 h a 6 W (1 W por gel).

La tinción de los geles se realizó con nitrato de plata, con un protocolo compatible con espectrometría de masas. La fijación se realizó durante 2 h en etanol:acetico:agua (50:10:40; (v/v/v)) y posteriores lavados con agua durante una hora, DTT (0,02%; (p/v)) durante 30 min y nitrato de plata (0,1%; (p/v)) durante 30 min. El revelado se realizó con carbonato sódico (2%; (p/v)) y formaldehído (0,04%; (v/v)), parándose con ácido acético (1%; (v/v)).

10.4. Análisis de imagen e identificación de proteínas por espectrofotometría de masas

La detección de los puntos así como el análisis estadístico y cuantitativo de los geles se realizó utilizando el programa PD-Quest (BioRad). El análisis estadístico se realizó con un 95% de confianza y para el cuantitativo se consideró como cambios significativo una diferencia de ± 2 veces. La identificación de

proteínas se realizó en el Servicio de Proteómica del Centro de Investigaciones Príncipe Felipe. Las proteínas se identificaron mediante su huella peptídica (Peptide Mass Fingerprint) y, en los casos en los que no se obtuvieron resultados, mediante secuenciación de un pequeño fragmento de la proteína, que se realizó mediante MS/MS.

11. Programas informáticos

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se utilizaron los siguientes programas informáticos:

- Adobe PhotoShop: Procesado de imágenes (Home Edition 4.0).
- DNAMAN: Análisis de secuencias (Versión 4.03, Lynnon Biosoft).
- Empower (Waters): Programa para la adquisición y el tratamiento de datos cromatográficos.
- Light Cycler (Versión 4.0.; Roche)
- Microsoft Excel: Cálculos matemáticos.
- Microsoft Word: Procesado de textos.
- Microsoft Power Point: Realización de figuras e imágenes.
- Reference Manager: Manejo de bases bibliográficas (versión 11.0.1).
- Sigma Plot: Elaboración de gráficos (versión 10.0).

También se utilizaron las aplicaciones *on line*:

- CFGP (Citrus Functional Genomic Project): Búsqueda de secuencias publicadas en su base de datos. <http://bioinfo.ibmcp.upv.es/genomics/cfgpDB/>
- Del NCBI (Nacional Center for Biotechnology Information):
 - Búsqueda de secuencias publicadas en su base de datos. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
 - Programas de comparación de secuencias con aquellas depositadas en la base de datos. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> (Altschul *et al.* 1990).
 - UniProt: Búsquedas de secuencias proteicas en su base de datos. <http://www.uniprot.org/help/uniref>

RESULTADOS

CAPÍTULO I. EFECTO DE LA TEMPERATURA DE CONSERVACIÓN EN LA BIOSÍNTESIS Y ACUMULACIÓN DE CAROTENOIDES EN FRUTOS DE DISTINTAS VARIEDADES DE CÍTRICOS

En diferentes experiencias realizadas en el laboratorio de Fisiología y Biotecnología Postcosecha se había constatado que la conservación de frutos de diferentes variedades de cítricos a 12 °C durante períodos relativamente prolongados incrementaba el color externo e interno de los mismos. En la **Figura 9** se muestra un ejemplo representativo de frutos de naranja 'Navelina' y 'Clemenules' conservados 6 semanas a 2 y 12 °C, donde se observa la mayor intensidad de color en aquellos que se mantuvieron a 12 °C.

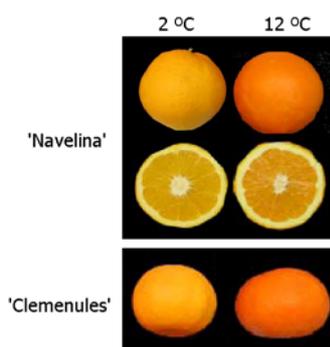


Figura 9. Color externo e interno de frutos de naranja 'Navelina' y mandarina 'Clemenules', conservados durante 6 semanas a 2 y 12 °C.

Con el fin de analizar con mayor profundidad este efecto, se realizó un estudio preliminar utilizando frutos virando de color ($a/b = -0,08 \pm 0,04$) de la variedad de naranja 'Navelina', que se conservaron a 2 y 12 °C durante 9 semanas (**Figura 10**), según se describe en el Apartado 3.1 de Materiales y Métodos.

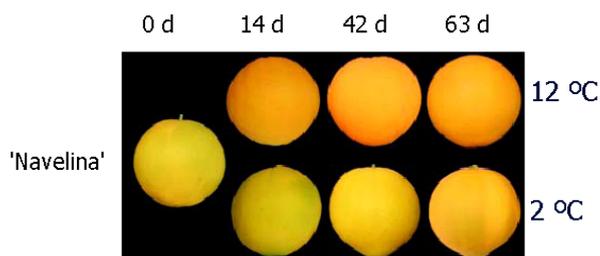


Figura 10. Evolución del color externo de frutos de naranja 'Navelina' recolectados con un a/b inicial de $-0,08 \pm 0,04$ almacenados a 2 y a 12 °C durante 14, 42 y 63 días.

En la **Figura 11** se muestra la evolución de la relación a/b en los frutos conservados a ambas temperaturas y la comparación respecto a los mantenidos a 20 °C durante dos semanas. Los frutos almacenados a 12 °C mostraron un mayor índice de coloración que los almacenados a 2 ó 20 °C, experimentando el principal aumento durante las 3 primeras semanas de almacenamiento. A 2 °C, sin embargo, sólo se produjo un ligero y progresivo incremento en el color externo y, al final de período de conservación, el color del flavedo fue claramente más amarillo que en los mantenidos a 12 °C (**Figura 11**).

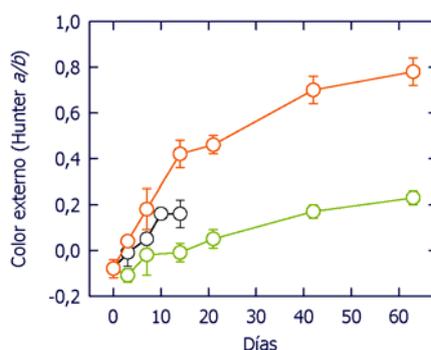


Figura 11. Efecto de la temperatura de conservación en la evolución del color del flavedo en frutos de naranja 'Navelina', recolectados con un a/b inicial de $-0,08 \pm 0,04$. Los frutos se almacenaron a 20 °C (○) durante dos semanas y a 12 °C (◐) y 2 °C (◑) durante 9 semanas. Los valores son la media \pm DE de al menos 10 frutos independientes.

Para caracterizar el efecto de la temperatura de conservación en los cambios cuantitativos y cualitativos en los carotenoides, se analizó el contenido total de clorofilas y carotenoides en el flavedo de los frutos de naranja 'Navelina' a lo largo del período de conservación a 2 y 12 °C. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 12**. El contenido de clorofilas totales en el flavedo disminuyó a lo largo del periodo de conservación, independientemente de la temperatura, aunque la pérdida de clorofilas fue más rápida en los frutos almacenados a 12 °C (**Figura 12 A**). La evolución del contenido de carotenoides totales, determinados como equivalentes de β -caroteno, en los frutos de naranja 'Navelina' almacenados a 12 °C experimentó un importante incremento, aumentando los niveles iniciales 4,5 veces a los 40 días, para disminuir posteriormente. En los frutos almacenados a 2 °C, el contenido en carotenoides totales se duplicó durante las 3 primeras semanas, y se mantuvo relativamente constante con posterioridad (**Figura 12 B**).

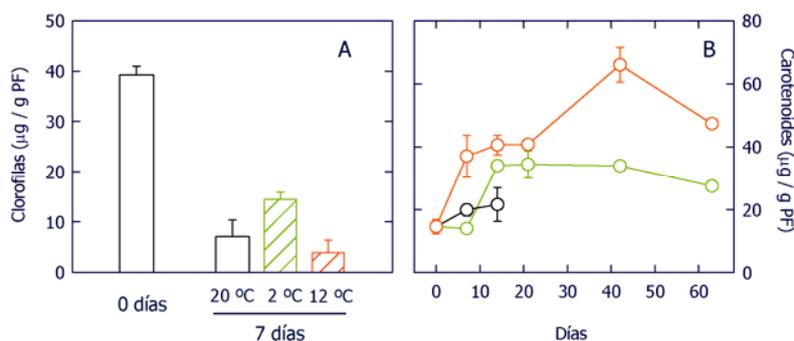


Figura 12. Efecto de la temperatura de conservación sobre el contenido de clorofilas totales (A) y de carotenoides totales (B) en el flavedo de frutos de naranja 'Navelina', recolectados con un a/b inicial de $-0,08 \pm 0,04$. Se muestran los resultados durante el almacenamiento a 20 °C (○) durante dos semanas y a 12 °C (◻) y 2 °C (◻). Los valores son la media \pm DE de al menos 3 análisis independientes.

Estos resultados preliminares indican que el almacenamiento de los frutos, en este caso de naranja 'Navelina', a 12 °C estimula la coloración del fruto e incrementa el contenido en carotenoides, lo que puede tener importantes repercusiones en la conservación postcosecha y la calidad de los frutos. Con estos antecedentes nos planteamos en este capítulo la caracterización fisiológica y molecular de la estimulación de la coloración de los frutos, tanto externa como interna, durante la conservación a 12 °C. Para ello se realizó un análisis comparativo de los cambios en carotenoides durante el almacenamiento a 2 y 12 °C en frutos de variedades agrónomicamente relevantes de naranjas ('Navelina' y 'Navelate') y de mandarina ('Clemenules') en distintos estadios de maduración.

1. Efecto de la temperatura de conservación sobre la biosíntesis y acumulación de carotenoides en frutos de naranja 'Navelina' en diferentes estadios de maduración

Para estudiar el efecto de la temperatura de conservación en el color y la acumulación de carotenoides en frutos de naranja 'Navelina' se seleccionaron los estadios de maduración o coloración que se muestran en la **Figura 13**. Los frutos recolectados en los estadios A y B ($a/b = -0,11 \pm 0,02$ y $0,44 \pm 0,01$, respectivamente) se dividieron y se almacenaron durante 8 semanas a 2 y 12 °C y durante 2 semanas a 20 °C (Apartado 3.1 de Materiales y Métodos). Los frutos del estadio C (totalmente coloreados) se mantuvieron a 2 y 12 °C durante 7 semanas. A lo largo de todo el periodo de conservación se tomaron muestras del flavedo y de la pulpa cada semana para su posterior análisis como se describe en el Apartado 1.2 de Materiales y Métodos.

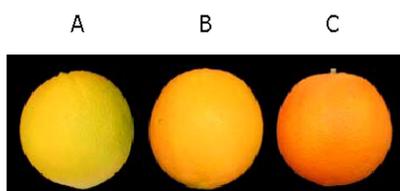


Figura 13. Aspecto externo del flavedo de los frutos de naranja 'Navelina' recolectados para el estudio de la conservación a 2 y a 12 °C. **A.** Frutos virando ($a/b = -0,11 \pm 0,02$); **B.** Frutos coloreados ($a/b = 0,44 \pm 0,01$); y **C.** Frutos totalmente coloreados ($a/b = 0,95 \pm 0,02$).

1.1. Cambios en el color externo e interno en frutos de naranja 'Navelina' durante la conservación a 2 y 12 °C

El aspecto externo e interno de los frutos virando (estadio A) y coloreados (estadio B) de naranja 'Navelina' a lo largo del periodo de almacenamiento a bajas temperaturas se muestra en la **Figura 14**. En general, el almacenamiento a 12 °C promovió de forma clara y evidente la coloración externa de los frutos, frente a los frutos conservados a 2 °C, que se mantuvo relativamente estable. La evolución del color en los frutos de ambos estadios siguió una curva exponencial a lo largo de las 3-4 primeras semanas y, a partir de ese momento, el cociente a/b siguió un incremento menos acusado (**Figura 15**). El incremento en la coloración del flavedo fue mayor en los frutos virando que en los frutos coloreados. Así, los frutos en el estadio A mostraron un incremento de 0,8 unidades en las 3 primeras semanas de almacenamiento a 12 °C, mientras que en los frutos que se mantuvieron a 2 °C su cociente de color sólo incrementó 0,2 unidades a lo largo del periodo de conservación (**Figura 15 A**). Por otro lado, los frutos coloreados (estadio B, $a/b = 0,44 \pm 0,01$) incrementaron su índice de coloración de forma más moderada y progresiva durante la conservación a 12 °C. Sin embargo, el color de los frutos se mantuvo estable durante la conservación a 2 °C (**Figura 15 B**). En las dos primeras semanas de conservación, en los estadios A y B, el índice de color de los frutos almacenados a 12 °C fue ligeramente superior al de los frutos control (20 °C). En el último estadio de maduración ensayado, el color de los frutos se mantuvo constante a lo largo de las 7 semanas de conservación, y sin diferencias entre 2 y 12 °C (**Figura 15 C**).

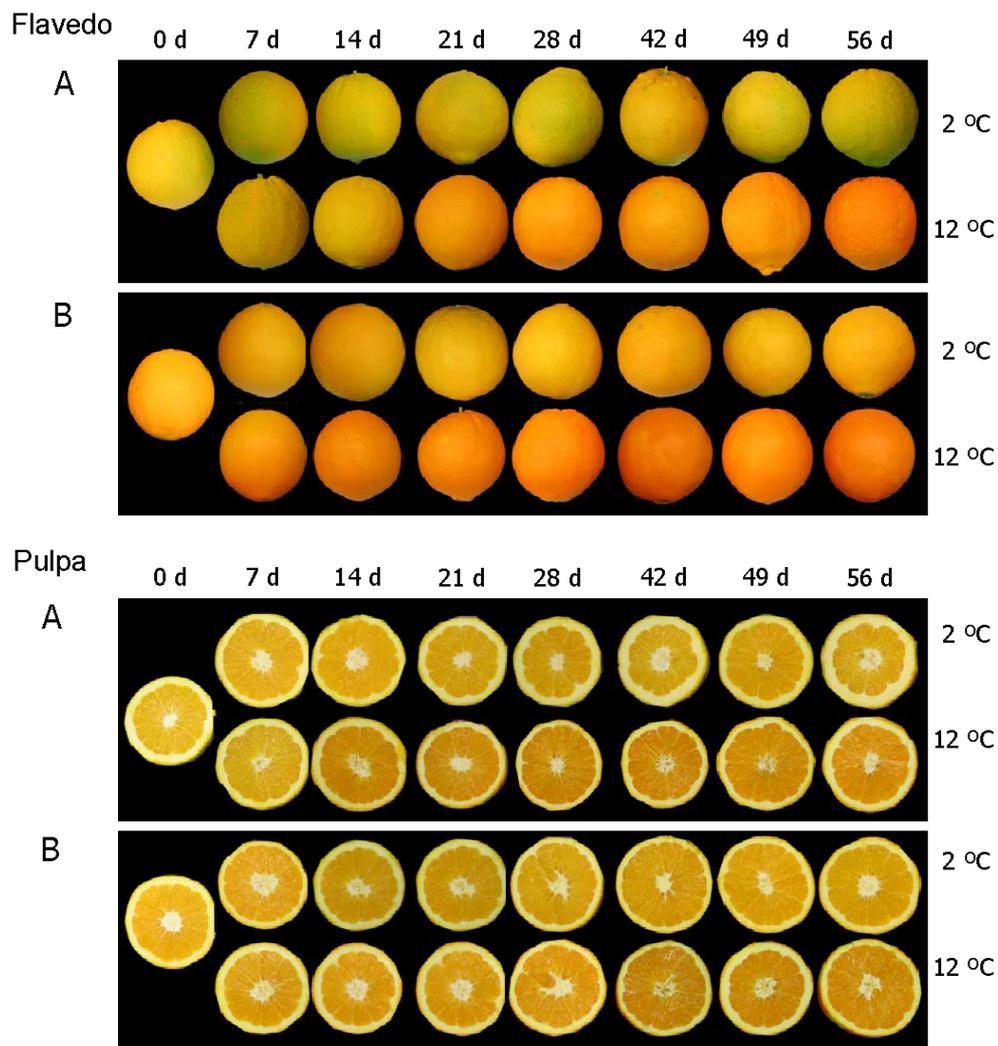


Figura 14. Evolución del color externo e interno de frutos de naranja 'Navelina' recolectados en dos estadios de maduración, durante la conservación a 2 y 12 °C. La nomenclatura **A-B** se corresponde con los tres estadios de coloración de la **Figura 13**. **A.** Frutos virando ($a/b = -0,11 \pm 0,02$) y **B.** Frutos coloreados ($a/b = 0,44 \pm 0,01$). Los números indican los días de almacenamiento.

La evolución del índice de maduración interno (expresado como $^{\circ}\text{Brix}/\text{acidez}$) durante la conservación se determinó en frutos de los estadios A ($a/b = -0,11 \pm 0,02$) y B ($a/b = 0,44 \pm 0,01$). El índice de maduración inicial en ambos frutos fue de 6,17 y 7,60, respectivamente (**Figura 16**). Este parámetro varió ligeramente a lo largo del almacenamiento a 12 °C en los frutos más coloreados, alcanzándose un índice de 8,7 a las 7 semanas, mientras que en los frutos virando se mantuvo constante. Por el contrario, en los frutos virando (**Figura 16 A**) el

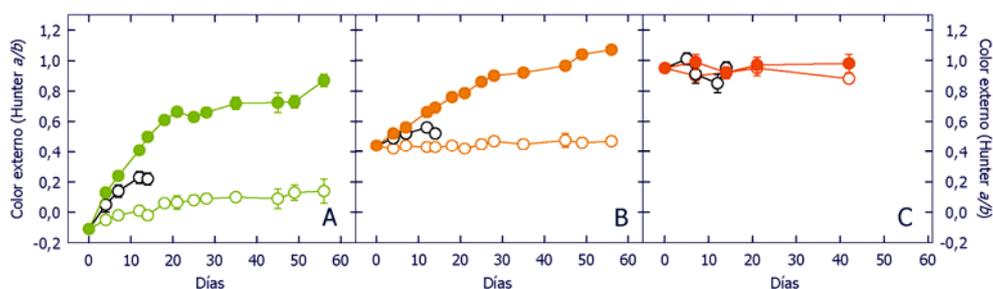


Figura 15. Evolución del color del flavedo de frutos de naranjas 'Navelina' recolectados en tres estadios de maduración, durante la conservación a 20 °C (○, círculo negro sin relleno), 12 °C (●, círculo de color con relleno) y a 2 °C (○, círculo de color sin relleno). El estadio de coloración inicial de los frutos fue: **A.** Frutos virando ($a/b = -0,11 \pm 0,02$); **B.** Frutos coloreados ($a/b = 0,44 \pm 0,01$); y **C.** Frutos totalmente coloreados ($a/b = 0,95 \pm 0,02$). Los valores son la media \pm DE de al menos 10 frutos independientes.

almacenamiento a 2 °C incrementó ligeramente el índice de maduración interna (7,55 °Brix/acidez).

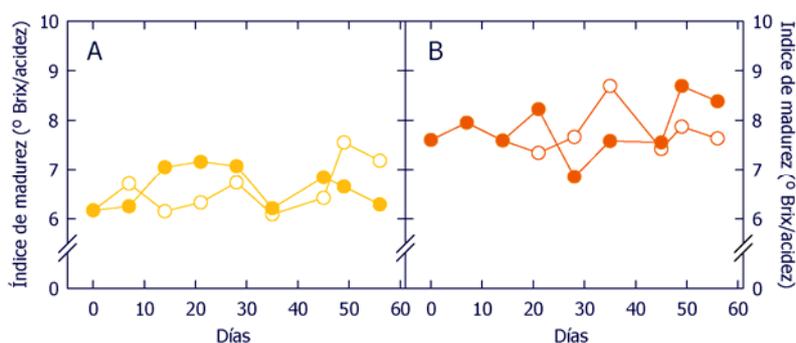


Figura 16. Evolución del índice de madurez en frutos de naranja 'Navelina' recolectados en dos estadios de maduración, durante el almacenamiento a 2 °C (○) y 12 °C (●). La nomenclatura **A-B** se corresponde con los tres estadios de coloración de la **Figura 13**: **A.** Frutos virando ($a/b = -0,11 \pm 0,02$); **B.** Frutos coloreados ($a/b = 0,44 \pm 0,01$). Los valores son la media \pm DE de al menos 10 frutos independientes.

En la **Figura 17** se muestra la evolución de la producción de etileno en los frutos de 'Navelina' virando y coloreados durante la conservación 12 °C. En general, se observa que el almacenamiento a 12 °C no provocó cambios importantes en la emisión de la hormona, sólo un ligero incremento con el tiempo, pero sin diferencias destacables respecto a la producción de etileno entre los frutos en los dos estadios de maduración.

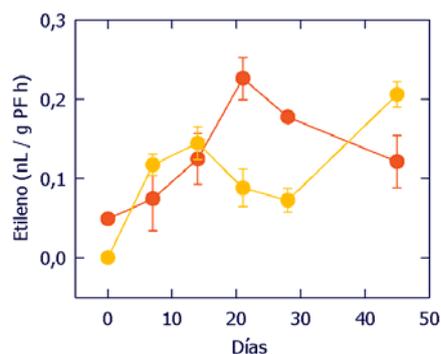


Figura 17. Evolución de la producción de etileno en frutos de naranja 'Navelina' virando ($a/b = -0,11 \pm 0,02$) (●) y coloreados ($a/b = 0,44 \pm 0,01$) (●) durante el almacenamiento a 12 °C. Los valores son la media \pm DE de al menos 3 análisis independientes.

1.2. Evolución del contenido de clorofilas y carotenoides totales en el flavedo y en la pulpa de frutos de naranja 'Navelina' durante la conservación a 2 y 12 °C

Para el análisis del contenido de clorofilas y carotenoides a lo largo del periodo de conservación se seleccionaron 5 puntos representativos: inicial, 7, 21, 35 y 49 días (**Figura 14**). En los frutos virando, el contenido inicial de clorofilas ($22,14 \pm 0,26 \mu\text{g} / \text{g PF}$) disminuyó de forma rápida durante la conservación a 12 °C, ya que después de 2 semanas no se detectaron, mientras que para el mismo periodo de tiempo a 2 °C tenían un contenido de $7,80 \pm 1,35 \mu\text{g} / \text{g PF}$ (datos no mostrados). En cambio, en los frutos coloreados no se detectaron clorofilas (**Tabla 8**).

Tabla 8. Color y contenido de clorofilas y carotenoides totales en el momento de la recolección en el flavedo y en la pulpa de frutos de naranja 'Navelina' recolectados en tres estadios de maduración.

| Color (a/b) | Flavedo | | Pulpa | |
|--------------------|---|---|---|---|
| | Clorofilas ($\mu\text{g} / \text{g PF}$) | Carotenoides ($\mu\text{g} / \text{g PF}$) | Clorofilas ($\mu\text{g} / \text{g PF}$) | Carotenoides ($\mu\text{g} / \text{g PF}$) |
| $-0,11 \pm 0,02$ | $22,14 \pm 0,22$ | $22,15 \pm 0,92$ | N.D. | $8,48 \pm 0,72$ |
| $0,44 \pm 0,01$ | N.D. | $32,00 \pm 1,00$ | N.D. | $4,25 \pm 0,07$ |
| $0,95 \pm 0,02$ | N.D. | $63,56 \pm 1,16$ | - | - |

N.D. No detectado

La evolución del contenido de carotenoides totales en el flavedo durante el almacenamiento a 2 y 12 °C presentó un patrón similar en los frutos de naranjas 'Navelina' en los dos primeros estadios de coloración seleccionados (**Figura 18**). En general, la conservación a 12 °C incrementó el contenido de carotenoides en la piel, mientras que en los frutos almacenados a 2 °C varió según el estadio de coloración inicial. El contenido de carotenoides en el flavedo se triplicó durante el almacenamiento a 12 °C, independientemente del estadio inicial de coloración de los frutos (**Figura 18**). Sin embargo, en los frutos en el estadio A el contenido en carotenoides totales se duplicó al final del periodo de almacenamiento a 2 °C (**Figura 18 A**), mientras que los coloreados (estadio B, $a/b = 0,44 \pm 0,01$) se mantuvo constante (**Figura 18 B**).

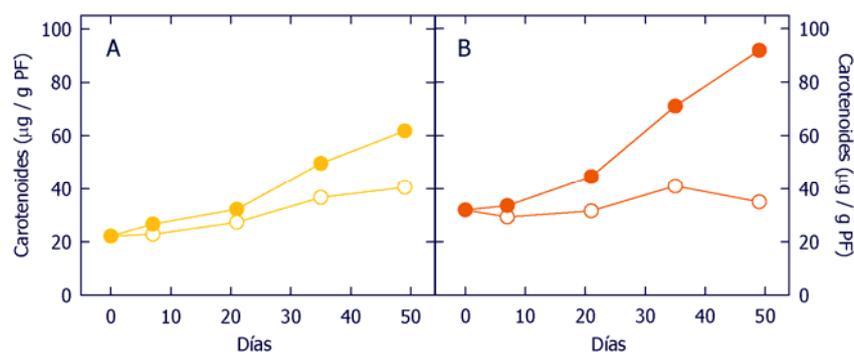


Figura 18. Evolución del contenido de carotenoides totales en el flavedo de frutos de naranja 'Navelina' virando ($a/b = -0,11 \pm 0,02$) (**A**) y coloreados ($a/b = 0,44 \pm 0,01$) (**B**) durante el almacenamiento a 2 °C (○) y 12 °C (●). Los valores son la media \pm DE de al menos 3 análisis independientes.

El patrón de acumulación de carotenoides totales en la pulpa durante la conservación a 12 °C mostró una tendencia similar (**Figura 19**). Así, al igual que ocurre en el flavedo, se produjo un incremento en el contenido de carotenoides totales que fue superior en los frutos coloreados ($a/b = 0,44 \pm 0,01$), casi 5 veces el contenido inicial, que en los frutos virando, donde se duplicó (**Figura 19**). Los frutos almacenados a 2 °C mostraron un patrón de acumulación diferente, ya que mientras que en los frutos virando apenas se produjeron cambios significativos, en los coloreados (estadio B) el contenido de carotenoides en la pulpa se duplicó durante la primera semana y se mantuvo constante posteriormente (**Figura 19 B**).

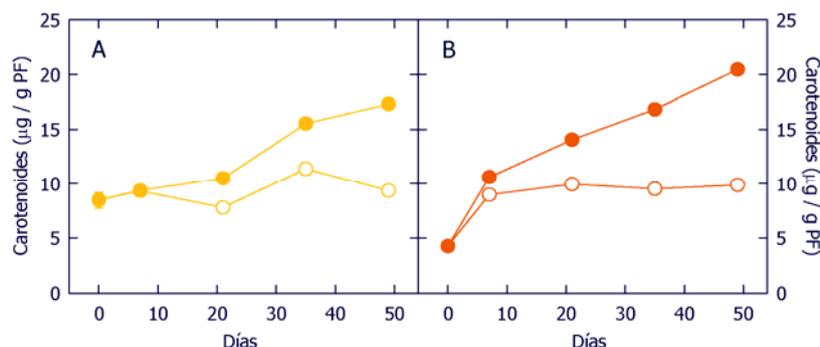


Figura 19. Evolución del contenido de carotenoides totales en la pulpa de frutos de naranja 'Navelina' virando ($a/b = -0,11 \pm 0,02$) (A) y coloreados ($a/b = 0,44 \pm 0,01$) (B) durante el almacenamiento a 2 °C (○) y 12 °C (●). Los valores son la media \pm DE de al menos 3 análisis independientes.

1.3. Composición de carotenoides en el flavedo y en la pulpa de frutos de naranja 'Navelina' durante la conservación a 2 y 12 °C

La composición de carotenoides en el flavedo y la pulpa de naranjas 'Navelina' conservadas a 2 y 12 °C se analizaron mediante HPLC-PDA, utilizando frutos en los estadios de maduración A y B descritos anteriormente y para los mismos tiempos de conservación que los análisis de carotenoides totales (Figura 18 y Figura 19). El perfil de carotenoides en el flavedo de frutos virando (estadio A) recién recolectados presentó algunos pigmentos característicos del tejido cloroplástico, como el β -caroteno, α -criptoxantina o neoxantina (Figura 20), a diferencia del flavedo de los frutos coloreados (estadio B), donde únicamente se observaron trazas de α -criptoxantina (Figura 21). En ambos estadios el carotenoide mayoritario fue la *cis*-violaxantina, que representó aproximadamente el 60% del total de carotenoides. Sin embargo, el contenido en carotenos fue mayor en los frutos virando, donde el caroteno mayoritario fue el caroteno lineal fitoeno.

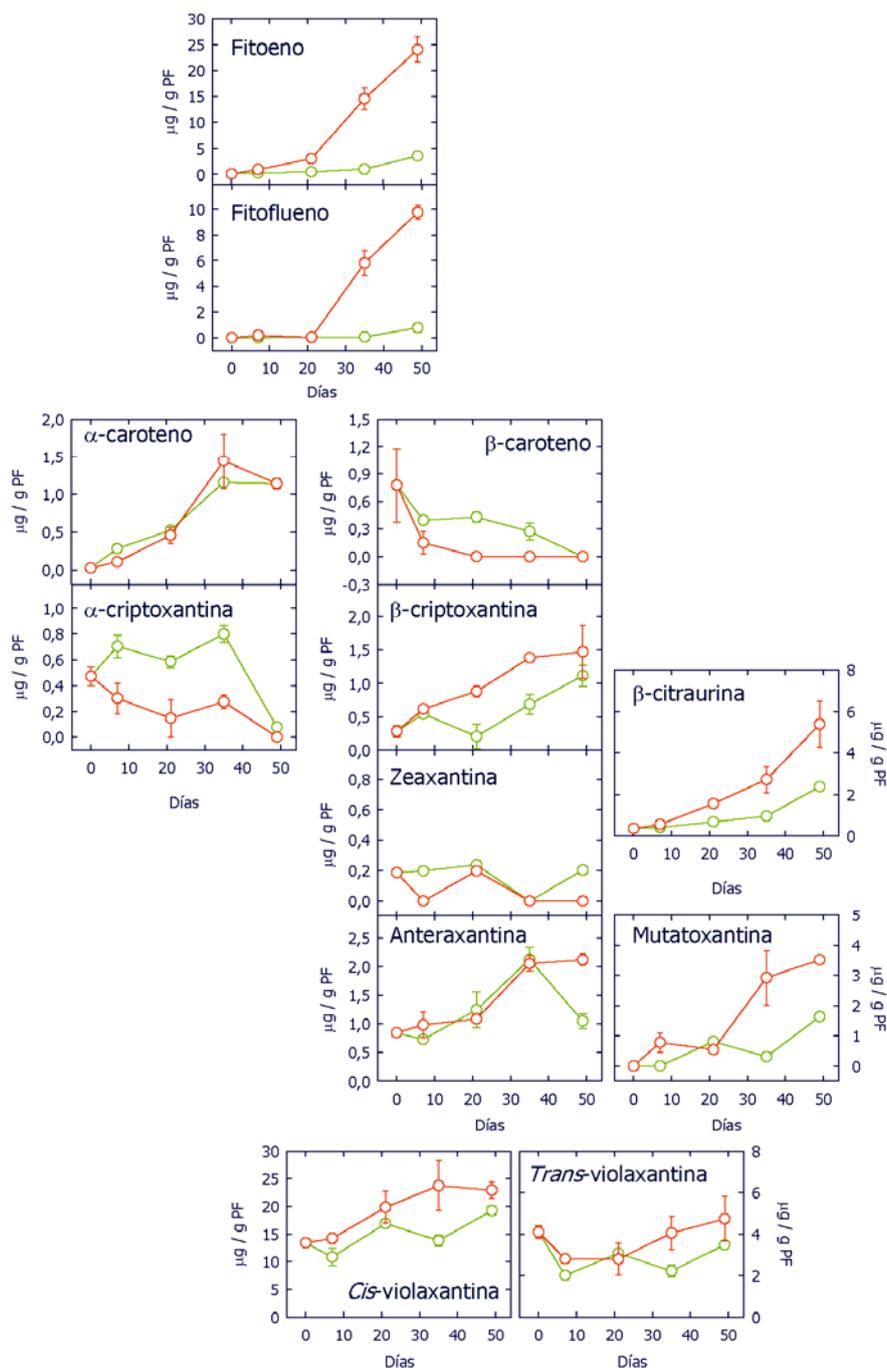


Figura 20. Evolución del contenido de carotenoides en el flavedo de frutos virando de naranja 'Navelina', recolectados con un a/b inicial de $-0,11 \pm 0,02$, almacenados durante 7 semanas a 2 °C (○) y 12 °C (○). Los valores son la media \pm DE de al menos tres análisis independientes.

En el flavedo de los frutos en ambos estadios de maduración, el almacenamiento a 12 °C incrementó el contenido de la mayoría de carotenoides individuales, tanto los carotenoides iniciales fitoeno y fitoflueno, como las xantofilas de tonalidades naranja-rojizas. Así, los carotenoides incoloros fitoeno y fitoflueno aumentaron hasta alcanzar aproximadamente concentraciones de 24 y 8-10 µg / g PF, respectivamente, independientemente del estadio de coloración inicial, en comparación con incrementos de 3 y 1 µg / g PF en frutos conservados a 2 °C. En cuanto a los cambios en xantofilas de la rama β,ε-, en ambos estadios se observó una evolución similar para ambas temperaturas de conservación (**Figura 20 y Figura 21**). El contenido total de β,β-xantofilas experimentó, en general, un incremento durante el almacenamiento a 12 °C, que fue similar para ambos estadios de maduración (en torno al 40-45%). En los frutos virando de color aparecieron nuevas xantofilas, como la mutatoxantina (derivado 5,8-epoxi de la anteraxantina de tonalidad amarillenta) y el apocarotenoide β-citraurina, que no estaban presentes en el momento de la cosecha, pero en todos los casos experimentaron importantes aumentos durante la exposición a 12 °C, siendo unos de los efectos más destacables de la temperatura de conservación. La concentración de β-criptoxantina, xantofila de tonalidad naranja intensa, aumentó durante la conservación, tanto en frutos virando como coloreados, pero no se marcaron diferencias relevantes entre los frutos conservados a 2 ó 12 °C (**Figura 20 y Figura 21**). Tampoco se observaron diferencias en el contenido de zeaxantina y anteraxantina en frutos de los dos estadios de maduración conservados a ambas temperaturas.

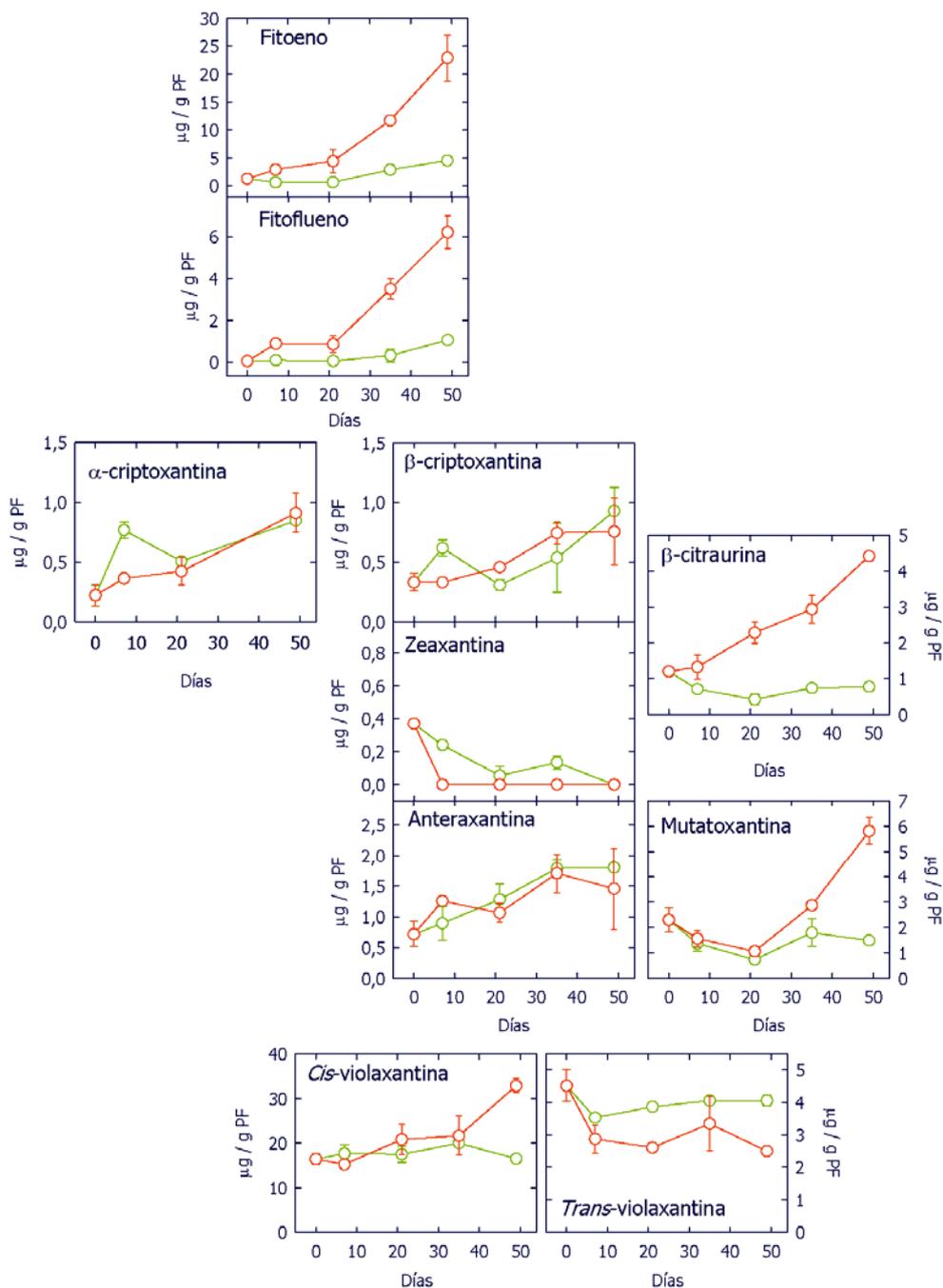


Figura 21. Evolución del contenido de carotenoides en el flavedo de frutos coloreados de naranja 'Navelina', recolectados con un a/b inicial de $0,44 \pm 0,01$, almacenados durante 7 semanas a 2 °C (○) y 12 °C (○). Los valores son la media \pm DE de al menos tres análisis independientes.

La composición y evolución de los principales carotenoides y xantofilas presentes en la pulpa de los frutos de naranja 'Navelina' en los estadíos de coloración y almacenados a 2 y 12 °C se muestran en las **Figura 22** y **Figura 23**, respectivamente. La composición inicial de carotenoides fue similar en ambos estadíos de coloración. En general, el almacenamiento a 12 °C promovió un mayor incremento de los carotenoides frente a la conservación a 2 °C, pero los cambios fueron diferentes a los observados en el flavedo. Así, los carotenoides incoloros permanecieron constantes en los frutos que estaban virando, mientras que en los frutos coloreados mostraron un ligero incremento a lo largo de la conservación. Con la excepción del descenso en luteína, que fue mayor en los frutos virando a 12 °C (**Figura 22** y **Figura 23**). La concentración de β,β -xantofilas mostró un mayor incremento en los frutos coloreados, donde incrementaron 5 veces a lo largo de la conservación a 12 °C, mientras que los frutos virando solamente aumentaron dos veces (**Figura 22** y **Figura 23**). La concentración de β -criptoxantina, responsable de la tonalidad de la pulpa, experimentó uno de los cambios más notables, ya que se incrementó aproximadamente 7 veces y más de 13 veces después de 7 semanas de conservación a 12 °C en los frutos virando y coloreados, respectivamente. La xantofila zeaxantina mostró un incremento en los frutos coloreados y la *trans*-violaxantina sólo experimentó un leve incremento, independientemente del estadio inicial de los frutos. La concentración de *cis*-violaxantina, el carotenoide mayoritario en la pulpa, aumentó tanto a 2 °C como a 12 °C en los dos estadíos de maduración, aunque los frutos conservados a 2 °C mostró una fuerte caída en las últimas semanas del almacenamiento, alcanzando los niveles iniciales (**Figura 22** y **Figura 23**).

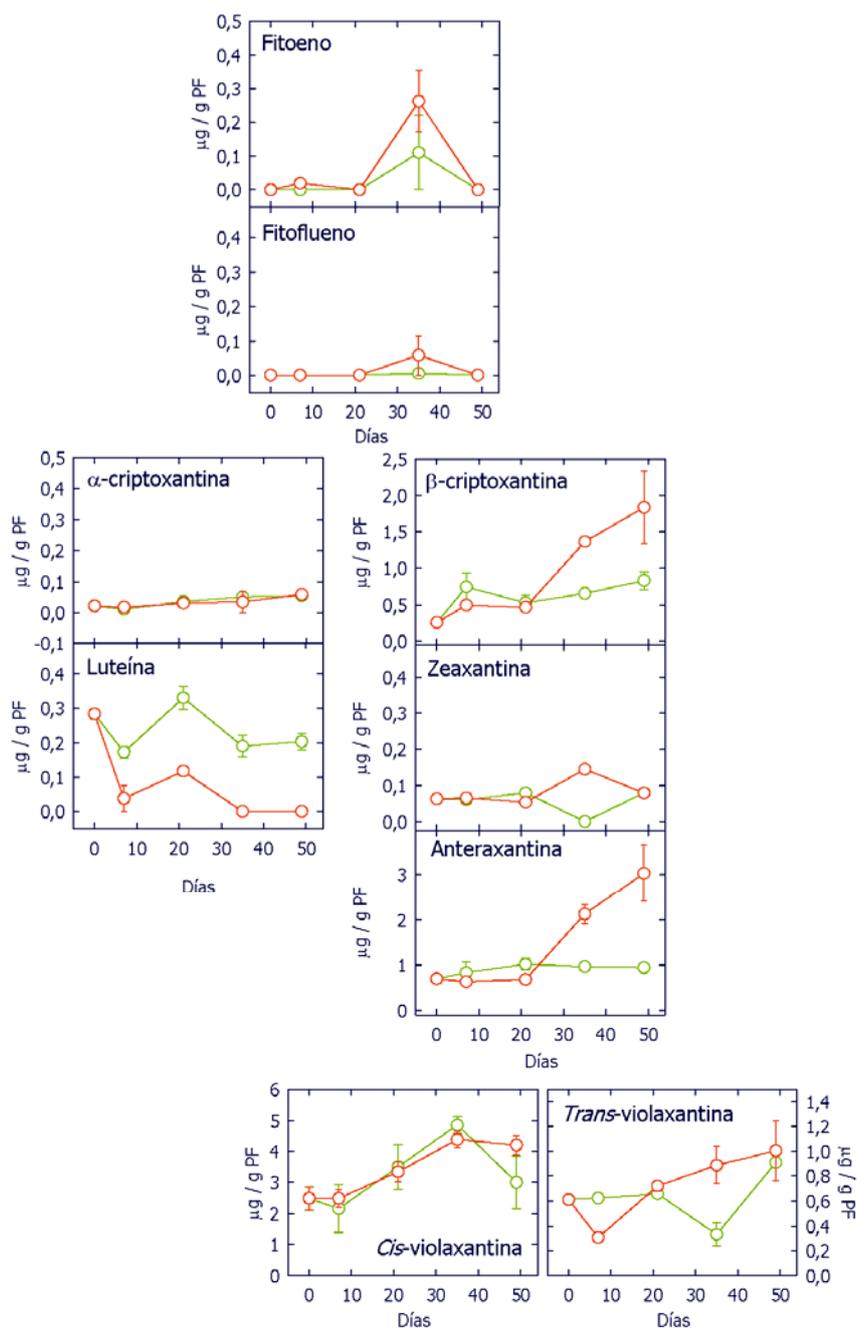


Figura 22. Evolución del contenido de carotenoides en la pulpa de frutos virando de naranja 'Navelina', recolectados con un *a/b* inicial de $-0,11 \pm 0,02$, almacenados durante 7 semanas a 2 °C (○) y 12 °C (○). Los valores son la media \pm DE de al menos tres análisis independientes

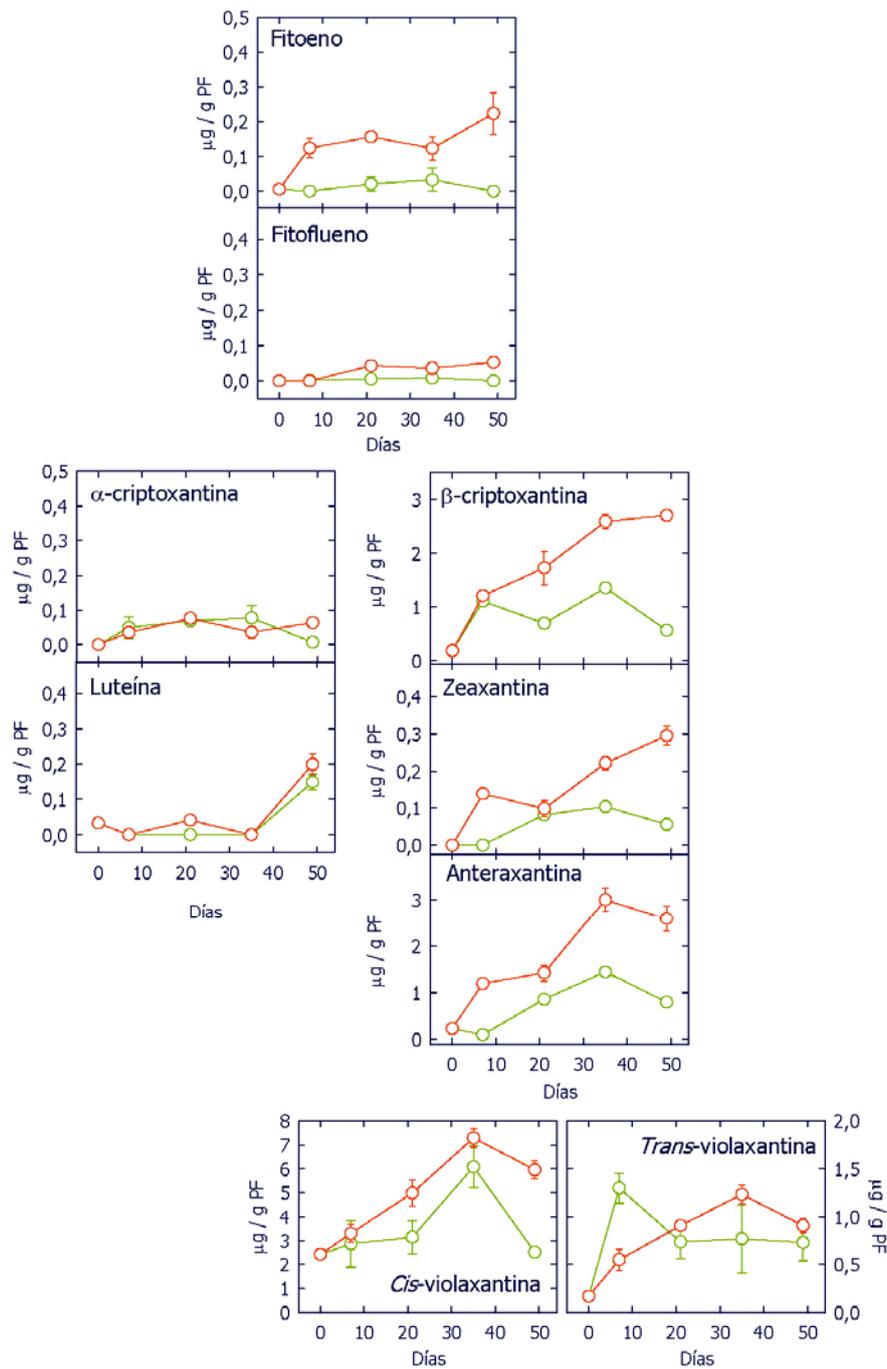


Figura 23. Evolución del contenido de carotenoides en la pulpa de frutos coloreados de naranja 'Navelina', recolectados con un a/b inicial de $0,44 \pm 0,01$, almacenados durante 7 semanas a 2 °C (○) y 12 °C (○). Los valores son la media \pm DE de al menos tres análisis independientes.

1.4. Análisis de la expresión de genes de la biosíntesis de carotenoides en el flavedo y en la pulpa de frutos de naranja 'Navelina' durante la conservación a 2 y 12 °C

El conjunto de resultados anteriores indica claramente que la exposición de los frutos de naranja a 12 °C estimula la carotenogénesis tanto en el flavedo como en la pulpa y, consecuentemente, promueve la coloración. Este efecto parece que conlleva una activación general de la ruta, incluidas las etapas tempranas de la misma, como se deduce del aumento del contenido en fitoeno y fitoflueno. Para caracterizar a nivel molecular el efecto de la temperatura de conservación en la ruta de biosíntesis de carotenoides, se analizaron los cambios en la expresión de cuatro genes claves de la ruta en el flavedo y en la pulpa de frutos conservados a 2 y 12 °C. Se seleccionaron los siguientes genes: fitoeno sintasa (*PSY*), primer paso de desaturación de entrada en la ruta, licopeno ciclasas (*βLCY1* y *2*) genes responsables de la ciclación de licopeno en β-caroteno, y β-caroteno hidroxilasa (*βCHX*), gen responsable de la hidroxilación de β-caroteno en β,β-xantofilas. Para el análisis de expresión se utilizó la técnica de RT-qPCR a tiempo real en las mismas muestras en las que se habían cuantificado los carotenoides y así poder relacionar los cambios en la concentración de carotenoides con la expresión de los genes correspondientes.

La expresión de *PSY* aumentó en los frutos virando de naranja 'Navelina' mantenidos a 12 °C, llegándose a duplicar la acumulación relativa del transcrito a los 21 días. La evolución de la expresión de los genes *βLCY1* y *βCHX* fue similar, alcanzando los mayores niveles después de las 3 primeras semanas, disminuyendo posteriormente. La expresión de *βLCY2* mostró un incremento progresivo hasta la 6^a-7^a semana de exposición a 12 °C. En los frutos mantenidos a 2 °C, por el contrario, la expresión de los cuatro genes disminuyó durante el almacenamiento, siendo durante la primera semana cuando se produjo el descenso más significativo en la acumulación de los correspondientes mRNAs (**Figura 24**). En los frutos coloreados ($a/b = 0,44 \pm 0,01$), el efecto de la temperatura de almacenamiento en los perfiles de expresión de los genes *PSY* y *βCHX* fue similar al de los frutos virando (**Figura 25**). La expresión del gen *βLCY1* aumentó progresivamente a lo largo de la conservación, mientras que la de *βLCY2* experimentó diferentes fluctuaciones, pero en los dos casos fueron sustancialmente superiores a la de los frutos mantenidos a 2 °C, temperatura a la cual la expresión de los diferentes genes se redujo desde la primera semana de almacenamiento (**Figura 25**).

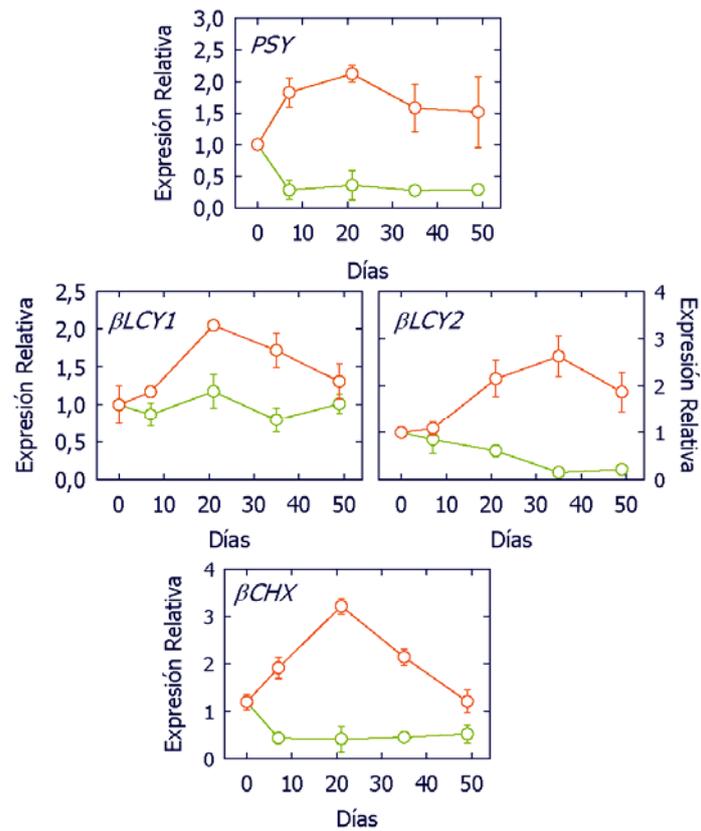


Figura 24. Expresión relativa de cuatro genes implicados en la biosíntesis de carotenoides en el flavedo de frutos de naranja 'Navelina', recolectados con un a/b inicial de $-0,11 \pm 0,02$ durante el almacenamiento a 2 °C (○) y 12 °C (○). Los valores obtenidos para cada gen están normalizados frente a los niveles de expresión al inicio del tratamiento (día 0), al que se le asigna un valor relativo de 1.

