

DEPARTAMENTO DE MEDICINA PREVENTIVA Y SALUD
PÚBLICA

RESISTENCIA FRENTE A LA INFECCIÓN POR
PENICILLIUM DIGITATUM DURANTE LA POSTCOSECHA
DE LOS FRUTOS CÍTRICOS. BASES MOLECULARES Y
METABOLISMO DE FENILPROPANOIDES

ANA ROSA BALLESTER FRUTOS

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2008

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 23 de Novembre de 2007 davant un tribunal format per:

- D. Vicente Conejero Tomás
- D. Emilio Montesinos Seguí
- D. José García Jiménez
- D. Pedro V. Martínez Culebras
- D. José F. Marcos López

Va ser dirigida per:

D. Luis González Candelas

D^a. M^a Teresa Lafuente Rodríguez

©Copyright: Servei de Publicacions
Ana Rosa Ballester Frutos

Depòsit legal:

I.S.B.N.:978-84-370-7059-9

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115



**‘Resistencia frente a la Infección por *Penicillium digitatum*
durante la Postcosecha de los Frutos Cítricos. Bases
Moleculares y Metabolismo de Fenilpropanoides’**

Tesis doctoral

Ana Rosa Ballester Frutos

Valencia, 2007



UNIVERSIDAD DE VALENCIA
Facultad de Farmacia
Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública,
Ciencias de la Alimentación, Toxicología y Medicina Legal



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos
Departamento de Ciencia de los Alimentos
Laboratorio de Fisiología y Biotecnología de Postcosecha



‘Resistencia frente a la Infección por *Penicillium digitatum* durante la Postcosecha de los Frutos Cítricos. Bases Moleculares y Metabolismo de Fenilpropanoides’

Trabajo presentado por **Ana Rosa Ballester Frutos** para
optar al grado de **Doctor** por la Universidad de Valencia

Directores **Luis González Candelas**
 M^a Teresa Lafuente Rodríguez

Tutora **M^a José Ocio Zapata**

Resumen

Penicillium digitatum es el agente causal de la podredumbre verde de los frutos cítricos y constituye uno de los patógenos más importantes durante la postcosecha de los mismos, llegando a causar hasta el 80 % de las podredumbres. Aunque el control de este patógeno se realiza en la actualidad con fungicidas químicos, existe una tendencia al abandono de los mismos y al empleo de estrategias alternativas de control. La inducción de resistencia natural en los frutos constituye una de estas alternativas. En el presente trabajo se pretende profundizar en las bases biológicas y moleculares de la inducción de resistencia en los frutos cítricos frente a un ataque por *P. digitatum*.

Se han evaluado distintos métodos de inducción de resistencia frente a *P. digitatum* con el fin de optimizar y seleccionar uno de ellos con el que abordar los estudios posteriores. Se compararon diversos tratamientos químicos (metil jasmonato, ácido β -aminobutírico y Brotomax®) y biológicos (hongos no patógenos de cítricos y paredes celulares de *P. digitatum*), así como un tratamiento de infección previa con *P. digitatum* y posterior inactivación térmica del patógeno. Se seleccionó este último sistema atendiendo a los buenos niveles de resistencia alcanzados (la incidencia se redujo más de un 70 % y la severidad más de un 85 %) y a la reproducibilidad del mismo.

El tratamiento seleccionado se empleó para estudiar los cambios globales de expresión génica durante la inducción de resistencia. Estos cambios se analizaron en el flavedo y el albedo de frutos cítricos empleando dos micromatrices de cDNA desarrolladas por el Consorcio de Genómica Funcional de Cítricos, denominadas 7k y 12k, que contienen aproximadamente 7.000 y 12.000 genes respectivamente. Las mayores inducciones se detectaron en genes que codifican enzimas del metabolismo de fenilpropanoides, especialmente metiltransferasas (OMTs), de la síntesis de etileno, entre los que se encuentran varios genes *ACO* (ácido 1-metilciclopropano 1-carboxílico oxidasa), proteínas relacionadas con la patogénesis (proteínas PR) y oxidorreductasas. También se observó una importante reducción de la expresión de genes regulados por bajas temperaturas, de genes inducibles por la luz y de otros de función desconocida. El análisis de anotación funcional por ontologías génicas mostró que los procesos relacionados con el metabolismo de aminoácidos y de fenilpropanoides se indujeron en los frutos sometidos al tratamiento de inducción de resistencia respecto a los frutos no tratados, siendo estos cambios mayores en el tejido interno.

Una vez finalizado el tratamiento de inducción de resistencia tiene lugar un aumento de la producción de etileno, que es comparable al que se observa en frutos infectados por *P. digitatum*. Sin embargo, en los frutos en los que se induce resistencia no hay desarrollo del hongo, por lo que todo el etileno procede del fruto. Mediante análisis Northern se ha comprobado que este aumento de los niveles de etileno coincide con una elevada inducción de la expresión del gen *CsACO*, al igual que ocurre en frutos infectados. Es de reseñar que las mayores inducciones tienen lugar en el albedo.

Para profundizar en el estudio de la implicación de la ruta de fenilpropanoides se procedió a analizar la expresión de genes que codifican las enzimas PAL, 4CL, F3H, IRL1, CADs, SAD y OMTs mediante hibridación Northern. Se observó que la expresión de la mayor parte de estos genes aumentaba en respuesta al tratamiento inductor, con un patrón similar en ambos tejidos. Aunque en general los niveles de expresión fueron superiores en el flavedo, las mayores inducciones se detectaron en el albedo. Además, se realizó un estudio de la expresión de estos genes en respuesta a la infección por *P. digitatum*, observándose que los cambios fueron, en general, similares a los inducidos por el tratamiento de inducción de resistencia.

El estudio de esta ruta se completó con la determinación del perfil metabólico de compuestos secundarios en los frutos cítricos mediante HPLC. En los frutos no tratados se observó en general una mayor abundancia y concentración de compuestos fenólicos en el flavedo respecto al albedo. Sólo la concentración de algunas flavanonas fue mayor en el albedo. La escoparona, 6,7-dihidroxycumarina, fue el compuesto con mayor inducción en respuesta al tratamiento inductor. Sin embargo, el mayor número de cambios como consecuencia de la infección y posterior inactivación térmica se observó en los derivados del ácido benzoico. Al igual que en respuesta al tratamiento inductor, durante la infección por *P. digitatum* se observó una modificación en la concentración de derivados del ácido benzoico.

También se ha analizado la posible actividad antifúngica *in vitro* e *in vivo* de diversas cumarinas, flavanonas y alcaloides sobre diferentes hongos patógenos. Las cumarinas escoparona y umbeliferona y la flavanona hesperidina fueron los compuestos con mayor actividad antifúngica *in vitro*, aunque ninguno de ellos inhibió por completo el crecimiento de los hongos patógenos de cítricos. Sin embargo, sólo las dos cumarinas mostraron un efecto *in vivo* retrasando el desarrollo de *P. digitatum* en frutos inoculados con este patógeno. La adición al medio de cultivo de algunos alcaloides presentes

en los cítricos redujo significativamente el crecimiento de *P. digitatum*, siendo la cafeína y el ácido 1, 2, 3, 4-tetrahidroharmane 3-carboxílico (THHCA) los compuestos más efectivos.

Este trabajo constituye la primera aproximación en el que se aborda conjuntamente un análisis transcriptómico y metabolómico de procesos relevantes en patología postcosecha. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la importancia que desempeñan tanto el metabolismo secundario, especialmente de fenilpropanoides, como el etileno en el proceso de resistencia inducida en frutos cítricos frente a la infección por *P. digitatum*.

Summary

Penicillium digitatum is the causal agent of green mould and constitutes the major postharvest pathogen of citrus fruit, accounting for up to 80 % of losses due to fungal decay. Although control of this pathogen is achieved by chemical fungicides, there is a trend to adopt new and safer control alternatives. Induction of natural resistance in fruit constitutes one of these alternatives. The aim of this work was to gain an insight into the biological and molecular bases of the induction of resistance in citrus fruit against *P. digitatum*.

Different methods to induce resistance against *P. digitatum* have been evaluated in order to optimize and to select one of them for further studies. Various chemical (methyl jasmonate, β -aminobutyric acid and Brotomax®), biological (non pathogenic fungi of citrus and cellular walls of *P. digitatum*) treatments, as well as the possible resistance induced by a previous infection with *P. digitatum* followed by its inactivation by a heat treatment were compared. The latter system was selected because of the high resistance achieved (the incidence was reduced more than 70 % and the severity more than 85 %) and its reproducibility.

Global changes in gene expression induced by the selected treatment were analyzed in the flavedo and albedo of citrus fruit. To that end, two cDNA microarrays developed by the Citrus Functional Genomics Project, named 7k and 12k, which contain about 7.000 and 12.000 genes, respectively, were used. The highest inductions were detected in genes that code for enzymes involved in phenylpropanoid metabolism, mainly methyltransferases (OMTs), ethylene biosynthesis, among which there are several *ACO* genes (1-aminocyclopropane 1-carboxylic acid oxidase), pathogenesis-related proteins (PR) and oxidoreductases. An important reduction in the expression of genes regulated by either cold or light, together with others of unknown function, was also

observed. Gene ontology comparisons showed that processes related to amino acids and phenylpropanoid metabolism were upregulated in treated fruits, being these changes more marked in the internal tissue.

An increase in ethylene production was observed after the heat treatment, coincident with the resistance acquisition, reaching a concentration similar to that observed in fruits infected by *P. digitatum*. Nevertheless, in the treated fruits the fungus does not progress, so the rise in ethylene must be due to the fruit. Northern blot analysis showed that this increase in ethylene paralleled a high induction on *CsACO* expression, as it occurs in infected fruits, and that the highest induction takes place into the albedo.

In order to get a deeper insight into the role of the phenylpropanoid metabolism in the induction of resistance, the expression of genes encoding PAL, 4CL, F3H, IRL1, CADs, SAD and OMTs was analyzed by Northern blot. The expression of most of these genes increased in response to the induction treatment, showing a similar pattern in both tissues. Although the overall expression levels were higher in the flavedo, the highest inductions were detected in the albedo. In addition, changes in the expression of these genes in response to the infection by *P. digitatum* were similar to those originated by the induction of resistance treatment.

The putative involvement of this pathway was further studied by examining changes in the metabolic profile by means of HPLC. In the treated fruits a greater abundance and a higher concentration of phenolic compounds in the flavedo with respect to the albedo were observed. Flavanones were the only phenolics whose concentration was higher in the internal tissue. Although the coumarin scoparone was the phenolic compound showing the highest increase in response to the treatment, it has to be pointed out that, among the different phenylpropanoids, benzoic acid derivatives were the most affected. Similar changes were detected during the infection of fruits by *P. digitatum*.

The possible antifungal activity of diverse coumarins, flavanones and alkaloids was tested both *in vitro* and *in vivo* against different pathogenic fungi. The coumarins scoparone and umbelliferone and the flavanone hesperidin showed the highest *in vitro* antifungal activity, although none of them inhibited completely the growth of the citrus fungal pathogens analyzed. However, only the coumarins had an effect *in vivo* delaying the development of *P. digitatum* in inoculated citrus fruit. On the other hand, addition of some alkaloids detected in citrus tissues to the culture medium significantly reduced the growth of

P. digitatum, being caffeine and 1, 2, 3, 4-tetrahydroharmane 3-carboxylic acid (THHCA) the most effective.

This is the first work undertaking both a transcriptomic and a metabolomic approach to study changes associated with relevant processes in postharvest pathology. The global results indicate that both the secondary metabolism, mainly phenylpropanoids, and ethylene play important roles in the induction of resistance in citrus fruit against *P. digitatum* infection.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	I
LISTADO DE FIGURAS	VII
LISTADO DE TABLAS	XI
ABREVIATURAS	XVII
<u>INTRODUCCIÓN</u>	<u>1</u>
1. Interacción planta-patógeno	5
1.1. Interacción incompatible	6
1.2. Mecanismos de defensa en las plantas	7
1.3. Tratamientos inductores de resistencia	17
2. Respuestas de los frutos cítricos frente al ataque por patógenos durante la postcosecha: mecanismos de defensa e inducción de resistencia	21
2.1. Interacción frutos cítricos-patógenos fúngicos	21
2.2. Inducción de resistencia en frutos cítricos y mecanismos asociados	24
<u>OBJETIVOS</u>	<u>35</u>
<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	<u>39</u>
1. Material vegetal	41
2. Hongos	42
3. Tratamientos de inducción de resistencia	43
3.1. Tratamientos con productos químicos	43
3.2. Tratamientos con paredes celulares de <i>P. digitatum</i>	43
3.3. Tratamientos con hongos no infectivos en frutos cítricos	44
3.4. Tratamiento de infección con <i>P. digitatum</i> y posterior inactivación térmica	44
4. Infecciones con <i>P. digitatum</i>	45
4.1. Análisis estadístico	46
5. Toma de tejido	46
6. Aislamiento de ácidos nucleicos	47
7. Análisis global de la expresión génica mediante micromatrices de cDNA	48
7.1. Descripción de las micromatrices de cDNA empleadas	48
	III

7.2. Marcaje indirecto del cDNA	49
7.3. Preparación de las sondas e hibridación de las micromatrices	50
7.4. Adquisición y análisis de datos	51
8. Determinaciones enzimáticas	53
8.1. Actividad peroxidasa	54
8.2. Actividad L-fenilalanina amonio-liasa	54
9. Obtención de sondas	56
10. Análisis Northern	58
10.1. Preparación de las membranas	58
10.2. Marcaje de las sondas	58
10.3. Hibridaciones	58
11. Determinación de la producción de etileno	59
12. Análisis de compuestos del metabolismo secundario por HPLC: fenilpropanoides	60
12.1. Extracción de compuestos fenólicos	60
12.2. Determinación de compuestos fenólicos por HPLC	60
12.3. Patrones analizados	61
13. Detección de compuestos fluorescentes por microscopía óptica	62
14. Actividad antifúngica de compuestos fenólicos y alcaloides	62
14.1. Ensayos <i>in vitro</i>	62
14.2. Ensayos <i>in vivo</i>	63
RESULTADOS	65
1. Efecto de los diferentes tratamientos de inducción de resistencia frente a la infección por <i>P. digitatum</i>	67
2. Análisis global de la expresión génica mediante micromatrices de cDNA	74
2.1. Análisis de la expresión de genes incluidos en la micromatriz 7k	74
2.2. Análisis de la expresión de genes mediante hibridación de la micromatriz 12k	97
2.3. Comparación de los resultados obtenidos a partir de las hibridaciones de las micromatrices 7k y 12k	131
3. Análisis de la expresión del gen <i>CsACO</i> y determinación de la producción de etileno	133

3.1. Análisis de la expresión del gen <i>CsACO</i> en naranjas ‘Navelate’ sometidas al tratamiento de infección más curado	133
3.2. Análisis de la expresión del gen <i>CsACO</i> en naranjas ‘Navelina’ en respuesta a la infección por <i>P. digitatum</i>	134
3.3. Determinación de la producción de etileno en frutos cítricos	135
4. Cambios en la actividad de las enzimas POX y PAL	137
4.1. Peroxidasa soluble e insoluble	137
4.2. L-fenilalanina amonio-liasa	139
5. Patrón de expresión de genes implicados en el metabolismo de fenilpropanoides en frutos cítricos	140
5.1. Análisis de la expresión de genes del metabolismo de fenilpropanoides en naranjas ‘Navelate’ sometidas al tratamiento de infección más curado	141
5.2. Análisis de la expresión de genes implicados en el metabolismo de fenilpropanoides en naranjas ‘Navelina’ infectadas con <i>P. digitatum</i>	146
5.3. Validación de los resultados de las hibridaciones con las micromatrices mediante análisis Northern	150
6. Perfiles metabólicos de compuestos secundarios en frutos cítricos: fenilpropanoides	153
6.1. Cambios asociados a la inducción de resistencia en naranjas ‘Navelate’	153
6.2. Cambios asociados a la infección de <i>P. digitatum</i> en naranjas ‘Navelina’	173
7. Observación de compuestos fluorescentes por microscopía óptica	182
8. Actividad antifúngica de compuestos fenólicos	183
8.1. Ensayos <i>in vitro</i>	183
8.2. Ensayos <i>in vivo</i>	190
<u>DISCUSIÓN</u>	<u>193</u>
1. Efectividad de los distintos tratamientos de inducción de resistencia	195
2. Estudio de cambios de expresión génica en naranjas ‘Navelate’ en respuesta al tratamiento de inducción de resistencia	198
3. Implicación del etileno en las respuestas de defensa de los frutos cítricos	209
4. Implicación del metabolismo de fenilpropanoides en las respuestas de defensa de los frutos cítricos	213
4.1. Importancia del metabolismo de fenilpropanoides en los mecanismos de inducción de resistencia de naranjas ‘Navelate’	213

4.2. Implicación del metabolismo de fenilpropanoides en la respuesta de naranjas 'Navelina' frente a una infección por <i>P. digitatum</i>	222
5. Comportamiento específico del flavedo y el albedo en la inducción de resistencia y en respuesta a la infección por <i>P. digitatum</i>	230
CONCLUSIONES	235
BIBLIOGRAFÍA	239
ANEXOS	269
1. Determinación de compuestos fenólicos mediante HPLC	271
1.1. Patrones	271
1.2. Compuestos fenólicos en el flavedo y el albedo de naranjas 'Navelate' sometidas al tratamiento de inducción de resistencia	278
1.3. Compuestos fenólicos en el flavedo y el albedo de naranjas 'Navelina' infectadas con <i>P. digitatum</i>	284

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la activación y coordinación de las rutas de transducción de señales en las respuestas de defensa de la planta frente a patógenos.	9
Figura 2. Ruta de fenilpropanoides.	12
Figura 3. Ruta biosintética del etileno.	15
Figura 4. Frutos de naranjas de la variedad 'Navelate'.	41
Figura 5. Crecimiento radial del aislado PHI-26 M1 de <i>P. digitatum</i> en medio de cultivo de PDA.	42
Figura 6. Tratamiento de inducción de resistencia.	45
Figura 7. Cámaras de incubación.	46
Figura 8. Incidencia y Severidad de la infección causada por <i>P. digitatum</i> en naranjas 'Navel' sometidas previamente a diferentes tratamientos de inducción de resistencia.	70
Figura 9. Incidencia y Severidad de la infección causada por los aislados PHI-26 M1 y CECT 2954 de <i>P. digitatum</i> y CMP1 de <i>P. expansum</i> en naranjas 'Navelina'.	71
Figura 10. Intensidad de la infección (Incidencia y Severidad) causada por <i>P. digitatum</i> en naranjas 'Navelate' sometidas al tratamiento de inducción de resistencia.	73
Figura 11. Incidencia y Severidad causada por <i>P. digitatum</i> en naranjas 'Navelate' sometidas previamente al tratamiento de inducción de resistencia consistente en una infección con el patógeno y un posterior tratamiento térmico de 3 d a 37 °C.	74
Figura 12. Representación de los procesos biológicos del nivel 3 de los genes incluidos en la micromatriz 7k que presentan homología con genes de <i>A. thaliana</i> .	75
Figura 13. Representación gráfica del diseño experimental empleado en la hibridación de la micromatriz 7k.	76
Figura 14. Diagramas de Venn que indican el número de genes incluidos en la micromatriz 7k con expresión diferencial en el flavedo de frutos cítricos en las distintas condiciones analizadas respecto a los frutos no tratados.	80
Figura 15. Representación gráfica de la ruta de biosíntesis del etileno a partir de metionina y del ciclo de SAM que mostraron cambios significativos en respuesta a la infección y posterior inactivación térmica del patógeno a 1 dpt en el flavedo de naranjas 'Navelate'.	95
Figura 16. Representación gráfica de las rutas de biosíntesis de fenilpropanoides, ácidos fenólicos libres y suberina que mostraron cambios significativos en respuesta a la infección y posterior inactivación térmica del patógeno en el flavedo de naranjas 'Navelate'.	96
Figura 17. Representación gráfica del diseño experimental empleado en la hibridación de la micromatriz 12k.	97

- Figura 18. Diagramas de Venn que indican el número de genes incluidos en la micromatriz 12k que se expresan diferencialmente en el flavedo en alguna de las condiciones analizadas respecto a los frutos no tratados. 100
- Figura 19. Diagramas de Venn que indican el número de genes incluidos en la micromatriz 12k que se expresan diferencialmente en el albedo en alguna de las condiciones analizadas respecto a los frutos no tratados. 101
- Figura 20. Representación gráfica de la ruta de biosíntesis del etileno a partir de metionina y el ciclo de SAM que mostraron cambios significativos en respuesta a la infección y posterior inactivación térmica del patógeno en el flavedo y albedo de naranjas 'Navelate'. 126
- Figura 21. Representación gráfica de las rutas de biosíntesis de fenilalanina, ácidos fenólicos libres y suberina que mostraron cambios significativos en respuesta a la infección y posterior inactivación térmica del patógeno en el flavedo y albedo de naranjas 'Navelate'. 127
- Figura 22. Representación gráfica de las rutas de biosíntesis de flavonoides y flavonoles que mostraron cambios significativos en respuesta a la infección y posterior inactivación térmica del patógeno en el flavedo y albedo de naranjas 'Navelate'. 128
- Figura 23. Análisis Northern de los cambios de expresión del gen *CsACO* en frutos cítricos sometidos al tratamiento de inducción de resistencia. 134
- Figura 24. Análisis Northern de la expresión del gen *CsACO* en tejido de flavedo y albedo de naranjas 'Navelina' inoculadas con el aislado PHI-26 M1 de *P. digitatum*. 135
- Figura 25. Producción de etileno en discos de 10 mm de diámetro procedentes de frutos cítricos. 136
- Figura 26. Actividad POX, soluble e insoluble, en tejido de flavedo y albedo de naranjas 'Navelate' cosechadas en Febrero de 2003 sometidas a distintos tratamientos. 138
- Figura 27. Actividad PAL en tejido de flavedo y albedo de naranjas 'Navelate' cosechadas en Febrero de 2003 sometidas a distintos tratamientos. 139
- Figura 28. Ruta resumida del metabolismo de fenilpropanoides. 141
- Figura 29. Análisis Northern de genes implicados en el metabolismo de los fenilpropanoides en tejido de flavedo y albedo de naranjas 'Navelate' sometidas al tratamiento de inducción de resistencia a los 0, 1 y 3 dpt. 144
- Figura 30. Análisis Northern de genes implicados en el metabolismo de fenilpropanoides en tejido de flavedo y albedo de naranjas 'Navelina' inoculadas con el aislado PHI-26 M1 de *P. digitatum*. 148
- Figura 31. Acumulación relativa de genes estudiados implicados en el metabolismo de fenilpropanoides en frutos cítricos sometidos al tratamiento de infección más curado. 152
- Figura 32. Comparación del cromatograma obtenido mediante los detectores de UV-visible y fluorescencia a partir de la extracción de compuestos fenólicos del flavedo de

- naranjas 'Navelate' sometidas al tratamiento de infección más curado a los 3 dpt con diferentes disolventes. 154
- Figura 33. Determinación de compuestos fenólicos mediante HPLC en el flavedo y el albedo de frutos cítricos no tratados. 156
- Figura 34. Cromatograma parcial en el que se presentan tres compuestos fluorescentes del flavedo de naranjas 'Navelate' que se indujeron como consecuencia del tratamiento de infección más curado a 0, 1 y 3 dpt respecto de frutos no tratados. 164
- Figura 35. Cromatograma MaxPlot de las flavonas polimetoxiladas presentes en el flavedo y el albedo de naranjas 'Navelina' no tratadas observadas con el detector de UV-visible. 175
- Figura 36. Fotografías de cortes transversales de la corteza de frutos de naranja de la variedad 'Navelina' realizadas con un microscopio estereoscópico binocular equipado con un sistema de fluorescencia. 183
- Figura 37. Crecimiento en medio PDB de los aislados PHI-26 M1 y CECT 2954 de *P. digitatum*, CMP1 de *P. expansum* y PHI-1 M1 de *P. italicum*. 184
- Figura 38. Ensayos de la actividad antifúngica de diversas cumarinas (umbeliferona, escoparona, escopoletina y esculetina) sobre el aislado PHI-26 M1 de *P. digitatum* en tres medios de cultivo diferentes: PDB, extracto acuoso de flavedo y extracto acuoso de albedo. 187
- Figura 39. Ensayo de la actividad antifúngica de cuatro flavanonas (hesperidina, hesperetina, naringina y naringenina) sobre el aislado PHI-26 M1 de *P. digitatum* en medio PDB. 188
- Figura 40. Ensayo de la actividad antifúngica de ocho alcaloides (teofilina, sanguinarina, cafeína, teobromina, ácido 1, 2, 3, 4-tetrahidroharmane 3-carboxílico (THHCA), berberina, hiosciamina y escopolamina) sobre el aislado PHI-26 M1 de *P. digitatum* en medio PDB. 188
- Figura 41. Ensayos de la actividad antifúngica de diversas cumarinas en naranjas 'Navelina' infectadas con el aislado PHI-26 M1 de *P. digitatum*. 191
- Figura 42. Nivel de expresión de diversos genes presentes en la micromatriz 7k que codifican OMTs. 200
- Figura 43. Ruta resumida del metabolismo de fenilpropanoides en la que se indica la expresión relativa de los genes estudiados mediante análisis Northern en el flavedo y albedode naranjas 'Navelate' sometidas al tratamiento de inducción de resistencia 1 dpt respecto al de los frutos no tratados. 217
- Figura 44. Ruta resumida del metabolismo de fenilpropanoides en la que se indica la expresión relativa de los genes estudiados mediante análisis Northern en el flavedo y albedo de naranjas 'Navelina' infectadas por *P. digitatum* a las 72 hpi respecto a la de los frutos no tratados. 225

Listado de Figuras de los Anexos

Figura- I. Espectros UV-visible y tiempo de retención de patrones correspondientes a derivados del ácido benzoico.	271
Figura- II. Espectros UV-visible y tiempo de retención de patrones correspondientes a derivados del ácido cinámico	272
Figura- III. Espectros UV-visible y tiempo de retención de patrones correspondientes a cumarinas.	273
Figura- IV. Espectros UV-visible y tiempo de retención de patrones correspondientes a flavonas.	274
Figura- V. Espectros UV-visible y tiempo de retención de patrones correspondientes a flavonas polimetoxiladas.	275
Figura- VI. Espectros UV-visible y tiempo de retención de patrones correspondientes a flavanonas.	276
Figura- VII. Espectros UV-visible y tiempo de retención de patrones correspondientes a alcaloides.	277

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Bibliotecas de cDNA generadas bajo el marco del CFGP.	32
Tabla 2. Tabla resumen de los genes analizados por hibridación Northern, indicando el clon, unigen y la genoteca de la que fueron obtenidos, micromatriz en la que están incluidos, proteína con la que presentan mayor similitud y organismo de la que procede.	57
Tabla 3. Intensidad de la infección (Incidencia y Severidad) estimada a los 6 dpi en frutos de naranjas ‘Navel’ inoculados con el aislado PHI-26 M1 de <i>P. digitatum</i> sometidos previamente a diferentes tratamientos de inducción de resistencia.	69
Tabla 4. Número de genes incluidos en la micromatriz 7k que mostraron expresión diferencial como consecuencia del tratamiento de inducción de resistencia en el flavedo de frutos cítricos.	77
Tabla 5. Listado de los 30 genes incluidos en la micromatriz 7k que más aumentaron la expresión en el flavedo como consecuencia del tratamiento de inducción de resistencia a 1 dpt.	81
Tabla 6. Listado de los 30 primeros genes incluidos en la micromatriz 7k que mostraron mayor inducción como consecuencia del tratamiento de inducción de resistencia a 1 dpt y no se detectaron en los frutos no tratados.	82
Tabla 7. Listado de los 30 genes incluidos en la micromatriz 7k que más redujeron la expresión en el flavedo como consecuencia del tratamiento de inducción de resistencia a 1 dpt.	83
Tabla 8. Listado de los 30 primeros genes incluidos en la micromatriz 7k que mostraron expresión diferencial negativa como consecuencia del tratamiento de inducción de resistencia a 1 dpt ya que no se detectaron en respuesta al tratamiento inductor pero sí en los frutos no tratados.	84
Tabla 9. Genes incluidos en la micromatriz 7k que codifican proteínas relacionadas con el estrés oxidativo y que mostraron expresión diferencial en el flavedo de naranjas ‘Navelate’ como consecuencia del tratamiento inductor de resistencia a 1 dpt.	85
Tabla 10. Genes incluidos en la micromatriz 7k que codifican proteínas PR y que mostraron expresión diferencial en el flavedo de naranjas ‘Navelate’ como consecuencia del tratamiento inductor a 1 dpt.	87
Tabla 11. Genes incluidos en la micromatriz 7k relacionados con la transcripción y señalización que mostraron expresión diferencial mayor a 2 veces en el flavedo de naranjas ‘Navelate’ como consecuencia del tratamiento inductor a 1 dpt.	89
Tabla 12. Procesos biológicos significativamente diferentes en el flavedo de frutos infectados y curados a 1 dpt respecto del resto de tratamientos.	91
Tabla 13. Genes incluidos en dos procesos biológicos significativos realizando el análisis de anotación funcional por ontologías génicas.	93

Tabla 14. Número de genes incluidos en la micromatriz 12k que mostraron expresión diferencial como consecuencia del tratamiento de inducción de resistencia en el flavedo y el albedo de frutos cítricos.	98
Tabla 15. Listado de los 30 genes incluidos en la micromatriz 12k que más aumentaron la expresión en el flavedo como consecuencia del tratamiento de inducción de resistencia a 1 dpt.	104
Tabla 16. Listado de los 30 primeros genes incluidos en la micromatriz 12k que mostraron mayor inducción en el flavedo como consecuencia del tratamiento de inducción de resistencia a 1 dpt y no se detectaron en los frutos no tratados.	105
Tabla 17. Listado de los 30 genes incluidos en la micromatriz 12k que más aumentaron la expresión en el albedo como consecuencia del tratamiento de inducción de resistencia a 1 dpt.	106
Tabla 18. Listado de los 30 primeros genes incluidos en la micromatriz 12k que mostraron mayor inducción en el albedo como consecuencia del tratamiento de inducción de resistencia a 1 dpt y que no se detectaron en los frutos no tratados.	107
Tabla 19. Listado de los 30 genes incluidos en la micromatriz 12k que más se reprimieron en el flavedo como consecuencia del tratamiento de inducción de resistencia a 1 dpt.	108
Tabla 20. Listado de los 30 primeros genes incluidos en la micromatriz 12k que no se detectaron a 1 dpt y sí en el flavedo de frutos no tratados.	109
Tabla 21. Listado de los 30 genes incluidos en la micromatriz 12k que más se reprimieron en el albedo como consecuencia del tratamiento de inducción de resistencia a 1 dpt.	110
Tabla 22. Listado de los 30 primeros genes incluidos en la micromatriz 12k que no se detectaron a 1 dpt y sí en el albedo de frutos no tratados.	111
Tabla 23. Genes que codifican proteínas relacionadas con el estrés oxidativo incluidos en la micromatriz 12k y que mostraron expresión diferencial en el flavedo y albedo de naranjas 'Navelate' como consecuencia del tratamiento inductor a 1 dpt.	112
Tabla 24. Genes que codifican proteínas PR incluidos en la micromatriz 12k que mostraron expresión diferencial en el flavedo y albedo de naranjas 'Navelate' como consecuencia del tratamiento inductor a 1 dpt.	114
Tabla 25. Genes relacionados con la transcripción y la señalización incluidos en la micromatriz 12k y que aumentaron la expresión en el flavedo de naranjas 'Navelate' como consecuencia del tratamiento inductor a 1 dpt.	116
Tabla 26. Genes implicados en la transcripción y señalización incluidos en la micromatriz 12k que redujeron la expresión en el flavedo de naranjas 'Navelate' como consecuencia del tratamiento inductor a 1 dpt.	117
Tabla 27. Listado de genes implicados en la transcripción y señalización incluidos en la micromatriz 12k que incrementaron la expresión en el albedo de naranjas 'Navelate' como consecuencia del tratamiento inductor a 1 dpt.	118

Tabla 28. Genes implicados en la transcripción y señalización incluidos en la micromatriz 12k con mayor represión en el albedo de naranjas 'Navelate' como consecuencia del tratamiento inductor a 1 dpt.	120
Tabla 29. Procesos biológicos significativamente diferentes en el flavedo y albedo de frutos sometidos al tratamiento de inducción de resistencia respecto del resto de tratamientos.	123
Tabla 30. Genes incluidos en dos procesos biológicos significativos realizando el análisis de anotación funcional por ontologías génicas.	124
Tabla 31. Anotación funcional por ontologías génicas de genes con expresión diferencial entre el flavedo y el albedo de naranjas 'Navelate' en diversas condiciones.	130
Tabla 32. Listado de genes comunes en las micromatrices 7k y 12k que mostraron expresión diferencial en el flavedo de naranjas en respuesta al tratamiento de inducción de resistencia a 1 dpt.	132
Tabla 33. Acumulación relativa de los mRNAs de genes implicados en el metabolismo de fenilpropanoides en tejido de flavedo y albedo de frutos de naranjas 'Navelate' sometidos al tratamiento de infección más curado a los 0, 1 y 3 dpt.	145
Tabla 34. Acumulación relativa de los genes estudiados implicados en el metabolismo de fenilpropanoides en tejido de flavedo y albedo de naranjas 'Navelina' inoculadas con el aislado PHI-26 M1 de <i>P. digitatum</i> .	149
Tabla 35. Compuestos detectados en el flavedo y el albedo de naranjas 'Navelate' no tratadas cuyo tiempo de retención y espectro coincide con patrones conocidos.	158
Tabla 36. Patrones empleados para la identificación de compuestos fenólicos de la corteza de los frutos cítricos.	159
Tabla 37. Compuestos derivados del ácido benzoico observados con el detector de UV-visible que modifican el área de integración más de 1,5 veces en el flavedo de naranjas sometidas al tratamiento de inducción de resistencia a 1 y 3 dpt respecto a los frutos no tratados.	162
Tabla 38. Compuestos derivados del ácido cinámico observados con el detector de UV-visible que modifican el área de integración más de 1,5 veces en el flavedo de naranjas sometidas al tratamiento de inducción de resistencia a 1 y 3 dpt respecto a los frutos no tratados.	163
Tabla 39. Cumarinas observadas con el detector de UV-visible que modifican el área de integración/concentración más de 1,5 veces en el flavedo de naranjas sometidas al tratamiento de inducción de resistencia a 1 y 3 dpt respecto a los frutos no tratados.	164
Tabla 40. Flavonas y flavanonas observadas con el detector de UV-visible que modifican el área de integración/concentración más de 1,5 veces en el flavedo de naranjas sometidas al tratamiento de inducción de resistencia a 1 y 3 dpt respecto a los frutos no tratados.	165

Tabla 41. Otros compuestos observados por el detector de UV-visible que modifican el área de integración más de 1,5 veces en el flavedo de naranjas sometidas al tratamiento de inducción de resistencia a 1 y 3 dpt respecto a los frutos no tratados.	166
Tabla 42. Compuestos derivados del ácido benzoico que modifican el área en más de 1,5 veces o menos de 0,67 en el albedo de naranjas sometidas al tratamiento inductor a 1 y/o 3 dpt respecto de los frutos no tratados.	167
Tabla 43. Compuestos derivados del ácido cinámico que modifican el área/concentración en más de 1,5 veces o menos de 0,67 en el albedo de naranjas sometidas al tratamiento inductor a 1 y/o 3 dpt respecto de los frutos no tratados.	168
Tabla 44. Compuestos tipo cumarinas que modifican el área/concentración en más de 1,5 veces o menos de 0,67 en el albedo de naranjas sometidas al tratamiento inductor a 1 y/o 3 dpt respecto de los frutos no tratados.	168
Tabla 45. Compuestos tipo flavonas y flavanonas que modifican el área/concentración en más de 1,5 veces o menos de 0,67 en el albedo de naranjas sometidas al tratamiento inductor a 1 y/o 3 dpt respecto de los frutos no tratados.	169
Tabla 46. Compuestos que modifican el área en más de 1,5 veces o menos de 0,67 en el albedo de naranjas sometidas al tratamiento inductor a 1 y/o 3 dpt respecto de los frutos no tratados.	170
Tabla 47. Compuestos detectados en el flavedo y el albedo de naranjas 'Navelina' no tratadas cuyo tiempo de retención y espectro coincide con patrones conocidos.	174
Tabla 48. Compuestos derivados de ácido benzoico que modifican el área en más de 1,5 veces o menos de 0,67 en el flavedo de naranjas infectadas por <i>P. digitatum</i> durante 24-48h.	176
Tabla 49. Compuestos derivados de ácido cinámico que modifican el área/concentración en más de 1,5 veces o menos de 0,67 en el flavedo de naranjas infectadas por <i>P. digitatum</i> durante 24-48 h.	177
Tabla 50. Cumarinas que modifican el área/concentración en más de 1,5 veces o menos de 0,67 veces en el flavedo de naranjas infectadas por <i>P. digitatum</i> durante 24-48 h.	177
Tabla 51. Flavonas y flavanonas que modifican el área/concentración en más de 1,5 veces o menos de 0,67 veces en el flavedo de naranjas infectadas por <i>P. digitatum</i> durante 24-48 h.	178
Tabla 52. Compuestos derivados del ácido benzoicos que modifican el área en más de 1,5 veces o menos de 0,67 en el albedo de naranjas infectadas por <i>P. digitatum</i> durante 24-48 h.	180
Tabla 53. Compuestos derivados del ácido cinámico que modifican el área/concentración en más de 1,5 veces o menos de 0,67 en el albedo de naranjas infectadas por <i>P. digitatum</i> durante 24-48 h.	180
Tabla 54. Flavonas y flavanonas que modifican el área/concentración en más de 1,5 veces o menos de 0,67 en el albedo de naranjas infectadas por <i>P. digitatum</i> durante 24-48 h.	181

Tabla 55. Valores relativos de A_{492} a las 72 h de incubación de los aislados PHI-26 M1 y CECT 2954 de <i>P. digitatum</i> , CMP1 de <i>P. expansum</i> y PHI-1 M1 de <i>P. italicum</i> en tres medios de cultivo diferentes: PDB, extracto acuoso de flavedo y de albedo suplementados con las cumarinas umbeliferona, escoparona, escopoletina y esculetina.	189
Tabla 56. Valores relativos de A_{492} a las 72 h de incubación de los aislados PHI-26 M1 y CECT 2954 de <i>P. digitatum</i> , CMP1 de <i>P. expansum</i> y PHI-1 M1 de <i>P. italicum</i> en el medio PDB suplementado con los compuestos hesperidina, hesperetina, naringenina y naringina.	189
Tabla 57. Valores relativos de A_{492} a las 73 h desde el inicio del crecimiento de los aislados PHI-26 M1 de <i>P. digitatum</i> y CMP1 de <i>P. expansum</i> en el medio PDB suplementado con diversos alcaloides.	190
Tabla 58. Ensayos <i>in vivo</i> de la actividad antifúngica de diversos compuestos fenólicos sobre el aislado PHI-26 M1 de <i>P. digitatum</i> en frutos de naranja.	192

Listado de Tablas de los Anexos

Tabla- I. Determinación de compuestos fenólicos mediante el detector de UV-visible en el flavedo de naranjas 'Navelate' sometidas al tratamiento de inducción de resistencia.	278
Tabla- II. Determinación de compuestos fluorescentes en el flavedo de naranjas 'Navelate' sometidas al tratamiento de infección más curado.	280
Tabla- III. Determinación de compuestos fenólicos mediante el detector de UV-visible asociado al HPLC en el albedo de naranjas 'Navelate' sometidas al tratamiento de inducción de resistencia.	281
Tabla- IV. Determinación de compuestos fluorescentes en el albedo de naranjas 'Navelate' sometidas al tratamiento de infección más curado.	283
Tabla- V. Determinación de compuestos fenólicos mediante el detector de UV-visible en el flavedo de naranjas 'Navelina' infectadas con <i>P. digitatum</i> .	284
Tabla- VI. Determinación de compuestos fluorescentes en el flavedo de naranjas 'Navelina' infectadas con <i>P. digitatum</i> .	287
Tabla- VII. Determinación de compuestos fenólicos mediante el detector de UV-visible en el albedo de naranjas 'Navelina' infectadas por <i>P. digitatum</i> .	288
Tabla- VIII. Determinación de compuestos fluorescentes en el albedo de naranjas 'Navelina' infectadas con <i>P. digitatum</i> .	290

ABREVIATURAS

1-MCP	1-metilciclopropeno
4CL	4-cumarato CoA ligasa
A	albedo
A.R.	acumulación relativa
A ₄₉₂	absorbancia a 492 nm
ACC	ácido 1-aminociclopropano 1-carboxílico
ACO	ACC oxidasa
ACS	ACC sintasa
AOS	especies activas de oxígeno
APX	ascorbato peroxidasa
ASR	'Abscisic stress ripening'
<i>avr</i>	gen de avirulencia
BABA	ácido DL-3-aminobutírico
BTH	Benzotiadiazol
C4H	cinamato 4-hidroxilasa
CAD	cinamil alcohol deshidrogenasa
CAT	catalasa
CCoAOMT	cafeil-CoA O-metiltransferasa
CCR	cinamil-CoA reductasa
cDNA	DNA complementario
CFGP	Proyecto de Genómica Funcional de Cítricos
CHS	chalcona sintasa
COMT	ácido cafeico O-metiltransferasa
CS1	cafeína sintasa
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
dpi	días posteriores a la inoculación
dpt	días posteriores al tratamiento térmico
ERF	factor de respuesta a etileno
F	flavedo
F3'5'H	flavonoide 3',5'-hidroxilasa
F3'H	flavonoide 3'-hidroxilasa
F3H	flavanona 3-hidroxilasa
F5H	ferulato 5-hidroxilasa
FPM	flavona polimetoxilada
GPY	medio de cultivo compuesto por glucosa, peptona y extracto de levadura
GR	glutathion reductasa

GST	glutathion S-transferasa
H ₂ O ₂	peróxido de hidrógeno
hpi	horas posteriores a la inoculación
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución ('High Performance Liquid Chromatography')
HR	respuesta hipersensible
HRGP	glicoproteínas ricas en hidroxiprolina ('Hydroxyproline-rich glycoproteins')
HSP	Proteína de choque térmico ('Heat-shock protein')
IRL1	isoflavona reductasa
JA	ácido jasmónico
LEA	'Late-embriogenesis abundant'
LOX	lipoxigenasa
LTP	proteína transportadora de lípidos ('lipid-transfer protein')
MAPKs	'Mitogen-Activated Protein Kinases'
MeJA	jasmonato de metilo
MeOH	metanol
MOPS	ácido 3-morfolino-propano-sulfónico
mRNA	RNA mensajero
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
NAM	proteínas de meristemo no apical
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NO	óxido nítrico
O ₂ ^{•-}	radical superóxido
OH [•]	radical hidroxilo
OMT	O-metiltransferasa
PA	polvo de acetona
PAL	L-fenilalanina amonio-liasa
PAMPs	patrones moleculares asociados al patógeno ('Pathogen-Associated Molecular Patterns')
PC-FLAV	paredes celulares de <i>P. digitatum</i> crecido en extracto acuoso de flavedo
PC-GPY	paredes celulares de <i>P. digitatum</i> crecido en medio GPY
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PDA	medio de cultivo compuesto por patata, dextrosa y agar
PDB	medio de cultivo líquido compuesto por patata y dextrosa
PF	peso fresco
PGIPs	proteínas inhibidoras de poligalacturonasas ('Polygalacturonase-Inhibiting Proteins')
POX	peroxidasa
PR	relacionadas con la patogénesis ('pathogenesis-related')
R	gen de resistencia

RH	humedad relativa
RNA	ácido ribonucleico
rRNA	RNA ribosómico
SA	ácido salicílico
SAD	sinapil alcohol deshidrogenada
SAM	S-adenosil-L-metionina
SD	desviación estándar
SDS	dodecil sulfato sódico
SOD	superóxido dismutasa
SSC	citrato sódico + cloruro sódico
TFIIA	factores de inicio de la transcripción
THHCA	Ácido 1, 2, 3, 4-tetrahidroharmane 3-carboxílico
T _R	tiempo de retención
UA	unidades de absorbancia
UV	ultravioleta
UV-vis	espectro ultravioleta-visible

ABREVIATURAS EMPLEADAS EN LOS EXPERIMENTOS

NT	frutos no tratados
NT0, NT24, NT48, NT72	frutos no tratados almacenados a 20 °C durante 0, 24, 48 y 72 h
H24, H48, H72	frutos heridos y almacenados a 20 °C durante 24, 48 y 72 h
I24, I48, I72	frutos inoculados con <i>P. digitatum</i> y almacenados a 20°C durante 24, 48 y 72 h
X3	frutos almacenados 24 h a 20 °C, 3 d a 4 °C y 3 d a 20 °C
C3	frutos almacenados 24 h a 20 °C, 3 d a 37 °C (curados) y 3 d a 20 °C
H3	frutos heridos, almacenados 24 h a 20 °C, curados y 3 d a 20 °C
I0, I1, I3	frutos inoculados con <i>P. digitatum</i> , almacenados 24 h a 20 °C, curados y almacenados posteriormente a 20 °C durante 0, 1 y 3 d

INTRODUCCIÓN

España ocupa la quinta posición mundial en la producción de frutos cítricos, produciendo aproximadamente 5,4 millones de toneladas en el año 2005 y siendo el mayor exportador mundial de frutos para el consumo en fresco (FAO, 2007). La región española de mayor producción es la Comunidad Valenciana, que genera más de la mitad del producto nacional. Las naranjas del grupo 'Navel' son las de mayor producción, constituyendo un 33 % de los cítricos valencianos (MAPYA, 2007). Las infecciones fúngicas son una de las principales causas de las pérdidas que se producen durante la postcosecha. Aunque estas pérdidas son difíciles de valorar, se estiman entre un 3 y un 6 % de todo el producto manejado en las centrales hortofrutícolas (Tuset, 1987; Perucho y Tuset, 2001), siendo superiores si las condiciones de recolección, confección y comercialización no son las adecuadas. Las especies de hongos que más incidencia tienen durante la postcosecha de cítricos en España son *Penicillium digitatum*, causante de la podredumbre verde, y *Penicillium italicum*, responsable de la podredumbre azul, que pueden producir entre el 60 y el 80 % de los podridos, según el estado del fruto antes de la conservación y las condiciones de almacenamiento. Otras especies como *Alternaria citri*, *Cladosporium herbarum*, *Phytophthora citrophthora*, *Geotrichum candidum*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Rhizopus stolonifer* pueden originar graves pérdidas ocasionalmente.

El control de los principales patógenos postcosecha de los frutos cítricos se realiza mediante el empleo de fungicidas sintéticos, como orto-fenilfenato sódico, tiabendazol, imazalil o guazatina. Además, otras medidas preventivas que pueden ayudar a disminuir las cantidades de fungicidas aplicadas se centran en la higiene, que reduce la cantidad de inóculo en la superficie del fruto, la eliminación de la infección incipiente o de los propágulos y la protección de la superficie del fruto mediante ceras (Eckert y Ogawa, 1985). Sin embargo, la práctica totalidad de los frutos son sometidos a algún tratamiento con fungicidas durante la postcosecha. El uso continuo de un número reducido de productos químicos conlleva un riesgo elevado de aparición de cepas resistentes (Bus, 1992). Además, los fungicidas empleados poseen un espectro de acción muy limitado. Este conjunto de factores, junto con la creación de una legislación muy estricta con respecto a los residuos tóxicos presentes en los productos hortofrutícolas, los problemas medioambientales que estos generan y la concienciación de los ciudadanos en cuanto a la salud y al medioambiente se refiere, hace necesario el desarrollo de nuevas alternativas de control al uso de los fungicidas que alcancen niveles de

control comparables a los que se obtienen con la aplicación de los productos químicos.

Desde hace algunos años se han investigado diversos tratamientos alternativos al empleo de los fungicidas, ya sean físicos, químicos o biológicos, para poder controlar las enfermedades postcosecha de frutas y verduras. Entre los primeros se encuentra la aplicación de calor que ha resultado efectiva en los frutos cítricos (Lurie, 1998), bien mediante baños con agua caliente o mediante el almacenamiento en cámaras con temperatura y humedad relativa (RH) elevadas. Los tratamientos térmicos pueden actuar directamente sobre el patógeno afectando la elongación del tubo germinativo o inactivando la germinación de las esporas (Schirra y col., 2000). Asimismo, se ha comprobado que el calor puede activar diversos mecanismos de defensa en los cítricos como son la inducción de proteínas de defensa o de compuestos antifúngicos (Pavoncello y col., 2001). Otro método físico estudiado en frutos cítricos es la aplicación de luz UV. Este tratamiento es beneficioso debido a su acción germicida y, por otro lado, a que induce respuestas de defensa en los frutos, entre las que destacan la síntesis de fitoalexinas (Kim y col., 1991; Rodov y col., 1992). Sin embargo, la dosis necesaria para desencadenar la máxima resistencia puede provocar daños al fruto (Ben Yehoshua y col., 1992) y, además, dosis superiores o inferiores a la óptima no proporcionan una reducción significativa de la infección (Droby y col., 1993). Entre los tratamientos químicos se ha investigado la adición de aditivos alimentarios, entre los que se encuentran sales inorgánicas como bicarbonato sódico, carbonato sódico o cloruro de calcio (Smilanick y col., 1999; Palou y col., 2001). Al igual que con la luz UV, el empleo de elevadas dosis de estos productos puede dar lugar a la aparición de daños en la corteza de los frutos. Una aproximación novedosa es la identificación y caracterización de pequeños péptidos sintéticos antimicrobianos que presentan actividad antifúngica *in vitro* frente a diversos patógenos de cítricos (López-García y col., 2000).

En cuanto a los tratamientos biológicos empleados durante la postcosecha de los frutos cítricos, destaca la aplicación de microorganismos que se encuentran en la superficie de los frutos y que pueden actuar como antagonistas frente a patógenos. En condiciones de laboratorio se han identificado diversos organismos capaces de reducir el número de podridos (Hofstein y col., 1994). Esta línea de investigación ha conducido a la comercialización de agentes biológicos para el control de infecciones en postcosecha. Entre ellos se encuentra la levadura *Candida oleophila*,

comercializada bajo el nombre de ‘Aspire’ y recientemente denominada Decco I-182 (Ecogen Corp., Langhorne, PA) (Hofstein y col., 1994; Droby y col., 1998) y otro basado en diversas cepas de *Pseudomonas syringae*, comercializados con el nombre global de ‘BioSave’ (EcoScience Corp., Orlando, FL) (Janisiewicz y Marchi, 1992; Janisiewicz y Jeffers, 1997). También se comercializa Yield Plus (Anchor Bio-Technologies, Cape Town, South Africa), basado en la levadura *Cryptococcus albidus* (Fan y Tian, 2001) y el producto Shemer (Agrogreen, Israel), basado en la levadura *Metschnikowia fructicola* (Kurtzman y Droby, 2001). Además, se ha demostrado el efecto de *Candida sake* (Teixidó y col., 1998; Abadías y col., 2003) y *Pantoea agglomerans* (Poppe y col., 2003; Plaza y col., 2004; Francés y col., 2006; Torres y col., 2007) en la reducción de infecciones durante la postcosecha en cítricos. Entre los mecanismos de acción de los agentes de biocontrol se ha propuesto la competición por el espacio y los nutrientes, el micoparasitismo, la antibiosis, la inducción de resistencia y la producción de enzimas líticas de pared celular (Arras, 1996; Bonaterra y col., 2003; El-Ghaouth y col., 2003; Poppe y col., 2003). La acción de estos microorganismos puede potenciarse si éstos son aplicados junto con algunos métodos físicos o químicos como tratamientos térmicos y sales inorgánicas (Obagwu y Korsten, 2003; Plaza y col., 2004; Mari y col., 2007).

A pesar de los estudios llevados a cabo, todavía no se conocen con exactitud los mecanismos de defensa de los frutos cítricos frente al ataque por patógenos. Por ello, en esta investigación se pretende profundizar en las bases fisiológicas y moleculares de la inducción de resistencia de los frutos cítricos frente a la infección por *P. digitatum*. Teniendo en cuenta resultados previos del laboratorio y de otros grupos, se profundizará en la posible implicación del metabolismo de fenilpropanoides en la inducción de resistencia y las respuestas de defensa de los cítricos frente a la infección por *P. digitatum*.