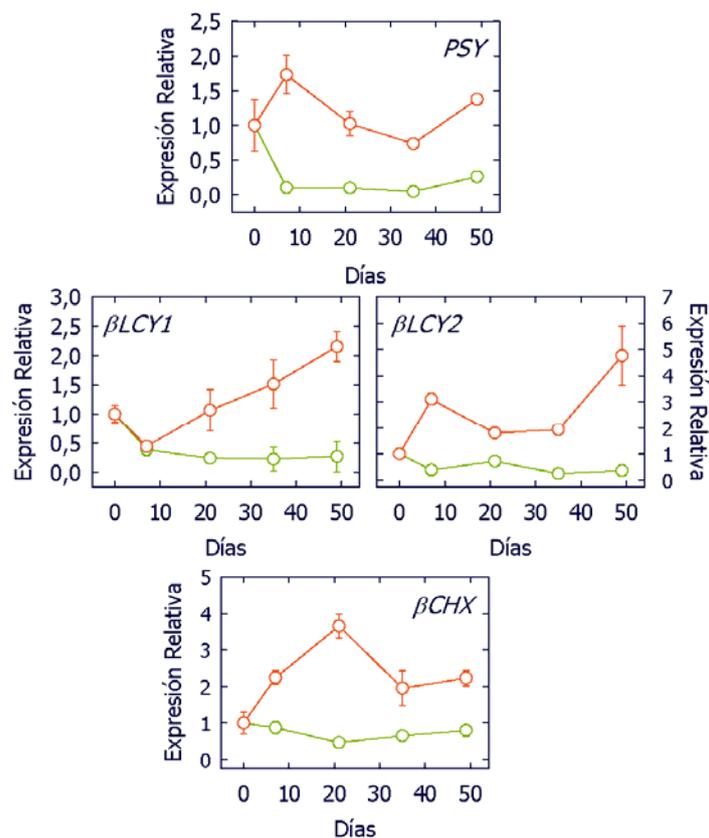


Figura 25. Expresión relativa de cuatro genes implicados en la biosíntesis de carotenoides en el flavedo de frutos de naranja 'Navelina', recolectados con un a/b inicial de $0,44 \pm 0,01$ durante el almacenamiento a $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ (\circ) y $12\text{ }^{\circ}\text{C}$ (\circ). Los valores obtenidos para cada gen están normalizados frente a los niveles de expresión al inicio del tratamiento (día 0), al que se le asigna un valor relativo de 1.

En la pulpa de los frutos virando, la exposición a $12\text{ }^{\circ}\text{C}$ produjo un aumento transitorio en la expresión de los diferentes genes, que llegó a multiplicar por 2,5, 5 y 3 veces la acumulación de los transcritos *βLCY1*, *βLCY2* y *βCHX*, respectivamente, mientras que el gen *PSY* disminuyó (**Figura 26**). Al igual que en el flavedo, los niveles de los mRNAs en la pulpa de los frutos almacenados a $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ mostraron una disminución a lo largo de todo el periodo de almacenamiento (**Figura 26**). En la pulpa de los frutos en el estadio de coloración más avanzado, el patrón de expresión de los genes fue distinto al anterior. En general, los mRNAs de los cuatro genes de la ruta analizados experimentaron una disminución a lo largo del almacenamiento, tanto a $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ como a $12\text{ }^{\circ}\text{C}$, y con la excepción del gen

β LCY1 en las primeras semanas, sin diferencias aparentes entre ambas temperaturas (**Figura 27**).

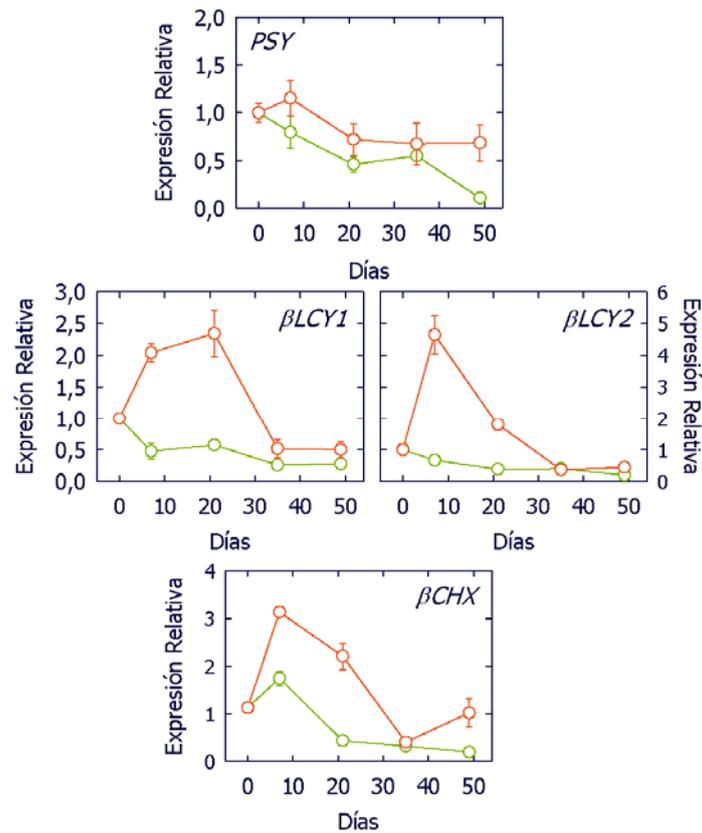


Figura 26. Expresión relativa de cuatro genes implicados en la biosíntesis de carotenoides en la pulpa de frutos de naranja 'Navelina', recolectados con un a/b inicial de $-0,11 \pm 0,02$ durante el almacenamiento a 2 °C (○) y 12 °C (◐). Los valores obtenidos para cada gen están normalizados frente a los niveles de expresión al inicio del tratamiento (día 0), al que se le asigna un valor relativo de 1.

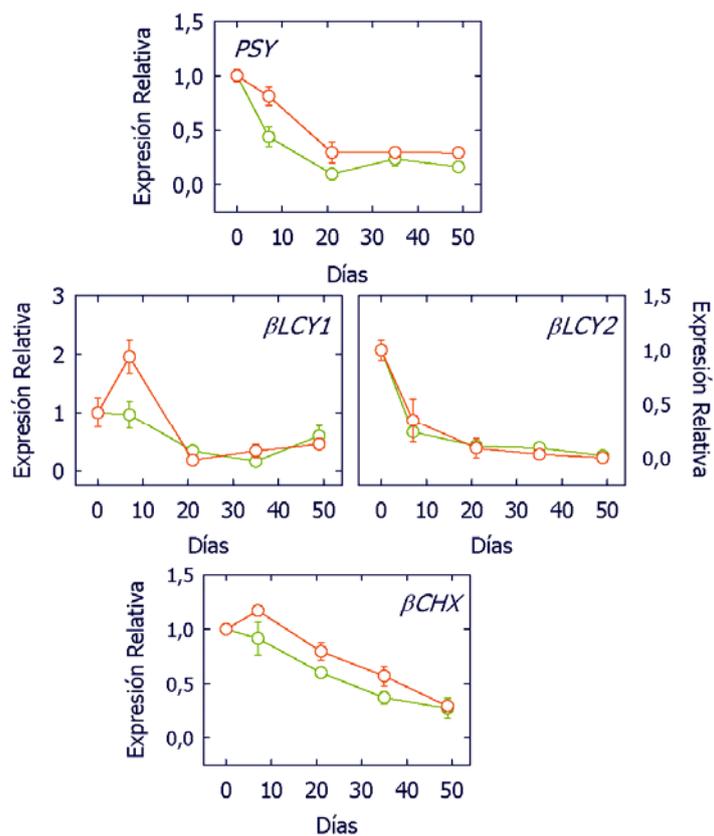


Figura 27. Expresión relativa de cuatro genes implicados en la biosíntesis de carotenoides en la pulpa de frutos de naranja 'Navelina', recolectados con un a/b inicial de $0,44 \pm 0,01$ durante el almacenamiento a 2 °C (○) y 12 °C (○). Los valores obtenidos para cada gen están normalizados frente a los niveles de expresión al inicio del tratamiento (día 0), al que se le asigna un valor relativo de 1.

1.5. Análisis de la acumulación diferencial de proteínas en el flavedo y en la pulpa de frutos de naranja 'Navelina' durante la conservación a 2 y 12 °C

Con el objetivo de estudiar los cambios en el proteoma asociados a la estimulación de la coloración y el aumento en el contenido de carotenoides que tiene lugar durante el almacenamiento a 12 °C, se procedió a realizar un análisis comparativo del perfil de proteínas en el flavedo y pulpa de frutos de naranja 'Navelina' recién traídos de campo (coloración inicial $a/b = -0,11 \pm 0,02$) (Apartado 10 de Material y Métodos) con frutos almacenados a 2 y 12 °C durante 3 semanas (**Figura 28**), ya que fue en este momento donde se observaron los mayores diferencias de coloración entre ambas temperaturas (**Figura 15**).

En las muestras de flavedo se identificaron 14 proteínas con acumulación diferencial (**Tabla 9**), sin embargo, en las correspondientes muestras de pulpa no se identificó ninguna proteína con patrón distinto a 2 y/o 12 °C respecto a las muestras de frutos recién traídos de campo. Por ello, se procedió a realizar el estudio comparativo del proteoma de pulpa en frutos almacenados 7 semanas a 2 y 12 °C, ya que en pulpa fue tras este periodo de almacenamiento donde se observó la mayor diferencia en el contenido de carotenoides totales (**Figura 19**). Del análisis comparativo de estas muestras de pulpa respecto al tiempo inicial se identificaron 4 proteínas con una acumulación diferencial a 2 y/o 12 °C (**Tabla 9**). Tanto en el caso de los análisis de muestras de flavedo como de pulpa, las proteínas que se acumularon de forma diferencial se seleccionaron para realizar una identificación mediante huella peptídica (Peptide Mass Fingerprint) por MS-MS/MS y, posteriormente, por búsqueda de homología utilizando el algoritmo MASCOT en las base de datos disponibles (NCBI no redundante, UniRef y *Citrus* Functional Genomics Project, CFGP).

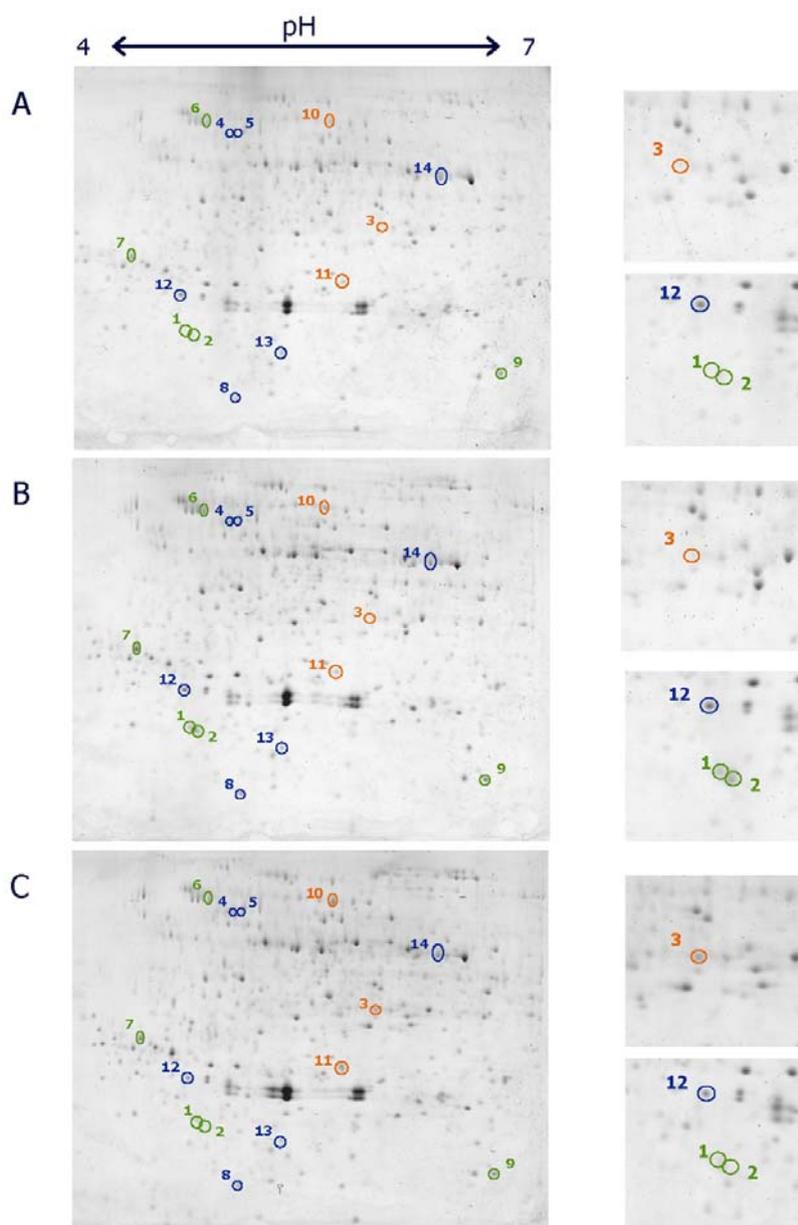


Figura 28. Geles bidimensionales representativos del proteoma de flavedo de naranjas 'Navelina'. En cada gel se cargaron 25 μ g de proteínas totales del flavedo de naranja 'Navelina' recién cosechados (A) y de flavedo de frutos a los 21 días de almacenamiento a 2 °C (B) y 12 °C (C). Las proteínas con una acumulación diferencial en las diferentes muestras (Tabla 9) se indican con círculos. Los círculos azules representan aquellas proteínas que mostraron un mismo perfil de acumulación a 2 y 12 °C, y distinto al del flavedo de frutos recién cosechados, los círculos naranjas aquellas proteínas que presentaron una mayor acumulación a 12 °C que a 2 °C y al inicio del experimento y los verdes aquellas que se acumularon más a 2 °C que a 12 °C y al inicio del experimento.

Con el objetivo de poder realizar una comparación cuantitativa de la abundancia de las proteínas entre las muestras almacenadas a 2 y 12 °C, las señales de las proteínas de los geles de 2 y 12 °C se normalizaron frente al valor obtenido para la misma en los geles de las muestras de frutos recién traídos de campo (inicio del almacenamiento) a los que se les asignó el valor arbitrario de 1. De las 14 proteínas identificadas en el flavedo de naranja 'Navelina' con una acumulación diferencial en las distintas temperaturas de conservación (**Tabla 9**), 5 de ellas presentaron una mayor acumulación en los frutos almacenados 3 semanas a 2 °C: dos lectinas (puntos 1 y 7), dos proteínas de choque térmico (heat shock proteins, HSP) (puntos 6 y 9) y una proteína de unión a GTP (punto 2). Tres proteínas, concretamente los puntos 3, 10 y 11, que corresponden respectivamente a una carboxilesterasa (CXS), un factor de transcripción tipo homeobox dependiente de luz y una glutatión transferasa, mostraron una mayor acumulación, aproximadamente el doble, en el flavedo de frutos almacenados a 12 °C que a 2 °C. Por el contrario, otras tres proteínas, una cafeoil-CoA O-metiltransferasa (punto 12) y una fosfolípido-hidroperóxido glutatión peroxidasa (punto 13) y la subunidad grande de la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (punto 14) se reprimieron durante el almacenamiento a ambas temperaturas de conservación, siendo, en general, esta disminución mayor en los frutos que permanecieron a 12 °C (**Tabla 9**). Los puntos 4 (similar a una proteína de uva), 5 (HSP 70) y 8 (HSP citosólica clase II) mostraron un patrón de acumulación similar, acumulándose durante la conservación a 2 y a 12 °C (**Tabla 9**).

Tabla 9. Cambios relativos en la abundancia de 18 proteínas en el flavedo y en la pulpa de frutos de naranja 'Navelina' almacenados a 2 y 12 °C, respecto a los frutos recién traídos de campo. Las proteínas con acumulación diferencial se identificaron mediante el software PD-Quest (BioRad) y la abundancia relativa de cada proteína (punto) se calculó normalizando frente a la señal obtenida para ese mismo punto en los correspondientes geles de muestras de flavedo o pulpa de frutos recién traídos de campo, a los que se les asignó el valor de 1. La anotación de las proteínas se realizó mediante huella peptídica (Peptide Mass Fingerprint) por MS-MS/MS y, posteriormente, por búsqueda de homología utilizando el algoritmo MASCOT en las base de datos disponibles. El valor entre paréntesis indica el valor umbral a partir del cual la anotación de la proteína es significativamente correcta ($p < 0,05$). (Página siguiente).

Tabla 9. (Página anterior)

| Tejido | Punto | Abundancia Relativa | | Valor Ident. ^a | Proteína más similar (Organismo) | Nº Acc. | |
|---------|-------|---------------------|-------|---------------------------|---|--|--------------|
| | | 2 °C | 12 °C | | | | |
| Flavado | 1 | 6,8 | 1,6 | 139 (81) | Lectina (<i>Citrus paradisi</i>) | gij11596188 | |
| | 2 | 6,7 | 1,6 | 73 (69) | Proteína de unión a GTP (<i>Oryza sativa</i>) | gij118071348 | |
| | 3 | 4,5 | 9,7 | 150 (67) | Carboxilesterasa (<i>Malus pumila</i>) | gij182697955 | |
| | 4 | 5,3 | 5,5 | 72 (69) | Proteína hipotética (<i>Vitis vinifera</i>) | gij1147770307 | |
| | 5 | 3,4 | 3,5 | 89 (81) | Heat Shock Proteína mitocondrial de 70 kDa (<i>Oryza sativa</i>) | gij127476086 | |
| | 6 | 2,4 | 1,5 | 98 (69) | Heat Shock Proteína de 70 kDa (<i>Zea mays</i>) | gij229464991 | |
| | 7 | 2,0 | 1,2 | 184 (81) | Lectina (<i>Citrus paradisi</i>) | gij11596188 | |
| | 8 | 1,6 | 1,4 | 124 (53) | Heat Shock Proteína Citosólica de clase II de bajo peso molecular (<i>Prunus dulcis</i>) | gij15257560 | |
| | 9 | 1,6 | 1,1 | 100 (67) | Heat Shock Proteína Citosólica de clase I de 17,7 kDa (<i>Ageratina adenophora</i>) | gij118722670 | |
| | 10 | 1,4 | 2,3 | 64 (56) | Proteína Homeobox luminodependiente (<i>Arabidopsis thaliana</i>) | gij1166897999 | |
| | 11 | 1,1 | 2,3 | 142 (73) | Glutación S-transferasa (<i>Arabidopsis thaliana</i>) | gij115375408 | |
| | 12 | 0,8 | 0,4 | 260 (73) | Cafeoil-CoA O-Metiltransferasa (<i>Eucalyptus globulus</i>) | gij30580381 | |
| | 13 | 0,8 | 0,4 | 146 (69) | Fosfolípido-hidroperóxido glutación peroxidasa (<i>Citrus sinensis</i>) | gij1544437 | |
| | 14 | 0,5 | 0,5 | 251 (81) | Subunidad grande de Ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (<i>Brasillocrotan mamominha</i>) | gij62861230 | |
| | 15 | 2,1 | 1,4 | 301 (73) | 2,3-bisfosfoglicerato-independiente fosfoglicerato mutasa (<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>) | gij13914394 | |
| | Pulpa | 16 | 2,3 | 2,3 | 99 (73) | Transaldolasa (<i>Lycopersicon esculentum</i>) | gij32481059 |
| | | 17 | 0,8 | 1,7 | 256 (73) | Heat Shock Proteína de 70 kDa (<i>Cucumis sativus</i>) | gij1143427 |
| | | 18 | 0,4 | 1,3 | 148 (73) | Factor citosólico (<i>Trifolium pratense</i>) | gij184453208 |

^a Valor de identificación

En la pulpa de naranjas 'Navelina' se identificaron un total de 4 proteínas con un patrón de acumulación distinto en las muestras almacenadas 7 semanas a a 2 y/o 12 °C respecto a las de los frutos recién traídos de campo (**Tabla 9**). Dos de estas proteínas presentaron una mayor acumulación en las muestras conservadas a 2 y 12 °C, y ambas se identificaron como enzimas implicadas en el metabolismo de azúcares: una 2,3-bifosfoglicerato-independiente fosfoglicerato mutasa (punto 15) y una transaldolasa (punto 16). Las otras dos proteínas de acumulación diferencial en pulpa, una HSP 70 (punto 17) y un factor citosólico (punto 18), fueron menos abundantes en la pulpa de frutos almacenados a 2 °C respecto a los frutos recién traídos de campo mientras que a 12 °C mostraron un patrón inverso (**Tabla 9**).

2. Efecto de la temperatura de conservación sobre la biosíntesis y acumulación de carotenoides en frutos de naranja 'Navelate' y de mandarina 'Clemenules'

Una vez caracterizado el efecto de la temperatura de conservación en los frutos de naranja 'Navelina' recolectados en diferentes estadios de maduración, se consideró de interés analizar el efecto en otras variedades de relevancia agronómica y comercial, y si los efectos generales sobre la coloración del fruto y la acumulación de carotenoides seguían los mismos patrones. Para ello, se seleccionaron frutos que ya habían iniciado la coloración de naranja 'Navelate' con índice $a/b = 0,26 \pm 0,00$ y frutos de mandarina 'Clemenules', que ya habían comenzado la desverdización natural, pero que aún presentaban tonalidades verdes en el flavedo ($a/b = -0,19 \pm 0,03$) (**Figura 29**). Los frutos de ambas variedades se almacenaron a 2 y 12 °C durante 9 semanas.



Figura 29. Aspecto del color externo del flavedo de los frutos de naranja 'Navelate' ($a/b = 0,26 \pm 0,02$) y de mandarina 'Clemenules' ($a/b = -0,19 \pm 0,03$) utilizados para el estudio de la conservación a 2 y a 12 °C.

2.1. Cambios en el color externo e interno de los frutos durante la conservación a 2 y 12 °C

En la **Figura 30** se observan los cambios en la coloración externa de los frutos de naranja 'Navelate' conservados a 2 y 12 °C durante 8 semanas. La exposición a 12 °C promovió de forma importante la pigmentación y, después de varias semanas de conservación, los frutos alcanzaron una coloración naranja intensa característica. A 2 °C, por el contrario, los cambios en la coloración externa fueron mucho menores, manteniéndose tonalidades similares a las iniciales.

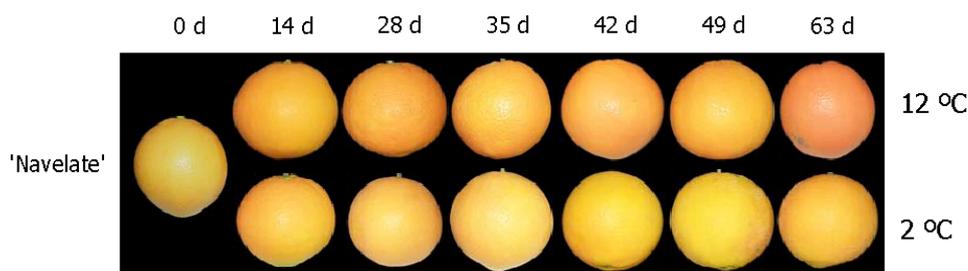


Figura 30. Aspecto del flavedo de los frutos de naranja 'Navelate' durante la conservación a 2 y 12 °C.

Los frutos de mandarina 'Clemenules' recolectados durante el viraje natural de la coloración ($a/b = -0,19 \pm 0,03$) experimentaron una rápida e importante estimulación de la coloración durante la conservación a 12 °C. Tan sólo tres semanas después de la recolección los frutos alcanzaron un índice de color superior a 0,4 y al final de la misma llegaron a valores superiores a 1 ($1,17 \pm 0,05$), correspondientes a una coloración anaranjada-rojiza intensa. El color de los frutos expuestos a bajas temperaturas solamente experimentó un ligero incremento, llegando a las 8 semanas a valores de a/b de $0,18 \pm 0,07$ (**Figura 31 A**). En los frutos de naranja 'Navelate', que tuvieron en el momento de la cosecha una coloración más alta, la conservación a 12 °C también aceleró el cambio de color respecto a los frutos conservados en frío alcanzando un índice a/b de 0,6 que es similar al índice de color que adquieren los frutos madurados de forma natural en campo, pero con diferencias menores que en los de mandarina (**Figura 31 B**).

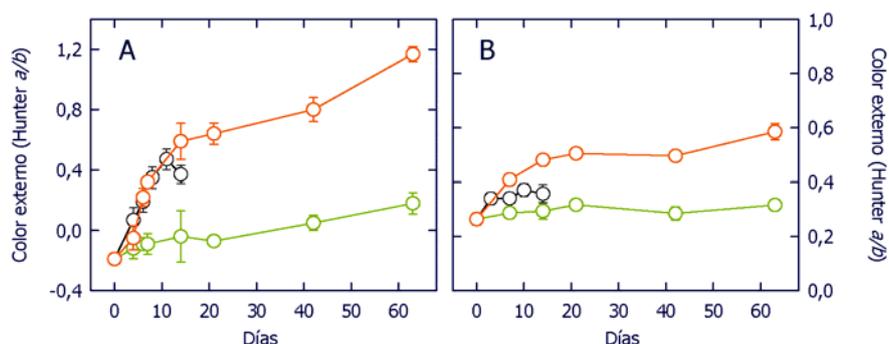


Figura 31. Evolución del color del flavedo de frutos de mandarina 'Clemenules' ($a/b = -0,19 \pm 0,03$) (A) y de naranja 'Navelate' (B) ($a/b = 0,26 \pm 0,02$). Los frutos se almacenaron a 20 °C (○) durante dos semanas y a 12 °C (◻) y 2 °C (◻) durante 9 semanas. Los valores son la media \pm DE de al menos 10 frutos independientes.

2.2. Evolución del contenido en clorofilas y carotenoides totales durante la conservación a 2 y 12 °C

La evolución del contenido de clorofilas totales del flavedo de mandarina 'Clemenules' y naranja 'Navelate' se muestra en la **Figura 32**. El flavedo de los frutos de 'Clemenules' tenía una concentración inicial de clorofilas 10 veces mayor que los de 'Navelate'. A lo largo de la conservación, el contenido de clorofilas disminuyó en ambas variedades independientemente de la temperatura, pero de forma más rápida en los frutos conservados a 12 °C. En los frutos de mandarina 'Clemenules' después de 40 días a 12 °C se redujo la concentración de clorofila un 82%, mientras que en los conservados a 2 °C el contenido en estos pigmentos era más de tres veces superior (**Figura 32 A**). En 'Navelate' tras 30 días de almacenamiento a 2 ó 12 °C los niveles de clorofilas fueron indetectables (**Figura 32 B**).

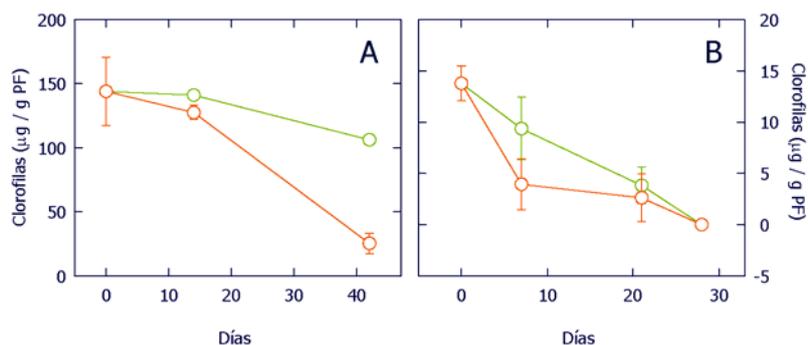


Figura 32. Evolución del contenido de clorofilas totales en el flavedo de frutos de mandarina 'Clemenules' ($a/b = -0,19 \pm 0,03$) (A) y de naranja 'Navelate' (B) ($a/b = 0,26 \pm 0,02$). Los frutos se almacenaron a 12 °C (○) y 2 °C (○) durante 9 semanas. Los valores son la media \pm DE de al menos 10 frutos independientes.

Los carotenoides totales, por su parte, se incrementaron progresivamente durante el almacenamiento a 12 °C tanto en mandarina 'Clemenules' como en 'Navelate'. Al final de los respectivos períodos de conservación, la concentración de carotenoides totales se triplicó en el flavedo de ambas variedades a 12 °C, mientras que a 2 °C se duplicó en los de mandarina y aumentó un 50% en los de 'Navelate' (Figura 33).

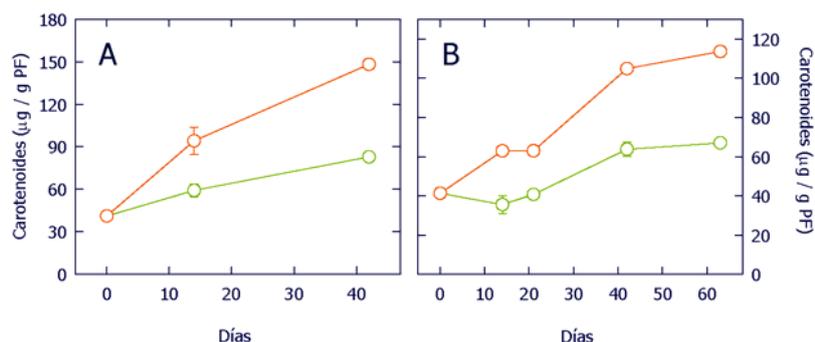


Figura 33. Evolución del contenido de carotenoides totales en el flavedo de frutos de mandarina 'Clemenules' (A) y de naranja 'Navelate' (B) con un a/b inicial de $-0,19 \pm 0,03$ y $0,26 \pm 0,02$, respectivamente, durante el almacenamiento a 12 °C (○) y 2 °C (○). Los valores son la media \pm DE de al menos 3 análisis independientes.

3. Estudio de la implicación del etileno en la estimulación de la carotenogénesis durante la conservación a 12 °C: Efecto de la aplicación de 1-MCP a frutos de mandarina 'Clemenules'

Con el objeto de estudiar si los mecanismos responsables de la estimulación de la coloración que se produce por la exposición de los frutos cítricos a 12 °C pueden estar mediados por la acción del etileno, se abordó la caracterización fisiológica y molecular de la biosíntesis y acumulación de carotenoides en el flavedo y pulpa de frutos de mandarina 'Clemenules' tratados con el inhibidor de la acción del etileno 1-MCP (1 μ L / L), y conservados posteriormente a 12 °C (Apartado 3.2 de Materiales y Métodos). Para ello, se recolectaron frutos de mandarina 'Clemenules' con un índice de coloración inicial de $0,00 \pm 0,02$, justo en el momento del viraje del color, se trataron con una concentración de 1-MCP que en otros experimentos se ha demostrado que es efectiva inhibiendo la acción del etileno en los frutos cítricos y se almacenaron a 12 °C durante 7 semanas (**Figura 34**).

Hay que destacar que los frutos de mandarina 'Clemenules' tratados con 1-MCP desarrollaron importantes lesiones y daños en la piel durante la conservación a 12 °C (**Figura 34 C**). Las lesiones en los frutos comenzaron a visualizarse tan sólo una semana después del tratamiento y avanzaron en extensión y severidad con el tiempo. Los síntomas iniciales de las lesiones aparecieron como manchas más o menos extensas de coloración marrón-pardo, distribuidas irregularmente por la superficie del fruto y que, conforme se extendieron, formaron áreas oscurecidas con apariencia de tejido necrosado o senescente. Este tipo de lesiones afectó a un gran porcentaje de los frutos tratados a partir de la tercera semana tras la aplicación de 1-MCP, por lo que no se pudo recolectar tejido ni seguir evaluando los parámetros de calidad el fruto.

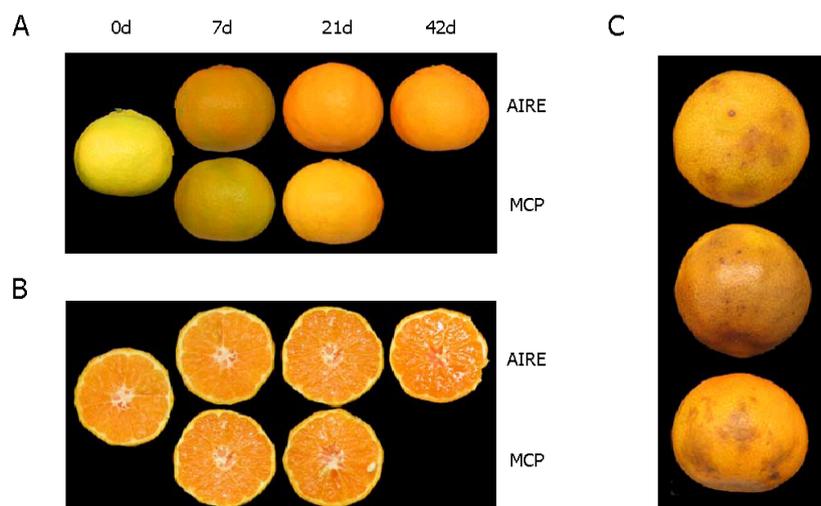


Figura 34. Aspecto de los frutos de mandarina 'Clemenules' con un a/b inicial de $0,00 \pm 0,02$ sometidos a la conservación a $12\text{ }^{\circ}\text{C}$ en atmósfera de aire y tratados previamente con 1-MCP ($1\text{ }\mu\text{L} / \text{L}$). **A.** Aspecto externo del flavedo; **B.** Aspecto interno de la pulpa, y **C.** Detalles de los daños causados por el tratamiento con 1-MCP en el flavedo tras 26 días de la primera aplicación.

3.1. Cambios en el color externo e interno de los frutos

La evolución del color externo en los frutos de mandarina 'Clemenules' tratados o no con 1-MCP a lo largo de la conservación se muestra en la **Figura 35**. Los frutos control (sin 1-MCP) mostraron una curva de coloración característica, con un incremento rápido durante las 3 primeras semanas y estabilizándose posteriormente. Los frutos tratados con 1-MCP mostraron una evolución similar, pero ligeramente más ralentizada y a partir de los 10 días de conservación, desarrollaron menos color que los frutos control. Al final del tratamiento el índice a/b de los frutos tratados con 1-MCP fue alrededor de un 30% inferior al de los frutos no tratados (**Figura 35**).

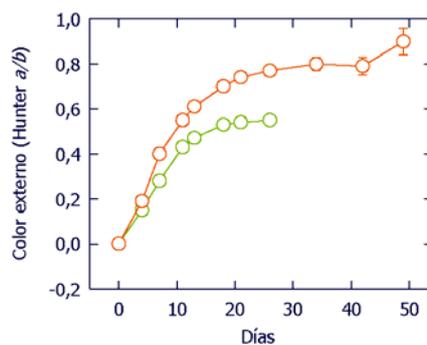


Figura 35. Efecto de la aplicación de 1-MCP en la evolución del color del flavedo en frutos de mandarina 'Clemenules' ($a/b = 0,00 \pm 0,02$) durante la conservación a 12 °C. Se muestra la evolución de los frutos tratados con 1 μL / L de 1-MCP (○) y los no tratados (○). Los valores son la media \pm DE de al menos 10 frutos independientes.

3.2. Evolución del contenido y la composición de carotenoides en el flavedo y en la pulpa de los frutos

La evolución del contenido total de carotenoides en el flavedo y la pulpa de los frutos de mandarina 'Clemenules' tratados con 1-MCP y mantenidos a 12 °C mostraron escasas diferencias respecto a los tejidos de los frutos no tratados (**Figura 36**). Durante la conservación a 12 °C el flavedo aumentó la concentración de carotenoides casi tres veces, pero el tratamiento con 1-MCP sólo redujo aproximadamente un 20% este incremento tras 3 semanas de almacenamiento (**Figura 36 A**). En la pulpa el incremento en carotenoides fue de menor magnitud y el tratamiento con 1-MCP sólo redujo en un 10% la concentración de estos pigmentos después de 3 semanas (**Figura 36 B**).

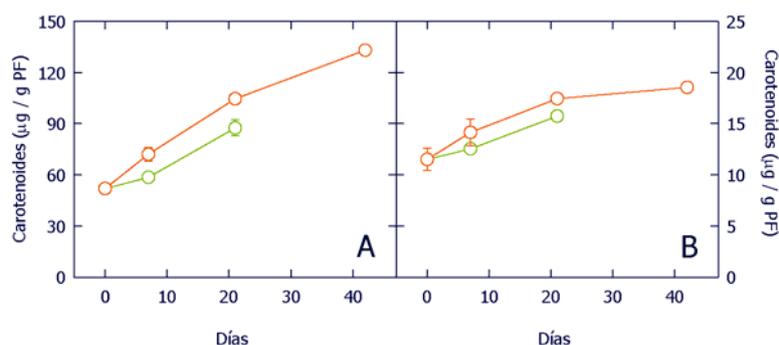


Figura 36. Evolución del contenido de carotenoides totales en el flavedo (**A**) y en la pulpa (**B**) de frutos de mandarina 'Clemenules' ($a/b = 0,00 \pm 0,02$) durante la conservación a 12 °C. Se muestran la evolución de los frutos tratados con 1 μ L / L de 1-MCP (◐) y los no tratados (○). Los valores son la media \pm DE de al menos 3 análisis independientes.

El efecto de la aplicación de 1-MCP en la composición y concentración de carotenoides individuales, determinados mediante HPLC-PDA, en el flavedo y la pulpa de frutos de mandarina 'Clemenules' conservados a 12 °C se muestra en las **Figura 37** y **Figura 38**, respectivamente. De forma general, en los frutos control se incrementó el contenido de la mayoría de carotenoides (excepto zeaxantina y *trans*-violaxantina en el flavedo). El tratamiento con 1-MCP previno la mayoría de los incrementos en la concentración de carotenoides, al menos durante las 3 semanas posteriores a la aplicación, tiempo en el que se pudieron recolectar frutos sin lesiones en la piel. Excepto tres xantofilas de la rama β,β (β -criptoxantina, zeaxantina y anteraxantina) el resto de carotenoides se mantuvieron a niveles similares a los iniciales en el flavedo de frutos tratados (**Figura 37**).

En la pulpa, los carotenoides mostraron algunas diferencias respecto al flavedo. Los carotenoides iniciales y las ϵ,β -xantofilas se mantuvieron constantes en los frutos almacenados a 12 °C, y el inhibidor no afectó su concentración, excepto la α -criptoxantina que mostró un ligero incremento. Un patrón similar se observó en los pigmentos de la rama β,β , excepto para la anteraxantina, que experimentó un incremento de su concentración en los frutos almacenados a 12 °C frente a los tratados con 1-MCP (**Figura 38**).

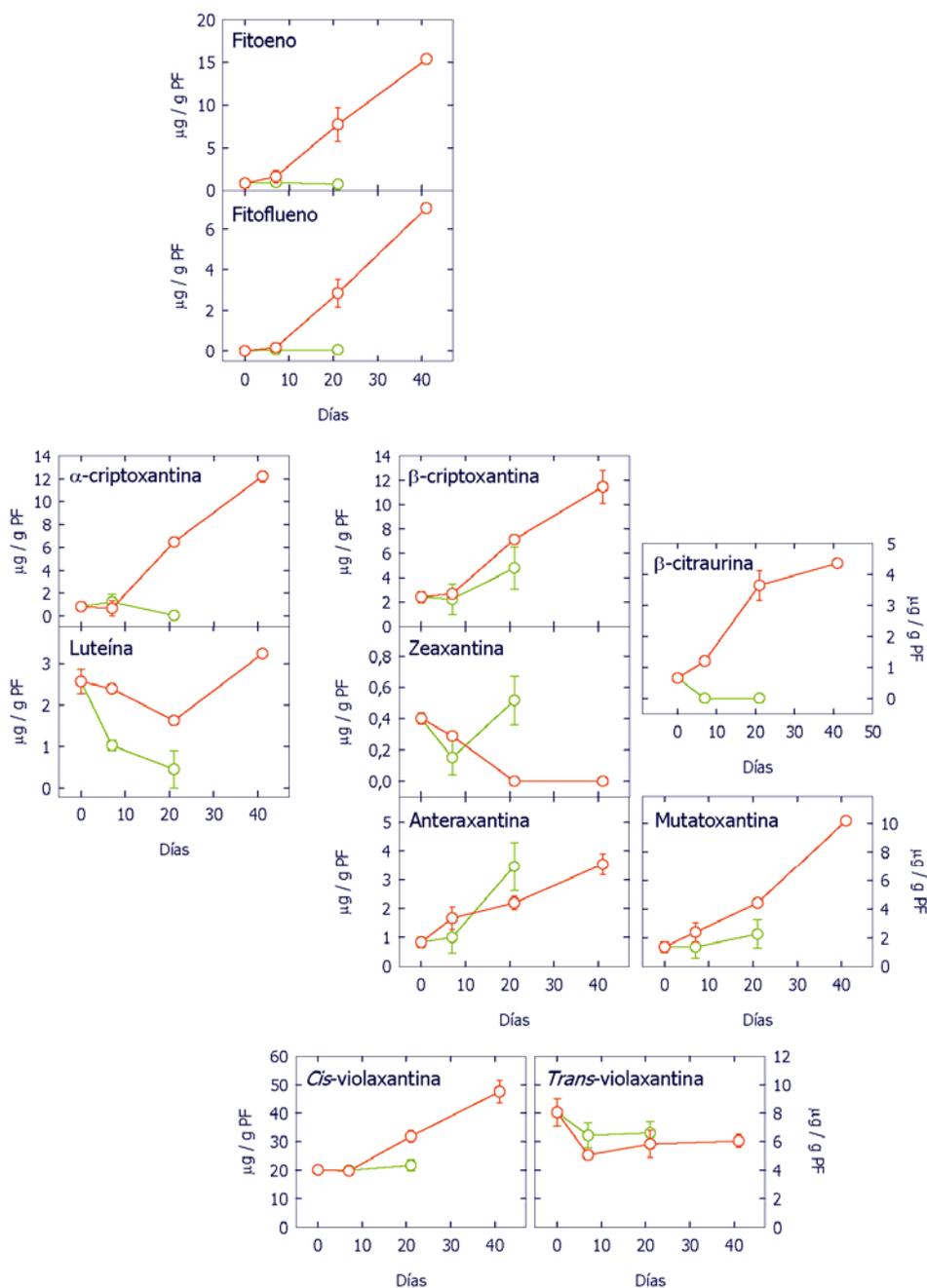


Figura 37. Efecto de la aplicación de 1-MCP en la evolución del contenido de carotenoides en el flavedo de frutos de mandarina 'Clemenules', recolectados con un a/b inicial de $0,00 \pm 0,02$, almacenados durante 6 semanas a $12\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se muestran la evolución de los frutos tratados con $1\text{ }\mu\text{L/L}$ de 1-MCP (○) y los no tratados (○). Los valores son la media \pm DE de al menos 3 análisis independientes.

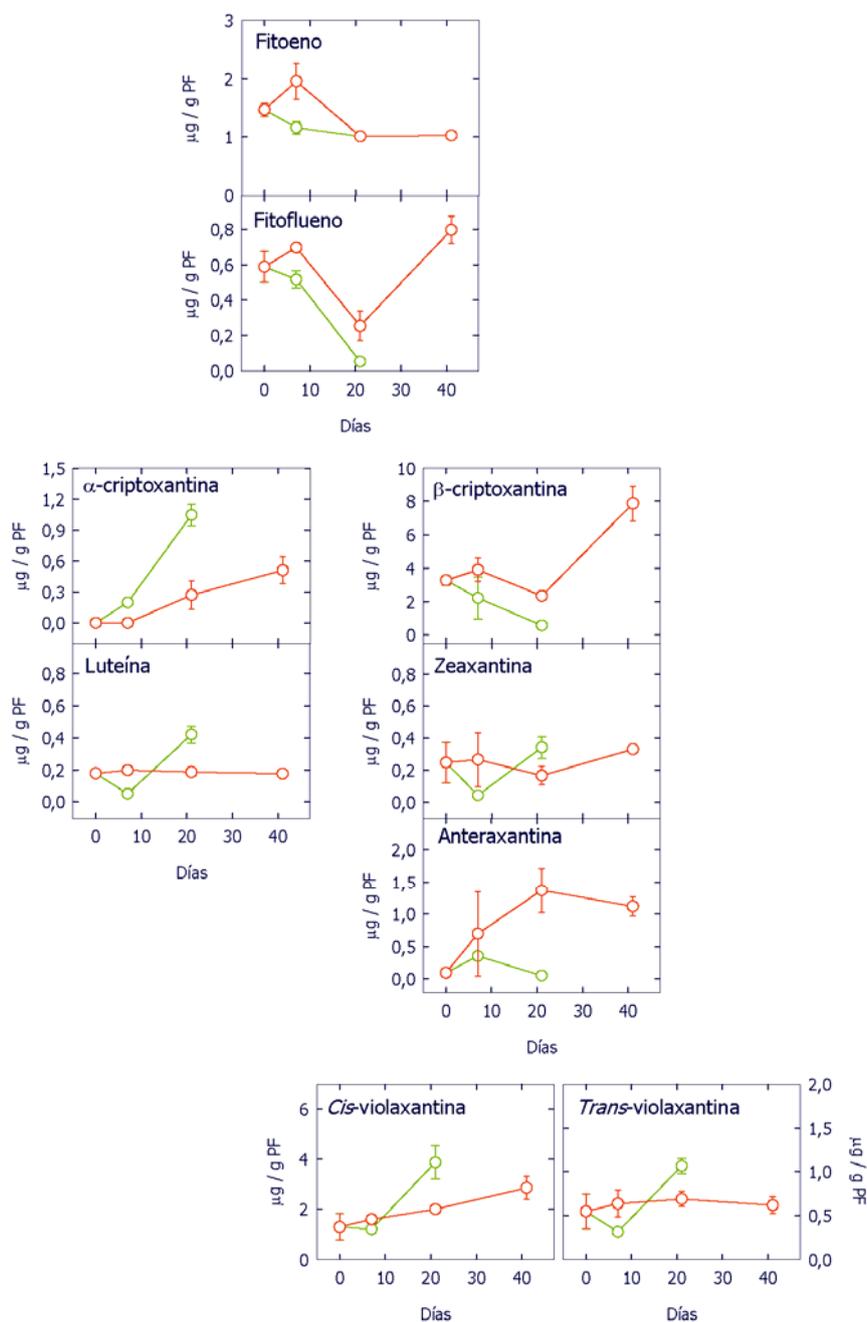


Figura 38. Efecto de la aplicación de 1-MCP en la evolución del contenido de carotenoides en la pulpa de frutos de mandarina 'Clemenules', recolectados con un a/b inicial de $0,00 \pm 0,02$, almacenados durante 6 semanas a $12\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se muestra la evolución de los frutos tratados con $1\text{ }\mu\text{L/L}$ de 1-MCP (\circ) y los no tratados (\circ). Los valores son la media \pm DE de al menos 3 análisis independientes.

3.3. Análisis de la expresión de genes de la biosíntesis de carotenoides en el flavedo y la pulpa

El análisis de la expresión relativa de los genes en el flavedo de mandarina 'Clemenules' mostró 2 perfiles diferentes. En el primero de ellos, que se observó para *PSY* y *βLCY2*, se caracterizó por un incremento transitorio de la expresión a lo largo del periodo de almacenamiento a 12 °C, siendo este aumento menor en los frutos tratados con 1-MCP y disminuyendo dramáticamente a los 21 d de tratamiento. La expresión de *PSY* aumentó 4,5 veces en los frutos control frente a 2 veces en los frutos tratados con el inhibidor. De igual forma, la expresión de *βLCY2* se incrementó 2,5 veces a los 21 días a 12 °C en los frutos no tratados. Un segundo perfil se observó para los genes *βLCY1* y *βCHX*, y se caracterizó por una bajada transitoria de la expresión durante las 3 primeras semanas y un aumento posterior (**Figura 39**).

La expresión en la pulpa de los cuatro genes analizados fue, en términos generales, diferente a la del flavedo, donde se mantuvo o redujo la acumulación de todos los transcritos durante la exposición a 12 °C. La aplicación de 1-MCP, produjo una reducción general en la expresión de todos los genes que, excepto para el gen *PSY*, fue mucho mayor que en los frutos no tratados (**Figura 40**).

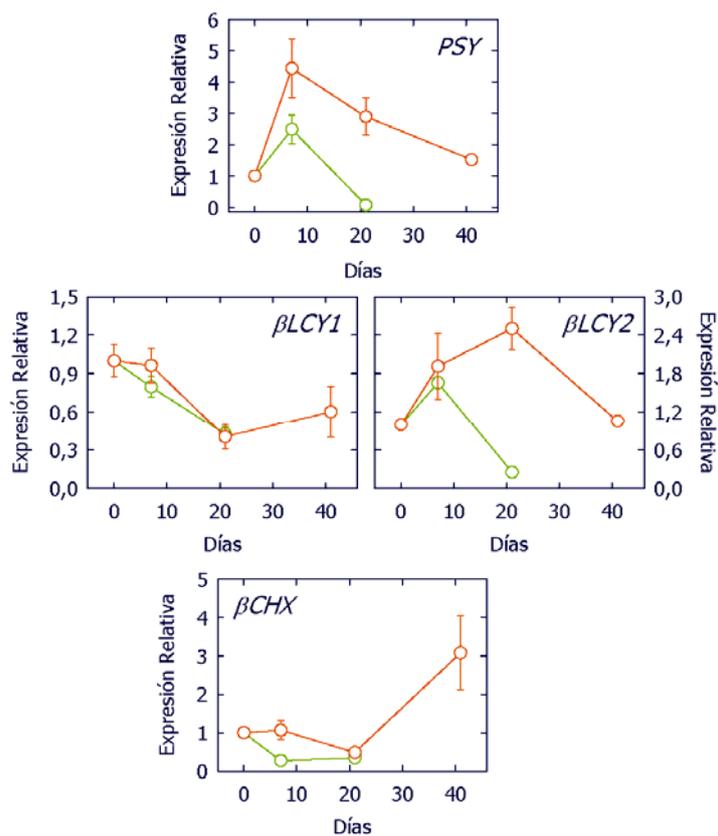


Figura 39. Efecto de la aplicación de 1-MCP en la expresión relativa de cuatro genes implicados en la biosíntesis de carotenoides en el flavedo de frutos de mandarina recolectados con un a/b inicial de $0,00 \pm 0,02$ durante el almacenamiento a $12\text{ }^{\circ}\text{C}$ tratados con $1\text{ }\mu\text{L} / \text{L}$ de 1-MCP (◻) y los no tratados (○). Los valores obtenidos para cada gen están normalizados frente a los niveles de expresión al inicio del tratamiento (día 0), al que se le asigna un valor relativo de 1.

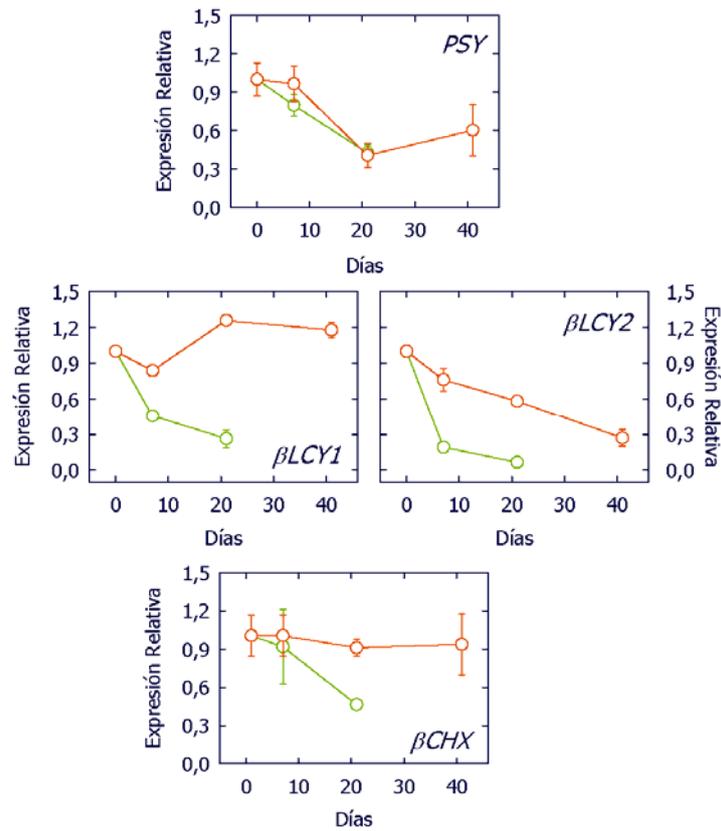


Figura 40. Efecto de la aplicación de 1-MCP en la expresión relativa de genes implicados en la biosíntesis de carotenoides en la pulpa de frutos de mandarina recolectados con un a/b inicial de $0,00 \pm 0,02$ durante el almacenamiento a $12\text{ }^{\circ}\text{C}$ tratados con $1\text{ }\mu\text{L} / \text{L}$ de 1-MCP (○) y los no tratados (◻). Los valores obtenidos para cada gen están normalizados frente a los niveles de expresión al inicio del tratamiento (día 0), al que se le asigna un valor relativo de 1.

CAPÍTULO II. EFECTO DEL ACONDICIONAMIENTO TÉRMICO EN LA BIOSÍNTESIS Y ACUMULACIÓN DE CAROTENOIDES EN FRUTOS CÍTRICOS

Los frutos de determinadas variedades de cítricos son sensibles a desarrollar DF cuando se almacenan por debajo de una determinada temperatura crítica, lo que afecta su valor comercial. Por ello, se han intentado desarrollar métodos para evitar estas alteraciones, entre los que destaca por su eficacia los tratamientos de acondicionamiento térmico, que, además, reducen la incidencia de podredumbres. Observaciones preliminares realizadas en nuestro laboratorio y por otros grupos, indican que en determinadas circunstancias estos tratamientos producen una pérdida de la coloración externa de los frutos cítricos (**Figura 41**) (Rodov *et al.*, 1995; Ben-Yehoshua *et al.*, 1995; Porat *et al.*, 2000; Plaza *et al.*, 2003; Plaza *et al.*, 2004; Erkan *et al.*, 2005b).

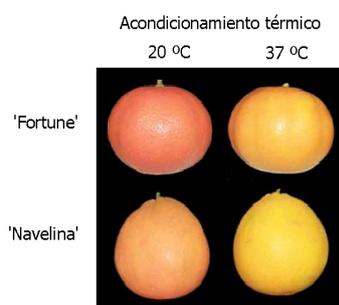


Figura 41. Efecto de 48 h de acondicionamiento térmico (37 °C, 90-95% HR) en el color externo de frutos de naranja 'Navelina' y mandarina 'Fortune'. Los frutos control permanecieron 3 días a 20 °C (90-95% HR).

En base a estos antecedentes, en esta Tesis Doctoral se planteó el estudio del efecto del acondicionamiento térmico sobre la biosíntesis y acumulación de carotenoides. Para ello, se abordó la caracterización, tanto fisiológica como molecular, de la biosíntesis y acumulación de carotenoides a lo largo del periodo de acondicionamiento (3 días a 37 °C) (González-Aguilar *et al.*, 1997). Además, para comprobar si esta pérdida de coloración era reversible o no, se estudió el efecto de la aplicación posterior de etileno, ya que esta hormona estimula la coloración en los cítricos. Para llevar a cabo estos objetivos, se seleccionaron dos variedades el híbrido de mandarina 'Fortune' y la naranja 'Navelina' (Sala *et al.*,

1992; Lafuente *et al.*, 1997) en tres estadios de coloración diferentes (**Figura 42**) (Apartado 3.3 de Materiales y Métodos).