1. INTERACCIÓN PLANTA-PATÓGENO

Las plantas están en permanente contacto con multitud de microorganismos que se encuentran en el ambiente. Sin embargo, en la mayor parte de los casos, éstos no consiguen colonizar el huésped. Por ello, la enfermedad no es un hecho generalizado en la interacción planta-patógeno (Ferreira y col., 2006). En algunos casos tiene lugar una resistencia ‘general’, denominada también ‘no específica’, ‘horizontal’ o ‘no-huésped’ (‘non-host resistance’), por la cual el patógeno es incapaz de reconocer e infectar a la

planta o la planta posee la habilidad de activar rápida y eficazmente los mecanismos de defensa, consiguiendo una protección y un fenotipo de resistencia (Nürberger y Lipka, 2005). En este tipo de resistencia la planta es resistente frente a todas las razas del patógeno. Se denomina también resistencia poligénica ya que está controlada por diversos genes. Recientemente la resistencia ‘no-huésped’ ha sido clasificada en dos tipos (Mysore y Ryu, 2004). En la resistencia tipo I no se observan síntomas visibles como la necrosis de las células. En este caso el patógeno no es capaz de superar las barreras preformadas de la planta ni los mecanismos de defensa de la misma. La segunda resistencia ‘no-huésped’ se denomina tipo II y está asociada a una respuesta rápida que origina una necrosis localizada. En este tipo de resistencia, el patógeno penetra en la planta pero ésta activa las reacciones de defensa que conducen a la respuesta hipersensible (HR) con la que el huésped consigue detener el avance del patógeno. En otros casos tiene lugar la resistencia ‘vertical’ o ‘específica’, por la cual la planta solamente es resistente frente a diversas razas del patógeno. Esta resistencia se basa en un reconocimiento activo entre el producto obtenido a partir de un gen de avirulencia (*avr*) en el patógeno y el correspondiente producto de un gen de resistencia (*R*) en la planta (resistencia gen a gen, ‘gene-for-gene resistance’) (Flor, 1971; Yang y col., 1997; Boller y Keen, 2001). Cuando se produce este reconocimiento, el patógeno no consigue infectar a la planta, determinando lo que se conoce como ‘interacción incompatible’. En aquellos casos en los que el patógeno consigue penetrar en el huésped y desarrolla la infección tiene lugar una ‘interacción compatible’. La diferencia entre que tenga lugar la resistencia o la susceptibilidad está relacionada con el tiempo de reconocimiento del patógeno invasor y de la rapidez y efectividad en la activación de los mecanismos de defensa por parte de la planta (Hammond-Kosack y Jones, 1996; Nimchuk y col., 2003; Tao y col., 2003).

1.1. Interacción incompatible

En la interacción incompatible, el patógeno no es capaz de infectar la planta por diversos motivos:

- La planta no posee las condiciones necesarias para que el patógeno se desarrolle, o éste es incapaz de reconocer al huésped (resistencia ‘no-huésped’).
- La planta posee barreras estructurales preformadas que imposibilitan la entrada del patógeno (Moerschbacher y Mendgen, 2001), actuando

generalmente a nivel de reconocimiento del patógeno o impidiendo la penetración primaria del mismo. Algunas de estas barreras físicas incluyen la cantidad y calidad de la cera y la cutícula que recubre las células epidérmicas, la estructura de la pared celular y el tamaño, localización y forma de los estomas. En cuanto a las barreras químicas preformadas, conocidas generalmente como fitoanticipinas, las plantas poseen diversos compuestos fenólicos, taninos y compuestos derivados de los ácidos grasos que podrían actuar como mecanismos de defensa frente al ataque por patógenos. Algunos de estos compuestos actúan como exudados e impiden la germinación de las esporas fúngicas. Asimismo, la superficie de las células posee diversas enzimas como glucanasas y quitinasas que actúan degradando las paredes celulares del patógeno (Agrios, 1997).

- Por último, la planta puede reconocer al patógeno, bien mediante el reconocimiento del producto obtenido a partir de un gen *avr* del patógeno por el correspondiente producto de un gen *R* de la planta, o bien mediante el reconocimiento de elicitores del patógeno, que incluyen sustancias típicamente asociadas con el metabolismo basal microbiano como glucanos de la pared celular, oligómeros de quitina, ácidos grasos, esteroides y glicopéptidos; en general, compuestos formados por el organismo invasor que son reconocidos por el huésped. A este conjunto de elicitores se les denomina patrones moleculares asociados al patógeno (PAMPs: 'pathogen-associated molecular patterns') (Nürberger y col., 2004). La percepción de estos elicitores se realiza mediante ciertos receptores de alta afinidad que se encuentran en la superficie de las plantas, desencadenando una cascada de señales intracelulares que resulta en la transcripción coordinada de gran cantidad de genes de respuesta de defensa.

1.2. Mecanismos de defensa en las plantas

Cuando se produce la interacción primaria entre el elicitador producido por el patógeno y el receptor de la planta o entre el producto del gen *avr* y el producto del gen *R* en la planta, se desencadena una serie de respuestas iniciales encaminadas a detener la entrada y/o avance del patógeno (Figura 1). Estos mecanismos de defensa activados en las plantas actúan primeramente en el punto de inoculación del patógeno y en las células adyacentes. En ciertos casos, estas respuestas de defensa pueden alcanzar a otras partes de las plantas conduciendo a una respuesta sistémica adquirida (SAR) que confiere resistencia frente a un amplio rango de patógenos (Durrant y Dong, 2004).

Entre las primeras respuestas de defensa locales de la planta se encuentran la activación de protein-quinasas y fosfatasas y cambios en la permeabilidad de la membrana y en la concentración de iones intracelulares (Hammond-Kosack y Jones, 2000; Zhao y col., 2005). En la célula tiene lugar la entrada de iones Ca^{2+} , la salida de iones Cl^- y el intercambio K^+/H^+ . Así, junto con la formación y entrada de iones H^+ se produce una disminución del pH intracelular y una alcalinización extracelular.

En los primeros estadios del ataque del patógeno se produce también una rápida activación de especies activas de oxígeno (AOS) como los radicales superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), hidroxilo (OH^{\cdot}) o el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), dando lugar a lo que se conoce como explosión oxidativa ('oxidative burst') (Mehdy, 1994; Wojtaszek, 1997; De Gara y col., 2003). La generación de radicales superóxido a partir del oxígeno (O_2) generalmente está relacionada con la activación del complejo enzimático NADPH oxidasa que se encuentra en la membrana plasmática de las células del huésped. El $\text{O}_2^{\cdot-}$ se dismuta rápidamente dando lugar a la formación de H_2O_2 y O_2 en una reacción catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD). El H_2O_2 puede atravesar fácilmente la membrana plasmática y penetrar en la célula. El H_2O_2 es tóxico directamente sobre el patógeno y, además, puede favorecer el refuerzo de la pared celular haciéndola más resistente a la penetración y degradación enzimática por parte del patógeno, bien uniendo glicoproteínas ricas en prolina e hidroxiprolina (HRGPs: 'hydroxyproline-rich glycoproteins') o incrementando la formación de compuestos fenólicos como ligninas y suberinas por acción de la peroxidasa (POX). El H_2O_2 generado durante la explosión oxidativa puede eliminarse por distintas vías. Así, el H_2O_2 se desdobla en H_2O y O_2 en una reacción catalizada por la catalasa (CAT), o mediante la ascorbato peroxidasa (APX) actuando en el ciclo de Halliwell-Asada junto con la deshidroascorbato reductasa y la glutatión reductasa (GR).

El óxido nítrico (NO) es una molécula señalizadora que en vertebrados regula diversos procesos biológicos como el sistema inmune, nervioso y vascular. En las plantas, el NO participa en la interacción planta-patógeno tanto en la SAR como en la SAR. Esta molécula potencia la acción de las AOS ya que inhibe la acción de la CAT y la APX promoviendo la HR (Delledonne y col., 1998). Además, el NO está implicado en la activación de protein-quinasas y en la inducción de genes de defensa (Hancock y col., 2002). Por ello, se ha observado una relación directa entre el NO y la resistencia a la enfermedad provocada por patógenos biotrofos. Sin embargo, aún es necesario esclarecer

su implicación en la defensa frente a patógenos necrotrofos (Romero-Puertas y col., 2004).

Entre las primeras respuestas de defensa también se encuentran la acumulación de callosa (polímero de glucano) y ligninas (polímero complejo de compuestos fenólicos) en la pared celular para impedir la entrada del patógeno. Asimismo, la deposición extracelular de HRGPs mediada por la acción del H_2O_2 contribuye también a este reforzamiento celular. Otra clase de proteínas de defensa extracelulares son las proteínas que inhiben las poligalacturonasas (PGIPs: 'polygalacturonase-inhibiting proteins') producidas por los hongos necrotrofos encargadas de degradar la pared celular de las plantas.

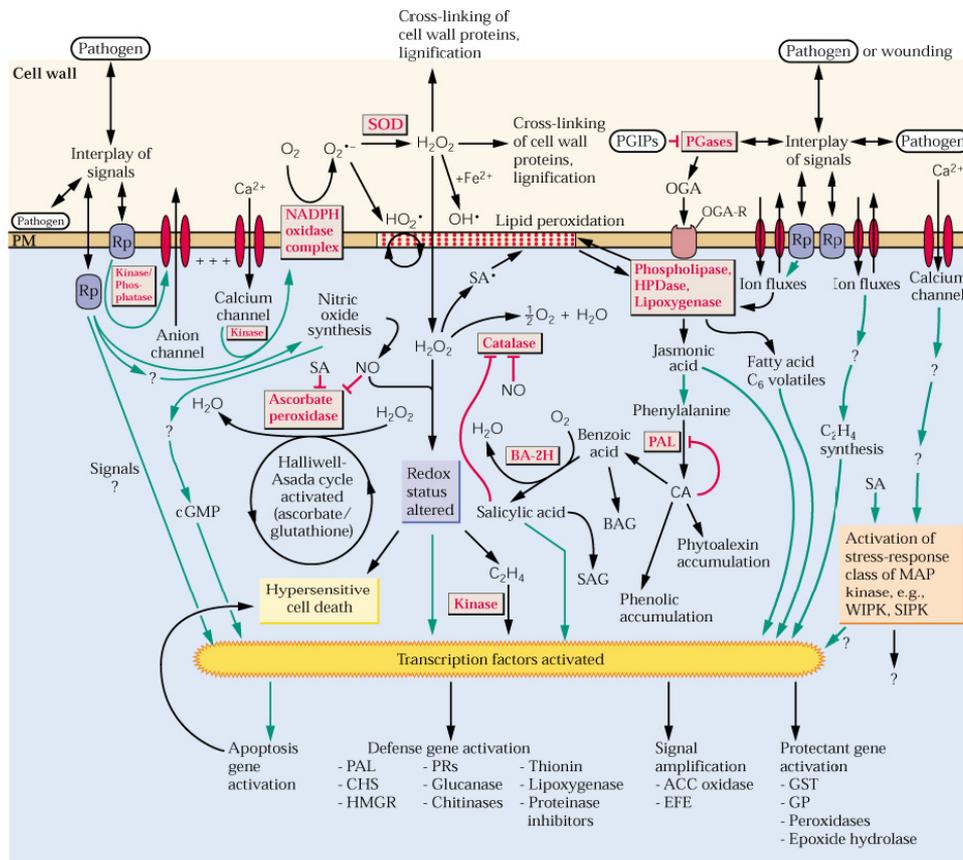


Figura 1. Esquema de la activación y coordinación de las rutas de transducción de señales en las respuestas de defensa de la planta frente a patógenos (Hammond-Kosack y Jones, 2000).

La producción de AOS es, junto con otros mecanismos de defensa, necesaria para activar la muerte celular inducida del huésped en la zona de infección del patógeno, conocida como respuesta hipersensible (HR). La HR limita el crecimiento del patógeno y, por ello, da lugar a una resistencia por parte de la planta. Este hecho es cierto en el caso de los hongos biotrofos como *Peronospora* sp. o *Erysiphe* sp., los cuales necesitan las células de la planta vivas para desarrollar su ciclo biológico. Sin embargo, los hongos necrotrofos como *Botrytis* sp., *Alternaria* sp. o *Penicillium* sp. obtienen los nutrientes del tejido muerto (Glazebrook, 2005). Por ello, generalmente la HR no siempre es efectiva frente al ataque por este tipo de hongos y, en algunos casos, puede facilitar la invasión de los mismos (Govrin y Levine, 2000). La activación de la HR incluye gran cantidad de respuestas rápidas de la célula. Además de las ya descritas, también tiene lugar una activación transcripcional de genes de defensa mediante la fosforilación/desfosforilación de proteínas mediante MAPKs ('mitogen-activated protein kinases'). Esta señalización génica da lugar, entre otras, a la activación de diversas rutas metabólicas y a la síntesis de diversas proteínas.

Mediante la activación de los factores de transcripción que tiene lugar durante el ataque del patógeno, se produce una acumulación de proteínas relacionadas con la patogénesis (proteínas PR: 'pathogenesis-related proteins'). Éstas son proteínas intra y extracelulares codificadas por la planta e inducidas por diversos estreses que juegan un papel muy importante en la respuesta de defensa de las plantas (van Loon y col., 2006). Las familias de las proteínas PR se clasifican atendiendo a sus propiedades físicas y biológicas. Entre ellas se encuentran POXs, taumatinas, proteínas inhibidoras de proteinasas, tioninas, proteínas transportadoras de lípidos (LTPs: 'lipid-transfer proteins') y defensinas. Las β -1,3-glucanasas (PR-2) actúan de dos formas: directamente degradando la pared celular de los hongos, o indirectamente liberando oligosacáridos que pueden actuar como elicitores en mecanismos de defensa (Leubner-Metzger y Meins, 1999). Entre las PRs también existen diversas quitinasas, pertenecientes a las familias PR-3, PR-4, PR-8 y PR-11 (Neuhaus, 1999). Estas proteínas poseen actividad antimicrobiana ya que degradan la quitina, compuesto mayoritario de la pared celular de los hongos.

La activación de genes de defensa también se ha relacionado con una alteración de rutas del metabolismo secundario. Entre ellas, el metabolismo de fenilpropanoides sufre modificaciones en respuesta al ataque de patógenos, aunque también en respuesta a heridas, luz UV y bajas temperaturas (Dixon y

Paiva, 1995). Los fenilpropanoides derivan del ácido cinámico, que se forma a partir de fenilalanina en una reacción catalizada por la L-fenilalanina amoniliasa (PAL), enzima que es el punto de unión entre el metabolismo primario (ruta del siquimato) y secundario (ruta de fenilpropanoides). Las relaciones biosintéticas entre cada uno de los compuestos del metabolismo de fenilpropanoides se muestra en la Figura 2. La interrelación entre el metabolismo de fenilpropanoides y las respuestas de defensa frente a la infección por patógenos se ha demostrado en numerosas especies vegetales. Por ejemplo, en plantas mutantes de tabaco que sobreexpresan el gen *PAL* aumenta la concentración de ácido clorogénico y son menos sensibles a la infección por el hongo *Cercospora nicotianae* (Shadle y col., 2003). Asimismo, se ha observado que la exposición de plantas de alfalfa a una raza avirulenta del patógeno fúngico *Colletotrichum trifolii*, da lugar a la producción de diversas fitoalexinas encaminadas a proteger la planta frente a una posterior infección por una raza virulenta. Además, esta respuesta de defensa está acompañada por un aumento en los niveles de expresión de los genes *PAL*, cinamato 4-hidroxilasa (*C4H*) e isoflavona reductasa (*IRL*) e incrementos en la actividad PAL (Saunders y O'Neill, 2004). Ya que el metabolismo de fenilpropanoides se ha relacionado con las respuestas de defensa de las plantas, se está profundizando en el estudio de la regulación génica de esta ruta para poder facilitar el conocimiento de los cambios de expresión de genes concretos y las subsecuentes alteraciones en este metabolismo en respuesta a diversos estreses (Dixon y col., 2002).

En general, los compuestos fenólicos no se encuentran libres en altas concentraciones en la célula, sino que suelen conjugarse con azúcares, ácidos orgánicos y carbohidratos de la pared celular. Entre los compuestos formados a partir del metabolismo de fenilpropanoides se encuentran las ligninas, lignanos y suberinas (en este caso, formando la parte aromática de un polímero complejo), los flavonoides (como antocianinas, taninos e isoflavonoides), y cumarinas, furanocumarinas y estilbenos. Algunos de ellos pueden participar en el refuerzo de la pared celular, como las ligninas y suberinas, o actuar como compuestos directamente tóxicos sobre el patógeno. Las fitoalexinas son compuestos de bajo peso molecular que se acumulan alrededor de la zona de infección o en respuesta a elicitores abióticos (Dixon y Paiva, 1995). En general, estos compuestos son tóxicos e inhiben el crecimiento de microorganismos. El crecimiento de diversos hongos filamentosos y otros microorganismos como bacterias y levaduras se ven afectados por la adición al medio de cultivo de diversas cumarinas como bergapteno, herniarina,

umbeliferona y escopoletina (Ojala y col., 2000). Diversos flavonoides presentes en la soja, como ginesteina, naringenina, isorrammetina y quercetina modifican el desarrollo *in vitro* de *Phytophthora sojae* (Rivera-Vargas y col., 1993).

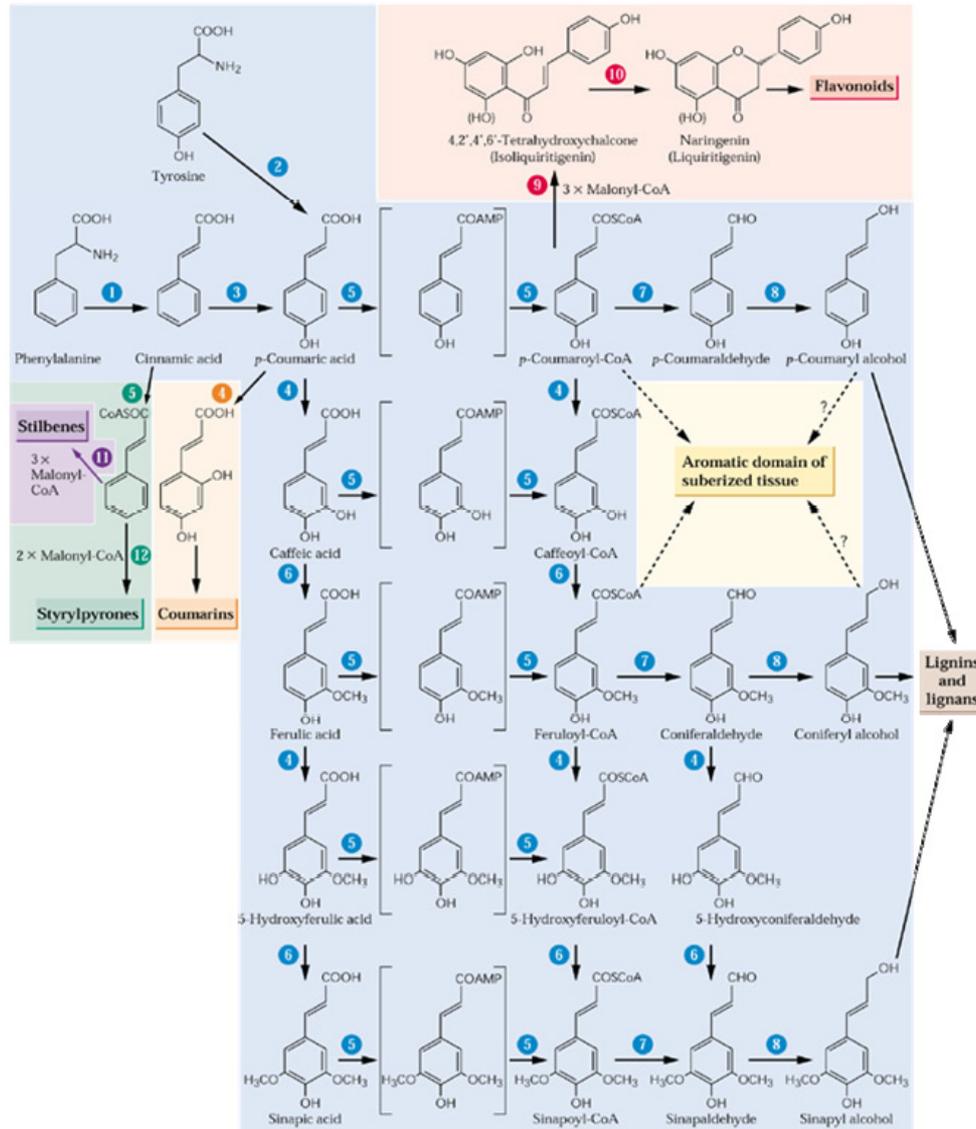


Figura 2. Ruta de fenilpropanoides (Croteau y col., 2000). 1) PAL; 2) PAL (o TAL) encontrado principalmente en hierbas; 3) Cinamato 4-hidroxilasa; 4) Hidroxilasas; 5) CoA ligasas, que participan en la ligación de AMP y CoA; 6) O-metiltransferasas; 7) Cinamil-CoA:NADPH oxidorreductasas; 8) Cinamil alcohol deshidrogenasas; 9) Chalcona sintasa; 10) Chalcona isomerasa; 11) Estilbeno sintasa; 12) Estirilpirona sintasa.

No todas las fitoalexinas proceden del metabolismo de fenilpropanoides como los isoflavonoides o cumarinas, sino que también pueden ser alcaloides o terpenos. Los isoprenoides de las plantas son un grupo muy complejo de compuestos que pueden dividirse en dos clases: los metabolitos primarios, entre los que se incluyen los esteroides, carotenoides y reguladores del crecimiento; y los metabolitos secundarios, entre los que se encuentran los monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos (Chappell, 1995). Los primeros son esenciales para la integridad de la membrana, como fotoprotectores y para el desarrollo de la planta. Sin embargo, los segundos se han relacionado mayoritariamente con la interacción entre la planta y el medioambiente. Así, se ha descrito un incremento en la síntesis de terpenoides concretos en la interacción planta-patógeno, como la risitina y lubimina en patata y el capsidiol y glutinosona en tabaco (Stoessl y col., 1976; Tarchevsky, 2001). Los alcaloides son compuestos nitrogenados, con carácter básico y de origen vegetal. Se clasifican en heterocíclicos y no heterocíclicos. Entre los primeros destacan los alcaloides derivados del triptófano y de la fenilalanina, de terpenos y del ácido nicotínico. Estos compuestos se han empleado ampliamente en medicina por los efectos que tienen sobre el sistema nervioso. Asimismo, se han descrito diversos alcaloides que poseen efecto antimicrobiano. La tomatina, un glicoalcaloide procedente del tomate, reduce el crecimiento *in vitro* de *Saccharomyces cerevisiae* (Simons y col., 2006), mientras que la solanina y la chaconina reducen el desarrollo de *Alternaria brassicicola* y *Rhizoctonia solani*, entre otros, viéndose alterada la efectividad con el pH del medio (Fewell y Roddick, 1993). Además, se ha descrito la inducción de estos compuestos en respuesta al ataque por patógenos. Por ejemplo, se ha descrito que la concentración de cafeína y teobromina en tallos de cacao infectados por el hongo *Crinipellis pernicioso* es mayor que en los no infectados, observándose además una reducción del crecimiento de este patógeno *in vitro* si estos compuestos son adicionados al medio de cultivo (Aneja y Gianfagna, 2001). La concentración de los alcaloides no solo se ve afectada por la interacción planta-patógeno. Aneja y Gianfagna (2001) mostraron que la aplicación exógena de ácido salicílico (SA) en hojas de cacao incrementaba la concentración de cafeína y teobromina.

El SA, el ácido jasmónico (JA) y el etileno son compuestos reguladores de la defensa en plantas. El SA (ácido 2-hidroxibenzoico) puede sintetizarse a partir de la ruta de los fenilpropanoides o también a partir del corismato en la ruta del siquimato (Métraux, 2002). El SA se ha relacionado tradicionalmente con la respuesta de defensa de las plantas frente al ataque por patógenos

(Yalpani y col., 1991). Los incrementos en los niveles de SA suelen estar asociados con un aumento de la expresión de genes que codifican proteínas PR, con la HR y con la ‘resistencia sistémica adquirida’ (SAR). La SAR es una resistencia que tiene lugar en partes distales de la planta en respuesta al ataque por patógenos que penetran por otro punto de la misma (Hammerschmidt, 1999) y es efectiva frente a un amplio espectro de patógenos. El H_2O_2 que ha permeado la pared celular aumenta el potencial redox del interior de la célula. Debido a estas condiciones oxidantes, se activa la enzima benzoato hidroxilasa que produce SA a partir del ácido benzoico (León y col., 1993). El SA inhibe las enzimas CAT y APX que reducen el H_2O_2 a O_2 , por lo que se acumulará H_2O_2 , que cerrará el ciclo aumentando la producción de SA (Sticher y col., 1997). Esta respuesta sistémica se ha relacionado con un aumento en la síntesis de proteínas PR y generalmente está mediada por la acción del SA (Hammerschmidt, 1999; Gozzo, 2003). Estudios recientes sugieren que la molécula señalizadora que viaja por la planta durante la SAR es una molécula lipídica (Durrant y Dong, 2004). Además, se ha observado que la señalización entre plantas adyacentes podría ocurrir mediante la transformación del SA en ácido metil salicílico, que es un compuesto volátil.

Otro tipo de resistencia es la conocida como ‘resistencia sistémica inducida’ (ISR). Algunas especies de rizobacterias son capaces de inducir en la planta una resistencia sistémica que es efectiva frente a un amplio rango de posibles patógenos (van Loon y col., 1998; Pozo y col., 2004). Durante la ISR se observa un incremento en la transcripción de genes y en la acumulación de diversas proteínas de defensa y compuestos que, posteriormente, actuarán frente al patógeno. En este tipo de resistencia que actúa independientemente del SA, los niveles de JA y etileno no aumentan respecto a las plantas en las que no ha tenido lugar la ISR. Sin embargo, se observa un mayor incremento de estos niveles frente al ataque por el patógeno.

Además del SA, otras rutas de señalización relacionadas con la respuesta de defensa en las plantas dependen del JA y del etileno. El aumento en la síntesis de JA tiene lugar en respuesta al ataque por patógenos y en respuesta a la herida y al daño mecánico producido por los insectos (Ryan, 2000). A partir de estudios llevados a cabo en tomate se ha observado que hay una acumulación de un péptido de pequeño tamaño denominado sistemina en respuesta a la herida. Este polipéptido interactúa con los receptores de la pared celular de la planta iniciando una cascada de señales entre las que se incluyen la transformación del ácido linolénico de las membranas celulares en JA. La

sistemina se ha considerado como una molécula señal que se trasloca a otras partes de la planta, mientras que el JA es una respuesta que se localiza en las células iniciales de la infección. Sin embargo, estudios recientes han mostrado que el JA o un derivado del mismo podrían actuar también como moléculas señalizadoras de larga distancia (Ryan y Moura, 2002). La señalización por JA genera un incremento en la expresión de diversos genes de defensa en la planta. No obstante, estos genes de defensa activados mediante este compuesto varían en composición, cantidad y momento de inducción respecto de aquellos activados por SA (Rojo y col., 2003; De Vos y col., 2005). Generalmente, la respuestas de defensa dependientes del JA no están asociadas a la muerte celular de la planta, por lo que podría ser una alternativa de defensa frente a los hongos necrotrofos (McDowell y Dangl, 2000).

El etileno es un gas también relacionado con las respuestas de defensa de las plantas frente al ataque por patógenos y en respuesta a estreses abióticos como la herida o la luz UV (Wang y col., 2002). Además, esta hormona está implicada en el desarrollo y crecimiento de las plantas y en procesos de maduración y senescencia. El etileno se sintetiza a partir de la metionina por vía del S-adenosil-L-metionina (SAM) y del intermediario ácido 1-aminociclopropano 1-carboxílico (ACC) mediante la acción de las enzimas ACC sintasa (ACS) y ACC oxidasa (ACO), respectivamente (Figura 3) (Yang, 1984). Durante la HR se produce un incremento en la producción de etileno como resultado de una interacción incompatible (Hammond-Kosack y Jones, 1996). Sin embargo, el papel del etileno en las respuestas de la planta frente al ataque por patógenos es complejo. Así, se han observado respuestas diferentes, reduciendo o potenciando la infección, dependiendo del microorganismo patógeno que interactúe (Berrocal-Lobo y col., 2002).

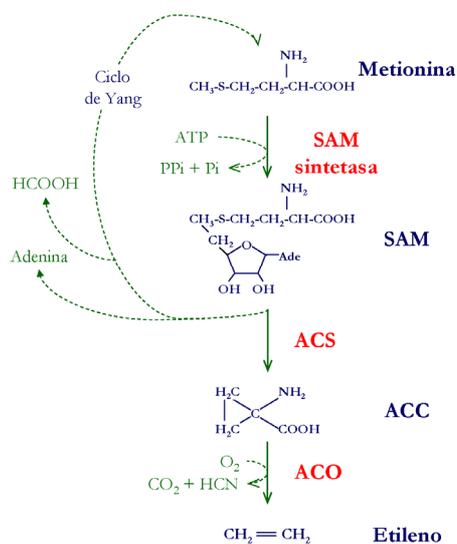


Figura 3. Ruta biosintética del etileno. Abreviaturas: S-adenosil-L-metionina (SAM), ácido 1-aminociclopropano (ACC), ACC sintasa (ACS), ACC oxidasa (ACO).

Muchos estudios avalan la interrelación entre el SA, el JA y el etileno (McDowell y Dangl, 2000; Rojo y col., 2003; Pozo y col., 2004; Glazebrook, 2005). En muchos casos el etileno actúa conjuntamente con el JA para activar la expresión de genes de defensa. Un ejemplo clásico de sinergismo entre ambas hormonas es la expresión del factor de transcripción *ERF1* ('Ethylene response factor') y la inducción de proteínas relacionadas con la defensa, como la defensina antimicrobiana PDF1.2, la quitinasa PR-3, la osmotina y otras (Lorenzo y col., 2003). Sin embargo, se han observado algunas interacciones negativas entre ambas hormonas en respuesta a la herida, entre otros estreses (Pozo y col., 2004). Generalmente, el SA actúa de forma antagónica tanto con el etileno como con el JA. Así, la aplicación de SA bloquea la síntesis de JA en *Arabidopsis* y tomate. Sin embargo, también se han descrito interacciones positivas entre el SA y las otras dos moléculas, JA y etileno (Rojo y col., 2003).

En muchos casos estos compuestos actúan como señales de potenciación de las respuestas de defensa. Esta 'potenciación' o 'priming' ocurre cuando las señales asociadas con una respuesta de defensa afecta positivamente a la magnitud y velocidad de los mecanismos de defensa asociados a otro tipo de señal, como puede ser el ataque por patógenos (Conrath y col., 2002; 2006). Durante esta potenciación no se observa un incremento en la expresión de genes o la acumulación de proteínas de defensa. Sin embargo, la posterior inoculación con el patógeno da lugar a un incremento en magnitud y una mayor rapidez en la respuesta de defensa respecto de una situación en la que no hubiera tenido lugar esa 'potenciación' previa.

Otros compuestos como el ácido abscísico (ABA) y los brasinoesteroides también intervienen en la respuesta de defensa de las plantas. Si bien se ha observado que estos compuestos están más implicados en el desarrollo y crecimiento de la planta, también se ha estudiado su relación en respuesta a diferentes estreses bióticos. Generalmente se ha asociado una mayor susceptibilidad de las plantas a la infección con elevadas concentraciones de ABA. Así, mutantes de tomate que tienen reducida la síntesis de esta hormona son más resistentes al ataque por el hongo necrotrofo *B. cinerea* (Audenaert y col., 2002) o por la bacteria *P. syringae* pv. *tomato* (Mohr y Cahill, 2007; De Torres-Zabala y col., 2007), entre otros. Sin embargo, la aplicación exógena de ABA revierte este hecho e incrementa la susceptibilidad en las plantas control. Además, se ha relacionado una reducción en la expresión de múltiples genes implicados en la defensa y una disminución en la

acumulación de ácido salicílico y ligninas en plantas de tomate tratadas con ABA con un incremento en la susceptibilidad frente al patógeno (Mohr y Cahill, 2007). No obstante, esta hormona también se ha relacionado con un incremento de la resistencia de las plantas al ataque por patógenos ya que se ha observado que el ABA puede interactuar con la deposición de callosa en los puntos de infección (Flors y col., 2005). El papel de los brasinoesteroides en los mecanismos de defensa de las plantas frente a patógenos es poco conocido. No obstante, además de relacionarse con el crecimiento y desarrollo de las plantas, también se ha observado que los brasinoesteroides originan un aumento de la resistencia al ataque por patógenos en plantas de patata, cebada y pepino (Krishna, 2003).

1.3. Tratamientos inductores de resistencia

La aplicación de diversos tratamientos, ya sean químicos, físicos o biológicos, se ha relacionado con la inducción de mecanismos de defensa en las plantas. Estos tratamientos pueden inducir la expresión de genes de defensa y la acumulación de compuestos procedentes del metabolismo secundario (Zhao y col., 2005). La mayor parte de los tratamientos de inducción de resistencia empleados en plantas son de origen químico. La aplicación exógena de SA induce respuestas de defensa en tomate y *A. thaliana* similares a las activadas durante el desarrollo de SAR (Yang y col., 1997). Así, la aplicación de este compuesto incrementa las actividades PAL y POX, el contenido en ligninas y la expresión de genes que codifican proteínas PR como quitinasas, glucanasas y POXs en diferentes plantas, incluyendo tomate, tabaco y *A. thaliana* (Métraux, 2001). Además, la aplicación de SA en concentraciones no tóxicas en plantas susceptibles puede aumentar la resistencia frente a patógenos potenciales (Murphy y col., 2000). La aplicación del producto comercial Bion (BTH: ácido benzo-(1,2,3)-tiadiazol-7-carbotióico S-metil-éster) (Syngenta Crop Protection), que es un análogo funcional del SA, induce respuestas de defensa en las plantas tales como el aumento de la expresión de genes que codifican proteínas PR o la acumulación de compuestos fenólicos (Friedrich y col., 1996; Hukkanen y col., 2007). En algunos casos, se ha observado que esta aplicación induce una resistencia sistémica frente a un amplio espectro de patógenos, incluyendo *P. parasitica* y *P. syringae* en tomate y *A. thaliana* (Gozzo, 2003) o *Phytophthora* sp. y *Sphaerotheca* sp. en plantas de fresa (Hukkanen y col., 2007).

Diversos autores han estudiado el efecto de la aplicación exógena de jasmonatos en el nivel de resistencia en plantas. Generalmente, el JA se aplica como jasmonato de metilo (MeJA) y esta aplicación aumenta la expresión de

genes relacionados con la defensa de las plantas e incrementa la acumulación de metabolitos secundarios (Pozo y col., 2004). En plantas de patata y tomate se ha comprobado que la aplicación de JA y MeJA induce defensas locales y sistémicas frente al hongo *Phytophthora infestans* (Cohen y col., 1993). Asimismo, la aplicación de JA ha sido efectiva en la inducción de resistencia frente a hongos necrotrofos como *B. cinerea* y *A. brassicicola* en *A. thaliana* (Thomma y col., 2000).

En respuesta a la aplicación del ácido DL-3-aminobutírico (BABA) se ha observado una inducción de resistencia en diversas interacciones planta-patógeno, incluyendo plantas como solanáceas y cucurbitáceas frente a distintos patógenos como hongos y bacterias (Cohen, 2002; Belhadj y col., 2006). Además, la adición de este compuesto provoca en la planta una deposición de callosa y/o una acumulación de ligninas, proteínas PR y de fitoalexinas como cumarinas, hechos que estarían relacionados con una menor susceptibilidad de las plantas a la infección por patógenos (Cohen, 2001; Ton y Mauch-Mani, 2004).

Otro producto empleado, conocido comercialmente como Messenger® (Eden Bioscience Corp.), procede de la proteína harpin, que es el primer elicitor de HR bacteriano caracterizado aislado de *Erwinia amylovora* (Wei y col., 1992). Este producto se emplea para favorecer el crecimiento en plantas y, además, se ha observado que induce resistencia frente a un amplio rango de patógenos. Así, este elicitor da lugar a una resistencia sistémica frente a *P. parasitica* y *P. syringae*, acompañado de una inducción de genes *PR-1* y *PR-2* en plantas de tomate (Dong y col., 1999).

La aplicación exógena de etileno se ha relacionado con una modificación en la actividad PAL y en la acumulación de proteínas PR como β -1,3-glucanasas y quitinasas (Yang y col., 1997). Así, el pretratamiento con etileno reduce la susceptibilidad en plantas de tomate posteriormente inoculadas con *B. cinerea*, mientras que el pretratamiento con 1-metilciclopropeno (1-MCP, inhibidor de la percepción de esta hormona) incrementa la infección de las mismas (Díaz y col., 2002). Este hecho se ha relacionado con un aumento en la expresión de genes relacionados con la patogénesis en respuesta al tratamiento con etileno previo a la infección por el patógeno. Se ha observado, además, que la aplicación de SA junto con etileno incrementa notablemente la expresión de genes que codifican β -1,3-glucanasa, *PR-1* y *ACO* en tomate, comparada con la inducción que mostraron estos genes si los compuestos se aplicaban independientemente (Díaz y col., 2002).

Entre los tratamientos biológicos, se ha estudiado la aplicación de agentes de biocontrol con el fin de activar los mecanismos de defensa e incrementar la resistencia de las plantas frente a una infección posterior (Alabouvette y col., 2006). Como se ha comentado, los mecanismos de acción de estos agentes son diversos. Entre estos modos de acción se ha propuesto la inducción de resistencia en las plantas. Este hecho se puso de manifiesto mediante el empleo de rizobacterias, que son capaces de inducir en la planta una resistencia sistémica (ISR) que es efectiva frente a un amplio rango de patógenos (van Loon y col., 1998). En algunos casos, esta acción de biocontrol se ha correlacionado con un incremento en las actividades quitinasa y β -1,3-glucanasa (Fuchs y col., 1997).

Gran parte de estos tratamientos inductores de resistencia también pueden ser empleados durante la postcosecha de frutas y verduras (Terry y Joyce, 2004). La aplicación de SA y BTH reduce la incidencia de la infección causada por *Alternaria* sp. y *P. expansum* en frutos de pepita y de hueso (Liu y col., 2005; Tian y col., 2006). Además, estos tratamientos inducen las actividades PAL, POX y β -1,3-glucanasa, así como los niveles de compuestos fenólicos en estos frutos. Yao y Tian (2005a) han observado que la aplicación de MeJA reduce la incidencia de una infección causada por *Monilinia fructicola* y *P. expansum* en melocotones, siendo este efecto mayor si se aplica conjuntamente con un agente de biocontrol. Esta resistencia a la enfermedad se ha relacionado con un incremento en las actividades PAL, POX, quitinasa y β -1,3-glucanasa.

Los tratamientos físicos se utilizan, principalmente, como sistemas desinfectantes ya que pueden eliminar las esporas e infecciones incipientes. Sin embargo, estos tratamientos también pueden inducir mecanismos de defensa en los frutos. Los tratamientos térmicos se han empleado ampliamente durante la postcosecha para reducir la incidencia de podridos y, en algunos casos, para inducir mecanismos de defensa en los frutos (Lurie, 1998; Schirra y col., 2000). Así, un lavado rápido con agua caliente a 55 °C mejora la apariencia, reduce la incidencia de infecciones fúngicas e incrementa la firmeza de los pimientos (Fallik y col., 1999), hecho relacionado con una reorganización o recristalización de las ceras que recubren el fruto. Además de los baños con agua caliente, también se ha empleado el aire a temperaturas elevadas. Así, el tratamiento de calor de 3 d a 38 °C incrementa la resistencia de tomates maduros frente a una infección posterior por *B. cinerea* (Lurie y col., 1997). Este hecho se ha correlacionado con un aumento en la actividad POX inducida por

el tratamiento térmico. Otro tratamiento físico es el empleo de luz UV, cuya acción se ha relacionado con una inducción de respuestas de defensa en el fruto, dando lugar a una reducción de las podredumbres. Así, se ha observado una inducción de resistencia frente a *B. cinerea* en zanahorias y fresas previamente irradiadas. Además, la aplicación de luz UV incrementa la concentración de la fitoalexina 6-metoximeleina en las zonas irradiadas de las zanahorias y aumenta la actividad PAL en fresas (Mercier y col., 2000; Nigro y col., 2000).

Durante la postcosecha de los frutos se pueden emplear diversos agentes de biocontrol, además de los productos comerciales comentados anteriormente. La aplicación de estos agentes de biocontrol, además de reducir la incidencia de una infección, en algunos casos se ha observado una activación de los mecanismos de defensa en el fruto. Así, la adición de *Cryptococcus laurentii* o *Aureobasidium pullulans* reduce la incidencia de una infección posterior causada por *Alternaria alternata*, *B. cinerea* o *P. expansum* en frutos de pepita durante la postcosecha y, además, la aplicación de estos agentes de biocontrol incrementa diversas actividades enzimáticas como PAL, POX, β -1,3-glucanasa, quitinasa y polifenoloxidasa (Ippolito y col., 2000; Tian y col., 2006). Además, la aplicación conjunta de estos agentes de biocontrol con diversos compuestos químicos puede tener un efecto sinérgico reduciendo la incidencia de la infección (El-Ghaouth y col., 2000; Qin y col., 2003; Yao y Tian, 2005a; Yu y Zheng, 2006; Conway y col., 2007). Así, la aplicación del agente de biocontrol *Rhodotorula glutinis* reduce la incidencia de las infecciones causadas por *P. expansum* o *A. alternata* en cerezas (Qin y col., 2003). Sin embargo, la combinación de este agente de biocontrol con SA incrementa el control de estos patógenos fúngicos en mayor proporción que si se aplican independientemente. El mecanismo por el cual el SA potencia la acción del agente de biocontrol se ha relacionado con la capacidad de este compuesto de incrementar las respuestas de defensa en el fruto, incluyendo las actividades polifenoloxidasa, PAL y β -1,3-glucanasa. Datos similares obtuvieron Yu y Zheng (2006), que observaron que la aplicación de SA potencia la acción de biocontrol de *C. laurentii* controlando la infección causada por *P. expansum* en manzanas y esta aplicación conjunta incrementa las actividades PAL, POX y lipoxigenasa (LOX) en mayor proporción que si estos tratamientos se aplican independientemente.

2. RESPUESTAS DE LOS FRUTOS CÍTRICOS FRENTE AL ATAQUE POR PATÓGENOS DURANTE LA POSTCOSECHA: MECANISMOS DE DEFENSA E INDUCCIÓN DE RESISTENCIA

2.1. Interacción frutos cítricos-patógenos fúngicos

Los frutos cítricos se encuentran rodeados de numerosos potenciales patógenos que, en la mayor parte de los casos, no desarrollan una infección. Sin embargo, cuando estos patógenos consiguen penetrar en los frutos e infectarlos, causan numerosas pérdidas económicas. Entre los hongos que pueden causar podridos durante la postcosecha de los frutos cítricos en España cabe destacar los hongos del género *Penicillium*, *P. digitatum* y *P. italicum*, mientras que en otras regiones productoras con un clima más tropical también alcanzan relevancia las infecciones provocadas por hongos de los géneros *Diplodia* sp., *Diaporthe* sp. y *Colletotrichum* sp. (Ritenour y col., 2003). Los hongos del género *Penicillium* son necrotrofos y necesitan la presencia de una herida o una abertura en la corteza del fruto para poder iniciar la infección (Kavanagh y Wood, 1967). La profundidad de las heridas es un factor determinante en la resistencia/susceptibilidad de los frutos cítricos a la infección por estos hongos. Así, cuanto mayor es la profundidad de las heridas, mayor es la infección causada por estos patógenos. Kavanagh y Wood (1967) mostraron que las heridas de menos de 2 mm de profundidad no favorecen el desarrollo de *P. digitatum* ya que esta profundidad es menor que el espesor del flavedo (parte externa coloreada del fruto), de aproximadamente 1,5 mm. Estos autores sugirieron que el flavedo es un tejido resistente mientras que el albedo (parte interna de la corteza de los frutos cítricos, de color blanquecina y con amplios espacios intercelulares) es más susceptible a la infección por este patógeno ya que cuando las heridas alcanzan el tejido interno, el hongo se desarrolla con mayor facilidad. Este hecho también fue observado por Ballester y col. (2006) que, mediante el empleo de sondas específicas de *Citrus sinensis* y *P. digitatum*, pudieron determinar la cantidad de rRNA de cada organismo en tejidos con diferente grado de colonización. Así, observaron que *P. digitatum* coloniza el tejido de albedo con mayor rapidez que el flavedo, sugiriendo una menor resistencia del tejido interno al avance de la infección. La cicatrización de las heridas también está implicada en la mayor o menor susceptibilidad de los frutos a la infección por patógenos. La herida practicada en la corteza de los frutos cítricos da lugar a una acumulación de compuestos, que se favorece con el almacenamiento de los frutos a alta RH y alcanza un máximo a las 72 h después de haber realizado la herida (Brown y col., 1978). Dicho incremento

en ligninas y compuestos fenólicos en el flavedo se relacionó con un menor porcentaje de infección de naranjas inoculadas con *P. digitatum*. Respecto al compuesto que se acumula en los tejidos adyacentes a la infección, se ha observado que hay una acumulación de material reactivo con fluoroglucinol en pomelos heridos e inoculados con *P. digitatum* (Lai y col., 2003). Estos autores sugieren que el material que se acumula en la zona de la herida no es lignina, sino suberina.

La mayor resistencia del tejido externo ha sido clásicamente asociada con una mayor concentración de compuestos antifúngicos (Rodov y col., 1995). Estos autores comprobaron en limones inmaduros que el desarrollo de la infección era menor cuando la inoculación se realizaba en las glándulas de aceite que cuando se realizaba entre ellas. Sin embargo, en limones maduros la incidencia fue mayor cuando la herida se realizaba en estas glándulas. En este estudio se observó que los aceites esenciales de limones inmaduros tenían una concentración elevada de compuestos antifúngicos, disminuyendo con el estado de maduración del fruto. Entre este material antifúngico preformado estaba el citral y las cumarinas o furanocumarinas limetina, isopimpinolina y 5-geranoxi-7-metoxicumarina. Estos compuestos preformados, conocidos como fitoanticipinas, actúan como primera línea de defensa frente al ataque de potenciales patógenos. Se ha observado que algunos de estos compuestos reducen el crecimiento de diversos patógenos *in vitro*. Así, el vapor de citral reduce el desarrollo de *P. digitatum*, *P. italicum* y *G. candidum in vitro* (Wuryatmo y col., 2003). Incluso la aplicación de citral después de la inoculación con el patógeno reduce la incidencia de la enfermedad por *P. digitatum* en limones (Ben Yehoshua y col., 1992). En los aceites esenciales también hay compuestos tipo isoprenoides y se ha observado que existe una correlación positiva entre el contenido en monoterpenos, con excepción del limoneno que representa aproximadamente el 90 %, y en sesquiterpenos de los frutos cítricos con la inhibición del desarrollo de *P. digitatum* (Caccioni y col., 1998).

Los cítricos pueden producir compuestos *de novo*, conocidos como fitoalexinas, cuya síntesis puede ser inducida en respuesta a patógenos. Entre estas sustancias destaca la umbeliferona (7-hidroxycumarina), que se acumula en el albedo de pomelos inmaduros infectados por *P. digitatum* (Afek y col., 1999). La concentración observada en este tejido inmaduro infectado era suficiente para inhibir el desarrollo del patógeno, según se confirmó con ensayos realizados *in vitro*. Sin embargo, los niveles de umbeliferona detectados en el albedo de frutos maduros fueron menores, e insuficientes para detener la

infección. Así, la capacidad del albedo para sintetizar este compuesto depende del estado de maduración del fruto, por lo que la maduración influye en la susceptibilidad de los frutos cítricos a una infección por *P. digitatum* (Kavanagh y Wood, 1967). En ensayos realizados *in vitro* se ha observado que esta cumarina también reduce el crecimiento de otros patógenos como *P. italicum*, *P. citrophthora*, *B. cinerea* y *A. alternata* (Afek y col., 1999), mientras que no inhibe el crecimiento de diversas bacterias y levaduras (Stanley y Jurd, 1971). La escoparona es otra fitoalexina que se detecta en el flavedo de limones inoculados con *P. digitatum*, mientras que no se detecta en frutos sanos (Kim y col., 1991). Sin embargo, esta concentración fue mayor en frutos infectados y posteriormente sometidos a un tratamiento de calor, como se comentará más adelante. La escoparona, la escopoletina y la 7-geranoxicumarina reducen el crecimiento *in vitro* de *P. digitatum* y, además, a medida que aumenta la concentración de estos compuestos disminuye el porcentaje de heridas infectadas por este patógeno en pomelos (Angioni y col., 1998).

La infección por *P. digitatum* aumenta la actividad de proteínas PR como quitinasas, glucanasas y POXs en el flavedo de frutos cítricos (Fajardo y col., 1998). Además, la expresión de genes que codifican quitinasas y β -1,3-glucanasas se altera en respuesta a una infección por *P. digitatum* en pomelos (McCollum, 2000; Porat y col., 2002). En ambos casos la acumulación más alta de los transcritos se observa en la zona adyacente al punto de inoculación. Sin embargo, las diferencias de expresión entre el tejido sano e infectado son menores en el gen que codifica una quitinasa que en el de la glucanasa.

En cuanto a la implicación de las enzimas del estrés oxidativo en respuesta a la infección por patógenos, se ha observado que, en general, la actividad CAT, SOD, APX y GR disminuye a medida que avanza la infección por *P. digitatum* en el flavedo y el albedo de naranjas 'Navelina' (Ballester y col., 2006). Solamente la actividad CAT aumenta en la zona más infectada por el hongo, o zona de esporulación, respecto a la zona adyacente o de maceración. Es posible que este incremento en la actividad se deba a la producción de CAT por parte del hongo, hecho ya descrito en otros patógenos como *Cladosporium fulvum* (Bussink y Oliver, 2001). En los estudios llevados a cabo por Ballester y col. (2006), se observó un incremento de la actividad POX insoluble en la zona de maceración del flavedo infectado, por lo que esta enzima podría contribuir a una mayor resistencia del tejido externo a ser infectado por el patógeno.

El metabolismo de fenilpropanoides también se ha relacionado con la respuesta de los frutos cítricos frente a la invasión por patógenos. Así, se ha observado un incremento en la expresión del gen *PAL* en la zona adyacente al

tejido infectado, disminuyendo a medida que aumenta la distancia al punto de inoculación, mientras que esta acumulación no se observó en pomelos sanos (McCollum, 2000; Ballester y col., 2006), o con el tiempo (Marcos y col., 2005). No obstante, la actividad PAL parece no inducirse en respuesta a la infección por *P. digitatum* en frutos cítricos (Ismail y Brown, 1979; Poppe y col., 2003). Ballester y col. (2006) han comprobado que la infección por *P. digitatum* induce la expresión del gen *PAL* tanto en el flavedo como en el albedo de frutos de naranja. Sin embargo, la actividad PAL aumenta en menor medida que la inducción observada a nivel transcripcional. Este hecho sugiere la habilidad por parte del hongo de suprimir este mecanismo de defensa. Este hecho ya fue descrito por diversos autores, que observaron que *P. digitatum* es capaz de inhibir el incremento en la actividad PAL inducido por heridas o etileno en los frutos cítricos (Ismail y Brown, 1979; Lisker y col., 1983). Además de las cumarinas nombradas anteriormente (Afek y col., 1999), otros compuestos derivados del metabolismo de fenilpropanoides que se han relacionado con la resistencia de los frutos cítricos al ataque por hongos patógenos son algunas flavanonas y flavonas polimetoxiladas, derivadas del metabolismo de fenilpropanoides (Del Río y col., 1998; Arcas y col., 2000; Ortuño y col., 2006). Sin embargo, la mayoría de los ensayos de actividad antimicrobiana de estos compuestos se han realizado *in vitro* utilizando generalmente medio de cultivo compuesto por agar, patata y dextrosa (PDA). La adición de estos compuestos al medio de cultivo da lugar a una reducción en el crecimiento de diversos hongos como *P. digitatum*, *P. citrophthora* y *Geotrichum* sp. Asimismo, se ha observado que la concentración de algunas flavanonas y flavonas polimetoxiladas en naranjas infectadas por *P. citrophthora* varía en función del nivel de colonización del tejido (Del Río y col., 2004). Así, la concentración de sinensetina, tangeretina, nobiletina, heptametoxiflavona y de las agliconas hesperetina y naringenina fue mínima en el tejido sano, incrementándose a medida que aumentaba el desarrollo de la infección. Sin embargo, la concentración de hesperidina y naringina fue máxima en el tejido control.

2.2. Inducción de resistencia en frutos cítricos y mecanismos asociados

En la bibliografía se han descrito diversos tratamientos, tanto físicos, como químicos y biológicos, capaces de inducir resistencia en los frutos cítricos frente a una infección por patógenos fúngicos (Ben Yehoshua y col., 2000). Entre los tratamientos físicos destaca la aplicación de calor, bien mediante baños con agua caliente o bien mediante el almacenamiento en cámaras con temperatura y RH elevadas (Schirra y Ben Yehoshua, 1999). Se ha

observado que los baños a 50 °C de mandarinas ‘Fortune’ provocan una recristalización o reordenación de las ceras depositadas sobre la corteza de los frutos. El calor ‘funde’ estas ceras, que se reorganizan en la superficie recubriendo los estomas, y actuando como una barrera mecánica impidiendo la entrada de los patógenos por las heridas o aberturas naturales (Schirra y col., 2000). Además, se ha observado una acumulación de ligninas en el punto de inoculación en frutos infectados durante 24 h y posteriormente sometidos a un baño a 53 °C durante 2 s (Nafussi y col., 2001). La aplicación de los tratamientos térmicos puede ir acompañada de una síntesis de fitoalexinas, una modificación en el nivel de expresión de ciertos genes y/o un cambio en diversas actividades enzimáticas. Así, la aplicación de un tratamiento de calor de 3 d a 36 °C en limones previamente infectados por *P. digitatum* aumenta la concentración de escoparona (6,7-dimetoxicumarina) en el flavedo de los mismos (Kim y col., 1991). La concentración es muy inferior si solamente se inocula el patógeno, mientras que este compuesto no se detecta en frutos no tratados o en los sometidos únicamente al tratamiento térmico. Estos autores correlacionan el aumento de la concentración de este compuesto con una menor capacidad de germinación de las esporas y elongación del tubo germinativo de *P. digitatum*. La aplicación de tratamientos térmicos también puede conducir a un incremento en la concentración de diversas proteínas PR como quitinasas, glucanasas y POXs. Así, Pavoncello y col. (2001) mostraron que el lavado de pomelos con agua caliente a 62 °C durante 20 s provoca una acumulación de estas proteínas. Asimismo, este tratamiento induce resistencia frente a una infección posterior por *P. digitatum*. Sin embargo, su eficacia depende del momento en el que se realice la inoculación de los frutos, siendo más beneficioso si ésta tiene lugar al primer y tercer día después del tratamiento.