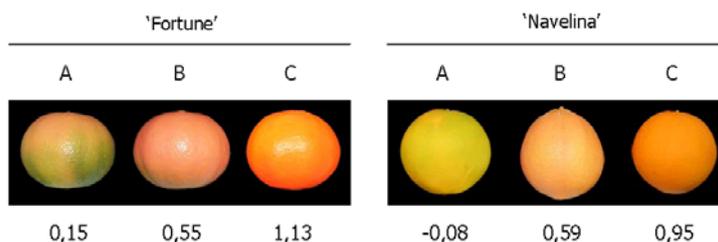


Figura 42. Aspecto del color externo de frutos de mandarina 'Fortune' y naranja 'Navelina' en los tres estadios de coloración recolectados para este estudio. **A.** Frutos virando; **B.** Frutos coloreados, y **C.** Frutos totalmente coloreados.

1. Caracterización de la biosíntesis y acumulación de carotenoides durante el periodo de curado y posterior aplicación de etileno en frutos de mandarina 'Fortune'

Se recolectaron frutos de mandarina 'Fortune' en tres estadios de coloración: A. Frutos virando ($a/b = 0,15 \pm 0,03$); B. Frutos con coloración avanzada ($a/b = 0,55 \pm 0,03$), y C. Frutos totalmente coloreados ($a/b = 1,13 \pm 0,02$) (**Figura 42**) y se sometieron a los tratamientos de acondicionamiento térmico tal y como se describen en el Apartado 3.3 de Materiales y Métodos.

1.1. Evolución del color del flavedo de frutos de mandarina 'Fortune' durante el curado y posterior aplicación de etileno

El aspecto externo y la evolución del cociente a/b de los frutos de mandarina 'Fortune' sometidos a 3 días de tratamiento a 20 °C (control) y 37 °C (curado) y posterior aplicación de etileno se muestran en la **Figura 43** y **Figura 44**, respectivamente. En estos frutos, la relación a/b se redujo a la mitad después de 2 d a 37 °C, mientras que a 20 °C se observó un importante aumento del color (2,5 veces, en 3 días) (**Figura 44 A**). En los frutos coloreados, con un a/b inicial de $0,55 \pm 0,03$, la exposición a 37 °C redujo (18%) el índice de color, pero no de forma tan acusada como en el estadio anterior (**Figura 44 B**), mientras que los frutos almacenados 3 días a 20 °C mostraron un ligero aumento de coloración ($a/b = 0,67 \pm 0,04$) (**Figura 44 B**). En el estadio más coloreado (estadio C), no se produjeron efectos significativos en ninguna de los dos temperaturas ensayadas (**Figura 44 C**).

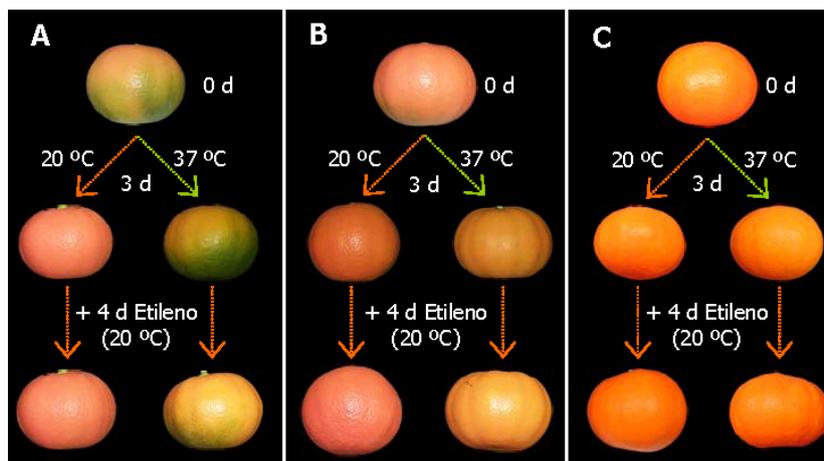


Figura 43. Aspecto externo de los frutos de mandarina 'Fortune' en los tres estadios de maduración, sometidos a los siguientes tratamientos: 3 d a 20 °C (control) o 37 °C (curados) y posterior aplicación de etileno (10 μ L / L) durante 4 días a 20 °C. La nomenclatura **A-C** se corresponde con los tres estadios de coloración de la **Figura 42: A.** Frutos virando ($a/b = 0,15 \pm 0,03$); **B.** Frutos con coloración avanzada ($a/b = 0,55 \pm 0,03$), y **C.** Frutos totalmente coloreados ($a/b = 1,13 \pm 0,02$).

Para determinar si la disminución del color por el tratamiento de curado era un efecto reversible o no, los frutos de mandarina 'Fortune' en los tres estadios se trataron durante 4 días con 10 μ L / L de etileno a 20 °C y se analizó la evolución del color (**Figura 43**). En general, la aplicación del etileno estimuló la coloración tanto de los frutos curados como los control (**Figura 43**). En los frutos curados, el efecto del etileno fue mayor en los de menor coloración inicial (estadios A y B) y en los que este tratamiento produjo una mayor reducción del color (**Figura 44**). Los frutos recuperaron, tras 4 días de tratamiento con etileno (10 μ L / L), su coloración inicial (**Figura 44**). Así en el estadio A, el etileno incrementó el cociente a/b aproximadamente un 79% (**Figura 44 A**), mientras que en los estadios B y C sólo lo aumentó un 28% (**Figura 44 B**) y un 9% (**Figura 44 C**), respectivamente. Aunque la coloración final en los frutos control (3 d a 20 °C) tras el tratamiento con etileno fue mayor que en los curados, el efecto del etileno fue similar en ambos frutos. En los frutos control, al igual que en los frutos curados, cuanto mayor fue la coloración inicial del fruto, menor fue el efecto del etileno en el incremento de color (**Figura 44**).

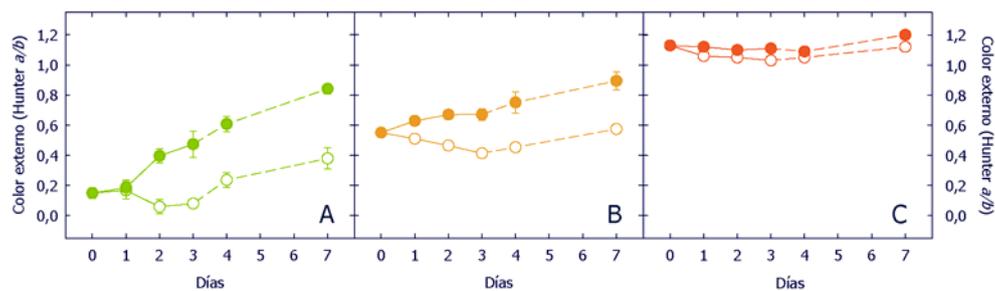


Figura 44. Evolución del color del flavedo de frutos de mandarina 'Fortune' durante 3 días de tratamiento térmico a 37 °C (○) o a 20 °C (●) (líneas continuas) y la posterior aplicación de etileno (10 μ L / L) durante 4 días a 20 °C (líneas discontinuas). La nomenclatura **A-C** se corresponde con los tres estadios de coloración de la **Figura 42**: **A**. Frutos virando ($a/b = 0,15 \pm 0,03$); **B**. Frutos con coloración avanzada ($a/b = 0,55 \pm 0,03$), y **C**. Frutos totalmente coloreados ($a/b = 1,13 \pm 0,02$). Los valores son la media \pm DE de al menos 10 frutos independientes.

1.2. Evolución del contenido de clorofilas y carotenoides en el flavedo y en la pulpa de frutos de mandarina 'Fortune' durante el curado y posterior aplicación de etileno

El contenido de clorofilas y de carotenoides totales en el flavedo de los frutos de mandarina 'Fortune' curados o no y tras la posterior aplicación de etileno se resume en la **Tabla 10**. En el momento de la cosecha, el mayor contenido en clorofilas totales se detectó en el flavedo de frutos virando (estadio A). En estos frutos, la concentración de clorofilas se redujo aproximadamente un 60% durante el periodo de almacenamiento, tanto en los frutos curados como en los controles. El posterior tratamiento con etileno redujo el contenido de clorofilas un 41% en los frutos curados, mientras que en los controles la disminución fue mayor (86%). En los recolectados en estadios de maduración más avanzados (estadio B y C) el contenido en clorofilas fue muy bajo ($<5 \mu\text{g} / \text{g PF}$) y no se detectaron cantidades apreciables después de los distintos tratamientos (**Tabla 10**).

Tabla 10. Contenido de clorofilas y carotenoides totales en el flavedo de frutos de mandarina 'Fortune' en tres estadios de coloración, después de 3 días a 20 o 37 °C y posterior aplicación de etileno (10 µL / L) durante 4 días a 20 °C.

| Color (a/b) | T. ^a (°C) | Clorofilas (µg / g PF) | | | Carotenoides (µg / g PF) | | |
|-------------|----------------------|------------------------|--------------|------------------|--------------------------|---------------|------------------|
| | | 0 días | 3 días | + 4 días Etileno | 0 días | 3 días | + 4 días Etileno |
| 0,15 ± 0,03 | 20 | 58,40 ± 0,83 | 24,40 ± 2,80 | 3,04 ± 0,03 | 60,05 ± 3,32 | 82,23 ± 0,53 | 112,45 ± 0,49 |
| | 37 | | 23,00 ± 0,86 | 13,50 ± 0,71 | | 57,95 ± 1,48 | 78,05 ± 8,56 |
| 0,55 ± 0,03 | 20 | 4,07 ± 0,77 | N.D. | N.D. | 63,20 ± 0,99 | 92,00 ± 2,62 | 75,83 ± 1,57 |
| | 37 | | N.D. | N.D. | | 77,85 ± 1,91 | 73,49 ± 8,72 |
| 1,13 ± 0,02 | 20 | N.D. | N.D. | N.D. | 117,99 ± 0,54 | 106,54 ± 9,94 | 122,03 ± 9,43 |
| | 37 | | N.D. | N.D. | | 87,35 ± 1,63 | 102,84 ± 4,01 |

N.D.No detectado

^a Temperatura del acondicionamiento

El efecto del curado sobre el contenido de carotenoides totales en el flavedo de mandarinas 'Fortune' fue dependiente del estadio de maduración del fruto. En el flavedo de los frutos en los estadios A y B el contenido inicial de carotenoides totales fue similar (aproximadamente 60 µg / g PF), mientras que casi se duplicó en los frutos totalmente coloreados (117,99 ± 0,54 µg / g PF) (**Tabla 10**). En los frutos virando (estadio A) el contenido en carotenoides aumentó un 33% después de 3 d a 20 °C y no se alteró en los curados. En frutos en el estadio B, durante los 3 d de exposición a 20°C el contenido en carotenoides aumentó un 45,5% mientras que a 37 °C sólo lo hizo en un 23,3%. Por el contrario, en los totalmente coloreados se mantuvo en los frutos control y disminuyó en los curados (**Tabla 10**). El efecto de la aplicación de etileno en el contenido de carotenoides también fue dependiente del estadio de maduración del fruto y similar en los curados o no. Así, en los frutos virando el tratamiento con etileno aumentó entre un 34-36% el contenido de carotenoides en ambos tratamientos. En los coloreados, la aplicación de la hormona redujo los carotenoides totales, para aumentarlos posteriormente en estadios más avanzados, y de forma similar a 20 °C (14,5%) y a 37 °C (17,7%) (**Tabla 10**).

Para analizar el posible efecto del curado en el contenido de carotenoides totales de la pulpa, se utilizaron frutos de mandarina 'Fortune' de principios de marzo, con un índice $a/b = 0,75 \pm 0,04$ (**Figura 45**). Se seleccionaron estos frutos, ya que están próximos al estadio de cosecha comercial para el consumo en fresco. Adicionalmente, el estudio del efecto del acondicionamiento a 37 °C se

prolongó hasta un total de 7 días. El contenido de carotenoides totales de la pulpa se incrementó un 25 y un 20% a los 3 días de exposición a 20 y 37 °C, respectivamente. El mantenimiento de los frutos durante 4 días adicionales a 37 °C no modificó la concentración de carotenoides totales, mientras que a 20 °C se incrementó un 36% (**Figura 45**).

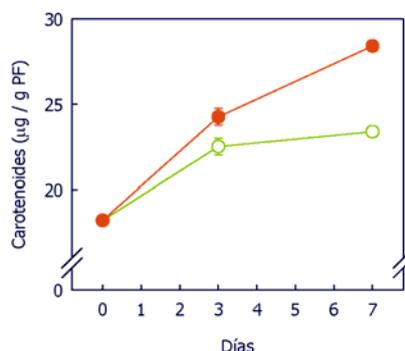


Figura 45. Evolución del contenido de carotenoides totales en la pulpa de frutos coloreados de mandarina 'Fortune' ($a/b = 0,75 \pm 0,04$) sometidos durante 3 d a 37 °C (○) o a 20 °C (●). Los valores son la media \pm DE de al menos tres análisis independientes.

1.3. Composición y contenido de carotenoides en el flavedo y en la pulpa de frutos de mandarina 'Fortune' durante el curado y posterior aplicación de etileno

Los cambios en la composición y en la concentración de carotenoides individuales en los frutos de la mandarina 'Fortune' sometidos a los tratamientos descritos en los apartados anteriores se analizaron mediante HPLC-PDA.

En general, en los frutos virando la temperatura de almacenamiento afectó de forma diferente a los distintos carotenoides. El contenido de fitoeno y fitoflueno no varió de forma importante respecto a los valores iniciales, tanto en los frutos almacenados a 20 °C como a 37 °C, y el tratamiento con etileno aumentó 3 y 6 veces la concentración de fitoeno y fitoflueno, respectivamente, respecto a las iniciales y con independencia de la temperatura (**Figura 46**). La violaxantina (*trans*-violaxantina+9-*cis*-violaxantina), carotenoide mayoritario en el estadio inicial, incrementó su contenido a los 3 días independientemente de la temperatura de almacenamiento, sin embargo, tras la aplicación de etileno esta xantofila se redujo en aproximadamente 10 µg en ambas condiciones (**Figura 46**). Es interesante destacar que la xantofila β -criptoxantina y el apocarotenoide β -citraurina disminuyeron drásticamente su concentración durante el curado,

llegando a disminuir 4 veces la concentración de β -criptoxantina tras la aplicación de etileno respecto a los frutos almacenados a 20 °C y a no detectarse β -citraurina tras 3 días a 37 °C, mientras que en los frutos almacenados a 20 °C aumentaron respecto a los valores iniciales. El posterior tratamiento con etileno a los frutos curados estimuló la acumulación tanto en β -criptoxantina (de $0,38 \pm 0,05$ a $2,00 \pm 0,24$ $\mu\text{g} / \text{g PF}$) como en β -citraurina (de 0 a 2 $\mu\text{g} / \text{g PF}$). La aplicación de etileno a los frutos almacenados a 20 °C redujo el contenido de β -criptoxantina a los valores iniciales mientras que el contenido de β -citraurina se duplicó respecto al inicial (**Figura 46**).

Los efectos sobre la composición de carotenoides en los frutos de mandarina 'Fortune' recolectados en un estadio de maduración más avanzado (estadio B) presentaron diferencias importantes respecto a los frutos virando. No se detectaron inicialmente carotenoides incoloros, ni fitoeno ni fitoflueno (**Figura 47**). Por el contrario, el carotenoide amarillo mutatoxantina tuvo una concentración inicial superior a la del estadio A ($7,48 \pm 0,26$ $\mu\text{g} / \text{g PF}$). Los contenidos de fitoeno, fitoflueno y mutatoxantina aumentaron durante los 3 días de acondicionamiento a 37 y a 20 °C, siendo notablemente mayor el incremento de fitoflueno y mutatoxantina en los frutos curados que en los control. En general, la concentración de fitoeno y fitoflueno aumentó de forma similar tras el tratamiento con etileno tanto en frutos previamente curados como en los almacenados a 20 °C. La mutatoxantina, sin embargo, tras la aplicación de etileno, disminuyó su contenido a la mitad en los frutos curados, a diferencia de los frutos control que mantuvieron constante su contenido. La β -criptoxantina en los frutos curados del estadio B siguió una evolución distinta a los del estadio A, duplicándose su contenido a diferencia de los frutos control que apenas varió su concentración. La aplicación de la hormona disminuyó el contenido de β -criptoxantina a la mitad en los frutos curados y se mantuvo constante en los control (**Figura 47**). La evolución del apocarotenoide β -citraurina en frutos del estadio B durante curado a 37 °C disminuyó a la mitad el contenido en β -citraurina, mientras que en los frutos almacenados a 20 °C aumentó en un 50%. El posterior tratamiento con etileno a frutos acondicionados y a frutos control no afectó el contenido de β -citraurina (**Figura 47**). La concentración de violaxantina incrementó tanto en los frutos controles como en los curados y, tras la aplicación de etileno, disminuyó a niveles similares a los iniciales (**Figura 47**).

La evolución de la concentración de los carotenoides más relevantes en el flavedo de frutos de mandarina 'Fortune' en un estadio totalmente coloreado

(estadío C, $a/b = 1,13 \pm 0,03$) se muestra en la **Figura 48**. En este estadío se mantuvo la concentración inicial de los carotenoides incoloros en los frutos curados, sin embargo, disminuyó aproximadamente 4 veces en los frutos control. El tratamiento con etileno no provocó cambios importantes en la concentración de fitoeno ni de fitoflueno en los frutos curados, mientras que en los frutos control incrementaron 5 y 7 veces, respectivamente. La mutatoxantina experimentó un mayor aumento a 37 que a 20 °C, llegando a duplicarse. Tras la aplicación de etileno, el contenido de mutatoxantina se redujo 1,5 veces en los frutos curados y se mantuvo en los control (**Figura 48**). La concentración de β -criptoxantina permaneció constante tras el acondicionamiento a ambas temperaturas y aumentó por el tratamiento con etileno. Los isómeros de violaxantina incrementaron su concentración durante el almacenamiento a 20 y a 37 °C. La aplicación de etileno disminuyó la concentración de 9-*cis*-violaxantina, independientemente de la temperatura inicial a la que fueron acondicionados, mientras que el isómero *trans* sólo disminuyó en los frutos sometidos a curado previamente. El contenido del apocarotenoide β -citraurina se mantuvo constante en todos los tratamientos (**Figura 48**).

El estudio del efecto del acondicionamiento térmico sobre el contenido y composición de carotenoides en la pulpa de frutos de mandarina 'Fortune' se llevó a cabo en frutos recolectados con un índice $a/b = 0,75 \pm 0,04$ (**Figura 49**). La concentración de los carotenos iniciales se incrementó en los 3 primeros días, siendo mayor el efecto a 20 que a 37 °C. La concentración de las xantofilas identificadas en la pulpa, anteraxantina, β -criptoxantina y violaxantina, aumentó o se mantuvo, independientemente de la temperatura de acondicionamiento. En la pulpa de estos frutos no se detectaron ni mutatoxantina, ni β -citraurina (**Figura 49**).

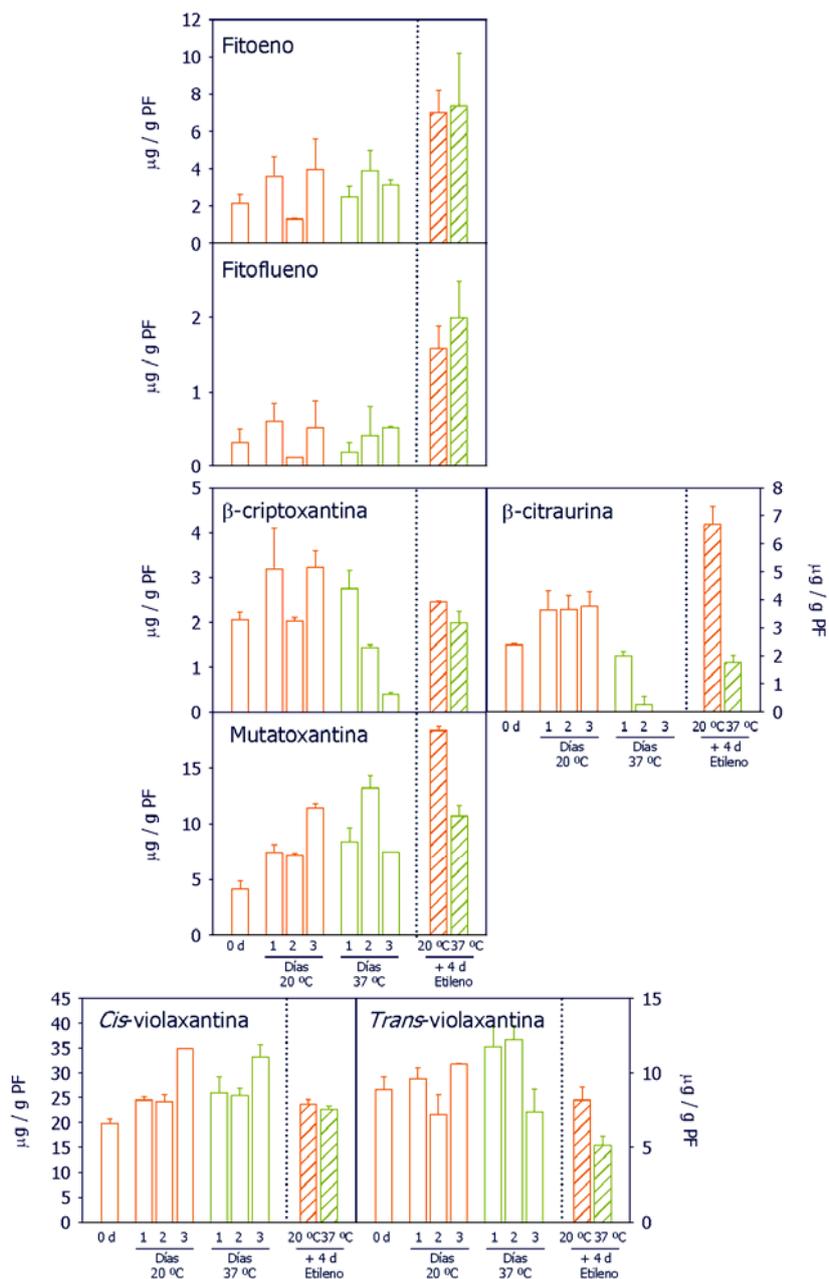


Figura 46. Composición y contenido de carotenoides del flavedo de frutos de mandarina 'Fortune' recolectados con un a/b inicial de $0,15 \pm 0,03$ durante 3 días de acondicionamiento térmico a 20 °C (barras naranjas) y 37 °C (barras verdes), y la posterior aplicación de etileno ($10 \mu / \text{L}$) durante 4 días (barras a rayas). Los valores son la media \pm DE de al menos tres análisis independientes.

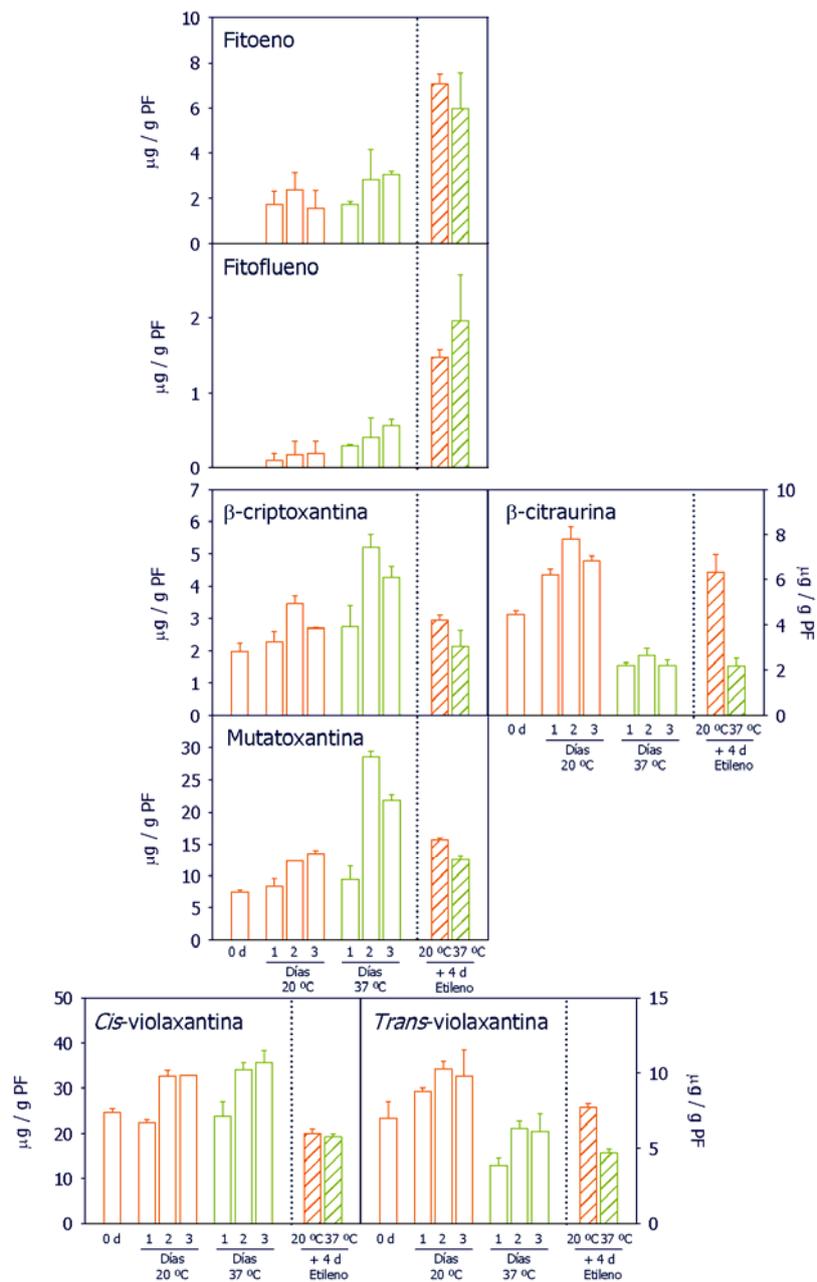


Figura 47. Composición y contenido de carotenoides del flavedo de frutos de mandarina 'Fortune' recolectados con un a/b inicial de $0,55 \pm 0,03$ durante 3 días de acondicionamiento térmico a 20 °C (barras naranjas) y 37 °C (barras verdes), y la posterior aplicación de etileno ($10 \mu / \text{L}$) durante 4 días (barras a rayas). Los valores son la media \pm DE de al menos tres análisis independientes.

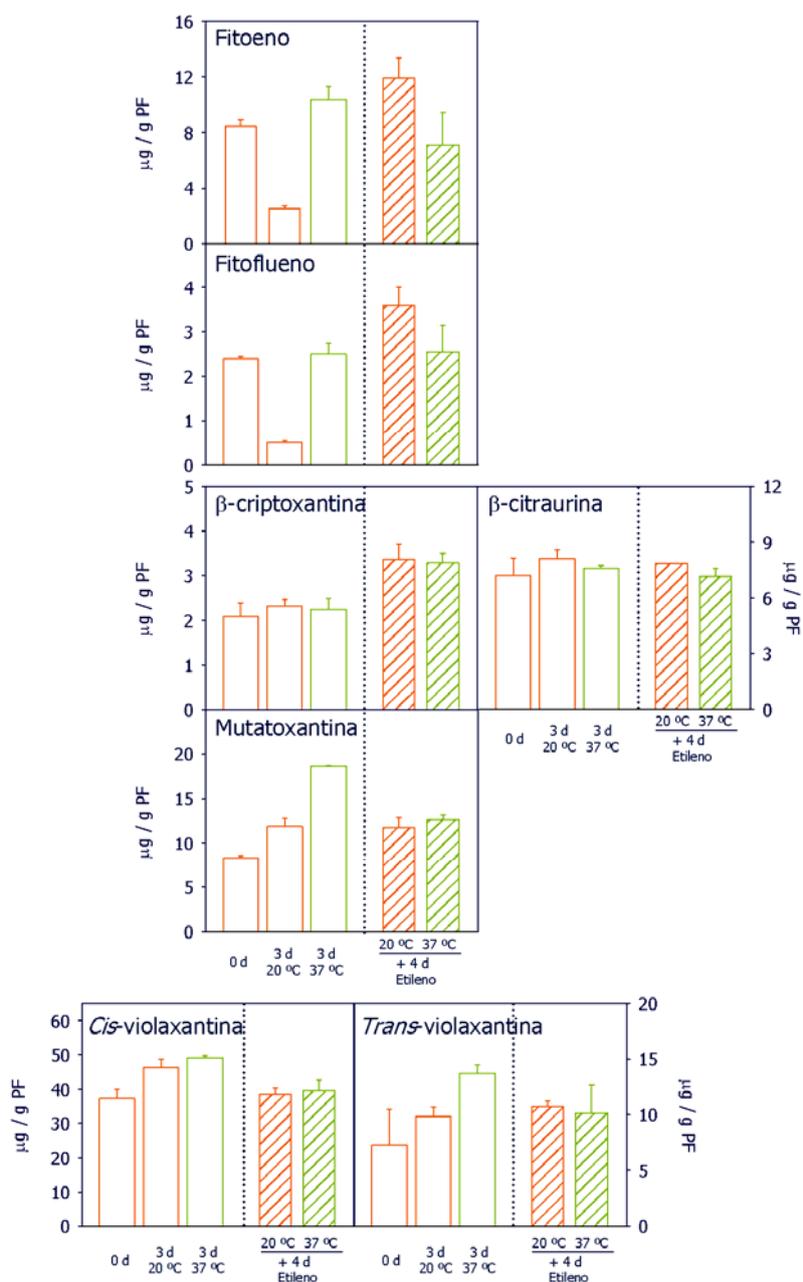


Figura 48. Composición y contenido de carotenoides del flavedo de frutos de mandarina 'Fortune' recolectados con un a/b inicial de $1,13 \pm 0,02$ durante 3 días de acondicionamiento térmico a 20 °C (barras naranjas) y 37 °C (barras verdes), y la posterior aplicación de etileno ($10 \mu / \text{L}$) durante 4 días (barras a rayas). Los valores son la media \pm DE de al menos tres análisis independientes.

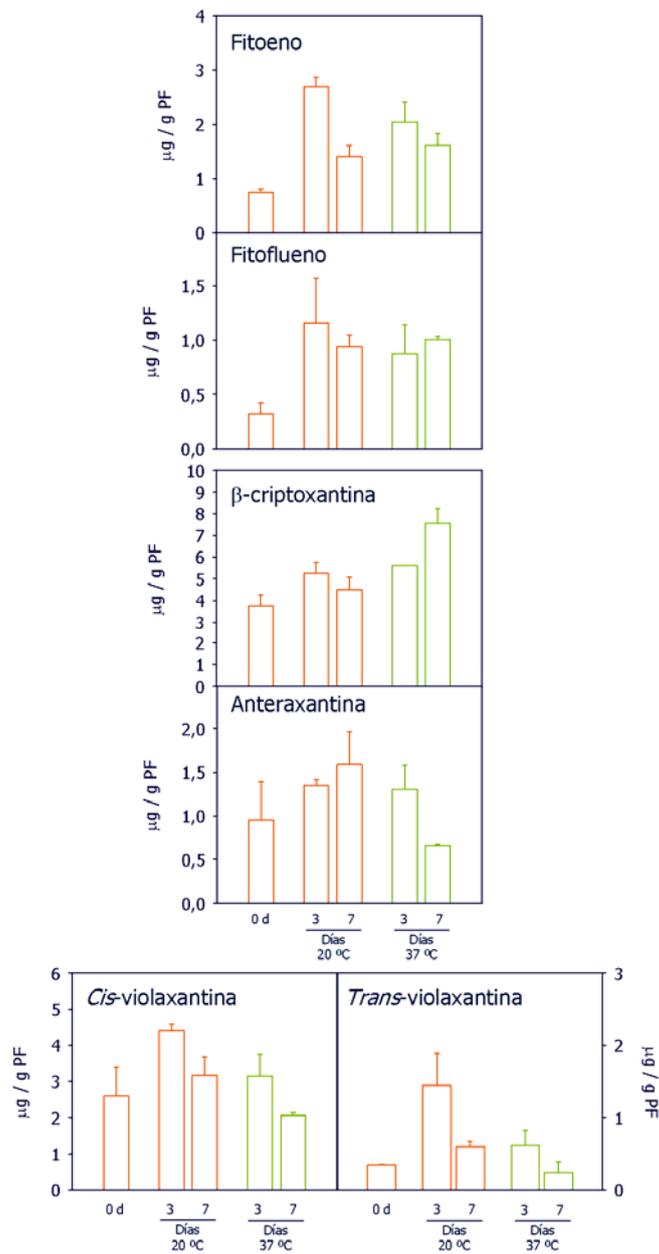


Figura 49. Composición y contenido de carotenoides de la pulpa de frutos de mandarina 'Fortune', recolectados con un índice de coloración externo inicial de $a/b = 0,75 \pm 0,04$ durante 3 días de acondicionamiento térmico a 20 °C (barras naranjas) y 37 °C (barras verdes), y la posterior aplicación de etileno ($10 \mu / \text{L}$) durante 4 días (barras a rayas). Los valores son la media \pm DE de al menos tres análisis independientes.

1.4. Análisis de la expresión de los genes de la biosíntesis de carotenoides en el flavedo de frutos de mandarina 'Fortune' durante el curado y posterior aplicación de etileno

Con objeto de determinar si las diferencias en el perfil de carotenoides observadas en frutos de mandarina 'Fortune' durante el periodo de curado y el posterior tratamiento con etileno se deben a una expresión diferencial de genes de la biosíntesis de carotenoides, se analizó mediante PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR) la expresión de genes clave de la biosíntesis de carotenoides. Los genes seleccionados para este estudio fueron: *PSY*, que codifica la primera enzima de la ruta y que está implicada en la producción de carotenos lineales determinando la entrada de flujo a la ruta; dos *βLCYs* (*βLCY1* y *βLCY2*), enzimas situadas en la bifurcación de la ruta e implicadas en la ciclación del licopeno y, por tanto, en el redireccionamiento de la ruta hacia la rama β,β ; y *βCHX* implicada en la biosíntesis de β,β -xantofilas. En la **Figura 50** se muestran los cambios en la expresión de estos genes durante el acondicionamiento térmico de frutos de mandarina 'Fortune' con índice de color *a/b* inicial de 0,55 (estadío B). La expresión de los genes seleccionados no se modificó de forma importante en el flavedo de los frutos control. Sin embargo, el almacenamiento de 3 días a 37 °C afectó de forma muy importante a los niveles de los transcritos de *PSY*, *βLCY2* y *βCHX*, que se redujeron entre 8 y 10 veces, respecto a los niveles iniciales. La aplicación de etileno durante 4 días a frutos previamente almacenados a 20 °C no modificó de forma importante la expresión de los genes estudiados (**Figura 50**). En los frutos curados, sin embargo, se incrementó considerablemente la acumulación de los mRNAs de *PSY*, *βLCY2* y *βCHX*, a niveles similares a los iniciales. El gen *βLCY1* mostró un patrón de acumulación diferente, con escasas variaciones por los diferentes tratamientos (**Figura 50**).

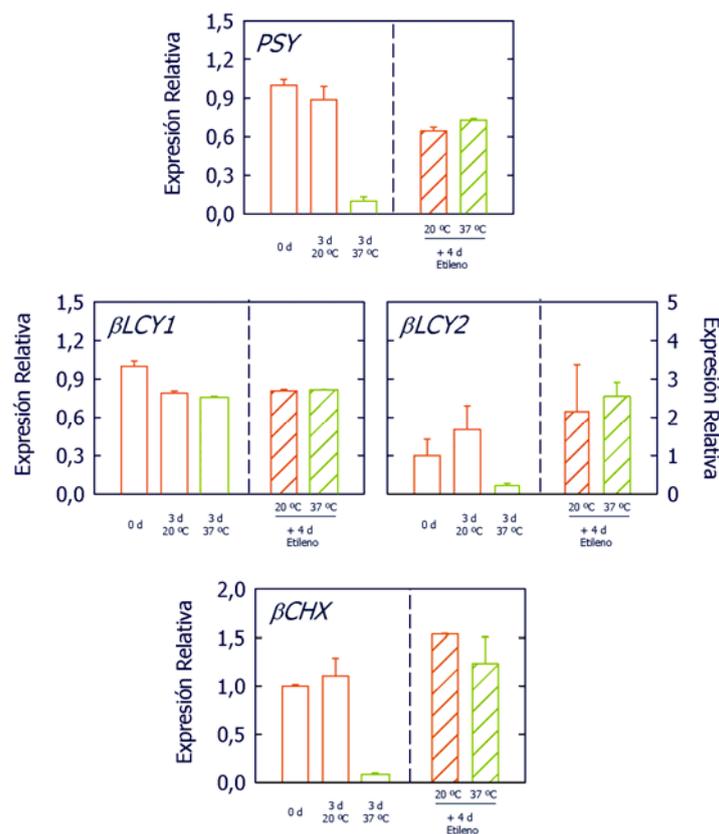


Figura 50. Expresión relativa de cuatro genes implicados en la biosíntesis de carotenoides en el flavedo de frutos de mandarina 'Fortune' (con un índice a/b inicial de $0,55 \pm 0,03$) durante el tratamiento de acondicionamiento térmico a 20 °C (barras naranjas) y 37 °C (barras verdes) y la posterior aplicación de etileno (10 $\mu\text{L/L}$) durante 4 días a 20°C (barras a rayas). Los valores obtenidos para cada gen están normalizados frente a los niveles de expresión al inicio del tratamiento (día 0), al que se le asigna un valor relativo de 1.

2. Caracterización de la biosíntesis y acumulación de carotenoides durante el periodo de curado y posterior aplicación de etileno en frutos de naranja 'Navelina'

Para el estudio del efecto del curado se recolectaron frutos de naranja 'Navelina' en tres estadios de coloración: (A) Frutos virando ($a/b = 0,08 \pm 0,04$); (B) Frutos con coloración avanzada ($a/b = 0,59 \pm 0,03$), y (C) Frutos totalmente coloreados ($a/b = 0,95 \pm 0,02$) (**Figura 42**) y se sometieron al tratamiento de acondicionamiento y posterior aplicación de etileno que en la mandarina 'Fortune' (Apartado anterior).

2.1. Evolución del color del flavedo de frutos de naranja 'Navelina' durante el curado y posterior aplicación de etileno

El aspecto externo y la evolución de la coloración, determinada como el cociente a/b , en los frutos de naranja 'Navelina' sometidos al tratamiento de acondicionamiento térmico y posterior aplicación de etileno se muestran en la **Figura 51** y en **Figura 52**, respectivamente.

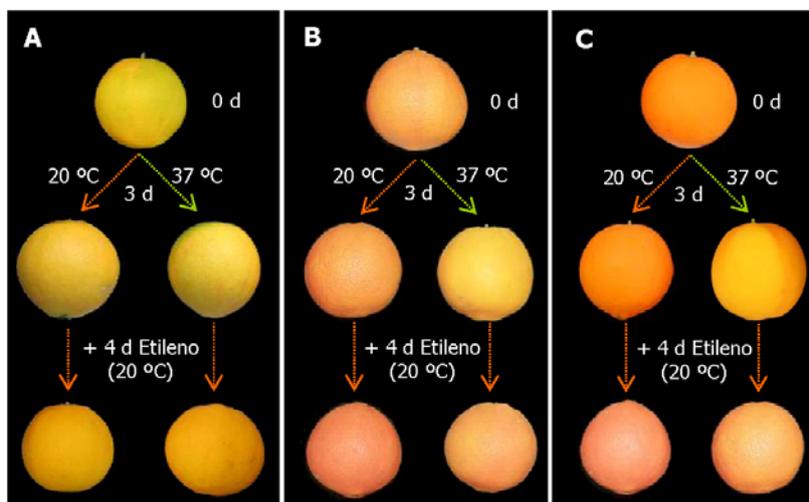


Figura 51. Aspecto externo de los frutos de naranja 'Navelina' en los tres estadios de maduración sometidos a los siguientes tratamientos: 3 d a 20 °C (control) o 37 °C (curados) y posterior aplicación de etileno (10 µL / L) durante 4 días a 20 °C. La nomenclatura **A-C** se corresponde con los distintos estadios de coloración presentados en la **Figura 42**: **A**. Frutos virando ($a/b = -0,08 \pm 0,04$); **B**. Frutos con coloración avanzada ($a/b = 0,59 \pm 0,03$), y **C**. Frutos totalmente coloreados ($a/b = 0,95 \pm 0,02$).

El tratamiento de curado a 37 °C durante 3 días produjo una disminución del color externo de los frutos de naranja en los tres estadios analizados (**Figura 51**). La pérdida de color por el curado mayor en los 2 estadios de coloración más avanzados (0,3 unidades del índice a/b). Para el mismo tiempo de tratamiento, la exposición a 20 °C apenas modificó el cociente a/b del flavedo de los frutos (**Figura 52**).

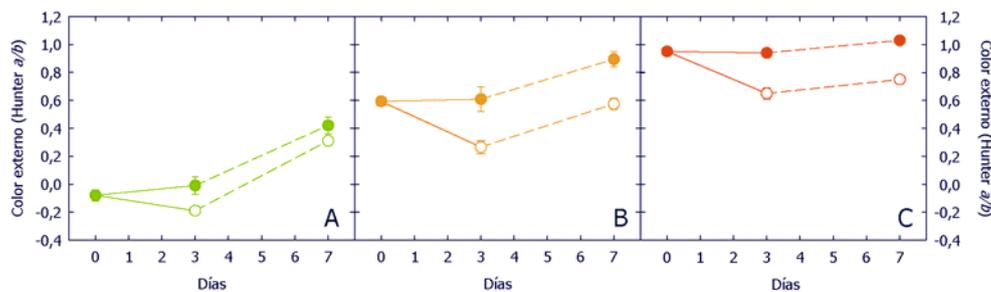


Figura 52. Evolución del color del flavedo de frutos de naranja 'Navelina' durante 3 días de tratamiento térmico a 37 °C (○) y el almacenamiento a 20 °C (●) (líneas continuas) y la posterior aplicación de etileno (10 µL / L) (líneas discontinuas). La nomenclatura **A-C** se corresponde con los distintos estadios de coloración presentados en la **Figura 42**: **A**. Frutos virando ($a/b = -0,08 \pm 0,04$); **B**. Frutos con coloración avanzada ($a/b = 0,59 \pm 0,03$), y **C**. Frutos totalmente coloreados ($a/b = 0,95 \pm 0,02$). Los valores son la media \pm DE de al menos 10 frutos independientes.

El tratamiento con etileno (10 µL / L) durante 4 días a 20 °C, promovió la coloración externa de los frutos de naranja 'Navelina' (**Figura 51**). Este incremento en el color se observó tanto en los frutos curados como en los frutos controles e independientemente del estadio inicial. De forma similar a lo observado en los frutos de mandarina 'Fortune', el efecto del etileno fue mayor en los frutos menos coloreados (**Figura 52**). Así, en los frutos virando ($a/b = -0,08 \pm 0,04$) se produjo un incremento del índice a/b de, aproximadamente, 0,5 unidades (**Figura 52 A**), mientras que en los dos estadios siguientes (B y C) este aumento en el índice a/b fue de 0,3, y 0,1, respectivamente, tanto en los frutos curados a 37 °C como en los frutos control a 20 °C (**Figura 52 B y C**)

2.2. Evolución del contenido de clorofilas y carotenoides en el flavedo de frutos de naranja 'Navelina' durante el curado y posterior aplicación de etileno

Los efectos de los diferentes tratamientos en el contenido de clorofilas y carotenoides totales se muestran en la **Tabla 11**. Los frutos de naranja con menor índice de coloración inicial (estadio A, $a/b = -0,08 \pm 0,04$) presentaron la mayor concentración inicial de clorofila, que se redujo un 37,8% y 50,3% tras el almacenamiento de 3 días a 20 °C o 37 °C, respectivamente. En los siguientes estadios de maduración o tras la exposición a etileno, el contenido en clorofilas fue muy reducido o indetectable (**Tabla 11**).

Tabla 11. Contenido de clorofilas y carotenoides totales en el flavedo de frutos de naranja 'Navelina' en tres estadios de coloración, después de 3 días a 20 o 37 °C y tras la posterior aplicación de etileno (10 µL / L) durante 4 d a 20 °C.

| Color (a/b) | T. ^a (°C) | Clorofilas (µg / g PF) | | | Carotenoides (µg / g PF) | | |
|----------------|-------------------------|------------------------|--------------|---------------------|--------------------------|--------------|---------------------|
| | | 0 días | 3 días | + 4 días Etileno | 0 días | 3 días | + 4 días Etileno |
| -0,08 ± 0,04 | 20 | | 24,40 ± 2,80 | N.D. | | 16,40 ± 0,20 | 24,18 ± 4,44 |
| | 37 | 39,25 ± 6,07 | 19,5 ± 5,59 | N.D. | 14,59 ± 2,25 | 19,50 ± 0,03 | 22,67 ± 3,78 |
| 0,59 ± 0,03 | 20 | | N.D. | N.D. | | 67,37 ± 4,75 | 58,51 ± 4,37 |
| | 37 | 4,51 ± 3,01 | N.D. | N.D. | 48,15 ± 1,20 | 77,85 ± 1,91 | 62,06 ± 4,59 |
| 0,95 ± 0,02 | 20 | | N.D. | N.D. | | 45,01 ± 1,81 | 122,20 ± 1,22 |
| | 37 | N.D. | N.D. | N.D. | 63,56 ± 1,16 | 43,95 ± 0,74 | 66,10 ± 5,97 |

N.D. No detectado

^a Temperatura del acondicionamiento

El contenido inicial de carotenoides totales en la piel de naranja 'Navelina' incrementó con el estadio de maduración del fruto (**Tabla 11**). La temperatura de almacenamiento tuvo efectos diversos en función del estadio de maduración del fruto. Mientras que en los frutos virando solamente se produjeron cambios modestos, en los frutos coloreados ($a/b = 0,59$) la concentración de carotenoides se incrementó un 40% y un 60% a 20 y 37 °C, respectivamente. En el flavedo de los frutos más maduros, sin embargo, el contenido de carotenoides totales disminuyó aproximadamente un 30%, tanto en el flavedo de los frutos curados como en los control (**Tabla 11**).

El efecto del etileno en la concentración de carotenoides del flavedo también fue deferente en los distintos estadios de maduración. En los frutos virando el etileno aumentó 1,3 veces, aproximadamente, el contenido en carotenoides totales, independientemente de la temperatura de acondicionamiento. En frutos del estadio, en los que el acondicionamiento aumentó el contenido de carotenoides, el tratamiento con etileno lo disminuyó tanto en los tratados a 20 como a 37 °C. Por el contrario, en los frutos totalmente coloreados, en los que se redujo el contenido de carotenoides durante el acondicionamiento, el tratamiento con etileno lo aumentó, siendo mayor el efecto en los tratados previamente a 20 °C (**Tabla 11**).

2.3. Composición y contenido de carotenoides en el flavedo y en la pulpa de frutos de naranjas 'Navelina' durante el curado y posterior aplicación de etileno

La concentración de los carotenoides más relevantes identificados en el flavedo de frutos de naranja 'Navelina' en el estadio de viraje (estadio A) se resume en la **Figura 53**. El contenido de carotenoides incoloros no se afectó durante los 3 días de acondicionamiento e incrementó por la posterior aplicación de etileno. La concentración de las xantofilas β -criptoxantina, mutatoxantina y violaxantina tampoco mostró diferencias importantes respecto los valores iniciales, independientemente de la temperatura de acondicionamiento. Es interesante destacar el comportamiento del apocarotenoide β -citraurina, ya que su concentración se redujo 5 veces durante los 3 días de almacenamiento a 37 °C, mientras que en los frutos control se mantuvieron los niveles constantes (**Figura 53**). El posterior tratamiento de los frutos control con etileno no varió de forma importante el contenido de β -criptoxantina, violaxantina y mutatoxantina, pero duplicó la concentración de β -citraurina. El efecto más destacable del tratamiento con etileno en los frutos curados fue el aumento de la concentración de β -citraurina (7 veces) y mutatoxantina (2 veces) y la disminución a la mitad del contenido de β -criptoxantina (**Figura 53**).

En el flavedo de los frutos coloreados (estadio B) el contenido de carotenoides incoloros aumentó tanto durante el curado como durante el almacenamiento a 20 °C. La aplicación de etileno a frutos curados incrementó la concentración de fitoeno y fitoflueno 2 y 6 veces, respectivamente, mientras que en los frutos control el contenido de fitoeno se mantuvo constante y el de fitoflueno se duplicó (**Figura 54**). Un comportamiento similar se observó para la mutatoxantina, cuyo contenido se duplicó durante el periodo de acondicionamiento a ambas temperaturas, y tras la posterior aplicación de etileno en los frutos curados, mientras que se mantuvo constante en los control. El contenido de la β -criptoxantina no varió de forma importante tras los diferentes tratamientos. La concentración de 9-*cis*-violaxantina se mantuvo durante el curado e incrementó a 20 °C, y la aplicación de etileno indujo un ligero aumento en los frutos curados y una disminución en los control (**Figura 54**). El apocarotenoide β -citraurina siguió un patrón similar al observado en el flavedo los frutos virando, disminuyendo aproximadamente 7 veces durante el almacenamiento a 37 °C y aumentando en los controles. La concentración de este apocarotenoide aumentó aproximadamente

9 veces tras la aplicación de la hormona en los frutos curados, y disminuyó a los valores iniciales en los frutos control (**Figura 54**).

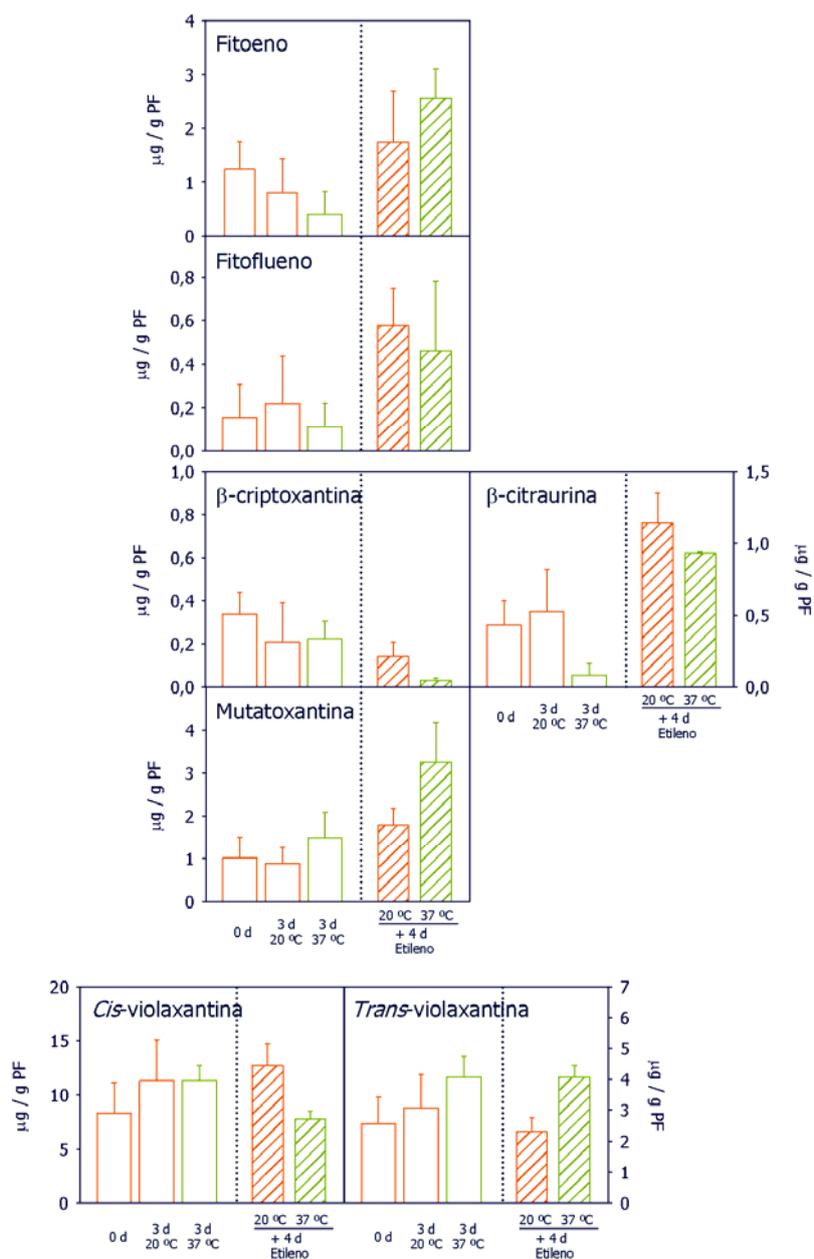


Figura 53. Composición y contenido de carotenoides del flavedo de frutos naranja 'Navelina' recolectados con un a/b inicial de $-0,08 \pm 0,04$ durante 3 días de acondicionamiento térmico a 20 °C (barras naranjas) y 37 °C (barras verdes) y la posterior aplicación de etileno ($10 \mu / \text{L}$) durante 4 días a 20 °C (barras a rayas). Los valores son la media \pm DE de al menos tres análisis independientes.

El efecto de los diferentes tratamientos en la concentración de carotenoides individuales en el flavedo de frutos totalmente coloreados (estadio C) se muestra en la **Figura 55**. La concentración de fitoflueno aumentó durante el acondicionamiento a ambas temperaturas, mientras que la de fitoeno no varió de forma importante. Tras la aplicación de etileno el contenido de ambos carotenos se triplicó (**Figura 55**). En los frutos recién cosechados no se detectó la xantofila mutatoxantina, sin embargo, tras 3 días de acondicionamiento a 20 °C y a 37 °C se incrementó hasta 2 y 4 µg / g PF, respectivamente. La concentración de β-criptoxantina no experimentó cambios importantes tras el acondicionamiento a 20 °C, pero aumentó cerca del 50% en los frutos curados. La aplicación de etileno estimuló el contenido de ambas xantofilas, tanto en los tratados previamente a 20 como a 37 °C (**Figura 55**). En el contenido de violaxantina no se observó ningún cambio tras los 3 días de acondicionamiento, pero la aplicación de etileno incrementó aproximadamente un 30% la concentración de esta xantofila (**Figura 55**). La concentración de β-citraurina no varió en los frutos control, mientras que en los frutos curados se redujo a la mitad. La posterior aplicación de etileno estimuló de forma importante la acumulación del apocarotenoide, siendo este efecto mayor en los frutos control que en los tratados a 37 °C (**Figura 55**).

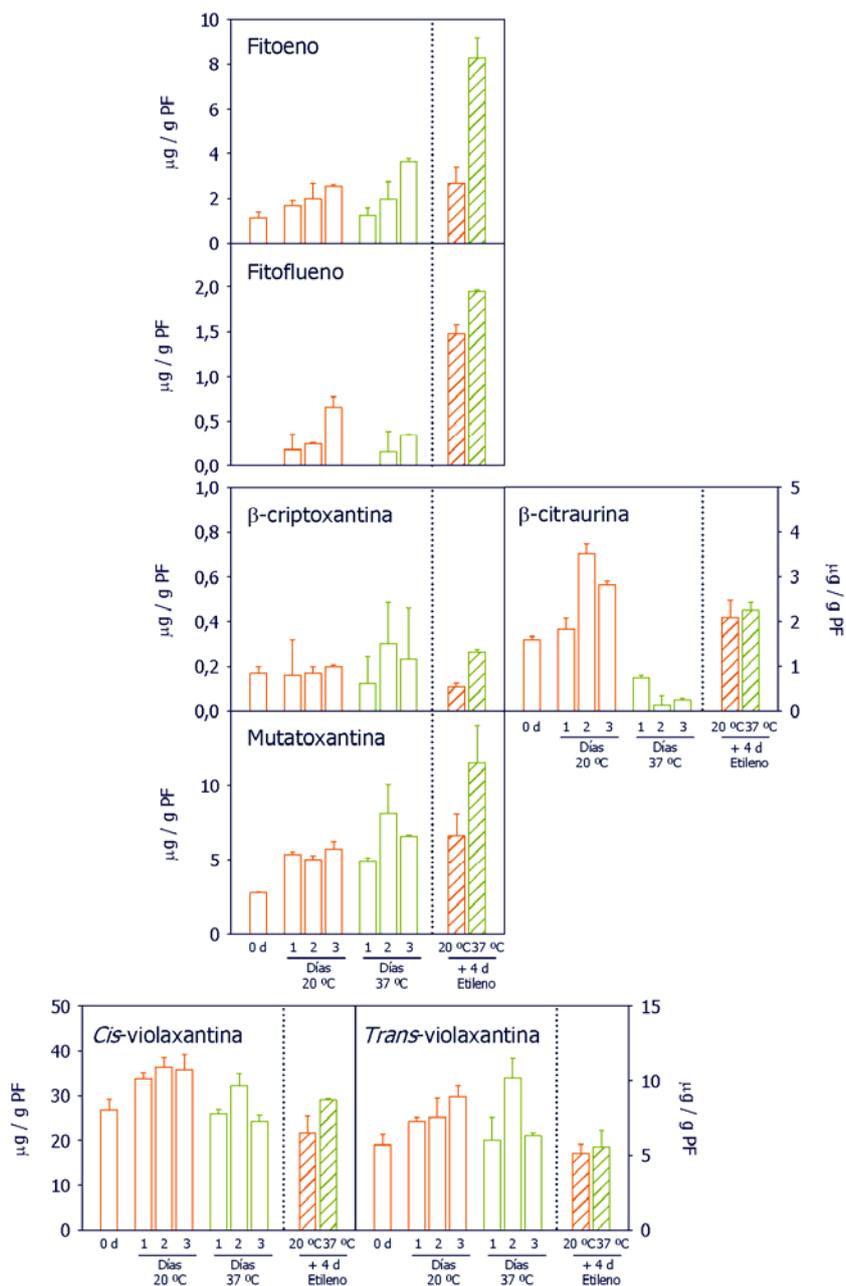


Figura 54. Composición y contenido de carotenoides del flavedo de frutos naranja 'Navelina' recolectados con un a/b inicial de $0,59 \pm 0,03$ durante 3 días de acondicionamiento térmico a 20 °C (barras naranjas) y 37 °C (barras verdes) y la posterior aplicación de etileno ($10 \mu / L$) durante 4 días a 20 °C (barras a rayas). Los valores son la media \pm DE de al menos tres análisis independientes.

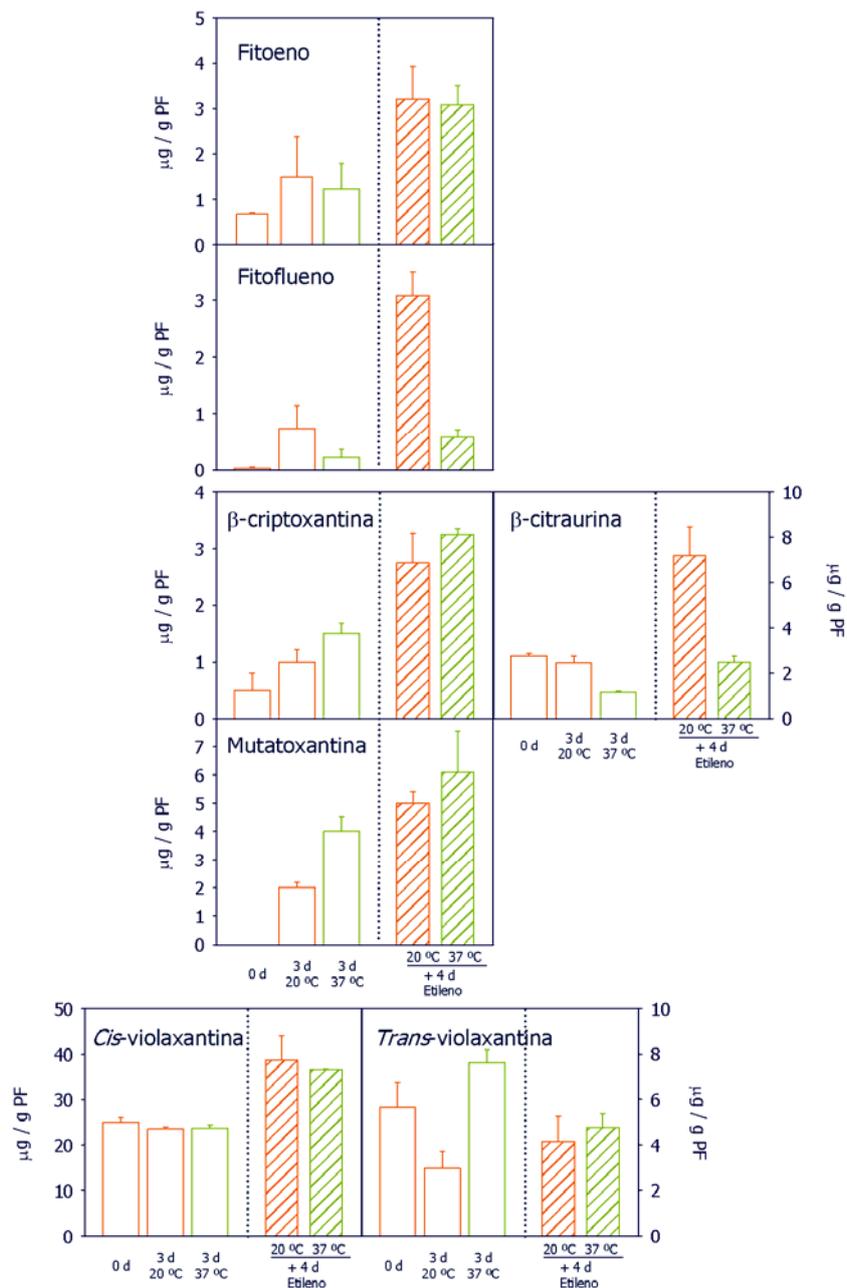


Figura 55. Composición y contenido de carotenoides del flavedo de frutos naranja 'Navelina' recolectados con un a/b inicial de $0,95 \pm 0,02$ durante 3 días de acondicionamiento térmico a 20 °C (barras naranjas) y 37 °C (barras verdes) y la posterior aplicación de etileno ($10 \mu / \text{L}$) durante 4 días a 20 °C (barras a rayas). Los valores son la media \pm DE de al menos tres análisis independientes.

2.4. Análisis de la expresión de los genes de la biosíntesis de carotenoides en el flavedo de frutos de naranja 'Navelina' durante el curado y posterior aplicación de etileno

Al igual que en los frutos de mandarina Fortune, se analizaron los cambios en la expresión de los genes *PSY*, *βLCY1*, *βLCY2* y *βCHX*, mediante RT-qPCR, en el flavedo de frutos coloreados (estadio B) de naranja sometidos a los diferentes tratamientos (**Figura 51**). La expresión de los genes *PSY* y *βCHX*, disminuyó tras los 3 días de acondicionamiento térmico, siendo mucho más importante el descenso a 37 (85%) que a 20 °C (60 y 40%, respectivamente). El gen *βLCY1* mostró una mayor pérdida en los frutos controles (35%) que en los curados (20%). No detectaron cambios importantes en la expresión del gen *βLCY2* a ambas temperaturas. El tratamiento posterior con etileno indujo una mayor acumulación de los transcritos en los frutos curados que en los controles. Así, por ejemplo, los mRNAs de *PSY* y *βCHX* incrementaron 6 veces en los frutos tratados previamente a 37 °C y se mantuvieron en los expuestos a 20 °C. El etileno produjo un aumento mucho más importante en la acumulación de los transcritos de *βLCY2* que de *βLCY1*, independientemente de la temperatura a la que estuvieron expuestos los frutos con anterioridad (**Figura 56**).

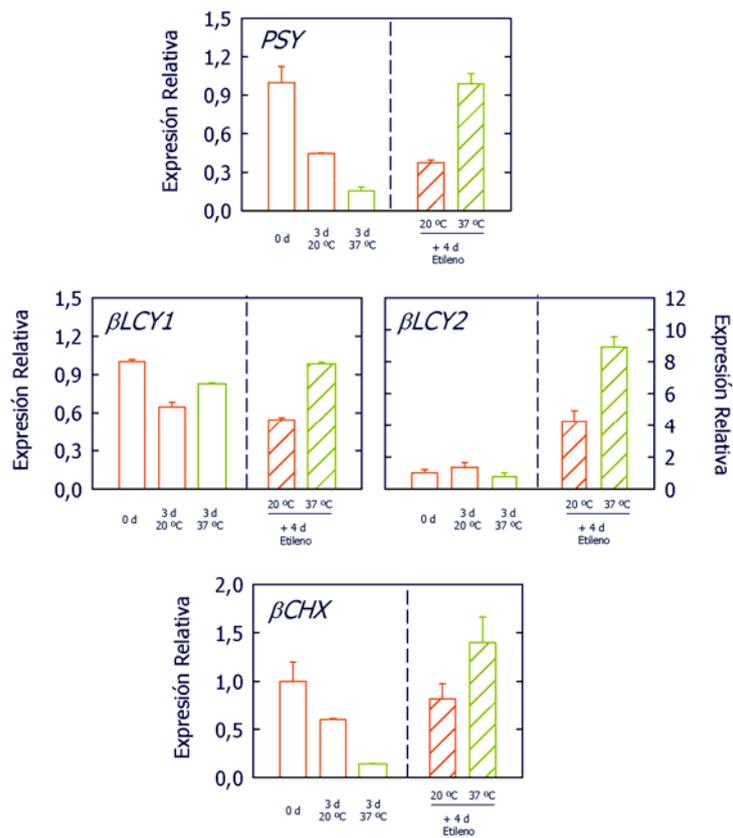


Figura 56. Expresión relativa de cuatro genes implicados en la biosíntesis de carotenoides en el flavedo de frutos naranja 'Navelina' (con un índice a/b inicial de $0,59 \pm 0,03$) durante el tratamiento de acondicionamiento térmico a 20 °C (barras naranjas) y 37 °C (barras verdes) y la posterior aplicación de etileno (10 $\mu\text{L} / \text{L}$) durante 4 días a 20 °C (barras a rayas). Los valores obtenidos para cada gen están normalizados frente a los niveles de expresión al inicio del tratamiento (día 0), al que se le asigna un valor relativo de 1.

CAPÍTULO III. PAPEL DEL ETILENO EN LA BIOSÍNTESIS Y ACUMULACIÓN DE CAROTENOIDES EN FRUTOS DE DISTINTAS VARIEDADES MANDARINAS

Con el fin de caracterizar el papel del etileno en la coloración y en la carotenogénesis de frutos cítricos y, en concreto, determinar si la hormona actúa como un inductor o si se requiere su percepción continua, en este capítulo de Tesis se han utilizado frutos de dos variedades de mandarina: el híbrido 'Fortune' y 'Clemenules', en diferentes estadios de coloración: frutos verdes, antes de los primeros síntomas visuales del cambio de color; frutos virando, en pleno proceso de coloración y antes de la completa desaparición de clorofilas, y frutos coloreados, en los que aún no se había alcanzado la coloración final del flavedo. La estrategia experimental consistió en la utilización del inhibidor de la acción del etileno 1-MCP para comprobar cómo prosiguen los diferentes procesos de la carotenogénesis (síntesis y acumulación de carotenoides, así como la expresión de genes de la biosíntesis de dichos pigmentos) en ausencia o con reducida acción de la hormona, tanto durante la postcosecha de los frutos (frutos separados del árbol) como en frutos intactos en el árbol, lo que ha constituido uno de los aspectos más novedosos de este trabajo.

1. Estudio del papel del etileno endógeno en la biosíntesis y acumulación de carotenoides en el flavedo durante la postcosecha de frutos de mandarina

Para caracterizar el efecto del etileno en la coloración de frutos de las variedades de mandarina 'Fortune' y 'Clemenules' a lo largo de la vida postcosecha, se seleccionaron los siguientes estadios de coloración: A. Frutos verdes ($a/b \approx -0,40$); B. Frutos virando ($a/b \approx -0,10$); y C. Frutos coloreados ($a/b \approx 0,27$) (**Figura 57**). Los frutos de ambas variedades se sometieron a un tratamiento con 1-MCP durante 16 h y, con el fin de corroborar la efectividad del tratamiento, algunos de los frutos se expusieron posteriormente a una atmósfera de etileno en cámaras termostataadas a 20 °C y 90-95% HR (Apartado 3.4 de Materiales y Métodos). En todos los casos se realizaron dos tratamientos de 1-MCP, al inicio del experimento y otro a los 7 días.

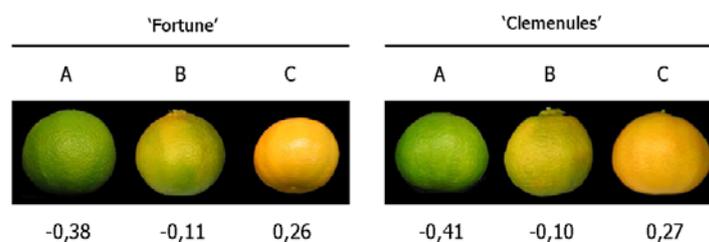


Figura 57. Aspecto y color del flavedo de los frutos de las variedades de mandarina 'Fortune' y 'Clemenules' recolectados para el estudio de la aplicación de 1-MCP. Debajo de cada fruto se indica la media del índice de coloración (a/b). **A.** Frutos verdes maduros; **B.** Frutos virando, y **C.** Frutos coloreados.

1.1. Efecto de la aplicación del inhibidor de la acción del etileno 1-MCP durante la postcosecha de frutos de mandarina 'Fortune' en tres estadios de maduración

1.1.1. Cambios en el color externo y en el contenido de clorofilas y carotenoides totales

El aspecto externo de los frutos de mandarina 'Fortune' en los tres estadios de coloración a lo largo del tratamiento, así como la evolución del color en los frutos tratados y no tratados con 1-MCP se muestran en las **Figura 58** y **Figura 59**, respectivamente. En los tres estadios de maduración el tratamiento con 1-MCP retrasó la coloración de los frutos, pero con ligeras diferencias. Así, en los dos primeros estadios de coloración, las diferencias en el color externo comenzaron a detectarse aproximadamente a partir del décimo día, mientras que en los frutos más coloreados el retraso en la coloración tras el tratamiento con 1-MCP comenzó a hacerse patente a partir del cuarto día (**Figura 59**). Con el fin de comprobar si el tratamiento con 1-MCP fue efectivo inhibiendo la acción de la hormona en la desverdización, un grupo de frutos tratados y no tratados con 1-MCP se mantuvieron en una atmosfera con $2 \mu\text{L} / \text{L}$ de etileno durante dos semanas. En los tres estadios se observó que el tratamiento con el inhibidor redujo de forma muy acentuada el efecto del etileno promoviendo la coloración, especialmente en los dos primeros estadios de maduración, donde la diferencia de coloración entre los frutos control y los tratados con 1-MCP fue de 0,7 unidades (**Figura 59 A y B**), mientras que en los frutos coloreados la diferencia fue mucho menor (**Figura 59 C**).

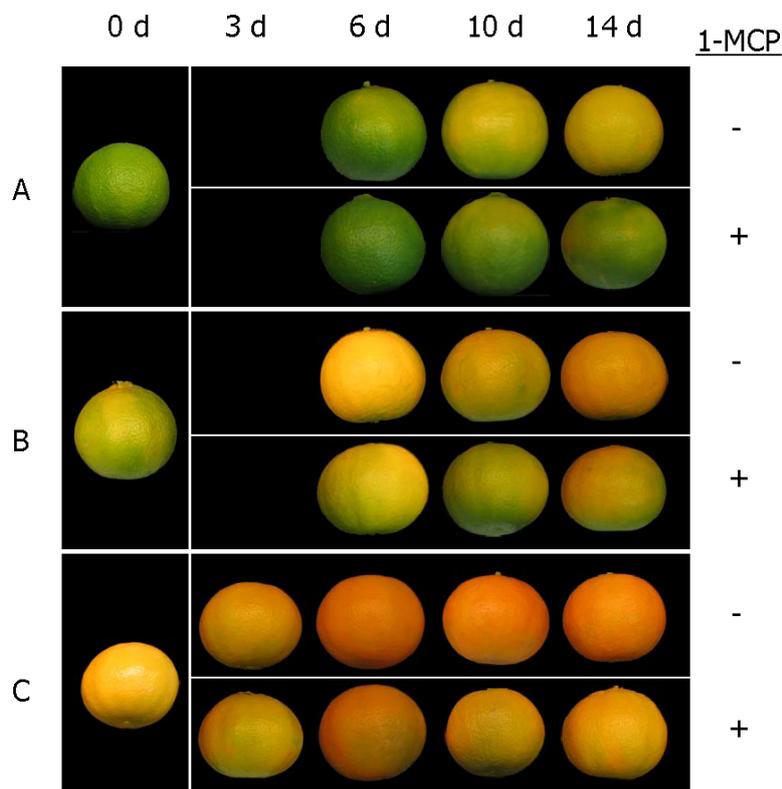


Figura 58. Aspecto y color del flavedo de los frutos de mandarina 'Fortune' en 3 estadios de maduración tratados (+) y no tratados (-) con 4 μL / L de 1-MCP. La nomenclatura **A-C** se corresponde con los distintos estadios de coloración indicados en la **Figura 57**: **A**. Frutos verdes ($a/b = -0,38 \pm 0,01$); **B**. Frutos virando ($a/b = -0,11 \pm 0,01$); y **C**. Frutos coloreados ($a/b = 0,26 \pm 0,01$). Los valores son la media \pm DE de al menos 10 frutos independientes.

La evolución del contenido de clorofilas durante la postcosecha de frutos de mandarina 'Fortune' tras la aplicación del inhibidor del etileno se muestra en la **Figura 60**. En el flavedo de los frutos verdes el contenido de clorofilas fue más elevado ($280,17 \pm 7,83 \mu\text{g} / \text{g PF}$), disminuyendo un 76%, aproximadamente, durante las dos semanas de tratamiento, tanto en los frutos control como en los tratados con 1-MCP (**Figura 60 A**). En los otros dos estadios de coloración se produjo un comportamiento similar, sin diferencias significativas por el efecto del 1-MCP en la pérdida de clorofilas (**Figura 60 B y C**).

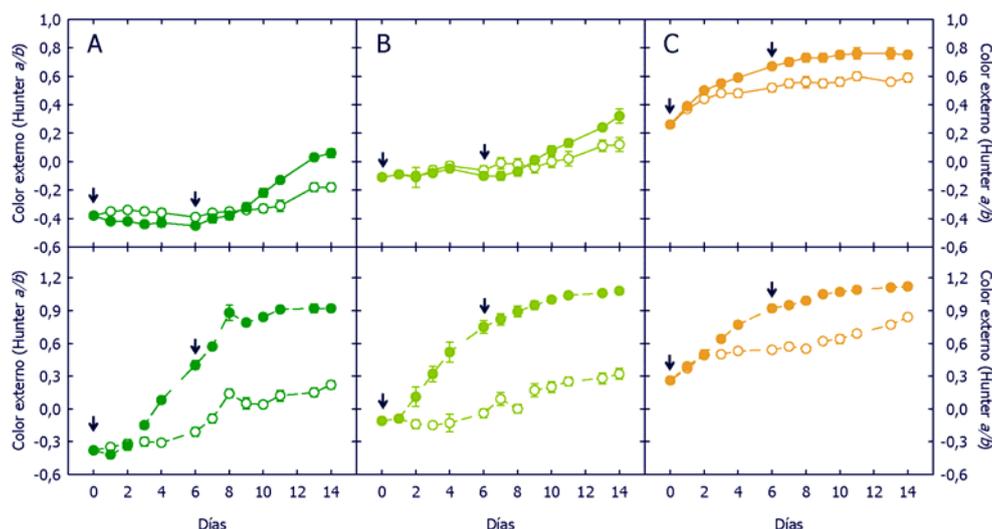


Figura 59. Evolución del color del flavedo de frutos de mandarina 'Fortune' tratados (○) y no tratados (●) con 1-MCP en atmósfera de aire (paneles superiores) y de etileno (2 µL / L) (paneles inferiores). Las flechas indican el tratamiento con 1-MCP (4 µL / L). La nomenclatura **A-C** se corresponde con los distintos estadios de coloración indicados en la **Figura 57**: **A.** Frutos verdes ($a/b = -0,38 \pm 0,01$); **B.** Frutos virando ($a/b = -0,11 \pm 0,01$); y **C.** Frutos coloreados ($a/b = 0,26 \pm 0,01$). Los valores son la media \pm DE de al menos 10 frutos independientes.

El tratamiento con 1-MCP durante 14 días no provocó cambios importantes en la evolución del contenido de carotenoides totales en el flavedo de los frutos de mandarina 'Fortune' entre los frutos control y los tratados con 1-MCP (**Figura 61**).

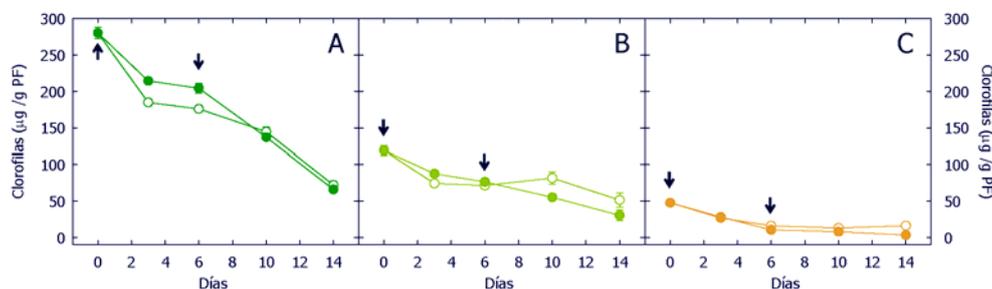


Figura 60. Evolución del contenido de clorofilas en el flavedo de frutos de mandarina 'Fortune' tratados (○) y no tratados (●) con 1-MCP en atmósfera de aire. Las flechas indican el momento en el que se aplicó el tratamiento con 1-MCP (4 µL / L). La nomenclatura **A-C** se corresponde con los distintos estadios de coloración indicados en la **Figura 57**: **A.** Frutos verdes ($a/b = -0,38 \pm 0,01$); **B.** Frutos virando ($a/b = -0,11 \pm 0,01$); y **C.** Frutos coloreados ($a/b = 0,26 \pm 0,01$). Los valores son la media \pm DE de al menos 3 análisis independientes.

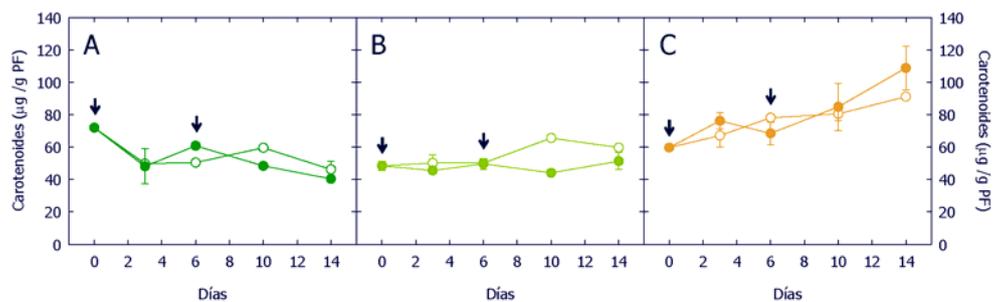


Figura 61. Evolución del contenido de carotenoides totales en el flavedo de frutos de mandarina 'Fortune' tratados (o) y no tratados (●) con 1-MCP en atmósfera de aire. Las flechas indican el momento en el que se aplicó el tratamiento con 1-MCP (4 µL / L). La nomenclatura **A-C** se corresponde con los distintos estadios de coloración indicados en la **Figura 57**: **A.** Frutos verdes ($a/b = -0,38 \pm 0,01$); **B.** Frutos virando ($a/b = -0,11 \pm 0,01$); y **C.** Frutos coloreados ($a/b = 0,26 \pm 0,01$). Los valores son la media \pm DE de al menos 3 análisis independientes.

1.1.2. Evolución de la composición de carotenoides en el flavedo

La composición de carotenoides en el flavedo de los frutos de mandarina 'Fortune' durante las dos semanas de conservación se analizó, mediante HPLC-PDA, en los tres estadios de maduración. En los tres estadios, la proporción de carotenoides lineales y cíclicos se mantuvo relativamente constante, a diferencia de las ϵ,β - y β,β -xantofilas. El perfil de carotenoides en cada uno de los estadios de coloración fue diferente. Así, el contenido de ϵ,β -xantofilas descendió tanto con la maduración del fruto como la conservación de los frutos a 20 °C, sin presentar diferencias importantes entre los controles y los tratados con 1-MCP (**Figura 62**, **Figura 63** y **Figura 64**). Por su parte, las β,β -xantofilas aumentaron, principalmente el apocarotenoide β -citraurina. El carotenoide mayoritario fue la *cis*-violaxantina, representando el 21,26, 30,55 y 34,89%, respectivamente, en los tres estadios de coloración estudiados. De la misma forma, el contenido de β -citraurina incrementó de 0,50 µg / g PF en el flavedo de los de frutos verdes al 2,55 µg / g PF en los frutos más coloreados. En general, durante la conservación de los frutos en los tres estadios analizados, la mayoría de los carotenoides descendieron, mostrando escasas diferencias entre los frutos control y los tratados con 1-MCP. Sin embargo, el apocarotenoide β -citraurina y la mutatoxantina aumentaron sus respectivas concentraciones en los frutos virando y coloreados, mientras que el carotenoide mayoritario, *cis*-violaxantina, se mantuvo constante en los dos estadios más verdes, aumentando en los coloreados (**Figura 62**, **Figura 63** y **Figura 64**).

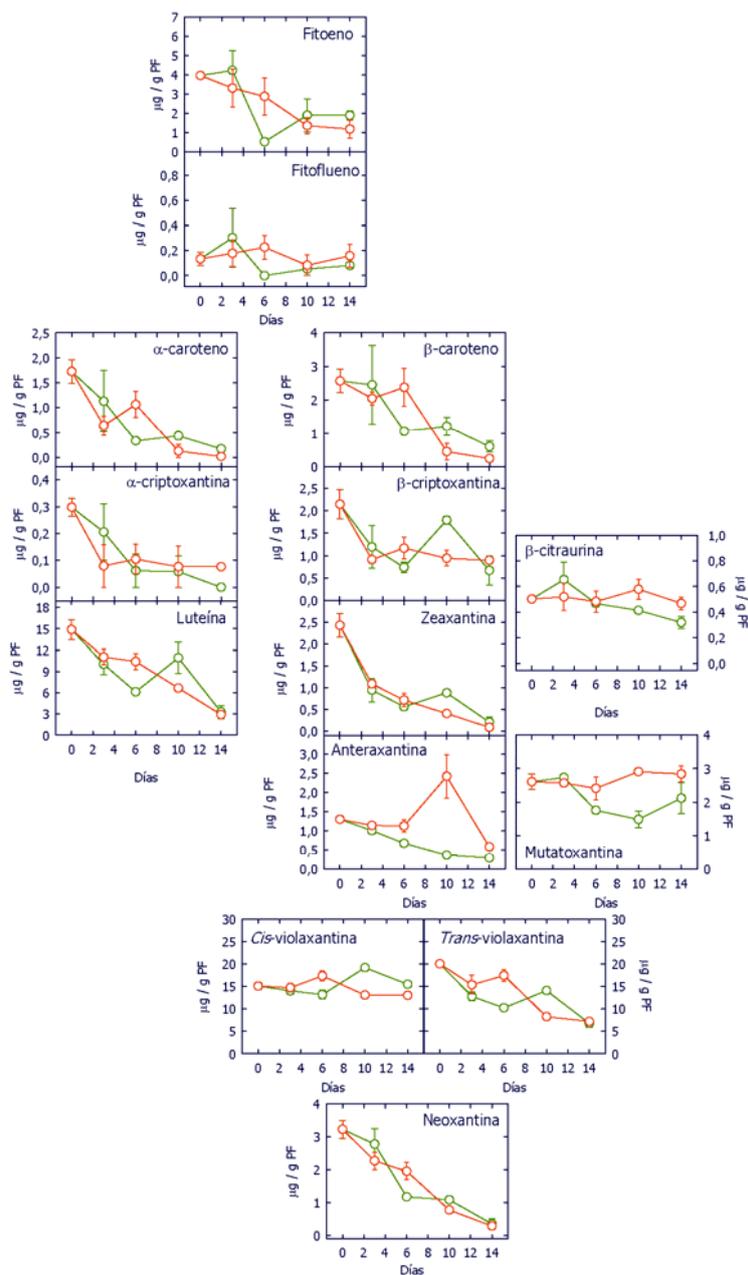


Figura 62. Composición y contenido de carotenoides en el flavedo de frutos de mandarina 'Fortune', recolectados con un a/b inicial de $-0,38 \pm 0,01$, tratados con $4 \mu\text{L} / \text{L}$ de 1-MCP (○) y no tratados (○) y mantenidos durante 14 días a $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Los valores son la media \pm DE de al menos 3 análisis independientes.

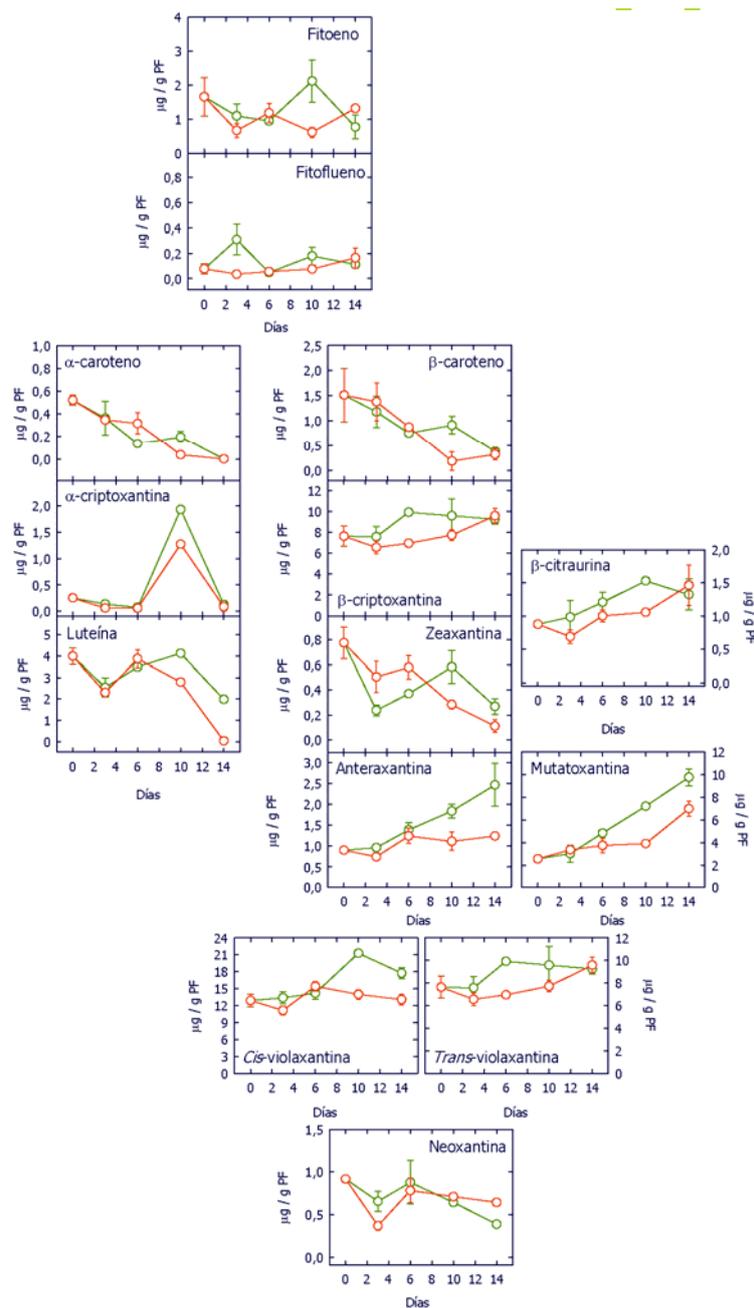


Figura 63. Composición y contenido de carotenoides en el flavedo de frutos de mandarina 'Fortune', recolectados con un a/b inicial de $-0,11 \pm 0,01$, tratados con $4 \mu\text{L} / \text{L}$ de 1-MCP (○) y no tratados (◻) y mantenidos durante 14 días a $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Los valores son la media \pm DE de al menos 3 análisis independientes.

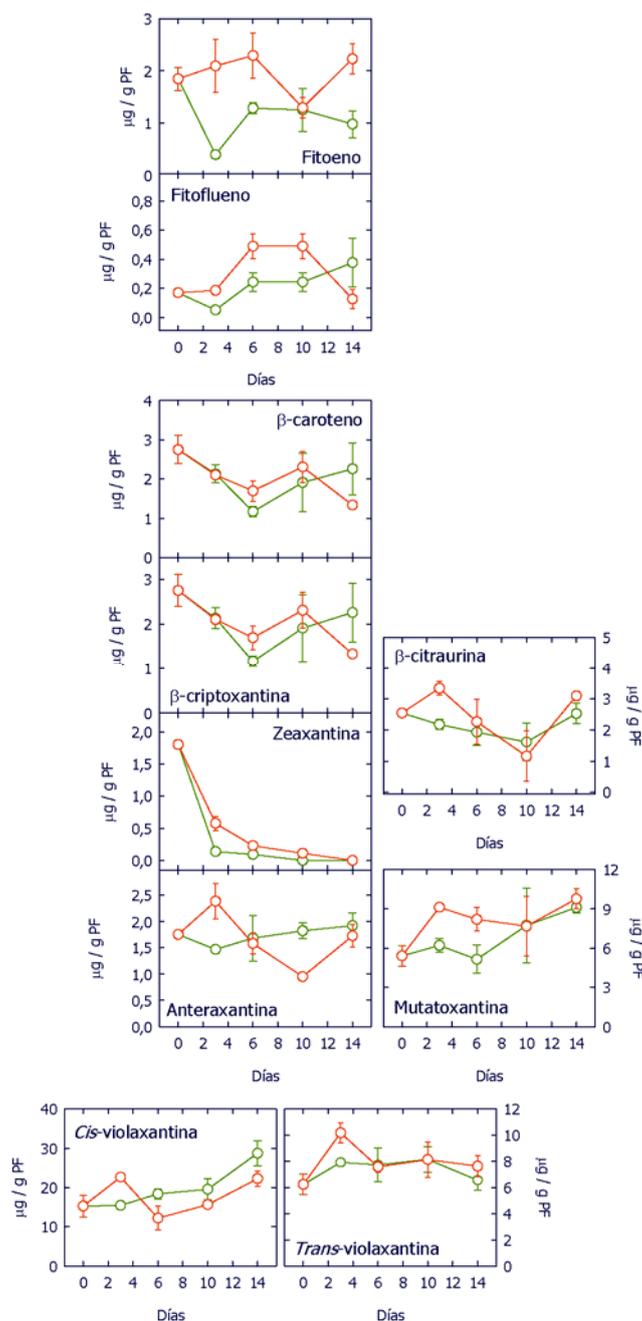


Figura 64. Composición y contenido de carotenoides en el flavedo de frutos de mandarina 'Fortune', recolectados con un a/b inicial de $0,26 \pm 0,01$, tratados con $4 \mu\text{L} / \text{L}$ de 1-MCP (\circ) y no tratados (\square) y mantenidos durante 14 días a 20°C . Los valores son la media \pm DE de al menos 3 análisis independientes.

1.1.3. Análisis de la expresión de los genes de la biosíntesis de carotenoides en el flavedo

Con el fin de analizar los efectos de la inhibición de la acción del etileno por 1-MCP en la expresión de algunos genes de la biosíntesis de carotenoides y su posible correlación con los niveles de los carotenoides individuales, se realizó un análisis, mediante RT-qPCR, de la acumulación de los mRNA correspondientes a los genes *PSY*, *βLCY1*, *βLCY2* y *βCHX* (**Figura 65**, **Figura 66** y **Figura 67**).

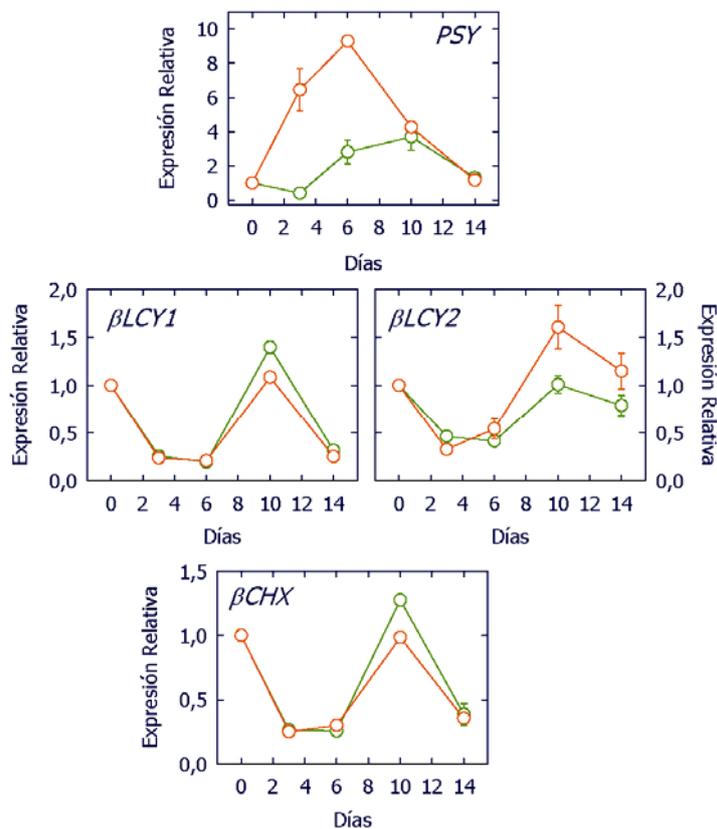


Figura 65. Expresión relativa de cuatro genes implicados en la biosíntesis de carotenoides en el flavedo de frutos de mandarina 'Fortune', recolectados con un a/b inicial de $-0,38 \pm 0,01$, tratados con $4 \mu\text{L} / \text{L}$ de 1-MCP (○) y no tratados (○) y mantenidos durante 14 días a $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Los valores obtenidos para cada gen están normalizados frente a los niveles de expresión al inicio del tratamiento (día 0) de los frutos verdes ($a/b = -0,38 \pm 0,01$, **Figura 57**), al que se le asigna un valor relativo de 1.

A lo largo de la maduración los genes se expresaron de forma diferente en el flavedo, así mientras los genes *PSY* y *βLCY2* incrementaron su expresión 10 y 3 veces, respectivamente, en los frutos más coloreados respecto a los verdes, los

genes *βLCY1* y *βCHX* disminuyeron su expresión un 80% y un 32%, respectivamente (**Figura 65**, **Figura 66** y **Figura 67**).

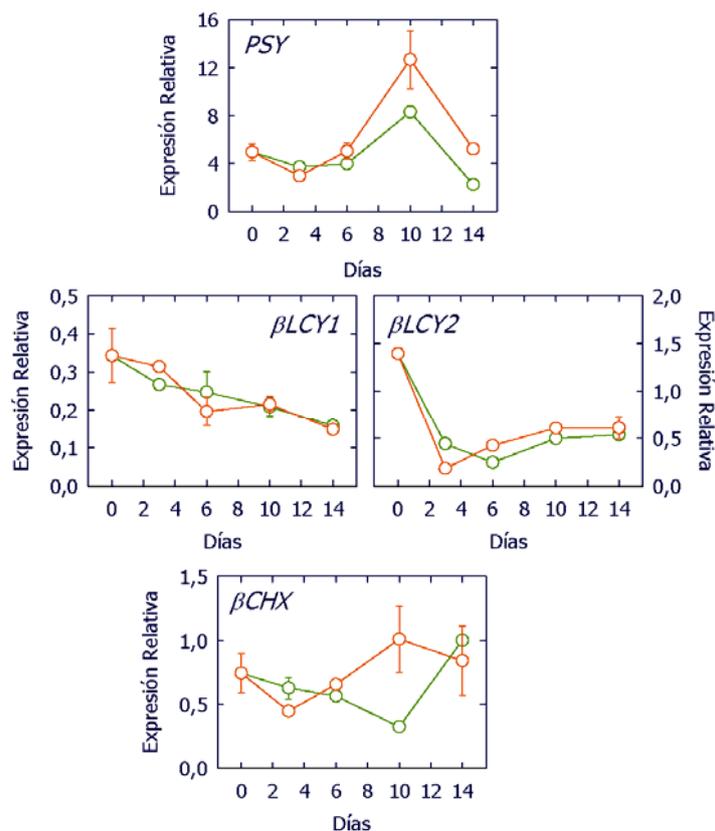


Figura 66. Expresión relativa de cuatro genes implicados en la biosíntesis de carotenoides en el flavedo de frutos de mandarina 'Fortune', recolectados con un a/b inicial de $-0,11 \pm 0,01$, tratados con $4 \mu\text{L} / \text{L}$ de 1-MCP (○) y mantenidos durante 14 días a $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Los valores obtenidos para cada gen están normalizados frente a los niveles de expresión al inicio del tratamiento (día 0) de los frutos verdes ($a/b = -0,38 \pm 0,01$, **Figura 57**), al que se le asigna un valor relativo de 1.

El perfil de expresión de los genes estudiados a lo largo del periodo de conservación fue diferente, dependiendo del estadio de maduración. En los dos estadios de coloración menos avanzados, que fueron los que presentaron la expresión de *PSY* más baja al inicio del experimento, mostraron un aumento transitorio en la expresión de este gen en los frutos control, mientras que en los tratados con 1-MCP este efecto se redujo parcialmente (**Figura 65** y **Figura 66**). Los frutos más coloreados presentaron inicialmente un alto nivel de mRNA de *PSY*,

que disminuyó durante el periodo de tratamiento, independientemente del tratamiento con 1-MCP (**Figura 67**).

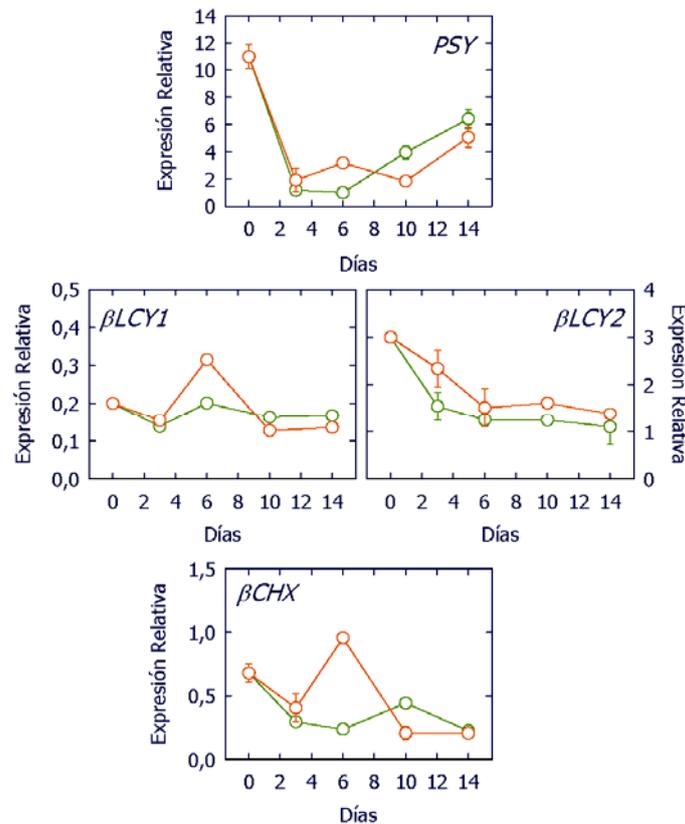


Figura 67. Expresión relativa de cuatro genes implicados en la biosíntesis de carotenoides en el flavedo de frutos de mandarina 'Fortune', recolectados con un a/b inicial de $0,26 \pm 0,01$, tratados con $4 \mu\text{L} / \text{L}$ de 1-MCP (○) y no tratados (○) y mantenidos durante 14 días a $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Los valores obtenidos para cada gen están normalizados frente a los niveles de expresión al inicio del tratamiento (día 0) de los frutos verdes ($a/b = -0,38 \pm 0,01$, **Figura 57**), al que se le asigna un valor relativo de 1.

La expresión del gen βLCY1 mostró efectos variables durante los 14 días de conservación. Aunque, en general, mostró una tendencia a descender no se detectaron diferencias por la aplicación de 1-MCP. Los transcritos de βLCY2 sólo mostraron un incremento en los frutos verdes durante la segunda semana de conservación, y dicho incremento se vio reducido por la aplicación de 1-MCP (**Figura 65**). En cambio, en los dos estadios de coloración más avanzados se observó un descenso en la expresión de βLCY2 , tanto en los frutos control como en los tratados con el inhibidor (**Figura 66** y **Figura 67**). Por último, el perfil de

acumulación del transcrito de βCHX mostró en los frutos verdes un descenso transitorio, tras el cual incrementó hasta alcanzar niveles similares a los iniciales. En los frutos virando y coloreados, este incremento observado en la expresión de βCHX se redujo por el tratamiento con 1-MCP (**Figura 66** y **Figura 67**). En general, estos resultados muestran que la inhibición de la acción del etileno por 1-MCP sólo redujo la expresión de algunos genes y en el momento de mayor incremento de su expresión.

1.2. Efecto de la aplicación del inhibidor de la acción del etileno 1-MCP durante la postcosecha de frutos de mandarina 'Clemenules' en tres estadios de maduración

Con el fin de comparar los efectos del 1-MCP en la carotenogénesis en frutos de una segunda variedad de mandarina, se seleccionó la mandarina 'Clemenules', que junto con otras características, presenta una velocidad de coloración más rápida que la variedad 'Fortune', lo que podría ampliar las conclusiones de este estudio. Se seleccionaron frutos en tres estadios de coloración similares a los de 'Fortune' (**Figura 57**) y se trataron con 1-MCP inmediatamente después de la recolección y a los 6 días.

Conviene destacar que los frutos de esta variedad tratados con 1-MCP, a diferencia de los de mandarina 'Fortune', desarrollaron importantes manchas en la piel, como se muestra en la **Figura 68**. Estas manchas o lesiones comenzaron a detectarse a partir de los 7 días de conservación y se manifestaron inicialmente como pequeñas manchas de color marrón-pardo, que se extendieron progresivamente sobre la superficie de los frutos y se ennegrecieron, confiriendo una apariencia de tejido necrosado. Las zonas internas del fruto también se vieron afectadas, fueron más blandas y presentaron un oscurecimiento y ennegrecimiento del albedo e incluso de las zonas adyacentes de los gajos. Tras 14 días de tratamiento, un porcentaje importante de los frutos estuvieron afectados y, aunque no se realizó un análisis cuantitativo de los frutos lesionados, estas alteraciones se observaron de forma consistente en los frutos en los tres estadios de coloración. Es interesante destacar que fueron los frutos más verdes lo que presentaron una mayor y más severa incidencia de los daños (**Figura 68**).



Figura 68. Detalle de los daños causados por el tratamiento con 1-MCP ($4 \mu\text{L} / \text{L}$) en el flavedo y en la pulpa de frutos de mandarina 'Clemenules' ($a/b = -0,38 \pm 0,01$, **Figura 57**) y conservados a $20 \text{ }^\circ\text{C}$, a los 6, 10 y 14 días del primer tratamiento.

1.2.1. Cambios en el color externo y en el contenido de clorofilas y carotenoides totales

El aspecto externo de los frutos de mandarina 'Clemenules' tratados y no tratados con 1-MCP durante la conservación a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ se muestra en la **Figura 69**. En esta variedad, a diferencia de las mandarinas 'Fortune', durante la conservación postcosecha a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ se produjo una rápida inducción del cambio del color en el flavedo, principalmente en los frutos verdes y virando. Estos resultados indican una mayor y más rápida capacidad carotenogénica de los frutos de esta variedad de mandarina.

En general, la evolución de la coloración de los frutos tratados con 1-MCP mostró un ligero retraso respecto a los frutos control, que se hizo patente a partir de los 6-7 días del inicio del experimento en los tres estadios de coloración (**Figura 70**). Así, por ejemplo, los frutos de los estadios más coloreados al final del tratamiento con 1-MCP mostraron una diferencia de 0,2 unidades en su índice de coloración (**Figura 70 B y C**).

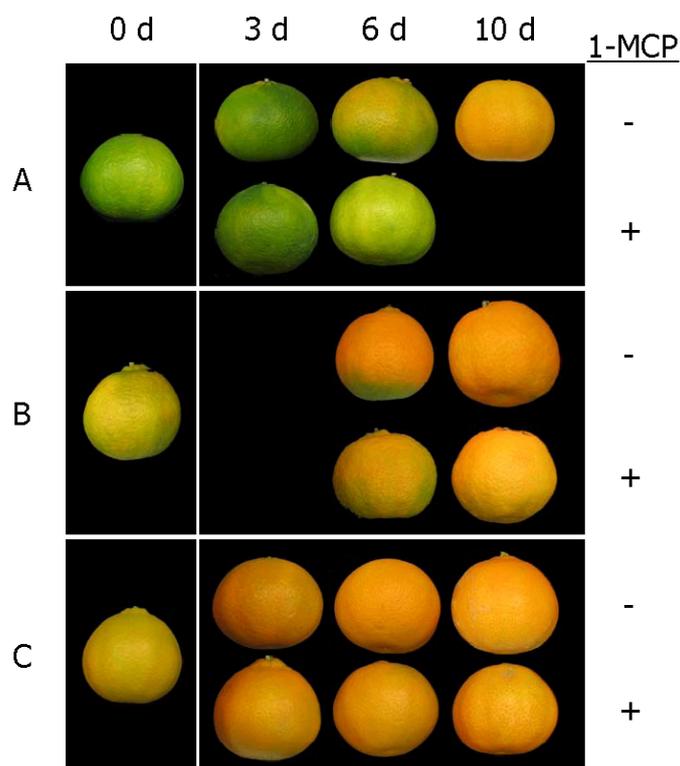


Figura 69. Aspecto y color del flavedo de los frutos de mandarina 'Clemenules' en 3 estadios de maduración tratados (+) y no tratados (-) con $4 \mu\text{L} / \text{L}$ de 1-MCP. La nomenclatura **A-C** se corresponde con los distintos estadios de coloración indicados en la **Figura 57**: **A.** Frutos verdes ($a/b = -0,41 \pm 0,01$); **B.** Frutos virando ($a/b = -0,10 \pm 0,01$); y **C.** Frutos coloreados ($a/b = 0,27 \pm 0,01$). Los valores son la media \pm DE de al menos 10 frutos independientes.

Con el fin de corroborar la eficacia de los tratamientos con 1-MCP en los procesos estudiados, se determinó el cambio de color en frutos virando, tratados o no con 1-MCP, e incubados en una atmósfera de etileno ($2 \mu\text{L} / \text{L}$). En la **Figura 71** se muestra que el 1-MCP retrasó eficientemente la velocidad de coloración respecto a los frutos control y, tras los 14 días de tratamiento el índice de color en estos frutos fue de $1,12 \pm 0,07$ frente a $0,47 \pm 0,03$ en los tratados con el inhibidor.

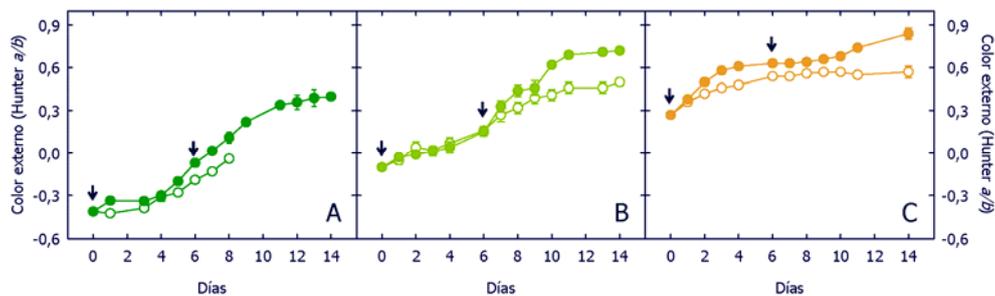


Figura 70. Evolución del color del flavedo de frutos de mandarina 'Clemenules' tratados (o) y no tratados (●) con 1-MCP en atmósfera con aire. Las flechas indican el momento del tratamiento con 1-MCP (4 $\mu\text{L} / \text{L}$). La nomenclatura **A-C** se corresponde con los distintos estadios de coloración indicados en la **Figura 57**: **A**. Frutos verdes ($a/b = -0,41 \pm 0,01$); **B**. Frutos virando ($a/b = -0,10 \pm 0,01$); y **C**. Frutos coloreados ($a/b = 0,27 \pm 0,01$). Los valores son la media \pm DE de al menos 10 frutos independientes.