La aplicación de luz UV reduce la infección por diversos patógenos en los frutos cítricos. La resistencia más elevada se observa cuando la inoculación con *P. digitatum* se realiza a las 24-48 h posteriores a la irradiación en limones, kumquat y pomelos, no observándose una reducción de la infección si la inoculación se realiza antes del tratamiento (Ben Yehoshua y col., 1992; Rodov y col., 1992; Droby y col., 1993). La eficacia de la luz UV reduciendo la incidencia de una infección posterior se ha relacionado con un incremento en la concentración de diversas fitoalexinas como la escoparona y la escopoletina (6-metoxi 7-hidroxycumarina) (D'hallewin y col., 1999; 2000), aumentando la concentración de estos compuestos a medida que la dosis de luz UV es mayor. No obstante, hay que tener en cuenta que una dosis elevada puede provocar

daños en la corteza de los frutos (Ben Yehoshua y col., 1992; D'hallewin y col., 1999). Asimismo, estos autores mostraron que el incremento en la concentración de escoparona depende de la variedad empleada, del estado de maduración del fruto y del momento en que se realice la irradiación. La aplicación de luz UV en frutos cítricos también incrementa la concentración de proteínas PR, como quitinasas (Porat y col., 1999a) y glucanasas (Porat y col., 2002). Otros autores han relacionado la eficacia de la luz UV reduciendo las infecciones fúngicas con un incremento en la actividad de las enzimas PAL y POX (Droby y col., 1993).

La aplicación de radiación gamma 2 h después de la inoculación de *P. digitatum* en pomelos reduce la incidencia de esta infección (Spalding y Reeder, 1985). Asimismo, esta irradiación incrementa la producción de aminoácidos aromáticos, compuestos fenólicos y cumarinas, induce la actividad PAL y aumenta la formación de ligninas en el flavedo de naranjas tratadas (Dubery, 1992). Sin embargo, estos autores no estudiaron la relación entre el incremento en estos compuestos y la reducción de una infección fúngica.

La aplicación de diversos compuestos químicos puede modificar la susceptibilidad de los frutos a una infección posterior. Por ejemplo, la adición de 'Margosan' (aceite procedente de la semilla de Nim) y quitosano (polímero N-acetil glucosamina desacetilada) en naranjas 14 h antes de la inoculación de *P. digitatum* reduce significativamente el porcentaje de heridas infectadas respecto de los frutos no tratados (Fajardo y col., 1998). La adición de otros compuestos puede reducir la susceptibilidad de los frutos a una infección posterior, lo que se ha relacionado con un incremento de la síntesis de fitoalexinas y/o una modificación de la expresión de diversos genes. Así, la adición de carbonato sódico previamente a la inoculación de *Penicillium* sp. reduce la infección causada por el patógeno y, paralelamente, incrementa la concentración de escoparona en naranjas (Vendetti y col., 2005). Asimismo, la aplicación de Brotomax (mezcla líquida de oligoelementos que se emplea como inductor de autodefensas frente a distintas situaciones de estrés) induce la síntesis de esta cumarina y, además, se observa un aumento en la resistencia de frutos de tangelo 'Nova' frente a la infección por *P. parasitica* (Ortuño y col., 1997). También se ha observado que el tratamiento de pomelos con BABA da lugar a un aumento en la acumulación de un gen que codifica una β -1,3-glucanasa en el flavedo de los mismos, siendo máxima a las 24 h posteriores al tratamiento (Porat y col., 2002). Estos autores demostraron además que esta β -1,3-glucanasa se induce en el flavedo de los cítricos en respuesta a la aplicación

de diversos elicitores como etileno, JA, heridas o por la infección de *P. digitatum*. La aplicación de BABA y JA incrementó también la acumulación de otra proteína PR, la quitinasa, en el flavedo de pomelos, alcanzando un máximo a las 48 h posteriores al tratamiento (Porat y col., 2001). La expresión de dicho gen también aumentó en el tejido externo de los frutos en respuesta a la aplicación de etileno, luz UV y el agente de control biológico *C. oleophilla*.

La aplicación de jasmonatos previa a la inoculación de *P. digitatum* reduce el podrido causado por este hongo durante la postcosecha de pomelos. Sin embargo, el empleo de dosis mayores o menores a la óptima no tienen ningún efecto (Droby y col., 1999). Además, el tratamiento con esta hormona consigue reducir el nivel de podrido natural y los daños por frío después del almacenamiento a bajas temperaturas. Como ya se ha comentado, la aplicación de JA a pomelos incrementa la expresión de genes que codifican una quitinasa y una β -1,3-glucanasa, observándose la máxima acumulación 24-48 h después del tratamiento (Porat y col., 2001; 2002).

El etileno, hormona vegetal implicada en la maduración y senescencia de los frutos, se emplea durante la postcosecha para acelerar el cambio de color de los frutos cítricos. Esta hormona también está implicada en las repuestas de defensa de los frutos cítricos frente a una infección por patógenos. Se ha observado que la producción de etileno aumenta en frutos cítricos infectados con *P. digitatum*, teniendo ésta su origen en el fruto y en el hongo (Achilea y col., 1985a; 1985b). Porat y col. (1999b) mostraron que la inhibición de la percepción del etileno mediante el empleo de 1-MCP incrementa el podrido natural en naranjas almacenadas durante 4 semanas a 20 °C, mientras que este tratamiento no incrementó los podridos en pomelos infectados artificialmente con *P. digitatum* (Mullins y col., 2000). Asimismo, Marcos y col. (2005) mostraron que el pretratamiento con 1-MCP de naranjas infectadas artificialmente incrementa la susceptibilidad de las naranjas a la infección por este hongo, aumenta la producción de etileno y da lugar a cambios en la expresión de genes implicados en la síntesis de esta hormona como *ACS* y *ACO* o en la respuesta de defensa de los frutos como *PAL* o quitinasas. La efectividad de la aplicación de este inhibidor es dependiente de la concentración empleada, variedad de los frutos y el tratamiento postcosecha empleado (Dou y col., 2005). Al igual que la implicación del 1-MCP en la respuesta a la infección en frutos cítricos no está clara ya que existen resultados contradictorios, el papel del etileno durante el proceso de infección varía en función del estado de maduración de los frutos, del patógeno fúngico

empleado y de la concentración y momento de aplicación de la hormona. Se ha observado diferente efectividad del etileno sobre el crecimiento *in vitro* de diversos patógenos fúngicos (El-Kazzaz y col., 1983). Así, la aplicación de etileno en diversas concentraciones estimula la germinación de las esporas de *P. digitatum* y *P. italicum in vitro*, mientras que no se observan cambios significativos en *A. alternata*, *P. expansum* o *Rhizopus stolonifer*. En cuanto a la efectividad de esta hormona *in vivo*, estos autores observaron que si la aplicación se realiza antes de la inoculación de *P. italicum* en las naranjas, la podredumbre avanza más lentamente respecto a frutos no tratados. No obstante, en otros casos el pretratamiento con etileno puede incrementar la susceptibilidad de los frutos a una infección fúngica. Así, este tratamiento puede reducir el contenido en citral en el flavedo de limones, haciéndolos menos resistentes a una infección por *P. digitatum* que los frutos no tratados (Ben Yehoshua y col., 1995). Además, esta hormona está implicada en los cambios observados en la expresión de diversos genes, ya que la aplicación de etileno en frutos cítricos da lugar a una acumulación de proteínas PR como quitinasas y glucanasas (Porat y col., 2001; 2002) o a un incremento en la actividad PAL o en la expresión del gen *PAL* (Lafuente y col., 2001; Marcos y col., 2005).

Otros tratamientos que inducen resistencia frente a diversos patógenos son el daño mecánico en la corteza de los frutos (Ismail y Brown, 1979) y la aplicación de agentes de biocontrol (Droby y col., 2002). Además de los productos comerciales comentados anteriormente, se han ensayado diversos agentes de biocontrol que podrían reducir la incidencia de una infección fúngica en frutos cítricos. Entre ellos se encuentra *C. oleophilla* (Fajardo y col., 1998; Droby y col., 2002), *Candida famata* (Arras, 1996) y *Pantoea agglomerans* (Poppe y col., 2003; Plaza y col., 2004; Francés y col., 2006). En algunos casos no se ha relacionado la menor susceptibilidad del fruto a la infección con una inducción de mecanismos de defensa en el fruto. Sin embargo, en otros, la aplicación de agentes de biocontrol al fruto puede desencadenar una resistencia inducida, que se ha relacionado con un incremento de la actividad PAL (Droby y Chalutz, 1999) o con la síntesis de las fitoalexinas escoparona y escopoletina (Arras, 1996). Asimismo, la resistencia inducida por el agente de biocontrol *C. oleophilla* se ha relacionado con incrementos en la producción de etileno, en las actividades PAL y POX y en la síntesis de escoparona y escopoletina y de las proteínas PR quitinasas y β -1,3-glucanasas (Fajardo y col., 1998; Droby y col., 2002). Sin embargo, estos últimos autores mostraron que la efectividad de este tratamiento depende de la distancia entre las heridas inoculadas con la

levadura y las del hongo y el desfase entre ambas inoculaciones. Las mayores eficacias se obtienen a partir de las 24 h después de la inoculación con la levadura.

El empleo de diversos tratamientos inductores de resistencia conjuntamente puede dar lugar a un efecto sinérgico que incremente la resistencia del fruto frente a una infección fúngica. Así, el empleo conjunto del agente de biocontrol *Bacillus subtilis* con bicarbonato sódico o con baños de agua caliente incrementa la resistencia de naranjas previamente infectadas con *P. digitatum* o *P. italicum*, siendo este tratamiento más efectivo que la aplicación independiente de los mismos (Obagwu y Korsten, 2003). Algo similar ocurre en limones y naranjas previamente inoculados con *P. digitatum* o *P. italicum*, en los que la aplicación del agente de biocontrol *P. agglomerans* conjuntamente con un tratamiento térmico a 33 °C durante 65 h o baños en agua caliente con una solución de bicarbonato sódico, reduce significativamente el porcentaje de podridos en mayor proporción que si los tratamientos se realizan independientemente (Plaza y col., 2004; Torres y col., 2007).

Como se ha observado, la mayor parte de los tratamientos de inducción de resistencia dan lugar a una modificación en el nivel de expresión de algunos genes en diversos sistemas vegetales (Porat y col., 2002; 2003; Bailey y col., 2005). Hace algunos años abordar este tema de forma amplia era lento y tedioso, por lo que se estudiaban solamente genes individuales. Sin embargo, actualmente el desarrollo de nuevas tecnologías ha facilitado este estudio. Mediante el empleo de bibliotecas substractivas de cDNA se ha profundizado en el estudio de la expresión diferencial de genes durante el proceso de infección, por ejemplo, en fresas (Casado-Díaz y col., 2006). Además, se han generado micromatrices de cDNA que contienen gran parte del genoma de diversos organismos constituyendo una herramienta muy poderosa para abordar el estudio de expresión de genes de manera global (Moy y col., 2004; Ralph y col., 2006; Mohr y Cahill, 2007).

En este trabajo se planteó el empleo de las micromatrices de cDNA generadas en el Consorcio de Genómica Funcional de Cítricos (CFGP, 2006), para realizar un estudio exhaustivo de los cambios en el nivel de expresión de genes de cítricos en respuesta al tratamiento de inducción de resistencia. El CFGP se creó con el propósito de desarrollar herramientas genómicas que permitan estudiar a gran escala aspectos relevantes de la biología de los cítricos, entre los que se encuentran el desarrollo biológico (crecimiento vegetativo, floración, desarrollo de los frutos, maduración, senescencia y abscisión), la

respuesta a estreses bióticos (hongos, bacterias y virus) y abióticos (salinidad, deshidratación y deficiencia en hierro) y la postcosecha (almacenamiento a bajas temperaturas e infecciones fúngicas). Las herramientas desarrolladas se pueden emplear para la realización de estudios transcriptómicos de los cítricos a partir de las colecciones de ESTs (*Expressed Sequence Tags*: fragmentos de cDNA secuenciados) obtenidas a partir de bibliotecas de cDNA construidas a partir de tejidos de cítricos en diferentes estados fisiológicos y en respuesta a diversos estreses. Estas bibliotecas de cDNA (Tabla 1) se han desarrollado en los laboratorios que forman parte del CFGP: Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP-CSIC-UPV) e Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC), estando este proyecto financiado por la Consellería de Agricultura, Pesca y Alimentación y por el Ministerio de Ciencia y Tecnología.

A partir de 18 genotecas generadas en el CFGP se ha construido la primera generación de micromatrices, denominada 7k (Forment y col., 2005). Posteriormente se generaron 35 bibliotecas más, construyéndose con la mayor parte de las 53 bibliotecas la micromatriz 12k o de segunda generación, de mayor tamaño que la anterior. Finalmente se prevé la construcción de una micromatriz, denominada 20k, que contenga la mayor parte del genoma de los cítricos. A partir de las 53 bibliotecas generadas se han obtenido aproximadamente 92.000 ESTs, que se agrupan en 27.551 unigenes, de los cuales 15.707 son secuencias únicas, y el resto forma parte de 11.844 ‘contigs’ (conjunto de clones solapantes pertenecientes a un mismo gen).

El IATA ha participado en la generación de seis bibliotecas de cDNA que se emplearon en la construcción de la micromatriz 12k. Además, a partir de tres de ellas se obtuvieron los genes estudiados en esta Tesis Doctoral. Estas tres bibliotecas de genes son:

- RindPdig24: biblioteca de cDNA obtenida a partir de la corteza de mandarinas ‘Clemenules’ infectadas con *P. digitatum* a las 24 h post-inoculación (hpi).
- RindPdigS: biblioteca substractiva de cDNA obtenida a partir de la corteza de naranjas ‘Navelina’ infectadas con *P. digitatum* a las 24 hpi. Esta biblioteca de fragmentos de cDNA está enriquecida en genes que se expresan más en respuesta a la infección que en respuesta a la herida.

- FlavCurFr1: biblioteca de cDNA a partir de flavedo de mandarinas 'Fortune' pretratadas a 37 °C y almacenadas posteriormente a 2 °C.

Tabla 1. Bibliotecas de cDNA generadas bajo el marco del CFGP. Las bibliotecas marcadas con asterisco se emplearon para la construcción de la micromatriz 7k.

Biblioteca	Organismo	Tejido	Tratamiento aplicado	Clones	Genes únicos	Contigs	Unigenes	Redundancia (%)	Unigenes específicos biblioteca	Novedad (%)
AbioticL1	<i>C. dementina</i>	Hojas	1) Estrés hídrico 2) Rehidratación 3) Estrés salino 4) Estrés salino progresivo 5) Clorosis férrica	960	125	498	623	25	139	22
AbioticR1	<i>C. rosemi</i>	Raíces	1) Estrés hídrico 2) Rehidratación 3) Estrés salino 4) Estrés salino progresivo 5) Clorosis férrica	960	157	531	688	24	168	24
AbsAOv1*	<i>C. dementina</i>	Zonas abscisión y explantes de flores	Etileno	1183	230	523	753	33	248	33
AbsCFruit1	<i>C. sinensis</i>	Zona C de abscisión y tejidos circundantes	Prácticas normales de cultivo	866	230	438	668	18	254	38
AbsCOv1	<i>C. dementina</i>	Zona C de abscisión y tejidos circundantes de ovarios	Etileno	1091	229	504	733	28	252	34
AbsDev	<i>C. dementina</i>	Zona abscisión laminar y tejidos circundantes de hojas	Prácticas normales de cultivo	956	220	523	743	20	242	33
AbsLeaSub1*	<i>C. dementina</i>	Hojas	Estrés hídrico y rehidratación	768	78	244	322	54	112	35
BiotPhyR1	<i>C. aurantium</i>	Raíces	<i>Phytophthora citrophthora</i>	960	364	401	765	17	407	53
CEVdCidro1	<i>C. medica</i>	Hojas	Virus exocortis cítricos (CEVd)	480	111	220	331	29	152	46
CTVClemen1	<i>C. dementina</i>	Tallos	Virus tristeza cítricos (CTV)	480	62	327	389	14	63	16
CTVLeafMc1*	<i>C. macrophylla</i>	Hojas	Virus tristeza cítricos (CTV)	1219	20	85	105	89	59	56
CTVMacrop1	<i>C. macrophylla</i>	Hojas	Virus tristeza cítricos (CTV)	480	133	214	347	22	147	42
DevOvary1	<i>C. dementina</i>	Ovarios	Prácticas normales de cultivo	384	27	192	219	26	29	13
DroRLeaf1*	<i>C. dementina</i>	Hojas	Deficiencia en hierro	576	136	365	501	11	141	28
Drought1*	<i>C. dementina</i>	Hojas	Estrés hídrico	722	65	245	310	49	71	23
Drought2*	<i>C. dementina</i>	Raíces	Estrés hídrico	1574	470	565	1035	26	515	50
EHR	<i>C. dementina</i>	Raíces		850	54	239	293	65	94	32
ExocortL1*	<i>C. medica</i>	Hojas	Virus exocortis cítricos (CEVd)	672	242	341	583	8	253	43
FerrChloL1*	<i>C. dementina</i>	Hojas	Deficiencia en hierro	864	78	344	422	24	83	20
FerrChloR1*	<i>C. dementina</i>	Raíces	Deficiencia en hierro	1056	161	478	639	21	170	27
FlavCurFr1*	<i>C. dementina</i> x <i>C. reticulata</i>	Flavado	Almacenamiento 37°C (4, 24, 72h) y 1°C (1, 3 y 10d)	1152	260	697	957	13	263	27
FlavCurFrS	<i>C. dementina</i> x <i>C. reticulata</i>	Flavado	Almacenamiento 37°C-3d y 1,5°C-7d	75	36	37	73	3	37	51
FlavFr1*	<i>C. dementina</i>	Flavado	2°C-7 y 24 d	2361	352	976	1328	36	387	29
FlavFrSub1*	<i>C. dementina</i> x <i>C. reticulata</i>	Flavado	2 y 12°C-14d-95% RH	824	70	160	230	61	89	39

Continuación de la Tabla 1.

Biblioteca	Organismo	Tejido	Tratamiento aplicado	Clones	Genes únicos	Contigs	Unigenes	Redundancia (%)	Unigenes específicos biblioteca	Novedad (%)
FlavRip1*	<i>C. dementina</i>	Flavado	Prácticas normales de cultivo	322	58	209	267	12	59	22
FlavSen1*	<i>C. dementina</i>	Flavado	Prácticas normales de cultivo	225	44	150	194	9	45	23
HSVdMacro1	<i>C. macrophylla</i>	Hojas	Virus HSVd	480	116	209	325	20	128	39
IF1*	<i>C. dementina</i>	Inflorescencia de ápices y flores	Prácticas normales de cultivo	2421	443	1165	1608	31	556	35
IVIA1	<i>C. dementina</i>	Mezcla de tejidos	Prácticas normales de cultivo	41460	5598	7233	12831	68	8980	70
KCL_Salt1	<i>C. resinii</i>	Raíces	Estrés salino	1053	225	625	850	18	248	29
NTLeaf1*	<i>C. dementina</i>	Hojas	Prácticas normales de cultivo	359	61	189	250	22	65	26
OF1*	<i>C. dementina</i>	Ovarios y frutos inmaduros	GA3	168	46	110	156	3	47	30
OF2*	<i>C. dementina</i>	Ovarios y frutos inmaduros	GA3	1739	417	784	1201	15	434	36
PCR	<i>C. dementina</i>			39	13	23	36	8	14	39
PhiFruit1*	<i>C. dementina</i>	Frutos	Prácticas normales de cultivo	576	120	348	468	16	127	27
PhiL_JIIV1	<i>C. dementina</i>	Glándulas de aceite de frutos	Prácticas normales de cultivo	1038	8	163	171	83	38	22
PhyRootCl1	<i>C. resinii</i>	Raíces	<i>Phytophthora citrophthora</i>	864	172	523	695	17	178	26
PhyRootSr1*	<i>C. aurantium</i>	Raíces	<i>Phytophthora citrophthora</i>	959	488	342	830	5	495	60
PhyRootSw1*	<i>C. sinensis</i>	Raíces	<i>Phytophthora citrophthora</i>	1886	965	630	1595	10	1008	63
PostharvC1	<i>C. dementina</i>	Flavado	Almacenamiento en frío	960	134	582	716	22	137	19
PostharveN	<i>C. dementina</i>	Flavado y albedo	2°C a distintos tiempos e infección con <i>P. digitatum</i>	928	176	561	737	17	185	25
PostharvP1	<i>C. dementina</i>	Corteza (flavado + albedo)	<i>P. digitatum</i>	1056	161	640	801	21	169	21
RindPdig24*	<i>C. dementina</i>	Corteza (flavado + albedo)	<i>P. digitatum</i>	1152	264	674	938	16	278	30
RindPdigS	<i>C. sinensis</i>	Corteza (flavado + albedo)	<i>P. digitatum</i>	330	37	147	184	38	50	27
Roots1*	<i>C. sinensis</i> x <i>Poncirus trifoliata</i>	Raíces	Paclbutrazol o Auxina	176	37	104	141	19	40	28
RVDDevelop1	<i>C. dementina</i>	Hojas, flores, ovarios y meristemo apical	Prácticas normales de cultivo	960	60	451	511	33	65	13
RVDDevelopN	<i>C. dementina</i>	Hojas, flores, ovarios y meristemo apical	Prácticas normales de cultivo	960	182	543	725	12	192	26
SaltLeaf1*	<i>C. dementina</i>	Hojas	Estrés salino	738	77	367	444	33	85	19
SLH	<i>C. sinensis</i>	Hojas	Estrés salino	1048	255	593	848	18	289	34
StrClemenN	<i>C. dementina</i>	Hojas y tallos	1) Estrés hídrico 2) rehidratación 3) Estrés salino 4) Estrés salino progresivo 5)Clorosis férrica 6)CTV	960	186	567	753	13	203	27
StrCleopN	<i>C. resinii</i>	Raíces	1) Estrés hídrico 2) rehidratación 3) Estrés salino 4) Estrés salino progresivo 5)Clorosis férrica 6) <i>Phytophthora citrophthora</i>	960	246	594	840	8	254	30
TF	<i>C. dementina</i>	Flavado y glándulas de aceite de frutos	Prácticas normales de cultivo	4037	781	2083	2864	28	819	29
Veg1*	<i>C. dementina</i>	Hojas, tallos y entrenudos	GA3 y paclbutrazol	1771	427	971	1398	17	439	31

OBJETIVOS

Los Objetivos que se abordan en esta tesis doctoral son:

1. Comparación de distintos sistemas de inducción de resistencia en frutos cítricos frente a la infección por *P. digitatum*.
2. Determinación de cambios globales de expresión génica en el flavedo y albedo de frutos cítricos relacionados con la inducción de resistencia frente a la infección por *P. digitatum* mediante el empleo de micromatrices de cDNA.
3. Estudio de la implicación del metabolismo de fenilpropanoides en frutos cítricos en la resistencia inducida frente a *P. digitatum*. Se determinarán conjuntamente los cambios en el patrón de expresión de genes implicados en esta ruta y en los perfiles metabólicos en el flavedo y albedo. Se compararán dichos cambios con los que se producen en respuesta a la infección por este patógeno.
4. Evaluación de la posible actividad antifúngica *in vitro* e *in vivo* de compuestos del metabolismo secundario de cítricos, principalmente compuestos fenólicos y alcaloides, frente a diversos hongos del género *Penicillium*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIAL VEGETAL

En los experimentos de inducción de resistencia mediante la aplicación de compuestos químicos, hongos no patógenos de cítricos y paredes celulares de *Penicillium digitatum*, se emplearon naranjas de la variedad 'Navel' (*Citrus sinensis* L. Obseck) procedentes de la cooperativa citrícola de Lliria (Valencia), de la cooperativa citrícola de Burriana o de un huerto situado en el término municipal de Náquera. También se emplearon naranjas de la variedad 'Navelina' procedentes de la cooperativa citrícola de Lliria, o de huertos situados en los términos municipales de Lliria o Picassent. Estos experimentos se realizaron durante las campañas 2004 y 2005.

Se utilizaron frutos de naranja de la variedad 'Navelate' (*Citrus sinensis* L. Obseck) (Figura 4), procedente de una mutación de 'Washington Navel', para realizar los experimentos de inducción de resistencia mediada por una infección previa con el patógeno y posterior tratamiento térmico. Se realizaron tres muestreos independientes a partir de frutos obtenidos en un huerto de la empresa 'La Reva', situado en el término municipal de Ribarroja (Valencia), en Febrero y Marzo de 2003, y en la cooperativa citrícola de Burriana (Castellón) en Marzo de 2006. El tejido procedente de estos tres experimentos se empleó en los diferentes análisis: determinaciones de actividades enzimáticas (Febrero de 2003, Marzo de 2003), de compuestos fenólicos mediante HPLC (Marzo de 2003) y análisis de la expresión de genes bien mediante hibridación Northern (Marzo de 2003) o mediante el empleo de micromatrices de cDNA (los tres experimentos).

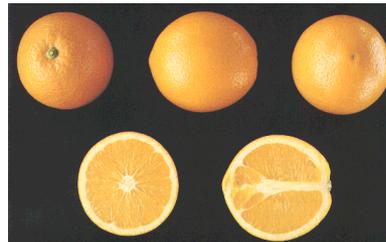


Figura 4. Frutos de naranjas de la variedad 'Navelate'.

En los experimentos de infección de frutos cítricos por *P. digitatum* se emplearon frutos de dos campañas diferentes. Se utilizaron naranjas de la variedad 'Navelina' procedentes de la cooperativa citrícola de Lliria (Valencia) en Enero de 2002. Posteriormente, se realizó un segundo experimento en Enero de 2006 a partir de frutos de naranja de la variedad 'Navelina' obtenidos de un huerto situado en el término municipal de Lliria (Valencia). El tejido proveniente de la campaña 2002 se empleó para el análisis de la expresión de

genes mediante hibridación Northern, y el de la campaña de Enero de 2006 para la determinación de compuestos fenólicos por HPLC.

Todos los frutos fueron recogidos antes de recibir ningún tratamiento postcosecha y se procesaron el mismo día de su recolección. Se seleccionaron frutos que no presentaron daños o podridos y se desinfectaron sumergiéndolos en una solución de lejía al 5 % durante 5 min. A continuación se enjuagaron con agua corriente y se dejaron secar a temperatura ambiente hasta su utilización.

2. HONGOS

Los frutos se infectaron con el hongo *P. digitatum* (Pers.:Fr.) Sacc., agente causal de la podredumbre verde de los frutos cítricos durante la postcosecha. Se empleó el aislado PHI-26 M1 procedente de una naranja infectada y aislado en el Laboratorio de Fisiología y Biotecnología de Postcosecha del IATA (Figura 5) (López-García, 2002). Además, se emplearon los hongos fitopatógenos *Penicillium expansum* Link, aislado CMP1 (Teixidó y col., 1998), que causa la podredumbre azul en manzanas, el aislado CECT 2954 de *P. digitatum*, procedente de la Colección Española de Cultivos Tipo, que es menos infectivo en los frutos cítricos que el aislado PHI-26 M1, y el aislado PHI-1 M1 de *Penicillium italicum* Whemer, aislado en el Laboratorio de Fisiología y Biotecnología de Postcosecha del IATA. A partir de un glicerinado de conidios conservado a -80 °C de los aislados en cuestión, se inocularon placas de medio de cultivo patata-dextrosa-agar (PDA, Difco Laboratorios, Inc.) y se incubaron durante 7 d a 24 °C. Las esporas se recogieron mediante el rascado de la superficie del medio de cultivo, se añadieron en un tubo con agua estéril y se filtraron a través de lana de vidrio. Se realizó el recuento de los conidios con un hematocitómetro en un microscopio óptico y se diluyeron hasta la concentración deseada. En todos los experimentos se emplearon conidios recogidos el mismo día de la infección.

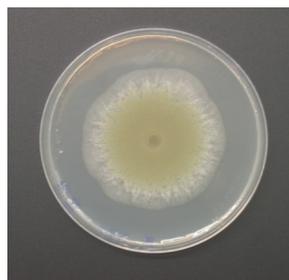


Figura 5. Crecimiento radial del aislado PHI-26 M1 de *P. digitatum* en medio de cultivo de PDA.

3. TRATAMIENTOS DE INDUCCIÓN DE RESISTENCIA

Se estudió el efecto de diversos compuestos químicos (ácido DL-3-aminobutírico (BABA) (Aldrich), jasmonato de metilo (MeJA) (Aldrich) y Brotomax® (Agrométodos, S.A.)) y de una inoculación previa con diversos hongos o con paredes celulares de *P. digitatum* en la inducción de resistencia en el fruto frente a una infección posterior.

3.1. Tratamientos con productos químicos

Se practicaron cuatro heridas equidistantes entre ellas en el ecuador del fruto mediante un clavo de 3 mm de profundidad y en ellas se añadieron 10 μ L de cada uno de los compuestos. Las concentraciones empleadas fueron 2, 20 y 200 mM de BABA, 1, 10 y 100 μ M de MeJA y 0,1, 0,5 y 2 % (v/v) de Brotomax. Los frutos se mantuvieron en una cámara termostataada a 20 °C y humedad relativa (RH) del 90-95 % durante 48 h. Transcurrido este tiempo, se realizaron infecciones con *P. digitatum* como se describe en el apartado 4 de Materiales y Métodos.

3.2. Tratamientos con paredes celulares de *P. digitatum*

Se inocularon 250 mL de medio de cultivo GPY (40 g L⁻¹ de glucosa, 5 g L⁻¹ de extracto de levadura y 5 g L⁻¹ de peptona) o de extracto acuoso de flavedo al 10 % con el aislado PHI-26 M1 de *P. digitatum* a una concentración de 10⁴ conidios mL⁻¹. Ambos cultivos se mantuvieron en agitación a 200 rpm a 24 °C durante 24 h en el caso del medio de cultivo GPY y 48 h en el del extracto acuoso de flavedo. Se recogió el micelio mediante filtración a través de velo de novia, se lavó con agua estéril, se prensó entre servilletas de papel y se congeló en nitrógeno líquido. El micelio prensado se trituroó con un molinillo y se mantuvo a -80 °C para posteriores usos.

La obtención de las paredes celulares se llevó a cabo según el método descrito por Santos y col. (1979) con ligeras modificaciones. Se añadió 1 mL de acetato sódico 50 mM pH 5,2 a 100 mg de micelio congelado y se homogeneizó mediante 20 ciclos de 1 min cada uno a potencia media en un disruptor celular (Mini beadbeater 8 Cell Disruptor, Biospec). Posteriormente, el extracto se sonicó 15 veces durante 45 s con un desintegrador ultrasónico PG-100 (amplitud de 20 microns) (MSE). El homogeneizado se centrifugó durante 2 min a 3.800 x g. El sedimento se lavó varias veces con 1 mL de acetato sódico 50 mM pH 5,2. Se prepararon diluciones equivalentes a 1 y 10 mg de micelio mL⁻¹ de agua estéril.

El tratamiento de inducción de resistencia consistió en la inoculación de 10 μL de la dilución adecuada de paredes celulares en cuatro heridas equidistantes practicadas en la corteza del fruto. Las naranjas se mantuvieron durante 48 h en una cámara termostataada a 20 °C y 90-95 % de RH y, posteriormente, se inocularon con el patógeno para estudiar el efecto del tratamiento inductor (Ver apartado 4 de Materiales y Métodos).

3.3. Tratamientos con hongos no infectivos en frutos cítricos

Como tratamiento de inducción de resistencia en los frutos cítricos frente a una infección posterior por *P. digitatum* se emplearon dos hongos patógenos de frutos: *P. expansum* Link, aislado CMP1, que causa la podredumbre azul en manzanas pero no infecta cítricos, y el aislado CECT 2954 de *P. digitatum* que, en las condiciones empleadas, no es capaz de infectar los frutos cítricos. Se inocularon 10 μL del patógeno a una concentración de 10^4 conidios mL^{-1} y los frutos se mantuvieron en una cámara termostataada a 20 °C durante 48 h antes de inocular una segunda herida con el aislado PHI-26 M1 de *P. digitatum* para estudiar la efectividad de este tratamiento inductor.

3.4. Tratamiento de infección con *P. digitatum* y posterior inactivación térmica

Se empleó el aislado PHI-26 M1 de *P. digitatum* como posible inductor de mecanismos de defensa en los frutos cítricos. En las heridas practicadas con un clavo de 3 mm de profundidad se inocularon 10 μL de una suspensión de conidios del aislado PHI-26 M1 a una concentración de 10^5 conidios mL^{-1} y los frutos se mantuvieron a 20 °C durante 24 h para favorecer el desarrollo del patógeno (I24) (Figura 6). Posteriormente, los frutos fueron sometidos a un tratamiento de curado térmico (3 d a 37 °C y 90-95 % de RH) para detener el progreso de la infección después de que los conidios hubiesen germinado a 20 °C (I).

Como controles, se estudió el efecto de la herida siguiendo el mismo procedimiento anterior pero añadiendo 10 μL de agua estéril en las heridas. Estos frutos se mantuvieron 24 h a 20 °C antes de ser sometidos al tratamiento de curado (H). Como control del efecto producido por la herida se emplearon frutos en los que no se realizó ninguna herida, mantenidos 20 °C durante 24 h y posteriormente curados (C). Finalmente, como control al tratamiento de curado, se emplearon frutos en los que no se les había practicado ninguna herida, almacenándolos 1 d a 20 °C y 3 d a 4 °C (X).

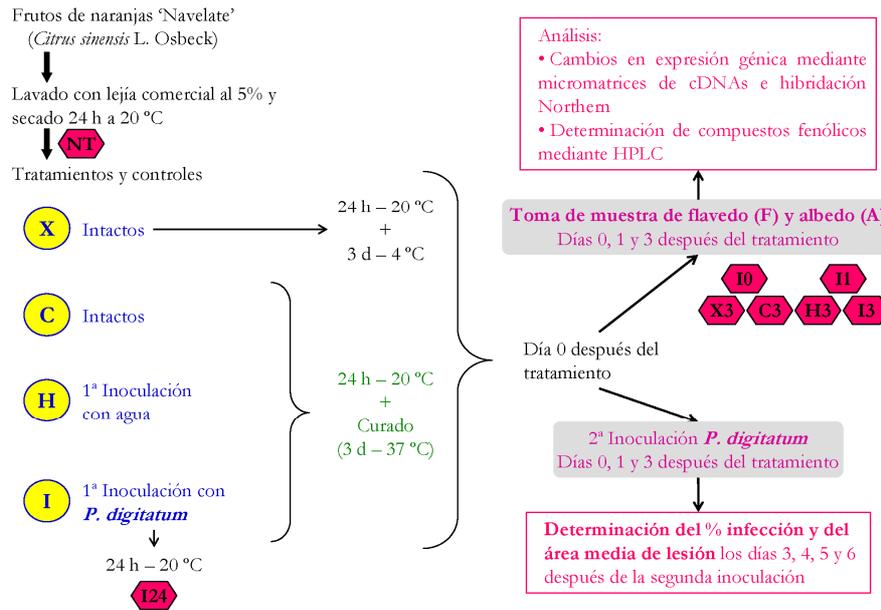


Figura 6. Tratamiento de inducción de resistencia.

4. INFECCIONES CON *P. digitatum*

En los experimentos de inducción de resistencia, y con el fin de estudiar el tiempo que es necesario para esta inducción, se realizó una segunda inoculación con el aislado PHI-26 M1 de *P. digitatum* a los 0, 1 y 3 días posteriores al tratamiento térmico (dpt). Las inoculaciones se realizaron en heridas de 3 mm de profundidad practicadas a 0,5 cm de la primera herida en la que se añadió el posible agente inductor. Se aplicaron 10 μ L del aislado PHI-26 M1 de *P. digitatum* a una concentración de 10^4 conidios mL^{-1} .

En los experimentos de desarrollo de la infección sin ningún tratamiento previo, se realizaron heridas practicadas con un clavo de 5 mm de profundidad en la corteza de los frutos cítricos. En las heridas se aplicaron 10 μ L del aislado PHI-26 M1 de *P. digitatum* a una concentración de 10^6 conidios mL^{-1} .

Los frutos se mantuvieron dentro de cajas de plástico de 32 L (sin cierre hermético para evitar la acumulación de compuestos volátiles) en una cámara termostataada a 20 °C y 90-95 % de RH (Figura 7). El porcentaje de heridas infectadas (Incidencia) y el área media de la zona de maceración (Severidad) se determinaron a los 3, 4, 5 y 6 días posteriores a la infección (dpi). Se define como área media de la zona de maceración al promedio del área media de lesión contabilizando todas las heridas inoculadas. Estas determinaciones se llevaron a cabo en tres réplicas de cinco frutos por tratamiento, contabilizándose un total de 60 heridas por tratamiento.



Figura 7. Cámaras de incubación.

4.1. Análisis estadístico

Los datos de incidencia y severidad de las lesiones correspondieron al valor medio de tres réplicas de cinco frutos con cuatro heridas por fruto. El análisis de los datos se realizó utilizando el paquete estadístico ‘Statgraphics Plus 5.1’ (Manugistics, Inc.) aplicando el análisis de la varianza (ANOVA). Se realizó un estudio de la homogeneidad de la varianza y, si ésta era homogénea, se empleó el test LSD, considerándose significativas diferencias de $p < 0,05$.

5. TOMA DE TEJIDO

En los experimentos de inducción de resistencia se empleó un sacabocados de 13 mm de diámetro que se centró en el punto de inoculación de los tratamientos de infección (I) y herida (H) o en la zona ecuatorial en los tratamientos de curado (C) y sano (X) para la toma de tejido. El flavedo y el albedo se separaron con un cuchillo e inmediatamente se congelaron en nitrógeno líquido. Se recogió conjuntamente el tejido de 160 discos procedentes de 20 naranjas para cada uno de los tratamientos indicados en el apartado 3.4 (X, C, H, I) a los 0, 1 y 3 dpt, al igual que de frutos no tratados (NT) y frutos infectados y almacenados 24 h a 20 °C (I24). El tejido congelado se trituró con un molinillo y se guardó en un recipiente a -80 °C para posteriores análisis (Figura 6).

El tejido procedente del experimento de desarrollo del patógeno en frutos cítricos no pretratados se obtuvo mediante un sacabocados de 7 mm de diámetro centrado en el punto de inoculación. El flavedo y el albedo se separaron con un cuchillo e inmediatamente se congelaron con nitrógeno líquido. Se recogió conjuntamente el tejido de 160 discos procedentes de 20 naranjas para cada uno de los tratamientos indicados en el apartado 4 (NT, H, I) a las 0, 24, 48 y 72 h dpi. El tejido congelado se procesó como se ha comentado anteriormente.

6. AISLAMIENTO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

El RNA fue obtenido a partir de 2 g de tejido de flavedo o de albedo, que se añadieron a una mezcla precalentada a 65 °C consistente en 10 mL de tampón de extracción (Tris-HCl 200 mM pH 8,0, cloruro sódico 300 mM, EDTA 50 mM, sarcosyl 2 % (p/v), polivinil-pirrolidona 40 1 % (p/v), β -mercaptoetanol 1 % (v/v)) y 5 mL de fenol equilibrado con Tris en un tubo de propileno de 50 mL. Después de la homogeneización con un Politrón PT 45/80 (Kinematica AG, Littau-Lucerne) durante 1 min, el extracto se incubó 15 min a 65 °C, se dejó enfriar en hielo y se añadieron 5 mL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1, v/v). El homogeneizado se centrifugó 20 min a 3.900 x g a 4 °C y la fase acuosa se extrajo de nuevo con 10 mL de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1, v/v/v). Los ácidos nucleicos se precipitaron mediante la adición de 1-1,5 volúmenes de etanol absoluto frío y centrifugación durante 15 min a 27.200 x g a 4 °C. El precipitado resultante se disolvió en 7,5 mL de TES (Tris-HCl 10 mM, EDTA 5 mM, SDS 0,1 %, pH 7,5) y 7,5 mL de agua y se dejó precipitar toda la noche a -20 °C con 5 mL de cloruro de litio 12 M. Después de centrifugar a 4 °C durante 60 min a 27.200 x g, el precipitado se lavó con 500 μ L de etanol al 70 % y se volvió a centrifugar durante 5 min a 17.900 x g. El sedimento resultante se lavó con acetato sódico 3 M pH 6,0 para eliminar polisacáridos, se centrifugó 5 min a 17.900 x g y se resuspendió en 40-80 μ L de agua mili Q estéril (Ballester y col., 2006). La concentración de RNA se determinó espectrofotométricamente mediante el detector MultiSkan Spectrum (Thermo Electron Corporation) y se verificó su integridad mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 % (p/v) con bromuro de etidio.

7. ANÁLISIS GLOBAL DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE MICROMATRICES DE cDNA

7.1. Descripción de las micromatrices de cDNA empleadas

En el análisis de la expresión de genes se emplearon dos micromatrices de cDNA desarrolladas en el CFGP. Los clones incluidos en ellas proceden de diversas genotecas de cDNA de cítricos que abarcan múltiples situaciones del desarrollo y de las respuestas a estrés biótico y abiótico en diferentes tejidos de la planta. La nomenclatura de los diversos clones o ESTs se realizó atendiendo a la biblioteca de la cual fueron aislados y la placa multipocillo en la cual se encuentran. Así, en el clon C06003B11 los seis primeros términos indican el laboratorio y biblioteca en el que han sido aislados (C06003) y el resto, la posición en la placa multipocillo generada (B11). Posteriormente, al agrupar los distintos clones en ‘contigs’ se crean unigenes representados por varios clones. A estos unigenes se les asignó un número del tipo 1479. Por lo tanto, cada unigen está representado por un número en el caso de que sea un ‘contig’ o por un identificador de clon si se trata de una secuencia única. La anotación funcional de los ESTs y la categorización funcional de los unigenes, se realizó mediante análisis de homología BLASTX contra la base de datos de proteínas no redundantes del ‘National Center for Biotechnology Information’ (NCBI) y del ‘Munich Information Center for Proteins Sequences’ (MIPS).

La primera de las micromatrices empleadas, denominada 7k, consta de 12.671 clones, que corresponden al menos a 6.333 unigenes procedentes de 18 bibliotecas de cDNA diferentes (Forment y col., 2005). En la generación de esta primera micromatriz se emplearon los primeros clones obtenidos en el CFGP independientemente de su secuencia, por lo tanto, los unigenes están representados por un número variable de clones. Además se incluyeron 2.038 clones de los que no se tenía información de secuencia disponible. El diámetro de impresión de cada clon fue de 120 micras. El diseño de la micromatriz fue de 48 bloques (4 bloques por fila y 12 por columna) y en cada bloque había 16 clones por fila y 17 por columna. Se analizó el flavedo de frutos cítricos no tratados (FNT) y en distintos momentos durante el proceso de inducción de resistencia: a las 24 h después de la inoculación con *P. digitatum* (FI24) y a los 0, 1 y 3 dpt después de realizar el tratamiento térmico de 3 d a 37°C al que se sometieron los frutos infectados (FI0, FI1, FI3). El tejido de flavedo procedía del experimento realizado en Marzo de 2003. Se realizaron tres réplicas técnicas de cada una de las muestras en estudio.

La segunda micromatriz, denominada 12k, está formada por 24.288 clones correspondiendo a 11.241 unigenes. Para la selección de los clones depositados en esta segunda micromatriz se tuvo en cuenta la totalidad de los ESTs disponibles en el CFGP hasta ese momento, entre los cuales se encontraban los obtenidos en las genotecas generadas en el IATA a partir de frutos infectados con *P. digitatum*. En este caso, cada unigen está representado dos veces en la micromatriz. El diámetro de impresión de cada clon fue de 90 micras. También están impresos diversos controles de hibridación, así como controles específicos de tejido o de individuo como es el caso del virus de la tristeza de los cítricos (CTV). El diseño fue de 4 bloques por fila y 12 por columna, y dentro de cada bloque, por 22 clones por fila y 23 por columna. Se analizó tejido procedente del flavedo y del albedo de frutos cítricos de las mismas muestras descritas en el caso de la micromatriz 7k, realizándose tres réplicas biológicas procedentes de los experimentos de Febrero y Marzo de 2003 y de Enero de 2006.

7.2. Marcaje indirecto del cDNA

Incorporación de aa-dUTP en la primera cadena de cDNA mediante la enzima transcriptasa reversa. El cDNA de cadena simple se sintetizó a partir de RNA total de las distintas muestras (muestra problema) o a partir de una mezcla de RNAs creada a partir de concentraciones iguales de RNA de las diferentes muestras a analizar (muestra de referencia). A 20 µg de RNA total en un volumen de 16,5 µL se añadió 1 µL del cebador ‘Anchored Oligo (dT)₂₀’ (Ref. 12577-011, Invitrogen) a una concentración de 2,5 µg µL⁻¹. La reacción se incubó a 70 °C durante 5 min e inmediatamente se transfirió la mezcla de reacción a hielo. La síntesis del cDNA se llevó a cabo en un volumen final de 30 µL, utilizándose las siguientes concentraciones finales de los componentes: tampón reacción de primera hebra 1X (Tris-HCl 50 mM pH 8,3, KCl 75 mM y MgCl₂ 3 mM) (Invitrogen), DTT 20 mM (Invitrogen), dATP 0,5 mM, dCTP 0,5 mM, dGTP 0,5 mM, dTTP 0,16 mM, 5-[3-aminoalil]-2'-deoxiuridina 5'-trifosfato (aa-dUTP) (Sigma) 0,33 mM, inhibidor de ribonucleasa (Invitrogen) 10 U y transcriptasa reversa SuperScript III (Invitrogen) 400 U. Las reacciones se incubaron en un horno de hibridación a 50 °C durante toda la noche.

Hidrólisis y purificación del producto de cadena simple. La reacción se inactivó por calor a 70 °C durante 10 min en el termociclador previamente atemperado y posteriormente se dio un pulso en la centrífuga. Para detener completamente la reacción e hidrolizar el RNA se añadieron 10 µL de NaOH 1 M y 10 µL de EDTA 500 mM pH 8,0. La mezcla se incubó a 70 °C durante 15 min. La

neutralización se llevó a cabo añadiendo 10 μL de HCl 1 M. Para la eliminación de los dNTPs no incorporados y de las aminas libres, las muestras se purificaron con el *kit* de purificación 'MiniElute PCR Purification' (Qiagen). Se mezcló el volumen de reacción de cDNA con 300 μL del tampón PE suministrado con el *kit*. Se homogeneizó y se traspasó a la columna de purificación. Se centrifugó durante 1 min a 10.000 x g y se añadieron 700 μL de tampón de lavado (fosfato potásico (K_3PO_4) 5 mM pH 8,5 y etanol al 80%) y se repitió este paso dos veces. Se transfirió la columna a un nuevo tubo en el que se recogió la muestra. Se añadió a la columna 30 μL de tampón de elución (K_3PO_4 4 mM pH 8,5), se centrifugó durante 1 min a 10.000 x g y se repitió el lavado dos veces más con 30 y 40 μL del tampón de elución hasta alcanzar un volumen final de 100 μL . La eficiencia de la síntesis se determinó espectrofotométricamente. Las muestras de cDNA se secaron a vacío y se almacenaron a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su posterior uso.

Acoplamiento de los fluoróforos al cDNA y purificación: el precipitado sólido de los fluoróforos Cy3 y Cy5 (Amersham Biosciences) se resuspendió con 70 μL de dimetilsulfóxido (DMSO), se alicuotaron 4 μL del fluoróforo resuspendido en diversos tubos, se secaron a vacío y se guardaron a $4\text{ }^\circ\text{C}$ en oscuridad y en presencia de un desecante como sílica gel hasta su uso. Para el acoplamiento del fluoróforo al cDNA sintetizado se resuspendió una alícuota del mismo con 9 μL de carbonato sódico 0,1 M pH 9,0, se mezcló con el cDNA secado y se incubó 2 h a $25\text{ }^\circ\text{C}$ en oscuridad. La muestra de referencia se marcó con el fluoróforo Cy3 y la muestra problema con Cy5. La reacción de acoplamiento se detuvo al añadir 35 μL de acetato sódico 100 mM pH 5,2. Las muestras se purificaron empleando el *kit* de purificación 'MiniElute PCR Purification' (Qiagen), empleando los tampones proporcionados en el mismo. La eficiencia y calidad del marcaje se determinó mediante espectrofotometría (Bittner y col., 2002). Finalmente se redujo el volumen de las muestras hasta unos 5 μL mediante centrifugación en vacío.

7.3. Preparación de las sondas e hibridación de las micromatrices

Las concentraciones finales de la solución de hibridación fueron: formamida al 50 % (v/v), 3X SSC, SDS 0,1 % (p/v), 0,1 mg mL^{-1} de DNA de espermatozoos de salmón y aproximadamente 50 pmoles del cDNA marcado con el fluoróforo en un volumen final de 30 μL . Después de mezclar las muestras de cDNA marcadas con los fluoróforos Cy3 y Cy5, se incubaron en un termociclador a $95\text{ }^\circ\text{C}$ durante 1 min y se mantuvieron al menos 5 min a temperatura ambiente hasta su uso.

Los cristales se introdujeron en la solución de prehibridación (3X SSC, SDS 0,1 % (p/v) y albúmina de suero bovino 0,1 mg mL⁻¹) durante 1 h a 42 °C. Tras ello, las micromatrices se lavaron en agua estéril durante 15 s, en isopropanol durante 2 s, en agua estéril durante 2 s e inmediatamente el cristal se introdujo en un tubo cónico de 50 mL y se centrifugó durante 10 min a 280 x g a temperatura ambiente para secarlo. La micromatriz se colocó en la cámara de hibridación (Gene Machines Hyb Chamber, Genomic Solutions). Sobre la micromatriz se colocó un cubreobjetos (Erie Scientific Company) y por la parte superior del mismo se introdujeron por capilaridad los 60 µL de la solución de hibridación. Se selló la cámara de hibridación y se mantuvo durante toda la noche en un baño a 42 °C. Posteriormente, las micromatrices se lavaron con una solución de 2X SSC y SDS 0,1 % (p/v) a 42 °C hasta soltar el cubreobjetos, seguido de un lavado con la misma solución anterior a 42 °C durante 5 min, uno con 0,1X SSC y SDS 0,1 % (p/v) a 25 °C durante 10 min, cinco de 1 min con 0,1X SSC a 25 °C y un enjuagado final durante 5 s con 0,01X SSC. El cristal se secó mediante centrifugación durante 10 min a 280 x g a temperatura ambiente.

7.4. Adquisición y análisis de datos

Las micromatrices hibridadas fueron escaneadas con un escáner GenePix 4000B (Axon Instruments) asociado al programa informático de análisis de imágenes 'GenePix Pro 6.0' (Axon Instruments). Las ganancias del fotomultiplicador fueron ajustadas de tal forma que el cociente de las intensidades totales fuera aproximadamente 1. El escaneado se llevó a cabo con una resolución de 10 µm, realizando dos pases de lector. La mediana de las intensidades de los píxeles de las señales de hibridación y del ruido de fondo local en cada canal fueron empleados como datos crudos para posteriores análisis. Aquellas sondas que no hibridaron o cuya señal de hibridación fue inferior al doble de la desviación del ruido de fondo local (SNR: 'Signal to Noise Ratio') (SNR<2) fueron marcados como ausentes y descartados de posteriores análisis. También se descartaron aquellas sondas en las que se observaron artefactos o defectos en las señales de hibridación.

Los datos fueron normalizados empleando el paquete informático GEPAS ('Gene Expresión Pattern Analysis Suite v3.1') (Montaner y col., 2006). Primeramente se empleó la aplicación DN MAD (Vaquerizas y col., 2004), descartando los datos de aquellos clones previamente etiquetados como malos o ausentes. En la normalización se restó la mediana del ruido de fondo del valor de adquisición para cada punto, asignando un valor de 0,5 si esta resta

era menor de este valor. Asimismo, se realizó una normalización Lowess dentro de cada micromatriz y entre las diferentes micromatrices. Posteriormente, mediante la aplicación Preprocessing (Herrero y col., 2003) incluida en GEPAS se buscaron réplicas correspondientes al mismo unigen dentro de cada hibridación y se calculó la media aritmética de los mismos, excluyendo de este cálculo aquellos valores que se desviaron más de dos veces de la desviación estándar de la media de todas las correspondientes al mismo unigen. Finalmente se realizó una corrección teniendo en cuenta las réplicas de un mismo tratamiento, de forma que los datos únicos dentro de las tres réplicas fueron descartados.