La evolución del contenido de clorofilas tras la aplicación de 1-MCP durante la postcosecha de frutos de mandarina 'Clemenules' se muestra en la **Figura 72**.

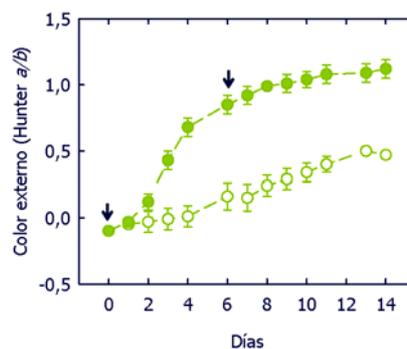


Figura 71. Evolución del color del flavedo de frutos de mandarina 'Clemenules' virando de color (estadio B de la **Figura 70**) tratados (o) y no tratados (●) con 1-MCP e incubados en atmósfera de etileno (2 $\mu\text{L} / \text{L}$). Las flechas indican el momento del tratamiento con 1-MCP (4 $\mu\text{L} / \text{L}$). Los valores son la media \pm DE de al menos 10 frutos independientes.

La mayor concentración de clorofilas se observó en los frutos verdes al inicio del tratamiento ($186,44 \pm 17,44 \mu\text{g} / \text{g PF}$), que a lo largo del tratamiento fue disminuyendo progresivamente, observándose una disminución más rápida en los frutos tratados con 1-MCP. Al final del periodo de tratamiento (14 días) el contenido de clorofilas disminuyó un 70% en los frutos control (**Figura 72 A**). En

los frutos virando de mandarina 'Clemenules' se produjo un descenso en el contenido de clorofilas similar, tanto en los frutos tratados como en los control (**Figura 72 B**). La concentración de clorofilas en los frutos coloreados fue muy baja ($24,42 \pm 0,01 \mu\text{g/ g PF}$), no detectándose niveles cuantificables al tercer día de tratamiento, por lo que, no se realizaron estos análisis.

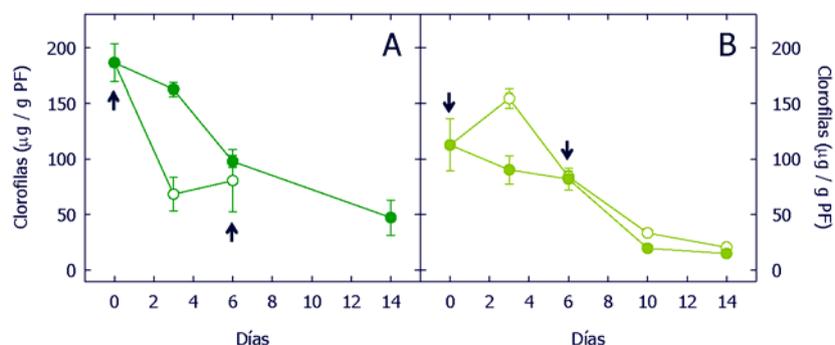


Figura 72. Evolución del contenido de clorofilas en el flavedo de frutos de mandarina 'Clemenules' tratados (○) y no tratados (●) con 1-MCP en atmósfera con aire. Las flechas indican el momento en el que se aplicó el tratamiento con 1-MCP ($4 \mu\text{L} / \text{L}$). La nomenclatura **A-B** se corresponde con los distintos estadios de coloración indicados en la **Figura 57**: **A**. Frutos verdes ($a/b = -0,41 \pm 0,01$) y **B**. Frutos virando ($a/b = -0,10 \pm 0,01$). Los valores son la media \pm DE de al menos 10 frutos independientes.

La evolución del contenido de carotenoides totales en el flavedo de los frutos de mandarina 'Clemenules' en los tres estadios de coloración no mostró diferencias importantes entre los frutos controles y aquellos tratados con 1-MCP (**Figura 73**). El incremento del contenido en carotenoides totales en los frutos verdes y virando fue aproximadamente del 37% (**Figura 73 A y B**) tras 14 días de tratamiento, mientras que en los frutos coloreados prácticamente se triplicó (**Figura 73 C**).

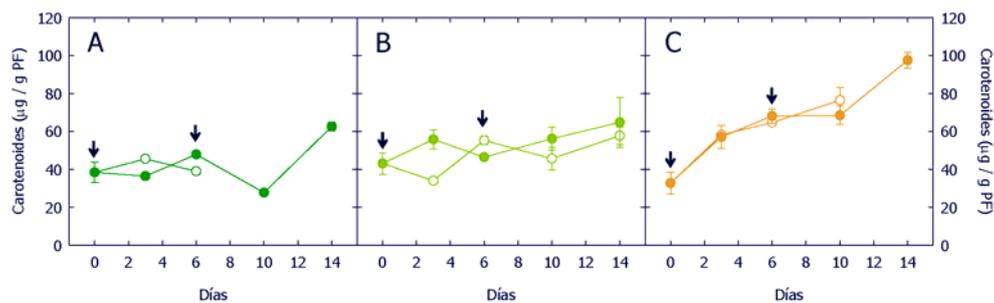


Figura 73. Evolución del contenido de carotenoides totales en el flavedo de frutos de mandarina 'Clemenules' tratados (o) y no tratados (●) con 1-MCP en atmósfera con aire. Las flechas indican el momento en el que fue aplicado el tratamiento con 1-MCP (4 µL / L). La nomenclatura **A-C** se corresponde con los distintos estadios de coloración indicados en la **Figura 57**: **A.** Frutos verdes ($a/b = -0,41 \pm 0,01$); **B.** Frutos virando ($a/b = -0,10 \pm 0,01$); y **C.** Frutos coloreados ($a/b = 0,27 \pm 0,01$). Los valores son la media \pm DE de al menos 10 frutos independientes.

1.2.2. Evolución de la composición de carotenoides en el flavedo

La composición de carotenoides en el flavedo de los frutos de mandarinas 'Clemenules' en los tres estadios analizados muestra que, en general, el contenido de los carotenoides lineales se incrementó ligeramente en los estadios más avanzados de coloración, mientras que la concentración de las xantofilas se mantuvo relativamente constante, variando la proporción de las ϵ,β - y β,β -xantofilas. Así, con el cambio de color disminuyó el contenido de luteína y aumentaron las β,β -xantofilas, como la β -criptoxantina, violaxantina y del apocarotenoide β -citaurina (**Figura 74**, **Figura 75** y **Figura 76**).

El perfil de carotenoides a lo largo del tratamiento con 1-MCP en frutos verdes de mandarina 'Clemenules' se muestra en la **Figura 74**. En general, la evolución de los carotenoides cloroplásticos disminuyó de forma similar tanto en frutos tratados con el inhibidor como en los frutos control. La inhibición de la acción del etileno no modificó la concentración de la mayoría de los carotenoides, mientras que para algunas β,β -xantofilas (β -criptoxantina, anteraxantina, mutatoxantina y *cis*-violaxantina) los niveles aumentaron durante la primera semana del tratamiento (**Figura 74**). Durante la segunda semana, los frutos tratados mostraron daños externos severos, por lo que no se pudo obtener el perfil de carotenoides individuales.

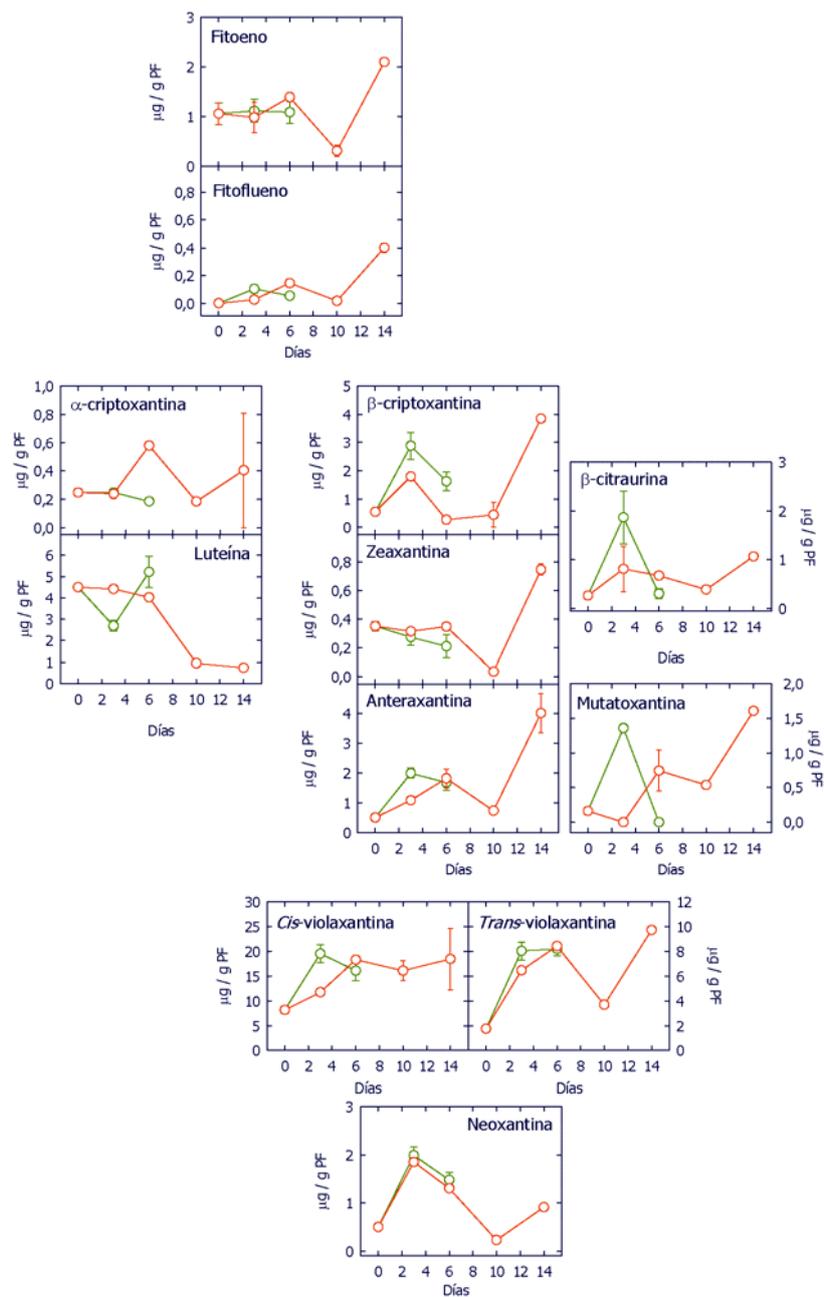


Figura 74. Composición y contenido de carotenoides del flavedo de frutos de mandarina 'Clemenules', recolectados con un *a/b* inicial de $-0,41 \pm 0,01$, tratados con $4 \mu\text{L} / \text{L}$ de 1-MCP (○) y no tratados (○) y mantenidos durante 14 días a $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Los valores son la media \pm DE de al menos 3 análisis independientes.

En los frutos virando de color, la mayoría de los carotenoides aumentaron durante el periodo de conservación, excepto los de la rama ϵ, β que disminuyeron (**Figura 75**). En los frutos tratados con 1-MCP se detectaron aumentos en el contenido de pigmentos cloroplásticos característicos, α - y β -caroteno, luteína, zeaxantina o neoxantina, y fitoeno, especialmente durante la primera semana. Las concentraciones de los carotenoides más abundantes como la *cis*-violaxantina o de otros con importante contribución en la coloración, como la β -criptoxantina o β -citraurina, aumentaron durante la conservación y de forma similar con el tratamiento de 1-MCP (**Figura 75**).

En el flavedo de los frutos coloreados, la mayoría de carotenoides presentaron concentraciones superiores a los estadíos anteriores, que, por lo general, aumentaron durante los 14 días de almacenamiento, sin observarse diferencias importantes entre los frutos control y los tratados con 1-MCP (**Figura 76**). Al final del periodo de tratamiento, las xantofilas anteraxantina y mutatoxantina aumentaron 2 y 6 veces, respectivamente, mientras que la *cis*-violaxantina y la β -citraurina, lo hicieron 3 y 4 veces, respectivamente (**Figura 76**).

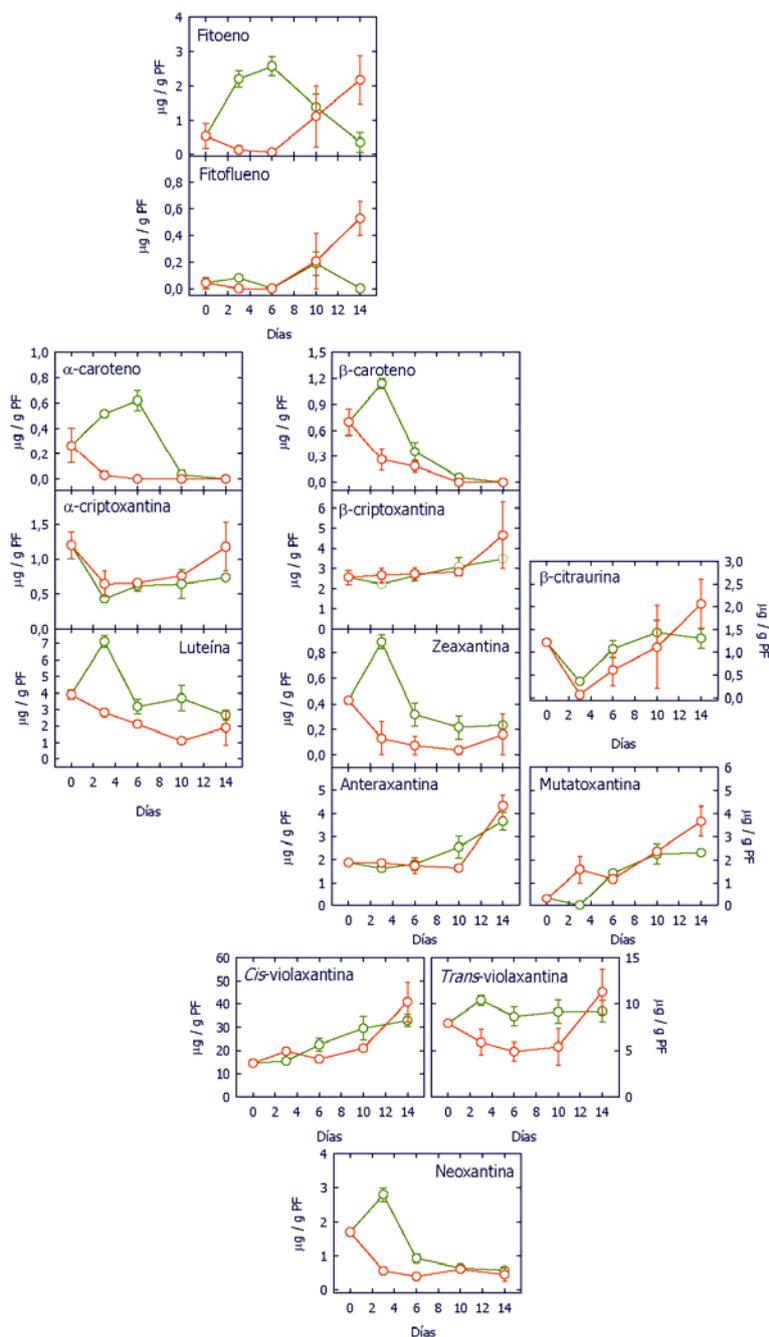


Figura 75. Composición y contenido de carotenoides en el flavedo de frutos de mandarina 'Clemenules', recolectados con un *a/b* inicial de $-0,10 \pm 0,01$, tratados con $4 \mu\text{L} / \text{L}$ de 1-MCP (○) y no tratados (◻) y mantenidos durante 14 días a $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Los valores son la media \pm DE de al menos 3 análisis independientes.

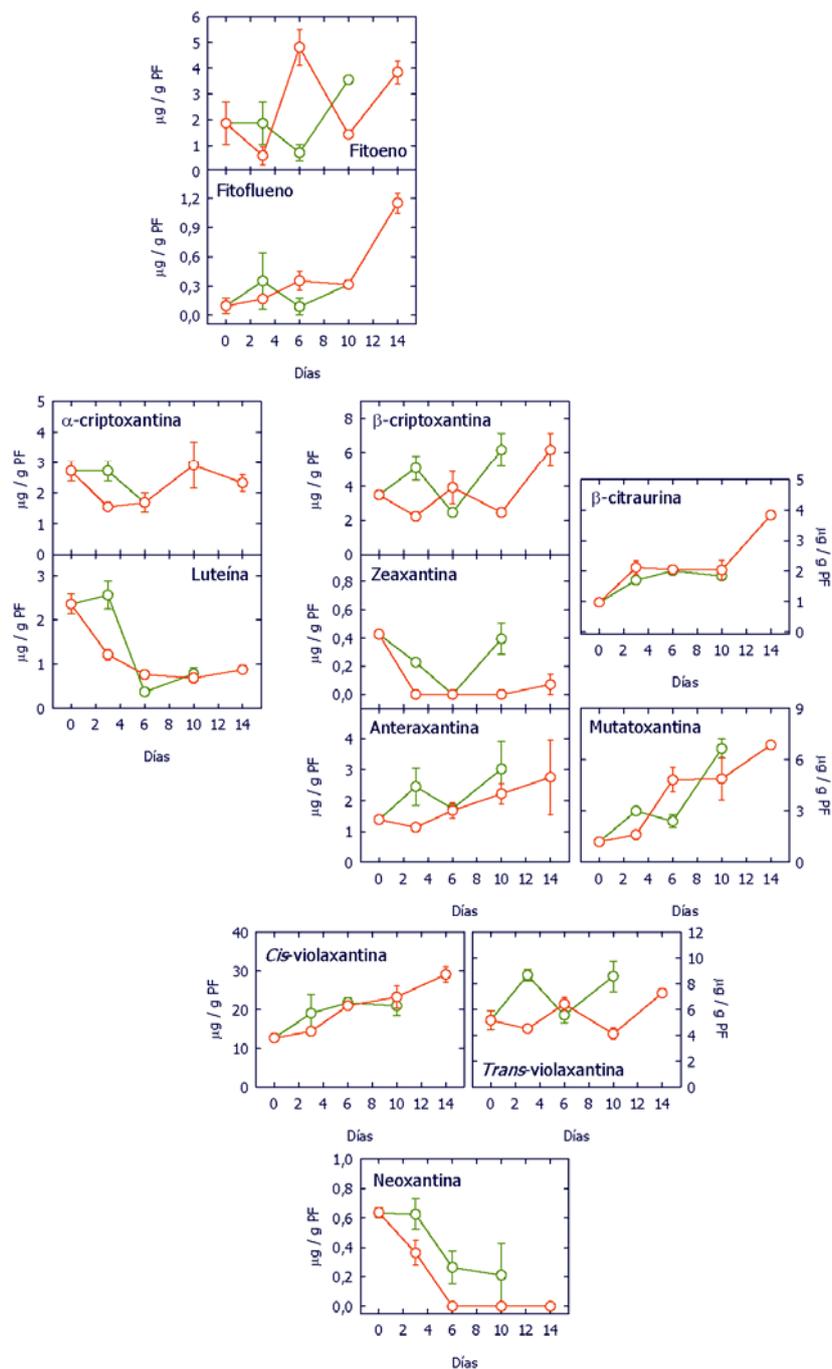


Figura 76. Composición y contenido de carotenoides en el flavedo de frutos de mandarina 'Clemenules', recolectados con un *a/b* inicial de $0,27 \pm 0,01$, tratados con $4 \mu\text{L} / \text{L}$ de 1-MCP (○) y no tratados (□) y mantenidos durante 14 días a $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Los valores son la media \pm DE de al menos 3 análisis independientes.

1.2.3. Análisis de la expresión de genes de la biosíntesis de carotenoides en el flavedo

El análisis de expresión mediante RT-qPCR de cuatro genes de la biosíntesis de carotenoides (*PSY*, *βLCY1* y *βLCY2*, y *βCHX*) reveló diferencias importantes debidas al tratamiento con 1-MCP y también respecto a los resultados obtenidos en mandarina 'Fortune' (**Figura 77**, **Figura 78** y **Figura 79**).

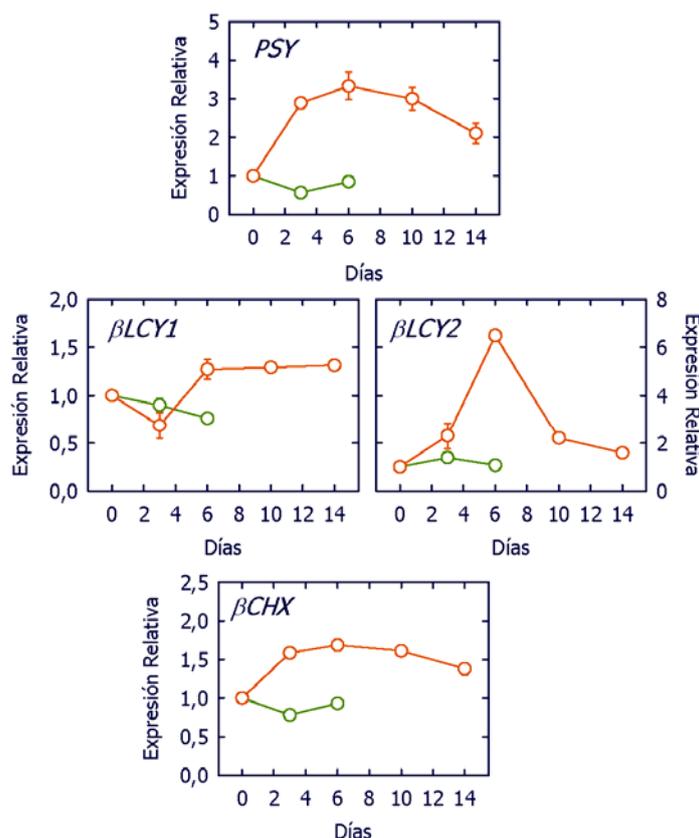


Figura 77. Expresión relativa de cuatro genes implicados en la biosíntesis de carotenoides en el flavedo de frutos de mandarina 'Clemenules', recolectados con un a/b inicial de $-0,41 \pm 0,01$, tratados con $4 \mu\text{L} / \text{L}$ de 1-MCP (○) y no tratados (○) y mantenidos durante 14 días a $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Los valores obtenidos para cada gen están normalizados frente a los niveles de expresión al inicio del tratamiento (día 0) de los frutos verdes ($a/b = -0,41 \pm 0,01$, **Figura 57**), al que se le asigna un valor relativo de 1.

Durante la maduración de los frutos de mandarinas 'Clemenules', la acumulación de mRNA del gen *PSY* mostró un incremento superior a 22 veces, y de 2 y 3 veces la de los genes *βLCY2* y *βCHX*, respectivamente (**Figura 77**, **Figura 78** y **Figura 79**). Es importante destacar que la inducción observada en la

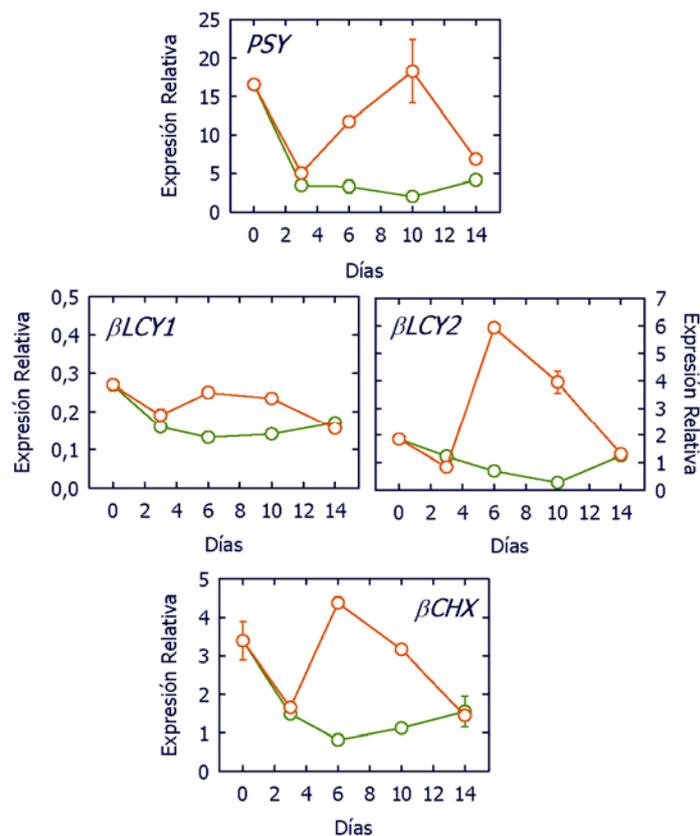


Figura 78. Expresión relativa de cuatro genes implicados en la biosíntesis de carotenoides en el flavedo de frutos de mandarina 'Clemenules' recolectados con un a/b inicial de $-0,10 \pm 0,01$ tratados con $4 \mu\text{L} / \text{L}$ de 1-MCP (○) y no tratados (○) y mantenidos durante 14 días a $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Los valores obtenidos para cada gen están normalizados frente a los niveles de expresión al inicio del tratamiento (día 0) de los frutos verdes ($a/b = -0,41 \pm 0,01$, **Figura 57**), al que se le asigna un valor relativo de 1.

expresión de estos tres genes en los frutos control durante la conservación a $20 \text{ }^\circ\text{C}$, prácticamente se suprimió por el tratamiento con 1-MCP, tanto en los frutos verdes como virando (**Figura 77** y **Figura 78**).

En general, en los tres estadios estudiados, el gen *βLCY1* fue el que experimentó menores cambios de expresión en los frutos control, incluso mostró descensos en la acumulación de su mRNA, por lo que el efecto del 1-MCP fue de menor magnitud (**Figura 77**, **Figura 78** y **Figura 79**). En los frutos coloreados no tratados, el gen *βLCY2* fue el que mostró el mayor incremento de expresión respecto al valor inicial, y en los frutos tratados con 1-MCP también se redujo de su expresión (**Figura 79**). El mRNA de *PSY* disminuyó drásticamente a los 6 días para, posteriormente, incrementar sus niveles en los frutos control y sin mostrar

ningún efecto en lo tratados con el inhibidor. Este conjunto de resultados muestra que la inhibición de la acción del etileno, mediante la aplicación de 1-MCP, suprimió eficientemente los aumentos de la expresión que se producen en los genes de biosíntesis de carotenoides, principalmente *PSY*, *β LCY2* y *β CHX*, durante el almacenamiento postcosecha a 20 °C en frutos verdes y virando.

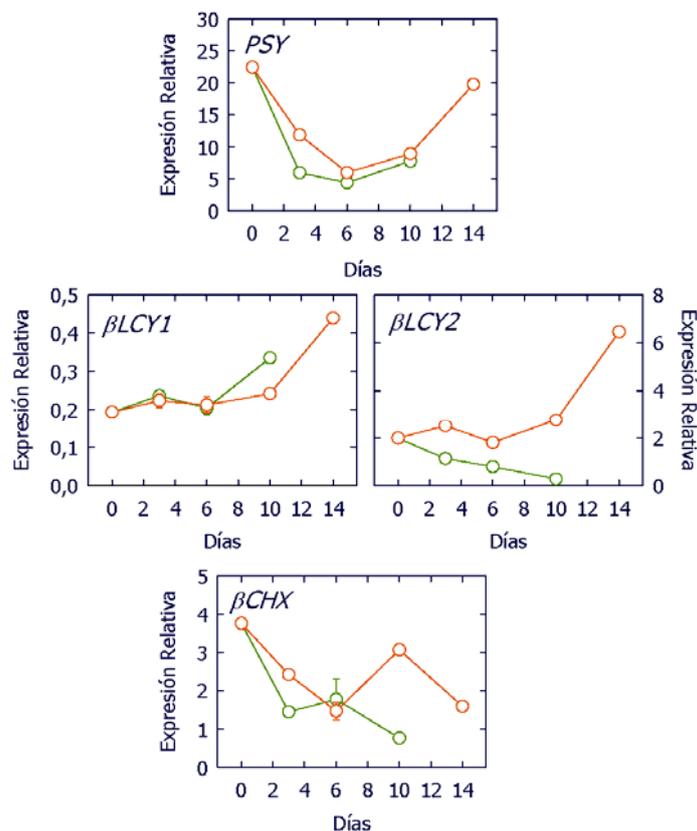


Figura 79. Expresión relativa de cuatro genes implicados en la biosíntesis de carotenoides en el flavedo de frutos de mandarina 'Clemenules' recolectados con un a/b inicial de $0,27 \pm 0,01$ tratados con $4 \mu\text{L} / \text{L}$ de 1-MCP (○) y no tratados (○) y mantenidos durante 14 días a 20 °C. Los valores obtenidos para cada gen están normalizados frente a los niveles de expresión al inicio del tratamiento (día 0) de los frutos verdes ($a/b = -0,41 \pm 0,01$, **Figura 57**), al que se le asigna un valor relativo de 1.

2. Estudio del papel del etileno endógeno en la biosíntesis y acumulación de carotenoides en el flavedo durante la maduración natural de frutos de mandarina

Los resultados obtenidos en este capítulo muestran que los efectos de la inhibición del etileno en los frutos de ambas variedades de mandarina fueron diferentes. De estos resultados se deduce que el tratamiento con 1-MCP inhibió la expresión de algunos de los genes de la biosíntesis de carotenoides, a pesar de que sólo produjo un ligero retraso en la coloración de los frutos y escasos efectos en el contenido y composición de carotenoides. Dado que los procesos y efectos durante la postcosecha de los frutos pueden no reflejar exactamente los mecanismos operativos durante la maduración natural de los frutos y generarse, además, interferencias por la separación de los mismos del árbol, se decidió estudiar el posible efecto del etileno sobre la carotenogénesis durante la maduración natural, inhibiendo la acción del etileno mediante la aplicación de 1-MCP, en los frutos de las mismas variedades en el árbol y de forma similar a los estudios realizados previamente en uva (Chervin *et al.*, 2004).

Los experimentos de la aplicación de 1-MCP a frutos en el campo se realizaron con mandarinas 'Fortune' y 'Clemenules' en diferentes estadíos de coloración, tal como se describe en el Apartado 3.4 de Materiales y Métodos, en frutos embolsados que se expusieron a una concentración de 8 $\mu\text{L} / \text{L}$ durante aproximadamente 24 h, al inicio y a los 7 días. Posteriormente, se determinó la velocidad de coloración de los frutos y para comprobar la eficacia del tratamiento, se recolectaron frutos inmediatamente después del mismo y se incubaron en una atmósfera de etileno (2 $\mu\text{L} / \text{L}$) durante 14 días, comparando la velocidad de desverdización con la de los frutos no tratados.

2.1. Efecto de la aplicación del inhibidor de la acción del etileno 1-MCP a frutos en el árbol de mandarina 'Fortune'

El primer experimento de la aplicación de 1-MCP a frutos en el campo se realizó con mandarinas 'Fortune'. Para ello, se seleccionaron frutos en cuatro estadíos de coloración diferentes: frutos verdes ($a/b = -0,44 \pm 0,02$), frutos virando de color ($a/b = -0,28 \pm 0,04$), frutos que estaban aproximadamente en el momento del viraje de color ($a/b = 0,02 \pm 0,02$) y frutos coloreados ($a/b = 0,24 \pm 0,03$). El aspecto externo de los frutos, así como la evolución del color de la piel se determinó durante 14 días, tal y como se muestra en la **Figura 80**.

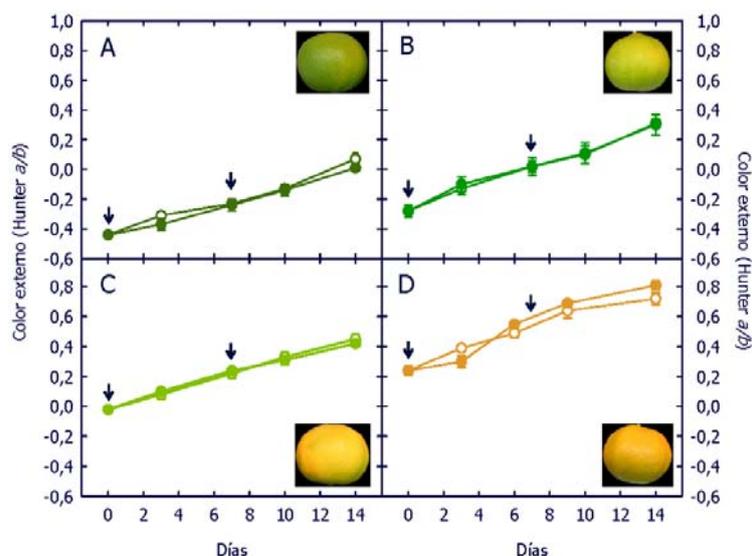


Figura 80. Aspecto inicial y evolución del color del flavedo de frutos de mandarina 'Fortune' tratados (○) y no tratados (●) con 1-MCP en el árbol. Las flechas indican el momento del tratamiento con 1-MCP (8 μ L / L). **A.** Frutos verdes ($a/b = -0,44 \pm 0,02$); **B.** Frutos virando ($a/b = -0,28 \pm 0,04$); **C.** Frutos en el momento del viraje ($a/b = 0,02 \pm 0,02$); y **D.** Frutos coloreados ($a/b = 0,24 \pm 0,03$). Los valores son la media \pm DE de al menos 10 frutos independientes.

Los resultados revelan que la velocidad de cambio de color fue muy similar y uniforme para los cuatro estadios de coloración, ya que incrementaron el color alrededor de 0,4-0,5 unidades a/b en el mismo periodo de tiempo. Es interesante destacar que, en general, no se observaron diferencias entre los frutos tratados o no con 1-MCP, sólo en los frutos coloreados se observaron ligeras diferencias en la tonalidad de la piel ($a/b = 0,81 \pm 0,03$ en los frutos control frente a $0,72 \pm 0,04$ en los tratados, a los 14 días) pero escasamente relevantes (**Figura 80**).

A pesar de la ausencia de diferencias en la velocidad de coloración entre los frutos control y aquellos tratados con 1-MCP, se comprobó si la aplicación del inhibidor en el campo había sido efectiva reduciendo la acción del etileno. En la **Figura 81** se observa la reducida respuesta de los frutos tratados con 1-MCP a la acción del etileno promoviendo el cambio de color. Después de 6 días de tratamiento con etileno la relación a/b de los frutos tratados con 1-MCP en campo fue $0,23 \pm 0,08$ frente a $0,68 \pm 0,03$ en los frutos control no tratados (**Figura 81**).

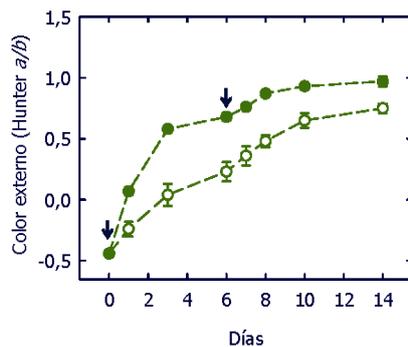


Figura 81. Evolución del color del flavedo de frutos de mandarina 'Fortune' con un índice de coloración inicial de $-0,44 \pm 0,02$ tratados (○) y no tratados (●) en árbol con 1-MCP ($8 \mu\text{L} / \text{L}$) e incubados durante 24 h en atmósfera de etileno ($2 \mu\text{L} / \text{L}$). Las flechas indican el momento en el que fue aplicado el tratamiento con 1-MCP. Los valores son la media \pm DE de al menos 10 frutos independientes.

2.2. Efecto de la aplicación del inhibidor de la acción del etileno 1-MCP a frutos en el árbol de mandarina 'Clemenules'

Para profundizar en el estudio del efecto de la inhibición de la acción del etileno por 1-MCP no sólo en la coloración de los frutos, sino también en el contenido y composición de carotenoides, así como en la expresión de los genes de biosíntesis de carotenoides, se realizó un tratamiento similar al descrito anteriormente pero en frutos de mandarinas 'Clemenules'. Para ello, se seleccionaron frutos verdes ($a/b = -0,35 \pm 0,02$) en los que la degradación de clorofilas ya se había iniciado y se realizaron dos tratamientos con 1-MCP, al inicio y después de 7 días. Después de cada tratamiento, se seleccionaron un grupo de frutos que se sometieron al tratamiento con etileno ($2 \mu\text{L} / \text{L}$) para verificar la efectividad de la inhibición de la acción de la hormona (Apartado 3.4 de Materiales y Métodos). El aspecto externo de los frutos a lo largo de los 14 días de tratamiento se muestra en la **Figura 82**.

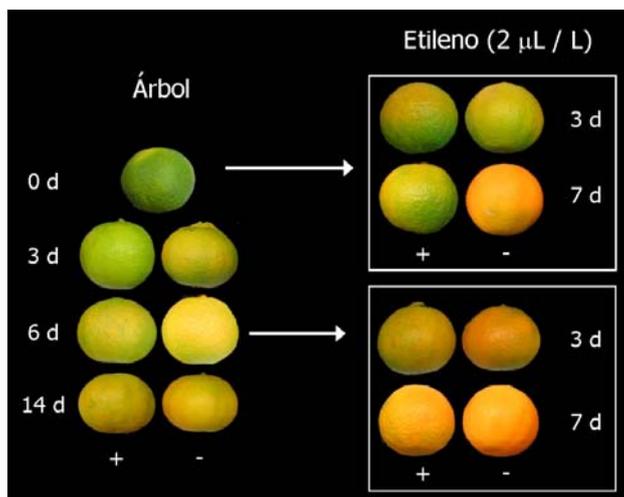


Figura 82. Aspecto y color del flavedo de los frutos de 'Clemenules', con un índice de coloración inicial a/b de $-0,35 \pm 0,02$ tratados (+) y sin tratar (-) con 1-MCP ($8 \mu\text{L} / \text{L}$) en el árbol. Se muestra el color de los frutos recolectados 24 h después del tratamiento en campo e incubados en atmósfera de etileno ($2 \mu\text{L} / \text{L}$) durante 3 y 7 días.

2.2.1. Cambios en el color externo y en el contenido de clorofilas y carotenoides totales

La velocidad de desverdización/coloración de los frutos de mandarinas 'Clemenules' en el campo fue mucho más rápida que la de los frutos de 'Fortune'. Sin embargo, la evolución del proceso en el árbol no mostró diferencias entre los frutos control y los tratados con 1-MCP, siguiendo tendencias prácticamente idénticas a lo largo de dos semanas (**Figura 83**).

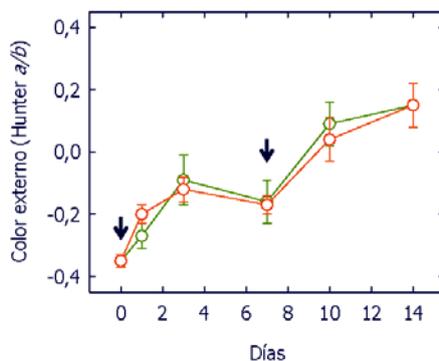


Figura 83. Evolución del color del flavedo de frutos de mandarina 'Clemenules' en el campo, con una coloración inicial a/b de $-0,35 \pm 0,02$, tratados (○) y no tratados (○) con 1-MCP en el árbol. Las flechas indican el momento del tratamiento con 1-MCP ($8 \mu\text{L} / \text{L}$). Los valores son la media \pm DE de al menos 10 frutos.

La aplicación de etileno a los frutos tratados y no tratados permitió confirmar que la aplicación de 1-MCP en campo fue efectiva inhibiendo la acción de la hormona, al menos durante los 7 días posteriores al tratamiento y, especialmente, tras el primero de ellos (**Figura 84**). A los 5 días en atmósfera de etileno, la relación a/b en los frutos control cambió desde $-0,35 \pm 0,02$ hasta $0,55 \pm 0,02$ en los frutos control, mientras que en los tratados con 1-MCP aumentó sólo hasta $-0,17 \pm 0,02$ (**Figura 84 A**). Tras la segunda aplicación de 1-MCP, las diferencias entre ambos frutos se redujeron, observándose un menor efecto del inhibidor contrarrestando la acción del etileno (**Figura 84 B**). Estos resultados indican que el tratamiento con 1-MCP en los frutos en el campo produjo una eficiente inhibición de la acción del etileno (**Figura 84**), que no se tradujo en cambios aparentes en la coloración de los frutos (**Figura 83**).

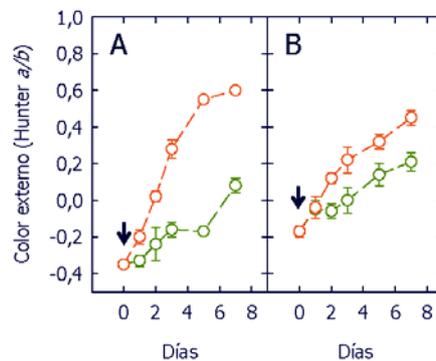


Figura 84. Evolución del color del flavedo de frutos de mandarina 'Clemenules', con un índice de coloración inicial a/b de $-0,35 \pm 0,02$, tratados (○) y no tratados (○) con 1-MCP en el árbol y en atmósfera de etileno ($2 \mu\text{L} / \text{L}$), tras la primera aplicación del inhibidor (**A**) y tras la segunda (**B**). Las flechas indican el momento en el que fue aplicado el tratamiento con 1-MCP ($8 \mu\text{L} / \text{L}$). Los valores son la media \pm DE de al menos 10 frutos.

La evolución del contenido de clorofilas disminuyó durante el periodo de experimentación, tanto en los control como en los tratados con 1-MCP, siendo ligeramente mayor el descenso en los frutos tratados (**Figura 85 A**). A diferencia de las clorofilas, el contenido de carotenoides aumentó durante las dos semanas de seguimiento de la maduración en el árbol. Este aumento fue ligeramente menor en los frutos control que en los tratados con 1-MCP (**Figura 85 B**).

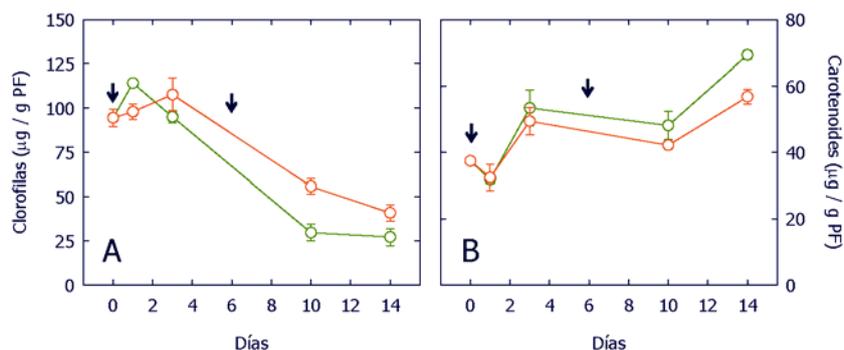


Figura 85. Evolución del contenido de clorofilas (A) y de carotenoides totales (B) del flavedo de frutos de mandarina 'Clemenules', con un índice a/b inicial de $-0,35 \pm 0,02$, tratados (○) y no tratados (●) con 1-MCP en el árbol. Las flechas indican el momento en el que fue aplicado el tratamiento con 1-MCP ($8 \mu\text{L} / \text{L}$). Los valores son la media \pm DE de al menos 3 análisis independientes.

2.2.2. Evolución de la composición de carotenoides en el flavedo

El contenido y composición en carotenoides en el flavedo de los frutos control y tratados con 1-MCP fue muy similar a lo largo del periodo estudiado. Los carotenoides incoloros se mantuvieron relativamente constantes, excepto en los frutos tratados en los que el contenido en fitoeno se duplicó (Figura 86). Los carotenoides de la rama ϵ, β presentaron una baja concentración y, a excepción de α -criptoxantina, no mostraron diferencias entre los tratamientos. Los niveles de β , β -xantofilas aumentaron o se mantuvieron durante el periodo de la maduración estudiado (por ejemplo, la β -criptoxantina y la *cis*-violaxantina duplicaron su contenido), a excepción de la neoxantina y del derivado apocarotenoide β -citraurina. Sin embargo, en todos los casos, excepto la zeaxantina, no se detectaron diferencias entre los frutos control y los tratados con el inhibidor de la acción del etileno (Figura 86).

El efecto del tratamiento postcosecha con etileno en la concentración de carotenoides también se analizó en los frutos tratados y en los no tratados con 1-MCP en el campo. En la Tabla 12 se muestran los resultados para algunos de los carotenoides más representativos a los 3 y 7 días después del primer tratamiento con 1-MCP. La aplicación de la hormona indujo un aumento de la concentración de fitoeno, luteína, β -criptoxantina y β -citraurina, y redujo el contenido de β -caroteno. En cambio, todos estos efectos se contrarrestaron eficientemente en los frutos que habían sido pre-tratados en el árbol con 1-MCP. La xantofila mayoritaria en el

flavedo fue la *cis*-violaxantina, cuya concentración no se vio afectada por etileno y, en consecuencia, tampoco por 1-MCP (**Tabla 12**).

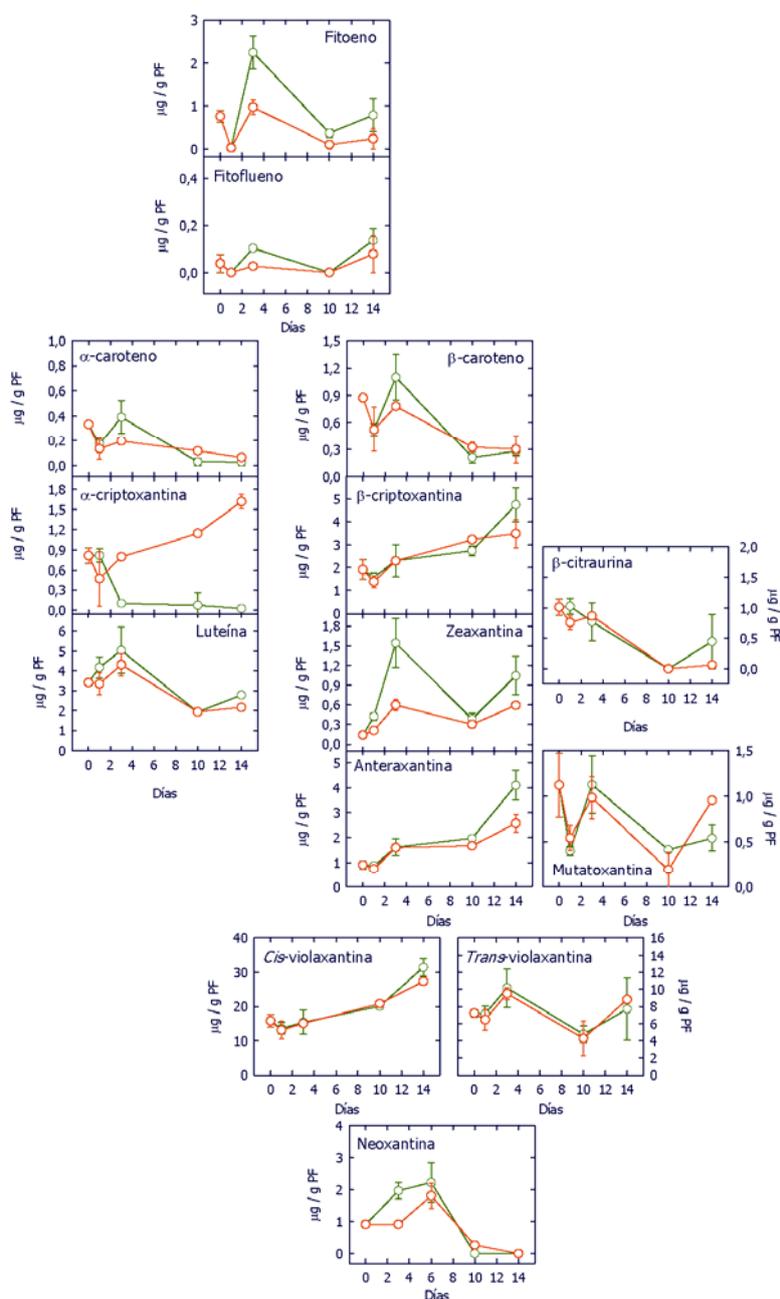


Figura 86. Composición y contenido de carotenoides en el flavedo de frutos de mandarina 'Clemenules', recolectados con un *a/b* inicial de $-0,35 \pm 0,02$, tratados con $8 \mu\text{L} / \text{L}$ de 1-MCP (○) y no tratados (◻) en el árbol. Los valores son la media \pm DE de al menos 3 análisis independientes.

Tabla 12. Contenido de carotenoides en el flavedo de frutos de mandarina 'Clemenules' (*a/b* inicial de $-0,35 \pm 0,02$), tratados en el campo con 1-MCP ($8 \mu\text{L} / \text{L}$) e incubados 24 h en una atmósfera de etileno ($2 \mu\text{L} / \text{L}$).

| Carotenoide | 1-MCP ($8 \mu\text{L} / \text{L}$) | $\mu\text{g} / \text{g PF}$ | | |
|--------------------------|---|--|------------------|------------------|
| | | Días de tratamiento con Etileno ($2 \mu\text{L} / \text{L}$) | | |
| | | 0 | 3 | 7 |
| Fitoeno | + | $1,00 \pm 0,18$ | $0,31 \pm 0,18$ | $1,55 \pm 0,25$ |
| | - | | $1,05 \pm 0,13$ | $3,91 \pm 0,86$ |
| Luteína | + | $3,42 \pm 0,10$ | $2,79 \pm 1,47$ | $1,41 \pm 0,03$ |
| | - | | $2,76 \pm 0,17$ | $5,44 \pm 2,04$ |
| β -caroteno | + | $0,97 \pm 0,02$ | $1,16 \pm 0,04$ | $0,54 \pm 0,16$ |
| | - | | $0,57 \pm 0,17$ | $0,20 \pm 0,02$ |
| β -criptoxantina | + | $3,02 \pm 0,43$ | $3,46 \pm 0,13$ | $2,77 \pm 0,92$ |
| | - | | $3,99 \pm 0,20$ | $4,24 \pm 0,09$ |
| <i>Cis</i> -violaxantina | + | $16,70 \pm 1,84$ | $16,68 \pm 0,48$ | $16,67 \pm 1,63$ |
| | - | | $16,14 \pm 0,98$ | $19,90 \pm 3,59$ |
| β -citraurina | + | $1,00 \pm 0,01$ | $1,32 \pm 0,03$ | $1,31 \pm 0,28$ |
| | - | | $3,09 \pm 0,25$ | $5,91 \pm 0,65$ |

2.2.3. Análisis de la expresión de genes de la biosíntesis de carotenoides en el flavedo

Con el fin de investigar el posible efecto de la inhibición de la acción del etileno en la expresión de 4 genes de la biosíntesis de carotenoides durante la maduración natural de los frutos en árbol, se analizó por RT-qPCR la acumulación de los mRNAs correspondientes a *PSY*, *β LCY1*, *β LCY2* y *β CHX* a los 1, 3, 10 y 14 días después de la primera aplicación de 1-MCP (**Figura 87**).

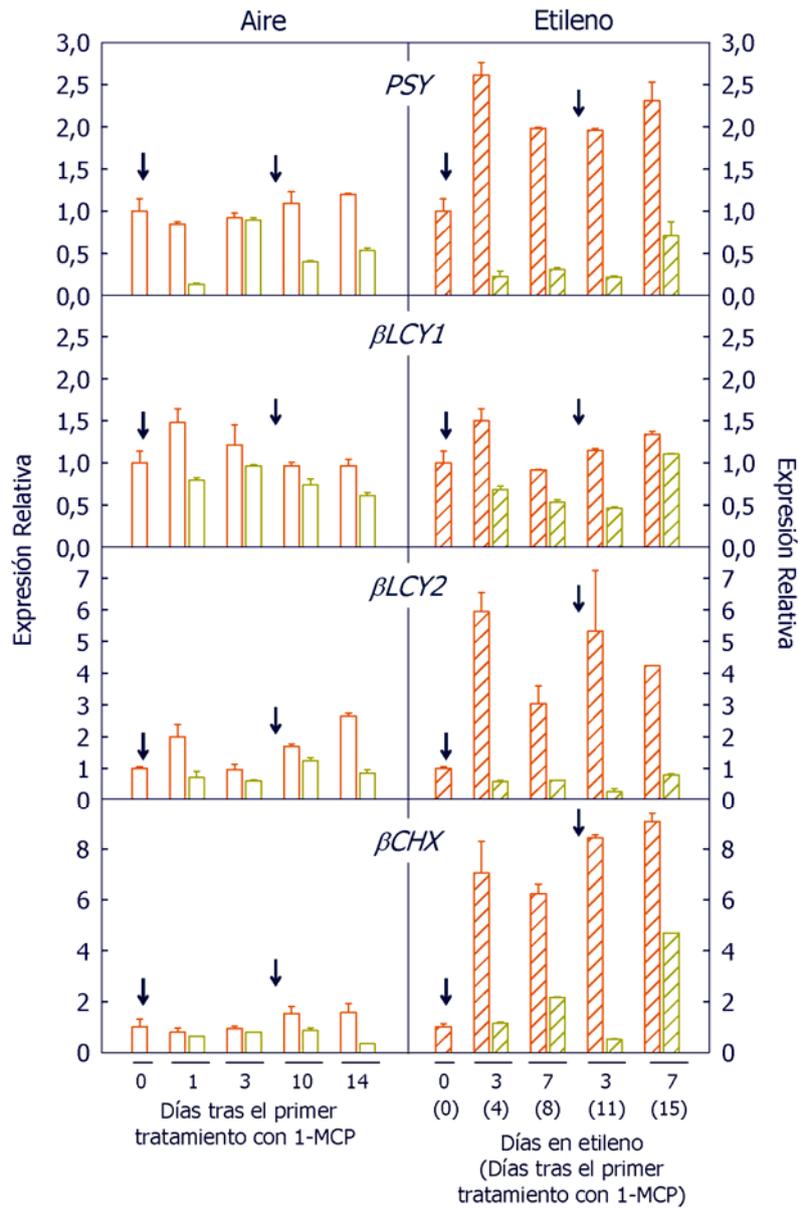


Figura 87. Expresión relativa de cuatro genes implicados en la biosíntesis de carotenoides en el flavedo durante la maduración en campo de frutos de mandarina 'Clemenules' (a/b inicial de $-0,35 \pm 0,02$) tratados (verdes) y no tratados (naranja) con 1-MCP en el árbol. Las flechas indican el momento del tratamiento con 1-MCP ($8 \mu\text{L} / \text{L}$) en el árbol al inicio y a los 7 días del inicio del experimento. Los paneles de la derecha corresponden a los frutos tratados y no tratados con 1-MCP en el árbol que tras 24 h se recolectaron y se trataron con $2 \mu\text{L} / \text{L}$ de etileno (barras a rayas). Los valores obtenidos para cada gen están normalizados frente al nivel de expresión al inicio del tratamiento (día 0), al que se le asigna un valor relativo de 1.

La expresión de los genes *PSY* y *βLCY1* en el flavedo de los frutos en el árbol se mantuvo constante o con ligeros aumentos a lo largo del experimento. La aplicación de 1-MCP redujo la acumulación del mensajero de *PSY*, y el efecto fue patente a las 24 h del tratamiento, tanto después de la primera como de la segunda aplicación de 1-MCP. El tratamiento con el inhibidor también evitó el ligero aumento de *βLCY1* (**Figura 87**). Un patrón distinto de acumulación de mRNA fue el presentado por los genes *βLCY2* y *βCHX*, cuyos niveles se duplicaron, aproximadamente, en los frutos control, mientras que en los tratados con 1-MCP estos incrementos se redujeron ligeramente (**Figura 87**).

En los frutos control (no tratados con 1-MCP) tratados con etileno hubo un importante incremento en la expresión de los genes analizados, *βLCY2* y *βCHX* aumentaron hasta 6-8 veces y el gen *PSY* incrementó su expresión 2,5 veces. Por el contrario, en los frutos tratados con 1-MCP se evitaron en gran medida los incrementos inducidos por el etileno, mostrando unos niveles de transcritos incluso menores que los iniciales (**Figura 87**). En general, a los 7 días de cada aplicación de 1-MCP se recuperaron ligeramente los niveles de expresión, indicando una pérdida de la efectividad del tratamiento con el inhibidor y un restablecimiento parcial de la acción del etileno. En cualquier caso, los mRNAs correspondientes a *PSY*, *βLCY2* y *βCHX* siempre fueron mucho menores en el flavedo de los frutos tratados con 1-MCP que en los controles. El gen *βLCY1* fue el que manifestó menor respuesta al etileno y consecuentemente también al 1-MCP (**Figura 87**).

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

1. Efecto de la conservación a bajas temperaturas en la coloración de distintas variedades de frutos cítricos

1.1. Caracterización bioquímica y molecular de la biosíntesis y acumulación de carotenoides durante la conservación refrigerada de naranjas y mandarinas

La conservación a bajas temperaturas es actualmente la técnica más utilizada para mantener la calidad y prolongar la vida postcosecha de los frutos. Sin embargo, muchos frutos de origen subtropical desarrollan DF por debajo de una temperatura, lo que obliga a que la temperatura de conservación sea un compromiso entre temperaturas suficientemente bajas para inhibir la maduración y evitar los deterioros, y ligeramente superior a la que provoca DF (Lurie y Klein, 1992). El efecto de la temperatura en la coloración de los frutos cítricos durante la maduración natural se ha estudiado extensamente, describiéndose que la rapidez con la que se alcanza la coloración máxima está positivamente influenciada por las bajas temperaturas nocturnas (inferiores a 20 °C) (Sonnen *et al.*, 1979; Casas y Mallent, 1988). Otros estudios en distintas especies de cítricos (como limones, mandarina 'Clemenules' o el híbrido 'Ortanique') también han relacionado las bajas temperaturas de almacenamiento con un incremento del color de los frutos (Cohen y Schiffmann-Nadel, 1978; Cohen *et al.*, 1990; Barry y Van Wyk, 2006; Van Wyk *et al.*, 2009). Estas observaciones junto con las realizadas en el laboratorio donde se ha desarrollado esta Tesis, sugieren que temperaturas ambientales en torno a 10-15 °C estimulan la coloración en frutos cítricos, tanto en campo como durante el almacenamiento postcosecha (Wheaton y Stewart, 1973; Tatsumi, 2000; Van Wyk *et al.*, 2009). A pesar de la importante y posibles repercusiones comerciales del efecto de la temperatura en la inducción de la coloración, son muy escasos los estudios fisiológicos y moleculares que han abordado estos efectos (Matsumoto *et al.*, 2009). Por ello, el objetivo de este trabajo ha sido investigar las bases fisiológicas y moleculares de los cambios de coloración que tienen lugar en diversas variedades de frutos cítricos durante el almacenamiento a bajas temperaturas que no causan DF (12 °C).

Para realizar este estudio se seleccionaron tres variedades de frutos cítricos: naranjas 'Navelina' y 'Navelate', y mandarinas 'Clemenules', en distintos estadios de coloración (Apartado 3.1 de Materiales y Métodos). En general, todas

las variedades experimentaron un marcado incremento en la coloración externa e interna durante el almacenamiento a 12 °C, mientras que los frutos conservados a 2 °C apenas variaron su coloración (**Figura 15, Figura 31 y Figura 35**). Recientemente, en un estudio realizado con naranjas 'Navel Palmer' sometidas a diferentes temperaturas de almacenamiento, se comprobó un importante incremento en el índice de color externo cuando se mantuvieron en un rango de temperaturas entre 11-15 °C, mientras que a temperaturas inferiores (4,5 °C) el color de los frutos no varió de forma importante (Van Wyk *et al.*, 2009).

En todas las variedades utilizadas en este trabajo el efecto de la temperatura de conservación en el color de la piel y de la pulpa de los frutos fue similar, aunque la coloración inicial tuvo una clara influencia en el color final desarrollado, siendo mayor el incremento de color en los frutos que estaban virando en el momento de la recolección (**Figura 15, Figura 31 y Figura 35**). Este efecto se ha descrito previamente en naranjas y mandarinas de otras variedades (Barry y Van Wyk, 2006; Van Wyk *et al.*, 2009).

Durante el periodo de conservación a 2 y 12 °C, los cambios en la coloración de los frutos estuvieron asociados a variaciones en el contenido de clorofilas y carotenoides totales. En general, la concentración de clorofilas disminuyó a lo largo de la conservación refrigerada, mientras que el contenido de carotenoides totales se incrementó tanto en la pulpa como en el flavedo. Estos resultados sugieren que el proceso de carotenogénesis sigue activo en los frutos separados del árbol durante la conservación postcosecha. En general, la degradación de clorofilas se favorece por las altas temperaturas, mientras que en la piel de los cítricos se produce una degradación más rápida a temperaturas inferiores a 30 °C (Porat *et al.*, 2001). Es interesante destacar que a 12 °C el incremento en la coloración de los frutos y en el contenido en carotenoides fue mayor y la degradación de clorofilas más rápida respecto a lo observado a temperaturas más bajas de conservación (2 °C) (**Figura 12, Figura 18, Figura 19, Figura 32 y Figura 33**). Resultados similares se han observado en naranjas 'Navel Palmer' conservadas a 11-15 °C (Van Wyk *et al.*, 2009) y en mandarinas 'Satsuma' almacenadas a 5 y 20 °C (Matsumoto *et al.*, 2009). En otros frutos carotenogénicos, como el tomate, también se ha observado una rápida pérdida de clorofilas durante el almacenamiento a 12 °C y, además, un aumento más rápido en la coloración en frutos sometidos previamente a un choque térmico (Lurie y Klein, 1992).

El incremento en el contenido de carotenoides en el flavedo durante la conservación a 12 °C fue similar en las diferentes variedades estudiadas aumentando entre 3 y 4 veces el contenido (**Figura 18**, **Figura 33** y **Figura 36**). Es interesante destacar que, tanto en frutos de naranja 'Navelina' como en frutos de mandarina 'Clemenules', el mayor aumento del color (**Figura 15**, **Figura 31 A** y **Figura 35**) correspondió con un mayor incremento en determinados carotenoides específicos, como se discute más adelante, y no con un mayor contenido de carotenoides totales (**Figura 18**, **Figura 33 A** y **Figura 36 A**). En diferentes variedades de mandarinas e híbridos se ha estudiado la relación entre la coloración y el contenido total de carotenoides, determinándose que no siempre existe una correlación directa entre ambos parámetros, al igual que se ha observado en este estudio (Farin *et al.*, 1983; Fanciullino *et al.*, 2008; Matsumoto *et al.*, 2009). Un claro ejemplo lo constituyen los frutos virando de la naranja 'Navelina' almacenados a 12 °C que, a pesar de que experimentaron un mayor incremento en la coloración (**Figura 15 A**), mostraron el menor aumento en la concentración de carotenoides totales (**Figura 18 A**), lo que podría explicarse por una rápida pérdida de clorofilas. Esta observación coincide con estudios realizados en naranjas 'Navel', donde la degradación de clorofilas conllevó un aumento en la coloración externa del fruto (Barry y Van Wyk, 2006). De la misma forma, el escaso incremento del color observado en los frutos almacenados a 2 °C podría explicarse por la lenta degradación de clorofilas junto con una menor acumulación de carotenoides.

La relación entre la temperatura óptima de conservación y la acumulación de carotenoides se ha estudiado en diferentes productos vegetales. En tomates se ha comprobado que el incremento de coloración durante la exposición de los frutos a 12 °C estuvo asociado a un aumento del licopeno, principal carotenoide de estos frutos (Lurie y Klein, 1992). Estudios similares se han realizado en otros frutos como nísperos, kakis, guisantes o zanahorias, relacionándose las temperaturas óptimas de conservación de cada especie con la acumulación de sus pigmentos característicos (Lee, 1986; Ding *et al.*, 1998; Monreal *et al.*, 1999; Arnal y Del Río, 2004; Besada *et al.*, 2008).

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la estimulación de la coloración en los frutos cítricos durante la conservación postcosecha a 12 °C se debe principalmente al aumento de la concentración de determinados carotenoides. En concreto, el incremento de la coloración externa parece estar claramente relacionado con el aumento de β -citraurina (**Figura 20**, **Figura 21** y

Figura 37), mientras que en la pulpa lo está con un incremento generalizado de las β,β -xantofilas, principalmente de β -criptoxantina (**Figura 22**, **Figura 23** y **Figura 38**). En general, los cambios en el perfil de carotenoides observados durante el almacenamiento a 12 °C están de acuerdo con los datos previos descritos en la bibliografía, en los que se ha establecido que la temperatura óptima para la síntesis de los carotenoides β -criptoxantina, β -citraurina y violaxantina en el flavedo de los cítricos se sitúa entre 12 y 14 °C (Sonnen *et al.*, 1979; Casas y Mallent, 1988). Además, tanto la β -citraurina como la β -criptoxantina se han descrito como carotenoides de gran repercusión en la coloración final de los frutos (Stewart y Wheaton, 1973a; Farin *et al.*, 1983; Goodner *et al.*, 2001; Alquézar, 2008). Oberholster *et al.* (2001) sugirieron que el contenido total de carotenoides coloreados en el flavedo de los frutos cítricos determina la intensidad de su coloración, mientras que el ratio de 9-*cis*-violaxantina/ β -citraurina (de color amarillo y naranja-rojizo, respectivamente) determina la tonalidad. El incremento en la concentración de β -citraurina en el flavedo de los frutos almacenados a 12 °C conlleva a una importante disminución del ratio 9-*cis*-violaxantina/ β -citraurina respecto a 2 °C, asociándose con un aumento del color externo del fruto (**Tabla 13**).

Tabla 13. Comparación del índice de color (*a/b*) y del balance del contenido de *cis*-violaxantina/ β -citraurina en el flavedo de naranja 'Navelina' y mandarina 'Clemenules' durante la conservación refrigerada.

| Variedad (Color inicial) ^a | T ^a . C. (°C) | 20 días de conservación | |
|--|-----------------------------|-------------------------|--|
| | | Color ^a | <i>Cis</i> -violaxantina/ β -citraurina |
| 'Navelina' (-0,11 ± 0,02) | 2 °C | 0,00 ± 0,05 | 88,44 |
| | 12 °C | 0,67 ± 0,03 | 12,69 |
| 'Navelina' (0,44 ± 0,02) | 2 °C | 0,42 ± 0,02 | 47,55 |
| | 12 °C | 0,79 ± 0,03 | 9,08 |
| 'Clemenules' (0,00 ± 0,02) | 12 °C | 0,74 ± 0,02 | 10,90 |

^a Color externo (Hunter *a/b*)

Como se ha mencionado anteriormente el contenido de β -criptoxantina durante la conservación a 12 °C se incrementó notablemente en la pulpa de frutos

de todas las variedades analizadas. Así, por ejemplo, en los frutos de naranja 'Navelina' virando y coloreados se observó un aumento de la concentración de β -criptoxantina de 7 y 14 veces, respectivamente, respecto al inicio del almacenamiento (**Figura 21** y **Figura 22**), mientras que en mandarina 'Clemenules' se duplicó (**Figura 38**). Este incremento en β -criptoxantina en la pulpa supone una importante mejora del valor nutricional de estos frutos, ya que esta xantofila junto con el β - y α -caroteno son los principales carotenoides con actividad provitamina A (Britton *et al.*, 2009), y en los frutos cítricos esta actividad se debe principalmente a la β -criptoxantina. Adicionalmente, el consumo de β -criptoxantina también podría tener importantes efectos beneficiosos para la salud como actividad antitumoral frente a ciertos tipos de cáncer (Nishino *et al.*, 2009) o un efecto positivo en la formación de masa ósea y en la prevención de la osteoporosis (Yamaguchi y Uchiyama, 2009). En este sentido, el almacenamiento postcosecha a 12 °C podría ser una alternativa tecnológica con importante repercusión en el valor nutricional y funcional de los frutos.

Las bases bioquímicas y moleculares que determinan las diferencias de coloración entre frutos de diferentes variedades de naranjas y mandarinas se han estudiado principalmente a lo largo de la maduración (Stewart, 1977; Gross, 1987; Kato *et al.*, 2004; Fanciullino *et al.*, 2006; Alquézar, 2008), relacionándose la coloración más intensa de las mandarinas con una mayor acumulación de β -criptoxantina y β -citraurina (Stewart y Wheaton, 1973a; Farin *et al.*, 1983; Gross, 1987; Goodner *et al.*, 2001; Dhuique-Mayer *et al.*, 2005; Alquézar, 2008). En este trabajo también se ha comprobado estas diferencias en la coloración y composición de carotenoides entre naranjas y mandarinas, tanto en los frutos recién recolectados como a lo largo del periodo de almacenamiento a 12 °C. Los frutos de 'Clemenules' presentaron una coloración más intensa durante la conservación a 12 °C y un mayor incremento de la concentración de β, β -xantofilas y, en particular, una mayor concentración de β -criptoxantina (**Figura 37** y **Figura 38**). Se ha propuesto que el balance entre la expresión de los genes de las etapas tempranas de la ruta de biosíntesis de carotenoides (*PSY*, *PDS*, *ZDS*, *β LCY*) respecto a la de los genes implicados en la biosíntesis de β, β -xantofilas (*β CHX* y *ZEP*) puede ser la causa de las diferencias en la acumulación de β -criptoxantina en las diferentes variedades (Kato *et al.*, 2004). Este balance se ha estudiado en frutos de las mandarinas 'Satsuma' y 'Clemenules', y en los híbridos 'Fortune' y 'Nova', comprobándose una mayor expresión relativa de los genes iniciales respecto a la *β CHX* (Kato *et al.*, 2004; Alquézar, 2008). Los resultados obtenidos

Tabla 14. Comparación del contenido de β -criptoxantina y el balance de la expresión de *PSY*/ *β CHX* en el flavedo de naranja 'Navelina' y mandarina 'Clemenules' durante la conservación refrigerada.

| Variedad (Color inicial) ^a | T ^a . C. (°C) | 20 días de conservación | |
|--|-----------------------------|---|---|
| | | β -criptoxantina (μ g / g PF) | <i>PSY</i> / <i>βCHX</i> |
| 'Navelina' (-0,11 \pm 0,02) | 2 °C | 0,25 \pm 0,10 | 0,66 |
| | 12 °C | 0,88 \pm 0,08 | 0,87 |
| 'Navelina' (0,44 \pm 0,02) | 2 °C | 0,31 \pm 0,04 | 0,22 |
| | 12 °C | 0,46 \pm 0,04 | 0,28 |
| 'Clemenules' (0,00 \pm 0,02) | 12 °C | 7,13 \pm 0,34 | 5,92 |

^a Color externo (Hunter *a/b*)

en esta Tesis también apoyan esta hipótesis, ya que el balance entre la expresión relativa de *PSY*/ *β CHX* fue mayor en los frutos de mandarina 'Clemenules' que en los de naranja 'Navelina' a lo largo de todo el periodo de conservación, lo que coincide con una mayor acumulación de β -criptoxantina en los tejidos de mandarina (**Tabla 14**).

Recientemente, se ha comprobado en frutos de mandarina 'Satsuma' que la biosíntesis de carotenoides es dependiente de la temperatura de conservación. Los frutos almacenados a 5 °C mostraron una menor expresión de los genes de biosíntesis de carotenoides que los almacenados a 20 °C (Matsumoto *et al.*, 2009). En concordancia con estos resultados, en este trabajo también se ha observado que la expresión de los genes de carotenoides en los frutos almacenados a 2 °C fue menor que a 12 °C (**Figura 24**, **Figura 25** y **Figura 39**). Además, a esta temperatura se estimuló la expresión de todos los genes de biosíntesis de carotenoides estudiados tanto en 'Navelina' (**Figura 24** y **Figura 25**) como en 'Clemenules' (**Figura 39**) y, en particular, la expresión de *PSY* se correlacionó se forma clara con un incremento en la concentración de los carotenoides incoloros fitoeno y fitoflueno. Sin embargo, a pesar de estas diferencias en la expresión de los genes en el flavedo de frutos almacenados a 2 y 12 °C, no se detectaron cambios importantes en la concentración total de β , β -xantofilas (**Figura 20**, **Figura 21** y **Figura 37**). Estos resultados sugieren que la biosíntesis de β -citraurina está claramente influenciada por la temperatura, estimulándose a 12 °C

e inhibiéndose durante la conservación a 2 °C. El origen biosintético de la β -citraurina no ha sido dilucidado, aunque parece provenir de la rotura específica de las β,β -xantofilas zeaxantina y/o β -criptoxantina (Yokoyama y White, 1966; Farin *et al.*, 1983). Se ha sugerido que esta reacción puede estar catalizada por enzimas de la familia de proteínas denominadas genéricamente enzimas de corte de carotenoides o CCDs (del inglés 'Carotenoid Cleavage Dioxygenases') (Giuliano *et al.*, 2003; Camara y Bouvier, 2004; Lewinsohn *et al.*, 2005), y, por tanto, diferencias en la actividad de estas enzimas podrían alterar tanto la concentración de los posibles sustratos (β,β -xantofilas) como de sus productos (β -citraurina). En cítricos se han caracterizado diferentes CCDs (Kato *et al.*, 2006; Agustí *et al.*, 2007) y algunas de ellas aumentan su expresión durante la maduración del frutos, sin embargo, parecen estar implicadas o bien en la biosíntesis de ABA o actuando de forma inespecífica sobre un amplio rango de carotenoides para generar apocarotenoides C_{14} y C_{13} , por lo que parece poco probable que éstas sean las responsables de la biosíntesis de β -citraurina.

En general, en la pulpa de la mayoría de las especies de cítricos el contenido de carotenoides totales es menor que en el flavedo (**Figura 18**, **Figura 19** y **Figura 36**;(Gross, 1987; Xu *et al.*, 2006; Alquézar, 2008), lo que está asociado a una menor expresión de los genes de biosíntesis de carotenoides (Kato *et al.*, 2004; Alquézar, 2008; Matsumoto *et al.*, 2009). En este trabajo se han observado diferencias importantes tanto en el contenido como en la composición de carotenoides entre el flavedo y la pulpa a lo largo de la conservación a 12 °C. Así, por ejemplo, mientras que en el flavedo el cambio más notable es el aumento de β -citraurina (**Figura 20**, **Figura 21** y **Figura 37**), en la pulpa los carotenoides que experimentaron mayores aumentos fueron la β -criptoxantina, anteraxantina y *cis*-violaxantina (**Figura 22**, **Figura 23** y **Figura 38**). No se detectaron β -citraurina ni la xantofila mutatoxantina en la pulpa de los frutos de 'Navelina' o 'Clemenules' durante todo el periodo de conservación (**Figura 22**, **Figura 23** y **Figura 38**). En estudios recientes en frutos maduros de mandarinas 'Satsuma' en los que se ha analizado de forma conjunta las variaciones en el perfil de carotenoides y el patrón de expresión de los genes de biosíntesis durante la conservación a 20 °C y a 5 °C, también se han comprobado diferencias importantes en la evolución de carotenoides entre el flavedo y la pulpa (Matsumoto *et al.*, 2009). Mientras que en el flavedo aumentó a ambas temperaturas el contenido de los dos principales carotenoides, β -criptoxantina y

violaxantina, en la pulpa no se observaron cambios importantes en la composición de carotenoides.

El estadio de maduración del fruto parece ser un factor determinante en los cambios en el perfil de carotenoides y en la expresión de los genes de su biosíntesis en la pulpa de los frutos durante el almacenamiento a 12 °C y, en general, no se observó una relación consistente entre ambos parámetros en los distintos estadios de maduración (**Figura 23** y **Figura 27**). Por otro lado, en la pulpa de los frutos almacenados a 2 °C la concentración de la mayoría de los carotenoides se mantuvo o disminuyó durante el periodo de conservación, en concordancia con la disminución en la expresión de los genes de biosíntesis. En la pulpa de frutos de la mandarina 'Satsuma' también se ha comprobado un descenso de la concentración de carotenoides y en la expresión de los genes de biosíntesis durante el almacenamiento a 5 °C (Matsumoto *et al.*, 2009). En conjunto, estos resultados sugieren que la regulación de la biosíntesis de carotenoides durante la conservación a distintas temperaturas es dependiente del tejido y está claramente influenciada por el estadio de maduración del fruto en el momento de la cosecha.

1.2. Caracterización proteómica de frutos de naranjas 'Navelina' durante la conservación a bajas temperaturas

Los estudios sobre el perfil proteómico en frutos cítricos son escasos, limitándose al análisis del metabolismo general, durante la maduración o a la caracterización del fenotipo de mutantes (Katz *et al.*, 2007; Alós *et al.*, 2008; Muccilli *et al.*, 2009). En lo referente a postcosecha, los trabajos se han centrado en el estudio de los cambios proteómicos producidos en el albedo durante la conservación refrigerada (Lliso *et al.*, 2007). En este trabajo se han analizado los cambios en el perfil proteómico del flavedo de naranjas 'Navelina' sometidas a 21 días de almacenamiento a 2 y 12 °C. Un grupo de proteínas se indujeron principalmente a 2 °C, como dos lectinas, una proteína de unión a GTP y una HSP-70 (**Figura 28**). La acumulación de estas tres proteínas también se ha descrito en el flavedo de pomelos y de mandarinas sometidos a estrés (Shi *et al.*, 2008). Las lectinas pertenecen a una amplia familia de proteínas cuya función en plantas es, principalmente, la de participar en la defensa contra patógenos (De Hoff *et al.*, 2009). Se sabe que están implicadas con la unión de porfirinas a lípidos, proteínas y otros compuestos (Komath *et al.*, 2006). Aunque la relación entre estas proteínas y los carotenoides no está clara, se ha observado una importante represión de estas lectinas en el mutante espontáneo *Navel negra* de *C. sinensis* característico por su coloración marrón debido a un defecto en la degradación de clorofilas (Alós

et al., 2008). En este trabajo la acumulación de lectinas en el flavedo de la naranja 'Navelina' parece que estuvo más relacionada con la adaptación al frío durante la conservación a 2 °C, dado que incrementó su acumulación a lo largo del periodo de almacenamiento, al igual que se ha descrito en otros vegetales como en el trigo (Timofeeva *et al.*, 2000; Timofeeva *et al.*, 2008) o en el arroz (Komatsu *et al.*, 2009), donde la adaptación al frío estuvo acompañada de un aumento de lectinas (Garaeva *et al.*, 2006). Por otro lado, la HSP 70 pertenece a una familia de proteínas relacionadas con el estrés (Fietto *et al.*, 2007), que presentan actividad chaperona y confieren termotolerancia (Iba, 2002; Kotak *et al.*, 2007). También se indujeron a bajas temperaturas dos HSP de bajo peso molecular (sHSP) (**Tabla 9**), aunque en menor medida que las HSP 70. Parece ser que ambos tipos de HSP cooperan para evitar la desnaturalización de las proteínas en condiciones de estrés (Lee y Vierling, 2000). La acumulación de estas sHSP se ha relacionado con la tolerancia a bajas temperaturas (Sabehat *et al.*, 1998), estabilizando las membranas tilacoidales frente al estrés oxidativo (Sun *et al.*, 2002; Sakthivel *et al.*, 2009). En frutos cítricos, la inducción de resistencia a los DF por el acondicionamiento térmico se ha relacionado con una importante acumulación de sHSP que portegen frente al estrés oxidativo (Rozenzvieg *et al.*, 2004). Además, en los últimos años, se ha determinado su implicación en la diferenciación de los cromoplastos, evitando los daños por el estrés oxidativo que se desencadenan en este proceso (Neta-Sharir *et al.*, 2005; Giuliano y Diretto, 2007). De hecho, frutos transgénicos de tomate que expresan constitutivamente una sHSP no requieren del acondicionamiento térmico para una correcta acumulación de carotenoides durante el periodo de conservación a bajas temperaturas (Neta-Sharir *et al.*, 2005).

Otras proteínas relacionadas con el estrés oxidativo que se acumularon de forma diferencial en el flavedo de naranjas 'Navelina' durante la conservación a 2 y 12 °C fueron una fosfolípido hidroperóxido glutatión peroxidasa (PHGPX) y una glutatión S-transferasa (GST). En naranjas 'Shamouti' se ha caracterizado una PHGPX (Beor-Tzahar *et al.*, 1995) cuya inducción se asoció a un incremento de las especies ROS generadas por diferentes estreses, como el frío (Avsian-Kretchmer *et al.*, 1999). Sin embargo, en este trabajo se observó una disminución de los niveles de esta proteína durante la conservación a ambas temperaturas, principalmente a 12 °C (**Tabla 9**). Por el contrario, GST, cuya inducción por estrés oxidativo ha sido descrita previamente (Chen *et al.*, 1996), se indujo durante el almacenamiento a 12 °C. En *A. thaliana* la acumulación de GST en los cloroplastos de plantas sometidas durante 7 semanas a 5 °C se ha relacionado con el

catabolismo de metabolitos tóxicos producidos a bajas temperaturas, dada la capacidad detoxificadora de la enzima (Lu *et al.*, 1998; Goulas *et al.*, 2006). En frutos de mandarina 'Fortune' almacenados a 2 °C se ha observado un incremento en la expresión de esta enzima que se relacionó con el estrés oxidativo provocado por las bajas temperaturas (Establés, 2008). Sin embargo, en nuestro estudio, la acumulación de esta proteína se observó en frutos almacenados a 12 °C, mientras que a 2 °C se mantuvieron niveles similares a los iniciales (**Tabla 9**).

Es interesante destacar la importante acumulación de una CXS a lo largo del almacenamiento a 12 °C (**Tabla 9**). Las CXS pertenecen a una amplia familia de hidrolasas de ésteres carboxílicos implicadas en numerosas funciones en plantas, como en la activación de compuestos señalizadores o en respuestas frente a estrés, entre otros (Gershater y Edwards, 2007). Además, se ha demostrado la capacidad de estas enzimas de hidrolizar ésteres de xantofilas (Zorn *et al.*, 2005) y su implicación en el metabolismo de la vitamina A y de carotenoides en humanos (Linke *et al.*, 2005). A lo largo de la maduración de los cítricos, el grado de esterificación de las xantofilas aumenta progresivamente, por lo que, el incremento de esta proteína durante el almacenamiento a 12 °C podría generar una mayor cantidad de xantofilas libres como zeaxantina o β -criptoxantina (Eilati *et al.*, 1972; Gross, 1987). Estas xantofilas libres, como se ha comentado anteriormente, podrían ser posibles sustratos para la formación de β -citraurina (Yokoyama y White, 1966; Farin *et al.*, 1983; Rodrigo *et al.*, 2004; Rodrigo y Zacarías, 2007), explicándose de esta forma el importante incremento del apocarotenoide durante la conservación a temperaturas moderadas (12 °C).

Entre las proteínas que se acumularon de forma diferencial se detectaron algunas que descendieron durante el periodo de conservación a bajas temperaturas, como una cafeoil-CoA O-metiltransferasa (COMT), implicada en la síntesis de fenilpropanoides, cuyo metabolismo está involucrado en la tolerancia al frío (Martínez-Tellez y Lafuente, 1997; Sánchez-Ballesta *et al.*, 2003). Se ha descrito que algunas COMT inducen su expresión cuando se someten a frío, en cambio, otras han sido identificadas y caracterizadas en relación a los tratamientos térmicos, indicando una gran complejidad en la regulación de esta ruta metabólica (Lluch, 2006). Otra proteína que descendió con la conservación a bajas temperaturas fue la subunidad grande de la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (RUBISCO), indicando una disminución del metabolismo basal, lo cual es coherente, dado que los frutos estuvieron en oscuridad durante el periodo de conservación.

En la pulpa se identificaron sólo cuatro proteínas diferenciales tras el almacenamiento durante 7 semanas a 2 y 12 °C. Dos de ellas se indujeron con el periodo de conservación y están relacionadas con el metabolismo de los carbohidratos, una 2,3-bisfosfoglicerato-independiente fosfoglicerato mutasa, implicada en la glicólisis y en la degradación de carbohidratos, y que se indujo durante el almacenamiento a 2 °C, y una transaldolasa, que se indujo tanto a 2 °C como a 12 °C y que forma parte del ciclo de las pentosas fosfatos. Estos datos indican un incremento del metabolismo respiratorio, de la misma forma que se ha descrito en mandarinas 'Fortune' almacenadas a 2 y 12 °C, donde se observó una disminución de los azúcares asociada a una mayor tasa respiratoria (Holland *et al.*, 2002). Por otro lado, durante el periodo de conservación a 12 °C se observó un ligero incremento de una HSP 70 y una proteína con homología a un factor citosólico de trébol, mientras que ambas proteínas estuvieron en menor cantidad en los frutos almacenados a 2 °C. Se ha demostrado que algunas HSP 70 forman complejos con la enzima PDS, actuando como mecanismo regulador post-transcripcional de la biosíntesis de carotenoides y permitiendo el correcto ensamblaje de los complejos enzimáticos (Bonk *et al.*, 1996; Giuliano y Diretto, 2007). En este trabajo, la mayor acumulación de HSP 70 en la pulpa a 12 °C puede estar relacionada con el incremento de determinados carotenoides, mientras que las HSP inducidas en el flavedo de naranja 'Navelina' parecen estar más relacionadas con el estrés originado por las bajas temperaturas.

1.3. Papel del etileno en la carotenogénesis de frutos de mandarinas 'Clemenules' durante la conservación a bajas temperaturas

Se ha propuesto que la desverdización natural de los frutos cítricos puede estar inducida por la producción de etileno en respuesta al estrés provocado por las bajas temperaturas nocturnas (Eaks, 1960; Cooper *et al.*, 1969b), de hecho, en ausencia de noches frías, como ocurre en zonas tropicales, los frutos permanecen verdes (Eaks, 1960; Eilati *et al.*, 1969b). En frutos de naranjas, pomelos y mandarinas recolectados se ha observado un aumento en la producción de etileno y de la coloración cuando éstos se sometieron a bajas temperaturas diurnas (Cooper *et al.*, 1969a; Wong *et al.*, 1999). De este modo, el etileno producido por el estrés por frío podría promover la degradación de clorofilas y la biosíntesis de carotenoides (Stewart y Wheaton, 1972; Goldschmidt *et al.*, 1993; Trebitsh *et al.*, 1993; Shemer *et al.*, 2008) estimulando la expresión de los genes de biosíntesis de carotenoides (Rodrigo y Zacarías, 2007; Matsumoto *et al.*, 2009). En esta Tesis, los frutos de naranja 'Navelina' y 'Navelate', y de mandarina 'Clemenules' conservados

a 12 °C, mostraron un importante incremento de la coloración, que estuvo asociado a una rápida degradación de clorofilas y a un incremento del contenido de determinados carotenoides y a un aumento en la expresión de los genes de su biosíntesis (Apartado 1.1 de esta Discusión). El efecto de la temperatura durante la desverdización con etileno y en la coloración ha sido estudiado previamente (Stewart y Wheaton, 1971; Wheaton y Stewart, 1973) y, más recientemente, se ha demostrado que el efecto del etileno exógeno en la carotenogénesis de frutos de mandarinas 'Satsuma' varió en función de la temperatura de conservación, inhibiéndose a bajas temperaturas (5 °C) (Matsumoto *et al.*, 2009). Por tanto, con el objetivo de elucidar si los mecanismos responsables de la estimulación de la coloración durante la exposición de los frutos a 12 °C pudieran estar mediados por la acción del etileno, se pre-trataron los frutos con 1-MCP, un inhibidor de la acción de la hormona, antes del almacenamiento a 12 °C (Serek *et al.*, 1995; Sisler y Serek, 1997; Watkins, 2008).

Es interesante destacar que los frutos de mandarina 'Clemenules' pretratados con 1-MCP desarrollaron daños en la piel durante el periodo de conservación (**Figura 34 C**). Estudios realizados en distintas variedades de cítricos han demostrado que diferentes daños asociados al frío se potencian por el tratamiento con 1-MCP, dependiendo tanto de la variedad como de la concentración del inhibidor (Dou *et al.*, 2005). De hecho, en diferentes experimentos realizados en esta Tesis, los frutos de mandarina 'Clemenules' tratados con 1-MCP durante la maduración postcosecha desarrollaron daños en la piel (**Figura 34 C** y **Figura 68**). Por tanto, los resultados de este trabajo confirman resultados anteriores en los que se han establecido que el etileno es parte de las respuestas de defensa de los frutos frente a situaciones de estrés y la reducción de su acción desencadena mayores deterioros y manchados en los frutos (Lafuente y Zacarias, 2006; Estables, 2008).

En cuanto a la evolución de la coloración, los frutos de mandarina 'Clemenules' tratados con 1-MCP y almacenados a 12 °C mostraron un índice de color inferior a los frutos control a las 3 semanas de conservación y antes de que los daños en la piel fueran visibles (**Figura 35**). Un efecto similar del inhibidor se ha descrito por otros autores y en este trabajo en frutos de mandarina 'Clemenules' y 'Fortune' a temperatura ambiente (20 °C) (Laamim *et al.*, 2005a; Laamim *et al.*, 2005b), Capítulo III de Resultados). En otras especies, como naranja 'Shamouti' (Porat *et al.*, 1999) o en limas 'Tahiti' (Kluge *et al.*, 2003), la aplicación de 1-MCP inhibió la desverdización de los frutos.

El menor índice de color externo de los frutos de mandarina 'Clemenules' estuvo asociado a una ligera disminución en el contenido de carotenoides totales en el flavedo (**Figura 35** y **Figura 36**). Sin embargo, como se ha comentado anteriormente, no siempre existe una correlación directa entre el contenido total de carotenoides en un tejido y su coloración final (Farin *et al.*, 1983; Fanciullino *et al.*, 2008; Matsumoto *et al.*, 2009). El análisis de los carotenoides individuales reveló, en general, una importante disminución en determinados carotenoides durante la conservación a 12 °C en los frutos pretratados con 1-MCP (**Figura 37** y **Figura 38**). En el flavedo, el 1-MCP evitó el incremento de los carotenoides incoloros fitoeno y fitoflueno, y de la β,β -xantofila *cis*-violaxatina, así como del apocarotenoide β -citraurina, cuyo contenido aumentó a 12 °C (**Figura 37**). En la pulpa sin embargo, el único efecto del 1-MCP se observó en la evolución de las xantofilas β -criptoxantina y anteraxantina, cuyo contenido disminuyó en los frutos tratados previamente con el inhibidor (**Figura 38**). El efecto positivo de las bajas temperaturas y del etileno exógeno en la acumulación de β -citraurina ha sido descrito previamente, así como la implicación del apocarotenoide en la coloración final de los frutos cítricos (Stewart y Wheaton, 1971; Stewart y Wheaton, 1973a; Farin *et al.*, 1983; Gross, 1987; Oberholster *et al.*, 2001; Goodner *et al.*, 2001; Rodrigo y Zacarías, 2007; Alquézar, 2008). En este trabajo, la disminución en la concentración de este apocarotenoide en los frutos pretratados con 1-MCP durante la conservación a 12 °C, sugiere que la acumulación de β -citraurina en estas condiciones parece estar mediada por el etileno.

En el Apartado 1.1 de esta Discusión se ha comentado el efecto de la conservación a 12 °C en la biosíntesis de carotenoides. En general, los genes analizados incrementaron su expresión en las variedades estudiadas a lo largo del periodo de conservación a 12 °C. El tratamiento con 1-MCP disminuyó la inducción de la expresión de los genes *PSY* y *βLCY2* en el flavedo (**Figura 39**) y en la pulpa donde, además, se observó el mismo efecto en la expresión de *βLCY1* (**Figura 40**). A pesar de las diferencias entre flavedo y pulpa, estos resultados indicarían la posible implicación de la hormona en la expresión de los genes de biosíntesis de carotenoides durante la conservación a 12 °C en ambos tejidos.

Aunque el papel del etileno endógeno en la carotenogénesis de los frutos cítricos aún no ha sido totalmente establecido, los primeros estudios realizados sugerían que el etileno endógeno producido por los tejidos no tenía capacidad *per se* para iniciar el cambio de color de los frutos (Apelbaum *et al.*, 1976). No obstante, distintos estudios posteriores sugieren que el etileno endógeno parece

tener un papel importante en diferentes procesos implicados en la maduración de frutos cítricos (Goldschmidt *et al.*, 1993). Dada la naturaleza no climatérica de los frutos cítricos, se han sugerido distintas hipótesis para explicar la acción del etileno endógeno en la coloración. Una de ellas sería que la presencia de pequeñas cantidades de la hormona en el interior de los tejidos, donde es fisiológicamente activa, es suficiente para activar diversos procesos relacionados con la maduración (Purvis, 1980). Por otro lado, en relación con los resultados obtenidos en este trabajo, Rasmussen (1975) propuso que, a pesar de que el nivel de etileno permanece bajo durante la maduración, la activación de genes que se produce puede estar mediada por un incremento en la sensibilidad a los niveles basales de etileno. Cada vez son más las evidencias que muestran la tasa de recambio de los receptores como un mecanismo de regulación, tanto de la biosíntesis de etileno como de su respuesta (McClellan y Chang, 2007; Kendrick y Chang, 2008). En manzanas, se ha propuesto que la unión de etileno a sus receptores está regulando la tasa de recambio de los mismos (Tatsuki *et al.*, 2007b) y que las bajas temperaturas (1 °C) inhiben la tasa de recambio de los receptores (Tatsuki *et al.*, 2009). Los resultados obtenidos sugieren que es necesaria la presencia de receptores funcionales de etileno para que se produzca la estimulación de la expresión normal de los genes de biosíntesis de carotenoides durante el periodo de conservación a 12 °C. En uvas se ha descrito un mecanismo similar, demostrándose la implicación del etileno en la regulación de la expresión de genes implicados en la biosíntesis de volátiles (Tesniere *et al.*, 2004) o la acumulación de antocianos (Chervin *et al.*, 2004). En este sentido, el leve incremento observado en la producción del etileno en frutos cítricos durante la conservación a 12 °C, junto con el posible aumento en el número de receptores o la sensibilidad de los mismos, podría activar la carotenogénesis y la degradación de clorofilas, con el consiguiente incremento de la coloración.

2. Efecto del acondicionamiento térmico en frutos de naranjas y mandarinas: Cambios en la biosíntesis y acumulación de carotenoides

2.1. Bases bioquímicas

Los tratamientos postcosecha de choque térmico han demostrado una alta eficacia en la inducción de tolerancia a las bajas temperaturas de conservación y en el control de podredumbres en frutos de diversas especies y variedades de cítricos (Ben-Yehoshua *et al.*, 1995; González-Aguilar *et al.*, 1997; Lurie, 1998; Nafussi *et al.*, 2001; Schirra *et al.*, 2004; Erkan *et al.*, 2005b; Nunes *et al.*, 2007).

Sin embargo, observaciones realizadas anteriormente y los resultados precedentes demuestran que, en determinadas circunstancias, provocan una pérdida de coloración externa del fruto, lo que deprecia la apariencia y calidad de los mismos (Rodov *et al.*, 1995; Ben-Yehoshua *et al.*, 1995; Porat *et al.*, 2000; Martínez-Jávega, 2002; Plaza *et al.*, 2004; Erkan *et al.*, 2005b). Dado que la coloración de los frutos cítricos está determinada por el contenido y la composición de carotenoides (Stewart y Wheaton, 1973a; Stewart y Leuenberger, 1976; Gross, 1987; Rodrigo *et al.*, 2003), la hipótesis plantada en este trabajo fue que el efecto del curado en la pérdida de coloración de los frutos se debe a alteraciones en la biosíntesis, acumulación o composición de carotenoides. Por ello, para caracterizar estos efectos se seleccionaron dos variedades de cítricos, mandarinas 'Fortune' y naranjas 'Navelina', con diferente velocidad de maduración, época de cosecha y características de la piel y, en ambos casos, se utilizaron frutos en tres estadios de maduración para extender y generalizar las conclusiones del trabajo.

Los resultados obtenidos muestran que, en general, tanto en mandarinas 'Fortune' como en naranjas 'Navelina', el tratamiento de curado térmico (3 días a 37 °C) produce la pérdida de coloración en el flavedo de los frutos (**Figura 44** y **Figura 52**). Los efectos más acusados en la pérdida de color se observaron en los frutos más inmaduros de mandarinas 'Fortune' y en los más coloreados de naranjas 'Navelina' (**Figura 44 A** y **Figura 52 C**), lo que sugiere que la intensidad de este tratamiento puede depender de cada variedad y del estadio de maduración. En trabajos realizados en frutos de mandarina 'Clemenules' se observó que un tratamiento térmico de 1 día a 40 °C retrasaba la coloración, tanto en frutos virando como en frutos coloreados, siendo el efecto más acusado en los últimos, que no alcanzaron la misma coloración que los frutos control (Plaza *et al.*, 2004). Estos resultados indican que el estadio de maduración es un factor determinante en el efecto del tratamiento térmico sobre el color externo del fruto y puede estar en relación con el contenido y composición de carotenoides en el flavedo de los frutos de cada variedad.

Las altas temperaturas durante la maduración o la postcosecha tienen efectos negativos sobre la coloración de los frutos cítricos (Stewart y Wheaton, 1972), ya que las temperaturas óptimas para la carotenogénesis son relativamente más bajas (12-20 °C) (Gross, 1987). Este efecto negativo también se manifiesta durante la desverdización natural y se hace especialmente patente en los frutos cultivados en climas tropicales, donde las altas temperaturas nocturnas y las escasas diferencias entre las temperaturas día/noche impiden el cambio de color y

que se consiga la pigmentación característica e intensa de los frutos (Barry y Van Wyk, 2006). Este efecto de las altas temperaturas en el retraso y la pérdida de color también se ha descrito en otros frutos como tomates o nísperos (Lurie *et al.*, 1996; Ding *et al.*, 1998; Yahia *et al.*, 2007).

A pesar de que el curado tuvo efectos evidentes en la pérdida de color en los frutos de 'Fortune' y 'Navelina', no se observó un paralelismo con el contenido y composición de carotenoides totales. Así, en los frutos de mandarina 'Fortune', el contenido de carotenoides totales en el flavedo de los frutos curados fue menor que en los control y en determinados casos inferiores a los iniciales (**Tabla 10**). En los frutos de 'Navelina', sin embargo, la temperatura de curado no provocó efectos diferentes en los niveles de carotenoides respecto a la temperatura control, lo que indica una ausencia de correlación con los efectos en el color del flavedo (índice *a/b*) (**Tabla 11**). Estos resultados apuntan a que los efectos del curado en la pérdida del color de los frutos no se deben mayoritariamente a una reducción del contenido de carotenoides totales, sino también a cambios específicos en carotenoides individuales. En un estudio reciente en frutos coloreados de la mandarina 'Satsuma', se ha comprobado que la conservación durante 3 semanas a 20 y 30 °C incrementó el contenido y composición de carotenoides en la piel y pulpa, pero mayoritariamente a 20 °C (Matsumoto *et al.*, 2009). Estos resultados son concordantes con los obtenidos en nuestro estudio, ya que los frutos coloreados de 'Satsuma' podrían ser fisiológicamente equivalentes a los frutos de 'Fortune' y 'Navelina' en el estadio B, en los que también se ha observado un aumento del contenido de carotenoides tanto a 20 como a 37 °C. Parece, por lo tanto, que en el momento de inducción de la carotenogénesis, cuando se están acumulando carotenoides e intensificando progresivamente el color, los frutos pueden mantener activos estos procesos a ambas temperaturas, aunque no se refleje directamente en el color externo. Sin embargo, en estadios más avanzados de la maduración y con mayor contenido en carotenoides este efecto desaparece y se puede producir el efecto contrario (**Tabla 10** y **Tabla 11**).

Los frutos de mandarina 'Fortune' utilizados en este trabajo mostraron respecto a los de naranja 'Navelina' no sólo una mayor concentración de carotenoides para estadios similares de coloración (**Tabla 10** y **Tabla 11**), sino también mayor contenido de β -criptoxantina y de β -citaurina (**Figura 46**, **Figura 47**, **Figura 48**, **Figura 53**, **Figura 54** y **Figura 55**). Además, la concentración de β -citaurina en el flavedo aumentó de forma progresiva con la maduración, alcanzando los niveles máximos en los frutos totalmente coloreados (**Figura 48** y

Figura 55), y en los frutos de 'Fortune' llegaron incluso a triplicar a los de 'Navelina'. El apocarotenoide β -citraurina es el responsable de la tonalidad naranja-rojiza de los frutos de algunas variedades de cítricos (Gross, 1987). Los resultados de este trabajo muestran una buena correlación entre la concentración de β -citraurina y la coloración externa del fruto, lo que refuerza el papel determinante de dicho apocarotenoide en la coloración final del flavedo de los frutos cítricos.

Uno de los efectos más significativos del tratamiento de curado, tanto en 'Fortune' como en 'Navelina', fue la importante disminución del contenido de β -citraurina, el cual se mantuvo o aumentó a 20 °C. Estos resultados están de acuerdo con los descritos anteriormente por Stewart y Wheaton (Stewart y Wheaton, 1971) en diversas variedades de cítricos en los que se han observado una reducción en la concentración de β -citraurina con el incremento de la temperatura. Es interesante destacar que esta reducción de β -citraurina fue mayor en los frutos más inmaduros, con menor concentración en este apocarotenoide y el efecto descendió progresivamente con la maduración del fruto. De hecho, en los frutos más coloreados de 'Fortune', en los que el curado térmico no produjo un descenso en el contenido de β -citraurina fueron los únicos en los que no se produjo una pérdida de coloración externa (**Figura 44** y **Figura 48**). Este patrón de cambios puede sugerir que el acondicionamiento a 37 °C afecta negativamente a la acumulación de β -citraurina en los estadios en los que existe una síntesis activa de la misma y, por lo tanto, el curado afectaría directamente a su biosíntesis. Esta serie de cambios en la concentración de β -citraurina en los frutos de la mandarina 'Fortune' y la naranja 'Navelina' en los tres estadios de maduración muestran una buena correlación con la coloración final de los frutos, por lo que se podría concluir que el efecto del curado en la pérdida de color del flavedo puede atribuirse principalmente al efecto sobre el contenido de β -citraurina.

El origen biosintético de la β -citraurina aún no ha sido dilucidado, aunque existen evidencias que indican que es un producto de la rotura de las β , β -xantofilas, β -criptoxantina y/o zeaxantina (Yokoyama y White, 1966; Stewart y Wheaton, 1972; Farin *et al.*, 1983; Rodrigo *et al.*, 2004; Rodrigo y Zacarías, 2007). Como se ha comentado anteriormente, la biosíntesis de apocarotenoides está catalizada por una amplia familia de enzimas denominadas genéricamente CCDs (Kato *et al.*, 2006; Rodrigo y Zacarías, 2007; Agustí *et al.*, 2007). Una subfamilia de las CCDs son las enzimas de la biosíntesis de ABA, denominadas NCEDs (Kato *et al.*, 2006; Rodrigo y Zacarías, 2007; Agustí *et al.*, 2007). Es interesante

mencionar que en frutos de mandarinas 'Fortune' se ha demostrado que el tratamiento de acondicionamiento térmico también disminuyen drásticamente los niveles de ABA, al igual que el contenido de β -citraurina (Lafuente *et al.*, 1997). En frutos de 'Satsuma' conservados a 30 °C se ha comprobado igualmente un descenso en los niveles de ABA y en la expresión de los genes NCEDs (Matsumoto *et al.*, 2009). Por tanto, es lógico asumir que la expresión de las CCDs implicadas en la síntesis de β -citraurina podrían ser también sensibles a las temperaturas relativamente elevadas (superiores a 30 °C), de forma similar a lo que ocurre con las NCEDs, y explicaría el efecto negativo sobre el contenido de β -citraurina.

En cuanto a la evolución de otros carotenoides durante el tratamiento de curado, no se identificaron correlaciones claras con la coloración del fruto, aunque es de destacar que los carotenoides incoloros presentaron una evolución similar en ambas variedades. En diversas situaciones, tanto el fitoeno como el fitoflueno, mostraron un incremento durante los 3 días de almacenamiento, independientemente de la temperatura y del estadio de maduración (**Figura 46**, **Figura 47**, **Figura 48**, **Figura 53**, **Figura 54** y **Figura 55**), lo que sugiere el mantenimiento del flujo de entrada en la ruta de carotenoides. El patrón de evolución del resto de carotenoides cambió en función del estadio de maduración y de la variedad, y fue en general mucho más variable y sin aparente relación con la coloración del fruto. Las xantofilas β -criptoxantina y *cis*-violaxantina, de mayor concentración en el flavedo, no experimentaron tampoco cambios consistentes con la coloración, por lo que no se puede concluir que los efectos del curado estén relacionados con la concentración de las mismas.

A diferencia de lo observado en el flavedo, el análisis del contenido de carotenoides totales en la pulpa de mandarina 'Fortune' no reveló diferencias importantes entre los frutos curados y no curados a los 3 días del tratamiento, ya que se incrementó en ambos casos. Sin embargo, tras 7 días de almacenamiento el contenido de carotenoides en los frutos curados fue menor que en los frutos control (**Figura 45**). Estas diferencias no conllevaron cambios importantes en el contenido de carotenoides individuales en la pulpa, ya que, mientras aumentó el contenido β -criptoxantina, descendió ligeramente el de violaxantina (**Figura 49**). En la pulpa de frutos de 'Satsuma' tampoco se identificaron diferencias importantes durante la conservación a 20 o 30 °C (Matsumoto *et al.*, 2009). En conjunto, estos resultados sugieren que, mientras el tratamiento de curado afecta en determinados estadios de maduración a la coloración y al contenido en carotenoides totales del flavedo, no se producen efectos similares en la pulpa de

los frutos. No se puede descartar, sin embargo, que el curado térmico pueda afectar el color o la composición de carotenoides de frutos en otros estadios de maduración, posiblemente más inmaduros.

Para comprobar la reversibilidad del efecto del curado en la pérdida de color se realizaron aplicaciones de etileno durante 4 días, ya que está demostrado el efecto de la hormona en la inducción del color (Stewart y Wheaton, 1971; Grierson *et al.*, 1986) estimulando la biosíntesis de carotenoides (Young y Jahn, 1972; Stewart y Wheaton, 1972; Rodrigo y Zacarías, 2007). El tratamiento con etileno exógeno tuvo un efecto similar en los frutos control y curados, tanto de 'Fortune' como de 'Navelina', estimulando de forma importante la coloración externa del flavedo (**Figura 44** y **Figura 52**). En general, el efecto del etileno fue menor en los frutos en estadios de coloración más avanzados, como cabría esperar por resultados precedentes (Rodrigo y Zacarías, 2007). En frutos de 'Clemenules' sometidos a un tratamiento térmico (1 día a 40 °C) en dos estadios de maduración, también se ha descrito un mayor y más rápido incremento del color por etileno en los frutos más inmaduros (Plaza *et al.*, 2004).

Los efectos del etileno en la concentración de los distintos carotenoides y xantofilas se reprodujeron con consistencia entre frutos curados y no curados de las dos variedades. Así, en general, se produjo un aumento de los carotenos iniciales incoloros, del contenido de β -criptoxantina, pero no se afectó o disminuyó el de la xantofila mayoritaria *cis*-violaxantina (**Figura 46**, **Figura 47**, **Figura 48**, **Figura 53**, **Figura 54** y **Figura 55**). Estos resultados son similares al patrón de cambios descritos en otros frutos cítricos (Stewart y Wheaton, 1971; Rodrigo y Zacarías, 2007; Matsumoto *et al.*, 2009), excepto el de *cis*-violaxantina, que en el caso de las naranjas 'Navelina' se produjo un aumento por etileno. Esta discrepancia podría deberse al estadio de maduración, ya que los frutos de 'Navelina' se encontraban en mucho menos avanzado (verde-maduro o verde-inmaduro) (Rodrigo y Zacarías, 2007) frente a frutos virando o coloreados (**Figura 51** y Matsumoto *et al.* 2009). El conjunto de resultados obtenidos indica que el tratamiento de curado no afectó la respuesta o sensibilidad de los frutos al etileno y que su efecto es reversible, al menos en lo referente a la síntesis y acumulación de carotenoides en el flavedo de los frutos cítricos.