Los genes con una expresión diferencial significativa entre dos tratamientos (X *vs.* Y) fueron identificados realizando un análisis SAM ('Significant Analysis of Microarrays') (Tusher y col., 2001) mediante el paquete informático TM4 ('Microarray Software Suite') (Saeed y col., 2003). Las diferencias en expresión génica se consideraron significativas cuando el valor de *p* corregido mediante FDR ('False Discovery Rate') fue inferior al 1 %. Un análisis SAM positivo indicaría una mayor expresión del gen en los frutos sometidos al segundo tratamiento (Y). Además, aquellos genes cuya expresión no se detectó en alguno de los dos tratamientos debido, generalmente, a una baja intensidad de señal, también se consideró que presentaban expresión diferencial. Así, cuando no se detectó expresión en X y sí en Y, Y sería positiva, y se considera que la diferencia de expresión sería negativa cuando no se detectara expresión en Y y sí en X. Por lo tanto, obtendríamos dos categorías de genes con expresión diferencial: aquellos obtenidos mediante un análisis SAM y que mostraron expresión en ambos tratamientos, y aquellos en los que en uno de los tratamientos no se detectó expresión.

Para los genes de cítricos incluidos en las micromatrices, las categorías funcionales fueron automáticamente asignadas mediante la comparación con los genes homólogos de *A. thaliana* (Forment y col., 2005). El análisis de anotación funcional por ontologías génicas se realizó con el paquete informático FatiGO+ (BABELOMICS) (Al-Shahrour y col., 2006). En este análisis se emplearon todos los genes con expresión diferencial, tanto los obtenidos mediante análisis SAM como los que no mostraron expresión en alguno de los dos tratamientos, y que poseían su homólogo en *A. thaliana* respecto del conjunto total de los genes de la micromatriz. Dos listas de genes en estudio se convierten en dos listas de términos GO ('Gene Ontology') (<http://www.geneontology.org>) usando la correspondiente tabla de asociación

gen-GO. Empleando un test exacto de Fisher para tablas de contingencia 2x2 se obtuvieron las sobrerrepresentaciones significativas de los términos GO de una de las listas respecto a la otra. Los valores p obtenidos se ajustaron mediante FDR, y los valores de $p < 0,05$ fueron considerados significativos. Así, se obtuvo una representación de los procesos biológicos como un árbol, más concretamente una gráfica acíclica dirigida (DAG: 'Directed Acyclic Graph') en el que cada nodo puede tener más de un parental. Los nodos superiores representan conceptos generales y, a medida que se desciende en el DAG, las definiciones son más precisas.

Además del empleo del FatiGO+ en el estudio de la anotación funcional por ontologías génicas, se utilizó el paquete informático AraCyc 3.5 (Mueller y col., 2003), en concreto de la herramienta 'OMICS Viewer', para la representación gráfica de las rutas metabólicas. En este caso se emplearon aquellos genes con homólogos en *A. thaliana* cuya expresión es significativa en una de las condiciones según el análisis SAM realizado con anterioridad y cuyo valor de inducción/represión en respuesta al tratamiento inductor de resistencia respecto a los frutos no tratados fue superior a dos. También se emplearon aquellos genes cuya expresión no se detectó en una de las dos condiciones analizadas, asignándoles valores extremos de expresión.

8. DETERMINACIONES ENZIMÁTICAS

La obtención de los extractos siempre se efectuó a una temperatura inferior a 4 °C. Independientemente de que el material de partida fuese tejido congelado a -80 °C o polvo de acetona (PA), se siguió la misma pauta de extracción. Se pesaron 100 mg de material vegetal en tubos de tapón de rosca de 2 mL de capacidad conteniendo 5 bolas de acero inoxidable de 2,3 mm de diámetro. El tejido se homogeneizó con el tampón correspondiente, en función de la actividad a ensayar, utilizando un disruptor celular (Mini beadbeater 8 Cell Disruptor, Biospec). La disrupción celular se llevó a cabo a velocidad media durante un minuto. A continuación el extracto celular fue centrifugado a 4 °C y a 11.600 x *g*.

Todas las determinaciones de actividad enzimática se llevaron a cabo en un espectrofotómetro Hewlett-Packard 8452A conectado a un baño termostático de forma que, con la ayuda del programa informático 'HP 89532A UV-vis Operating Software', se efectuó un seguimiento completo de la reacción.

El material vegetal de partida provenía de dos experimentos independientes realizados en naranjas de la variedad 'Navelate' durante las campañas de Febrero y Marzo de 2003. Todas las determinaciones enzimáticas se realizaron en al menos tres extracciones independientes de tejido proveniente del mismo experimento. Los resultados corresponden a los valores medios de dichos ensayos con sus correspondientes desviaciones estándar.

8.1. Actividad peroxidasa (POX)

Aproximadamente 100 mg de tejido de flavedo o albedo se extrajeron con 750 μL de tampón fosfato sódico 0,1 M pH 6,0. El sobrenadante obtenido después de homogeneizar la muestra en el disruptor celular y centrifugarla 10 min se pasó a un tubo de 2 mL de capacidad. Al precipitado resultante se le añadió de nuevo 750 μL del tampón indicado y se procedió igual que anteriormente. El sobrenadante resultante se añadió al anterior, obteniéndose así el extracto enzimático para la determinación de la actividad POX soluble.

La actividad POX asociada a paredes celulares, POX insoluble, se extrajo durante una hora en hielo a partir del sedimento producido en la obtención de la fracción soluble con 750 μL de tampón fosfato sódico 0,1 M pH 6,0 conteniendo cloruro sódico 1 M. Transcurrido este tiempo, se procedió igual que en el caso de la POX soluble, realizando el segundo lavado con este último tampón.

Para la determinación de la actividad POX se empleó el método descrito por Lagrimini y Rothstein (1987) utilizando guayacol 20 mM y agua oxigenada 8 mM como sustratos, pero la reacción tuvo lugar a 30 °C. El volumen final de reacción fue de 2 mL y se ensayaron 200 μL del sobrenadante obtenido procedente de tejido de flavedo, o 300 μL en el caso de albedo. Para ambas fracciones las reacciones se incubaron 15 min, determinándose cada 20 s el valor de la absorbancia a 470 nm. La máxima pendiente de la curva se empleó para calcular la actividad enzimática, que se expresó como el incremento en la absorbancia a 470 nm $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$ de peso fresco de tejido.

8.2. Actividad L-fenilalanina amonio-liasa (PAL)

Se obtuvo polvo de acetona a partir de 10 g de tejido previamente congelado en nitrógeno líquido y triturado con molinillo. El tejido se extrajo durante un minuto en un homogeneizador Politrón PT 45/80 (Kinematica AG, Littau-Lucerne) con 100 mL de acetona fría (-20 °C). El tejido se filtró a través de papel de filtro utilizando un embudo Buchner y se lavó una vez

haciendo pasar 40 mL de acetona fría. El polvo de acetona se dejó secar a temperatura ambiente durante dos horas y se almacenó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis.

En la extracción a partir de tejido de flavedo se emplearon 50 mg del polvo de acetona y 1,5 mL de tampón borato sódico 0,1 M pH 8,8 conteniendo β -mercaptoetanol 20 mM. Después de la homogeneización en el disruptor celular se centrifugó durante 30 min. A continuación, a 1 mL de sobrenadante se le añadió sulfato amónico al 60 %. Se agitó y se mantuvo en hielo durante 30 min. Se centrifugó de nuevo durante 30 min a $11.600 \times g$. El precipitado obtenido se resuspendió con 700 μL del tampón borato sódico 0,1 M pH 8,8 y se centrifugó durante 2 min. El sobrenadante obtenido se desaló empleando las columnas 'Poly-Prep $\text{\textcircled{R}}$ Chromatography' (Bio-Rad) en las que se empaquetaron 2 mL de Sephadex G-25 Medium (Amersham Pharmacia Biotech AB). Se añadieron los 700 μL del sobrenadante en la columna, y posteriormente se adicionó 1 mL de tampón borato sódico 0,1 M pH 8,8, que se recogió en otro tubo. La columna se restituyó para posteriores análisis añadiendo 8 mL del tampón en cuestión. El sobrenadante desalado se empleó para la determinación de la actividad PAL.

En el caso del albedo, y debido a la formación de geles, se recogieron 500 μL del sobrenadante extraído en la primera centrifugación, y se lavó de nuevo el tejido con 1 mL del tampón borato sódico 0,1 M pH 8,8 conteniendo β -mercaptoetanol 20 mM. Después de una nueva centrifugación de 10 min se volvieron a recoger 500 μL de sobrenadante, que se adicionaron a los obtenidos anteriormente. El mililitro total obtenido se procesó entonces igual que se hizo con el flavedo.

La determinación de la actividad PAL se basa en el aumento de absorbancia a 290 nm que se produce por la formación de ácido cinámico a partir de fenilalanina (Riov y col., 1968; 1969). Las reacciones se llevaron a cabo incubando 660 μL del extracto, 200 μL de fenilalanina 100 mM y agua destilada hasta 2 mL. En los blancos se omitió la fenilalanina. La incubación se mantuvo durante 2 h a una temperatura de $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Una unidad de actividad PAL se define como la cantidad de enzima que produce un nanomol de ácido cinámico por hora. El coeficiente de extinción molar del ácido cinámico se calculó a partir de una curva patrón con diferentes concentraciones del mismo, desde 0 a 10 mM, siendo la solución de reacción la misma que en el ensayo, pero sustituyéndose el extracto por 640 μL de tampón de extracción y 20 μL de las diferentes concentraciones de ácido cinámico disuelto en etanol

absoluto. En el cálculo de la actividad se introdujo un factor de corrección para tener en cuenta la cantidad de extracto que fue sometido a precipitación con sulfato amónico.

9. OBTENCIÓN DE SONDAS

En el Laboratorio de Fisiología y Biotecnología de Postcosecha del IATA se habían construido diversas genotecas de cDNA procedentes de frutos cítricos sometidos a estreses bióticos y abióticos. Así, se emplearon los clones incluidos en la genotecas RindPdigS (nomenclatura de los clones: C06052 hasta C06054), RindPdig24 (C06001 hasta C06024, número de placas pares) y FlavCurFr1 (C06001 hasta C06024, número de placas impares). Partiendo del estudio de estas genotecas de cDNA, se seleccionaron aquellos genes implicados en el metabolismo de fenilpropanoides (Tabla 2). A partir de los clones de cDNA originales, se amplificó el fragmento que serviría de molde en la reacción de marcaje mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El volumen final de las reacciones fue de 50 μ L, utilizándose las siguientes concentraciones finales de componentes: tampón de reacción 1X (Tris HCl 10 mM pH 8,3, KCl 50 mM, gelatina 0,001 %) (Ecogen), MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs 0,2 mM, cebador sentido y antisentido 0,4 μ M, EcoTaq 1 U (Ecogen), 1 ng de DNA plasmídico. Se usaron como cebadores los oligonucleótidos FOR17 (5'-GTT TTC CCA GTC ACG AC-3') y REV17 (5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'). Las condiciones de PCR, que se programaron en un termociclador Genius (Techne), fueron: 94 °C durante 3 min, seguido de 35 ciclos que constaban de una desnaturalización a 94 °C durante 30 s, una hibridación a 56 °C durante 45 s y una extensión a 72 °C durante 2 min. Se finalizó con una extensión a 72 °C durante 10 min. Los fragmentos de DNA amplificados se purificaron con el *kit* 'High Pure PCR Product Purification' (Roche Applied Sciences) y se cuantificaron mediante espectrofluorometría empleando el fluoróforo RiboGreen® (Molecular Probes, Inc.).

Las sondas correspondientes al dominio D2 del fragmento 26S rDNA de *C. sinensis* y 28S rDNA de *P. digitatum* se obtuvieron según Ballester y col. (2006), empleando como molde DNA genómico y como cebadores los oligonucleótidos 28SF2 (5'-AGA GAA TTC GGA CTT TGA AAA GAG AGT-3') y 28Z (5'-CCT TGG TCC GTG TTT CAA GAC-3').

Tabla 2. Tabla resumen de los genes analizados por hibridación Northern, indicando el clon, unigen y la genoteca de la que fueron obtenidos, micromatriz en la que están incluidos, proteína con la que presentan mayor similitud y organismo de la que procede.

GEN	CLON	UNIGEN	GENOTECA	SIMILAR A	ORGANISMO	Valor E
PAL1	C06006A08	6764 (7-12k)	RindPdíg24	Fenilalanina amonio-liasa	<i>Citrus dementina</i> \times <i>Citrus reticulata</i>	1E-41
CAH1	C06006C03	C06006C03 (12k)	RindPdíg24	Cinamato 4-hidroxilasa CYP73	<i>Citrus sinensis</i>	1E-143
CAH2	C06002E04	6781 (7-12k)	RindPdíg24	Cinamato 4-hidroxilasa CYP73	<i>Citrus sinensis</i>	1E-135
4CL	C06002D07	2840 (12k)	RindPdíg24	4-cumarato: CoA ligasa	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1E-64
F3H	C06005D12	5299 (12k)	FlavCurFr1	Flavanona 3-hidroxilasa	<i>Citrus sinensis</i>	1E-127
IRL1	C06019G06	7043 (7k)	FlavCurFr1	Isoflavona reductasa	<i>Pyrus communis</i>	4E-98
COMT1	C06052D07	3039 (12k)	RindPdígS	Ácido cafeico 3-O-metiltransferasa	<i>Populus tremuloides</i>	2E-41
COMT2	C06014C04	6786 (7-12k)	RindPdíg24	Ácido cafeico O-metiltransferasa	<i>Rosa chinensis</i>	1E-68
COMT3	C06011B08	2914	FlavCurFr1	Ácido cafeico O-metiltransferasa II	<i>Nicotiana tabacum</i>	1E-72
CCoAOMT1	C06002C11	7170 (7-12k)	RindPdíg24	Cafeil CoA O-metiltransferasa	<i>Ananas comosus</i>	4E-16
CCoAOMT2	C06012F04	7094 (7-12k)	RindPdíg24	Cafeil CoA O-metiltransferasa 6	<i>Nicotiana tabacum</i>	2E-86
CAD1	C06002D02	2554 (12k)	RindPdíg24	Cinamil alcohol deshidrogenasa	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1E-101
CAD2	C06014F09	7075 (7-12k)	RindPdíg24	Cinamil alcohol deshidrogenasa	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	2E-96
CAD3	C06011B04	6699 (12k)	FlavCurFr1	Cinamil alcohol deshidrogenasa	<i>Malus \times domestica</i>	1E-109
SAD	C06052H09	6420 (7-12k)	RindPdígS	Sinapil alcohol deshidrogenasa	<i>Populus tremula</i> \times <i>Populus tremuloides</i>	8E-46
POX1	C06004C04	6911 (7k)	RindPdíg24	Peroxidasa	<i>Populus kitakamiensis</i>	3E-22
POX2	C06021H01	7163 (7k)	FlavCurFr1	Peroxidasa	<i>Gossypium hirsutum</i>	2E-45
CS1	C06053E01	4794 (12k)	RindPdígS	Cafeína sintasa	<i>Camellia sinensis</i>	4E-16
CsACO	C06022E01	7230 (7k)	RindPdíg24	Ác. 1 aminociclopropano 1-carboxílico	<i>Citrus sinensis</i>	1E-101

10. ANÁLISIS NORTHERN

10.1. Preparación de las membranas

Las muestras de RNA desnaturalizado (10 µg) se separaron en geles de agarosa al 1,2 % (p/v) en tampón ácido 3-morfolino-propano-sulfónico (MOPS: MOPS 0,02 M, acetato sódico 10 mM, pH 7,0) conteniendo formaldehído 2,2 M según protocolos habituales (Sambrock y col., 1989). Una vez finalizó la electroforesis, el RNA fue transferido a membranas de nylon Hybond-N+ (Amersham Pharmacia Biotech) usando 20X SSC (cloruro sódico 3 M, citrato sódico 0,3 M, pH 7,0) como medio de transferencia. El RNA se fijó a la membrana mediante irradiación con una dosis de 120.000 µJ cm⁻² de luz UV en un Crosslinker UVC 500 (Hoefer Inc.).

10.2. Marcaje de las sondas

Las sondas se marcaron con $\alpha^{(32}\text{P})\text{-dATP}$ mediante amplificación lineal de DNA monocatenario usando el *kit* ‘Strip-EZTM PCR’ (Ambion, Inc.). El cebador empleado fue FOR17 para marcar las sondas correspondientes al 26S rDNA de *C. sinensis* y al 28S rDNA de *P. digitatum* y T7 (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3') para el resto de los clones. Las condiciones de PCR fueron 94 °C durante 3 min, seguido de 35 ciclos compuestos por una desnaturalización a 94 °C durante 30 s, una hibridación a 52 °C durante 30 s y una extensión a 72 °C durante 1 min. Finalmente se llevó a cabo una extensión a 72 °C durante 10 min. Los productos de PCR obtenidos se purificaron empleando columnas ‘MicrospinTM S 300 HR’ (Amersham-Pharmacia Biotech). Para determinar la radiactividad de las sondas se empleó un contador de centelleo líquido 1409 Rackbeta LKB (LKB Wallac).

10.3. Hibridaciones

Los filtros se prehibridaron durante 2 h a 42 °C con 10 mL del tampón de hibridación ‘UltrahybTM: Ultrasensitive Hybridation Buffer’ (Ambion, Inc.). Tras ello, se añadió la sonda a una concentración final superior a 10⁶ dpm mL⁻¹ y se dejó hibridar toda la noche a 42 °C. Posteriormente, los filtros se lavaron con una solución de 2X SSC y SDS 0,1 % (p/v) a temperatura ambiente durante 15 min, seguido de un lavado a 55 °C durante 15 min con la misma solución anterior y de dos lavados de 30 min a 55 °C con una solución que contenía 0,1X SSC y SDS 0,1 % (p/v). Una vez lavadas las membranas, se expusieron en pantallas ‘BAS MP 2040 Imaging Plate’ (Fuji Photo Film Co., LTD.), que se desintometraron en un equipo FLA-3000 (Fuji Photo Film Co.,

LTD.). La intensidad de las señales de hibridación se cuantificó con el programa Image Gauge V4.0 (Science Lab 98, Fuji Photo Film Co., LTD.). La eliminación de las sondas radiactivas para reutilizar las membranas se llevó a cabo con las soluciones provistas en el *kit* de marcaje 'Strip-EZ™ PCR' (Ambion, Inc.).

Las últimas hibridaciones de cada membrana se realizaron con las sondas correspondientes a los genes ribosómicos 26S de *C. sinensis* y 28S de *P. digitatum*. En las hibridaciones con estas sondas se empleó como tampón de prehibridación y de hibridación el descrito por Church y Gilbert (1984) consistente en fosfato sódico 0,3 M pH 7,2, SDS 7 % (p/v) y EDTA 1 mM. La concentración de la sonda en la solución de hibridación fue aproximadamente 10^5 dpm mL⁻¹. La temperatura empleada en ambas etapas fue de 68 °C. El lavado de los filtros consistió en una incubación de 15 min a temperatura ambiente en 2X SSC conteniendo SDS 0,1 %, seguido de una incubación de 30 min a 68 °C con la misma solución. Finalmente se efectuó un último lavado de 30 min a 68 °C en 0,1X SSC conteniendo SDS 0,1 %. Las membranas se procesaron de la forma descrita anteriormente.

Para la normalización de los valores relativos de acumulación de cada mRNA se dividió la señal de hibridación de la banda por la obtenida utilizando como sonda el fragmento ribosómico de naranja.

11. DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ETILENO

Se determinó la producción de etileno tanto en frutos sometidos al tratamiento de inducción de resistencia mediante una infección y posterior inactivación térmica como en los frutos incluidos en el experimento del desarrollo de la infección. Se introdujeron 10 discos de corteza de naranja de 10 mm de diámetro en tubos de 14 mL que se cerraron herméticamente con tapones de goma y se incubaron a 20 °C durante 15 min. Los discos de un mismo tubo procedían de tres naranjas diferentes y se analizaron tres tubos independientes. De cada tubo se extrajo 1 mL del gas acumulado en el espacio de cabeza con una jeringa hipodérmica y se inyectó en un cromatógrafo de gases (Perkin Elmer, Autosample Analyzer) con detector de ionización de llama. Se utilizó una columna de alúmina (óxido de aluminio activado) de 1 m de longitud y 2 mm de diámetro interno (Supelco, Barcelona) y nitrógeno como gas portador a un flujo de 45 mL min⁻¹. La temperatura de la columna, del inyector y del detector fueron 140 °C, 160 °C y 160 °C, respectivamente. En estas condiciones, el tiempo de retención del etileno fue de 1-1,2 min. La

concentración de etileno se calculó por comparación de la altura de los picos de las muestras con la de un estándar conocido de 1,01 ppm de etileno después de sustraer los niveles ambientales de los tubos vacíos.

12. ANÁLISIS DE COMPUESTOS DEL METABOLISMO SECUNDARIO POR HPLC: FENILPROPANOIDES

12.1. Extracción de compuestos fenólicos

Para la extracción de compuestos fenólicos de la corteza de frutos cítricos se emplearon frutos de las campañas de Marzo de 2003, en el caso del experimento de inducción de resistencia, y de Enero de 2006, en el de desarrollo de la infección. Se pesaron 100 mg de tejido de flavedo o albedo congelado en tubos de tapón de rosca de 2 mL de capacidad conteniendo 5 bolas de acero inoxidable de 2,3 mm de diámetro. El tejido se homogeneizó con 500 μ L de metanol (MeOH) al 80 % utilizando un disruptor celular. La disrupción celular se llevó a cabo a velocidad media durante 1 min. A continuación el extracto celular fue centrifugado a 4 °C y 11.600 x *g*. Al precipitado resultante se le añadió de nuevo 500 μ L de MeOH al 80 % y se procedió igual que anteriormente. Los extractos se unieron y se filtraron a través de filtros de nylon de 0,45 μ m (Teknokroma) e inmediatamente se inyectaron 20 μ L en el cromatógrafo para la determinación de los compuestos fenólicos presentes en las mismas. Se realizaron al menos dos extracciones independientes, realizando una inyección de cada extracción. Se calculó la media y la desviación estándar del total de las inyecciones analizadas para cada tratamiento.

12.2. Determinación de compuestos fenólicos por HPLC

La determinación de compuestos fenólicos se realizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC: 'High Performance Liquid Chromatography'). El equipo empleado contaba con un inyector automático Waters 717 plus, un detector de fotodiodos Waters 2996, un detector de fluorescencia Waters 474, un sistema de bombas Waters 600 y un desgasificador en línea AF de Waters, todos ellos controlados por el programa informático 'Empower' (Waters, Barcelona, España). La fase estacionaria consistía en una columna C18 de fase reversa con un tamaño de partícula de 5 μ m y poro de 100 Å, con una longitud de 250 mm y un diámetro de 4,60 mm (Luna C18 (2), Phenomenex). Se utilizó una precolumna μ Bondapak C18 (Waters) con un tamaño de partícula de 10 μ m y un tamaño de poro de 125 Å. Los compuestos fenólicos fueron

analizados usando un gradiente binario compuesto por agua a pH 2,5 ajustado con ácido fosfórico (Disolvente A) y por acetonitrilo (Disolvente B). La composición inicial de la fase móvil fue 99 % A y 1 % B, cambiando a 70 % A y 30 % B con un gradiente lineal durante 60 min. Durante los siguientes 45 min la composición del solvente cambió a 1 % A y 99 % B, que se mantuvo durante los 10 min posteriores. Finalmente, se restablecieron las condiciones iniciales en 1 min y la columna se reequilibró durante 24 min hasta la inyección posterior. El flujo del eluyente fue de 0,8 mL min⁻¹, la temperatura de la columna se mantuvo constante a 35 °C mediante un horno y el volumen de inyección fue de 20 µL. Cada tipo de muestra se extrajo dos veces de forma independiente y se realizó una inyección de cada una de ellas. Los cambios de absorbancia fueron registrados en un detector de fotodiodos desde 200 a 400 nm durante todo el gradiente. Las longitudes de excitación y de emisión del detector de fluorescencia fueron de 313 y 405 nm, respectivamente. Para cada muestra se obtuvo en el detector de fotodiodos un cromatograma Maxplot, cuyo perfil de cada pico corresponde a la longitud de onda donde la absorbancia es máxima, y un cromatograma en mV en el caso de la fluorescencia. Se obtuvo el valor del área de cada pico mediante integración en cada uno de los perfiles cromatográficos. En aquellos casos en los que se disponía de patrón comercial, la concentración se calculó utilizando una curva patrón del mismo.

12.3. Patrones analizados

El ácido clorogénico, escoparona y umbeliferona se obtuvieron de la casa comercial Aldrich. Los compuestos apigenina, apiina, ácido α -resorcílico, ácido β -resorcílico, ácido γ -resorcílico, quercetina, rutina y ácido salicílico se compraron a Sigma y el ácido cafeico, esculetina, ácido ferúlico, ácido gálico, ácido gentísico, hesperidina, naringenina, ácido *p*-cumárico, quercetina-3- β -D-glucósido, escopoletina, ácido sinápico y ácido trans-cinámico a Fluka. Los compuestos fenólicos 4-hidroxycumarina, didimina, diosmetina, diosmina, narirutina, eriocitrina, eriodictiol, hesperetina, neoeriocitrina, neohesperidina y sinensetina se compraron a Extrasynthèse (Extrasynthèse, Genay, Francia). La isosinensetina, hexametil-O-gosipetina, tetrametil-O-isoescutelareina, hexametil-O-quercetagetina, nobiletina, tetrametil-O-escutelareina, heptametoxiflavona y tangeretina han sido donados por el Dr. Sendra (Sendra y col., 1988). Además, se emplearon los alcaloides teofilina, cafeína, teobromina, ácido 1, 2, 3, 4-tetrahidroharmane 3-carboxílico (THHCA), sanguinarina, berberina, hiosciamina y escopolamina obtenidos de la casa comercial Sigma.

13. DETECCIÓN DE COMPUESTOS FLUORESCENTES POR MICROSCOPIA ÓPTICA

Los frutos cítricos empleados en los experimentos de inducción de resistencia mediante una inoculación previa seguida de un tratamiento térmico (Apartado 3.4 de Materiales y Métodos) se utilizaron para la observación de compuestos fluorescentes en la corteza de los mismos. Para ello, con la ayuda de un escalpelo se practicaron dos cortes transversales en la corteza dando lugar a un fragmento de aproximadamente 3 mm de grosor. Uno de los cortes atravesaba una herida de las practicadas artificialmente en los frutos heridos (H) y en los infectados y curados (I). Los fragmentos se depositaron en un portaobjetos y la observación de los compuestos fluorescentes se realizó con un microscopio estereoscópico binocular SMZ800 (Nikon) equipado con sistema de fluorescencia (Filtro EX 480/40 BA 510).

14. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y ALCALOIDES

14.1. Ensayos *in vitro*

En los ensayos *in vitro* de la actividad antifúngica de diversos compuestos fenólicos y alcaloides se emplearon como medios de cultivo líquido extracto acuoso de flavedo, extracto acuoso de albedo y medio líquido de patata-dextrosa (PDB, Difco Laboratorios, Inc.). Se emplearon los extractos acuosos de la corteza de los frutos cítricos para simular las condiciones de infección de *P. digitatum in vivo*, además de un medio de cultivo rico en nutrientes (PDB) para favorecer el desarrollo del patógeno. Para la preparación de los extractos acuosos de flavedo y albedo, se pesó 1 g de tejido previamente congelado y triturado y se añadieron 10 mL de agua estéril. Se homogeneizó con un Politrón PT 45/80 durante 1 min y se centrifugaron a 27.200 x g durante 15 min. Se recogió el sobrenadante y se filtró a través de velo de novia. Se añadieron 100 µg mL⁻¹ de cloranfenicol y se mantuvo en condiciones estériles hasta su uso. Para la preparación del medio líquido PDB se añadieron 24 g de PDB comercial a 1 L de agua y se filtró a través de un filtro de 0,20 µm de diámetro de poro (Sartorius).

Los ensayos de inhibición del crecimiento *in vitro* de los microorganismos por la presencia de diversos compuestos analizados se realizaron en placas de microtítulo de 96 pocillos (Nunc). La selección de la concentración de los compuestos ensayada se llevó a cabo teniendo en cuenta

la bibliografía existente en la que se indican las concentraciones de estos compuestos en frutos sanos, infectados o sometidos a algún tratamiento de inducción de resistencia y el efecto sobre el desarrollo de diversos patógenos como *P. digitatum* y *P. citrophthora* (Kim y col., 1991; Afek y col., 1999; Kretschmar y Baumann, 1999; Arcas y col., 2000; Nafussi y col., 2001; Herraiz y Galisteo, 2003; Del Río y col., 2004). La concentración máxima del compuesto fue de 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en el caso de escoparona, escopoletina, umbeliferona, escopoletina, hesperetina, y naringenina, de 20.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para hesperidina y naringina, y de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en el caso de teofilina, cafeína, teobromina, THHCA, sanguinarina, berberina, hiosciamina y escopolamina, no superando el 5 % del volumen final. Se realizaron diluciones seriadas reduciendo a la mitad la concentración del compuesto en cuestión. Los stocks concentrados de los compuestos se hicieron en MeOH, excepto en el caso de la hesperidina, que fue en DMSO. La concentración final del patógeno fue de 10^4 conidios mL^{-1} . Los hongos ensayados fueron los descritos en el Apartado 2 de Materiales y Métodos. Se siguió la evolución de su crecimiento durante 7 d, con tres lecturas al día, por medida de la absorbancia a 492 nm (A_{492}) a diferentes tiempos de incubación, en un lector de placas Titertek Multiskan PLUS (Labsystems) asociado al software 'Genesis Lite' (Labsystems). Las placas se incubaron a 24 °C sin agitación. En todos los experimentos el volumen final del ensayo fue de 100 μL por pocillo.

En todos los experimentos se realizaron 3 réplicas por tratamiento. A cada medida de A_{492} se le restó el valor del blanco correspondiente a la media obtenida a partir de pocillos sin microorganismo. Se calcularon la media de A_{492} y la desviación estándar (SD) para cada tratamiento.

14.2. Ensayos *in vivo*

Para realizar los ensayos *in vivo* de diversos compuestos fenólicos se practicaron cuatro heridas equidistantes en el ecuador del fruto con un clavo de 3 mm de profundidad y en ellas se añadieron 5 μL de cada uno de los compuestos o de mezclas de los mismos. Las concentraciones empleadas fueron 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de escoparona, escopoletina y umbeliferona y 20.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de hesperidina. Los stocks concentrados se hicieron en MeOH, excepto para la hesperidina que fue en DMSO. Las diluciones hasta alcanzar la concentración a aplicar se realizaron en MeOH. Los frutos se mantuvieron en una cámara termostataada a 20 °C durante 2 h. Transcurrido este tiempo, se inoculó con *P. digitatum*, aplicando en la misma herida practicada anteriormente 10 μL de una suspensión de conidios a una concentración de 10^5 conidios

mL⁻¹. Se determinó el porcentaje de infección y el área media de la zona de maceración a los 3, 4, 5 y 6 dpi. Estas determinaciones se llevaron a cabo en tres réplicas de cinco frutos por tratamiento, contabilizándose un total de 60 heridas por tratamiento.

RESULTADOS

1. EFECTO DE LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS DE INDUCCIÓN DE RESISTENCIA FRENTE A LA INFECCIÓN POR *P. digitatum*

Se ha estudiado la posible inducción de resistencia en frutos cítricos frente a una infección por *P. digitatum* mediante la utilización de diferentes tratamientos. En la Tabla 3 se muestran el porcentaje de infección y el área media de la zona macerada de naranjas tratadas con distintos compuestos químicos, paredes celulares y hongos no infectivos, e inoculadas posteriormente con *P. digitatum*. En la Figura 8 se muestra, además, el desarrollo de la infección a los 3, 4, 5 y 6 días después de la inoculación (dpi) en los frutos sometidos a los tratamientos más efectivos. Estos experimentos se repitieron tres veces en diferentes campañas obteniéndose resultados similares.

Como se muestra en la Tabla 3, la herida *per se* dio lugar a una reducción significativa tanto en el porcentaje de infección como en el área media de la zona macerada respecto a los frutos no tratados. Teniendo en cuenta esto y que los compuestos y los patógenos no infectivos se añadieron en una herida artificial, se compararán los resultados obtenidos de la aplicación de dichos tratamientos con los obtenidos en los frutos heridos.

Los compuestos químicos ensayados se seleccionaron teniendo en cuenta estudios previos realizados por diversos autores en frutos cítricos (Ortuño y col., 1997; Droby y col., 1999; Porat y col., 2003). En el presente trabajo se observó que la aplicación de Brotomax en heridas practicadas artificialmente en la corteza de los frutos cítricos no redujo significativamente ni el porcentaje de infección ni el área media de la zona macerada respecto a los frutos heridos. Sin embargo, la aplicación de BABA a una concentración de 200 mM redujo de forma significativa la incidencia de la infección causada por el aislado PHI-26 M1 de *P. digitatum*. La aplicación de MeJA redujo el porcentaje de infección cuando el compuesto se añadió a una concentración de 1 μ M. Asimismo, el área media de la zona macerada se redujo significativamente con la aplicación de MeJA a 1 y 100 μ M, obteniéndose en estos casos los menores valores de severidad de la infección.

Además de los compuestos químicos, se procedió al ensayo de paredes celulares de hongos no patógenos y de un aislado patógeno de *P. digitatum* ya que hay descritos muchos ejemplos en los que distintos constituyentes de la pared celular de hongos actúan como elicitores de respuestas de defensa en las plantas (Terry y Joyce, 2004; Ferreira y col., 2006). Para la obtención de las

paredes celulares de *P. digitatum* se ensayaron dos medios de cultivo de crecimiento diferentes. Se utilizó GPY, que es un medio rico en nutrientes (PC-GPY), y un extracto acuoso de flavedo (PC-FLAV) que simularía las condiciones de crecimiento iniciales del patógeno en los frutos cítricos. La aplicación de 1 ó 10 mg mL⁻¹ de paredes celulares de *P. digitatum* obtenidas a partir del crecimiento del hongo en el medio de cultivo GPY también redujo significativamente el porcentaje de heridas infectadas y el área media de la zona de maceración respecto a los frutos heridos. Sin embargo, solamente la aplicación de 1 mg mL⁻¹ de paredes celulares del hongo obtenidas a partir del extracto acuoso de flavedo dio lugar a una reducción significativa de la incidencia y la severidad de la infección.

Tabla 3. Intensidad de la infección (Incidencia y Severidad) estimada a los 6 dpi en frutos de naranjas 'Navel' inoculados con el aislado PHI-26 M1 de *P. digitatum* sometidos previamente a diferentes tratamientos de inducción de resistencia.

TRATAMIENTO	CONCENTRACIÓN	INTENSIDAD DE LA INFECCIÓN	
		Incidencia (%)	Severidad (cm ²)
Frutos no tratados		66,7 a	27,4 a
Frutos heridos		46,7 bc	15,5 cde
Brotomax	0,1 %	46,7 bc	16,1 cd
	0,5 %	41,7 cde	14,2 cdef
	2,0 %	55,0 b	21,1 b
	2 mM	40,0 cdef	10,6 defg
BABA	20 mM	38,3 cdef	12,1 cdefg
	200 mM	33,3 efg	10,8 efg
	1 μM	31,7 fg	7,8 g
MeJA	10 μM	40,0 cdef	10,3 efg
	100 μM	43,3 cd	8,2 g
PC-GPY	1 mg mL ⁻¹	34,2 defg	10,0 fg
	10 mg mL ⁻¹	33,3 efg	10,2 fg
PC-FLAV	1 mg mL ⁻¹	28,3 g	9,7 fg
	10 mg mL ⁻¹	45,8 b	16,9 bc
<i>P. digitatum</i> CECT 2954	10 ⁴ con. mL ⁻¹	41,4 cdef	9,9 fg
<i>P. expansum</i> CMP1	10 ⁴ con. mL ⁻¹	35,0 defg	9,6 fg

* En heridas practicadas en la corteza de los frutos se añadieron 10 μL de los distintos compuestos a analizar: frutos no tratados, frutos heridos, Brotomax, BABA, MeJA, paredes celulares de PHI-26 M1 crecido en medio de cultivo GPY (PC-GPY) o crecido en extracto acuoso de flavedo (PC-Flav), aislado CECT 2954 de *P. digitatum* a una concentración de 10⁴ conidios mL⁻¹ (*P. digitatum* CECT 2954), aislado CMP1 de *P. expansum* a una concentración de 10⁴ conidios mL⁻¹ (*P. expansum* CMP1). Después de una incubación de 48 h a 20 °C, los frutos fueron inoculados con 10 μL del aislado PHI-26 M1 de *P. digitatum* a una concentración de 10⁴ conidios mL⁻¹ en heridas de 3 mm de profundidad practicadas a 0,5 cm de la anterior. La desviación estándar corresponde a tres réplicas de cinco frutos, con cuatro inoculaciones en cada uno. A los 6 dpi se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) empleando el test LSD. Diferencias de $p < 0,05$ fueron consideradas significativas.

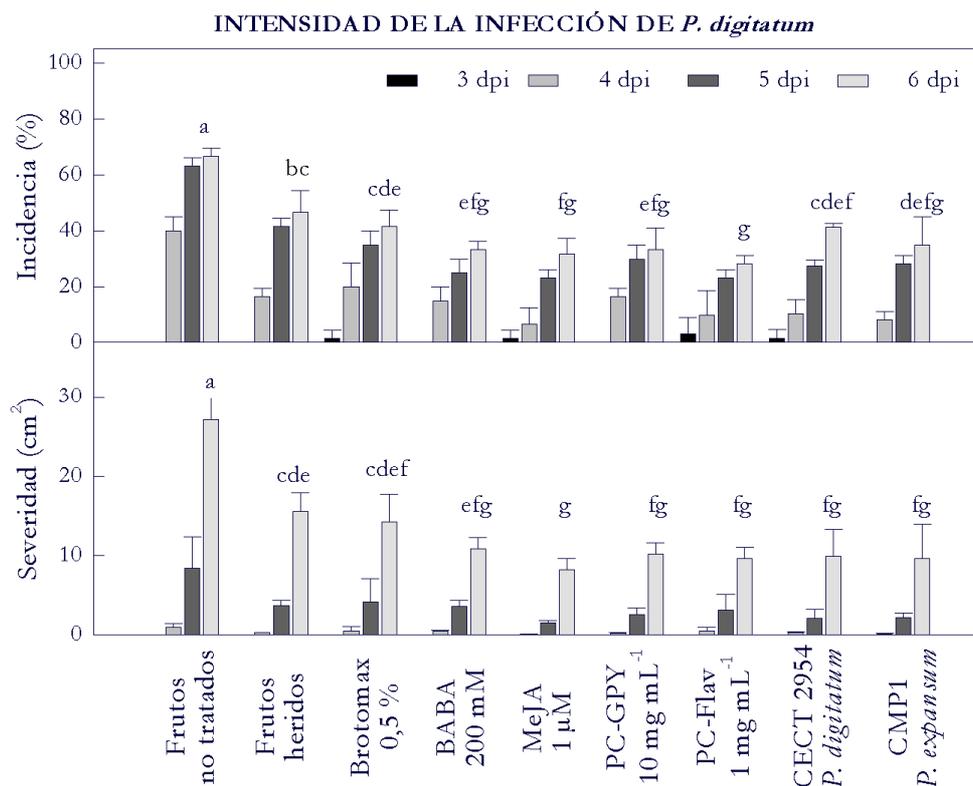


Figura 8. Incidencia (%) y Severidad (cm²) de la infección causada por *P. digitatum* en naranjas 'Navel' sometidas previamente a diferentes tratamientos de inducción de resistencia. En heridas practicadas en la corteza de los frutos se añadieron 10 µL de los distintos compuestos a analizar. Naranjas no tratadas como control, agua estéril en heridas, Brotomax al 0,5 %, BABA a 200 mM, MeJA a 1 µM, paredes celulares de micelio del aislado PHI-26 M1 de *P. digitatum* crecido en medio de cultivo GPY aplicando 10 mg mL⁻¹ o crecido en extracto acuoso de flavedo aplicando 1 mg mL⁻¹, aislado CECT 2954 de *P. digitatum* a una concentración de 10⁴ conidios mL⁻¹, aislado CMP1 de *P. expansum* a una concentración de 10⁴ conidios mL⁻¹. Después de una incubación de 48 h a 20 °C, los frutos fueron inoculados con 10 µL del aislado PHI-26 M1 de *P. digitatum* a una concentración de 10⁴ conidios mL⁻¹ en heridas de 3 mm de profundidad practicadas a 0,5 cm de la anterior. La desviación estándar corresponde a tres réplicas de cinco frutos, con cuatro inoculaciones cada uno. A los 6 dpi se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) empleando el test LSD. Diferencias de $p < 0,05$ fueron consideradas significativas.

Además de estos tratamientos, se estudió la aplicación de dos patógenos no infectivos de los frutos cítricos en las condiciones del ensayo. En la Figura 9 se muestran tanto el porcentaje de heridas infectadas como el área media de la zona de maceración del aislado CECT 2954 de *P. digitatum* y del aislado CMP1 de *P. expansum*, así como del hongo modelo en este trabajo, el aislado PHI-26 M1 de *P. digitatum*. Los dos primeros patógenos no son capaces de infectar los frutos cítricos en las condiciones del ensayo. Sin embargo, PHI-26 M1 infectó prácticamente todos los frutos a los 6 dpi. Solamente la aplicación del patógeno no infectivo CMP1 en los frutos cítricos redujo significativamente la incidencia de una infección posterior frente a los frutos heridos (Tabla 3 y Figura 8). Sin embargo, tanto con la aplicación del aislado CECT 2954 de *P. digitatum* como del aislado CMP1 de *P. expansum* se observó una reducción significativa del área media de la zona macerada.

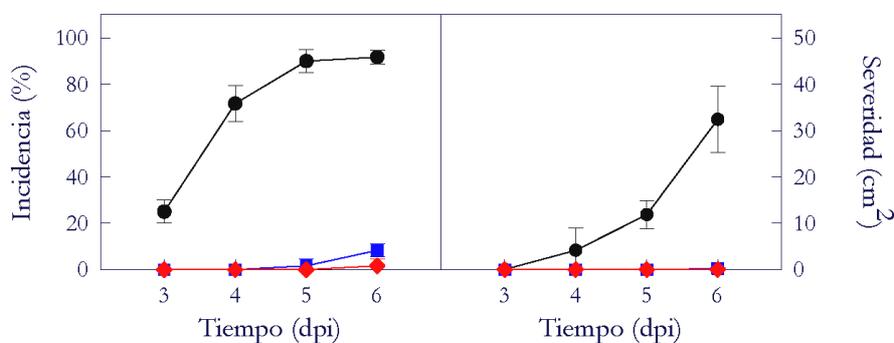


Figura 9. Incidencia (%) y Severidad (cm²) de la infección causada por los aislados PHI-26 M1 (●) y CECT 2954 (●) de *P. digitatum* y CMP1 de *P. expansum* (■) en naranjas 'Navelina' inoculadas con una concentración de 10⁵ conidios mL⁻¹. La desviación estándar corresponde a tres réplicas de cinco frutos, con cuatro inoculaciones cada uno.

Junto con los tratamientos químicos y biológicos enumerados, y basándose en estudios previos de Kim y col. (1991) y en ensayos realizados en el Laboratorio de Fisiología y Biotecnología de Postcosecha del IATA (Ballester, 2001), se realizaron diversos experimentos para estudiar la posible inducción de resistencia mediante una inoculación con el aislado PHI-26 M1 de *P. digitatum* y posterior inactivación térmica del mismo. Los experimentos empleados en el presente trabajo se realizaron durante las campañas del año 2003 al 2006, obteniéndose resultados similares. El tejido recogido en Febrero y Marzo de 2003 y Enero de 2006 se empleó en posteriores análisis. En la Figura 10 se representa la incidencia y la severidad de la infección causada por *P. digitatum* a los 3, 4, 5 y 6 dpi en frutos no tratados (NT), curados (C), heridos y curados (H) y frutos infectados y curados (I), todos ellos inoculados los días 1 y 3 dpt. Además, en la Figura 11 se muestra tanto el porcentaje de infección como el área media de la zona de maceración a los 3, 4, 5 y 6 dpi en frutos infectados y curados e inoculados los 0, 1 y 3 días después del tratamiento (dpt).

La inoculación con el aislado PHI-26 M1 de *P. digitatum* en una herida próxima a la inicial realizada el mismo día de finalizar el tratamiento térmico, redujo la incidencia de la infección en un 29 % respecto a los frutos no tratados a los 6 dpi. La reducción en el área media de la zona macerada en este caso fue del 74 % (Figura 11).

Cuando la inoculación se realizó un día después de finalizar el tratamiento térmico (dpt), se observó una disminución significativa en el porcentaje de infección y en el área media de la zona macerada a los 6 dpi en los frutos heridos y curados o infectados y curados respecto al tratamiento de curado o respecto a frutos no tratados (Figura 10). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los frutos heridos y curados y los infectados y curados.

Si la inoculación con *P. digitatum* se realizaba tres días después de finalizar el tratamiento térmico (Figura 10), el tratamiento de inducción de resistencia redujo la incidencia en más de un 70 % a 3 dpt y la severidad en más de un 85 % respecto a los frutos no tratados. Los tratamientos de infección más curado y de herida más curado también reducían el porcentaje de heridas infectadas y el área de la zona macerada respecto al tratamiento de curado a 3 dpt. Sin embargo, en este caso las diferencias entre ambos tratamientos eran significativas, observándose una menor incidencia y severidad de la infección en el caso del tratamiento de infección más curado.

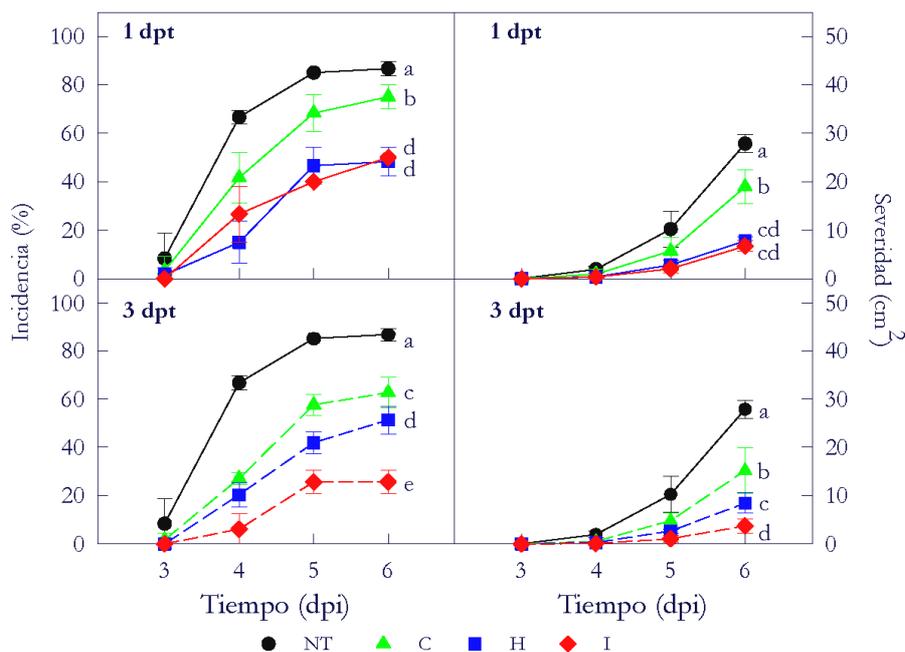


Figura 10. Intensidad de la infección (Incidencia y Severidad) causada por *P. digitatum* en naranjas 'Navelate' sometidas al tratamiento de inducción de resistencia: frutos no tratados (□), frutos curados (3 d a 37 °C) (▲), frutos heridos y curados (◐), frutos inoculados con el aislado PHI-26 M1 de *P. digitatum* y curados (◑). Todos los frutos se incubaron 24 h a 20 °C antes de ser sometidos durante 3 d al tratamiento térmico (4 ó 37 °C) y posteriormente se inocularon con el aislado PHI-26 M1 de *P. digitatum* a una concentración de 10^4 conidios mL⁻¹ a 1 y 3 dpt. Las barras indican la desviación estándar de tres réplicas de cinco frutos, con cuatro inoculaciones cada uno. El análisis de la varianza (ANOVA) se realizó a los 6 dpi. Se empleó el test LSD y diferencias de $p < 0,05$ fueron consideradas significativas.

Al comparar el porcentaje de heridas infectadas en frutos infectados y curados y posteriormente inoculados a los 0, 1 y 3 dpt, se comprobó que la menor incidencia de la infección tenía lugar cuando la inoculación se realizaba tres días después del curado (Figura 11). Así, se obtuvo una disminución progresiva en el porcentaje de heridas infectadas a medida que aumentó el tiempo transcurrido desde la finalización del tratamiento inductor. La mayor reducción en el área media de la zona macerada ocurrió también en frutos infectados y curados, aunque en este caso no se observaron diferencias significativas cuando la inoculación posterior se realizaba 0, 1 ó 3 dpt (Figura

11). Teniendo en cuenta resultados previos obtenidos en el Laboratorio de Fisiología y Biotecnología de Postcosecha del IATA y la mayor reproducibilidad de este tratamiento frente a los anteriores, se seleccionó el tratamiento inductor consistente en una infección con *P. digitatum* y posterior inactivación térmica del patógeno para estudios posteriores.

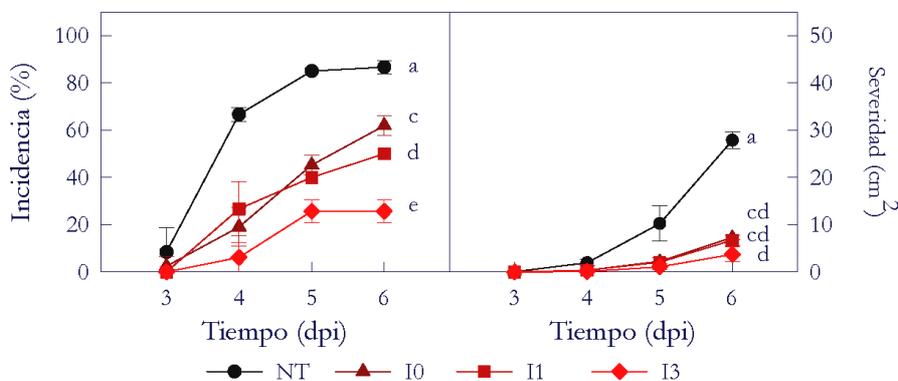


Figura 11. Incidencia y Severidad causada por *P. digitatum* en naranjas 'Navelate' sometidas previamente al tratamiento de inducción de resistencia consistente en una infección con el patógeno y un posterior tratamiento térmico de 3 d a 37 °C. Todos los frutos se incubaron 24 h a 20 °C antes de ser sometidos al curado y, posteriormente, fueron inoculadas con el aislado PHI-26 M1 de *P. digitatum* a una concentración de 10⁴ conidios mL⁻¹ a los 0 (▲), 1 (◊) y 3 (◻) dpt, incluidas las no tratadas (◻). Las barras indican la desviación estándar de tres réplicas de cinco frutos, con cuatro inoculaciones en cada uno. El análisis de la varianza (ANOVA) se realizó a los 6 dpi considerando todos los tratamientos del experimento ya explicados en la Figura 10. Se empleó el test LSD y diferencias de $p < 0,05$ fueron consideradas significativas.

2. ANÁLISIS GLOBAL DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE MICROMATRICES DE cDNA

2.1. Análisis de la expresión de genes incluidos en la micromatriz 7k

Se realizó un primer estudio de la expresión de los genes incluidos en la micromatriz denominada 7k. Esta micromatriz consta de 12.671 clones procedentes de 18 genotecas, que corresponden a 6.333 unigenes (Forment y col., 2005). Aproximadamente el 77 % de estos genes poseen homología con genes de *A. thaliana*. En la Figura 12 se muestra el análisis de anotación

funcional por ontologías génicas de los genes de la micromatriz 7k que presentan homología con genes de *A. thaliana* realizado con el paquete informático FatiGO+ (BABELOMICS) (Al-Shahrour y col., 2006). En la clasificación efectuada atendiendo a procesos biológicos, la mayor parte de los genes con homólogos en *A. thaliana* de la micromatriz 7k están incluidos dentro de los procesos metabólicos celulares (65 %), primarios (58 %) y de macromoléculas (43 %).



Figura 12. Representación de los procesos biológicos del nivel 3 de los genes incluidos en la micromatriz 7k que presentan homología con genes de *A. thaliana*. Este análisis se llevó a cabo con el programa informático FatiGO+ (BABELOMICS).

En la hibridación con la micromatriz 7k se empleó RNA de flavedo de frutos cítricos sometidos al tratamiento de infección más curado procedentes del mismo experimento, realizándose tres réplicas técnicas (Figura 13). El análisis de la micromatriz se inició con la normalización de las señales de hibridación. Posteriormente se realizó un estudio de los genes con expresión diferencial en cada una de

las situaciones analizadas dos a dos mediante un análisis SAM con $FDR < 1\%$. Finalmente, y a partir de los genes con expresión diferencial, se llevó a cabo un estudio de los procesos metabólicos implicados en cada una de las diferentes condiciones estudiadas mediante el empleo de los programas informáticos FatiGO+ y AraCyc 3.5.