2.2. Bases moleculares

Con el fin de estudiar a nivel molecular el efecto del curado en la biosíntesis de carotenoides, se seleccionaron 4 genes de la ruta que se han descrito previamente como relevantes en el flujo y redireccionamiento hacia la

formación de β,β -xantofilas: *PSY*, *β LCY1*, *β LCY2* y *β CHX* (Rodrigo *et al.*, 2004; Kato *et al.*, 2004; Alquézar, 2008; Alquézar *et al.*, 2008a). En general, el tratamiento de acondicionamiento térmico o curado produjo un importante descenso en la expresión de los genes de biosíntesis de carotenoides *PSY*, *β CHX* y *β LCY2*, tanto en 'Fortune' como en 'Navelina' (**Figura 50** y **Figura 56**). Resultados similares se han obtenido en frutos de mandarinas 'Satsuma' almacenados a 30 °C, donde se observó una disminución en la expresión de la mayoría de los genes (Matsumoto *et al.*, 2009). Por otro lado, análisis transcriptómicos realizados en frutos totalmente coloreados de mandarina 'Fortune' sometidos al mismo tratamiento de curado, mostraron una disminución generalizada en el nivel de los transcritos de la ruta de biosíntesis de carotenoides (Establés, 2008). En frutos verdes de tomate en los que se realizó un tratamiento de choque térmico (3 días a 38 °C) se comprobó un retraso en la inducción de la *PSY* (Lurie *et al.*, 1996). En conjunto, estos resultados muestran el efecto inhibitorio de las altas temperaturas sobre la expresión de los genes de biosíntesis de carotenoides, independientemente de la variedad. Sin embargo, a temperaturas moderadas (20 °C) la respuesta de los genes fue dependiente de la variedad, ya que en mandarinas 'Fortune' los niveles de los transcritos se mantuvieron (**Figura 50**), mientras que en naranjas 'Navelina' disminuyeron (**Figura 56**). En otras especies de mandarina y naranja se han observado efectos similares (Rodrigo y Zacarías, 2007; Matsumoto *et al.*, 2009), lo que sugiere que existe un efecto genético de la especie y del tipo de fruto en la expresión de los genes de biosíntesis de carotenoides frente a la temperatura. Esta diferencia en la respuesta frente a un factor ambiental podría estar relacionada con la diferente velocidad de carotenogénesis de mandarinas y naranjas durante la maduración natural, que en general es más rápida y acelerada en las primeras (Kato *et al.*, 2004; Alquézar, 2008).

La evolución del contenido en carotenoides durante el periodo de acondicionamiento a distintas temperaturas no mostró una clara correlación con la expresión de los genes de biosíntesis analizados. De hecho, la disminución generalizada en la expresión de los genes de carotenoides durante el curado no fue paralela con una disminución en el contenido de ninguno de los carotenoides, a excepción del apocarotenoide β -citraurina. En particular, la disminución en la expresión relativa de *β LCY2* durante el curado de los frutos de 'Fortune' (**Figura 50**) y 'Navelina' (**Figura 56**) no conllevó un descenso en el contenido de β,β -xantofilas. Esta falta de correlación entre la expresión de genes de biosíntesis de carotenoides y la acumulación de carotenos y xantofilas se ha descrito en

diferentes variedades (Fanciullino *et al.*, 2008; Machado *et al.*, 2008; Alquézar *et al.*, 2008a; Matsumoto *et al.*, 2009) y, más recientemente, durante el almacenamiento de frutos de 'Satsuma' a 30 °C (Matsumoto *et al.*, 2009). Estos resultados, sugieren la implicación de otros mecanismos en la regulación de la biosíntesis de carotenoides, tanto post-transcripcionales, traduccionales como a nivel de actividad catalítica (Cunningham, 2002; Bramley, 2002; Fanciullino *et al.*, 2008; Matsumoto *et al.*, 2009), junto a otros procesos como la estabilidad de los carotenoides y su degradación. De esta forma el descenso en la expresión de un gen o de un determinado transcrito no conllevaría necesariamente una reducción en la concentración del producto de esa reacción en el mismo período de tiempo. Sería lógico asumir que, aunque el tratamiento térmico puede inhibir la expresión de un determinado gen, la concentración del carotenoide correspondiente puede mantenerse prácticamente inalterada si no hay un efecto específico del curado sobre el mismo.

La reversibilidad de los procesos afectados por los tratamientos térmicos se ha comprobado en frutos de diferentes especies (Lurie y Klein, 1990; Lurie *et al.*, 1996; Plaza *et al.*, 2004). Así, por ejemplo, los niveles del mRNA de la ACC oxidasa, enzima implicada en la síntesis de etileno, disminuyeron en frutos de tomates curados (3 días a 38 °C), recuperándose tras el periodo de acondicionamiento (Lurie *et al.*, 1996). En nuestro estudio y, específicamente, en la carotenogénesis, se ha comprobado que el efecto del curado es reversible, no sólo el contenido de carotenoides, sino también la expresión de los genes de biosíntesis. Los resultados muestran una importante inducción en la expresión del gen *PSY* (**Figura 50** y **Figura 56**) en los frutos curados tratados con etileno, la cual estuvo asociada a una mayor acumulación de fitoeno y fitoflueno (**Figura 47** y **Figura 54**). Entre los otros genes de la biosíntesis de carotenoides analizados, *βCHX* y *βLCY2* también mostraron una clara estimulación de su expresión por el tratamiento con etileno en los frutos curados. El gen *βLCY1*, sin embargo, no presentó una respuesta al etileno, tal como se ha comprobado anteriormente (Rodrigo y Zacarías, 2007; Alquézar *et al.*, 2009). Los aumentos relativos en los transcritos de *βCHX* y *βLCY2* fueron diferentes en los frutos de 'Fortune' y 'Navelina', y la mayor inducción de *βLCY2* se produjo en los frutos de naranja, que llegó a incrementarse casi 10 veces. Este patrón de inducción por etileno es similar al que se produce en otros estadios de maduración, donde la hormona estimula las etapas iniciales de la ruta, aumentando la expresión de *PSY* y la concentración de fitoeno y fitoflueno (Rodrigo y Zacarías, 2007), y la expresión de gen *βLCY2*

(Alquézar *et al.*, 2009). Estos resultados confirman que tras el tratamiento de curado la respuesta de los frutos cítricos a la aplicación de etileno permanece prácticamente inalterada.

Esta estimulación de la expresión génica por el etileno en los frutos curados no conllevó un aumento paralelo de las β,β -xantofilas (**Figura 47** y **Figura 54**), que incluso descendieron en los frutos de mandarina 'Fortune' y se mantuvieron en 'Navelina'. A pesar de ello, el etileno incrementó la coloración y el contenido en β -citraurina en los frutos curados. Como se ha descrito anteriormente, en diferentes estudios se ha propuesto que la intensidad de la coloración en diferentes variedades de naranja se debe al ratio *cis*-violaxantina (carotenoide amarillo)/ β -citraurina (carotenoide naranja-rojizo) (Oberholster *et al.*, 2001). Los resultados obtenidos en este trabajo refuerzan esta hipótesis, ya que el etileno no aumentó la concentración de violaxantina, lo que haría descender la relación *cis*-violaxantina/ β -citraurina. Como se ha mencionado anteriormente, la biosíntesis de β -citraurina no se conoce con exactitud, pero su aumento por etileno puede estar relacionado con la estimulación de la expresión tanto de β CHX, implicada en la síntesis del posible precursor β -criptoxantina, como de las CCDs, ya que los miembros de esta familia de genes también se inducen por la hormona (Rodrigo y Zacarías, 2007).

En conclusión, los resultados de este trabajo demuestran que la pérdida de coloración que se produce en los frutos cítricos por la exposición a 37 °C depende de la variedad y el estadio de maduración. Este efecto se debe principalmente a los cambios en β -citraurina, que es el carotenoide que mostró mayor correlación con las alteraciones en el color. El curado inhibe la expresión de los genes de biosíntesis de carotenoides *PSY*, β CHX y β LCY2, y, en general, estos efectos son reversibles por la aplicación de etileno.

3. Papel del etileno en la carotenogénesis de los frutos cítricos

A pesar de que durante años se han acumulado numerosas evidencias del papel del etileno en la maduración, el modo de acción de la hormona y cómo los bajos niveles de etileno, que normalmente producen los frutos cítricos durante su maduración, coordinan los diferentes cambios fisiológicos y bioquímicos asociados a este proceso son todavía desconocidos. Estudios de expresión génica en el flavedo de frutos cítricos indican que el etileno estimula y acelera algunos de los cambios que se producen durante la maduración natural del fruto (Trebitch *et al.*, 1993; Alonso *et al.*, 1995; Zacarías y Alférez, 2007), pero no se puede concluir que el etileno sea el regulador natural de estos cambios. Dado el carácter no

climatérico de los frutos cítricos, se ha sugerido que el papel de la hormona durante la maduración podría ejercerse mediante cambios en la sensibilidad a la misma (Alonso *et al.*, 1995). Sin embargo, no se han obtenido hasta la fecha evidencias claras de cambios en los niveles de los receptores del etileno que puedan justificar dichas alteraciones en la sensibilidad a la hormona (Katz *et al.*, 2007; Rosales *et al.*, 2009).

En este capítulo de Tesis se ha abordado el estudio de la posible implicación del etileno y su modo de acción en la carotenogénesis de frutos de mandarina, tanto los cambios en el color del flavedo como en el contenido de carotenoides y en la expresión de genes clave en la síntesis de estos pigmentos. Para ello, se ha utilizado una estrategia experimental diferente a la que normalmente se ha empleado en este tipo de estudios en cítricos, la aplicación del inhibidor de la acción del etileno, 1-MCP, a frutos en diferentes estadios de maduración, con el fin de comprobar la evolución de la carotenogénesis en ausencia o con muy baja capacidad de percepción del etileno. El 1-MCP es un inhibidor competitivo de la acción del etileno que se une irreversiblemente a los receptores, pero con el paso del tiempo los tejidos tratados sintetizan nuevos receptores y se puede restaurar progresivamente la acción hormonal (Serek *et al.*, 1995; Sisler y Serek, 1997; Watkins, 2008). En este trabajo se han utilizado frutos de dos variedades de mandarina ('Fortune' y 'Clemenules') con diferente velocidad de coloración y en tres estadios de maduración, con el fin de comprobar los posibles efectos del etileno al inicio del cambio de color o cuando ya se ha iniciado, lo que supone uno de los aspectos más novedosos del trabajo, comparando la respuesta de los frutos en el árbol con la de frutos cosechados (postcosecha).

En frutos climatéricos en los que se ha inhibido la síntesis de etileno a nivel molecular o la percepción de la hormona mediante el tratamiento con 1-MCP, se ha llegado a la conclusión de que se necesita la acción permanente del etileno para mantener los procesos de la maduración del fruto (al menos los dependientes de la hormona), con lo que el etileno actuaría como un 'reostato' más que como un 'disparador' del proceso (Trebitch *et al.*, 1993; Hoeberichts *et al.*, 2002; Opiyo y Ying, 2005; Pech *et al.*, 2008). Por otro lado, la aplicación de 1-MCP a frutos no climatéricos, como uvas (El-Kereamy *et al.*, 2003; Tesniere *et al.*, 2004; Chervin *et al.*, 2004) o fresas (Tian *et al.*, 2000; Trainotti *et al.*, 2005) ha permitido comprobar la existencia de procesos de la maduración que parecen ser dependientes del etileno. En los frutos cítricos se han realizado numerosos estudios para analizar el efecto del 1-MCP en la coloración del fruto y en su comportamiento

postcosecha (Porat *et al.*, 1999; Mullins *et al.*, 2000; Porat *et al.*, 2001; Zhong *et al.*, 2001; Kluge *et al.*, 2003; Laamim *et al.*, 2005a; Win *et al.*, 2006). Las conclusiones de estos trabajos indican que, efectivamente, la inhibición de la acción del etileno puede retrasar la coloración de los frutos, pero también se han obtenido resultados contrarios, por lo que parece existir un efecto dependiente de la variedad y del estadio de maduración. En general se puede establecer que los bajos niveles de etileno que normalmente producen los frutos son necesarios para mantener parte de las respuestas fisiológicas y bioquímicas que tienen lugar durante la maduración de los cítricos (Porat *et al.*, 1999).

Los resultados generales de esta Tesis indican que, parece existir una respuesta diferente a la inhibición de la acción del etileno de los frutos en el árbol o una vez cosechados, y que los principales efectos del 1-MCP se observaron en la expresión de los genes de biosíntesis de carotenoides. Las diferencias en la velocidad de desverdización de los frutos de las dos variedades utilizadas se correlacionan con las diferencias tanto en la acumulación de carotenoides y la expresión de genes de biosíntesis, como con una respuesta diferente al 1-MCP.

3.1. 'Fortune' y 'Clemenules': dos variedades de mandarina con distinta velocidad de coloración

Los resultados de este trabajo confirman las diferencias en la velocidad de carotenogénesis entre los frutos de las dos variedades de mandarina consideradas (Alquézar, 2008). Los frutos de la mandarina 'Fortune', especialmente en estadios más iniciales, tuvieron una velocidad de desverdización más lenta que los de 'Clemenules' (**Figura 59** y **Figura 70**). Además, el contenido de carotenoides totales en frutos verdes se mantuvo constante a lo largo del almacenamiento postcosecha, mientras que en 'Clemenules' se produjo un incremento del 61% (**Figura 61** y **Figura 73**). Estas diferencias también se reflejaron en el perfil de carotenoides individuales, donde por ejemplo, tendieron a descender durante la postcosecha de los frutos de 'Fortune', mientras que en los de 'Clemenules' estos descensos no fueron tan abruptos e incluso aumentaron determinados carotenoides, como la β -criptoxantina y violaxantina, y el apocarotenoide β -citraurina.

Estas diferencias en la carotenogénesis entre las dos variedades se reflejaron más claramente en la acumulación de mRNAs de genes clave de la biosíntesis de carotenoides durante la maduración del fruto (**Tabla 15**). Dos de los cuatro genes analizados (*PSY* y *β CHX*) aumentaron su expresión de forma mucho más acusada en el flavedo de los frutos de 'Clemenules' que en los de 'Fortune',

para índices de coloración similares, desde frutos verdes hasta los coloreados. Estas diferencias entre variedades fueron especialmente superiores para el gen βCHX en 'Clemenules', lo que explica la mayor acumulación de β -criptoxantina en los frutos de 'Fortune' y concuerda con los resultados previos obtenidos en distintas variedades (Kato *et al.*, 2004; Alquézar, 2008).

A lo largo de la postcosecha, la expresión de estos genes también reveló diferencias en su patrón de expresión. Así, en frutos de mandarina 'Fortune' sólo se observó un incremento en la expresión de PSY en los frutos verdes y virando (**Figura 65** y **Figura 66**), y de $\beta LCY2$ en los más verdes (**Figura 65**). En los frutos de 'Clemenules' se observó un incremento en la expresión de los genes PSY y $\beta LCY2$ en los tres estadios de coloración (**Figura 77**, **Figura 78** y **Figura 79**), lo que indica de nuevo que la mayor y más rápida inducción de la carotenogénesis en el flavedo de los frutos de 'Clemenules' se manifiesta igualmente durante la conservación postcosecha.

Es interesante destacar que, cuando se compara la desverdización inducida por el etileno entre los frutos de ambas variedades con una relación a/b similar, no se encontraron diferencias importantes (**Figura 59**, **Figura 71** y **Figura 84**), lo que indica que los frutos de ambas variedades parecen tener similar respuesta o sensibilidad al etileno, al menos en la coloración del fruto. Esta similitud en la sensibilidad al etileno sugeriría que las diferencias en la velocidad de coloración entre las dos variedades durante la maduración natural del fruto no se deben a diferencias en la respuesta a la hormona durante el proceso, sino más probablemente a diferencias propias de cada variedad en la velocidad de desarrollo/maduración del fruto.

Tabla 15. Relación de los niveles de expresión de los genes *PSY*, *β LCY1*, *β LCY2* y *β CHX* en el flavedo de frutos de mandarinas 'Fortune' y 'Clemenules' en los estadíos de maduración. Los valores de la expresión relativa de cada gen están referidos al estadío de coloración más verde de cada variedad, al que se le asignó el valor de 1.

| Gen | Estadíos de coloración de mandarinas (<i>a/b</i>) | | | | | |
|-------------------------------|---|-------|-------|--------------|-------|-------|
| | 'Fortune' | | | 'Clemenules' | | |
| | -0.38 | -0.11 | 0.26 | -0.41 | -0.10 | 0.27 |
| <i>PSY</i> | 1 | 4.95 | 10.97 | 1 | 16.5 | 22.47 |
| <i>βLCY1</i> | 1 | 0.34 | 0.20 | 1 | 0.27 | 0.19 |
| <i>βLCY2</i> | 1 | 1.39 | 2.99 | 1 | 1.84 | 1.98 |
| <i>βCHX</i> | 1 | 0.74 | 0.68 | 1 | 3.39 | 3.76 |

3.2. Efecto del 1-MCP en la coloración de frutos de mandarinas

Uno de los resultados más interesantes de este trabajo fue la diferencia en la respuesta (coloración del flavedo) a la aplicación de 1-MCP de los frutos durante la postcosecha o cuando el tratamiento se realizó a los frutos en el árbol. La aplicación de 1-MCP a frutos cosechados, tanto de mandarina 'Fortune' como de 'Clemenules', se realizó en tres momentos de la maduración; en frutos verdes en los primeros momentos de la desverdización, en frutos virando de color, aún con una relación *a/b* negativa, y a frutos coloreados, antes de alcanzar la máxima coloración (**Figura 57**). Es de destacar que en los frutos de ambas variedades en los dos primeros estadíos la inhibición de la acción del etileno por 1-MCP retrasó ligeramente la velocidad de coloración después de varios días de tratamiento (entre 5 y 7 días), que coincidió, aproximadamente, con el momento en el que los frutos control aumentaron la velocidad de coloración (**Figura 59** y **Figura 70**). Sin embargo, en los frutos coloreados el retraso en la coloración se manifestó pocos días después del tratamiento y, prácticamente durante todo el experimento, los valores *a/b* de los frutos tratados con 1-MCP fueron más bajos que los de los frutos no tratados. Estos resultados indicarían que el etileno estimula o promueve el cambio de color en el flavedo y que su acción parece que se ejerce a partir de un momento determinado de la maduración, cuando ya se ha iniciado el proceso, posiblemente controlando la velocidad del mismo. El efecto del 1-MCP reduciendo la velocidad de coloración de los frutos en los tres estadíos de maduración es

similar al observado en frutos de tomate tratados con 1-MCP. En frutos de otras especies vegetales también se ha demostrado que el efecto del 1-MCP puede ser dependiente del momento de la cosecha, como en fresa (Tian *et al.*, 2000), uva (Chervin *et al.*, 2004), tomate (Hoeberichts *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2009) o manzana (Tatsuki *et al.*, 2007a). Guillén *et al.* (2006), comparando cuatro variedades de tomate describen que el efecto del 1-MCP en la coloración de los frutos fue más acusado en los recolectados en un estadio de coloración más avanzado. Un efecto similar del 1-MCP también se ha observado en la coloración postcosecha de distintas variedades de frutos cítricos, como mandarinas 'Clemenules' (Laamim *et al.*, 2005a), naranjas 'Shamouti' (Porat *et al.*, 1999) o diversas variedades de limas (Kluge *et al.*, 2003; Win *et al.*, 2006) y pomelos (Mullins *et al.*, 2000). El hecho de que la inhibición de la acción del etileno retrasando el cambio de color del flavedo sea dependiente del estadio de maduración del fruto puede justificar las diferencias encontradas entre las diferentes especies y variedades, al menos durante la postcosecha de los frutos cítricos.

Las variaciones en la concentración de los diferentes carotenoides individuales durante las dos semanas de conservación de los frutos de mandarina, tanto 'Fortune' como 'Clemenules', no mostraron un comportamiento constante y parece que también fueron dependientes del estadio de maduración del fruto y de la variedad. En general se produjo un descenso de las xantofilas de la rama ϵ,β , típico de tejido cloroplástico, mientras que aumentaron los carotenos lineales iniciales y las xantofilas violaxantina, β -criptoxantina y el apocarotenoide β -citraurina. Aunque en los frutos de ambas variedades se produjeron diferencias según el estadio de maduración del fruto, no se observaron efectos importantes en la concentración de los diferentes carotenoides individuales por el tratamiento con el inhibidor de la acción del etileno. Únicamente se podría destacar que en algunos momentos de la maduración el tratamiento con 1-MCP promueve una mayor concentración de carotenos lineales incoloros (fitoeno) o de xantofilas amarillas como la anteraxantina o la mutatoxantina, que en su conjunto conferirían una menor coloración a los frutos. Sin embargo, en los diferentes tratamientos no se obtuvieron efectos significativos por el tratamiento con 1-MCP sobre las xantofilas mayoritarias que proporcionan tonalidades más brillantes o intensas en la piel de los frutos de mandarina (β -criptoxantina y β -citraurina). En otros frutos, como albaricoques (Kita *et al.*, 2007) o tomates (Opiyo y Ying, 2005) tratados con 1-MCP también se observó una discrepancia entre la coloración y la acumulación de

carotenoides. En conjunto, estos resultados muestran una falta de correlación entre el color de los frutos y la acumulación de carotenoides individuales como se ha descrito previamente en otros casos (Fanciullino *et al.*, 2008; Alquézar *et al.*, 2008a; Matsumoto *et al.*, 2009) y en los capítulos anteriores de esta Tesis. El retraso de la coloración causado por el 1-MCP se ha relacionado con un retraso en la degradación de clorofilas en otras variedades de cítricos (Kluge *et al.*, 2003; Win *et al.*, 2006). Sin embargo, el efecto del 1-MCP en los niveles de clorofilas en los diferentes tratamientos postcosecha realizados en este trabajo, no parecen estar asociados al retraso en la coloración.

En los frutos tratados con 1-MCP en el árbol, tanto en 'Fortune' como en 'Clemenules', no se observaron efectos sobre la velocidad de coloración (**Figura 80** y **Figura 83**). Para comprobar si el tratamiento en campo era efectivo inhibiendo la acción del etileno, inmediatamente después de la exposición de los frutos al 1-MCP, un lote de frutos réplica se trataron en el laboratorio con 2 μL / L de etileno y se comprobó que, efectivamente, los tratados con 1-MCP presentaban una menor respuesta al etileno, tanto en la coloración del fruto como en la acumulación de carotenoides y en la expresión de los genes de su biosíntesis. Estas comprobaciones se realizaron también después de efectuar el segundo tratamiento con 1-MCP en campo, confirmándose una menor sensibilidad al etileno, aunque no tan acusada como tras el primer tratamiento. Esta serie de experimentos permitió corroborar que en los frutos tratados con 1-MCP durante la maduración natural se ha inhibido eficientemente la acción del etileno. A pesar de ello, no se produjeron efectos significativos en la coloración del fruto ni en la acumulación de carotenoides, lo que indicaría que el etileno no parece estar implicado en la regulación natural de estos procesos en los estadios de maduración estudiados.

Existen ligeras diferencias entre los resultados obtenidos de la aplicación de 1-MCP en los frutos en el campo o durante su postcosecha. Una posible explicación sería que en los frutos cosechados y separados de la planta se ha podido inducir procesos de estrés o de aceleración de la senescencia en los que estaría implicado el etileno, lo que aceleraría la maduración del fruto. En esas condiciones en las que el etileno podría estar implicado, su inhibición se manifestaría más claramente en la coloración que en los frutos unidos al árbol. De hecho, la evolución de la coloración del fruto parece ser más lineal y progresiva en los frutos en el árbol que en los cosechados (**Figura 59** y **Figura 81**), lo que justificaría la idea anterior.

3.3. Efecto del etileno en la expresión de los genes de biosíntesis de carotenoides en los frutos de mandarina durante la maduración natural y durante la postcosecha

A pesar de que la inhibición de la acción del etileno no tuvo efectos en la coloración de los frutos en el campo ni en la acumulación de carotenoides, el tratamiento fue efectivo suprimiendo los cambios en la expresión de los genes de biosíntesis de carotenoides (**Figura 87**). Estos resultados confirmarían que durante la maduración (coloración) natural del fruto (en árbol) el etileno parece actuar principalmente sobre la expresión de genes de la biosíntesis de carotenoides, aunque este efecto no se traduce durante el período estudiado en cambios significativos en la coloración del fruto o en la acumulación de carotenoides. Esta conclusión se apoya por el efecto inhibitorio tan importante del 1-MCP sobre la acumulación de los mRNAs de *PSY*, *BLCY2* y *βCHX* tan sólo 1 día después del tratamiento. El hecho de que se produzca un aumento en los niveles de transcritos posteriormente, indica una recuperación parcial de la acción del etileno, no obstante, la nueva exposición a 1-MCP redujo de nuevo los niveles de expresión (**Figura 87**). Aunque se puede especular con que el tratamiento con 1-MCP no ha bloqueado completamente la acción del etileno y puede haber todavía un efecto residual, los resultados de la aplicación de etileno exógeno demuestran que, en esos mismos frutos, se reduce de forma muy importante la respuesta a la hormona. La aplicación de etileno exógeno incrementó de forma acusada la expresión de *PSY*, *BLCY2* y *βCHX*, especialmente los dos últimos, aumento que se suprimió en los tratados previamente con 1-MCP en campo. Este efecto se manifestó de forma similar en la acumulación de carotenoides, ya que el etileno incrementó el contenido de fitoeno, luteína, β-criptoxantina y β-citraurina, mientras que el pretratamiento con 1-MCP contrarrestó eficazmente este efecto (**Tabla 12**). Estos resultados son consistentes con los obtenidos en otros estudios donde se ha comprobado una acción selectiva del etileno en la estimulación de la concentración de determinados carotenoides y genes de la biosíntesis de los mismos (Rodrigo y Zacarías, 2007; Alquézar *et al.*, 2009; Matsumoto *et al.*, 2009).

El efecto del 1-MCP en la reducción de la expresión los genes de la biosíntesis de carotenoides se observó igualmente durante la postcosecha de los frutos, aunque ambas variedades de mandarina mostraron diferencias en cada estadio de maduración. Estos resultados apoyan la observación mencionada anteriormente de que el efecto del 1-MCP puede depender de la variedad, la intensidad de carotenogénesis de la misma y del estadio de maduración de los

frutos. Es interesante destacar que, en este estudio, el 1-MCP fue muy efectivo reduciendo los aumentos en la expresión de los genes de biosíntesis de carotenoides que se indujeron en un determinado estadio de coloración y en una variedad determinada, como ocurrió con la expresión de *PSY* y de *βLCY2* en los frutos verdes de mandarina 'Fortune' y 'Clemenules', o con *βCHX* en los tres estadios de maduración de las mandarinas 'Clemenules'. Sin embargo, en los casos en los que se produjo un descenso en la acumulación de los mRNA, como en determinados estadios para *βLCY1* y *βLCY2* (**Figura 66** y **Figura 67**), el 1-MCP no modificó este comportamiento, lo que sugiere que los descensos en la expresión de estos genes no están controlados por el etileno. El hecho de que la disminución de la expresión génica por 1-MCP se observe en mandarinas 'Fortune' mayoritariamente en los frutos más verdes, que es el estadio donde se producen los cambios más importantes, revela su menor velocidad carotenogénica. Por el contrario, en mandarinas 'Clemenules', el 1-MCP tuvo un marcado efecto en todos los estadios de coloración estudiados, lo que es indicativo de una mayor capacidad carotenogénica. En frutos de tomate y de albaricoque se ha comprobado que el 1-MCP reduce la expresión del gen *PSY*, aunque no totalmente (Hoerberichts *et al.*, 2002; Kita *et al.*, 2007), al igual que ocurre en los frutos verdes de ambas variedades de mandarinas, lo que sugiere que pueden existir otros factores que influyen en el control de la expresión de este gen.

Este conjunto de resultados indica que la acción del etileno en la carotenogénesis se ejerce principalmente (sino únicamente) sobre la expresión de los genes de biosíntesis de carotenoides y que, al menos parcialmente, el incremento en la acumulación de los transcritos de determinados genes que se produce durante la maduración natural o la conservación postcosecha podría estar regulado por esta hormona. Durante la maduración de frutos de otras variedades de cítricos se ha demostrado que el control transcripcional de la biosíntesis de carotenoides constituye un importante mecanismo de regulación, pero no siempre la expresión de los genes de biosíntesis de carotenoides se correlaciona directamente con el contenido y composición de carotenoides (Fujii *et al.*, 2007; Fanciullino *et al.*, 2008; Machado *et al.*, 2008; Alquézar *et al.*, 2008b; Matsumoto *et al.*, 2009). El etileno, sin embargo, no parece que tenga una implicación directa en otros procesos post-transcripcionales o post-traduccionales que acompañan a la carotenogénesis de los frutos y que determinan el contenido y composición de carotenoides. Para explicar esta aparente discrepancia se han propuesto diferentes mecanismos post-transcripcionales de regulación en los que no estaría implicado el

etileno, como son la regulación de la actividad de las enzimas carotenogénicas o asociadas a este proceso (Schledz *et al.*, 1996; al-Babili *et al.*, 1996; Welsch *et al.*, 2000; Fanciullino *et al.*, 2008), la tasa de recambio de las mismas (Hirschberg, 2001; Fanciullino *et al.*, 2008), así como la estabilidad de los carotenoides y su almacenamiento (Fanciullino *et al.*, 2008; Galpaz *et al.*, 2008), lo que podría conducir a que en ausencia o con reducida acción del etileno (por aplicación del 1-MCP), a pesar de la supresión de la expresión de los genes de biosíntesis, pueda proseguir la acumulación de carotenoides.

3.4. La inhibición de la acción del etileno provoca manchados y deterioros en la piel de los frutos de la mandarina Clemenules

Los frutos de las mandarinas estudiadas no sólo presentaron diferente respuesta al 1-MCP en la coloración del fruto y en la expresión de los genes de biosíntesis de carotenoides, sino también en la sensibilidad a desarrollar manchados o desordenes fisiológicos en la piel. Así, los frutos de mandarina 'Clemenules' tratados con 1-MCP presentaron importantes daños a temperatura de no-frío en los tres estadios de maduración. Estos desórdenes se manifestaron como manchas superficiales parduzcas-marrones más o menos intensas y que se extendieron por la superficie del fruto, con una apariencia de tejido necrosado que deteriora completamente la calidad del fruto (**Figura 68**). En otros desordenes fisiológicos se ha demostrado que el 1-MCP potencia los daños, tanto los que se producen a temperaturas de frío como de no-frío (Porat *et al.*, 1999; Zhong *et al.*, 2001; Lafuente *et al.*, 2001a; Lafuente y Sala, 2002; Dou *et al.*, 2005; Guillén *et al.*, 2006). Además, el 1-MCP también aumenta la incidencia de las podredumbres causadas por hongos del género *Penicillium* (Porat *et al.*, 1999; Mullins *et al.*, 2000; Zhong *et al.*, 2001; Marcos *et al.*, 2005). No obstante, el efecto del inhibidor puede variar en función del desorden fisiológico y de la especie (Dou *et al.*, 2005). Así, por ejemplo, en frutos de lima, la aplicación del inhibidor no tuvo ningún efecto en los DF, mientras que incrementó la incidencia de podredumbres (Kluge *et al.*, 2003). En cambio estas alteraciones no aparecieron en el híbrido de mandarina 'Fortune', a pesar de que esta variedad es muy sensible a desarrollar DF y que se ha demostrado que el etileno tiene un efecto beneficioso (Lafuente *et al.*, 1997; Lafuente *et al.*, 2001a). Estos resultados muestran la diferente respuesta de los frutos cítricos a la aplicación de 1-MCP y frente a distintas situaciones de estrés (Salvador *et al.*, 2004; Salvador *et al.*, 2006). A pesar de que los frutos cítricos producen normalmente pequeñas cantidades de etileno, se ha sugerido que el etileno endógeno es necesario para mantener las respuestas naturales de

los frutos frente a diferentes situaciones ambientales adversas, y la inhibición de su acción por 1-MCP acelera las respuestas deteriorantes (Porat *et al.*, 1999). Los frutos de la mandarina 'Clemenules' parecen ser más sensibles a la inhibición de la acción del etileno y, a pesar de que la causa de los daños no se conoce, el hecho de que se provoquen estas lesiones por el tratamiento con 1-MCP corrobora la idea del papel protector del etileno frente a condiciones ambientales adversas.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Del conjunto de resultados de esta Tesis Doctoral se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1.- El almacenamiento a 12 °C estimula la coloración tanto interna como externa de naranjas 'Navelina' y 'Navelate' y de mandarinas 'Clemenules'. Este efecto parece estar relacionado con el estadio de maduración, siendo menor en los estadios más avanzados. Durante la conservación a 2 °C, sin embargo, la coloración de los frutos permanece prácticamente inalterable.

2.- Durante la conservación a 12 °C se incrementan los niveles de carotenoides totales y, más concretamente, los carotenoides iniciales de la ruta, fitoeno y fitoflueno, y las β,β -xantofilas. La estimulación de la coloración que se produce a esta temperatura parece estar asociada a un incremento de la concentración del apocarotenoide β -citraurina, tanto en naranjas como en mandarinas, y de β -criptoxantina en mandarinas 'Clemenules'.

3.- La conservación a 12 °C estimula en el flavedo la expresión de los genes de biosíntesis de carotenoides *PSY*, *β LCY1*, *β LCY2* y *β CHX*, mientras que a 2 °C se mantienen prácticamente inalterables. En la pulpa, en cambio, este efecto es más dependiente del estadio de maduración.

4.- El estudio del proteoma de naranjas 'Navelina' almacenadas a bajas temperaturas ha permitido identificar polipéptidos que se acumulan diferencialmente a 2 y 12 °C en el flavedo y en la pulpa. Es interesante destacar la acumulación de una carboxilesterasa durante la conservación 12 °C y proteínas implicadas en la respuesta frente a estrés oxidativo.

5.- El pretratamiento con 1-MCP, un inhibidor de la acción del etileno, reduce parcialmente la estimulación de la coloración que se produce durante la conservación a 12 °C. El 1-MCP también atenúa el aumento en los carotenoides individuales fitoeno, fitoflueno y β -citraurina, y la acumulación de los transcritos de

los genes *PSY*, *β LCY1*, *β LCY2* y *β CHX*. Por lo tanto, la estimulación de la carotenogénesis a 12 °C parece estar parcialmente mediada por la acción del etileno.

6.- El tratamiento de curado térmico (3 días a 37 °C) provoca una disminución en la coloración y en el contenido de carotenoides totales en el flavedo de los frutos de mandarina 'Fortune' y naranja 'Navelina'. Este efecto del curado térmico parece deberse principalmente al descenso del contenido de β -citraurina, y depende de la variedad y del estadio de maduración.

7.- La expresión de los genes de biosíntesis de carotenoides, *PSY*, *β LCY2* y *β CHX* disminuye de forma importante durante la exposición de los frutos a 37 °C.

8.- Los efectos del curado térmico son reversibles, ya que la aplicación exógena de etileno restaura los niveles de carotenoides y de expresión de los genes de su biosíntesis.

9.- Se ha estudiado el papel endógeno del etileno en la carotenogénesis de frutos de mandarinas en diferentes estadios de maduración mediante la aplicación de 1-MCP a frutos en el árbol o una vez recolectados. La inhibición de la acción del etileno retrasa ligeramente el cambio de color durante la postcosecha, aunque no se observan efectos significativos por el tratamiento con el inhibidor en los frutos en el árbol.

10.- La acción del etileno en la biosíntesis de carotenoides parece ejercerse principalmente sobre la expresión de los genes carotenogénicos, tanto en la maduración natural de los frutos, como durante su postcosecha. Estos resultados sugieren que se requiere la percepción continua de la hormona para mantener la expresión de los genes de biosíntesis de carotenoides. Sin embargo, estos efectos no se reflejan en cambios en el perfil de carotenoides del flavedo de los frutos durante el periodo estudiado.

11.- En general, en los distintos tratamientos postcosecha estudiados en esta Tesis, el contenido de carotenoides totales o de determinados carotenoides individuales no siempre muestra una clara correlación con la expresión de los genes de su biosíntesis. Por tanto, además de la regulación a nivel transcripcional, existen otros mecanismos que pueden ser determinantes en la acumulación de carotenoides en frutos cítricos.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Abeles, F. B., Morgan, P. W. y Salveit, M. E. J.** (1992). Ethylene in Plant Biology. En: London. Academic Press.
- Adams-Phillips, L., Barry, C. S. y Giovannoni, J. J.** (2004). Signal transduction systems regulating fruit ripening. *Trends in Plant Science*, **9** (7): 331-338.
- Agustí, J., Merelo, P., Cercós, M., Tadeo, F. R. y Talón, M.** (2008). Ethylene-induced differential gene expression during abscission of citrus leaves. *Journal of Experimental Botany*, **59** (10): 2717-2733.
- 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.** (1999). Preharvest factors affecting postharvest quality of citrus fruit. En: M. Schirra (Ed.), *Advances in postharvest diseases and disorders control of citrus fruit*. 1-34. India.
- Agustí, M.** (2000). Citricultura. En: Barcelona. Mundi-prensa.
- Agustí, M., Martínez-Fuentes, A., Mesejo, C., Juan, M. y Almela, V.** (2003). Cuajado y desarrollo de los frutos cítricos. En: Generalitat Valenciana, Consejería de Agricultura y Pesca (Ed.).Valencia.
- al-Babili, S., von Lintig, J., Haubruck, H. y Beyer, P.** (1996). A novel, soluble form of phytoene desaturase from *Narcissus pseudonarcissus* chromoplasts is Hsp70-complexed and competent for flavinylation, membrane association and enzymatic activation. *The Plant Journal*, **9** (5): 601-612.
- Alfárez, F., Agustí, M. y Zacarías, 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.
- Alonso, J. M., Chamarro, J. y Granell, A.** (1995). Evidence for the involvement of ethylene in the expression of specific RNAs during maturation of the orange, a non-climacteric fruit. *Plant Molecular Biology*, **29** (2): 385-390.
- 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** (2): 541-547.
- Alós, E., Roca, M., Iglesias, D. J., Mínguez Mosquera, M. I., Damasceno, C. M. B., Thannhauser, T. W., Rose, J. K. C., Talón, M. y Cercós, M.**

- (2008). An evaluation of the basis and consequences of a stay-green mutation in the 'Navel negra' citrus mutant using transcriptomic and proteomic profiling and metabolite analysis. *Plant Physiology*, **147** (3): 1300-1315.
- Alquézar, B.** (2008). *Caracterización bioquímica y molecular de la carotenogénesis en frutos cítricos*. Tesis. Universidad de Valencia.
- Alquézar, B., Rodrigo, M. J. y Zacarías, L.** (2008a). Carotenoid biosynthesis and their regulation in citrus fruits. *Tree and Forestry Science and Biotechnology*, **2** (1): 23-35.
- Alquézar, B., Rodrigo, M. J. y Zacarías, L.** (2008b). Regulation of carotenoid biosynthesis during fruit maturation in the red-fleshed orange mutant 'Cara Cara'. *Phytochemistry*, **69** (10): 1997-2007.
- Alquézar, B., Zacarías, L. y Rodrigo, M. J.** (2009). Molecular and functional characterization of a novel chromoplast-specific lycopene β -cyclase from citrus and its relation to lycopene accumulation. *Journal of Experimental Botany*, **60** (6): 1783-1719.
- Apelbaum, A., Goldschmidt, E. E. y Ben-Yehoshua, S.** (1976). Involvement of endogenous ethylene in the induction of color change in 'Shamouti' oranges. *Plant Physiology*, **57** (5): 836-838.
- Arnal, L. y Del Río, M. A.** (2004). Quality of persimmon fruit cv. 'Rojo brillante' during storage at different temperatures. *Spanish Journal of Agricultural Research*, **2** (2): 243-248.
- Auldrige, M. E., Block, A., Vogel, J. T., Dabney-Smith, C., Mila, I., Bouzayen, M., Magallanes-Lundback, M., DellaPenna, D., McCarty, D. R. y Klee, H. J.** (2006a). Characterization of three members of the *Arabidopsis* carotenoid cleavage dioxygenase family demonstrates the divergent roles of this multifunctional enzyme family. *The Plant Journal*, **45** (6): 982-993.
- Auldrige, M. E., McCarty, D. R. y Klee, H. J.** (2006b). Plant carotenoid cleavage oxygenases and their apocarotenoid products. *Current Opinion in Plant Biology*, **9** (3): 315-321.
- Avsian-Kretchmer, O., Eshdat, Y., Gueta-Dahan, Y. y Ben-Hayyim, G.** (1999). Regulation of stress-induced phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase expression in citrus. *Planta*, **209** (4): 469-477.
- Bain, J. M.** (1958). Morphological, anatomical and physiological changes in the developing fruit of the 'Valencia' orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Australian Journal of Botany*, **6**: 1-24.

- 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.
- Baldwin, E. A.** (1993). Citrus. En: J. E. Taylor y A. Tucker (Eds.), *Biochemistry of fruit ripening*: 107-149. London. Chapman and Hall
- Barmore, C. R.** (1975). Effect of ethylene on chlorophyllase activity and chlorophyll content in calamondin rind tissues. *Hortscience*, **10**: 595-596.
- Barr, J., White, W. S., Chen, L., Bae, H. y Rodermeil, S.** (2004). The GHOST terminal oxidase regulates developmental programming in tomato fruit. *Plant, Cell and Environment*, **27** (7): 840-852.
- Barry, C. S., Blume, B., Bouzayen, M., Cooper, W. C., Hamilton, A. J. y Grierson, D.** (1996). Differential expression of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene family of tomato. *The Plant Journal*, **9** (4): 525-535.
- Barry, C. S. y Giovannoni, J. J.** (2007). Ethylene and fruit ripening. *Journal of Plant Growth Regulation*, **26** (2): 143-159.
- Barry, C. S., Llop-Tous, M. I. y Grierson, D.** (2000). The regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene expression during the transition from system-1 to system-2 ethylene synthesis in tomato. *Plant Physiology*, **123** (3): 979-986.
- Barry, G. H. y Van Wyk, A. A.** (2006). Low-temperature cold shock may induce rind colour development of 'Nules Clementine' mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) fruit. *Postharvest Biology and Technology*, **40** (1): 82-88.
- Bartley, G. E. y Ishida, B. K.** (2007). Ethylene-sensitive and insensitive regulation of transcription factor expression during in vitro tomato sepal ripening. *Journal of Experimental Botany*, **58** (8): 2043-2051.
- Beeor-Tzahar, T., Ben-Hayyim, G., Holland, D., Faltin, Z. y Eshdat, Y.** (1995). A stress-associated citrus protein is a distinct plant phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *FEBS Letter*, **366** (2-3): 151-155.
- Ben-Yehoshua, S., Rodov, V., Fang, D. Q. y Kim, J. J.** (1995). Preformed antifungal compounds of citrus fruit: Effect of postharvest treatments with heat and growth regulators. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **43** (4): 1062-1066.
- Besada, C., Arnal, L. y Salvador, A.** (2008). Improving storability of persimmon cv. 'Rojo Brillante' by combined use of preharvest and postharvest treatments. *Postharvest Biology and Technology*, **50** (2-3): 169-175.

- Biale, J. B. y Young, R. E.** (1981). Respiration and ripening in fruits: Retrospect and prospect. *Recent Advances in the Biochemistry of Fruits and Vegetables*, 1-39.
- Bleecker, A. B. y Kende, H.** (2000). Ethylene: A gaseous signal molecule in plant. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **16**: 1-18.
- Bonk, M., Tadros, M., Vandekerckhove, J., al-Babili, S. y Beyer, P.** (1996). Purification and characterization of chaperonin 60 and heat-shock protein 70 from chromoplasts of *Narcissus pseudonarcissus*: Involvement of heat-shock protein 70 in a soluble protein complex containing phytoene desaturase. *Plant Physiology*, **111** (3): 931-939.
- Botella-Pavía, P., Besumbes, O., Phillips, M. A., Carretero-Paulet, L., Boronat, A. y Rodríguez-Concepción, M.** (2004). Regulation of carotenoid biosynthesis in plants: evidence for a key role of hydroxymethylbutenyl diphosphate reductase in controlling the supply of plastidial isoprenoid precursors. *The Plant Journal*, **40** (2): 188-199.
- Bouvier, F., D'Harlingue, A., Hugueney, P., Marin, E., Marion-Poll, A. y Camara, B.** (1996). Xanthophyll biosynthesis. Cloning, expression, functional reconstitution, and regulation of β -cyclohexenyl carotenoid epoxidase from pepper (*Capsicum annuum*). *Journal of Biological Chemistry*, **271** (46): 28861-28867.
- Bouvier, F., Hugueney, P., D'Harlingue, A., Kuntz, M. y Camara, B.** (1994). Xanthophyll biosynthesis in chromoplasts: Isolation and molecular cloning of an enzyme catalyzing the conversion of 5,6-epoxycarotenoid into ketocarotenoid. *The Plant Journal*, **6** (1): 45-54.
- Bouvier, F., Keller, Y., D'Harlingue, A. y Camara, B.** (1998). Xanthophyll biosynthesis: Molecular and functional characterization of carotenoid hydroxylases from pepper fruits (*Capsicum annuum* L.). *Biochimica et Biophysica Acta*, **1391** (3): 320-328.
- Bouvier, F., Suire, C., D'Harlingue, A., Backhaus, R. A. y Camara, B.** (2000). Molecular cloning of geranyl diphosphate synthase and compartmentation of monoterpene synthesis in plant cells. *The Plant Journal*, **24** (2): 241-252.
- Bouvier, F., Suire, C., Mutterer, J. y Cámara, B.** (2003). Oxidative remodeling of chromoplast carotenoids: Identification of the carotenoid dioxygenase *CsCCD* and *CsZCD* genes involved in crocus secondary metabolite biogenesis. *The Plant Cell*, **15** (1): 47-62.
- Bramley, P. M.** (2002). Regulation of carotenoid formation during tomato fruit ripening and development. *Journal of Experimental Botany*, **53** (377): 2107-2113.

- Breitenbach, J. y Sandmann, G.** (2005). ζ -Carotene *cis* isomers as products and substrates in the plant poly-*cis* carotenoid biosynthetic pathway to lycopene. *Planta*, **220** (5): 785-793.
- Britton, G.** (1995). Structure and properties of carotenoids in relation to function. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, **9** (15): 1551-1558.
- Britton, G., Lianaen-Jensen, S. y Pfander, H.** (1998). Overview of carotenoid biosynthesis. En: G. Britton (Ed.), *Biosynthesis and Metabolism*. 13-148. Berlín. Basel: Birkhäuser Verlag
- Britton, G., Lianaen-Jensen, S. y Pfander, H.** (2009). Nutrition and Health. En: Britton, G., Lianaen-Jensen, S., y Pfander, H. (Eds.). Berlín. Basel: Birkhäuser Verlag.
- Bustin, S. A.** (2002). Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): Trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology*, **29**: 23-39.
- Camara, B. y Bouvier, F.** (2004). Oxidative remodeling of plastid carotenoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **430** (1): 16-21.
- Cara, B. y Giovannoni, J. J.** (2008). Molecular biology of ethylene during tomato fruit development and maturation. *Plant Science*, **175** (1-2): 106-113.
- Carol, P. y Kuntz, M.** (2001). A plastid terminal oxidase comes to light: implications for carotenoid biosynthesis and chlororespiration. *Trends in Plant Science*, **6** (1): 31-36.
- Casas, A. y Liácer, J.** (1988). El color de los frutos cítricos. III. Modificación del color mediante tratamientos pre-recolección. *Revista de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos*, **28**: 173-190.
- Casas, A. y Mallent, M. D.** (1988). El color de los frutos cítricos. I. Generalidades. II. Factores que influyen en el color. Influencia de la especie, de la variedad y de la temperatura. *Revista de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos*, **28**: 184-202.
- Chalutz, E., Waks, J. y Schiffmann-Nadel, M.** (1985). A comparison of the response of different citrus fruit cultivars to storage temperature. *Scientia Horticulturae*, **25** (3): 271-277.
- Chen, W., Chao, G. y Singh, K. B.** (1996). The promoter of a H₂O₂-inducible, *Arabidopsis* glutathione S-transferase gene contains closely linked OBF- and OBP1-binding sites. *The Plant Journal*, **10** (6): 955-966.
- Chervin, C., El-Kereamy, A., Roustan, J. P., Latché, A., Lamon, J. y Bouzayan, M.** (2004). Ethylene seems required for the berry development

- and ripening in grape, a non-climacteric fruit. *Plant Science*, **167** (6): 1301-1305.
- Ciardi, J. y Klee, H.** (2001). Regulation of ethylene-mediated responses at the level of the receptor. *Annals of Botany*, **88** (5): 813-822.
- Coggins, C. W., Hall, A. E. y Jones, W. W.** (1981). The influence of temperature on regreening and carotenoid content of the 'Valencia' orange rind. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **106**: 251-254.
- Cohen, E. y Schiffmann-Nadel, M.** (1978). Storage capability at different temperatures of lemons grown in Israel. *Scientia Horticulturae*, **9** (3): 251-257.
- Cohen, E., Shalom, Y. y Rosenberger, I.** (1990). Post-harvest behaviour of 'Ortanique' ('Topaz') tangor citrus fruit during long-term storage at various temperatures. *Scientia Horticulturae*, **44** (3-4): 235-240.
- Cooper, W. C., Rasmussen, G. K. y Hutchison, D. J.** (1969a). Promotion of abscission of orange fruits by cycloheximide as related to the site of treatment. *Bioscience*, **19**: 443-444.
- Cooper, W. C., Rasmussen, G. K. y Waldon, E. S.** (1969b). Ethylene evolution stimulated by chilling in citrus and *Persea sp.* *Plant Physiology*, **44**: 1194-1196.
- Couey, H. M.** (1982). Chilling injury of crops of tropical and subtropical origin. *Hortscience*, **17**: 162-165.
- Crowell, D. N., Packard, C. E., Pierson, C. A., Giner, J. L., Downes, B. P. y Chary, S. N.** (2009). Identification of an allele of *CLA1* associated with variegation in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*, **118** (1): 29-37.
- Cunningham, F. X.** (2002). Regulation of carotenoid synthesis and accumulation in plants. *Pure and Applied Chemistry*, **74** (8): 1409-1417.
- Cunningham, F. X. y Gantt, E.** (1998). Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **49**: 557-583.
- Cunningham, F. X. y Gantt, E.** (2001). One ring or two? Determination of ring number in carotenoids by lycopene ϵ -cyclases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **98** (5): 2905-2910.
- Cunningham, F. X., Pogson, B. J., Sun, Z., McDonald, K. A., DellaPenna, D. y Gantt, E.** (1996). Functional analysis of the α and β lycopene cyclase enzymes of *Arabidopsis* reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation. *The Plant Cell*, **8** (9): 1613-1626.

- Cuquerella, J., Navarro, P. y Salvador, A.** (1999). Respuesta a la desverdización de nuevas variedades de cítricos. *Levante Agrícola*, **348** (0457-6039): 263-271.
- Davies, B. H.** (1976). Carotenoids. En: T. W. Goodwin (Ed.), *Chemistry and biochemistry of plant pigments*: 38-165. New York: Academy press.
- Dawson, T. L.** (2009). Biosynthesis and synthesis of natural colours. *Coloration Technology*, **125** (2): 61-73.
- De Hoff, P. L., Brill, L. M. y Hirsch, A. M.** (2009). Plant lectins: The ties that bind in root symbiosis and plant defense. *Molecular Genetics and Genomics*, **282** (1): 1-15.
- DellaPenna, D. y Pogson, B. J.** (2006). Vitamin synthesis in plants: Tocopherols and carotenoids. *Annual Review of Plant Biology*.
- Demmig Adams, B., Gilmore, A. M. y Adams, W. W.** (1996). Carotenoids.3. *In vivo* functions of carotenoids in higher plants. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, **10** (4): 403-412.
- Dhuique-Mayer, C., Caris-Veyrat, C., Ollitrault, P., Curk, F. y Amiot, M. J.** (2005). Varietal and interspecific influence on micronutrient contents in citrus from the Mediterranean area. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53** (6): 2140-2145.
- Ding, C. K., Chachin, K., Hamauzu, Y., Ueda, Y. y Imahori, Y.** (1998). Effects of storage temperatures on physiology and quality of loquat fruit. *Postharvest Biology and Technology*, **14** (3): 309-315.
- Dogbo, O. y Camara, B.** (1987). Purification of isopentenyl pyrophosphate isomerase and geranylgeranyl pyrophosphate synthase from *Capsicum* chromoplasts by affinity-chromatography. *Biochimica et Biophysica Acta*, **920** (2): 140-148.
- Dong, L., Lurie, S. y Zhou, H. W.** (2002). Effect of 1-methylcyclopropene on ripening of 'Canino' apricots and 'Royal Zee' plums. *Postharvest Biology and Technology*, **24** (2): 135-145.
- 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 and Biotechnology*, **80** (6): 786-792.
- Eaks, I. L.** (1960). Physiological studies of chilling injury in citrus fruits. *Plant Physiology*, **35**: 632-636.
- Edem, D. O.** (2009). Vitamin A: A review. *Asian Journal of Clinical Nutrition*, **1** (1): 65-82.