Después de la normalización de las señales de hibridación y del análisis de réplicas técnicas (Ver apartado 7.4 de Materiales y Métodos), se analizaron 8.309 genes de los 8.384 genes presentes en la micromatriz 7k, estando 1.391 genes sin secuenciar. Los resultados de las hibridaciones indicaron que solamente 365 genes presentes en la micromatriz mostraron cambios de expresión diferencial como consecuencia del desarrollo de la infección durante 24 h (Tabla 4). El 20 % de estos genes no se detectaron en el flavedo de los frutos no tratados, siendo la mayor parte de función desconocida. Se consideró que estos genes tienen una expresión diferencial positiva. La expresión de 10 genes aumentó más de 2 veces respecto al flavedo de frutos no tratados ($\log_2(FI24/FNT) > 1$): dos genes cuyos homólogos en *A. thaliana* codifican dos ácido salicílico metiltransferasas dependientes de S-adenosil-L-metionina (SAM), una anexina, una proteína de unión a cobre, un homólogo a DNA polimerasa y cinco genes de función desconocida. El nivel de expresión de 235 genes se redujo como consecuencia del desarrollo del patógeno durante 24 h, no detectándose expresión en más del 50 % de los mismos como consecuencia del desarrollo de la infección. Así, los genes cuya expresión no se detectó en FI24 se consideraron con expresión diferencial negativa. Entre los 12 genes que más redujeron su nivel de expresión más de 2 veces a las 24 hpi se detectaron cuatro genes que codifican proteínas inducibles por la luz ('Early

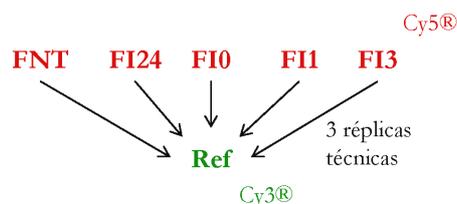


Figura 13. Representación gráfica del diseño experimental empleado en la hibridación de la micromatriz 7k. La referencia estaba formada por una mezcla equitativa de cada una de las muestras a analizar.

light induced’), que presentan el mismo homólogo en *A. thaliana*, y cinco con función desconocida.

Tabla 4. Número de genes incluidos en la micromatriz 7k que mostraron expresión diferencial como consecuencia del tratamiento de inducción de resistencia en el flavedo de frutos cítricos. Se consideraron genes con expresión diferencial cuando en el análisis SAM (X vs. Y) con FDR < 1 % eran positivos (se inducen en la segunda condición y hay valor de expresión en ambos casos) o negativos (se reprimen en la segunda condición y hay valor en las dos muestras). Además, también se consideró con expresión diferencial positiva aquellos genes en los que no se detectó valor en X pero sí en Y, o negativos si en Y no había expresión pero sí en X (Expresión específica).

M-7k	SAM		Expresión específica		Σ_+	Σ_-	Σ_{total}
	+	-	+	-			
FNT-FI24	62	63	68	172	130	235	365
FNT-FI0	1.418	1.240	67	248	1.485	1.488	2.973
FNT-FI1	1.755	1.399	56	285	1.811	1.684	3.495
FNT-FI3	866	808	94	123	960	931	1.891
FI24-FI0	1.87	1.193	112	186	1.599	1.379	2.978
FI24-FI1	1.897	1.424	91	213	1.988	1.637	3.625
FI24-FI3	767	610	194	116	961	726	1.687
FI0-FI1	1.146	1.173	145	193	1.291	366	2.657
FI0-FI3	776	586	254	103	1.030	689	1.719
FI1-FI3	1.006	747	302	90	1.308	837	2.145

El almacenamiento posterior a 37 °C durante 3 d incrementó el nivel de expresión de 1.599 genes, 288 de los cuales se indujeron más de 2 veces respecto a los frutos infectados durante 24 h. Entre los que se indujeron más de 4 veces se encontraban cuatro O-metiltransferasas (OMTs), una taumatina, una quitinasa, una proteína homóloga a la proteína 6 de tolerancia a la salinidad en *A. thaliana*, una proteína de unión a RNA, una proteína LEA (‘Late-embriogenesis abundant’) y una GGPP sintasa. Se observó una reducción en la expresión del 17 % de los genes de la micromatriz, entre los que destacaron 379 que se reprimieron más de 2 veces respecto a los frutos infectados durante 24 h. Es el caso de diversos genes todavía no secuenciados y de otros que codifican dos ácido salicílico metiltransferasas dependientes de SAM, tres genes regulados por las bajas temperaturas (*COR15*) y tres proteínas inducibles por la luz. Además, el nivel de expresión de 186 genes descendió a los 0 dpt hasta no detectarse, entre los que se encuentran una POX, una acuaporina y

una proteína inducible por la luz, además de diversos genes de función desconocida.

El tratamiento de infección más curado provocó a 1 dpt una variación significativa del nivel de expresión de casi el 42 % de los genes incluidos en la micromatriz 7k respecto de los frutos no tratados (FNT). Se observó un aumento en el nivel de expresión de 1.811 genes respecto a FNT, de los cuales 190 mostraron una inducción mayor de 2 veces respecto al flavedo de frutos no tratados. En la Tabla 5 se presentan los 30 genes con mayor aumento en el nivel de expresión como consecuencia del tratamiento de infección más curado a 1 dpt. Entre estos genes se encuentran cinco que codifican diversas OMTs, dos ACOs, una taumatina y una proteína homóloga a la proteína 6 de tolerancia a la salinidad en *A. thaliana*, aparte de diversos genes todavía no secuenciados o sin homología en *A. thaliana*. El nivel de expresión de otros 56 genes solamente se detectó en los frutos infectados y curados a 1 dpt y no en los no tratados, incluyendo un gen que codifica una OMT, genes que codifican proteínas de estrés como una LEA, una SOD y una tiorredoxina y, mayoritariamente, genes que no tienen homólogo en *A. thaliana* o que no estaban secuenciados (Tabla 6). La expresión de 750 genes aumentó solamente en respuesta al tratamiento inductor a 1 dpt (Figura 14), encontrándose una PAL, una glutamato deshidrogenasa y diversas proteínas de función desconocida o genes no secuenciados entre los 21 que se indujeron más de 2 veces. De los 1.684 genes cuya expresión disminuyó en el flavedo de frutos infectados y curados a 1 dpt se encuentran tres proteínas inducibles por la luz, dos POXs y un gen *COR15* con una reducción de más de 4 veces (Tabla 7), así como 285 genes que presentan homología con proteínas de función muy diversa, cuya expresión descendió hasta no detectarse a 1 dpt (Tabla 8). Casi 500 genes redujeron su expresión solamente en el flavedo a 1 dpt en respuesta al tratamiento inductor (Figura 14).

Tres días después del tratamiento de infección más curado se detectó un aumento en el nivel de expresión de 960 genes presentes en la micromatriz, 139 de ellos con un nivel de inducción de más de 2 veces frente a los frutos no tratados. Aparte de los genes que codifican OMTs y la proteína taumatina, inducidos también a 1 dpt, otros genes que codifican diversas proteínas LEA y la proteína miraculina se indujeron más de 2 veces respecto a los frutos no tratados. Además, 94 genes que no se detectaron en los frutos no tratados mostraron expresión a 3 dpt en respuesta al tratamiento inductor. Casi el 12 % de los genes presentes en la micromatriz 7k redujeron su expresión a 3 dpt.

Entre los 17 que redujeron la expresión más de 4 veces respecto al flavedo de frutos no tratados se encuentran cuatro proteínas inducibles por la luz, dos POXs, una poligalacturonasa, una aciltransferasa y diversos genes con función desconocida. La expresión de 750 genes aumentó solamente en el flavedo de frutos infectados y curados a 1 dpt, mientras que solamente fueron 122 genes a los 3 dpt (Figura 14). Igualmente, el número de genes cuyo nivel de expresión se redujo específicamente a 1 dpt fue mayor que a 3 dpt. La expresión de 2.145 genes se alteró como consecuencia de la infección más curado a 3 dpt respecto a 1 dpt.

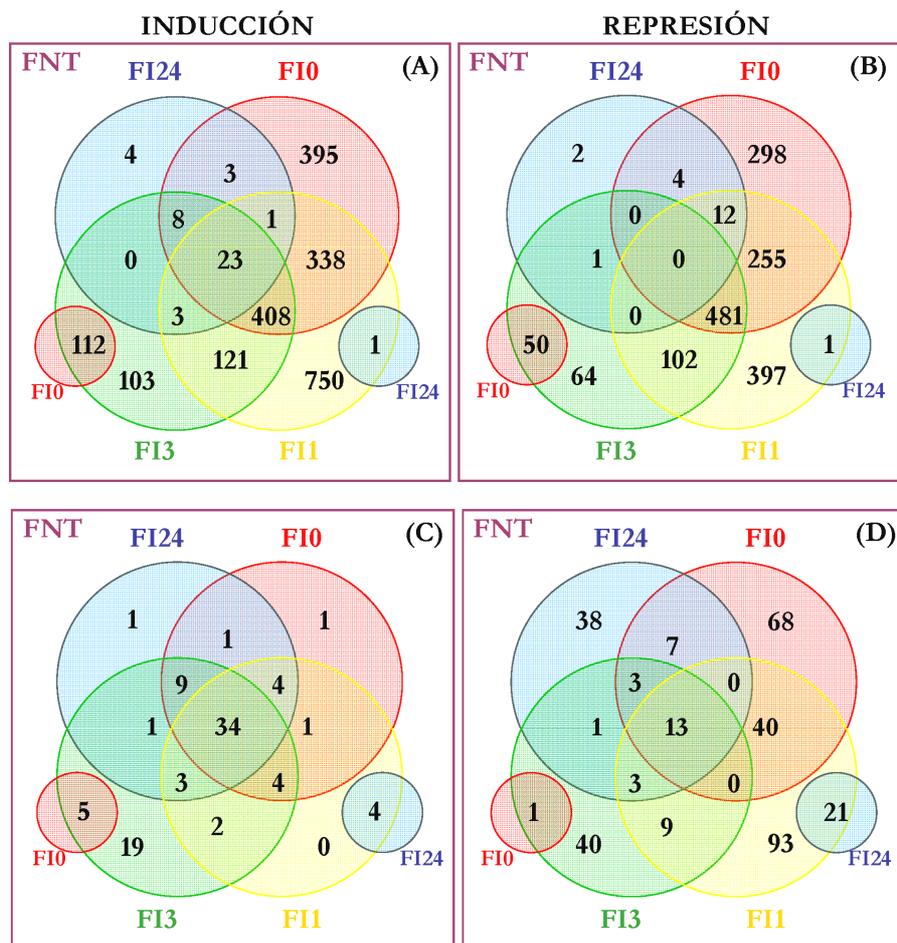


Figura 14. Diagramas de Venn que indican el número de genes incluidos en la micromatriz 7k con expresión diferencial en el flavedo de frutos cítricos en las distintas condiciones analizadas respecto a los frutos no tratados. Se indica el número de genes que fueron significativos en el análisis SAM con $FDR < 1\%$, excluyendo aquellos en los que una de las muestras no mostraba valor de expresión (A-B), y el número de genes que, siendo o no significativos mediante el análisis SAM, se expresaban solamente en una de las condiciones analizadas (C-D).

Tabla 5. Listado de los 30 genes incluidos en la micromatriz 7k que más aumentaron la expresión en el flavedo como consecuencia del tratamiento de inducción de resistencia a 1 dpt. Se muestra el unigen al que pertenecen, la homología con *A. thaliana*, si es que la presentan, y el \log_2 del cociente de: A) FI24/FNT, B) FI0/FNT, C) FI1/FNT y D) FI3/FNT. Fueron considerados significativos si el valor de *p*-corregido mediante FDR fue menor del 1 % en el análisis estadístico SAM. En negrita se indican aquellos genes con expresión diferencial en las condiciones comparadas.

Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	A	B	C	D
Secuencia no disponible	C04002B12		1,08	3,73	5,39	3,35
Catecol OMT [<i>Nicotiana tabacum</i>]	1816	At5g54160	0,46	2,49	4,22	3,18
COMT II [<i>Nicotiana tabacum</i>]	5454	At5g54160	0,43	2,65	4,18	3,18
ACO [<i>Gossypium</i> sp.]	4356	At1g05010	0,58	2,32	3,91	2,14
Secuencia no disponible	C05039C02		0,43	2,24	3,85	1,99
Catecol OMT III [<i>Nicotiana tabacum</i>]	6947	At5g54160	0,66	1,31	3,80	2,19
COMT [<i>Rosa chinensis</i>]	5951	At5g54160	-0,24	1,78	3,64	2,08
Secuencia no adecuada para BLAST	C08006D11		0,29	2,34	3,47	1,89
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	6144		0,14	2,68	3,46	4,94
Catecol OMT III [<i>Nicotiana tabacum</i>]	5970	At5g54160	-0,05	1,00	3,32	1,60
Taumatina 1 [<i>Castanea sativa</i>]	6959	At1g20030	-0,70	2,10	3,12	2,68
ACO [<i>Citrus sinensis</i>]	7230	At1g05010	0,06	1,61	3,12	1,35
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	C08007D08		-0,01	1,99	3,09	2,72
Prot 6 tolerancia a salinidad [<i>Beta vulgaris</i>]	2435	At4g27000	0,40	2,86	3,01	2,53
Transportador [<i>A. thaliana</i>]	6218	At3g13050	-0,14	0,53	2,71	0,92
Secuencia no disponible	C18013E11		0,00	1,40	2,71	1,55
L-asparaginasa	4517	At5g08100	0,29	0,66	2,49	0,48
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	2357		0,25	0,10	2,44	1,14
Dicianina [<i>Lycopersicon esculentum</i>]	4496	At5g20230	0,65	1,42	2,40	1,75
Secuencia no disponible	C02013H11		0,15	0,93	2,36	0,84
SAM sintetasa [<i>Litchi chinensis</i>]	6344	At3g17390	0,29	1,17	2,30	1,00
Secuencia no disponible	C04006B05		0,16	1,24	2,25	1,83
Transportador [<i>A. thaliana</i>]	3103	At5g13750	0,50	1,28	2,14	1,19
LTP [<i>Pisum sativum</i>]	6404	At2g38540	-0,04	1,06	2,13	1,15
Secuencia no disponible	C04022C08		-0,28	1,03	2,12	1,09
Secuencia no adecuada para BLAST	C02020H10		-0,20	0,01	2,10	0,16
COG0312	C08010E07		-0,12	1,05	2,07	1,33
Secuencia no adecuada para BLAST	C08006F11		-0,27	-0,17	2,06	0,79
Prot unión calcio [<i>A. thaliana</i>]	5705	At5g39670	0,23	1,47	2,05	1,40
Metionina sintasa (MPI7_60) [<i>A. thaliana</i>]	7178	At5g17920	-0,25	-0,07	1,98	0,08

Tabla 6. Listado de los 30 primeros genes incluidos en la micromatriz 7k que mostraron mayor inducción como consecuencia del tratamiento de inducción de resistencia a 1 dpt y no se detectaron en los frutos no tratados. Se consideraron con expresión diferencial positiva aquellos genes que no mostraron valor de expresión en FNT y sí en la otra muestra, asignándoles el símbolo +. El listado está ordenado de mayor a menor expresión en FI1. (Ver nomenclatura en la Tabla 5).

Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	A	B	C	D
COMT [<i>Zinnia elegans</i>]	6305	At5g54160	+	+	+	+
Secuencia no disponible	C05039B11		+	+	+	+
Secuencia no disponible	C05031E01		+		+	
Secuencia no adecuada para BLAST	C16003F04			+	+	
Prot dedos de zinc (C3HC4) [<i>A. thaliana</i>]	C04018G11	At3g26730	+	+	+	+
F15O4.20 [<i>A. thaliana</i>]	C02014B09	At1g35620	+	+	+	+
Prot gamma-glutamyltranspeptidasa [<i>A. thaliana</i>]	C04013E11	At4g29210			+	+
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	C02014E10		+		+	
Secuencia no disponible	C05031F12		+	+	+	+
Secuencia no adecuada para BLAST	C02014E01		+	+	+	+
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	C08016D12		+	+	+	+
dj1158H2.1	C08003E08				+	
Secuencia no disponible	C03001E07		+	+	+	+
Secuencia no adecuada para BLAST	C08017C02		+	+	+	+
OSJNBa0035B13.1 [<i>Oryza sativa</i>]	C02010C10	At1g51610	+	+	+	+
Prot quinasa transmembrana rica en leucina [<i>A. thaliana</i>]	C03001A07	At3g28450	+	+	+	+
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	C08005D09			+	+	+
Secuencia no disponible	C20004F06		+	+	+	
Secuencia no adecuada para BLAST	C18016A06		+	+	+	+
Secuencia no adecuada para BLAST	C18014H11		+	+	+	+
Secuencia no disponible	C05031D02		+	+	+	
Secuencia no disponible	C05031E07		+	+	+	+
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	C08007G02		+	+	+	+
Factor transcripción homeobox (KNAT6) [<i>A. thaliana</i>]	C02004E05	At1g70510	+	+	+	+
LEA5 [<i>Citrus sinensis</i>]	5387	At4g02380	+		+	
RNA polimerasa II 13.6 kDa [<i>A. thaliana</i>]	569	At3g52090	+	+	+	+
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	C08003C12		+	+	+	+
SOD Cu-Zn [<i>Arvicennia marina</i>]	1893		+	+	+	+
Tiorredoxina [<i>A. thaliana</i>]	595	At1g50320	+	+	+	+
Secuencia no disponible	C05039E01		+		+	+

Tabla 7. Listado de los 30 genes incluidos en la micromatriz 7k que más redujeron la expresión en el flavedo como consecuencia del tratamiento de inducción de resistencia a 1 dpt. Se muestra el unigen al que pertenecen, la homología con *A. thaliana*, si es que la presentan, y el \log_2 del cociente de: A) FI24/FNT, B) FI0/FNT, C) FI1/FNT y D) FI3/FNT. Fueron considerados significativos si $FDR < 1\%$ en el análisis estadístico SAM (X vs. Y). Además, también se consideraron con expresión diferencial negativa aquellos genes cuya expresión no se detectó en respuesta al tratamiento inductor y sí en FNT. En negrita se indican los genes con expresión diferencial.

Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	A	B	C	D
Secuencia no disponible	C02003B08		-1,46	-5,85	-4,12	-4,62
Secuencia no adecuada para BLAST	C20005B10		-1,67	-4,92	-3,63	-3,56
Prot inducible por la luz [<i>A. thaliana</i>]	7142	At3g22840	-1,54	-	-3,37	-2,76
Prot inducible por la luz [<i>A. thaliana</i>]	546	At3g22840	-1,48	-3,79	-3,12	-3,71
Homólogo a subunidad 1 del isoenzima poligalacturonasa [<i>A. thaliana</i>]	6564	At1g70370	0,33	-1,85	-3,01	-2,39
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	2295		-1,39	-3,41	-3,01	-2,82
Fragmento de mucina de <i>Rhesus macaque</i>	231		0,07	-2,20	-2,84	-2,46
POX [<i>Gossypium</i> sp.]	7179	At4g21960	0,20	-1,31	-2,79	-2,27
Prot inducible por la luz [<i>A. thaliana</i>]	7155	At3g22840	-1,25	-3,33	-2,75	-2,76
Galactinol sintasa [<i>Ajuga reptans</i>]	2304	At1g60470	-1,41	-3,18	-2,60	-2,76
ATPasa tipo AAA [<i>A. thaliana</i>]	6345	At1g07510	-0,02	-1,04	-2,49	-0,85
Receptor quinasa [<i>A. thaliana</i>]	C20007G06	At1g10860	0,09	-1,43	-2,45	-2,44
Receptor de benzodiazepina [<i>A. thaliana</i>]	6697	At2g47770	-0,92	-2,55	-2,44	-1,30
Prot ASR [<i>Ginkgo biloba</i>]	6637	At4g35800	0,05	-0,84	-2,43	-0,95
Secuencia no disponible	C04004B01		-0,24	-3,03	-2,40	-1,25
Secuencia no disponible	C04004C11		-0,29	-2,91	-2,38	-1,22
Secuencia no adecuada para BLAST	C04002F10		-0,12	-2,94	-2,38	-1,16
COR15 [<i>Citrus clementina</i> x <i>Citrus reticulata</i>]	6647	At1g54410	-0,41	-2,99	-2,38	-1,31
Secuencia no disponible	C04004C01		-0,31	-2,91	-2,38	-1,44
Secuencia no adecuada para BLAST	C03006B08		-0,33	-2,82	-2,37	-1,48
Secuencia no disponible	C04005H11		-0,40	-2,99	-2,35	-1,24
Secuencia no disponible	C04004E12		-0,52	-2,71	-2,33	-1,36
Secuencia no adecuada para BLAST	C04004A03		-0,32	-2,76	-2,32	-1,41
POX [<i>Gossypium</i> sp.]	7163	At4g21960	0,11	-1,17	-2,31	-2,33
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	C08007B08		0,07	-1,07	-2,29	-0,81
Secuencia no disponible	C04004B03		-0,33	-2,82	-2,29	-1,37
Prot aspartil proteasa [<i>A. thaliana</i>]	4261	At3g18490	0,11	-0,77	-2,25	-1,19
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	5381		0,38	-0,93	-2,25	-1,50
Secuencia no disponible	C05018G10		-0,61	-2,66	-2,24	-1,22
T3F17.27 [<i>A. thaliana</i>]	6980	At2g46080	-0,42	-2,89	-2,23	-1,43

Tabla 8. Listado de los 30 primeros genes incluidos en la micromatriz 7k que mostraron expresión diferencial negativa como consecuencia del tratamiento de inducción de resistencia a 1 dpt ya que no se detectaron en respuesta al tratamiento inductor pero sí en los frutos no tratados. Los valores se han ordenado de mayor a menor expresión en FNT (Ver nomenclatura en la Tabla 7).

Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	A	B	C	D
Prot inducible por la luz	854	At3g22840	-1,22	-3,49	-	-2,34
Acuaporina PIP1-1 [<i>Vitis berlandieri</i> x <i>Vitis rupestris</i>]	6941	At4g00430	-0,54	-	-	-1,86
Secuencia no disponible	C04004C10		-	-	-	-1,13
Prot integral de membrana [<i>A. thaliana</i>]	2327	At3g06390	-0,39	-1,48	-	-0,86
Regulador transcripcional COG0864	C08017B09		-0,22	-0,32	-	-0,51
Secuencia no adecuada para BLAST	C18015B11		0,31	-	-	-0,17
Secuencia no disponible	C03001B09		-0,14	-0,56	-	-0,26
Secuencia no disponible	C05006C09		-	-	-	-0,41
Secuencia no disponible	C05022D10		-	-	-	-0,38
Prot fosfatidilinositolglicano clase N(PIG-N)	C03002G05	At3g01380	-0,25	-0,60	-	-0,22
Precursor LTP [<i>Gossypium hirsutum</i>]	6113	At2g38540	-0,28	-0,97	-	-0,45
Factor transporte nuclear 2 (NTF2) [<i>A. thaliana</i>]	4199	At1g71480	0,88	-0,35	-	-0,50
Secuencia no disponible	C03001A03		-0,19	-0,35	-	-0,21
Secuencia no disponible	C05006B07		-	-	-	-0,47
Prot ribosomal S13 [<i>Panax ginseng</i>]	6322	At4g00100	-0,38	-	-	-0,62
Secuencia no disponible	C05042H07		-	-	-	0,14
Prot no homóloga en <i>A. thaliana</i>	2206		-	-0,38	-	0,01
Secuencia no adecuada para BLAST	C18013F02		0,34	-0,26	-	-0,04
Peptidil-prolil cis-trans isomerasa TLP38	C02013F11	At3g15520	-0,42	-	-	-0,39
Secuencia no disponible	C05022D12		-	-	-	-
Secuencia no disponible	C05006A02		-	-	-	-0,33
Prot DEMETER [<i>A. thaliana</i>]	4198	At2g36490	0,39	-0,09	-	-
OSJNBb0017I01.21 [<i>Oryza sativa</i> (cv. <i>japonica</i>)]	C08002D12	At1g65070	-	-0,60	-	-0,55
Secuencia no disponible	C04005E12		0,15	-0,58	-	-
Flavonoide 3'-hidroxilasa [<i>Glycine max</i>]	6981	At5g07990	-0,45	-0,57	-	-0,68
Secuencia no adecuada para BLAST	C07003H12		-0,11	-	-	-0,01
Secuencia no adecuada para BLAST	C08004G11		0,03	-0,16	-	-0,11
Secuencia no disponible	C05006B05		-	-	-	-0,17
Secuencia no adecuada para BLAST	C16003F09		-	-	-	-0,17
Prot no homóloga en <i>A. thaliana</i>	C08002F03		-0,33	-0,24	-	-0,93

Teniendo en cuenta la importancia de las proteínas PR, del estrés oxidativo y de los procesos de la transcripción y señalización, se realizó un estudio más exhaustivo de los cambios de expresión de los genes presentes en la micromatriz 7k que codifican proteínas implicadas con los mismos. Así, de los 64 genes relacionados con el estrés oxidativo incluidos en esta micromatriz, 13 aumentaron la expresión como consecuencia de la infección y posterior inactivación térmica del patógeno a 1 dpt respecto a los frutos no tratados. Estos 13 genes corresponden a dos SODs, tres POXs y ocho GSTs (Tabla 9). Cabe destacar la presencia de una SOD que no se detectó en el flavedo de frutos no tratados, pero sí se observó en el resto de los tratamientos. En cuanto a los genes que redujeron la expresión en respuesta al tratamiento inductor se encontraron 16, que codifican dos CATs, dos APXs, cuatro POXs, tres glutation peroxidasas, dos GSTs y dos monodeshidroascorbato reductasas. De éstos, una APX y una POX no se detectaron en los frutos infectados y curados a 1 dpt.

Tabla 9. Genes incluidos en la micromatriz 7k que codifican proteínas relacionadas con el estrés oxidativo y que mostraron expresión diferencial en el flavedo de naranjas 'Navelate' como consecuencia del tratamiento inductor de resistencia a 1 dpt. Se muestra el unigen al que pertenecen, la homología con *A. thaliana*, si es que la presentan, y el \log_2 del cociente de las intensidades relativas de: A) FI24/FNT, B) FI0/FNT, C) FI1/FNT y D) FI3/FNT. Fueron considerados significativos si $FDR < 1\%$ en el análisis estadístico SAM (X vs. Y). También se consideraron con expresión diferencial aquellos genes en los que no se detectó expresión en uno de los dos tratamientos. Se asignó el signo + cuando no se detectó expresión en los frutos no tratados y sí en Y, y el signo - cuando se detectó expresión en los frutos no tratados (X) y no en respuesta al tratamiento inductor. Los genes con expresión diferencial se indican en negrita.

Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	A	B	C	D
GST [<i>Glycine max</i>]	2496	At2g30860	0,63	0,98	1,68	1,12
GST [<i>Glycine max</i>]	5575	At2g30860	0,64	0,99	1,58	0,93
GST [<i>Cucurbita maxima</i>]	4728	At2g29420	0,60	0,82	1,28	1,04
GST [<i>Phaseolus acutifolius</i>]	549	At2g30860	0,39	0,73	1,13	0,62
POX [<i>Populus balsamifera</i> subsp. <i>trichocarpa</i>]	6991	At2g38380	0,27	0,03	0,75	0,43
GST [<i>Glycine max</i>]	6777	At2g29420	-0,06	0,29	0,54	0,59
GST [<i>Glycine max</i>]	6484	At3g09270	0,13	0,29	0,48	0,62
GST [Papaya]	7087	At1g78380	-0,03	0,42	0,46	0,31
GST [<i>A. thaliana</i>]	4853	At5g45020	-0,03	0,02	0,46	-0,03
POX [<i>A. thaliana</i>]	C08008E07	At4g30170	-0,17	0,16	0,44	0,17
SOD [<i>Avicennia marina</i>]	1930	At1g08830	0,26	0,40	0,39	0,22
POX [<i>Nicotiana tabacum</i>]	6799	At1g71695	-0,06	0,52	0,34	0,27
SOD [<i>Avicennia marina</i>]	1893	At1g08830	+	+	+	+

Continuación Tabla 9.

Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	A	B	C	D
POX [<i>Gossypium</i> sp.]	7179	At4g21960	0,20	-1,31	-2,79	-2,27
POX [<i>Gossypium</i> sp.]	7163	At4g21960	0,11	-1,17	-2,31	-2,33
Glutation peroxidasa [<i>A. thaliana</i>]	4322	At2g25080	-0,56	-1,57	-1,34	-1,30
Glutation peroxidasa	6317	At4g11600	-0,17	-0,60	-1,07	-0,22
Glutation peroxidasa [<i>Citrus sinensis</i>]	6875	At4g11600	-0,24	-0,40	-0,97	-0,08
APX [<i>Spinacia oleracea</i>]	4495	At1g07890	0,05	0,21	-0,75	-0,12
Tioredoxin peroxidasa [<i>Nicotiana tabacum</i>]	6029	At5g06290	0,03	-0,48	-0,57	-0,37
POX [<i>Oryza sativa</i>]	C07004C08	At1g60420	-0,18	-0,10	-0,56	-0,88
Monodehidroascorbato reductasa [<i>Cucumis sativus</i>]	4237	At3g09940	-0,03	-0,61	-0,52	-0,23
Monodehidroascorbato reductasa [<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>]	6753	At3g52880	-0,15	-0,44	-0,41	-0,11
CAT 1	6855	At4g35090	-0,17	0,05	-0,41	0,01
CAT [<i>Prunus persica</i>]	7175	At4g35090	-0,09	-0,05	-0,34	0,02
GST [<i>Carica papaya</i>]	4851	At1g78380	-0,06	0,03	-0,34	-0,29
GST [<i>Euphorbia esula</i>]	7183	At2g47730	-0,06	0,24	-0,33	-0,43
POX [<i>Populus balsamifera</i>]	6502	At5g06720	-0,18	-	-	-
APX [<i>Gossypium</i> sp.]	6179	At4g35000	0,13	0,03	-	-0,19

En la micromatriz 7k estaban incluidos 54 genes que codifican proteínas PR. Aunque más del 70 % de estos genes modificó significativamente la expresión en respuesta al tratamiento inductor a 1 dpt respecto a los frutos no tratados, estos cambios generalmente fueron pequeños (Tabla 10). La expresión de 20 genes que codifican una β -1,3-glucanasa (PR-2), seis quitinasas, cuatro PR-4, cuatro taumatinas (PR-5), un inhibidor de proteínasa (PR-6), dos ribonucleasas (PR-10) y dos LTPs (PR-14) se indujeron en respuesta al tratamiento de infección y posterior curado a 1 dpt, destacando una taumatina, una LTP y una quitinasa con una inducción mayor a 2 veces. Por el contrario, doce genes que codifican LTPs redujeron la expresión en respuesta al tratamiento inductor, al igual que un gen que codifica otra β -1,3-glucanasa y cinco quitinasas.

Tabla 10. Genes incluidos en la micromatriz 7k que codifican proteínas PR y que mostraron expresión diferencial en el flavedo de naranjas 'Navelate' como consecuencia del tratamiento inductor a 1 dpt (Ver nomenclatura en la Tabla 9).

Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	A	B	C	D
Taumatina 1 (PR 5)	6959	At1g20030	-0,70	2,10	3,12	2,68
LTP (PR 14) [<i>Pisum sativum</i>]	6404	At2g38540	-0,04	1,06	2,13	1,15
Quitinasa CHI1 [<i>Citrus sinensis</i>]	5509	At3g54420	-0,18	1,44	1,17	0,87
PR 4A [<i>Nicotiana tabacum</i>]	6567	At3g04720	-0,03	0,85	0,79	1,09
Quitinasa clase II [<i>Citrus jambhiri</i>]	923	At3g12500	-0,18	2,33	0,75	1,52
Quitinasa clase II [<i>Citrus jambhiri</i>]	6920	At3g12500	0,04	-	0,66	0,96
PR 4A [<i>Nicotiana tabacum</i>]	7113	At3g04720	-0,01	0,60	0,60	0,81
PR 4A [<i>Nicotiana tabacum</i>]	7168	At3g04720	-0,14	0,76	0,60	1,12
PR10A [<i>Datisca glomerata</i>]	6785	At1g24020	0,81	1,06	0,48	0,91
PR 5-1 [<i>Helianthus annuus</i>]	C18016E09	At4g11650	-0,32	0,64	0,46	1,17
Quitinasa clase I [<i>Citrus jambhiri</i>]	7132	At3g12500	-0,14	1,30	0,45	0,81
PR 4A [<i>Nicotiana tabacum</i>]	7235	At3g04720	0,25	1,06	0,45	0,26
β -1,3-glucanasa (PR-2) [<i>Oryza sativa</i>]	C18011A09	At5g63230	0,04	0,27	0,38	0,34
Quitinasa clase I [<i>Citrus jambhiri</i>]	7103	At3g12500	-0,18	1,02	0,37	0,71
Taumatina (PR 5) [<i>A. thaliana</i>]	C07001F06	At5g02140	0,15	0,33	0,35	0,17
PR 5-1 [<i>Helianthus annuus</i>]	7174	At4g11650	-0,63	0,16	0,35	0,26
PR10A [<i>Datisca glomerata</i>]	7001	At3g61110	0,45	0,67	0,34	0,45
LTP (PR 14) [<i>Pisum sativum</i>]	C04004H06	At2g38540	-0,01	0,19	0,32	0,18
Quitinasa clase II [Naranja dulce]	7191	At3g12500	-0,17	-	0,31	0,70
PR-6 [<i>Sambucus nigra</i>]	3413	At5g43580	-0,08	0,16	0,24	0,10
LTP (PR 14) [<i>Citrus sinensis</i>]	176	At2g38540	-0,14	-0,58	-1,54	-0,81
Glucanasa (PR-2) [<i>A. thaliana</i>]	C02012D11	At4g17180	-0,22	-0,33	-1,33	-0,76
LTP (PR 14) [<i>Citrus sinensis</i>]	7104	At2g38540	-0,06	-0,42	-1,16	-0,54
Quitinasa 1 (CTL1) [<i>A. thaliana</i>]	1960	At1g05850	0,03	-0,38	-0,95	-0,48
LTP (PR 14) [<i>Citrus sinensis</i>]	7231	At5g59310	-0,20	-0,46	-0,88	-0,42
LTP (PR 14) [<i>Helianthus annuus</i>]	7150	At5g59320	-0,12	-0,36	-0,83	-0,43
LTP (PR 14) [<i>A. thaliana</i>]	2163	At2g45180	-0,17	-0,94	-0,76	-0,82
LTP (PR 14) [<i>A. thaliana</i>]	6493	At3g18280	0,14	1,48	-0,71	-0,09
LTP (PR 14) [<i>Cicer arietinum</i>]	4215	At1g27950	-0,06	0,05	-0,52	-0,22
LTP (PR 14) [<i>A. thaliana</i>]	6950	At3g18280	0,14	0,82	-0,50	0,06
Quitinasa (CHI1) [<i>Citrus sinensis</i>]	2366	At3g54420	0,04	-0,30	-0,45	0,02
LTP (PR 14) [<i>A. thaliana</i>]	6692	At4g33550	-0,15	-0,06	-0,44	-0,39
Quitinasa (CHI1) [<i>Citrus sinensis</i>]	635	At2g43590	-0,03	-0,13	-0,35	-0,01
LTP (PR 14) [<i>Vigna unguiculata</i>]	5341	At3g18280	0,35	0,74	-0,34	0,18
PR 4A [<i>Nicotiana tabacum</i>]	4925	At3g04720	-0,18	0,34	-0,29	0,21
Quitinasa (CHI1) [<i>Citrus sinensis</i>]	5760	At3g54420	-0,02	-0,19	-0,22	0,04
LTP (PR 14) [<i>Citrus sinensis</i>]	3010	At5g59320	-0,17	-0,29	-0,20	-0,89
Quitinasa (CHI1) [<i>Citrus sinensis</i>]	6931	At3g54420	0,02	-0,07	-0,17	0,00
LTP (PR 14) [<i>Gossypium hirsutum</i>]	6113	At2g38540	-0,28	-0,97	-	-0,45

Los cambios en los niveles de expresión de genes implicados en transcripción y señalización generalmente fueron pequeños. Por lo tanto, se decidió realizar un análisis estadístico conjunto de los 345 genes relacionados con estos procesos incluidos en esta micromatriz. Se realizó un análisis SAM, considerándose significativos aquellos genes con un valor de p corregido mediante FDR inferior al 5 %, condición menos restrictiva que la que se empleó para el análisis de todos los genes de la micromatriz 7k. El tratamiento de inducción de resistencia aumentó la expresión de 133 genes a 1 dpt, de los cuales 7 aumentaron la expresión más de 2 veces respecto de los frutos no tratados (Tabla 11). Entre los genes que mostraron mayor inducción estaban genes que codifican un factor de transcripción WRKY, tres proteínas de meristemo no apical (NAM), un factor de inicio de la transcripción (TFIIA) y una proteína de dedos de zinc. Además, la expresión de 3 genes que codifican un factor de transcripción MYB, una proteína homeobox y una RNA polimerasa no se detectó en el flavedo de los frutos no tratados, asignándoles el signo +. El nivel de expresión de 76 genes se redujo en el flavedo de naranjas 'Navelate' infectadas y curadas a 1 dpt respecto a los frutos no tratados, la expresión de 7 de los cuales se redujo más de 2 veces. Estos 7 genes codifican dos proteínas ASR ('Abscisic stress ripening'), un factor Myb, una proteína 3 de fototropismo, un factor de transcripción de choque térmico, una proteína conteniendo el dominio NAC y un factor de respuesta a etileno (ERF) conteniendo el dominio AP2. Además, el nivel de expresión de 15 genes que codifican proteínas implicadas en la transcripción y señalización descendió a 1 dpt hasta no detectarse.

Tabla 11. Genes incluidos en la micromatriz 7k relacionados con la transcripción y señalización que mostraron expresión diferencial mayor a 2 veces en el flavedo de naranjas 'Navelate' como consecuencia del tratamiento inductor a 1 dpt. Los genes indicados con el signo + se ordenaron de mayor a menor valor de expresión en FI1, mientras que los signos - se ordenaron de mayor a menor expresión en FNT (Ver nomenclatura en la Tabla 9).

Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	A	B	C	D
Proteína SPF1 [<i>Ipomoea batatas</i>]	6060	At2g38470	0,04	0,78	1,33	0,58
WRKY6 [<i>A. thaliana</i>]	2313	At1g62300	0,29	0,97	1,31	0,49
Prot meristemo no apical (NAM) [<i>A. thaliana</i>]	233	At1g01720	0,30	0,66	1,30	0,57
Prot NAM [<i>A. thaliana</i>]	6916	At1g69490	-0,28	0,91	1,20	0,77
Prot NAM 3 [<i>Petunia × hybrida</i>]	4666	At1g01720	-0,24	0,80	1,18	0,14
Factor inicio transcripción TFIIA-gamma [<i>A. thaliana</i>]	C01003F12	At4g24440	1,10	0,92	1,14	1,05
Prot dedos de zinc 1 [<i>Datisca glomerata</i>]	6609	At1g27730	-0,35	0,46	1,11	0,09
MYB103 [<i>A. thaliana</i>]	C01006C11	At1g63910	+	+	+	+
Factor transcripción homeobox (KNAT6) [<i>A. thaliana</i>]	C02004E05	At1g70510	+	+	+	+
RNA polimerasa II 13.6 kDa [<i>A. thaliana</i>]	569	At3g52090	+	+	+	+
Prot ASR [<i>Ginkgo biloba</i>]	6637	At4g35800	0,05	-0,84	-2,43	-0,95
Prot ASR ('Abscisic stress ripening') [<i>Prunus persica</i>]	7080	At4g35800	-0,03	-0,64	-1,98	-0,74
Myb92 [<i>Nicotiana tabacum</i>]	C20006B02	At2g37630	-0,48	-2,11	-1,72	-1,22
Prot 3 hipocotilo no fototrófico [<i>A. thaliana</i>]	C20007C01	At5g64330	-0,29	-0,43	-1,30	-1,11
Factor transcripción choque térmico [<i>A. thaliana</i>]	1823	At2g26150	-0,08	-0,87	-1,24	-0,94
Prot meristemo no apical (NAM) [<i>A. thaliana</i>]	4367	At3g15510	-0,08	-0,48	-1,23	-0,46
Factor transcripción conteniendo dominio AP2	4713	At5g13330	-0,29	-1,36	-1,14	-0,79
Prot MADS-box 4 [<i>Vitis vinifera</i>]	7139	At1g24260	-0,19	-0,94	-1,00	-0,20
COG0864 (Regulador transcripcional)	C08017B09		-0,22	-0,32	-	-0,51
Proteína DEMETER [<i>A. thaliana</i>]	4198	At2g36490	0,39	-0,09	-	-
Myb [<i>A. thaliana</i>]	C01010A07	At5g06800	-0,15	-0,36	-	-0,49
Factor respuesta auxina (ARF6) [<i>A. thaliana</i>]	C03006F12	At1g30330	0,24	-0,51	-	-0,33
Prot bHLH [<i>A. thaliana</i>]	C20002E09	At2g42280	-0,24	-0,04	-	-0,11
Prot unión DNA [<i>Daucus carota</i>]	2681	At5g65310	-0,03	-0,13	-	-0,08
MAPK [<i>Homo sapiens</i>]	C08018G05	At3g08000	0,03	0,07	-	-0,05
Prot dedos de zinc [<i>A. thaliana</i>]	3367	At1g30810	0,15	-	-	0,11
Prot homeobox-leucine zipper [<i>Glycine max</i>]	3371	At4g16780	0,02	0,16	-	-0,02
P0456B03.14 [<i>Oryza sativa</i>]	5217	At5g16550	-0,04	-	-	-0,09
MAPK [<i>Petroselinum crispum</i>]	2030	At4g01370	-	0,11	-	0,07
Prot ribosomal 60S [<i>A. thaliana</i>]	3197	At3g13580	0,13	0,23	-	-0,03
PHCLF3 [<i>Petunia × hybrida</i>]	4262	At4g02020	-0,11	0,34	-	0,42
Factor transcripción YABBY [<i>Antirrhinum majus</i>]	C02019G10	At1g69180	0,20	-	-	0,04
Myb [<i>Oryza sativa</i>]	6578	At1g25340	0,15	0,45	-	0,45

Después del análisis de la expresión de genes individuales, se procedió al estudio del efecto del tratamiento inductor en el conjunto de los mismos mediante el análisis de anotación funcional por ontologías génicas. Para ello, a los genes de cítricos incluidos en la micromatriz 7k se les asignó la misma categoría funcional que la del correspondiente gen homólogo de *A. thaliana*. Este análisis indicó que 1.033 de los 1.811 genes detectados como inducidos significativamente como consecuencia del tratamiento de infección más curado a 1 dpt respecto a frutos no tratados poseían un homólogo de *A. thaliana*. Estos genes con expresión diferencial estaban incluidos dentro de diversos procesos biológicos (Ver Tabla 12). Entre ellos destacan los procesos biosintéticos, traducción, procesos biosintéticos de la célula y procesos metabólicos de aminoácidos y derivados, con $p < 10^{-4}$. Al analizar los procesos biológicos no redundantes, destacaron la traducción, procesos metabólicos de metionina, los procesos biosintéticos de derivados de aminoácidos y la respuesta a la herida. Los procesos biológicos con inducción significativa en el flavedo de frutos infectados y curados a 1 dpt respecto a los frutos no tratados fueron similares a los obtenidos cuando se realizó esta comparación con cualquier otro tratamiento. En los frutos infectados y curados a 1 dpt se observó una mayor representación de los procesos metabólicos secundarios, de ácidos orgánicos, de compuestos aromáticos, de los ácidos carboxílicos, de metionina y de fenilpropanoides y los procesos biosintéticos de compuestos aromáticos, de compuestos azufrados, de derivados de aminoácidos y de la familia de aminoácidos aromáticos respecto a los 3 dpt. Los genes significativos incluidos en algunos de dichos procesos biológicos se indican en la Tabla 13.

Tabla 12. Procesos biológicos significativamente diferentes ($p < 0,05$) en el flavedo de frutos infectados y curados a 1 dpt respecto del resto de tratamientos. Los genes analizados en cada comparación son aquellos que mostraron expresión diferencial tanto por análisis SAM como porque una de las condiciones no presentó valor de expresión. El signo + indica que esos procesos biológicos se inducen en la segunda condición, y el signo - indica inducción en la primera. En la tabla se muestra: A) número de genes incluidos en cada procesos biológico, B) número de genes con expresión diferencial, C) valor de p corregido y D) SR: sobrerrepresentado, IR: infrarrepresentado. En azul se muestran los procesos biológicos significativos no redundantes. El análisis, basado en las hibridaciones con la micromatriz 7k, se realizó con el programa informático Fatigo+ (BABELOMICS).

PROCESOS BIOLÓGICOS	-----Micromatriz 7k-----																	
	FNT vs. FI1						FI24 vs. FI1						FI10 vs. FI1			FI3 vs. FI1		
	A	+		-			+		-			+			+			
Nivel 3																		
Procesos biosintéticos	473	169	2,26e-05	SR			181	7,40e-05	SR			122	5,60e-03	SR	82	7,73e-03	SR	
Respuesta a estímulos externos	46	26	6,35e-03	SR			27	1,20e-02	SR									
Procesos metabólicos de compuestos nitrogenados	87	42	6,35e-03	SR								35	4,58e-03	SR	27	1,57e-03	SR	
Respuesta a estímulos abióticos	176				65	1,18e-02	SR			62	6,41e-03	SR						
Procesos metabólicos celulares	1.283						425	2,41e-02	SR									
Procesos metabólicos secundarios	70														22	5,41e-03	SR	
Nivel 4																		
Procesos biosintéticos celulares	394	156	2,26e-05	SR			165	1,54e-04	SR			115	4,58e-03	SR	76	1,04e-02	SR	
Procesos metabólicos de aminoácidos y derivados	97	49	5,19e-04	SR			47	2,05e-02	SR			42	9,07e-04	SR	35	6,66e-06	SR	
Procesos metabólicos de aminas	76	38	6,35e-03	SR			38	3,46e-02	SR			33	3,01e-03		27	2,61e-04	SR	
Respuesta a herida	33	20	1,36e-02	SR			21	1,47e-02	SR									
Procesos metabólicos del azufre	17	12	3,27e-02	SR											9	1,20e-02	SR	
Nucleobase, nucleosido, nucleótido y ác. nucleicos	306											39	1,42e-03	IR				
Procesos metabólicos de ácidos orgánicos	135														36	3,98e-03	SR	
Procesos metabólicos de compuestos aromáticos	56														17	4,34e-02	SR	

Continuación de la Tabla 12.

PROCESOS BIOLÓGICOS	-----Micromatriz 7k-----																	
			FNT vs. FI1				FI24 vs. FI1				FI0 vs. FI1		FI3 vs. FI1					
	A	B	+	-	B	C	D	B	C	D	B	C	D	B	C	D		
Nivel 5																		
Procesos metabólicos de derivados de aminoácidos	45	27	1,55e-03	SR				27	1,00e-02	SR			23	2,65e-03	SR	20	2,39e-04	SR
Procesos biosintéticos de macromoléculas	223	91	1,73e-03	SR				100	7,55e-04	SR								
Procesos biosintéticos de compuestos nitrogenados	42												22	2,65e-03	SR	17	2,49e-03	SR
Procesos biosintéticos de compuestos aromáticos	34												17	2,84e-02	SR	13	2,20e-02	SR
Procesos metabólicos de los ácidos carboxílicos	13															36	2,49e-03	SR
Procesos biosintéticos de compuestos azufrados	9															6	3,12e-02	SR
Nivel 6																		
Traducción	175	78	5,19e-04	SR				85	4,18e-04	SR								
Procesos metabólicos de aminoácidos	69	35	8,53e-03	SR									31	2,65e-03	SR	24	1,57e-03	SR
Procesos biosintéticos de derivados de aminoácidos	35	20	3,96e-02	SR									14	1,02e-03	SR	17	1,57e-03	SR
Procesos biosintéticos de aminas	40												22	2,65e-03	SR	17	1,57e-03	SR
Procesos metabólicos de fenilpropanoides	28												15	2,84e-02	SR	13	4,69e-03	SR
Procesos catabólicos de proteínas	65															0	1,46e-02	IR
Procesos catabólicos de macromoléculas dependientes de modificación	58															0	4,47e-02	IR
Nivel 7																		
Procesos metabólicos de aminoácidos azufrados	12	11	1,73e-03	SR				11	4,46e-03	SR			12	1,80e-02	SR	8	5,41e-03	SR
Elongación de la traducción	14							11	3,16e-02	SR								
Procesos metabólicos de aminoácidos fam. aspartato	16							12	3,30e-02	SR			9	2,65e-03	SR	9	8,32e-03	SR
Procesos biosintéticos de aminoácidos	36												20	2,65e-03	SR	14	1,04e-02	SR
Procesos catabólicos de proteínas celulares	60															0	2,93e-02	IR
Nivel 8																		
Procesos metabólicos de metionina	10	10	1,02e-03	SR				10	2,06e-03	SR						7	1,24e-02	SR
Procesos biosintéticos de aminoácidos azufrados	4															6	7,59e-03	SR
Proteolisis implicada en el catabolismo de proteínas celulares	58															0	2,29e-02	IR
Nivel 9																		
Procesos catabólicos de proteínas dependientes de modificación	58															0	7,59e-03	IR

Tabla 13. Genes incluidos en dos procesos biológicos significativos realizando el análisis de anotación funcional por ontologías génicas. Entre paréntesis se representa, en primer lugar, el número de genes significativos incluidos en el proceso biológico y, en segundo lugar, el número de genes totales de dicho proceso incluidos en la micromatriz 7k.

PROCESOS METABÓLICOS DE FENILPROPANOIDEOS (Nivel 6)			
(F10 vs. F11 +) (15/28)			
Homólogo en <i>A. thaliana</i>	Proteína más similar	Unigen	Log₂(F11 /FNT)
At4g33510	2-deshidro 3-deoxifosfoheptonato aldolasa	C01004H05	+
At1g72680	CAD	4934	+
At3g17390	SAM sintetasa	6344	1,13
At2g37040	PAL	6764	0,90
At5g13930	Acridona sintasa	6432	1,52
At1g22410	2-deoxi-D-araboni-heptulosonato 7-fosfato sintasa	6783	0,63
At2g45300	3-fosfosiquimato 1-carboxiviniltransferasa	3050 2722	0,68 +
At1g17020	Oxidorreductasa	C20002D06	0,52
At3g29200	Corismato mutasa	236	0,91
At1g15950	Cinamil CoA reductasa	6338	0,76
At4g34850	Chalcona sintasa	4364	0,47
At4g30210	Citocromo P450 reductasa	6726	0,23
At4g39980	2-deoxi-D-araboni-heptulosonato 7-fosfato sintasa	5794	0,82
At2g30490	C4H	6781	0,74
At5g54160	COMT	6305	1,46
		1816	1,73
		5454	1,53
		6947	2,49
		5951	1,87
		5970	2,31

PROCESOS METABÓLICOS DE METIONINA (Nivel 8)			
(FNT vs. F11 +) (10/10)			
Homólogo en <i>A. thaliana</i>	Proteína más similar	Unigen	Log₂(F11 /F10)
At3g17390	SAM sintetasa	6344	2,30
At3g57050	Cistationina β-liasa	619	+
		4985	0,46
At1g62960	ACS	C08005B11	0,23
At2g44160	Metilenotetrahidrofolato reductasa	6339	1,02
At3g61510	ACS	6055	0,48
At1g02500	SAM sintetasa	7186	1,63
		4577	0,58
At1g05010	ACO	4356	3,91
		7230	3,12
		C18016D09	0,74
At2g19590	ACO	6409	0,57
At3g01120	Cistationina γ-sintasa	6418	1,93
		6788	1,32
		1772	1,06
At5g17920	Metionina sintasa	7178	1,98
		6733	1,90

Los resultados obtenidos mediante la herramienta informática ‘OMICS Viewer’ de AraCyc 3.5 indicaron que el tratamiento de infección y posterior inactivación térmica del patógeno alteró la expresión de genes incluidos en diversas rutas metabólicas. Así, entre las rutas inducidas en el flavedo de frutos infectados y curados a 1 dpt respecto a los frutos no tratados se encontraron aquellas implicadas en la síntesis de JA, de SA a partir de PAL, de putrescina, de cardiolipina, de serina, de fosfolípidos y la síntesis de compuestos aromáticos como la biosíntesis de geranylgeranildifosfato, así como la biosíntesis de metionina, de adenosilmetionina, de etileno a partir de metionina y el ciclo de SAM (Figura 15). También estaba incluida la biosíntesis de fenilpropanoides, de suberina y de flavonoles (Figura 16). Las reacciones redox del glutatión y la eliminación de radicales superóxido se inducen debido al aumento en la expresión de un gen glutatión peroxidasa y dos SOD. Las rutas de biosíntesis de carotenoides y de vitamina E, la degradación de azúcares a etanol y lactosa y la oxidación de ácidos grasos se reprimieron significativamente a 1 dpt en respuesta al tratamiento inductor. Asimismo, el ciclo glutatión ascorbato se reprimió debido a una reducción de la expresión de dos genes APX.

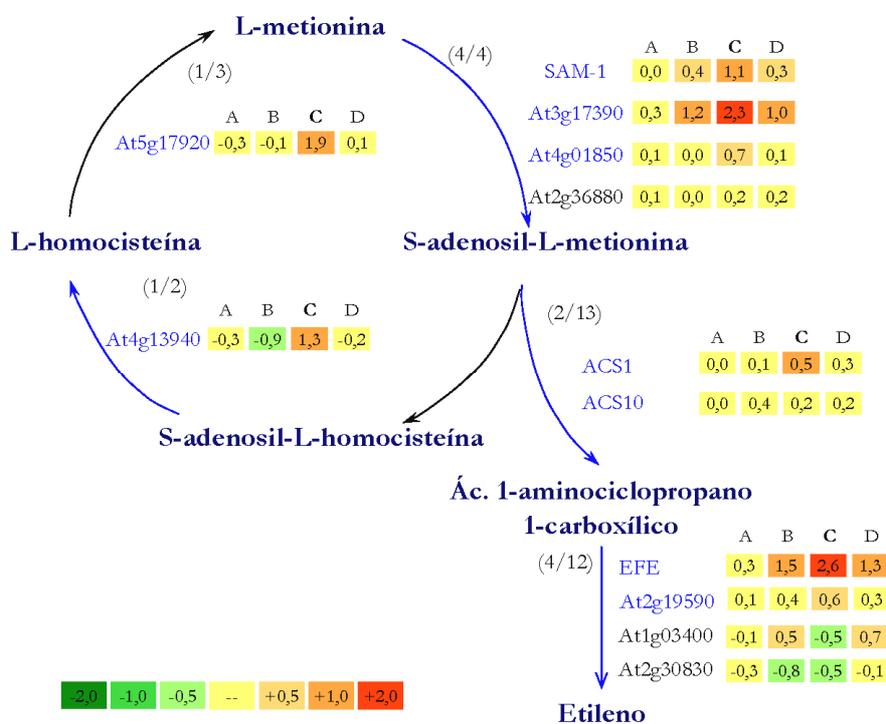


Figura 15. Representación gráfica de la ruta de biosíntesis del etileno a partir de metionina y del ciclo de SAM que mostraron cambios significativos en respuesta a la infección y posterior inactivación térmica del patógeno a 1 dpt (C) en el flavedo de naranjas 'Navelate'. Se empleó la herramienta informática 'OMICS Viewer' de 'AraCyc 3.5'. En azul se representan los genes con expresión diferencial en respuesta al tratamiento inductor a 1 dpt. Entre paréntesis se indica en primer término el número de genes con homólogo en *A. thaliana* incluidos en la micromatriz 7k, y en segundo término el número de genes de *A. thaliana* incluidos en este paso metabólico. Los números indican de forma secuencial el log₂ del cociente de las intensidades relativas de: A) FI24/FNT, B) FI0/FNT, C) FI1/FNT y D) FI3/FNT.

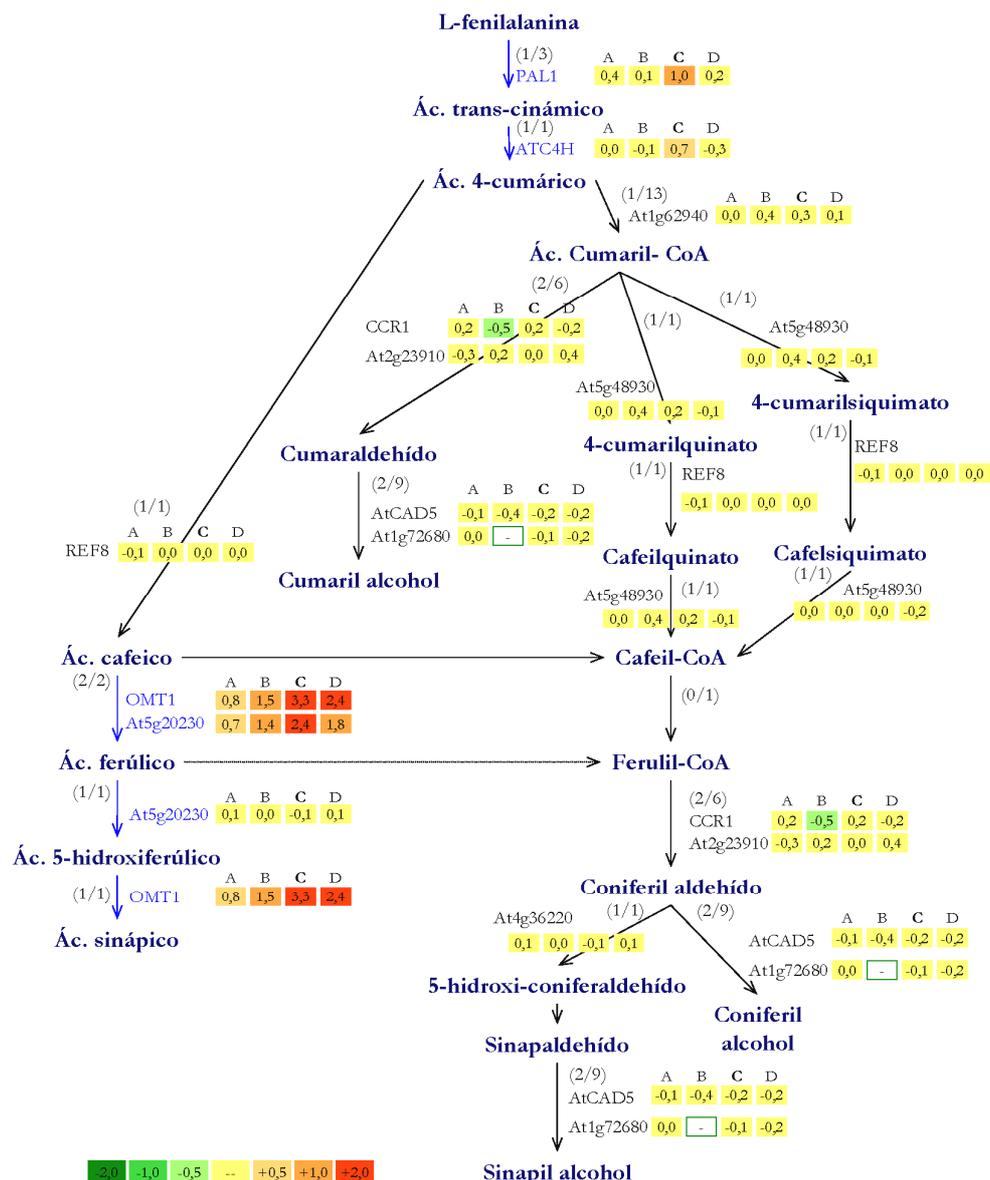


Figura 16. Representación gráfica de las rutas de biosíntesis de fenilpropanoides, ácidos fenólicos libres y suberina que mostraron cambios significativos en respuesta a la infección y posterior inactivación térmica del patógeno en el flavedo de naranjas ‘Navelate’. Los valores recuadrados indican que en una de las condiciones no se detectó expresión. El signo + indica que no se detectó expresión en los frutos no tratados pero sí en el tratamiento comparado, mientras que el signo - indica que no se detectó expresión en el tratamiento pero sí en los frutos no tratados (Ver detalles en el pie de Figura 15).

2.2. Análisis de la expresión de genes mediante hibridación de la micromatriz 12k

En el CFGP se desarrolló una matriz de mayor tamaño, denominada 12k, formada por 24.288 clones, que corresponden a 11.241 unigenes, de los cuales el 77 % poseen homología con genes de *A. thaliana*. El análisis de anotación funcional de esta micromatriz es similar al del 7k (Figura 12). En la micromatriz de mayor tamaño estaban representados 4.407 genes de los incluidos en la micromatriz 7k.

En este segundo análisis se empleó RNA de flavedo y albedo de frutos cítricos sometidos al tratamiento de infección más curado obtenidos a partir de tres muestreos independientes de naranjas 'Navelate' recolectadas en Febrero y Marzo de 2003 y en Marzo de 2006 (Figura 17). Todos los análisis se realizaron con los dos tejidos conjuntamente. De los genes presentes en la micromatriz, finalmente se analizaron 10.769 debido a la eliminación de muchos de ellos, fundamentalmente por presentar señales de hibridación débiles.

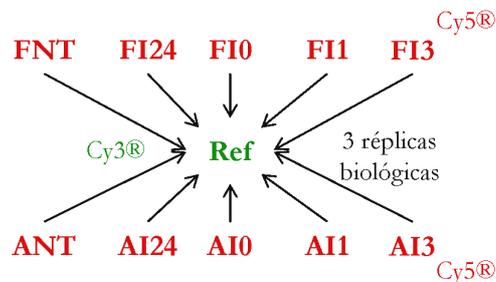


Figura 17. Representación gráfica del diseño experimental empleado en la hibridación de la micromatriz 12k. La referencia estaba formada por una mezcla equitativa de cada una de las muestras a analizar.

El desarrollo de *P. digitatum* durante 24 h en los frutos cítricos alteró de forma significativa la expresión del 13,6 % de los genes analizados de flavedo y del 10,2 % de albedo respecto a los frutos no tratados (Tabla 14). Los 324 genes del flavedo y los 762 del albedo que se indujeron en respuesta al desarrollo del patógeno no se detectaron en los frutos no tratados. Muchos de estos genes eran de función desconocida o no habían sido secuenciados. La expresión de 1.137 y 347 genes en el flavedo y albedo, respectivamente, cayó hasta ser indetectable en el flavedo de frutos infectados por *P. digitatum*.

Tabla 14. Número de genes incluidos en la micromatriz 12k que mostraron expresión diferencial como consecuencia del tratamiento de inducción de resistencia en el flavedo y el albedo de frutos cítricos. Se consideraron genes con expresión diferencial cuando en el análisis SAM con $FDR < 1\%$ (X vs. Y) eran positivos (se inducen en la segunda condición y hay valor de expresión en ambos casos) o negativos (se reprimen en la segunda condición y hay valor en las dos muestras analizadas). Además, también se consideraron con expresión diferencial positiva aquellos genes en los que no se detectó valor en X y sí en Y, o negativos si en X había expresión pero no en Y (Expresión específica).

M-12k	SAM		Expresión específica		Σ_+	Σ_-	Σ_{total}
	+	-	+	-			
FNT-FI24	0	0	324	1.137	324	1.137	1.461
FNT-FI0	137	132	284	1.203	451	1.335	1.786
FNT-FI1	43	84	277	1.404	320	1.488	1.808
FNT-FI3	181	48	579	735	760	783	1.543
FI24-FI0	74	93	618	724	692	817	1.509
FI24-FI1	7	24	552	866	559	890	1.449
FI24-FI3	112	91	1.139	482	1.251	573	1.824
FI0-FI1	9	2	594	802	603	804	1.407
FI0-FI3	9	13	1.241	478	1.250	491	1.741
FI1-FI3	4	0	1.354	387	1.358	387	1.745
ANT-AI24	0	0	762	347	762	347	1.109
ANT-AI0	344	177	716	377	1.078	536	1.614
ANT-AI1	141	104	457	1.155	598	1.259	1.857
ANT-AI3	138	38	267	1.462	40	1.500	1.905
AI24-AI0	89	57	459	535	548	592	1.140
AI24-AI1	83	58	226	1.339	309	1.397	1.706
AI24-AI3	55	19	157	1.767	212	1.786	1.998
AI0-AI1	12	10	255	1.292	267	1.302	1.569
AI0-AI3	40	79	240	1.774	280	1.853	2.133
AI1-AI3	6	19	471	968	477	987	1.464

El almacenamiento posterior a 37 °C durante 3 d modificó la expresión del 14 % de los genes analizados de flavedo y el 11 % del albedo respecto a los frutos infectados. El tratamiento de infección más curado a 0 dpt modificó el nivel de expresión de 1.786 genes en el flavedo y 1.614 genes en el albedo respecto a los frutos no tratados. Entre los genes que se indujeron más de dos veces en ambos tejidos se encontraron algunos que codifican una germina, una oxidoreductasa, dos OMTs y una proteína de función desconocida. La expresión de 123 genes aumentó solamente en el flavedo a los 0 dpt y no en el resto de los tratamientos (Figura 18), mientras que este número se triplicó en el caso del albedo (Figura 19). El nivel de expresión de los genes que codifican una ACO, una germina, una proteína de unión a DNA, dos tocoferol polipreniltransferasas y una LOX aumentó específicamente en el albedo y el nivel de inducción fue más de dos veces superior respecto al albedo de frutos no tratados. Del total de genes con expresión en la muestra I0, no se detectó expresión de 284 en el flavedo de frutos no tratados y de 716 en el caso del albedo. El tratamiento de infección más curado a 0 dpt redujo más de 2 veces la expresión de genes que codifican diversas proteínas de función desconocida, un factor de transcripción Myb y una flavin reductasa en ambos tejidos. El 90 % de los 1.335 genes reprimidos en el flavedo en frutos infectados y curados a 0 dpt no se expresaron en este tejido. Este porcentaje fue algo inferior en el albedo, donde no se detectó expresión en el 70 % de los 536 genes reprimidos.

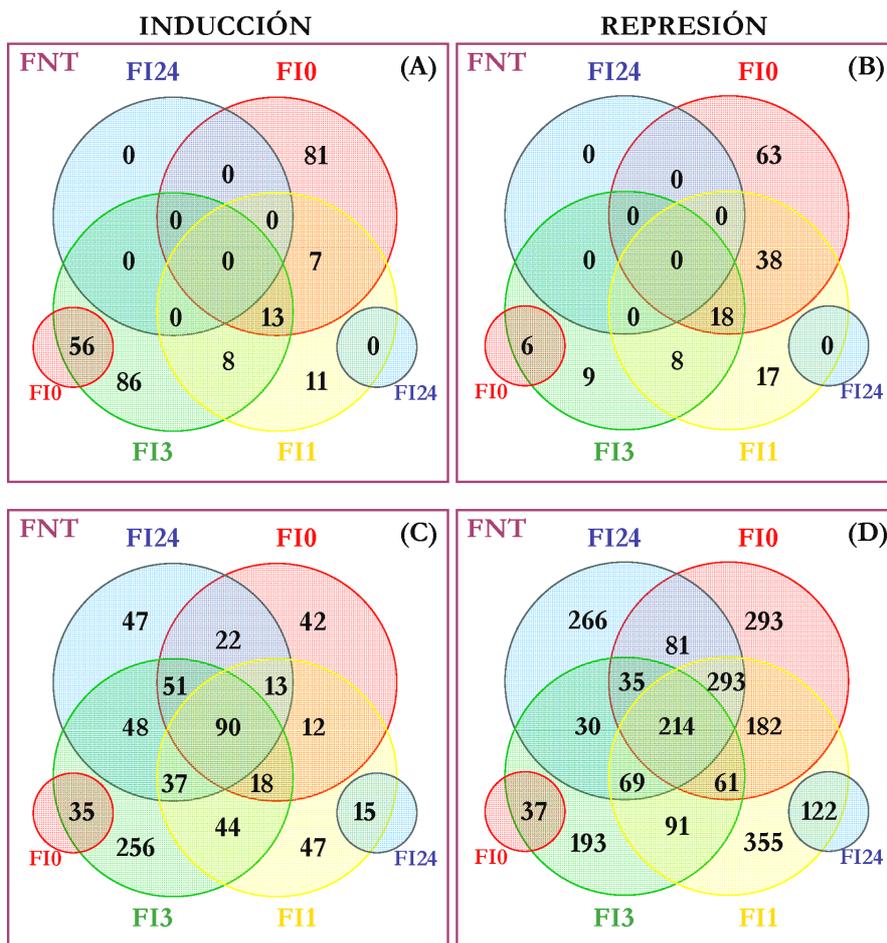


Figura 18. Diagramas de Venn que indican el número de genes incluidos en la micromatriz 12k que se expresan diferencialmente en el flavedo en alguna de las condiciones analizadas respecto a los frutos no tratados. Se indican el número de genes que fueron significativos en el análisis SAM con FDR < 1 %, excluyendo aquellos en los que una de las muestras no mostraba valor de expresión (A-B), y el número de genes que, siendo o no significativos mediante el análisis SAM, se expresaban solamente en una de las condiciones analizadas (C-D).

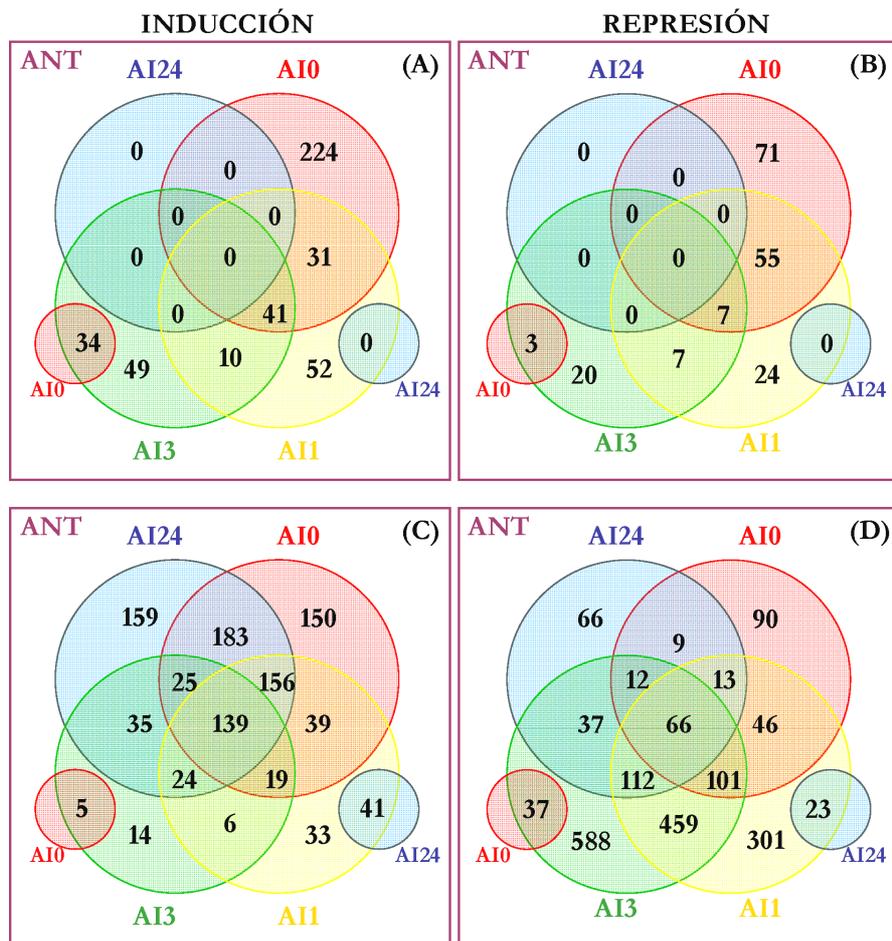


Figura 19. Diagramas de Venn que indican el número de genes incluidos en la micromatriz 12k que se expresan diferencialmente en el albedo en alguna de las condiciones analizadas respecto a los frutos no tratados. Se indican el número de genes que fueron significativos en el análisis SAM con $FDR < 1\%$, excluyendo aquellos en los que una de las muestras no mostraba valor de expresión (A-B), y el número de genes que, siendo o no significativos mediante el análisis SAM, se expresaron solamente en una de las condiciones analizadas (C-D).

En las Tablas 15, 17, 19 y 21 se muestran los datos de expresión de genes en el flavedo y albedo de frutos infectados y curados a 1 dpt respecto a los frutos no tratados, así como su correspondiente expresión en el resto de tratamientos. Además, en las Tablas 16, 18, 20 y 22 se muestran los genes y los valores relativos de expresión en aquellos casos en los que no se detectaba expresión en las comparaciones X vs. Y. Si no se detectó expresión en X y sí en Y se asignó el signo +, y si no se detectó en Y pero sí en X, el signo -. El tratamiento de infección más curado modificó la expresión del 17 % de los genes analizados en el flavedo y el albedo a 1 dpt. En el albedo se indujeron 598 genes, mientras que en el flavedo fueron aproximadamente la mitad. Sin embargo, el número de genes cuya expresión se redujo fue similar en ambos tejidos. La expresión de 22 genes, entre los que se encuentran siete OMTs, tres oxidorreductasas, una ACO, una isoflavona reductasa, una quitinasa y una GST, aumentó más de 2 veces en ambos tejidos respecto a frutos no tratados. Considerando los genes cuyo nivel de expresión fue al menos 2 veces el del flavedo de los frutos no tratados, 10 genes se expresaron solamente en el tejido externo (Ver CD adjunto). Se encontraron dos OMTs, dos oxidorreductasas, una acridona sintasa, una proteína de unión a RNA y una GST. Sin embargo, la comparación de estas situaciones puso de manifiesto que 241 genes se expresaron solamente en el albedo. Entre los genes con una inducción mayor a 5 veces en este tejido se encuentran aquellos que codifican una ACO, siete OMTs, una proteína germina, una PR-10, una oxidorreductasa y una dicianina (Tabla 17). Se detectó una reducción en el nivel de expresión de aproximadamente 1.500 genes del flavedo y 1.300 del albedo de frutos infectados y curados a 1 dpt. De éstos, 277 y 457 genes no se detectaron en el flavedo y albedo, respectivamente, a 1 dpt. Entre los genes que redujeron la expresión más de 3 veces en respuesta al tratamiento inductor a 1 dpt en ambos tejidos se detectaron tres proteínas COR15, una protein-quinasa y una flavin reductasa (Tabla 19 y Tabla 21). Además, se redujo la expresión de una proteína inducible por la luz, una proteína transmembrana, una β -1,3-glucanasa, una flavonol sintasa y tres de función desconocida, solamente en el flavedo.

Entre el 13 y el 15 % de los genes analizados en la micromatriz 12k mostraron cambios de expresión con el tratamiento de infección más curado a 3 dpt en ambos tejidos respecto de los frutos no tratados. En el flavedo, la expresión de 122 genes aumentó al menos 2 veces, entre los que se encontraban genes que codifican siete OMTs, tres oxidorreductasas y dos naringenina-chalcona sintasas, además de diversos genes de función

desconocida o que no mostraron homólogo en *A. thaliana*. De ellos, una LEA, una acridona sintasa, una oxidorreductasa, dos citocromos P450, una OMT y algunos de función desconocida, se indujeron solamente en el flavedo. Del total de genes con expresión a 3 dpt, 579 no se expresaron en el flavedo de frutos no tratados. En el albedo, la expresión de 77 genes aumentó más de 2 veces respecto a los frutos no tratados. De ellos, 35 se indujeron solamente en el albedo, entre los que se encontraron genes que codifican tres OMTs, dos germinas, tres glutation S-transferasas (GSTs) y tres tocoferol polipreniltransferasas. Entre los genes cuya expresión disminuyó significativamente a 3 dpt se encontraron diversos genes que codifican una proteína inducible por la luz y una β -1,3-glucanasa en el flavedo y un gen que codifica una proteína de choque térmico en el albedo. Solamente los niveles de expresión de 1 gen en el flavedo y 13 en el albedo disminuyeron a 3 dpt respecto a 1 dpt.

Tabla 15. Listado de los 30 genes incluidos en la micromatriz 12k que más aumentaron la expresión en el flavedo como consecuencia del tratamiento de inducción de resistencia a 1 dpt. Se muestra el unigen al que pertenecen, la homología con *A. thaliana*, si es que la presentan, y el \log_2 del cociente de: A) I24/NT, B) I0/NT, C) I1/NT y D) I3/NT. Fueron considerados significativos si FDR < 1 % en el análisis estadístico SAM (X vs. Y). Además, también se consideraron con expresión diferencial positiva aquellos genes cuya expresión no se detectó en los frutos no tratados y sí en el otro tratamiento comparado, o negativa cuando no se detectó expresión génica en respuesta al tratamiento inductor y sí en NT. En negrita se indican los genes con expresión diferencial.

Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	FLAVEDO				ALBEDO			
			A	B	C	D	A	B	C	D
COMT [<i>Rosa chinensis</i>]	5951	At5g54160	0,23	2,38	4,22	3,18	0,28	2,47	4,18	3,41
Oxidorreductasa [<i>A. thaliana</i>]	C31108D04	At3g13610	-1,21	3,08	3,77	3,96	0,49	3,46	4,36	4,26
COMT1 [<i>Populus</i> sp.]	3039	At5g54160	-0,82	1,45	3,58	1,92	0,56	2,14	3,83	3,08
COMT3 [<i>Populus</i> sp.]	1479	At5g54160	-0,41	2,29	3,43	3,28	0,74	2,39	3,79	4,04
COMT	C08010D03	At5g54160	-0,53	1,53	3,41	2,08	0,03	1,36	3,36	2,10
ACO1 [<i>A. thaliana</i>]	6409	At2g19590	-	0,85	2,48	-	0,03	0,66	1,03	0,35
Isoflavona reductasa [<i>Citrus x paradisi</i>]	C08017C07	At1g19540	-0,79	1,20	2,37	0,94	0,36	1,17	2,34	1,26
Proteína hipotética [<i>A. thaliana</i>]	C34005H07	At3g48770	-0,09	1,58	2,28	1,39	0,66	3,02	4,06	3,32
Eugenol OMT [<i>Rosa chinensis</i> var. <i>spontanea</i>]	1086	At5g54160	0,20	1,11	2,26	2,02	0,43	0,95	1,79	0,85
CCoAOMT [<i>Populus tremuloides</i>]	7170	At4g34050	0,13	1,61	2,24	1,79	0,69	2,99	4,16	3,33
Hidroxicinamil transferasa [<i>N. tabacum</i>]	3765	At5g48930	-0,03	1,14	2,23	1,51	0,79	1,67	2,60	2,27
Oxidorreductasa [<i>A. thaliana</i>]	3727	At3g13610	-	1,53	2,22	-	+	+	+	+
Transferasa F1K23.12 [<i>A. thaliana</i>]	C34208C07	At1g28680	0,80	1,07	2,16	0,85	+	+	+	+
Eugenol OMT [<i>Rosa chinensis</i> var. <i>spontanea</i>]	3957	At5g54160	-0,13	1,03	2,14	1,55	0,43	0,24	1,18	0,98
Metionina sintasa MPI7_60 [<i>A. thaliana</i>]	6733	At5g17920	-0,07	0,41	2,13	0,16	-0,22	0,73	2,09	0,36
Transferasa O-linked GlcNAc [<i>Methanothermobacter</i>]	5162	At5g65520	-	-	1,90	1,37	0,30	0,67	2,07	1,49
Transferasa [<i>A. thaliana</i>]	2820	At1g28680	0,03	0,71	1,82	0,59	0,62	1,46	2,45	1,16
Prot embryo-abundant [<i>A. thaliana</i>]	4799	At2g41380	-0,98	0,45	1,69	0,23	1,06	1,66	2,87	2,04
GST 22 [<i>Glycine max</i>]	C08034B04	At2g30860	0,65	1,09	1,64	0,92	0,50	0,84	1,69	1,15
Acridona sintasa II [<i>Ruta graveolens</i>]	6432	At5g13930	0,51	0,81	1,63	2,22	0,72	1,32	0,85	1,63
Quitinasa (CHI1) [<i>Citrus sinensis</i>]	5509	At3g54420	-1,03	1,86	1,61	1,40	0,68	2,38	2,06	2,82
Calmodulina [<i>A. thaliana</i>]	5356	At2g41410	-0,03	1,25	1,57	0,79	0,22	1,14	1,77	0,70
P0468B07.6 [<i>Oryza sativa</i> (cv. <i>japonica</i>)]	6146	At3g56710	-0,53	0,82	1,46	0,48	0,49	0,96	1,96	1,21
Glucosa 6-P deshidrogenasa [<i>Oryza sativa</i>]	2493	At5g13110	0,64	1,99	1,42	1,62	+	+	+	+
Oxidorreductasa [<i>A. thaliana</i>]	C20002D06	At1g17020	0,61	0,84	1,36	1,74	1,22	2,08	2,89	2,82
Glutamato deshidrogenasa 1 (GDH1) [<i>A. thaliana</i>]	C34002A06	At5g18170	0,50	0,30	1,28	0,99	0,56	0,47	1,23	1,10
Oxidorreductasa [<i>A. thaliana</i>]	5293	At1g17020	0,45	0,51	1,26	2,21	0,63	1,56	1,63	2,24
Prot unión RNA [<i>Oryza sativa</i> (cv. <i>japonica</i>)]	741	At2g33410	0,07	1,70	1,18	1,29	0,27	1,66	1,07	0,99
Prot función desconocida	C31200A06	At5g08680	0,37	1,44	1,17	1,49	0,00	0,80	0,64	0,83
Factor elongación 1 alfa (EF-1a) [<i>Naegleria andersoni</i>]	C08006C03	At5g60390	0,90	0,60	1,14	0,61	0,40	0,58	0,89	1,05

Tabla 16. Listado de los 30 primeros genes incluidos en la micromatriz 12k que mostraron mayor inducción en el flavedo como consecuencia del tratamiento de inducción de resistencia a 1 dpt y no se detectaron en los frutos no tratados. El listado está ordenado de mayor a menor expresión en FI1 (Ver detalles en la Tabla 15).

Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	FLAVEDO				ALBEDO			
			A	B	C	D	A	B	C	D
Citocromo P450 [<i>A. thaliana</i>]	4691	At5g05260	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicerol quinasa [<i>Glycine max</i>]	C05808A08	At1g80460			+					
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	C04033E04				+	+	-0,24	-0,39	0,01	-
Proteína desconocida [<i>Setaria italica</i>]	1475	At4g30880	+	+	+		0,24	0,51	0,33	0,66
Siqumato deshidrogenasa [<i>A. thaliana</i>]	C31008H01	At3g06350	+	+	+	+	0,25	0,55	0,72	0,61
D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa [<i>A. thaliana</i>]	5938	At1g17740	+	+	+	+	0,08	1,00	0,84	0,19
Acetiltransferasa [<i>A. thaliana</i>]	C31805A06	At3g26040	+	+	+	+	+		+	
Protoclorofilida reductasa A (PCR A) [<i>A. thaliana</i>]	6509	At5g54190			+		0,44	0,33	-	-
Prot quinasa transmembrana rica en leucina [<i>A. thaliana</i>]	C34104D04	At1g74360	+	+	+	+	0,31	0,34	0,90	0,19
Prot relacionada respuesta a TMV [<i>N. tabacum</i>]	C31801F01	At3g01360			+					
Lacasa /difenol oxidasa [<i>A. thaliana</i>]	6732	At3g09220		+	+	+	-0,18	0,15	-0,27	-0,44
Quinona oxidoreductasa [<i>Bacillus subtilis</i>]	C31201D02	At5g17000		+	+		0,43	0,02	-	-
Prot no homóloga en <i>A. thaliana</i>	C08024B01				+		-0,30	-	-	-0,45
PAL [<i>Citrus dementina</i> x <i>Citrus reticulata</i>]	6764	At2g37040	+	+	+	+		+	+	
P0434B04.9 [<i>Oryza sativa</i> (cv. <i>japonica</i>)]	C02004D02	At5g42690	+		+	+	+			
Prot no homóloga en <i>A. thaliana</i>	6343				+				+	
Helicasa RNA DEAD box (RH3) [<i>A. thaliana</i>]	C34006B06	At5g26742	+	+	+	+	+	+	+	+
Prot no homóloga en <i>A. thaliana</i>	3060		+	+	+	+	-0,38	-	0,52	0,22
Prot ChaC [<i>A. thaliana</i>]	2771	At4g31290	+	+	+	+	-	-0,43	-0,42	-0,65
Prot fiddlehead [<i>Gosypium hirsutum</i>]	3510	At2g26250		+	+					
Lisina quetogluturato reductasa 1 [<i>Oryza sativa</i> (cv. <i>japonica</i>)]	3558	At1g61240			+					
Prot desconocida [<i>A. thaliana</i>]	C31710F12	At5g62620	+	+	+			+	+	+
Prot 3 asociada a fitocromo [<i>A. thaliana</i>]	C02020G06	At1g09530			+	+	+			
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	4156		+	+	+	+	0,53	1,22	0,72	0,92
Prot función desconocida	C21006F07	At4g10100	+		+	+	+		+	+
Chalcona isomerasa [<i>Lycopersicon esculentum</i>]	2161	At2g26310	+	+	+	+	0,16	0,55	0,65	0,02
Polipéptido glicosilado reversible -1 [<i>A. thaliana</i>]	C21006B08	At3g02230			+	+				+
Ribosomal L10 [<i>Plasmodium yoelii yoelii</i>]	C08016B09	At1g66580		+	+		0,21	0,21	0,52	0,58
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	6129		+		+	+	0,04	-	0,34	-
Osmotina [<i>Quercus robur</i>]	C08017H01	At4g11650			+		+			

Tabla 17. Listado de los 30 genes incluidos en la micromatriz 12k que más aumentaron la expresión en el albedo como consecuencia del tratamiento de inducción de resistencia a 1 dpt (Ver detalles en la Tabla 15).

Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	FLAVEDO				ALBEDO			
			A	B	C	D	A	B	C	D
ACO [<i>Citrus sinensis</i>]	3377	At1g05010	0,24	2,24	4,22	1,47	1,61	2,76	4,70	2,68
Oxidorreductasa [<i>A. thaliana</i>]	C31108D04	At3g13610	-1,21	3,08	3,77	3,96	0,49	3,46	4,36	4,26
COMT [<i>Rosa chinensis</i>]	5951	At5g54160	0,23	2,38	4,22	3,18	0,28	2,47	4,18	3,41
CCoAOMT [<i>Populus tremuloides</i>]	7170	At4g34050	0,13	1,61	2,24	1,79	0,69	2,99	4,16	3,33
Prot unión a DNA [<i>A. thaliana</i>]	C34005H07	At3g48770	-0,09	1,58	2,28	1,39	0,66	3,02	4,06	3,32
Catecol OMT III [<i>Nicotiana tabacum</i>]	6533	At5g54160	0,37	1,17	3,56	1,78	0,09	1,66	3,86	2,49
COMT1 [<i>Populus</i> sp.]	3039	At5g54160	-0,82	1,45	3,58	1,92	0,56	2,14	3,83	3,08
COMT3 [<i>Populus</i> sp.]	1479	At5g54160	-0,41	2,29	3,43	3,28	0,74	2,39	3,79	4,04
Prot no homóloga en <i>A. thaliana</i>	C05803G03		0,20	0,67	2,00	-0,39	1,83	1,81	3,69	1,72
PR-10A [<i>Datisca glomerata</i>]	6785	At1g24020	0,87	1,56	1,09	1,31	1,27	3,61	3,45	3,03
COMT [<i>Stylosanthes humilis</i>]	C08010D03	At5g54160	-0,53	1,53	3,41	2,08	0,03	1,36	3,36	2,10
Prot 6 tolerancia salinidad [<i>Beta vulgaris</i>]	2435	At4g27000	0,06	2,16	2,28	1,68	0,53	2,59	3,29	2,48
β -cianoalanina sintasa [<i>Betula pendula</i>]	5206	At3g61440	-0,51	-0,33	2,72	1,70	0,14	0,74	3,16	2,23
P0481E12.6 [<i>Oryza sativa</i> (cv. <i>japonica</i>)]	C05132B12	At4g32480	-0,26	0,90	2,49	0,47	0,98	1,63	3,08	1,76
Prot germina [<i>A. thaliana</i>]	5506	At5g39150	1,70	2,24	2,31	2,68	1,03	3,67	3,02	2,96
Dicianina [<i>Lycopersicon esculentum</i>]	4496	At5g20230	0,51	1,22	2,12	1,51	1,27	1,89	3,01	2,47
Prot no homóloga en <i>A. thaliana</i>	5329		0,06	0,13	1,51	-0,32	1,39	1,23	2,93	1,24
Prot embrio-abundant [<i>A. thaliana</i>]	4799	At2g41380	-0,98	0,45	1,69	0,23	1,06	1,66	2,87	2,04
Catecol OMT III [<i>Nicotiana tabacum</i>]	5970	At5g54160	-0,18	1,12	3,81	-	-	0,37	2,85	-
Oxidorreductasa [<i>A. thaliana</i>]	1248	At1g17020	0,37	0,49	2,36	2,85	0,55	1,33	2,84	3,40
Glucano endo-1,3- β -D-glucosidasa [Naranja dulce]	6037	At3g57270	-0,33	-0,38	1,61	0,35	-0,61	0,68	2,81	1,18
CPRD2 [<i>Vigna unguiculata</i>]	2332	At1g26390	0,29	1,12	1,99	1,06	1,25	2,18	2,77	2,06
Precursor II aglutina (CIAI) [<i>Cladrastis kentukea</i>]	C08027C08	At5g65600	-0,62	1,53	2,42	0,93	-0,07	1,88	2,74	1,74
Hidroxicinamil transferasa [<i>Nicotiana tabacum</i>]	3765	At5g48930	-0,03	1,14	2,23	1,51	0,79	1,67	2,60	2,27
Transferasa [<i>A. thaliana</i>]	2820	At1g28680	0,03	0,71	1,82	0,59	0,62	1,46	2,45	1,16
Citocromo P450 [<i>A. thaliana</i>]	4408	At5g05260	-0,53	0,41	1,31	0,73	0,59	1,49	2,44	1,73
PR-4A [<i>Nicotiana tabacum</i>]	7168	At3g04720	-0,50	1,47	1,34	2,04	-0,21	2,06	2,42	3,09
Prot unión [<i>A. thaliana</i>]	4724	At5g19000	-1,00	1,07	1,03	1,52	0,62	2,17	2,37	3,20
DAHP sintetasa 1 [<i>Nicotiana tabacum</i>]	6471	At1g22410	-0,09	0,27	1,25	-0,10	0,86	1,53	2,36	0,94
IRL1 [<i>Citrus x paradisi</i>]	C08017C07	At1g19540	-0,79	1,20	2,37	0,94	0,36	1,17	2,34	1,26

Tabla 18. Listado de los 30 primeros genes incluidos en la micromatriz 12k que mostraron mayor inducción en el albedo como consecuencia del tratamiento de inducción de resistencia a 1 dpt y que no se detectaron en los frutos no tratados. El listado está ordenado de mayor a menor expresión en AI1 (Ver detalles en la Tabla 15).

Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	FLAVEDO				ALBEDO			
			A	B	C	D	A	B	C	D
Prot respuesta ABA [<i>A. thaliana</i>]	C18022F11	At5g23370	-	-	-	0,64	+	+		
P0691E06.20 [<i>Oryza sativa</i> (cv. <i>japonica</i>)]	5044	At1g31130	-	1,56	1,65	0,65	+	+	+	
Deshidrogenasa [<i>Oryza sativa</i> (cv. <i>japonica</i>)]	1785	At1g17020	0,46	-	0,16	0,53	+	+	+	
Citocromo P450 [<i>A. thaliana</i>]	4691	At5g05260	+	+	+	+	+	+	+	+
Prot unión elemento respuesta a etileno [<i>Solanum lycopersicum</i>]	804	At3g23240	-	-	-	0,28	+	+	+	
Transferasa [<i>A. thaliana</i>]	C34208C07	At1g28680	0,80	1,07	2,16	0,85	+	+		
F7H19_170 [<i>A. thaliana</i>]	C19002C06	At4g22990	-	-	1,16	-0,65	+	+	+	
Prot no homólogo en <i>A. thaliana</i>	C04030D12						+		+	
Nectarina 5 [<i>Nicotiana langsdorffii</i> x <i>Nicotiana sanderae</i>]	C08027E03	At5g44360	-	0,96	1,72	1,40	+	+	+	+
MEK map quinasa [<i>Medicago sativa</i> subsp. x <i>varia</i>]	C07005E02	At3g21220	-0,26	-	0,00	-	+	+	+	+
Intercambiador Cation/H (CHX18) [<i>A. thaliana</i>]	C08031C07	At5g41610	-	0,69	1,02	0,56	+	+		
Prot no homólogo en <i>A. thaliana</i>	C19008A04		0,50	1,09	2,94	1,11	+	+	+	
α -amilasa [<i>Aspergillus kawachi</i>]	C34210A03									+
Quitinasa clase IV (CHIV) [<i>A. thaliana</i>]	C31801A05	At3g54420	-	1,27	1,56	-0,02	+	+	+	+
Oxidoreductasa [<i>A. thaliana</i>]	3727	At3g13610	-	1,53	2,22	-	+	+	+	+
Prot no homólogo en <i>A. thaliana</i>	C08007D08		-2,01	1,32	2,49	2,49	+	+	+	+
β -1,3-glucanasa [<i>Vitis vinifera</i>]	4010	At3g57270	-	1,46	-	1,31	+	+		
Prot no homólogo en <i>A. thaliana</i>	C08013H06						+	+		
N-acetiltransferasa (GNAT) [<i>A. thaliana</i>]	2793	At2g32030	-	-	-	-	+	+	+	+
Prot unión calcio [<i>A. thaliana</i>]	C31108F11	At4g13440	-0,42	-0,44	0,42	-0,15	+	+	+	+
Prot no homólogo en <i>A. thaliana</i>	C08025D04						+	+	+	
Trealosa fosfatasa [<i>A. thaliana</i>]	C31804B02	At5g65140	-	0,00	-0,11	-0,28	+	+	+	+
Prot ciclasa [<i>A. thaliana</i>]	4792	At4g34180	0,09	0,37	-	0,97	+	+	+	+
AAR149Wp [<i>Eremotbecium gossypii</i>]	C08004A07	At3g12180	+	+		+	+	+	+	
Prot no homólogo en <i>A. thaliana</i>	3470		-0,39	-0,84	0,06	-0,91	+	+	+	+
Glicosiltransferasa [<i>Bacillus cereus</i>]	C08013F07						+	+	+	
Prot alta movilidad [<i>Branchiostoma belcheri</i>]	C31201E06	At4g23800	-	0,45	-	0,54	+	+		
Serina carboxipeptidasa [<i>Medicago truncatula</i>]	C31806B05	At3g63470	-0,36	0,84	1,28	1,09	+	+	+	+
Prot cupina [<i>A. thaliana</i>]	C31004A06	At5g61750					+	+	+	
Prot arm arm repeat [<i>Oryza sativa</i> (cv. <i>japonica</i>)]	3417	At1g60190					+	+	+	+

Tabla 19. Listado de los 30 genes incluidos en la micromatriz 12k que más se reprimieron en el flavedo como consecuencia del tratamiento de inducción de resistencia a 1 dpt. Se muestra el unigen al que pertenecen, la homología con *A. thaliana*, si es que la presentan, y el \log_2 del cociente de: A) I24/NT, B) I0/NT, C) I1/NT y D) I3/NT. Fueron considerados significativos si FDR < 1 % en el análisis estadístico SAM (X vs. Y). Además, también se consideraron con expresión diferencial positiva aquellos genes cuya expresión no se detectó en los frutos no tratados y sí en el otro tratamiento comparado, o negativa cuando no se detectó expresión génica en respuesta al tratamiento inductor y sí en FNT. En negrita se indican los genes con expresión diferencial.

Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	FLAVEDO				ALBEDO			
			A	B	C	D	A	B	C	D
Homólogo a subunidad 1 del isoenzima poligalacturonasa [<i>A. thaliana</i>]	6564	At1g70370	0,55	-2,01	-2,72-3,38	0,92	-1,77	-	-2,91	
COR15 [<i>Citrus clementina</i> x <i>Citrus reticulata</i>]	6659	At1g54410	-0,97	-3,60-2,71	-1,98	-0,44	-3,04-2,57	-1,56		
Poligalacturonasa (F17O7_9) [<i>A. thaliana</i>]	4068	At1g70370	0,84	-1,65	-2,64-3,14	0,98	-1,54	-	-	
Prot no homóloga en <i>A. thaliana</i>	1161		0,02	-1,16	-2,39-2,03	0,49	0,46	-0,38	-1,36	
Prot inducible por la luz [<i>A. thaliana</i>]	7142	At3g22840	-0,85	-2,77-2,36-3,10		-0,43	-0,70	-0,84	-1,53	
Acuaporina [<i>Vitis berlandieri</i> x <i>Vitis ripensis</i>]	3352	At4g00430	0,35	-1,36	-2,33-1,96	1,20	0,41	-1,25	-1,03	
Alérgeno de polen [<i>A. thaliana</i>]	1259	At1g78040	-0,56	-0,81	-2,28-2,01	-0,45	-0,95	-1,96-1,90		
MYB92 [<i>Nicotiana tabacum</i>]	C20006B02	At2g37630	-0,28	-2,29-2,07-1,32		-0,44	-2,29	-	-1,27	
COR15 [<i>Citrus clementina</i> x <i>Citrus reticulata</i>]	1199	At1g54410	-0,18	-2,88-2,07-1,27		-0,43	-3,13-2,80	-1,60		
COR15 [<i>Citrus clementina</i> x <i>Citrus reticulata</i>]	2799		-0,33	-2,56-2,04-1,30		-0,34	-2,56-2,49	-1,63		
Prot implicada biosíntesis ascorbato VTC2 [<i>A. thaliana</i>]	6847	At4g26850	-0,07	-1,60-2,04-2,03		-0,14	-1,26-1,86-1,93			
Prot conteniendo pentatricopeptido repetido (PPR) [<i>A. thaliana</i>]	1650	At3g59300	-0,36	-2,71-2,01-1,21		-0,32	-2,97-2,70	-1,75		
Prot función desconocida [<i>A. thaliana</i>]	C06003B11	At5g14790	-0,26	-2,69-2,01-1,24		-0,23	-2,75-2,54	-1,53		
β -1,3-glucanasa [<i>Olea europaea</i>]	2188	At2g16230	0,23	-1,46-1,87-2,83		0,30	0,21	-0,54	-0,98	
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	3926		-0,51	-2,14-1,82-3,23		-0,76	-1,29	-2,06	-2,66	
Protein-quinasa [<i>A. thaliana</i>]	C31703C06	At3g21630	-0,51	-2,20-1,70-1,41		-0,48	-2,36-1,92	-1,72		
Flavin reductasa [<i>A. thaliana</i>]	C04006E11	At2g34460	-0,28	-2,10-1,63-1,28		-0,55	-2,21-2,24	-1,62		
Calmodulina (MSS3) [<i>A. thaliana</i>]	4628	At2g43290	-0,42	-1,81-1,62-1,36		-0,14	-1,71	-1,88	-1,46	
OSJNBa0060P14.12 [<i>Oryza sativa</i> (cv. japonica)]	C16015G06	At3g01370	-0,12	-2,03-1,57-1,01		-0,36	-2,05-2,05	-1,32		
Zeaxantina epoxidasa [<i>Citrus unshiu</i>]	7007	At5g67030	-0,01	-1,56-1,56-1,14		-0,04	-0,80-1,21	-1,00		
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	C04006B06		-	-2,18-1,56-1,11		-0,32	-2,06-1,80	-1,18		
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	C04023D07		-0,22	-1,92-1,55-1,07		-0,29	-1,97-2,04	-1,43		
Fosforibuloquinasa [<i>Mesembryanthemum</i> sp.]	1508	At1g32060	0,10	-2,09-1,54-1,07		-0,26	-1,88	-1,77	-0,68	
Prot josefin [<i>A. thaliana</i>]	5312	At3g54130	-0,32	-2,01-1,53-1,20		-0,30	-2,06-1,68	-1,28		
Tioredoxina tipo H (TRX-H) [<i>Ricinus communis</i>]	6538	At3g51030	-0,21	-0,75	-1,49-0,88	-0,01	-0,59	-1,09	-0,82	
Flavonol sintasa/Flavanona 3-hidroxilasa (CitFLS) [<i>Citrus unshiu</i>]	5903	At5g08640	0,09	-1,04-1,45-1,25		0,19	0,45	-0,44	-0,91	
Prot tipo chaperona [<i>A. thaliana</i>]	C04030G01	At5g55220	-0,26	-1,84-1,45-0,97		-0,35	-1,71-1,82	-1,27		
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	C03001C11		-0,14	-1,02-1,42-1,04		-0,69	-1,36-1,76	-0,98		
Prot unión DNA con dominio bromo [<i>A. thaliana</i>]	C05802A10	At5g46550	-0,31	-2,17	-1,40-1,10	-0,28	-1,79-1,84	-1,18		
Prot función desconocida [<i>A. thaliana</i>]	C34007G11	At3g62370	0,09	-1,88-1,40-0,98		-0,24	-2,18-2,12	-1,34		

Tabla 20. Listado de los 30 primeros genes incluidos en la micromatriz 12k que no se detectaron a 1 dpt y si en el flavedo de frutos no tratados. El listado está ordenado de mayor a menor expresión en FNT (Ver detalles en la Tabla 19).

Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	FLAVEDO				ALBEDO			
			A	B	C	D	A	B	C	D
Prot esteroide sulfotransferasa [<i>A. thaliana</i>]	5756	At5g07010	0,37	-1,73	-	-3,26	0,92	0,32	-0,44	-1,48
Prot bHLH [<i>A. thaliana</i>]	C05133A11	At5g43650	-	-	-	-	-0,60	-0,29	-	-1,21
Precursor prot unión clorofila a/b [<i>Citrus limon</i>]	1135	At1g29910	-1,04	-1,06	-	-	-0,40	-0,11	-0,17	-1,08
Prot función desconocida	4670	At1g05805	-1,10	-0,85	-	-1,23	-0,71	-0,10	-	-
Precursor prot fotosistema II 22 kDa (CP22)	7012	At1g44575	-	-	-	-1,47	+			
Prot función desconocida	3127	At1g29060	-0,08	-	-	-1,03	+	+	+	
Prot función desconocida [<i>A. thaliana</i>]	1756	At2g27290	-	-	-	-1,03	+	+	+	
Prot conteniendo dominio AP2 [<i>A. thaliana</i>]	686	At1g22810	-	-	-	-	+	+		
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	936		-	-1,13	-	-1,18	-0,85	-	-0,61	-
Transportador potasio [<i>Oryza sativa</i> (cv. <i>japonica</i>)]	C31804F08	At2g30070	-0,20	-	-	-1,29	0,10	-	0,09	-0,64
Prot conteniendo dominio CBS [<i>A. thaliana</i>]	4370	At4g27460	-0,85	-0,54	-	-0,86	-0,40	-0,05	-	-
Prot expansina [<i>Quercus robur</i>]	6237	At4g38400	-1,88	-0,85	-	-1,04	-1,93	-0,97	-1,30	-1,84
Prot homóloga translationally controlled tumor	3987	At3g16640	-	-0,68	-	-1,42	-0,55	0,00	-	-
Esterasa [<i>Oryza sativa</i> (cv. <i>japonica</i>)]	C05133F03	At1g10740	-	-	-	-	-0,52	-0,41	-	0,17
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	C34210B01		-0,86	-	-	-0,96	-0,12	-0,50	-0,06	-0,90
OSJNBa0058K23.16 [<i>Oryza sativa</i> (cv. <i>japonica</i>)]	C34208E06	At5g52060	-0,63	-	-	-1,54	-0,54	-0,46	-	-
Rafinosa sintasa [<i>Cucumis sativus</i>]	6318	At5g40390	-0,68	-	-	-0,55	-0,57	-0,61	-1,16	-0,99
Canal de iones	4320	At5g15410	-0,14	-1,92	-	-1,21	-0,29	-1,24	-1,29	-0,57
Prot 8 glicosil transferasa [<i>A. thaliana</i>]	C34005H05	At1g19300	-0,60	-1,25	-	-1,10	-0,98	-1,14	-1,25	-1,56
Alérgeno Mal d1	2810	At1g24020	0,53	-0,77	-	-	+	+	+	
Aciltransferasa [<i>A. thaliana</i>]	6315	At2g38110	-0,15	-0,88	-	-1,19	0,16	-0,17	0,14	-0,16
Prot W fotosistema II	5477	At2g30570	0,05	-	-	-0,45	-0,29	-0,15	-0,78	-0,71
Prot 1 pequeña [<i>Oryza sativa</i> (cv. <i>japonica</i>)]	C04035A03		-0,46	-	-	-0,77	-0,34	-1,58	-	-1,17
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	3065		-0,01	-0,53	-	-0,27	+			
Erg-1 [<i>Solanum tuberosum</i>]	2691	At5g64260	-1,44	-0,56	-	-1,06	-1,62	0,08	-1,11	-1,01
OSJNBa0011]08.5 [<i>Oryza sativa</i> (cv. <i>japonica</i>)]	5886	At2g46100	-0,04	-0,86	-	-1,76	-0,14	-1,05	-	-
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	C08025G11		-	-	-	-0,95	-0,57	-0,82	-1,00	-
No homólogo en <i>A. thaliana</i>	C18018D09		-0,08	-0,40	-	-0,73	0,20	-0,37	-0,49	-0,46
T32A17_160 [<i>A. thaliana</i>]	C31703H11	At4g08850	-	-	-	-0,69	-	-	-	-
Galactosiltransferasa galactinol-rafinosa [<i>Vigna angularis</i>]	3420	At4g01970	-	-0,95	-	-0,92	-0,86	-1,17	-0,90	-

Tabla 21. Listado de los 30 genes incluidos en la micromatriz 12k que más se reprimieron en el albedo como consecuencia del tratamiento de inducción de resistencia a 1 dpt (Ver detalles en la Tabla 19).

Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	FLAVEDO				ALBEDO			
			A	B	C	D	A	B	C	D
COR15 [<i>Citrus clementina</i> x <i>Citrus reticulata</i>]	1199	At1g54410	-0,18	-2,88	-2,07	-1,27	-0,43	-3,13	-2,80	-1,60
Prot conteniendo pentatricopéptido (PPR) repetido [<i>A. thaliana</i>]	1650	At3g59300	-0,36	-2,71	-2,01	-1,21	-0,32	-2,97	-2,70	-1,75
COR15 [<i>Citrus clementina</i> x <i>Citrus reticulata</i>]	6659	At1g54410	-0,97	-3,60	-2,71	-1,98	-0,44	-3,04	-2,57	-1,56
Prot desconocida [<i>A. thaliana</i>]	C06003B11	At5g14790	-0,26	-2,69	-2,01	-1,24	-0,23	-2,75	-2,54	-1,53
COR15 [<i>Citrus clementina</i> x <i>Citrus reticulata</i>]	2799		-0,33	-2,56	-2,04	-1,30	-0,34	-2,56	-2,49	-1,63
Flavin reductasa [<i>A. thaliana</i>]	C04006E11	At2g34460	-0,28	-2,10	-1,63	-1,28	-0,55	-2,21	-2,24	-1,62
OSJNBa0094H06.13 [<i>Oryza sativa</i> (cv. <i>japonica</i>)]	C16012B01	At5g38050	-0,15	-2,21	-1,35	-1,39	-0,12	-2,32	-2,15	-1,42
Prot desconocida [<i>A. thaliana</i>]	C34007G11	At3g62370	0,09	-1,88	-1,40	-0,98	-0,24	-2,18	-2,12	-1,34
OSJNBa0060P14.12 [<i>Oryza sativa</i> (cv. <i>japonica</i>)]	C16015G06	At3g01370	-0,12	-2,03	-1,57	-1,01	-0,36	-2,05	-2,05	-1,32
Prot no homóloga en <i>A. thaliana</i>	C04023D07		-0,22	-1,92	-1,55	-1,07	-0,29	-1,97	-2,04	-1,43
Transportador integral de membrana [<i>A. thaliana</i>]	C05074B01	At5g54860	-0,52	-2,02	-1,37	-1,28	-0,37	-2,07	-1,99	-1,71
Transaldolasa (EC 2.2.1.2) [<i>Solanum tuberosum</i>]	6755	At5g13420	0,03	-1,52	-1,15	-0,64	-0,46	-1,89	-1,97	-1,18
Alérgeno de polen [<i>A. thaliana</i>]	1259	At1g78040	-0,56	-0,81	-2,28	-2,01	-0,45	-0,95	-1,96	-1,90
Protein-quinasa [<i>A. thaliana</i>]	C31703C06	At3g21630	-0,51	-2,20	-1,70	-1,41	-0,48	-2,36	-1,92	-1,72
Prot no homóloga en <i>A. thaliana</i>	C34009E05		-0,12	-1,59	-1,72	-1,02	-0,62	-1,95	-1,87	-1,33
Precursor tiorredoxina tipo F [<i>Pisum sativum</i>]	3884	At5g16400	0,01	-1,70	-1,64	-0,94	-0,23	-1,68	-1,85	-1,39
Prot unión DNA con dominio bromo [<i>A. thaliana</i>]	C05802A10	At5g46550	-0,31	-2,17	-1,40	-1,10	-0,28	-1,79	-1,84	-1,18
Prot tipo chaperona [<i>A. thaliana</i>]	C04030G01	At5g55220	-0,26	-1,84	-1,45	-0,97	-0,35	-1,71	-1,82	-1,27
Prot unión a DNA [<i>A. thaliana</i>]	C34205F07	At3g04590	0,12	-1,67	-1,22	-1,02	-0,26	-1,85	-1,81	-1,08
Prot función desconocida	C16016C04	At1g21645	-0,13	-1,75	-1,30	-1,04	-0,17	-2,14	-1,81	-1,22
Prot no homóloga en <i>A. thaliana</i>	C04006B06		-	-2,18	-1,56	-1,11	-0,32	-2,06	-1,80	-1,18
Prot no homóloga en <i>A. thaliana</i>	C03001C11		-0,14	-1,02	-1,42	-1,04	-0,69	-1,36	-1,76	-0,98
Prot no homóloga en <i>A. thaliana</i>	3930		-0,29	-0,04	-0,82	-0,50	-0,78	-1,11	-1,75	-2,27
Citocromo P450 [<i>Petunia x hybrida</i>]	4528	At2g45570	-0,37	-1,23	-1,29	-1,10	-0,32	-1,89	-1,75	-1,34
Prot auxilina [<i>A. thaliana</i>]	C18023B02	At4g12780	-0,26	-1,91	-1,36	-1,15	-0,15	-1,82	-1,74	-1,27
Prot pectato liasa [<i>A. thaliana</i>]	5556	At1g04680	0,17	-1,65	-1,28	-0,56	-0,05	-1,60	-1,73	-0,63
Prot función desconocida [<i>A. thaliana</i>]	C34010F11	At1g28140	0,06	-1,10	-1,07	-0,68	-0,22	-1,52	-1,72	-1,40
Prot josefina [<i>A. thaliana</i>]	5312	At3g54130	-0,32	-2,01	-1,53	-1,20	-0,30	-2,06	-1,68	-1,28
Prot ribosomal [<i>A. thaliana</i>]	6532	At5g20160	-0,15	-1,47	-1,19	-0,72	-0,28	-1,99	-1,66	-
Prot función desconocida [<i>Malus x domestica</i>]	C04030D01	At1g26850	-0,02	-0,04	-0,62	-0,17	-0,25	-1,75	-1,65	-1,47

Tabla 22. Listado de los 30 primeros genes incluidos en la micromatriz 12k que no se detectaron a 1 dpt y sí en el albedo de frutos no tratados. El listado está ordenado de mayor a menor expresión en ANT (Ver detalles en la Tabla 19).

Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	FLAVEDO				ALBEDO			
			A	B	C	D	A	B	C	D
Prot mantenimiento estructural cromosoma [<i>A. thaliana</i>]	C06003F07	At3g47700	-0,20	-0,49	-	-	-	-1,16	-	-
Cisteína proteinasa [<i>Ipomoea batatas</i>]	4236	At3g49340	-	-0,50	-	-	-	-1,10	-	-
Galactinol sintasa, isoforma GolS-1 [<i>Ajuga reptans</i>]	2304	At1g60470	-	-	-	-	-1,26	-1,52	-	-
Xiloglucano endotransglucosilasa [<i>Populus</i> sp.]	3535	At5g13870				+	-0,67	-1,25	-	-
Prot fibra Fb34 [<i>Gossypium barbadense</i>]	1862	At4g27435	-	-0,73	-	-	-	-0,84	-	-
Sucrosa fosfato sintasa [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	1609	At4g10120	-0,09	-	-	-0,57	0,04	-2,04	-	0,45
Receptor benzodiazepina [<i>A. thaliana</i>]	6697	At2g47770	-0,50	-1,95	-2,28	-1,68	-0,46	-1,77	-	-
Prot proteasa CAAX amino terminal [<i>A. thaliana</i>]	C05054G05	At2g03140	-0,02	-	-	-	-0,30	-1,36	-	-
Prot 1 pequeña [<i>Oryza sativa</i> (cv. <i>japonica</i>)]	C04035A03		-0,46	-	-	-0,77	-0,34	-1,58	-	-1,17
Prot no homóloga en <i>A. thaliana</i>	C08021C07					+	-1,13	-	-	-
Prot función desconocida [<i>A. thaliana</i>]	C18013E05	At4g24210					-	-	-	-
Prot función desconocida [<i>A. thaliana</i>]	2469	At5g64830	-0,10	-0,27	-	-0,52	-0,58	-0,59	-	-
Prot tiorredoxina [<i>A. thaliana</i>]	3097	At5g06690	-0,37	-0,53	-	-0,21	-0,06	-1,01	-	-
Prot no homóloga en <i>A. thaliana</i>	C18005C05		-	-0,13	-	-	-0,43	-0,17	-	-
Prot transducina WD-40 repetido	C06002G04	At1g80670	-	-	-	-	-0,73	-0,51	-	-
Fosfomanosa isomerasa [<i>A. thaliana</i>]	C08012A09	At1g67070					-	-0,38	-	-
Glutamina sintasa [<i>Oryza sativa</i>]	C31303B12	At2g23970	-	-	-	-	-0,27	-	-	-
Prot WD-40 repetido, fitocromo A [<i>A. thaliana</i>]	4862	At1g53090	-	0,48	1,34	0,73	0,22	-0,28	-	-
Prot 5 dedos de zinc (ZFP5) [<i>A. thaliana</i>]	3312	At1g10480		+			-0,13	0,00	-	-
Prot no homóloga en <i>A. thaliana</i>	C08024C01		-	-	-	-	-0,27	-0,31	-	-
Prot transducina WD-40 repetido	3223	At2g43770	0,06	0,22	0,16	-	-0,52	-0,62	-	-
Protein quinasa [<i>A. thaliana</i>]	4954	At3g63330					-	-	-	-
Prot no homóloga en <i>A. thaliana</i>	2590		+	+	+	+	-0,59	-0,21	-	-0,39
β -galactosidasa [<i>Lycopersicon esculentum</i>]	C31805H10	At4g36360	-0,60	-	-	-1,18	-0,41	-	-	-
Prot cerebro 44 [<i>Oryza sativa</i> (cv. <i>japonica</i>)]	C08008D07	At5g20090					-	-	-	-
Prot fosfatasa 2C [<i>A. thaliana</i>]	C21003B06	At3g63340					-0,58	-0,88	-	-
Prot función desconocida	5386	At1g64980	-0,31	-0,17	-	-	-0,62	-0,72	-	-
Prot función desconocida [<i>Synechococcus</i> sp.]	C01005C06	At5g67370	0,00	-0,28	-0,40	-0,07	-0,25	-0,26	-	-
Prot inhibidora invertasa/pectin metilesterasa	562	At5g62360	-	0,47	-	-0,34	-0,30	-0,05	-	-
Prot ribosomal L18 [<i>A. thaliana</i>]	6300	At1g48350	-	-	-	0,07	-0,53	-	-	-

Al igual que con los resultados de la micromatriz 7k, se procedió a un estudio más detallado de los genes que codifican proteínas relacionadas con el estrés oxidativo, proteínas PR y las relacionadas con la transcripción y señalización. El tratamiento de infección y posterior inactivación térmica del patógeno a 1 dpt aumentó la expresión de 2 genes en el flavedo y 10 en el albedo, de los 60 relacionados con el estrés oxidativo incluidos en la micromatriz 12k (Tabla 23). De estos genes del albedo, 6 no se detectaron en los frutos no tratados. Además de la inducción de genes que codifican GSTs en ambos tejidos, aumentó la expresión de una SOD, cuatro POX y una glutación reductasa en el albedo. El nivel de expresión de 12 genes en el flavedo y 3 en el albedo descendió a 1 dpt hasta no detectarse. En ambos tejidos se redujo la expresión de diversos genes que codifican GSTs y POX. Además, no se detectó expresión de genes que codifican dos SOD y una tiorredoxina en el flavedo a 1 dpt.

Tabla 23. Genes que codifican proteínas relacionadas con el estrés oxidativo incluidos en la micromatriz 12k y que mostraron expresión diferencial en el flavedo y albedo de naranjas 'Navelate' como consecuencia del tratamiento inductor a 1 dpt. Se muestra el unigen al que pertenecen, la homología con *A. thaliana*, si es que la presentan, y el \log_2 del cociente de: A) I24/NT, B) I0/NT, C) I1/NT y D) I3/NT. Fueron considerados significativos si FDR < 1 % en el análisis estadístico SAM (X vs. Y). Además, también tienen expresión diferencial positiva aquellos genes cuya expresión no se detectó en los frutos no tratados y sí en el otro tratamiento comparado. Los genes en el albedo que no se detectaron en los frutos no tratados (+) se ordenaron de mayor a menor expresión en AI1. Los genes cuya expresión no se detectó en FI1 (-) se ordenaron de mayor a menor expresión en FNT, y los que no se detectaron en AI1, de mayor a menor expresión en ANT.

Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	FLAVEDO				ALBEDO			
			A	B	C	D	A	B	C	D
GST [<i>Glycine max</i>]	C08034B04	At2g30860	0,65	1,09	1,64	0,92	0,50	0,84	1,69	1,15
GST [<i>Glycine max</i>]	1151	At2g30870	0,32	0,79	1,05	0,68	0,17	0,68	1,31	-
GST [<i>Euphorbia esula</i>]	5543	At1g02920	0,28	0,22	-	-	0,09	-	-	-0,37
POX clase III [<i>Gossypium hirsutum</i>]	3912	At5g05340	0,00	0,61	-	-0,06	+	+		
GST [<i>A. thaliana</i>]	C20007C12	At2g29420	-0,22	-	-	-0,07	-	-0,09	-0,10	-1,08
GR [<i>Vitis vinifera</i>]	2427	At3g54660	-	-	-	-0,11	+	+		
Glutación POX	C08011G07	At2g25080	-0,39	-0,09	-	-0,24	-0,25	0,41	0,00	-
POX [<i>Gossypium hirsutum</i>]	C34103G06	At5g05340	-	-0,24	-	-	+	+	+	
POX clase III [<i>Gossypium hirsutum</i>]	3725	At5g05340	0,26	0,26	-	-0,26	+	+	+	
Tiorredoxina POX [<i>Saccharomyces cerevisiae</i>]	C31200F02		-0,20	-	-	-	0,27	-0,19	-	0,05
SOD Cu/Zn [<i>Citrus limon</i>]	712	At1g08830	-	-	-	0,24	+	+	+	+
POX	6411	At1g05260	-	-	-	-	+	+	+	
POX [<i>Glycine max</i>]	C08028D07	At1g05260	-	-	-	-0,27	+	+	+	
SOD Cu/Zn [<i>Arvicennia marina</i>]	1893	At1g08830	-0,36	-	-	-	+			

Continuación de la Tabla 23.

Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	FLAVEDO				ALBEDO			
			A	B	C	D	A	B	C	D
GST T3 [<i>Lycopersicon esculentum</i>]	1173	At2g29420	-0,15	0,95	2,07	1,55	0,36	1,15	1,99	2,13
GST 22 [<i>Glycine max</i>]	C08034B04	At2g30860	0,65	1,09	1,64	0,92	0,50	0,84	1,69	1,15
GST [<i>Cucurbita maxima</i>]	4728	At2g29420	0,34	0,53	1,05	1,05	0,45	0,55	1,58	1,23
GST [<i>Phaseolus acutifolius</i>]	549	At2g30860	0,39	0,85	1,11	0,59	0,39	0,74	1,45	1,05
SOD [<i>Citrus limon</i>]	712	At1g08830	-	-	-	0,24	+	+	+	+
POX [<i>Gossypium hirsutum</i>]	C34103G06	At5g05340	-	-0,24	-	-	+	+	+	
POX clase III [<i>Gossypium hirsutum</i>]	3725	At5g05340	0,26	0,26	-	-0,26	+	+	+	
GR (NADPH) [<i>Vitis vinifera</i>]	2427	At3g54660	-	-	-	-0,11	+		+	
POX [<i>Glycine max</i>]	C08028D07	At1g05260	-	-	-	-0,27	+	+	+	
POX (EC 1.11.1.7) isozima 40K	6411	At1g05260	-	-	-	-		+	+	
GST (EC 2.5.1.18) [<i>Carica papaya</i>]	6240	At1g78380	0,08	-0,21	-0,34	-0,19	-0,24	-0,21	-0,64	-0,41
POX [<i>A. thaliana</i>]	C31101F04	At2g37130	0,03	-0,74	-0,33	-0,48	-0,58	-0,65	-	0,16
Tiorredoxina POX [<i>Saccharomyces cerevisiae</i>]	C31200F02		-0,20	-	-	-	0,27	-0,19	-	0,05
GST [<i>Euphorbia esula</i>]	5534	At1g02920	0,28	0,22	-	-	0,09	-	-	-0,37

En la micromatriz 12k se incluyeron 52 genes que codifican proteínas PRs. Solamente dos genes que codifican una quitinasa y una PR-1b aumentaron la expresión más de 2 veces en el flavedo como consecuencia del tratamiento inductor a 1 dpt, mientras que fueron 10 en el albedo (Tabla 24). De estos últimos, 5 no se detectaron en el albedo de los frutos no tratados. Entre los genes que aumentaron la expresión más de 2 veces en el albedo se encontraron genes que codifican una PR-10A, una PR-4A, una quitinasa y una LTP. Todos los genes que redujeron la expresión en respuesta al tratamiento inductor en ambos tejidos no se detectaron a 1 dpt. En el flavedo redujeron la expresión dos β -1,3-glucanasas, dos PRs, dos LTPs, una taumatina, una defensina y una quitinasa, mientras que en el albedo fueron una PR-1b, una PR y una taumatina.

Tabla 24. Genes que codifican proteínas PR incluidos en la micromatriz 12k que mostraron expresión diferencial en el flavedo y albedo de naranjas ‘Navelate’ como consecuencia del tratamiento inductor a 1 dpt (Ver pie de Tabla 23).

Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	FLAVEDO				ALBEDO			
			A	B	C	D	A	B	C	D
Quitinasa (CHI1) [<i>Citrus sinensis</i>]	5509	At3g54420	-1,03	1,86	1,61	1,40	0,68	2,38	2,06	2,82
PR-1b [<i>Nicotiana tabacum</i>]	C02010A04	At4g33720		+			-	-0,23	-	-
β -1,3-glucanasa [<i>Olea europaea</i>]	2188	At2g16230	0,23	-1,46	-1,87	-2,83	0,30	0,21	-0,54	-0,98
β -1,3-glucanasa [<i>Vitis vinifera</i>]	4010	At3g57270	-	1,46	-	1,31		+	+	
Quitinasa clase V	C16012G05	At4g19800	0,00	0,41	-	0,16	-0,02	-0,45	0,02	-0,19
PR [<i>A. thaliana</i>]	C08022C06	At1g50060	-0,15	-0,19	-	-	0,33	0,07	-0,06	0,04
PR [<i>A. thaliana</i>]	C32201F10	At4g25780	-	-	-	-0,34	0,09	-0,07	-	-
LTP (PR-14)	C08022F07	At2g18370	-0,18	0,12	-	-0,32	-0,09	0,12	0,12	0,20
Taumatina (PR-5) [<i>A. thaliana</i>]	2283	At1g73620	-	-	-	-0,49	+	+	+	
LTP (PR-14)	2163	At2g45180	0,54	-0,85	-	-1,47	0,17	-0,17	-0,37	-0,92
Prot defensiva (PR-12) [<i>A. thaliana</i>]	3247	At1g19610	-	-0,16	-	-	+	+	+	
PR-10A [<i>Datisca glomerata</i>]	6785	At1g24020	0,87	1,56	1,09	1,31	1,27	3,61	3,45	3,03
PR-4A [<i>Nicotiana tabacum</i>]	7168	At3g04720	-0,50	1,47	1,34	2,04	-0,21	2,06	2,42	3,09
Quitinasa (CHI1) [<i>Citrus sinensis</i>]	5509	At3g54420	-1,03	1,86	1,61	1,40	0,68	2,38	2,06	2,82
LTP (PR-14) [<i>Pisum sativum</i>]	6404	At2g38540	-0,17	0,55	0,97	0,75	0,24	0,89	1,06	0,95
Quitinasa (CHI1) [<i>Citrus sinensis</i>]	6931	At3g54420	0,02	1,20	0,81	0,97	0,41	0,97	0,96	1,20
Quitinasa clase IV (CHIV) [<i>A. thaliana</i>]	C31801A05	At3g54420	-	1,27	1,56	-0,02	+	+	+	+
β -1,3-glucanasa (PR-2) [<i>Vitis vinifera</i>]	4010	At3g57270	-	1,46	-	1,31		+	+	
Thaumatina (PR-5) [<i>A. thaliana</i>]	2283	At1g73620	-	-	-	-0,49	+	+	+	
LTP (PR-14) [<i>A. thaliana</i>]	C31704C02	At3g53980	-0,35	-	-0,26	-0,53	+	+	+	+
PR-1b [<i>Nicotiana tabacum</i>]	C02010A04	At4g33720				+	-	-0,23	-	-
PR [<i>A. thaliana</i>]	C32201F10	At4g25780	-	-	-	-0,34	0,09	-0,07	-	-
Taumatina (PR-5) [<i>A. thaliana</i>]	C07001F06	At5g02140				+	-0,16	-	-	-

Para conocer con más detalle el comportamiento de genes relacionados con la transcripción y señalización, se realizó un análisis SAM con FDR < 5 % con los 726 unigenes incluidos en la micromatriz 12k implicados en estos procesos. Este análisis fue menos restrictivo ya que cambios de expresión que generalmente se observan en este tipo de genes son reducidos. El tratamiento de inducción de resistencia aumentó significativamente la expresión de 24 genes en el flavedo a 1 dpt (Tabla 25), mientras que 92 se reprimieron. Entre los inducidos se encuentran un factor de respuesta a auxina y distintos factores de transcripción bHLH, bZIP, MYB y WRKY. Además, entre los genes inducidos, no se detectó expresión de 16 genes en el flavedo de los frutos no tratados. De los 92 genes que redujeron la expresión en respuesta al

tratamiento inductor, 4 la disminuyeron más de dos veces respecto a los frutos no tratados (Tabla 26). Estos genes codifican una proteína con dedos de zinc, una proteína de unión a DNA y dos factores de transcripción bZIP y MYB. Aproximadamente 80 genes redujeron la expresión como consecuencia del tratamiento inductor, no detectándose a 1 dpt.

Un mayor número de genes modificó la expresión como consecuencia de la infección y posterior inactivación térmica del patógeno en el albedo a 1 dpt. La expresión de 42 genes aumentó significativamente en este tejido a 1 dpt, 6 de los cuales incrementaron su expresión más de 2 veces respecto al albedo de frutos no tratados (Tabla 27). Estos genes codifican tres factores de transcripción tipo WRKY, un activador transcripcional de genes PR, una proteína de unión a DNA, un factor de transcripción MYB y una proteína NAM. Entre los genes que aumentaron la expresión como consecuencia de la infección y posterior curado, 25 no se habían detectado en el albedo de los frutos no tratados. La expresión de 104 genes se redujo en respuesta al tratamiento inductor a 1 dpt en el albedo. Los genes que mostraron una mayor represión codifican una proteína de unión a DNA, dos factores de transcripción bZIP y MYB y una proteína con repeticiones WD (Tabla 28). De estos 104 genes, 76 redujeron la expresión hasta no detectarse a 1 dpt.

Tabla 25. Genes relacionados con la transcripción y la señalización incluidos en la micromatriz 12k y que aumentaron la expresión en el flavedo de naranjas ‘Navelate’ como consecuencia del tratamiento inductor a 1 dpt. Se muestra el unigen al que pertenecen, la homología con *A. thaliana*, si es que la presentan, y el log₂ del cociente de: A) I24/NT, B) I0/NT, C) I1/NT y D) I3/NT. Fueron considerados significativos si FDR < 1 % en el análisis estadístico SAM (X vs. Y). Además, también tienen expresión diferencial positiva aquellos genes cuya expresión no se detectó en los frutos no tratados y sí en el otro tratamiento comparado, o negativa cuando no se detectó expresión génica en respuesta al tratamiento inductor y sí en FNT. Los genes que no se detectaron en el flavedo de los frutos no tratados se ordenaron de mayor a menor expresión en F11.

Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	FLAVEDO				ALBEDO			
			A	B	C	D	A	B	C	D
Prot bHLH [<i>A. thaliana</i>]	C16016H12	At1g05805	0,03	0,84	1,19	0,54	-0,03	0,49	0,74	0,18
Factor respuesta a auxina [<i>Mangifera indica</i>]	5484	At5g62010	0,21	1,22	0,99	1,28	-0,05	0,85	0,47	0,69
Factor transcripción bZIP [<i>A. thaliana</i>]	C05076H09	At3g49760	-0,32	0,37	0,98	1,17	0,10	0,23	0,57	1,01
MYB103 [<i>A. thaliana</i>]	C01006C11	At1g63910	-0,17	1,47	0,92	1,65	-0,28	0,83	0,72	0,82
Prot unión a DNA WRKY [<i>Solanum tuberosum</i>]	2538	At5g13080	-0,26	0,39	0,92	1,03	0,52	1,19	1,71	1,17
OSJNBa0021F22.13 [<i>Oryza sativa</i> (cv. <i>japonica</i>)]	C05075F07	At3g47570	0,10	0,99	0,83	1,04	-0,11	0,67	0,59	0,80
Prot EIN3 [<i>Cucumis melo</i>]	1839	At2g27050	0,43	0,83	0,81	0,81	0,11	0,57	0,39	0,70
Prot unión a DNA WRKY3 [Perejil]	2730	At2g23320	0,04	0,06	0,46	0,27	0,26	0,43	0,81	0,52
Prot-quinasa rica en leucina [<i>A. thaliana</i>]	C34104D04	At1g74360	+	+	+	+	0,31	0,34	0,90	0,19
Prot 3 asociada a fitocromo [<i>A. thaliana</i>]	C02020G06	At1g09530			+	+	+			
Factor transcripción Myb [<i>Nicotiana tabacum</i>]	2013	At5g29000	+	+	+	+	0,12	0,39	0,27	0,35
Prot inducida harpin [<i>A. thaliana</i>]	5661	At1g65690			+	+	+			+
Factor transcripción MYC [<i>Solanum tuberosum</i>]	C06001G08	At4g00870	+	+			-	-	-	-
Prot-quinasa rica en leucina [<i>A. thaliana</i>]	4693	At2g31880			+	+				
Prot factor rápida alcalinización (RALF) [<i>A. thaliana</i>]	C32105H10	At4g14010		+	+	+				+
Prot reparación DNA acoplada a transcripción [<i>A. thaliana</i>]	C08011A11	At5g28740	+	+	+	+	0,09	0,00	0,37	-0,04
Factor transcripción Myb [<i>A. thaliana</i>]	C01010A07	At5g06800	+	+	+	+	+	+		
Factor transcripción Myb [<i>A. thaliana</i>]	C08036G05	At2g21650			+	+	0,02	-	0,61	0,11
RNA polimerasa II 15.9 kDa (RPB15.9) [<i>A. thaliana</i>]	5002	At5g09920	+		+	+	-	-	-0,30	0,16
Prot MADS-box [<i>Malus x domestica</i>]	C20007B02	At5g20240			+		-	0,58	-	-
Factor transcripción SF3 [<i>N. tabacum</i>]	4615	At3g55770	+	+	+	+	-0,14	-	-	-0,14
RNA polimerasa dependiente RNA [<i>A. thaliana</i>]	4755	At1g14790	+	+	+	+	0,38	0,24	1,00	0,45
MYB121 [<i>A. thaliana</i>]	6711	At3g30210	+		+	+	-0,12	-	-	-0,26
Prot quinasa [<i>A. thaliana</i>]	4090	At2g02220	+		+		+			+

Tabla 26. Genes implicados en la transcripción y señalización incluidos en la micromatriz 12k que redujeron la expresión en el flavedo de naranjas ‘Navelate’ como consecuencia del tratamiento inductor a 1 dpt. El listado de los 30 primeros genes cuya expresión no se detectó en respuesta al tratamiento inductor se ordenó de mayor a menor expresión en FNT (Ver detalles en la Tabla 25).

Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	FLAVEDO				ALBEDO			
			A	B	C	D	A	B	C	D
MYB [<i>Nicotiana tabacum</i>]	C20006B02	At2g37630	-0,28	-2,29	-2,07	-1,32	-0,44	-2,29	-	-1,27
Prot dedos de zinc [<i>A. thaliana</i>]	C31703G06	At5g54630	-0,49	-	-1,28	-1,03	+			+
Prot bZIP [<i>A. thaliana</i>]	C04027A02	At1g52320	-0,31	-1,06	-1,28	-0,72	-0,28	-1,13	-1,25	-0,86
Prot union a DNA [<i>A. thaliana</i>]	C34205F07	At3g04590	0,12	-1,67	-1,22	-1,02	-0,26	-1,85	-1,81	-1,08
Factor transcripción Myb [<i>Populus x canescens</i>]	C18004B12	At4g21440	-0,11	-1,25	-0,99	-0,86	-0,20	-1,41	-1,25	-0,89
Prot argonauta (AGO1) [<i>A. thaliana</i>]	C02008E12	At1g48410	-0,18	-0,83	-0,66	-0,65	-0,29	-0,74	-0,61	-0,75
Prot repetición WD [<i>A. thaliana</i>]	4635	At4g03020	0,03	-0,31	-0,60	-0,26	-0,10	-0,46	-1,18	-0,40
Factor transcripción unión CCAAT-box	2429	At3g53340	-0,15	-0,26	-0,57	-0,41	0,11	-0,16	-0,52	-0,27
Calmodulina 4 [<i>Daucus carota</i>]	6486	At3g43810	-0,32	-0,54	-0,56	-0,45	-0,30	-0,75	-0,59	-0,40
Factor transcripción conteniendo dominio AP2	4713	At5g13330	0,06	-1,09	-0,53	-0,54	-0,18	-1,01	-1,01	-0,71
Prot MADS box (GHMADS-2) [<i>Gossypium hirsutum</i>]	C34106B08	At4g09960	-0,14	-0,61	-0,51	-0,35	-0,09	-0,59	-0,54	-0,17
Prot bHLH [<i>A. thaliana</i>]	C05133A11	At5g43650	-	-	-	-	-0,60	-0,29	-	-1,21
Factor transcripción conteniendo dominio AP2	686	At1g22810	-	-	-	-	+	+		
Nexina 1 [<i>Brassica oleracea</i>]	1230	At5g06140	-	-0,43	-	-	-	-0,27	-	-
DREB1 [<i>Theobroma cacao</i>]	C05133H03	At4g25490	-	-0,60	-	-0,74	-0,48	-0,13	-0,40	-0,14
Prot Myb [<i>A. thaliana</i>]	2102	At2g36960	-0,54	-	-	-0,34	-0,04	0,19	0,09	0,00
Prot conteniendo dominio RWP-RK [<i>A. thaliana</i>]	C21003H07	At2g17150	-	-	-	-0,38	0,33	0,19	0,10	-
Prot peptidasa S41 [<i>A. thaliana</i>]	956	At5g46390	-	-	-	-	-0,38	0,06	-	-
Prot dedos de zinc (C2H2) [<i>A. thaliana</i>]	C34203F07	At5g40710	0,23	-0,87	-	-0,94	-0,04	-0,46	-	-
Factor respuesta a etileno 5 [<i>Vitis aestivalis</i>]	6948	At5g47230	-	-	-	-	+	+	+	
Prot Lil3 [<i>Oryza sativa</i> (cv. <i>japonica</i>)]	152	At4g17600	0,17	-0,38	-	-0,20	0,18	-0,02	-0,01	-0,25
Factor transcripción LIM [<i>N. tabacum</i>]	C31706C11	At1g10200	-0,16	0,35	-	-0,33	0,01	-0,49	-0,44	-0,42
Factor GHMYB10 [<i>Gossypium hirsutum</i>]	C32102B08	At1g22640	-0,07	-	-	-	+			+
Prot dedos de zinc (C3HC4 RING finger) [<i>A. thaliana</i>]	6268	At2g47700	-0,25	-	-	-	-0,12	-0,32	-	-0,36
Prot PHAP2B [<i>Petunia x hybrida</i>]	C06018G12	At4g36920	-0,09	-	-	-0,15	0,04	0,03	0,01	0,18
Prot dedos de zinc	3497	At2g31380	0,11	-	-	-	+			
Prot dedos de zinc (tipo B-box) [<i>A. thaliana</i>]	C07012B10	At3g21150	-	-	-	0,23	-0,40	0,10	-0,06	-
Prot expresada [<i>A. thaliana</i>]	C18007H09	At3g29780	-	-	-	-	+	+		
Prot F-box [<i>A. thaliana</i>]	C08005D08	At1g25280	-	-0,01	-	-0,24	0,19	0,28	-	-
CG33149-PA [<i>Drosophila melanogaster</i>]	3764	At3g55770	-0,19	-	-	-0,13	0,03	-0,06	-0,02	-0,05
GmMYB29A2 [<i>Glycine max</i>]	1404	At2g31180	-0,81	-0,30	-	-0,37	0,20	0,42	0,85	0,76
Factor 2 respuesta auxina [<i>Oryza sativa</i>]	C04033A05	At5g62010	-0,02	-	-	-0,34	0,48	0,45	0,29	0,52
Prot resistencia enfermedad [<i>A. thaliana</i>]	2142	At4g16890	-	-0,38	-	-	0,24	0,11	-	-
Myb [<i>Nicotiana tabacum</i>]	C07001B04	At4g32740	-	-	-	-0,37	0,10	-	-	-
Prot regul. auxina [<i>Populus tremula x Populus t</i>]	4620	At3g04730	-	-	-	-0,13	+			
EMF2 [<i>A. thaliana</i>]	2110	At2g35670	-0,32	-0,35	-	-0,06	-0,15	0,05	-0,27	0,12
Myb [<i>Nicotiana tabacum</i>]	2416	At4g32730	-0,38	-	-	0,07	-0,01	-0,20	-0,22	-0,39
Prot dedos zinc	C03003F04	At1g69600	-	-	-	-	-	0,43	-	-

Tabla 27. Listado de genes implicados en la transcripción y señalización incluidos en la micromatriz 12k que incrementaron la expresión en el albedo de naranjas 'Navelate' como consecuencia del tratamiento inductor a 1 dpt. Los genes que no se detectaron en el albedo de frutos no tratados se ordenaron de mayor a menor expresión en AI1 (Ver detalles en la Tabla 25).

Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	FLAVEDO				ALBEDO			
			A	B	C	D	A	B	C	D
Prot unión DNA tipo WRKY [<i>Solanum tuberosum</i>]	2538	At5g13080	-0,26	0,39	0,92	1,03	0,52	1,19	1,71	1,17
Prot unión DNA tipo WRKY [<i>A. thaliana</i>]	5635	At4g31550	-0,30	1,25	0,86	0,25	-0,07	1,83	1,38	0,64
Prot 10 NAM [<i>Petunia x hybrida</i>]	3380	At1g01720	0,27	0,49	1,07	0,49	0,28	1,12	1,32	0,60
Factor transcripción WRKY [<i>A. thaliana</i>]	2313	At1g62300	0,05	0,24	0,85	-0,23	0,39	1,12	1,10	0,69
Prot MYB [<i>Petunia x hybrida</i>]	C05146C04	At3g23250	-1,01	0,40	1,12	0,39	-0,22	0,58	1,07	0,79
Prot unión DNA [<i>A. thaliana</i>]	C31207G03	At3g22780	-0,50	-0,67	0,45	-0,58	0,00	-0,08	1,07	0,13
Prot quinasa transmembrana rica en leucina [<i>A. thaliana</i>]	C34104D04	At1g74360	+	+	+	+	0,31	0,34	0,90	0,19
Prot unión DNA WRKY3 [<i>Petroselinum crispum</i>]	2730	At2g23320	0,04	0,06	0,46	0,27	0,26	0,43	0,81	0,52
Prot bHLH [<i>Tulipa</i> sp.]	C16016H12	At1g05805	0,03	0,84	1,19	0,54	-0,03	0,49	0,74	0,18
Factor transcripción MYB103 [<i>A. thaliana</i>]	C01006C11	At1g63910	-0,17	1,47	0,92	1,65	-0,28	0,83	0,72	0,82
Factor transcripción conteniendo dominio AP2 [<i>A. thaliana</i>]	C16018F01	At5g64750	-0,28	0,15	0,75	0,15	-0,25	0,05	0,66	0,22
OSJNBa0021F22.13 [<i>Oryza sativa</i> (cv. <i>japonica</i>)]	C05075F07	At3g47570	0,10	0,99	0,83	1,04	-0,11	0,67	0,59	0,80
Prot unión DNA [<i>A. thaliana</i>]	C34204B08	At4g12080	0,19	0,42	0,19	0,27	-0,06	0,70	0,58	0,33
Prot NAM [<i>A. thaliana</i>]	6041	At3g04070	0,02	0,03	0,16	0,11	0,10	0,04	0,51	0,32
Factor 7 choque térmico [<i>A. thaliana</i>]	4180	At4g11660	0,09	0,44	0,57	0,48	0,16	0,60	0,36	0,22

Continuación de la Tabla 27.

Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	FLAVEDO				ALBEDO			
			A	B	C	D	A	B	C	D
Prot unión respuesta etileno [<i>Lycopersicon esculentum</i>]	804	At3g23240	-	-	-	0,28	+	+	+	+
MEK map quinasa [<i>Medicago sativa</i> subsp. x <i>varia</i>]	C07005E02	At3g21220	-0,26	-	0,00	-	+	+	+	+
Prot alta movilidad [<i>Branchiostoma belcheri</i>]	C31201E06	At4g23800	-	0,45	-	0,54		+	+	
Prot 3 unión a DNA [<i>Nicotiana tabacum</i>]	3964	At3g56400	-	-	-	0,16	+	+	+	+
Factor transcripción bZIP (BZI-4) [<i>Nicotiana tabacum</i>]	C08005F12	At3g62420	-	-	-	0,07	+	+	+	+
Prot bHLH [<i>A. thaliana</i>]	C31602G06	At4g00050	-	-	-	0,12	+	+	+	+
MYB8 [<i>Gerbera hybrid</i> cv. "Terra Regina"]	4407	At3g27810	-	0,12	-	0,38	+	+	+	+
Prot meristemo no apical (NAM) [<i>A. thaliana</i>]	6913	At4g27410	-0,09	-	0,12	0,38	+		+	+
Factor5 respuesta etileno [<i>Vitis aestivalis</i>]	6948	At5g47230	-	-	-	-	+	+	+	+
AEL165Cp [<i>Eremothecium gossypii</i>]	C08026F09	At4g31420	-	-	-	-0,69	+	+	+	+
Prot cromometilasa [<i>Nicotiana tabacum</i>]	C32008E06	At1g69770	-	-	-	-	+		+	+
Prot bHLH [<i>A. thaliana</i>]	1369	At5g54680	-	-	-	-		+	+	
Prot dedos de zinc (tipo C2H2) (WIP5) [<i>A. thaliana</i>]	C08035C04	At1g51220	-	-	-	0,26	+	+	+	+
Prot dedos de zinc (tipo C3HC4 RING finger) [<i>A. thaliana</i>]	C31801E12	At1g23980	-	-	-0,13	-0,14	+	+	+	+
Prot dedos de zinc RING-H2 [<i>Oryza sativa</i>]	C31404E10	At2g39720	-	0,46	0,23	0,13	+	+	+	+
Factor transcripcional B3 [<i>A. thaliana</i>]	C32102D11	At4g01580					+	+	+	+
Represor transcripción ROM1 [<i>Phaseolus vulgaris</i>]	4420	At4g36730	-	-0,19	-	0,22	+	+	+	+
Regulador respuesta tipo A [<i>Catharanthus roseus</i>]	C05810C02	At1g74890	-0,59	-0,12	-0,23	-0,34	+	+	+	+
Prot dedos zinc (tipo C2H2) [<i>A. thaliana</i>]	C32105F11	At1g75710	-	-	-	0,20	+	+	+	+
Fosfolipasa C	1704	At3g08510	-0,26	-0,03	-	-0,14	+		+	+
Prot reparadora DNA XRCC1 [<i>A. thaliana</i>]	2797	At1g80420					+	+	+	+
MYB48 [<i>A. thaliana</i>]	C31809D10	At3g46130	-	-	-	0,41		+	+	
Prot homeobox NDX1 [<i>Glycine max</i>]	3052	At4g03090	-	-	-0,33	-	+	+	+	+
RNA polimerasa sigma subunidad SigF	C31701D05	At2g36990	-	-	-0,29	-	+	+	+	+
Prot 26 MADS box [<i>Cucumis sativus</i>]	2100	At5g20240		+		+	+	+	+	+

Tabla 28. Genes implicados en la transcripción y señalización incluidos en la micromatriz 12k con mayor represión en el albedo de naranjas 'Navelate' como consecuencia del tratamiento inductor a 1 dpt. El listado de los 30 primeros genes cuya expresión no se detectó en respuesta al tratamiento inductor se ordenó de mayor a menor expresión en ANT (Ver detalles en la Tabla 25).

Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	FLAVEDO				ALBEDO			
			A	B	C	D	A	B	C	D
Prot unión DNA [<i>A. thaliana</i>]	C34205F07	At3g04590	0,12	-1,67	-1,22	-1,02	-0,26	-1,85	-1,81	-1,08
Prot bZIP [<i>A. thaliana</i>]	C04027A02	At1g52320	-0,31	-1,06	-1,28	-0,72	-0,28	-1,13	-1,25	-0,86
Factor transcripción MYB [<i>Populus × canescens</i>]	C18004B12	At4g21440	-0,11	-1,25	-0,99	-0,86	-0,20	-1,41	-1,25	-0,89
Prot repetición WD [<i>A. thaliana</i>]	4635	At4g03020	0,03	-0,31	-0,60	-0,26	-0,10	-0,46	-1,18	-0,40
Factor transcripción conteniendo dominio AP2	4713	At5g13330	0,06	-1,09	-0,53	-0,54	-0,18	-1,01	-1,01	-0,71
Prot dedos zinc (tipo C3HC4 RING finger) [<i>A. thaliana</i>]	3090	At1g15100	-0,14	-0,22	-0,68	-0,62	-0,10	-0,49	-0,92	-0,70
Prot 4 MADS-box [<i>Vitis vinifera</i>]	7139	At1g24260	0,13	-0,70	-0,87	0,02	-0,18	-0,59	-0,85	-0,10
Prot α alta movilidad (HMGalpha)	6482	At3g51880	-0,16	-0,58	-0,49	0,05	-0,32	-0,77	-0,77	-0,49
Factor rápida alcalinización (RALF) [<i>A. thaliana</i>]	6077	At3g16570	-0,14	-0,35	-0,75	-0,62	-0,19	-0,28	-0,74	-0,45
Prot reguladora (ROM2) [<i>Phaseolus vulgaris</i>]	4030	At2g46270	-0,38	-0,17	-0,47	-0,11	-0,37	-0,33	-0,68	-
Prot 2 MADS-box [<i>Vitis vinifera</i>]	C02026F05	At5g15800	0,10	-0,61	-0,71	0,06	-0,19	-0,58	-0,66	0,05
Prot MYC [<i>A. thaliana</i>]	C04033B02	At5g08130	-0,12	-0,57	-	-0,82	0,15	-0,51	-0,62	-0,17
Prot argonauta (AGO1) [<i>A. thaliana</i>]	C02008E12	At1g48410	-0,18	-0,83	-0,66	-0,65	-0,29	-0,74	-0,61	-0,75
Factor transcripcional B3 [<i>A. thaliana</i>]	1675	At4g01580	-0,08	-0,76	-0,20	0,22	0,42	-0,90	-0,60	-
(1-4)- β -manan endohidrolasa [<i>A. thaliana</i>]	2233	At5g66460	0,06	-0,04	-0,55	-0,55	-0,23	-0,24	-0,57	-0,84
Prot 3 MADS-box [<i>Vitis vinifera</i>]	C03011D02	At2g45650	0,08	-0,42	-0,85	0,13	-0,29	-0,57	-0,57	0,07
Prot 2 MADS-box [<i>Gossypium hirsutum</i>]	C34106B08	At4g09960	-0,14	-0,61	-0,51	-0,35	-0,09	-0,59	-0,54	-0,17
Pirolina-5-carboxilato sintetasa [<i>Vitis vinifera</i>]	7125	At2g39800	-0,09	-0,33	-0,51	-0,01	-0,08	-0,25	-0,53	0,16
T8I13.23 [<i>A. thaliana</i>]	4735	At2g47390	0,29	0,35	-0,10	0,20	-0,05	-0,13	-0,53	-0,24
Factor transcripción unión CCAAT-box putative [<i>A. thaliana</i>]	2429	At3g53340	-0,15	-0,26	-0,57	-0,41	0,11	-0,16	-0,52	-0,27
T8I13.23 [<i>A. thaliana</i>]	6192	At2g47390	0,27	0,42	-0,43	0,34	0,06	-0,07	-0,52	-0,04
Factor transcripción bZIP [<i>A. thaliana</i>]	C02020B07	At3g58120	0,33	-0,33	-0,13	-0,14	-0,25	-0,35	-0,51	-0,07
Protein-quinasa NTF3	5776	At1g59580	0,17	0,30	0,25	0,41	-0,19	-0,29	-0,49	-0,05
Prot conteniendo dominio NusB antiterminación [<i>A. thaliana</i>]	C05076B06	At4g26370	+	+		+	-0,23	-0,33	-0,48	-0,48
Factor transcripción [<i>A. thaliana</i>]	1698	At4g39250	0,00	-0,31	-0,09	-	0,10	-0,44	-0,48	-0,26
Prot unión DNA dominio BE RAV-like B3 [<i>Oryza sativa</i>]	2597	At2g46870	-0,04	-0,18	-0,21	-0,24	-0,04	-0,35	-0,48	-0,40
Protein-quinasa 1 [<i>Medicago sativa</i>]	1923	At4g08500	0,10	-0,48	-0,22	0,10	0,17	-0,50	-0,45	0,14
Prot NAM [<i>A. thaliana</i>]	3603	At4g35580	-0,43	-0,32	-0,21	-0,24	-0,17	-0,22	-0,38	-0,11

Continuación de la Tabla 28.

Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	FLAVEDO				ALBEDO				
			A	B	C	D	A	B	C	D	
Prot 5 dedos zinc (ZFP5) [<i>A. thaliana</i>]	3312	At1g10480		+				-0,13	0,00	-	-
Prot transducina	3223	At2g43770	0,06	0,22	0,16	-		-0,52	-0,62	-	-
MYB91 [<i>Nicotiana tabacum</i>]	C20006B02	At2g37630	-0,28	-2,29	-2,07	-1,32		-0,44	-2,29	-	-1,27
Prot dedos zinc (tipo C3HC4 RING finger) [<i>A. thaliana</i>]	C08033H03	At4g35840	-0,42	-0,41	-	0,22		-0,25	-0,52	-	-0,17
Factor transcripción 3 RNA polimerasa B [<i>Schistosoma japonicum</i>]	C08009A11	At1g17880	0,07	-	-	-		-0,17	-0,37	-	-
Factor transcripción SF3 [<i>Nicotiana tabacum</i>]	4615	At3g55770	+	+	+	+		-0,14	-	-	-0,14
Protein-quinasa (MPK20)	C02014C05	At2g42880	-	-0,59	-0,48	-0,45		-0,69	-0,48	-	-
Prot conteniendo dominio NusB antiterminación [<i>A. thaliana</i>]	C31704H06	At4g26370	+			+		-	-	-	-0,56
Prot dedos zinc (tipo C2H2) [<i>A. thaliana</i>]	C34203F07	At5g40710	0,23	-0,87	-	-0,94		-0,04	-0,46	-	-
MYB33 [<i>A. thaliana</i>]	C18020D12	At5g06100	-0,44	-0,10	-0,19	-0,40		-0,30	-0,18	-	-0,45
Prot bHLH [<i>A. thaliana</i>]	C05133A11	At5g43650	-	-	-	-		-0,60	-0,29	-	-1,21
Factor transcripción MYB121 [<i>A. thaliana</i>]	6711	At3g30210	+		+	+		-0,12	-	-	-0,26
Prot dedos zinc (tipo C3HC4 RING finger) [<i>A. thaliana</i>]	6268	At2g47700	-0,25	-	-	-		-0,12	-0,32	-	-0,36
Factor respuesta auxina (ARF6) [<i>A. thaliana</i>]	C03006F12	At1g30330	0,50	-	-	-0,21		0,20	-	-	-
Prot peptidasa S41 [<i>A. thaliana</i>]	956	At5g46390	-	-	-	-		-0,38	0,06	-	-
knotted 3 [<i>Nicotiana tabacum</i>]	C08024G08	At4g08150	0,36	-	-	0,25		-	-0,05	-	-
Prot unión DNA [<i>A. thaliana</i>]	4256	At2g45850				+		-1,18	-0,45	-	-
Prot función desconocida [<i>A. thaliana</i>]	2482	At1g43860	+			+		-	-	-	-
Transportador ABC [<i>A. thaliana</i>]	7004	At1g15520	+	+		+		-0,56	-0,36	-	-0,61
Factor 10 respuesta auxina [<i>A. thaliana</i>]	C31301A12	At2g28350	-	-	0,13	-		-0,27	-0,29	-	-
Factor lanzamiento cadena peptídica [<i>A. thaliana</i>]	C05073G05	At3g57190	0,15	-0,05	-	-		0,09	-0,35	-	-0,05
Nexina 1 [<i>Brassica oleracea</i>]	1230	At5g06140	-	-0,43	-	-		-	-0,27	-	-
Regulador transcripción [<i>Lactobacillus plantarum</i>]	C31208G07							-0,22	-	-	-
Prot hoja rizada [<i>Oryza sativa</i> (cv. <i>japonica</i>)]	C05807E11	At2g23380	-	-	-	-		-0,83	-0,01	-	-
Prot Myb [<i>Nicotiana tabacum</i>]	1760		-	-	-0,09	-0,30		-0,05	0,28	-	-
Factor choque térmico HSF8	C18019A10	At4g17750		+				0,15	0,09	-	-
Prot tipo POZ [<i>A. thaliana</i>]	6559	At5g63160						-0,05	0,21	-	-

Con el fin de profundizar en el conocimiento de aquellos procesos metabólicos implicados en la inducción de resistencia en los frutos cítricos, se procedió al estudio conjunto de la expresión de los genes incluidos en la micromatriz 12k. El análisis de anotación funcional por ontologías génicas mostró que aquellos genes que se indujeron en el flavedo de frutos sometidos al tratamiento de inducción de resistencia respecto a los frutos no tratados estaban incluidos mayoritariamente dentro de los procesos relacionados con el metabolismo secundario, de compuestos aromáticos, de derivados de aminoácidos y de fenilpropanoides (Tabla 29). En cuanto al albedo, el tratamiento de infección más curado aumentó de forma significativa los procesos relacionados con el metabolismo y la biosíntesis de aminoácidos entre los que se encuentran los procesos biosintéticos de fenilpropanoides y los metabólicos de aminoácidos azufrados entre los no redundantes. Los genes significativos incluidos en algunos de estos procesos se indican en la Tabla 30.

Tabla 29. Procesos biológicos significativamente diferentes ($p < 0,05$) en el flavedo y albedo de frutos sometidos al tratamiento de inducción de resistencia respecto del resto de tratamientos. Los genes que se han analizado en cada comparación son aquellos con expresión diferencial por análisis SAM o en los que no se detectó expresión en uno de los tratamientos, considerándose positivos (+) cuando se inducen en la segunda condición o negativos (-) si se reprimen en la segunda condición. El análisis, basado en las hibridaciones con la micromatriz 12k, se realizó con el programa informático FatiGO+ (BABELOMICS), mostrándose en la tabla el valor de p corregido. En azul se muestran los procesos biológicos significativos no redundantes. El signo + indica que esos procesos biológicos se inducen en la segunda condición, y el signo - si son en la primera. En la tabla se muestra: A) número de genes incluidos en cada procesos biológico, B) número de genes con expresión diferencial, C) valor de p corregido y D) SR: sobrerrepresentado. En azul se muestran los procesos biológicos significativos no redundantes.

-----Micromatriz 12k----- PROCESOS BIOLÓGICOS	FNT vs. FI0		FNT vs. FI1		ANT vs. AI1		ANT vs. AI3		AI24 vs. AI1		AI24 vs. AI3		
	A	B	+	D	B	+	D	B	+	D	B	+	D
Nivel 3													
Procesos metabólicos secundarios	106	22	9,76e-05	SR	14	2,55e-02	SR	20	1,19e-02	SR	17	1,78e-02	SR
Procesos biosintéticos	705							78	1,04e-02	SR			
Procesos metabólicos de compuestos nitrogenados	177										17	4,14e-02	SR
Nivel 4													
Procesos metabólicos de compuestos aromáticos	94	6	3,23e-02	SR							13	8,58e-03	SR
Procesos biosintéticos celulares	630							74	5,59e-03	SR			
Procesos metabólicos de aminoácidos y derivados	190							30	1,19e-02	SR	23	1,74e-04	SR
Procesos metabólicos del azufre	33							10	1,82e-02	SR	9	8,69e-04	SR
Generación de metabolitos precursores y energía	236										27	2,62e-02	SR
Procesos metabólicos de aminas	155										17	9,61e-03	SR
Procesos metabólicos de hormonas	17										5	4,94e-02	SR
Nivel 5													
Procesos metabólicos de derivados de aminoácidos	71	14	3,11e-02	SR				16	1,19e-02	SR	15	4,58e-05	SR
Procesos biosintéticos de compuestos aromáticos	52							15	5,59e-03	SR	11	2,62e-02	SR
Procesos biosintéticos de compuestos azufrados	14										6	2,39e-03	SR
Procesos biosintéticos de compuestos nitrogenados	77										12	6,50e-03	SR
Procesos biosintéticos de hormonas	13										5	1,66e-02	SR
Nivel 6													
Procesos metabólicos de fenilpropanoides	44	13	6,74e-04	SR				12	1,19e-02	SR	10	2,62e-02	SR
Procesos biosintéticos de derivados de aminoácidos	53							14	1,04e-02	SR			
Procesos biosintéticos de aminas	73										13	4,58e-05	SR
Procesos metabólicos de aminoácidos	141										12	3,57e-03	SR
Nivel 7													
Procesos biosintéticos de fenilpropanoides	31							10	1,19e-02	SR	9	1,17e-02	SR
Procesos metabólicos de aminoácidos azufrados	17							7	1,82e-02	SR			
Procesos biosintéticos de aminoácidos	65										8	9,04e-07	SR
Nivel 8													
Procesos biosintéticos de aminoácidos azufrados	10										11	8,58e-03	SR
Procesos metabólicos de metionina	12										6	8,69e-04	SR
											5	2,91e-02	SR

Tabla 30. Genes incluidos en dos procesos biológicos significativos realizando el análisis de anotación funcional por ontologías génicas. Entre paréntesis se muestra, en primer lugar el número de genes significativos incluidos en el proceso biológico y, en segundo lugar el número de genes totales de dicho proceso incluidos en la micromatriz 12k.