- Eilati, S. K., Budowski, P. y Monselise, S. P.** (1972). Xanthophyll esterification in the flavedo of citrus fruit. *Plant and Cell Physiology*, **13** (4): 741-746.
- Eilati, S. K., Budowski, P. y Monselise, S. P.** (1975). Carotenoid changes in 'Shamouti' orange peel during chloroplast-chromoplast transformation on and off tree. *Journal of Experimental Botany*, **26** (93): 624-632.
- Eilati, S. K., Goldschmidt, E. E. y Monselise, S. P.** (1969a). Hormonal control of colour changes in orange peel. *Experientia*, **25** (2): 209-210.
- Eilati, S. K., Monselise, S. P. y Budowski, P.** (1969b). Seasonal development of external color and carotenoid content in the peel of ripening 'Shamouti' oranges. *Journal of American Society of Horticultural Science*, **94**: 346-348.
- El-Kereamy, A., Chervin, C., Roustan, J. P., Cheynier, V., Souquet, J. M., Moutounet, M., Raynal, J., Ford, C., Latché, A., Pech, J. C. y Bouzayen, M.** (2003). Exogenous ethylene stimulates the long-term expression of genes related to anthocyanin biosynthesis in grape berries. *Physiologia Plantarum*, **119** (2): 175-182.
- Enfissi, E. M. A., Fraser, P. D., Lois, L. M., Boronat, A., Schuch, W. y Bramley, P. M.** (2005). Metabolic engineering of the mevalonate and non-mevalonate isopentenyl diphosphate-forming pathways for the production of health-promoting isoprenoids in tomato. *Plant Biotechnology Journal*, **3** (1): 17-27.
- Erkan, M., Pekmezci, M., Karasahin, I. y Uslu, H.** (2005a). Reducing chilling injury and decay in stored 'Clementine' mandarins with hot water and curing treatments. *European Journal of Horticultural Science*, **70** (4): 183-188.
- Erkan, M., Pekmezci, M. y Wang, C. Y.** (2005b). 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.
- Establés, B.** (2008). *Estudio transcriptómico de los mecanismos implicados en la tolerancia inducida por el curado al daño por frío y por el etileno al colapso de la corteza en los frutos cítricos*. Tesis. Universidad Politécnica de Valencia.
- Esteve, M. J., Cantero, A., Romero, C., Kawaide, H., Jimenez, L. F., Kuzuyama, T., Seto, H., Kamiya, Y. y León, P.** (2001). Analysis of the expression of *CLA1*, a gene that encodes the 1-deoxyxylulose 5-phosphate synthase of the 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **124** (1): 95-104.
- Fanciullino, A. L., Cercós, M., Dhuique-Mayer, C., Froelicher, Y., Talón, M., Ollitrault, P. y Morillon, R.** (2008). Changes in carotenoid content and biosynthetic gene expression in juice sacs of four orange varieties (*Citrus*

- sinensis*) differing in flesh fruit color. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56** (10): 3628-3638.
- Fanciullino, A. L., Dhuique-Mayer, C., Luro, F., Casanova, J., Morillon, R. y Ollitrault, P.** (2006). Carotenoid diversity in cultivated citrus is highly influenced by genetic factors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54** (12): 4397-4406.
- Fanciullino, A. L., Dhuique-Mayer, C., Luro, F., Morillon, R. y Ollitrault, P.** (2007). Carotenoid biosynthetic pathway in the Citrus genus: Number of copies and phylogenetic diversity of seven genes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55** (18): 7405-7417.
- Farin, D., Ikan, R. y Gross, J.** (1983). The carotenoids pigments in the juice and flavodo of a mandarin hybrid (*Citrus reticulata* CV Michal) during ripening. *Phytochemistry*, **22**: 403-408.
- Fester, T., Maier, W. y Strack, D.** (1999). Accumulation of secondary compounds in barley and wheat roots in response to inoculation with an arbuscular mycorrhizal fungus and co-inoculation with rhizosphere bacteria. *Mycorrhiza*, **8** (5): 241-246.
- Fietto, L. G., Costa, M. D. L., Cruz, C. D., Souza, A. A., Machado, M. A. y Fontes, E. P. B.** (2007). Identification and in silico analysis of the citrus HSP70 molecular chaperone gene family. *Genetics and Molecular Biology*, **30** (3 SUPPL.): 881-887.
- Fluhr, R. y Mattoo, A. K.** (1996). Ethylene: Biosynthesis and perception. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **15** (5-6): 479-523.
- Fraser, P. D. y Bramley, P. M.** (2004). The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in Lipid Research*, **43** (3): 228-265.
- Fraser, P. D., Enfissi, E. M. A. y Bramley, P. M.** (2009). Genetic engineering of carotenoid formation in tomato fruit and the potential application of systems and synthetic biology approaches. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **483** (2): 196-204.
- Fraser, P. D., Kiano, J. W., Truesdale, M. R., Schuch, W. y Bramley, P. M.** (1999). Phytoene synthase-2 enzyme activity in tomato does not contribute to carotenoid synthesis in ripening fruit. *Plant Molecular Biology*, **40** (4): 687-698.
- Fraser, P. D., Romer, S., Shipton, C. A., Mills, P. B., Kiano, J. W., Misawa, N., Drake, R. G., Schuch, W. y Bramley, P. M.** (2002). Evaluation of transgenic tomato plants expressing an additional phytoene synthase in a fruit-specific manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **99** (2): 1092-1097.

- Fraser, P. D., Schuch, W. y Bramley, P. M.** (2000). Phytoene synthase from tomato (*Lycopersicon esculentum*) chloroplast. Partial purification and biochemical properties. *Planta*, **211** (3): 361-369.
- Fujii, H., Shimada, T., Sugiyama, A., Nishihara, M., 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.
- Galpaz, N., Wang, Q., Menda, N., Zamir, D. y Hirschberg, J.** (2008). Abscisic acid deficiency in the tomato mutant high-pigment 3 leading to increased plastid number and higher fruit lycopene content. *The Plant Journal*, **53** (5): 717-730.
- Gama, J. J. T. y Sylos, C. M.** (2005). Major carotenoid composition of Brazilian 'Valencia' orange juice: Identification and quantification by HPLC. *Food Research International*, **38** (8-9): 899-903.
- Garaeva, L. D., Pozdeeva, S. A., Timofeeva, O. A. y Khokhlova, L. P.** (2006). Cell-wall lectins during winter wheat cold hardening. *Russian Journal of Plant Physiology*, **53** (6): 746-750.
- García, J. M., Olmo, M., Oliva, J., García-Díaz, M. T. y Martínez, M. C.** (2004). Curado intermitente de naranjas. *Levante Agrícola*, **372** (0457-6039): 305-312.
- García-Limones, C., Shnäbele, K., Blanco-Portales, R., Bellido, M. L., Caballero, J. L., Schwab, W. y Muñoz-Blanco, J.** (2008). Functional characterization of *FaCCD1*: A carotenoid cleavage dioxygenase from strawberry involved in lutein degradation during fruit ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56** (19): 9277-9285.
- Gershater, M. C. y Edwards, R.** (2007). Regulating biological activity in plants with carboxylesterases. *Plant Science*, **173** (6): 579-588.
- Giovannoni, J. J.** (2001) Molecular biology of fruit maturation and ripening. 52, pp. 725-749.
- Giovannoni, J. J.** (2004). Genetic regulation of fruit development and ripening. *The Plant Cell*, **16** (Suppl. 2004): S170-S180.
- Giovannoni, J. J.** (2007). Fruit ripening mutants yield insights into ripening control. *Current Opinion in Plant Biology*, **10**: 283-289.
- Giuliano, G., al-Babili, S. y von Lintig J.** (2003). Carotenoid oxygenases: Cleave it or leave it. *Trends in Plant Science*, **8** (4): 145-149.
- Giuliano, G., Bartley, G. E. y Scolnik, P. A.** (1993). Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato development. *The Plant Cell*, **5** (4): 379-387.

- Giuliano, G. y Diretto, G.** (2007). Of chromoplasts and chaperones. *Trends in Plant Science*, **12** (12): 529-531.
- Giuliano, G., Tavazza, R., Diretto, G., Beyer, P. y Taylor, M. A.** (2008). Metabolic engineering of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends in Biotechnology*, **26** (3): 139-145.
- Golding, J. B., Shearer, S. G. y McGlasson, W. B.** (1998). Application of 1-MCP and propylene to identify ethylene-dependent ripening processes in mature banana fruit. *Postharvest Biology and Technology*, **14**: 87-98.
- Goldschmidt, E. E.** (1988). Regulatory aspects of chloro-chromoplast interconversions in senescing citrus fruit peel. *Israel Journal of Botany*, **47**: 123-130.
- Goldschmidt, E. E., Huberman, M. y Goren, R.** (1993). Probing the role of endogenous ethylene in the degreening of citrus-fruit with wthylene antagonists. *Plant Growth Regulation*, **12** (3): 325-329.
- González-Aguilar, G., Zacarías, 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.
- Goodner, K. L., Rouseff, R. L. y Hofsommer, H. J.** (2001). Orange, mandarin, and hybrid classification using multivariate statistics based on carotenoid profiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49** (3): 1146-1150.
- Goodwin, T. W.** (1980). The biochemistry of carotenoids. En. New York. Chapman and Hall
- Goodwin, T. W.** (1983). Developments in carotenoid biochemistry over 40 years. *Biochemical Society Transactions*, **11** (5): 473-483.
- Goulas, E., Schubert, M., Kieselbach, T., Kleczkowski, L. A., Gardeström, P., Schröder, W. y Hurry, V.** (2006). The chloroplast lumen and stromal proteomes of *Arabidopsis thaliana* show differential sensitivity to short- and long-term exposure to low temperature. *The Plant Journal*, **47** (5): 720-734.
- Grierson, W., Cohen, E. y Kitagawa, H.** (1986). Degreening. En: W. F. Wardowski, S. Nagy y W. Grierson (Eds.), *Fresh citrus fruit*: 253-274. Westport CT. AVI Public Co.
- Gross, J.** (1981). Pigment changes in the flavedo of dancy Tangerine (*Citrus reticulata*) during ripening. *Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie*, **103** (5): 451-457.
- Gross, J.** (1987). Pigments in fruits. En: London: Academic Press.

- Gross, J. y Timberg, R.** (1983). Pigment and ultrastructural changes in the developing pummelo *Citrus grandis* 'Goliath'. *Botanical Gazette*, **144** (3): 401-406.
- Guillén, F., Castillo, S., Zapata, P. J., Martínez-Romero, D., Valero, D. y Serrano, M.** (2006). Efficacy of 1-MCP treatment in tomato fruit. 2. Effect of cultivar and ripening stage at harvest. *Postharvest Biology and Technology*, **42** (3): 235-242.
- Guis, M., Botondi, R., Ben-Amor, M., Ayub, R., Bouzayen, M., Pech, J. C. y Latché, A.** (1997). Ripening-associated biochemical traits of Cantaloupe Charentais melons expressing an antisense ACC oxidase transgene. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **122** (6): 748-751.
- Hashimoto, J. G., Beadles-Bohling, A. S. y Wiren, K. M.** (2004). Comparison of RiboGreen (R) and 18S rRNA quantitation for normalizing real-time RT-PCR expression analysis. *Biotechniques*, **36** (1): 54-+.
- Hirschberg, J.** (2001). Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Current Opinion in Plant Biology*, **4** (3): 210-218.
- Hoeberichts, F. A., Van der Plas, L. H. W. y Woltering, E. J.** (2002). Ethylene perception is required for the expression of tomato ripening-related genes and associated physiological changes even at advanced stages of ripening. *Postharvest Biology and Technology*, **26** (2): 125-133.
- 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.
- Hornero-Méndez, D., Costa-García, J. y Mínguez Mosquera, M. I.** (2002). Characterization of carotenoid high-producing *Capsicum annuum* cultivars selected for paprika production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50** (20): 5711-5716.
- Howitt, C. A. y Pogson, B. J.** (2006). Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues. *Plant, Cell and Environment*, **29**: 435-445.
- Hsieh, M. H. y Goodman, H. M.** (2005). The Arabidopsis *IspH* homolog is involved in the plastid non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Plant Physiology*, **138** (2): 641-653.
- Huang, F. C., Molnar, P. y Schwab, W.** (2009). Cloning and functional characterization of carotenoid cleavage dioxygenase 4 genes. *Journal of Experimental Botany*, **60** (11): 3011-3022.
- Huguene, P., Badillo, A., Chen, H. C., Klein, A., Hirschberg, J., Camara, B. y Kuntz, M.** (1995). Metabolism of cyclic carotenoids: A model for the

alteration of this biosynthetic pathway in *Capsicum annuum* chromoplasts. *The Plant Journal*, **8** (3): 417-424.

- Huguene y, P., Romer, S., Kuntz, M. y Camara, B.** (1992). Characterization and molecular cloning of a flavoprotein catalyzing the synthesis of phytofluene and ζ -carotene in *Capsicum* chromoplasts. *European Journal of Biochemistry*, **209** (1): 399-407.
- Iannetta, P. P. M., Laarhoven, L. J., Medina-Escobar, N., James, E. K., McManus, M. T., Davies, H. V. y Harren, F. J. M.** (2006). Ethylene and carbon dioxide production by developing strawberries show a correlative pattern that is indicative of ripening climacteric fruit. *Physiologia Plantarum*, **127** (2): 247-259.
- 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.
- Ibdah, M., Azulay, Y., Portnoy, V., Wasserman, B., Bar, E., Meir, A., Burger, Y., Hirschberg, J., Schaffer, A. A. y Katzir, N.** (2006). Functional characterization of *CmCCD1*, a carotenoid cleavage dioxygenase from melon. *Phytochemistry*, **67** (15): 1579-1589.
- Ikoma, Y., Komatsu, A., Kita, M., Ogawa, K., Omura, M., Yano, M. y Moriguchi, T.** (2001). Expression of a phytoene synthase gene and characteristic carotenoid accumulation during citrus fruit development. *Physiologia Plantarum*, **111** (2): 232-238.
- Ilg, A., Beyer, P. y al-Babili, S.** (2009). Characterization of the rice carotenoid cleavage dioxygenase 1 reveals a novel route for geranyl biosynthesis. *FEBS Journal*, **276** (3): 736-747.
- Inoue, K., Furbee, K. J., Uratsu, S., Kato, M., Dandekar, A. M. y Ikoma, Y.** (2006). Catalytic activities and chloroplast import of carotenogenic enzymes from citrus. *Physiologia Plantarum*, **127** (4): 561-570.
- Isaacson, T., Ronen, G., Zamir, D. y Hirschberg, J.** (2002). Cloning of *tangerine* from tomato reveals a carotenoid isomerase essential for the production of β -carotene and xanthophylls in plants. *The Plant Cell*, **14** (2): 333-342.
- 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. *The Plant Journal*, **20** (6): 653-661.
- 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.
- Katz, E., Fon, M., Lee, Y. J., Phynney, B. S. y Sadka, A.** (2007). The citrus fruit proteome: Insights into citrus fruit metabolism. *Planta*, **226**: 989-1005.
- Katz, E., Lagunes, P. M., Riov, J., Weiss, 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** (2): 243-252.
- Kendrick, M. D. y Chang, C.** (2008). Ethylene signaling: New levels of complexity and regulation. *Current Opinion in Plant Biology*, **11** (5): 479-485.
- Kim, I. J., Ko, K. C., Nam, T. S., Kim, Y. W., Chung, W. I. y Kim, C. S.** (2003). Expression and activity of citrus phytoene synthase and β -carotene hydroxylase in *Escherichia coli*. *Journal of Microbiology*, **41** (3): 212-218.
- Kita, M., Kato, M., Ban, Y., Honda, C., Yaegaki, H., Ikoma, Y. y Moriguchi, T.** (2007). Carotenoid accumulation in Japanese apricot (*Prunus mume* Siebold & Zucc.): Molecular analysis of carotenogenic gene expression and ethylene regulation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55** (9): 3414-3420.
- Kita, M., Komatsu, A., Omura, M., Yano, M., Ikoma, Y. y Moriguchi, T.** (2001). Cloning and expression of *CitPDS1*, a gene encoding phytoene desaturase in citrus. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **65** (6): 1424-1428.
- Klee, H. J.** (1993). Ripening physiology of fruit from transgenic tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants with reduced ethylene synthesis. *Plant Physiology*, **102** (3): 911-916.
- Kluge, R. A., Jomori, M. L. L., Jacomino, A. P., Vitti, M. C. D. y Padula, M.** (2003). Intermittant warming in 'Tahiti' lime treated with an ethylene inhibitor. *Postharvest Biology and Technology*, **29** (2): 195-203.
- Knee, M.** (1988). Carotenol esters in developing apple fruits. *Phytochemistry*, **27** (4): 1005-1009.
- Komath, S. S., Kavitha, M. y Swamy, M. J.** (2006). Beyond carbohydrate binding: New directions in plant lectin research. *Organic and Biomolecular Chemistry*, **4** (6): 973-988.

- Komatsu, S., Yamada, E. y Furukawa, K.** (2009). Cold stress changes the concanavalin A-positive glycosylation pattern of proteins expressed in the basal parts of rice leaf sheaths. *Amino Acids*, **36** (1): 115-123.
- Kotak, S., Larkindale, J., Lee, U., von Koskull-Doring, P., Vierling, E. y Scharf, K. D.** (2007). Complexity of the heat stress response in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, **10** (3): 310-316.
- Kuntz, M., Romer, S., Suire, C., Hugueney, P., Weil, J. H., Schantz, R. y Camara, B.** (1992). Identification of a cDNA for the plastid-located geranylgeranyl pyrophosphate synthase from *Capsicum annuum*: Correlative increase in enzyme-activity and transcript level during fruit ripening. *The Plant Journal*, **2** (1): 25-34.
- Laamim, M., Ait-Oubahou, A. y Benichou, M.** (2005a). Effect of 1-methylcyclopropene on the quality of 'Clementine' mandarin fruit at ambient temperature. *Journal of Food, Agricultural and Environment*, **3** (1): 34-36.
- Laamim, M., Benichou, M. y Ait-Oubahou, A.** (2005b). Some effects of 1-methylcyclopropene on the quality of 'Clementine' mandarin fruit kept at ambient temperature. *Acta Horticulturae*, **682**: 695-700.
- Lafuente, M. T., Alférez, F., Sánchez-Ballesta, M. T., Sala, J. M. y Zacarías, L.** (2001a). Alteraciones fisiológicas durante la postcosecha en frutos cítricos: Tratamientos de control y mecanismos implicados. *Levante Agrícola*, **355**: 128-133.
- Lafuente, M. T., Belver, A., Guye, M. G. y Saltveit, M. E., Jr.** (1991). Effect of temperature conditioning on chilling injury of Cucumber cotyledons: Possible role of abscisic acid and heat shock proteins. *Plant Physiology*, **95** (2): 443-449.
- Lafuente, M. T., Establés, 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'. *Levante Agrícola*, **391** (0457-6039): 206-210.
- Lafuente, M. T., Martínez-Tellez, M. A. y Zacarías, 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 Zacarías, L.** (2003). The effect of ethylene increasing citrus fruit chilling tolerance is more likely related to PAL than to

the antioxidative enzyme system. En: M. Vendrell, H. Klee, J. C. Pech y F. Romojaro (Eds.), *Biology and biotechnology of the plant hormone ethylene III*: 126-127. Amsterdam. IOS Press

Lafuente, M. T. y Zacarías, L. (2006). Postharvest physiological disorder in citrus fruit. *Stewart Postharvest Review*, **2** (1): 1-9.

Lafuente, M. T., Zacarías, 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., Zacarías, L., Sala, J. M., Sánchez-Ballesta, M. T., Gosalbes, M. J., Marcos, J. F., González-Candelas, L., Lluch, Y. y Granell, A. (2005). Understanding the basis of chilling injury in citrus fruit. *Acta Horticulturae*, **682** (0567-7572): 831-842.

Lange, B. M. y Ghassemian, M. (2003). Genome organization in *Arabidopsis thaliana*: A survey for genes involved in isoprenoid and chlorophyll metabolism. *Plant Molecular Biology*, **51** (6): 925-948.

Lee, C. Y. (1986). Changes in carotenoid content of carrots during growth and post-harvest storage. *Food Chemistry*, **20** (4): 285-293.

Lee, G. J. y Vierling, E. (2000). A small heat shock protein cooperates with heat shock protein 70 systems to reactivate a heat-denatured protein. *Plant Physiology*, **122** (1): 189-197.

Lelievre, J. M., Latché, A., Jones, B., Bouzayen, M. y Pech, J. C. (1997). Ethylene and fruit ripening. *Physiologia Plantarum*, **101** (4): 727-739.

Lewinsohn, E., Sitrit, Y., Bar, E., Azulay, Y., Ibdah, M., Meir, A., Yosef, E., Zamir, D. y Tadmor, Y. (2005). Not just colors-carotenoid degradation as a link between pigmentation and aroma in tomato and watermelon fruit. *Trends in Food Science and Technology*, **16** (9): 407-415.

Libal-Weksler, Y., Vishnevetsky, M., Ovadis, M. y Vainstein, A. (1997). Isolation and regulation of accumulation of a minor chromoplast-specific protein from *Cucumber corollas*. *Plant Physiology*, **113** (1): 59-63.

Lichtenstein, A. H. (2009). Nutrient supplements and cardiovascular disease: a heartbreaking story. *Journal of lipid research*, **50 Suppl**: S429-433.

Lin, Z., Zhong, S. y Grierson, D. (2009). Recent advances in ethylene research. *Journal of Experimental Botany*, erp204.

- Linke, T., Dawson, H. y Harrison, E.** (2005). Microsomal acid retinyl ester hydrolase isolation, characterization, substrate and tissue specificity. *Journal of Biological Chemistry*, **280**: 23287-23294.
- Lliso, I., Tadeo, F. R., Phinney, B. S., Wilkerson, C. G. y Talón, M.** (2007). Protein changes in the albedo of citrus fruits on postharvesting storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55** (22): 9047-9053.
- Lluch, Y.** (2006). *Bases moleculares del mecanismo de tolerancia al frío inducido por tratamientos de acondicionamiento a altas temperaturas en frutos cítricos*. Tesis. Universidad de Valencia.
- Lois, L. M., Rodríguez-Concepción, M., Gallego, F., Campos, N. y Boronat, A.** (2000). Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: Regulatory role of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase. *The Plant Journal*, **22** (6): 503-513.
- López, A. B., Yang, Y., Thannhauser, T. W. y Li, L.** (2008). Phytoene desaturase is present in a large protein complex in the plastid membrane. *Physiologia Plantarum*, **133** (2): 190-198.
- Lu, S. y Li, L.** (2008). Carotenoid metabolism: Biosynthesis, regulation and beyond. *Journal of Integrative Plant Biology*, **50** (7): 778-785.
- 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** (2): 267-282.
- Lurie, S.** (1998). Postharvest heat treatments. *Postharvest Biology and Technology*, **14** (3): 257-269.
- Lurie, S., Handros, A., Fallik, E. y Shapira, R.** (1996). Reversible inhibition of tomato fruit gene expression at high temperature: Effects on tomato fruit ripening. *Plant Physiology*, **110** (4): 1207-1214.
- Lurie, S. y Klein, A.** (1992). Ripening characteristics of tomatoes stored at 12 °C and 2 °C following a prestorage heat treatment. *Scientia Horticulturae*, **51** (1-2): 55-64.
- Lurie, S. y Klein, J. D.** (1990). Heat treatment of ripening apples: Differential effects on physiology and biochemistry. *Physiologia Plantarum*, **78** (2): 181-186.
- Machado, M. A., Astúa, J. F., Do Amaral, A. M., Malosso, A., y Mazzafera, P.** (2008) Gene expression of carotenoid biosynthesis pathway and carotenoid content in different varieties of sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osb.). [11th International citrus congress], p. 60. Wuhan, China.

- Marcos, J. F., González-Candelas, L. y Zacarías, 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.
- Martínez-Jávega, J.** (2002). Estado actual de las aplicaciones del frío en la postcosecha de cítricos. En: A. López, A. Esnoz y F. Artés (Eds.), *Actas del I Congreso Español de Ciencias y Técnicas del Frío-I*: 433-442.
- Martínez-Jávega, J. y Cuquerella, J.** (1995). Alteraciones fisiológicas de la postrecolección de frutos cítricos. *Fruticultura Profesional*, **69**: 57-67.
- Martínez-Tellez, M. A. y Lafuente, M. T.** (1997). Effect of high temperature conditioning on ethylene, phenylalanine ammonia-lyase, peroxidase and polyphenol oxidase activities in flavedo of chilled 'Fortune' mandarin fruit. *Journal of Plant Physiology*, **150** (6): 674-678.
- Mathieu, S., Terrier, N., Procureur, J., Bigey, F. y Gunata, Z.** (2005). A carotenoid cleavage dioxygenase from *Vitis vinifera* L.: Functional characterization and expression during grape berry development in relation to C-13-norisoprenoid accumulation. *Journal of Experimental Botany*, **56** (420): 2721-2731.
- Matsumoto, H., Ikoma, Y., Kato, M., Nakajima, N. y Hasegawa, Y.** (2009). Effect of postharvest temperature and ethylene on carotenoid accumulation in the flavedo and juice sacs of 'Satsuma' mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57** (11): 4724-4732.
- McClellan, C. A. y Chang, C.** (2007). The role of protein turnover in ethylene biosynthesis and response. *Plant Science*, **175** (1-2): 24-31.
- McCollum, G.** (2007). 1-methylcyclopropene inhibits degreening but stimulates respiration and ethylene biosynthesis in grapefruit. *Hortscience*, **42** (1): 120-124.
- 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** (5352): 235-236.
- Meléndez-Martínez, A. J., Britton, G., Vicario, I. M. y Heredia, F. J.** (2007a). Relationship between the colour and the chemical structure of carotenoid pigments. *Food Chemistry*, **101** (3): 1145-1150.
- Meléndez-Martínez, A. J., Britton, G., Vicario, I. M. y Heredia, F. J.** (2008). The complex carotenoid pattern of orange juices from concentrate. *Food Chemistry*, **109** (3): 546-553.
- Meléndez-Martínez, A. J., Vicario, I. M. y Heredia, F. J.** (2003). A routine high-performance liquid chromatography method for carotenoid

- determination in ultrafrozen orange juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51** (15): 4219-4224.
- Meléndez-Martínez, A. J., Vicario, I. M. y Heredia, F. J.** (2004). Nutritional importance of carotenoid pigments. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, **54** (2): 149-154.
- Meléndez-Martínez, A. J., Vicario, I. M. y Heredia, F. J.** (2007b). Provitamin A carotenoids and ascorbic acid contents of the different types of orange juices marketed in Spain. *Food Chemistry*, **101** (1): 177-184.
- Meredith, F. I. y Young, R. H.** (1969). Effect of temperature on pigment development in 'Redblush' grapefruit and ruby blood oranges. *Proceedings First International Citrus Symposium*, **1**: 271-276.
- Meredith, F. I. y Young, R. H.** (1971). Changes in lycopene and carotene content of 'Redblush' grapefruit exposed to high temperatures. *Hortscience*, **6**: 233-234.
- Mita, S., Kawamura, S., Yamawaki, K., Nakamura, K. y Hyodo, H.** (1998). Differential expression of genes involved in the biosynthesis and perception of ethylene during ripening of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). *Plant and Cell Physiology*, **39** (11): 1209-1217.
- Mita, S., Kirita, C., Kato, M. y Hyodo, H.** (1999). Expression of ACC synthase is enhanced earlier than that of ACC oxidase during fruit ripening of mume (*Prunus mume*). *Physiologia Plantarum*, **107** (3): 319-328.
- Monreal, M., De Ancos, B. y Cano, M. P.** (1999). Influence of critical storage temperatures on degradative pathways of pigments in green beans (*Phaseolus vulgaris* cvs. Perona and boby). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47** (1): 19-24.
- Moore, G. A.** (2001). Oranges and lemons: clues to the taxonomy of Citrus from molecular markers. *Trends in Genetics*, **17** (9): 536-540.
- Muccilli, V., Licciardello, C., Fontanini, D., Russo, M. P., Cunsolo, V., Saletti, R., Reforgiato Recupero, G. y Foti, S.** (2009). Proteome analysis of Citrus sinensis L. (Osbeck) flesh at ripening time. *Journal of Proteomics*, **73** (1): 134-152.
- 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** (2): 155-164.
- Nafussi, B., Ben-Yehoshua, S., Rodov, V., Peretz, J., Ozer, B. K. y D'Hallewin, G.** (2001). Mode of action of hot-water dip in reducing decay of lemon fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49** (1): 107-113.

- Nakatsuka, A., Murachi, S., Okunishi, H., Shiomi, S., Nakano, R., Kubo, Y. y Inaba, A.** (1998). Differential expression and internal feedback regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, l-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase, and ethylene receptor genes in tomato fruit during development and ripening. *Plant Physiology*, **118** (4): 1295-1305.
- Nakatsuka, A., Shiomi, S., Kubo, Y. y Inaba, A.** (1997). Expression and internal feedback regulation of ACC synthase and ACC oxidase genes in ripening tomato fruit. *Plant and Cell Physiology*, **38** (10): 1103-1110.
- Neta-Sharir, I., Isaacson, T., Lurie, S. y Weiss, D.** (2005). Dual role for tomato heat shock protein 21: Protecting photosystem II from oxidative stress and promoting color changes during fruit maturation. *The Plant Cell*, **17** (6): 1829-1838.
- Nishino, H., Murakoshi, M., Tokuda, H. y Satomi, Y.** (2009). Cancer prevention by carotenoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **483** (2): 165-168.
- Nunes, C., Usall, J., Manso, T., Torres, R., Olmo, M. y García, J. M.** (2007). Effect of high temperature treatments on growth of *Penicillium* spp. and their development on 'Valencia' oranges. *Food Science and Technology International*, **13** (1): 63-68.
- Oberholster, R.** (2001). *The biochemical basis of colour as an aesthetic quality in Citrus sinensis*. Tesis. University of Natal.
- Oberholster, R., Cowan, K., Molnar, P. y Tóth, G.** (2001). Biochemical basis of color as an aesthetic quality in *Citrus sinensis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49** (1): 303-307.
- Ohmiya, A., Kishimoto, S., Aida, R., Yoshioka, S. y Sumitomo, K.** (2006). Carotenoid cleavage dioxygenase (*CmCCD4a*) contributes to white color formation in *Chrysanthemum* petals. *Plant Physiology*, 106.
- Okada, K., Saito, T., Nakagawa, T., Kawamukai, M. y Kamiya, Y.** (2000). Five geranylgeranyl diphosphate synthases expressed in different organs are localized into three subcellular compartments in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **122** (4): 1045-1056.
- Opiyo, A. M. y Ying, T. J.** (2005). The effects of 1-methylcyclopropene treatment on the shelf life and quality of cherry tomato (*Lycopersicon esculentum* var. cerasiforme) fruit. *International Journal of Food Science and Technology*, **40** (6): 665-673.
- Pascual, M., Mallent, M. D. y Cuñat, P.** (1993). Study of the 'Naveline' oranges carotenoids. *Revista Espanola de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, **33** (2): 179-196.

- Pech, J. C., Bouzayen, M. y Latché, A.** (2008). Climacteric fruit ripening: Ethylene-dependent and independent regulation of ripening pathways in melon fruit. *Plant Science*, **175** (1-2): 114-120.
- Pecker, I., Gabbay, R., Cunningham, F. X. y Hirschberg, J.** (1996). Cloning and characterization of the cDNA for lycopene β -cyclase from tomato reveals decrease in its expression during fruit ripening. *Plant Molecular Biology*, **30** (4): 807-819.
- Pérez, A. G., Luaces, P., Olmo, M., Sanz, C. y García, J. M.** (2007). Effect of intermittent curing on mandarin quality. *Journal of Food Science*, **70** (1): M64-M68.
- Plaza, P., Sanbruno, A., Usall, J., 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.
- Plaza, P., Usall, J., Torres, R., Lamarca, N., Asensio, A. y Viñas, I.** (2003). Control of green and blue mould by curing on oranges during ambient and cold storage. *Postharvest Biology and Technology*, **28** (1): 195-198.
- Pogson, B. J., McDonald, K. A., Truong, M., Britton, G. y DellaPenna, D.** (1996). *Arabidopsis* carotenoid mutants demonstrate that lutein is not essential for photosynthesis in higher plants. *The Plant Cell*, **8** (9): 1627-1639.
- Porat, R.** (2009). Degreening of citrus fruit. *Tree and Forestry Science and Biotechnology*, **2** (1): 71-76.
- Porat, R., Feng, X. Q., Huberman, M., Galili, D., Goren, R. y Goldschmidt, E. E.** (2001). Gibberellic acid slows postharvest degreening of 'Oroblanco' citrus fruits. *Hortscience*, **36** (5): 937-940.
- Porat, R., Pavoncello, D., Peretz, J., Ben-Yehoshua, S. y Lurie, S.** (2000). 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., 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.
- Pretel, M. T., Serrano, M., Amoros, A., Riquelme, F. y Romojaro, F.** (1995). Non-involvement of ACC and ACC oxidase activity in pepper fruit ripening. *Postharvest Biology and Technology*, **5** (4): 295-302.
- Pupin, A. M., Dennis, M. J. y Toledo, M. C. F.** (1999). HPLC analysis of carotenoids in orange juice. *Food Chemistry*, **64** (2): 269-275.

- Purvis, A. C.** (1980). Sequence of chloroplast degreening in 'Calamondin' fruit as influenced by ethylene and AgNO₃. *Plant Physiology*, **66** (4): 624-627.
- Purvis, A. C. y Barmore, C. R.** (1981). Involvement of ethylene in chlorophyll degradation in peel of citrus-fruits. *Plant Physiology*, **68** (4): 854-856.
- Rasmussen, G. K.** (1975). Cellulase activity endogenous abscisic acid and ethylene in four citrus cultivars during maturation. *Plant Physiology*, **56**: 765-767.
- Riov, J. y Yang, S. F.** (1982). Effects of exogenous ethylene on ethylene production in citrus leaf tissue. *Plant Physiology*, **70**: 136-141.
- 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.
- Rodrigo, M. J., Alquézar, B. y Zacarías, L.** (2005). 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., Alférez, F., Mallent, M. D. y Zacarías, L.** (2003). Characterization of 'Pinalate', a novel *Citrus sinensis* mutant with a fruit-specific alteration that results in yellow pigmentation and decreased ABA content. *Journal of Experimental Botany*, **54** (383): 727-738.
- Rodrigo, M. J., Marcos, J. F. y Zacarías, 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 Zacarías, L.** (2003). Involvement of ethylene in the expression of carotenoids and abscisic biosynthesis genes in the peel of citrus (*Citrus sinensis*) fruit. En: M. Vendrell, H. Klee, J. C. Pech y F. Romojaro (Eds.), *Biology and biotechnology of the plant hormone ethylene III*: 255-256. Amsterdam. IOS Press
- Rodrigo, M. J. y Zacarías, L.** (2006). Horticultural and quality aspects of citrus fruits. En: Y. H. Hui (Ed.), *Handbook of fruits and fruit processing*: 293-307. Blackwell Publishing
- Rodrigo, M. J. y Zacarías, 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** (1): 14-22.

- Rodríguez-Concepción, M.** (2006). Early steps in isoprenoid biosynthesis: Multilevel regulation of the supply of common precursors in plant cells. *Phytochemistry Reviews*, **5** (1): 1-15.
- Rodríguez-Concepción, M., Ahumada, I., Díez Juez, E., Sauret-Güeto, S., Lois, L. M., Gallego, F., Carretero-Paulet, L., Campos, N. y Boronat, A.** (2001). 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase and plastid isoprenoid biosynthesis during tomato fruit ripening. *The Plant Journal*, **27** (3): 213-222.
- Rodríguez-Concepción, M. y Boronat, A.** (2002). Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiology*, **130** (3): 1079-1089.
- Rodríguez-Concepción, M., Querol, J., Lois, L. M., Imperial, S. y Boronat, A.** (2003). Bioinformatic and molecular analysis of hydroxymethylbutenyl diphosphate synthase (*GCPE*) gene expression during carotenoid accumulation in ripening tomato fruit. *Planta*, **217** (3): 476-482.
- Romer, S. y Fraser, P. D.** (2005). Recent advances in carotenoid biosynthesis, regulation and manipulation. *Planta*, **221** (3): 305-308.
- Romer, S., Hugueney, P., Bouvier, F., Camara, B. y Kuntz, M.** (1993). Expression of the genes encoding the early carotenoid biosynthetic-enzymes in *Capsicum annuum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **196** (3): 1414-1421.
- Ronen, G., Carmel Goren, L., Zamir, D. y Hirschberg, J.** (2000). An alternative pathway to β -carotene formation in plant chromoplasts discovered by map-based cloning of *beta* and *old-gold* color mutations in tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **97** (20): 11102-11107.
- Ronen, G., Cohen, M., Zamir, D. y Hirschberg, J.** (1999). Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: expression of the gene for lycopene ϵ -cyclase is down-regulated during ripening and is elevated in the mutant *Delta*. *The Plant Journal*, **17** (4): 341-351.
- Rosales, R., Liao, H. L., y Burns, J. K.** (2009) IAA, ABA and ethylene content and related gene expression is altered in mature fruit fractions of Huanglongbing-infected *Citrus sinensis*. [2nd International Citrus Biotechnology Symposium], p. 52.
- Rosati, C., Aquilani, R., Dharmapuri, S., Pallara, P., Marusic, C., Tavazza, R., Bouvier, F., Camara, B. y Giuliano, G.** (2000). Metabolic engineering of β -carotene and lycopene content in tomato fruit. *The Plant Journal*, **24** (3): 413-419.

- Rouseff, R., Raley, L. y Hofsommer, H. J.** (1996). Application of diode array detection with a C-30 reversed phase column for the separation and identification of saponified orange juice carotenoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **44** (8): 2176-2181.
- 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.
- Sabehat, A., Lurie, S. y Weiss, D.** (1998). Expression of small heat-shock proteins at low temperatures: A possible role in protecting against chilling injuries. *Plant Physiology*, **117** (2): 651-658.
- Sakthivel, K., Watanabe, T. y Nakamoto, H.** (2009). A small heat-shock protein confers stress tolerance and stabilizes thylakoid membrane proteins in cyanobacteria under oxidative stress. *Archives of Microbiology*, **191** (4): 319-328.
- Sala, J. M., Lafuente, M. T. y Cuñat, P.** (1992). 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**: 489-495.
- Sala, J. M., Mallent, M. D., Pérez-Zúñiga, F. y Cuñat, P.** (1988). La evolución del color de naranjas y mandarinas en el proceso de desverdiación con etileno. *Revista de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos*, **28** (4): 558-566.
- Salvador, A., Carvalho, C. P., Monterde, A. y Martínez-Jávega, J.** (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 Martínez-Jávega, J.** (2004). Aplicación del 1-MCP en postcosecha. *Levante Agrícola, Especial Postcosecha*: 332-339.
- Sánchez-Ballesta, M. T., Lluch, Y., Gosalbes, M. J., Zacarías, 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.
- Sandmann, G.** (1994). Carotenoid biosynthesis in microorganisms and plants. *European Journal of Biochemistry*, **223** (1): 7-24.
- Sandmann, G.** (2001). Carotenoid biosynthesis and biotechnological application. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **385** (1): 4-12.
- Sandmann, G.** (2002). Molecular evolution of carotenoid biosynthesis from bacteria to plants. *Physiologia Plantarum*, **116** (4): 431-440.

- Saunt, J.** (2000). Citrus varieties of the world. En: England. Sinclair international limited.
- 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.
- Schledz, M., al-Babili, S., von Lintig, J., Haubruck, H., Rabbani, S., Kleinig, H. y Beyer, P.** (1996). Phytoene synthase from *Narcissus pseudonarcissus*: functional expression, galactolipid requirement, topological distribution in chromoplasts and induction during flowering. *The Plant Journal*, **10** (5): 781-792.
- Schwartz, S. H., Qin, X. y Zeevaart, J. A.** (2001). Characterization of a novel carotenoid cleavage dioxygenase from plants. *The Journal of Biological Chemistry*, **276** (27): 25208-25211.
- Serek, M., Sisler, E. C. y Reid, M. S.** (1995). Effects of 1-MCP on the vase life and ethylene response of cut flowers. *Plant Growth Regulation*, **16** (1): 93-97.
- Shaked, A. y Hasdai, D.** (1985). Organic acids in the juice of developing nucellar and old-clone 'Shamouti' oranges. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, **60**: 563-568.
- Shemer, T. A., Harpaz-Saad, S., Belausov, E., Lovat, N., Krokhin, O., Spicer, V., Standing, K. G., Goldschmidt, E. E. y Eyal, Y.** (2008). Citrus chlorophyllase dynamics at ethylene-induced fruit color-break: A study of chlorophyllase expression, posttranslational processing kinetics, and in situ intracellular localization. *Plant Physiology*, **148** (1): 108-118.
- Shi, J. X., Chen, S., Gollop, N., Goren, R., Goldschmidt, E. E. y Porat, R.** (2008). Effects of anaerobic stress on the proteome of citrus fruit. *Plant Science*, **175** (4): 478-486.
- Shimokawa, K., Shimada, S. y Yaeo, K.** (1978). Ethylene-enhanced chlorophyllase activity during degreening of Citrus unshiu Marc. *Scientia Horticulturae*, **8** (2): 129-135.
- Simkin, A. J., Schwartz, S. H., Auldridge, M. E., Taylor, M. G. y Klee, H. J.** (2004). The tomato carotenoid cleavage dioxygenase 1 genes contribute to the formation of the flavor volatiles β -ionone, pseudoionone, and geranylacetone. *The Plant Journal*, **40** (6): 882-892.
- Sisler, E. C. y Serek, M.** (1997). Inhibitors of ethylene responses in plants at the receptor level: Recent developments. *Physiologia Plantarum*, **100** (3): 577-582.

- Smirra, I., Halevy, A. H. y Vainstein, A.** (1993). Isolation and characterization of a chromoplast-specific carotenoid-associated protein from *Cucumis sativus* corollas. *Plant Physiology*, **102** (2): 491-496.
- Smith, J. H. y Benitez, A.** (1955). Chlorophylls. En: K. Paech y M. V. Traey (Eds.), *In modern methods of plant analyses*: 142-196. Berlín. Springer
- Snodderly, D. M.** (1995). Evidence for protection against age-related macular degeneration by carotenoids and antioxidant vitamins. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **62** (6): 1448S-1461.
- Sonnen, H.** (1977). Carotenoid formation in ripening 'Satsuma' fruit. *Proceeding of the International Society of Citriculture*, **3**: 1089-1092.
- Sonnen, H., Lenz, F. y Gross, J.** (1979). Einfluss der wüzeltemperature auf die carotenoidentwinklung in fruchtschalen vom *Citru unshiu* (Marc.) und *Citrus madurensis* (Lour.). *Gartenbauwissenschaft*, **4**: 49-52.
- Stalberg, K., Lindgren, O., Ek, B. y Hoglund, A. S.** (2003). Synthesis of ketocarotenoids in the seed of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, **36** (6): 771-779.
- Stearns, C. R. y Young, G. T.** (1942). The relation of climatic conditions to color development in citrus fruit. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, **55**: 59-61.
- Stewart, I.** (1977). Citrus color: A review. *Proceeding of the International Society of Citriculture*, **1**: 308-311.
- Stewart, I. y Leuenberger, U.** (1976). Citrus color. *Alimenta*, **15**: 33-36.
- 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). Carotenoids in citrus. Their accumulation induced by ethylene. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **20** (2): 448-&.
- Stewart, I. y Wheaton, T. A.** (1973a) Carotenoids in citrus. I Congreso Mundial de Citricultura 2, pp. 325-330.
- Stewart, I. y Wheaton, T. A.** (1973b). Conversion of β -citraurin to reticulataxanthin and β -apo-8'-carotenal to citranaxanthin during isolation of carotenoids from citrus. *Phytochemistry*, **12** (12): 2947-2951.
- Sun, W., Van Montagu, M. y Verbruggen, N.** (2002). Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression*, **1577** (1): 1-9.

- Sun, Z., Gantt, E. y Cunningham, F. X.** (1996). Cloning and functional analysis of the β -carotene hydroxylase of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, **271** (40): 24349-24352.
- Tadeo, F. R., Cercós, M., Iglesias, D. J., Naranjo, M. A., Ríos, G., Carrera, E., Lliso, I., Morillon, R., Ollitrault, P. y Talón, M.** (2008). Molecular physiology of development and quality of citrus. En: J. C. Kader y M. Delseny (Eds.), *Advances in Botanical Research Incorporating Advances in Plant Pathology*. 147-223. Academic Press
- Tadeo, F. R., Moya, J. L., Iglesias, D. J., Talón, M. y Primo-Millo, E.** (2003). Histología y citología de cítricos. En: Generalitat Valenciana: Consejería de Agricultura y Pesca (Ed.).Valencia.
- Tanaka, Y., Sasaki, N. y Ohmiya, A.** (2008). Biosynthesis of plant pigments: Anthocyanins, betalains and carotenoids. *Plant Journal*, **54** (4): 733-749.
- Tao, N., Hu, Z., Liu, Q., Xu, J., Cheng, Y., Guo, L., Guo, W. y Deng, X.** (2007). Expression of phytoene synthase gene (*Psy*) is enhanced during fruit ripening of 'Cara Cara' navel orange (*Citrus sinensis* L: Osbeck). *Plant Cell Reports*, **26** (6): 837-843.
- Tatsuki, M., Endo, A. y Ohkawa, H.** (2007b). Influence of time from harvest to 1-MCP treatment on apple fruit quality and expression of genes for ethylene biosynthesis enzymes and ethylene receptors. *Postharvest Biology and Technology*, **43**: 28-35.
- Tatsuki, M., Endo, A. y Ohkawa, H.** (2007a). Influence of time from harvest to 1-MCP treatment on apple fruit quality and expression of genes for ethylene biosynthesis enzymes and ethylene receptors. *Postharvest Biology and Technology*, **43** (1): 28-35.
- Tatsuki, M., Hayama, H. y Nakamura, Y.** (2009). Apple ethylene receptor protein concentrations are affected by ethylene and differ in cultivars that have different storage life. *Planta*, **230** (2): 407-417.
- Tatsumi, Y.** (2000). Studies on the storage of 'Hebezu' fruits. *Bulletin of the Faculty of Agriculture, Miyazaki University*, **47**: 59-68.
- Taylor, M. y Ramsay, G.** (2005). Carotenoid biosynthesis in plant storage organs: recent advances and prospects for improving plant food quality. *Physiologia Plantarum*, **124** (2): 143-151.
- Tesniere, C., Pradal, M., El-Kereamy, A., Torregrosa, L., Chatelet, P., Roustan, J. P. y Chervin, C.** (2004). Involvement of ethylene signalling in a non-climacteric fruit: New elements regarding the regulation of *ADH* expression in grapevine. *Journal of Experimental Botany*, **55** (406): 2235-2240.

- Theologis, A.** (1992). One rotten apple spoils the whole bushel: The role of ethylene in fruit ripening. *Cell*, **70** (2): 181-184.
- Tian, L., Musetti, V., Kim, J., Magallanes-Lundback, M. y DellaPenna, D.** (2004). The *Arabidopsis* LUT1 locus encodes a member of the cytochrome P450 family that is required for carotenoid ϵ -ring hydroxylation activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **101** (1): 402-407.
- Tian, M. S., Prakash, S., Elgar, H. J., Young, H., Burmeister, D. M. y Ross, G. S.** (2000). Responses of strawberry fruit to 1-methylcyclopropene (1-MCP) and ethylene. *Plant Growth Regulation*, **32** (1): 83-90.
- Timofeeva, O., Khokhlova, L., Belyaeva, N., Chulkova, Y. y Garaeva, L.** (2000). Cytoskeleton-induced alterations of the lectin activity in winter wheat under cold hardening and abscisic acid (ABA). *Cell Biology International*, **24** (6): 375-381.
- Timofeeva, O. A., Garaeva, L. D., Chulkova, Y. y Khokhlova, L. P.** (2008). Effect of cartolin on oryzalin-induced changes in lectin activity during low-temperature plant hardening. *Russian Journal of Plant Physiology*, **55** (3): 333-337.
- Ting, S. y Attaway, A.** (1971). Citrus. En: *The biochemistry of fruits and their products*. New York. Academic Press
- Trainotti, L., Pavanello, A. y Casadoro, G.** (2005). Different ethylene receptors show an increased expression during the ripening of strawberries: Does such an increment imply a role for ethylene in the ripening of these non-climacteric fruits? *Journal of Experimental Botany*, **56** (418): 2037-2046.
- Trainotti, L., Tadiello, A. y Casadoro, G.** (2007). The involvement of auxin in the ripening of climacteric fruits comes of age: the hormone plays a role of its own and has an intense interplay with ethylene in ripening peaches. *Journal of Experimental Botany*, **58** (12): 3299-3308.
- Trebitsh, T., Goldschmidt, E. E. y Riov, J.** (1993). Ethylene induces de novo synthesis of chlorophyllase, a chlorophyll degrading enzyme, in citrus fruit peel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **90** (20): 9441-9445.
- Van den Berg, H., Faulks, R., Granado, H. F., Hirschberg, J., Olmedilla, B., Sandmann, G., Southon, S. y Stahl, W.** (2000). The potential for the improvement of carotenoid levels in foods and the likely systemic effects. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **80** (7): 880-912.
- Van Wyk, A. A., Huysamer, M. y Barry, G. H.** (2009). Extended low-temperature shipping adversely affects rind colour of 'Palmer Navel' sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osb.) due to carotenoid degradation but can

- partially be mitigated by optimising post-shipping holding temperature. *Postharvest Biology and Technology*, **53** (3): 109-116.
- Vishnevetsky, M., Ovadis, M. y Vainstein, A.** (1999a). Carotenoid sequestration in plants: the role of carotenoid-associated proteins. *Trends in Plant Science*, **4** (6): 232-235.
- Vishnevetsky, M., Ovadis, M., Zuker, A. y Vainstein, A.** (1999b). Molecular mechanisms underlying carotenogenesis in the chromoplast: Multilevel regulation of carotenoid-associated genes. *The Plant Journal*, **20** (4): 423-431.
- Vogel, J. T., Tan, B. C., McCarty, D. R. y Klee, H. J.** (2008). The carotenoid cleavage dioxygenase 1 enzyme has broad substrate specificity, cleaving multiple carotenoids at two different bond positions. *Journal of Biological Chemistry*, **283** (17): 11364-11373.
- Wang, C. Y. y Baker, J. E.** (1979). Effects of 2 free-radical scavengers and intermittent warming on chilling injury and polar lipid-composition of cucumber and sweet pepper fruits. *Plant and Cell Physiology*, **20** (1): 243-251.
- Watkins, C. B.** (2008). Postharvest effects on the quality of horticultural products: Using 1-MCP to understand the effects of ethylene on ripening and senescence processes. *Proceedings of the International Symposium on the Role of Postharvest Technology in the Globalization of Horticulture*, **768**: 19-31.
- Welsch, R., Beyer, P., Hugueney, P., Kleinig, H. y von Lintig, J.** (2000). Regulation and activation of phytoene synthase, a key enzyme in carotenoid biosynthesis, during photomorphogenesis. *Planta*, **211** (6): 846-854.
- Wheaton, T. A. y Stewart, I.** (1973). Optimum temperature and ethylene concentrations for postharvest development of carotenoid pigments in citrus. *Journal of American Society of Horticultural*, **98**: 337-340.
- Win, T. O., Srilaong, V., Heyes, J., Kyu, K. L. y Kanlayanarat, S.** (2006). Effects of different concentrations of 1-MCP on the yellowing of West Indian lime (*Citrus aurantifolia*, Swingle) fruit. *Postharvest Biology and Technology*, **42** (1): 23-30.
- Wong, W. S., Ning, W., Xu, P. L., Kung, S. D., Yang, S. F. y Li, N.** (1999). Identification of two chilling-regulated 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase genes from citrus (*Citrus sinensis* L.Osbeck) fruit. *Plant Molecular Biology*, **41** (5): 587-600.
- Xu, C. J., Fraser, P. D., Wang, W. J. y Bramley, P. M.** (2006). Differences in the carotenoid content of ordinary citrus and lycopene-accumulating mutants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54** (15): 5474-5481.

- Yahia, E. M., Soto-Zamora, G., Brecht, J. K. y Gardea, A.** (2007). Postharvest hot air treatment effects on the antioxidant system in stored mature-green tomatoes. *Postharvest Biology and Technology*, **44** (2): 107-115.
- Yamaguchi, M. y Uchiyama, S.** (2009). Osteoporosis prevention by β -cryptoxanthin. En: *Functional Food and Health*: 408-418. Washington, DC. American Chemical Society
- Yamamoto, H. Y.** (1985). Xanthophyll cycles. *Methods in Enzymology*, **110**: 303-312.
- Yang, S. F. y Hoffman, N. E.** (1984). Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology*, **35**: 155-189.
- Yokoyama, H. y Vandercook, C. E.** (1967). Citrus Carotenoids .I. Comparison of carotenoids of mature-green and yellow lemons. *Journal of Food Science*, **32** (1): 42-48.
- Yokoyama, H. y White, M. J.** (1966). Citrus carotenoids VI. : Carotenoid pigments in the flavedo of Sinton citrangequat. *Phytochemistry*, **5** (6): 1159-1173.
- Young, L. B. y Erickson, L. C.** (1961). Influences of temperature on color change in 'Valencia' oranges. *Proceedings of the America Society Horticultural Science*, **78**: 197-200.
- Young, R. y Jahn, O.** (1972). Ethylene-induced carotenoid accumulation in citrus fruit rinds. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **97** (2): 258-261.
- Zacarías, L. y Alférez, F.** (2007). Regulation by carbon dioxide of wound-induced ethylene biosynthesis in the peel of citrus fruit. *Food Science and Technology International*, **13** (6): 497-504.
- Zacarías, L., Lafuente, M. T., Marcos, J. F., Saladie, M. y Dupille, E.** (2002). Regulation of ethylene biosynthesis cold storage of the chilling-sensitive 'Fortune' mandarine fruit. En: M. Vendrell, H. Klee, J. C. Pech y F. Romojaro (Eds.), *Biology and biotechnonology of the plabt hormone ethylene III*: 112-117. Amsterdam. IOS Press
- Zhang, Z. Q., Huber, D. J., Hurr, B. M. y Rao, J.** (2009). Delay of tomato fruit ripening in response to 1-methylcyclopropene is influenced by internal ethylene levels. *Postharvest Biology and Technology*, **54** (1): 1-8.
- Zhong, G. Y., Huberman, M., Feng, X. Q., Sisler, E. C., Holland, D. y Goren, R.** (2001). Effect of 1-methylcyclopropene on ethylene-induced abscission in citrus. *Physiologia Plantarum*, **113** (1): 134-141.

Zorn, H., Bouws, H., Takenberg, M., Nimtz, M., Getzlaff, R., Breithaupt, D. E. y Berger, R. G. (2005). An extracellular carboxylesterase from the basidiomycete *Pleurotus sapidus* hydrolyses xanthophyll esters. *Biological Chemistry*, **386** (5): 435-440.