PROCESOS METABÓLICOS DE FENILPROPANOIDES (Nivel 6) (ANT vs. AI1 +) (12/44)			
Homólogo en <i>A. thaliana</i>	Proteína más similar	Unigen	Log₂(AI1 /ANT)
At2g02400	CCR	4404	+
At2g37040	PAL	2545	1,98
		6764	+
At1g22410	3-deoxi-D-arabino-heptulose 7-fosfato sintasa	6471	2,36
At1g17020	Oxidoreductasa	1248	2,84
		1785	+
At4g36220	Aldehído 5-hidrolasa	C31103D11	+
At5g13930	Chalcona sintasa	C31802G12	0,66
At5g20550	Oxidoreductasa	C08035A06	+
At3g29200	Corismato mutasa	236	0,81
At5g54160	O-metiltransferasa	5970	2,85
		C08010D03	3,36
		1479	3,79
		3039	3,83
		6533	3,86
		5951	4,18
At2g40890	Citocromo P450	C31809G11	1,19
At2g33590	CCR	C34002H12	+
At5g07990	Citocromo P450	C06052D10	+
PROCESOS METABÓLICOS DE METIONINA (Nivel 8) (AI24 vs. AI1 +) (5/12)			
Homólogo en <i>A. thaliana</i>	Proteína más similar	Unigen	Log₂(AI1 /AI24)
At2g44160	Metilnotetrahidrofolato reductasa	C05069H02	1,03
		6339	1,35
At1g05010	ACO	3377	4,70
At3g57050	Cistationina β-liasa	4985	0,97
		606	+
At2g19590	ACO	6409	1,03
At5g17920	Metionina sintasa	6733	2,09

Adicionalmente, se comprobó utilizando la herramienta informática 'OMICS Viewer' de 'AraCyc 3.5' que los genes cuya expresión varió en respuesta al tratamiento de inducción de resistencia estaban incluidos dentro de diversas rutas metabólicas. Los resultados obtenidos del análisis de la micromatriz 12k corroboran los de la micromatriz 7k, ya que entre las rutas que se indujeron como consecuencia de la infección y posterior inactivación térmica del patógeno en ambos tejidos se incluyeron la biosíntesis de metionina y el ciclo de SAM (Figura 20), así como la biosíntesis de fenilpropanoides, de ácidos fenólicos libres, de suberina y de flavonoles (Figura 21 y Figura 22). También se observó una inducción de las reacciones redox del glutatión y del ciclo ascorbato/glutatión debido a un aumento en la expresión de genes que codifica una GST en ambos tejidos y glutatión disulfido reductasa en el albedo. Además, en el flavedo se indujeron la biosíntesis de flavonoides y la ruta de oxidación de pentosa fosfato en respuesta al tratamiento inductor, mientras que fueron la biosíntesis de vitamina E, de cisteína y de glucosinolato desde fenilalanina en el albedo. Rutas relacionadas con el metabolismo de azúcares como la glicólisis, la gluconeogénesis y la degradación de gliceraldehído 3-fosfato y degradación de azúcar a etanol y lactato se redujeron significativamente en ambos tejidos. Genes que redujeron la expresión en el flavedo en respuesta al tratamiento de infección y posterior inactivación térmica del patógeno a 1 dpt estaban incluidos en la biosíntesis de estaquiosa y ajugosa dependiente de galactinol, la ruta de oxidación de la pentosa fosfato, el ciclo de Calvin y en las reacciones redox del glutatión debido a una reducción en la expresión de genes que codifican una GST y una glutatión disulfido reductasa, mientras que las rutas de biosíntesis de brasinoesteroides, de corismato, serina, espermina y espermidina se reprimieron solamente en el albedo.

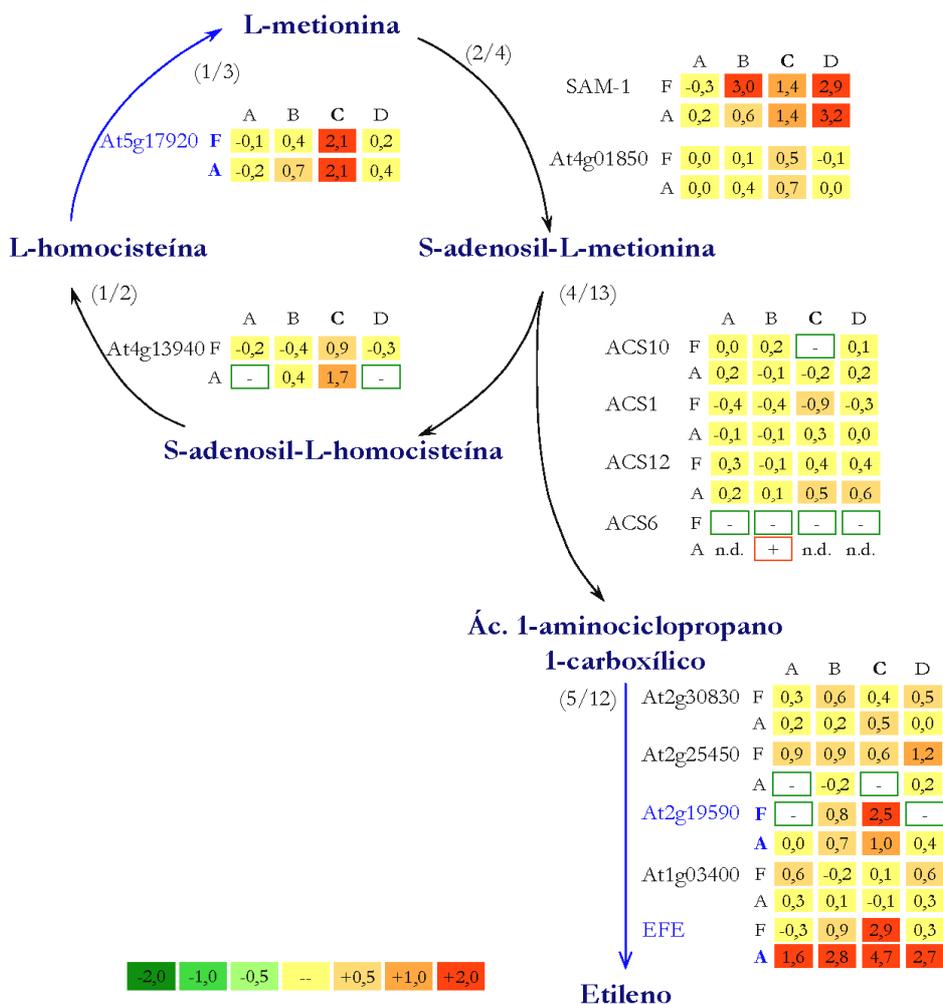


Figura 20. Representación gráfica de la ruta de biosíntesis del etileno a partir de metionina y el ciclo de SAM que mostraron cambios significativos en respuesta a la infección y posterior inactivación térmica del patógeno en el flavedo (F) y albedo (A) de naranjas ‘Navelate’. Se empleó la herramienta informática ‘OMICS Viewer’ de ‘AraCyc 3.5’. En azul se representan los genes con expresión diferencial en respuesta al tratamiento inductor. Entre paréntesis se indica, en primer término el número de genes con homólogo en *A. thaliana* incluidos en la micromatriz 12k, y en segundo término el número de genes de *A. thaliana* incluidos en este paso metabólico. Los números indican de forma secuencial el log₂ del cociente de las intensidades relativas de: A) I24/NT, B) I0/NT, C) I1/NT y D) I3/NT. n.d.: no detectado. Los valores recuadrados indican aquellos casos en los no se detectó expresión en una de las condiciones, asignando el signo + cuando no se detectó en los frutos no tratados, y el signo – cuando se detectó en los frutos no tratados y no en el tratamiento comparado.

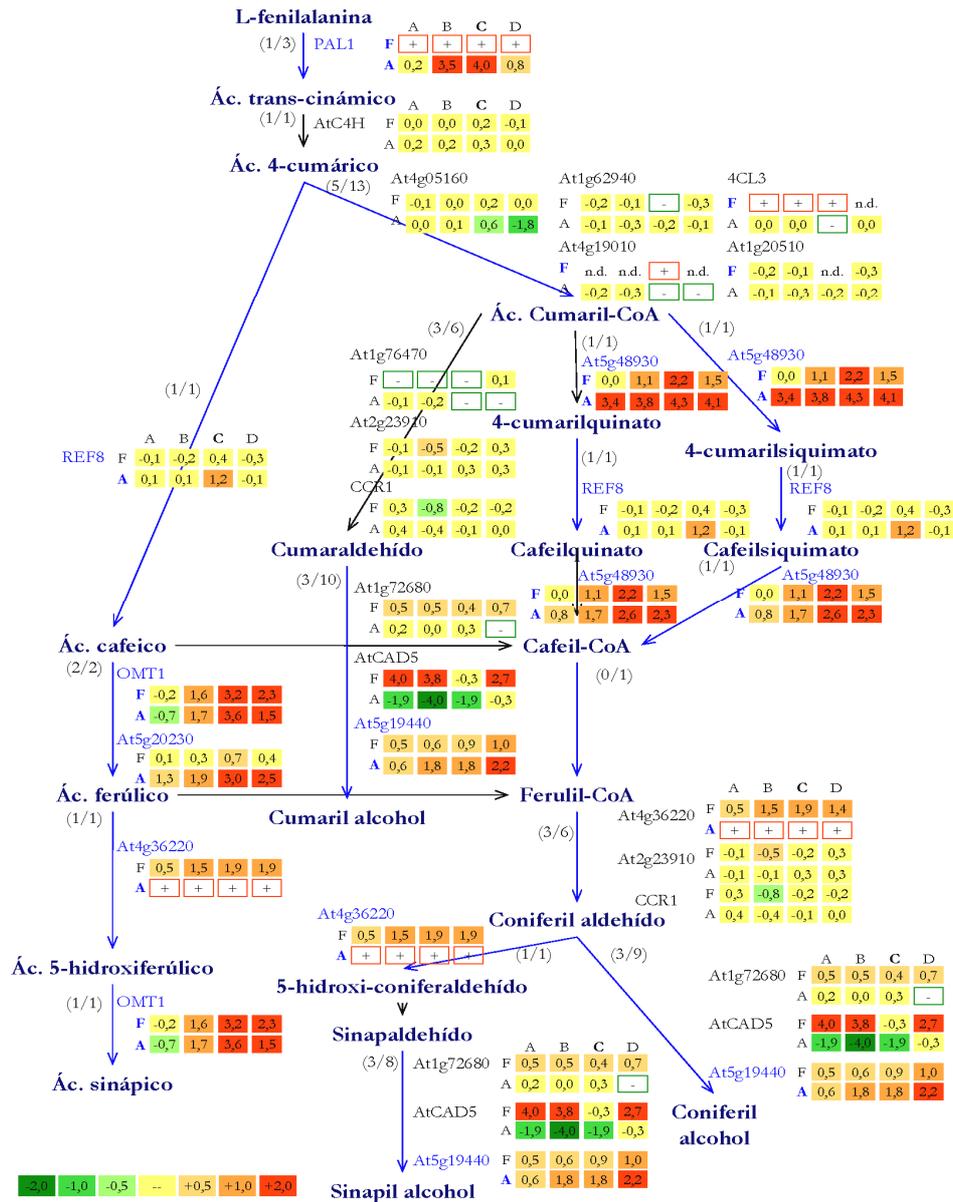


Figura 21. Representación gráfica de las rutas de biosíntesis de fenilalanina, ácidos fenólicos libres y suberina que mostraron cambios significativos en respuesta a la infección y posterior inactivación térmica del patógeno en el flavedo (F) y albedo (A) de naranjas 'Navelate'. (Ver detalles en la Figura 20).

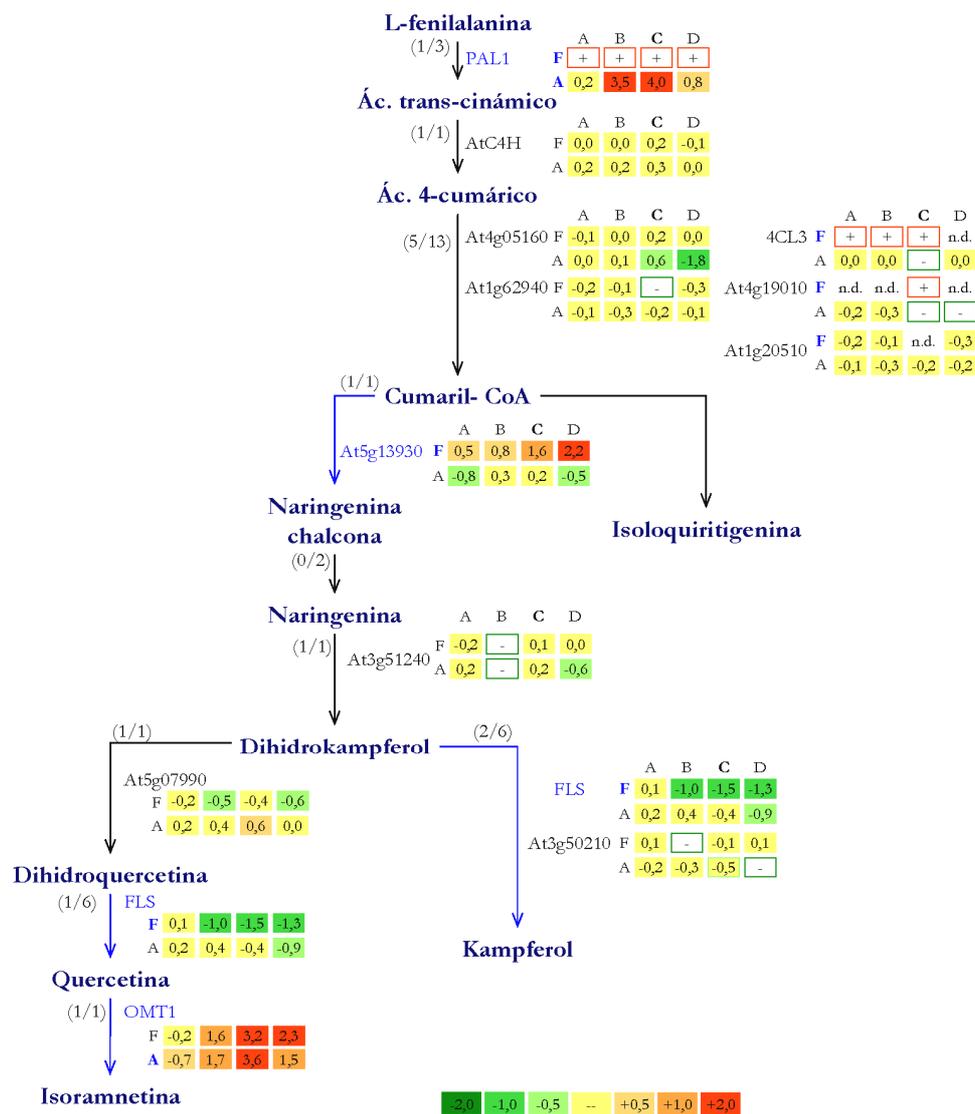


Figura 22. Representación gráfica de las rutas de biosíntesis de flavonoides y flavonoles que mostraron cambios significativos en respuesta a la infección y posterior inactivación térmica del patógeno en el flavedo (F) y albedo (A) de naranjas ‘Navelate’. (Ver pie de Figura 20).

Un objetivo importante de este estudio fue determinar las diferencias de expresión génica entre los dos tejidos que conforman la corteza de los frutos cítricos en respuesta a todas las condiciones ensayadas. En todas ellas se observó un mayor número de genes con expresión específica en el flavedo, comprobándose que, en todas las condiciones analizadas, diversos genes cuyos homólogos en *A. thaliana* codifican un transportador ABC, dos LOXs, una UDP-glucosil transferasa, una proteína SRG1, una chalcona sintasa (CHS) y una cinamil CoA reductasa (CCR) eran específicos en este tejido. Los genes expresados solamente en el albedo en cualquiera de las situaciones estudiadas codifican varias proteínas sin homólogos en *A. thaliana* y las proteínas P23 y P27 del virus de la tristeza de los cítricos (CTV). Además, otras proteínas de CTV, P18, P20 y P25 se inducen específicamente en el albedo en tres de las cinco condiciones analizadas: en los frutos no tratados y en respuesta al tratamiento inductor a 0 y 1 dpt.

El desarrollo de la infección durante 24 h dio lugar a la expresión diferencial de 468 genes en el flavedo, el 47 % de los cuales no se detectaron en el albedo infectado. En el tejido externo, 138 genes mostraron expresión diferencial de más de 2 veces respecto al albedo. Entre ellos destacan genes que codifican tres proteínas de transferencia de lípidos, tres transportadores ABC, cuatro LOXs y cinco OMTs. La expresión de 1.551 genes aumentó en el albedo como consecuencia del desarrollo del patógeno, no detectándose expresión en el flavedo en el 96 % de los mismos. Los genes que se expresaron diferencialmente en el albedo codificaban generalmente proteínas de función desconocida, así como una SOD, una calmodulina y un factor de transcripción Myb.

La infección y posterior almacenamiento a 37 °C modificó la expresión de 308 genes en el flavedo, no detectándose expresión en más del 50 % en el albedo a 0 dpt. Los genes que modificaron la expresión en el flavedo codifican, entre otras, diversas proteínas de función desconocida, tres proteínas de transferencia de lípidos, cuatro OMTs y cuatro citocromos P450. La expresión de 22 genes que codifican una SOD, una proteína homóloga a la proteína DC1.2 de *A. thaliana* relacionada con la maduración y varias de función desconocida se modificó a 0 dpt en el albedo. Además, no se detectó expresión en 1472 genes en el flavedo y sí en el albedo a 0 dpt.

El tratamiento de infección más curado a 1 dpt cambió la expresión de 18 genes que codifican dos LOXs, un transportador ABC, una proteína SRG1, dos naringenina-chalcona sintasas, un citocromo P450, una quitinasa, una

ACO, una CCR y diversas proteínas de función desconocida en el flavedo. Además, la expresión de 580 genes no se detectó en el albedo a 1 dpt y sí en el flavedo. En el albedo se modificó la expresión de 13 genes, siete de ellos de función desconocida y cinco proteínas del CTV. La expresión de 1.052 genes se detectó en el albedo a 1 dpt y no en el flavedo. Sin embargo, el número de genes cuya expresión varió a 3 dpt fue muy superior en el flavedo (1.547 genes), mientras que en el albedo solo se observaron diferencias de expresión en 378 genes.

El estudio de la anotación funcional mostró una acumulación de genes con expresión diferencial en el flavedo. Estos genes estaban incluidos dentro de diversos procesos biológicos como los relacionados con los compuestos aromáticos, derivados de aminoácidos, ácidos orgánicos, fenilpropanoides, ácidos grasos y ácidos carboxílicos y monocarboxílicos (Tabla 31). Así, estos procesos biológicos se encontraron diferencialmente expresados en el flavedo respecto del albedo.

Tabla 31. Anotación funcional por ontologías génicas de genes con expresión diferencial entre el flavedo y el albedo de naranjas 'Navelate' en diversas condiciones. Los genes que se han analizado en cada comparación son aquellos que en el análisis SAM se consideraron significativos o en los que no se detectó expresión en uno de los tratamientos (-: mayor expresión en el flavedo que en el albedo). El análisis, basado en las hibridaciones con la micromatriz 12k, se realizó con el programa informático FatiGO+ (BABELOMICS). En la tabla se muestra: A) número de genes incluidos en cada procesos biológico, B) número de genes con expresión diferencial, C) valor de *p* corregido y D) SR: sobrerrepresentado. En azul se muestran los procesos biológicos significativos no redundantes.

-----Micromatriz 12k----- PROCESOS BIOLÓGICOS	FNT vs. ANT				FI24 vs. AI24			
	A	B	C	D	B	C	D	
Nivel 3								
Procesos metabólicos secundarios	106				19	3,83e-03	SR	
Nivel 4								
Procesos metabólicos de compuestos aromáticos	94				17	1,04e-02	SR	
Respuesta a herida	48				11	1,66e-02	SR	
Nivel 5								
Procesos biosintéticos de compuestos aromáticos	52				15	2,00e-04	SR	
Procesos metabólicos de derivados de aminoácidos	71				17	4,29e-04	SR	
Procesos biosintéticos de ácidos orgánicos	45				11	1,13e-02	SR	
Nivel 6								
Procesos metabólicos de fenilpropanoides	44	12	3,13e-06	SR	12	3,48e-03	SR	
Procesos biosintéticos de derivados de aminoácidos	53				16	8,33e-05	SR	
Procesos biosintéticos de los ácidos carboxílicos	45				11	1,13e-02	SR	
Procesos metabólicos de los ácidos monocarboxílicos	89				16	1,13e-02	SR	
Nivel 7								
Procesos biosintéticos de fenilpropanoides	31	11	8,39e-03	SR	12	1,21e-04	SR	
Procesos metabólicos de flavonoides	14	7	2,25e-03	SR				
Procesos metabólicos de ácidos grasos	59				13	1,04e-02	SR	
Nivel 8								
Procesos biosintéticos de ácidos grasos	40				11	1,13e-02	SR	

2.3. Comparación de los resultados obtenidos a partir de las hibridaciones de las micromatrices 7k y 12k

Con el fin de comparar los resultados obtenidos a partir de las hibridaciones con las dos micromatrices utilizadas, se realizó un estudio con los datos obtenidos del flavedo ya que este tejido se empleó en las dos hibridaciones. Se observó un mayor número de genes con cambios de expresión diferencial en la micromatriz 7k (Tabla 4 y Tabla 14). Por ejemplo, mientras que en los frutos infectados y curados a 1 dpt respecto a los no tratados se detectó un cambio de expresión de 3.209 genes mediante la hibridación con la micromatriz 7k, solamente 143 lo hicieron al emplear la micromatriz 12k. Estas diferencias pueden ser debidas a que la hibridación con la micromatriz 12k se realizó a partir de tres réplicas biológicas, mientras que con la micromatriz 7k se llevaron a cabo tres réplicas técnicas de una muestra biológica.

En general se observó que mayores cambios de expresión diferencial fueron similares en los 4.407 genes comunes en ambas micromatrices. Así, al finalizar el tratamiento de infección más curado se detectó una expresión diferencial de genes que codifican OMTs y una quitinasa. El tratamiento de infección más curado a 1 dpt solo aumentó el nivel de expresión de 6 genes de entre los 4.407 genes comunes de ambas micromatrices, entre los que destacan aquellos que codifican dos OMTs, una metionina sintasa, una calmodulina, una quitinasa y una PAL (Tabla 32). El tratamiento inductor también redujo la expresión de genes que codifican, por ejemplo, una proteína inducible por la luz y un factor de transcripción Myb, a parte de diversas proteínas de función desconocida. Al analizar los niveles de expresión de los genes comunes que fueron significativamente diferentes se observó que éstos fueron ligeramente distintos dependiendo de la micromatriz empleada en la hibridación. Esto podría ser debido a lo ya expuesto anteriormente sobre el empleo de réplicas biológicas.

Tabla 32. Listado de genes comunes en las micromatrices 7k y 12k que mostraron expresión diferencial en el flavedo de naranjas en respuesta al tratamiento de inducción de resistencia a 1 dpt. En negrita se indican los genes con expresión diferencial (Ver detalles en la Tabla 25).

Proteína más similar	Unigen	Homólogo en <i>A. thaliana</i>	FLAVEDO (7k)				FLAVEDO (12k)				ALBEDO (12k)			
			A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
COMT	5951	At5g54160	-0,24	1,78	3,64	2,08	0,23	2,38	4,22	3,18	0,28	2,47	4,18	3,41
Metionina sintasa [<i>A. thaliana</i>]	6733	At5g17920	-0,27	-0,15	1,90	0,08	-0,07	0,41	2,13	0,16	-0,22	0,73	2,09	0,36
CCoAOMT	7170	At4g34050	-0,09	0,88	1,39	0,76	0,13	1,61	2,24	1,79	0,69	2,99	4,16	3,33
Calmodulina [<i>A. thaliana</i>]	5356	At2g41410	0,02	0,86	1,36	0,74	-0,03	1,25	1,57	0,79	0,22	1,14	1,77	0,70
Quitinasa CHI1 [<i>Citrus sinensis</i>]	5509	At3g54420	-0,18	1,44	1,17	0,87	-1,03	1,86	1,61	1,40	0,68	2,38	2,06	2,82
PAL [<i>Citrus clementina</i> x <i>Citrus reticulata</i>]	6764	At2g37040	0,42	0,14	1,04	0,24	+	+	+	+	+	+	+	
Prot inducible por luz	7142	At3g22840	-1,54	-	-3,37	-2,76	-0,85	-2,77	-2,36	-3,10	-0,43	-0,70	-0,84	-1,53
Homólogo a subunidad 1 del isoenzima poligalacturonasa	6564	At1g70370	0,33	-1,85	-3,01	-2,39	0,55	-2,01	-2,72	-3,38	0,92	-1,77	-	-2,91
Galactinol sintasa 1 [<i>Ajuga reptans</i>]	2304	At1g60470	-1,41	-3,18	-2,60	-2,76	-	-	-	-	-1,26	-1,52	-	-
Aciltransferasa [<i>A. thaliana</i>]	6315	At2g38110	-0,79	-2,39	-2,15	-2,38	-0,15	-0,88	-	-1,19	0,16	-0,17	0,14	-0,16
Prot conteniendo pentatricopéptido (PPR)	1650	At3g59300	-0,61	-2,25	-1,96	-1,28	-0,36	-2,71	-2,01	-1,21	-0,32	-2,97	-2,70	-1,75
Hidrolasa [<i>A. thaliana</i>]	2029	At5g14450	0,00	-1,34	-1,90	-2,29	0,02	-0,18	-	-0,48	0,18	-0,17	0,36	-0,04
Prot no homólogo en <i>A. thaliana</i>	C04023D07		-0,36	-2,43	-1,88	-1,05	-0,22	-1,92	-1,55	-1,07	-0,29	-1,97	-2,04	-1,43
Myb [<i>Nicotiana tabacum</i>]	C20006B02	At2g37630	-0,48	-2,11	-1,72	-1,22	-0,28	-2,29	-2,07	-1,32	-0,44	-2,29	-	-1,27
Prot ribosomal L18 [<i>Spodoptera frugiperda</i>]	C08002D11	At5g27850	-0,14	-0,50	-1,62	-0,85	-	-	-	-	-	0,27	-	-
Esterasa inducida por etileno [<i>Citrus sinensis</i>]	4255	At2g23620	0,35	-0,78	-1,54	-1,06	0,19	-0,28	-	-0,44	0,49	-0,05	0,61	-0,36
COR15 [<i>Citrus clementina</i> x <i>Citrus reticulata</i>]	6659	At1g54410	0,11	-1,96	-1,43	-0,34	-0,97	-3,60	-2,71	-1,98	-0,44	-3,04	-2,57	-1,56
Prot choque térmico [<i>Lycopersicon esculentum</i>]	6998	At4g27670	0,24	-0,46	-1,40	-1,12	0,33	-	-	-	0,16	-	-	-1,98
Pdd1p [<i>Tetrahymena thermophila</i>]	C08008B01	At2g47450	-0,34	-1,58	-1,32	-0,90	-	-0,13	-	-	0,15	0,14	0,68	0,01
Flavin reductasa [<i>A. thaliana</i>]	C04006E11	At2g34460	-0,38	-1,61	-1,31	-1,08	-0,28	-2,10	-1,63	-1,28	-0,55	-2,21	-2,24	-1,62
Prot no homólogo en <i>A. thaliana</i>	C03001C11		-0,08	-0,37	-1,07	-0,31	-0,14	-1,02	-1,42	-1,04	-0,69	-1,36	-1,76	-0,98
Prot fotosistema II	5477	At2g30570	-0,50	-0,85	-1,05	-0,62	0,05	-	-	-0,45	-0,29	-0,15	-0,78	-0,71
Prot no homólogo en <i>A. thaliana</i>	C18006C06		-0,10	-0,80	-1,04	-0,95	0,00	-0,65	-1,13	-0,65	-0,17	-0,65	-0,64	-1,86
Tiorredoxina	6538	At3g51030	0,05	-0,37	-1,03	-0,42	-0,21	-0,75	-1,49	-0,88	-0,01	-0,59	-1,09	-0,82

3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *CsACO* Y DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ETILENO

El análisis de las hibridaciones de las micromatrices puso de manifiesto que algunos de los genes que más se inducían como consecuencia del tratamiento de inducción de resistencia correspondían a genes que codifican ACOs. Esta proteína está implicada en la ruta de biosíntesis del etileno, catalizando el paso de ácido 1-aminociclopropano 1-carboxílico (ACC) a etileno. Por lo tanto, se realizó un estudio más detallado de la expresión del gen *CsACO* disponible en el Laboratorio de Fisiología y Biotecnología de Postcosecha del IATA (clon C06022E01-unigen 7230) en los frutos sometidos al tratamiento de infección más curado, así como en frutos infectados por *P. digitatum*. Asimismo, se midió la producción de etileno en discos de corteza de naranjas tomados de forma similar a los utilizados para estudiar los cambios de expresión del gen *CsACO*.

3.1. Análisis de la expresión del gen *CsACO* en naranjas ‘Navelate’ sometidas al tratamiento de infección más curado

En la Figura 23 se muestra el análisis Northern de la expresión del gen *CsACO* en respuesta al tratamiento de inducción de resistencia. En este estudio se empleó tejido de flavedo (F) y albedo (A) procedente de las naranjas de la variedad ‘Navelate’ del experimento de Marzo de 2003. La intensidad de la señal de hibridación se normalizó teniendo en cuenta la cantidad de RNA ribosómico de naranja presente en cada muestra. Se asignó arbitrariamente un valor de 1,0 al valor de la muestra de flavedo antes de comenzar los tratamientos (FNT), refiriendo el resto de valores a éste. Al analizar la acumulación del rRNA 26S de *C. sinensis* se observó que en todas las muestras había una cantidad similar de transcrito, independientemente de si los frutos habían sido previamente infectados o no. Asimismo, no se observó acumulación del rRNA 28S de *P. digitatum* en ninguna de las muestras analizadas.

El patrón de expresión del gen fue similar en ambos tejidos. El desarrollo de la infección durante 24 h incrementó ligeramente el nivel de expresión del gen. Sin embargo, la máxima expresión se detectó en frutos infectados y curados a 1 dpt, observándose un valor de acumulación relativa de 51,6 y 91,5 en el flavedo y el albedo, respectivamente. La acumulación del transcrito a los 3 dpt en frutos curados fue prácticamente indetectable, mientras que en los frutos heridos y curados, el nivel de expresión aumentó

respecto al observado en los frutos no tratados. A los 3 dpt, el nivel de expresión del gen *CsACO* descendió de forma importante respecto al detectado a 1 dpt, aunque fue superior a los valores iniciales. La máxima inducción se observó en el albedo de frutos infectados y curados a 1 dpt ya que pasó de no detectarse en tejido sano a alcanzar un valor de acumulación relativa de 91,5.

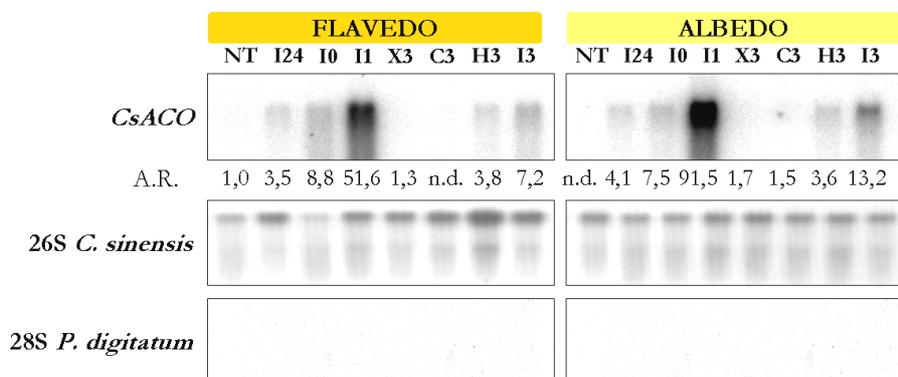


Figura 23. Análisis Northern de los cambios de expresión del gen *CsACO* en frutos cítricos sometidos al tratamiento de inducción de resistencia. El análisis se realizó en tejido de flavedo (◊) y albedo (◊) de naranjas ‘Navelate’ sometidas al tratamiento de infección más curado a los 0, 1 y 3 dpt. NT) Naranjas no tratadas, I24) frutos inoculados con el aislado PHI-26 M1 de *P. digitatum*, X) frutos intactos almacenados 3 d a 4 °C, C) naranjas intactas y curadas (3 d a 37 °C), H) naranjas heridas y curadas, I) frutos inoculados con *P. digitatum* a una concentración de 10^5 conidios mL⁻¹ y curados. A. R.: acumulación relativa de la expresión del gen obtenida en función de la cantidad de RNA ribosómico de naranja presente en cada muestra.

3.2. Análisis de la expresión del gen *CsACO* en naranjas ‘Navelina’ en respuesta a la infección por *P. digitatum*

Se analizó el patrón de expresión del gen *CsACO* durante el desarrollo de la infección (Figura 24). Para ello, se inocularon naranjas de la variedad ‘Navelina’ con el aislado PHI-26 M1 de *P. digitatum* y se analizó la expresión de estos genes en tejido de flavedo y albedo a las 0, 24, 48 y 72 hpi. Se normalizó la señal de hibridación teniendo en cuenta la cantidad de RNA ribosómico de naranja presente en cada muestra y se asignó arbitrariamente un valor de referencia de 1,0 al flavedo de frutos no tratados a las 0 h del inicio del experimento. En general, la acumulación relativa del rRNA 26S de *C. sinensis*

fue similar en todas las muestras, excepto a las 72 hpi, en las que el patógeno había colonizado el tejido hasta tal punto que apenas quedaba rRNA del fruto, ya que casi todo correspondió al rRNA 28S de *P. digitatum* (Figura 24).

El patrón de expresión del gen *CsACO* fue similar en ambos tejidos. La expresión del gen a las 24 h se incrementó 2 y 4 veces en el flavedo y albedo, respectivamente, como consecuencia de la herida, aumentando ligeramente en los días posteriores. Sin embargo, el desarrollo de *P. digitatum* incrementó la acumulación relativa del transcrito a las 24 hpi, alcanzándose un valor máximo a las 48 hpi de 50 y 40, en el flavedo y albedo, respectivamente. La expresión del gen descendió ligeramente a las 72 hpi, siendo este descenso más acusado en el albedo. La mayor inducción se detectó en el albedo infectado durante 48 h, siendo 80 veces superior al observado en el albedo no tratado.

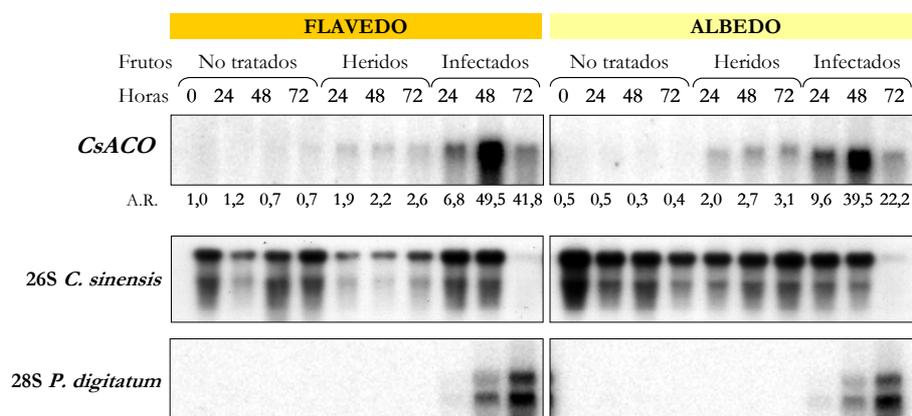


Figura 24. Análisis Northern de la expresión del gen *CsACO*. El análisis se realizó en tejido de flavedo (□) y albedo (□) de naranjas 'Navelina' procedente de frutos no tratados, frutos heridos y frutos inoculados con el aislado PHI-26 M1 de *P. digitatum* a una concentración de 10^6 conidios mL^{-1} . Todos los frutos se almacenaron durante 24, 48 y 72 h a 20 °C. A. R.: acumulación relativa.

3.3. Determinación de la producción de etileno en frutos cítricos

Para la determinación de la producción de etileno se extrajeron discos de la corteza de los frutos con un sacabocados de 10 mm centrado en el punto de inoculación y se introdujeron en tubos de vidrio de 14 mL. Los tubos se cerraron herméticamente y 15 min después se extrajo con una jeringa 1 mL de aire del espacio de cabeza y se inyectó en un cromatógrafo de gases. En la Figura 25 se muestra la producción de etileno en cada una de las muestras

estudiadas. La producción de etileno de los discos procedentes de los frutos no tratados o de los intactos y curados no varió sustancialmente durante el almacenamiento. Sin embargo, la producción de etileno en los discos de frutos heridos y curados aumentó ligeramente un día después del almacenamiento a 37 °C. La producción de etileno en los discos procedentes de los frutos infectados y curados presentó un nivel máximo de aproximadamente 42 nL h⁻¹ g⁻¹ PF a los 2 días después del curado, disminuyendo rápidamente un día después.

El desarrollo de la infección de *P. digitatum* provocó un ligero incremento en la producción de etileno similar al observado en frutos heridos a las 24 hpi. Sin embargo, la producción de etileno aumentó drásticamente a las 48 hpi, alcanzando un valor máximo de aproximadamente 45 nL h⁻¹ g⁻¹ PF. La producción de etileno descendió drásticamente 96 h después de la inoculación con el patógeno. Como puede observarse en la Figura 25, la producción de etileno como consecuencia del tratamiento de infección más curado alcanzó un máximo similar al detectado en frutos infectados.

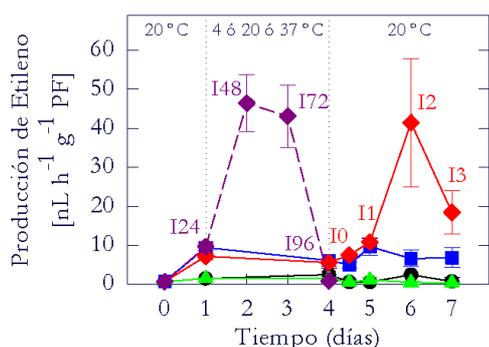


Figura 25. Producción de etileno en discos de 10 mm de diámetro procedentes de frutos cítricos. Se analizó la producción de etileno en frutos no tratados (□), frutos curados (▲), frutos heridos y curados (△) y frutos infectados y curados (◼). También se emplearon frutos infectados con el aislado PHI-26 M1 de *P. digitatum* y almacenados a 20 °C durante 24, 48, 72 y 96 hpi (◼). Las barras indican la desviación estándar de tres réplicas de tres tubos, con 10 discos cada uno procedentes de 3 naranjas.

4. CAMBIOS EN LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS POX Y PAL

Con el fin de comprobar si el tratamiento de inducción de resistencia por inoculación previa a un tratamiento térmico implicaba alteraciones en el metabolismo de fenilpropanoides, se procedió a estudiar los cambios de actividad de las enzimas POX y PAL. La determinación de las actividades enzimáticas se realizó en tejido de flavedo y albedo de naranjas 'Navelate' cosechadas en Febrero y Marzo de 2003, obteniéndose resultados similares. En este trabajo se muestran los resultados de los frutos cosechados en Febrero.

4.1. Peroxidasa soluble e insoluble

Las diferencias encontradas en la actividad POX, soluble e insoluble, en el flavedo y albedo de frutos cítricos sometidos a distintos tratamientos se muestran en la Figura 26. La actividad POX insoluble fue similar en el flavedo y el albedo, mientras que en la fracción soluble la actividad POX en el flavedo fue aproximadamente 10 veces mayor a la del albedo.

Los cambios en la actividad POX soluble e insoluble en el flavedo en respuesta a los diferentes tratamientos fueron similares (Figura 26 A y C). En ambos casos se observó un aumento significativo en la actividad en frutos infectados y curados a 1 y 3 dpt. Sin embargo, el tratamiento de curado redujo la actividad POX soluble e insoluble. No se encontraron diferencias significativas en la actividad POX insoluble en el flavedo de frutos infectados y curados analizados a 1 ó 3 dpt. En cambio, la actividad POX soluble fue superior en los analizados a los 3 dpt.

Las diferencias entre la actividad POX soluble e insoluble en el albedo fueron más importantes, siendo la primera aproximadamente 30 veces menor que la segunda en frutos no tratados. Las muestras de albedo de los frutos no tratados presentaron la menor actividad POX soluble, mientras que la mayor actividad correspondió a frutos infectados y curados analizados a los 3 dpt (Figura 26 B). En el caso de la actividad POX insoluble, las diferencias no fueron tan acusadas (Figura 26 D). Solamente se observaron diferencias significativas en los frutos infectados y almacenados 24 h a 20 °C y en los curados, que presentaron en estos casos los valores más bajos de actividad POX insoluble.

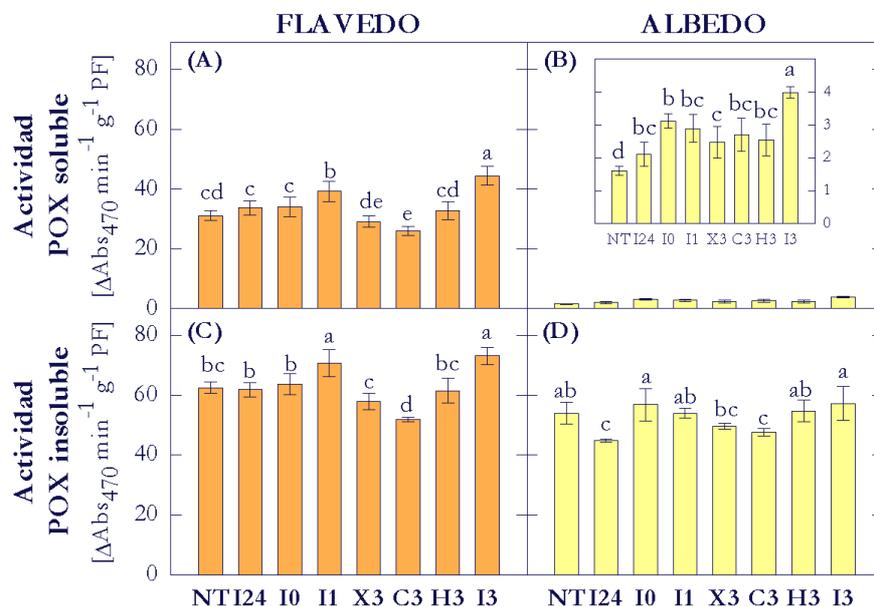


Figura 26. Actividad POX, soluble (A y B) e insoluble (C y D), en tejido de flavedo (A y C) (□) y albedo (B y D) (□) de naranjas 'Navelate' cosechadas en Febrero de 2003 sometidas a distintos tratamientos: NT) naranjas no tratadas, I24) frutos inoculados con el aislado PHI-26 M1 de *P. digitatum*, X3) naranjas intactas, almacenadas 3 d a 4 °C y 3 d a 20 °C, C3) naranjas intactas, curadas y almacenadas 3 d a 20 °C, H3) frutos heridos, curados y almacenados 3 d a 20 °C, I) naranjas inoculadas con 10⁵ conidios mL⁻¹ del aislado PHI-26 M1 de *P. digitatum*, curadas y muestreadas a los 0, 1 y 3 dpt. Todos los frutos se incubaron 24 h a 20 °C antes de ser sometidos al tratamiento térmico. Las barras indican la desviación estándar de tres extracciones independientes. Se realizó el análisis de la varianza (ANOVA) empleando el test LSD. Actividades con distintas letras (en el mismo tejido) fueron consideradas significativamente diferentes ($p < 0,05$).

4.2. L-fenilalanina amonio-liasa

Las diferencias encontradas en la actividad PAL del flavedo y el albedo de los frutos expuestos a los tratamientos mencionados anteriormente se exponen en la Figura 27. Los cambios en la actividad PAL en respuesta a los tratamientos ensayados en ambos tejidos fueron similares, aunque la actividad en el flavedo fue muy superior. En ambos tejidos, las mayores actividades correspondieron a frutos infectados y curados a 0, 1 y 3 dpt, detectándose la máxima actividad PAL a 1 dpt. La actividad de la enzima PAL en frutos heridos y curados aumentó de forma significativa respecto a los frutos no tratados, aunque fue inferior a la detectada en los frutos infectados y curados. La infección *per se* aumentó ligeramente la actividad PAL frente a los frutos no tratados, aunque estas diferencias no fueron significativas.

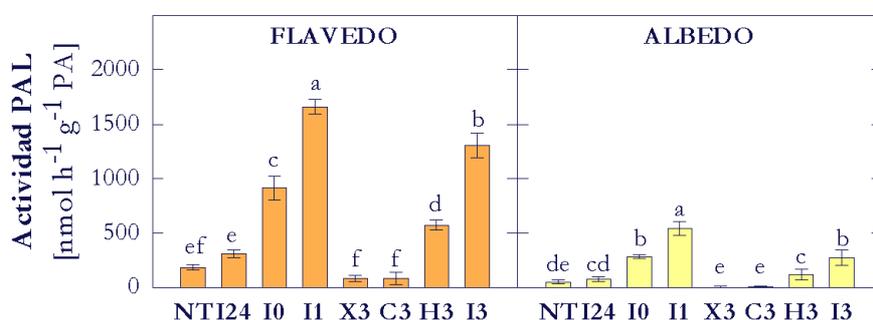


Figura 27. Actividad PAL en tejido de flavedo (□) y albedo (□) de naranjas 'Navelate' cosechadas en Febrero de 2003 sometidas a distintos tratamientos: NT) naranjas intactas recién cosechadas, I24) frutos inoculados con el aislado PHI-26 M1 de *P. digitatum*, X3) naranjas intactas, almacenadas 3 d a 4 °C y 3 d a 20 °C, C3) naranjas intactas, curadas y almacenadas 3 d a 20 °C, H3) frutos heridos, curados y almacenados 3 d a 20 °C, I) naranjas inoculadas con 10⁵ conidios mL⁻¹ del aislado PHI-26 M1 de *P. digitatum* curadas y muestreadas a los 0, 1 y 3 dpt. Todos los frutos se incubaron 24 h a 20 °C antes de ser sometidos al tratamiento térmico. Las barras indican la desviación estándar de tres extracciones independientes. Se realizó el análisis de la varianza (ANOVA) empleando el test LSD. Actividades con distintas letras (en el mismo tejido) fueron consideradas significativamente diferentes ($p < 0,05$).

5. PATRÓN DE EXPRESIÓN DE GENES IMPLICADOS EN EL METABOLISMO DE FENILPROPANOIDES EN FRUTOS CÍTRICOS

Los resultados obtenidos a partir de los análisis de las hibridaciones de las micromatrices de cDNA y otros previos obtenidos del estudio de diversas actividades enzimáticas apuntaban a la implicación del metabolismo secundario en la inducción de resistencia de los frutos cítricos mediada por un tratamiento de infección más curado. Por ello, se decidió realizar un estudio más exhaustivo de los genes implicados en una de las principales rutas del metabolismo secundario como es la de los fenilpropanoides. A partir de las secuencias de clones de las genotecas RindPdig24 (1152 clones secuenciados), RindPdigS (330) y FlavCurFr1 (1152) obtenidas en el Laboratorio de Fisiología y Biotecnología Postcosecha del IATA, se identificaron varios genes que codifican hipotéticas proteínas implicadas en el metabolismo de fenilpropanoides y se utilizaron en el presente trabajo: PAL, C4H, 4CL, F3H, IRL1, COMT, CCoAOMT, CAD, SAD y POX (Tabla 2). Todas ellas están implicadas en el metabolismo de compuestos fenólicos, como se muestra esquemáticamente en la Figura 28.

Como se verá posteriormente en el estudio de los cambios en compuestos fenólicos del flavedo y albedo de los frutos cítricos sometidos al tratamiento de inducción de resistencia (Apartado 6.1 de Resultados) y de frutos infectados con *P. digitatum* (Apartado 6.2), se detectó la inducción de diversos compuestos cuyo máximo de absorbancia era muy próximo al de algunos alcaloides. Asimismo, se comprobó que estos compuestos son fluorescentes al igual que diversos alcaloides como la cafeína. Se ha descrito la relación de diversos alcaloides con diferentes estreses en distintos sistemas vegetales y, además, la ruta de estos compuestos deriva directamente del metabolismo de los fenilpropanoides. Por ello, se analizaron también los cambios en la expresión de un gen de la cafeína sintasa (*CS1*) que estaba presente en las genotecas obtenidas en el Laboratorio de Fisiología y Biotecnología Postcosecha del IATA (Tabla 2).

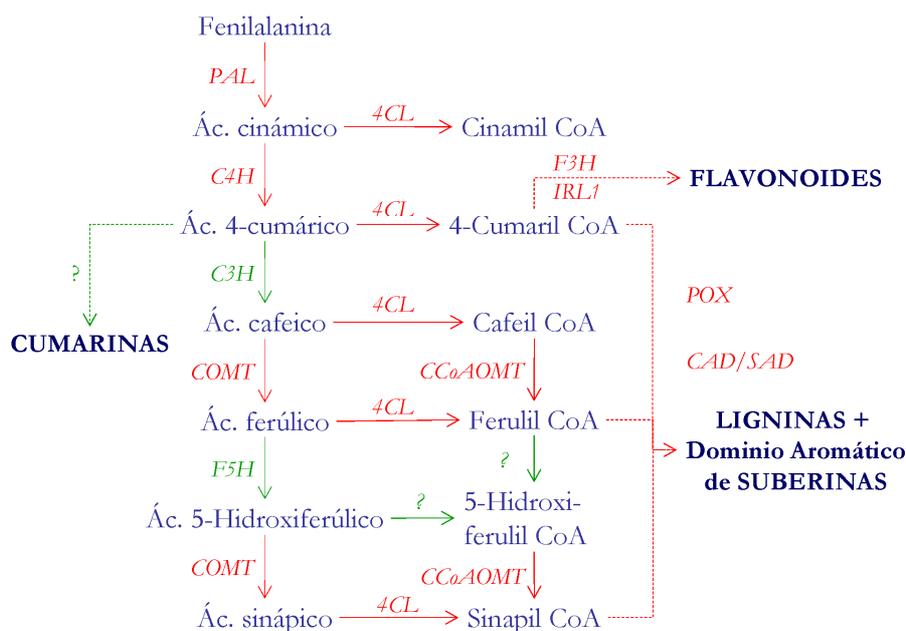


Figura 28. Ruta resumida del metabolismo de fenilpropanoides. Abreviaturas: *PAL* fenilalanina amonio-liasa, *C4H* cinamato 4-hidroxilasa, *C3H* cinamato 3-hidroxilasa, *COMT* ácido cafeico O-metiltransferasa, *F5H* ferulato 5-hidroxilasa, *4CL* 4-cumarato CoA ligasa, *F3H* flavanona 3-hidroxilasa, *IRL1* isoflavona reductasa, *CCoAOMT* cafeil-CoA O-metiltransferasa, *CAD* cinamil alcohol deshidrogenasa, *SAD* sinapil alcohol deshidrogenasa y *POX* peroxidasa. En rojo se muestran los genes analizados en este trabajo.

5.1. Análisis de la expresión de genes del metabolismo de fenilpropanoides en naranjas 'Navelate' sometidas al tratamiento de infección más curado

En la Figura 29 se muestra el análisis Northern de los genes seleccionados implicados en el metabolismo de fenilpropanoides en respuesta al tratamiento de inducción de resistencia. En este estudio se empleó tejido de flavedo y albedo procedente de las naranjas de la variedad 'Navelate' del experimento de Marzo de 2003. Las intensidades de las señales de hibridación fueron normalizadas teniendo en cuenta la cantidad de RNA ribosómico de naranja presente en cada muestra (Tabla 33). En casi todos los casos se asignó arbitrariamente un valor de 1,00 al valor de la muestra de flavedo antes de

comenzar los tratamientos (FNT), refiriendo el resto de valores a éste. En el caso de los genes *COMT1*, *SAD* y *CS1* y del transcrito de mayor tamaño del gen *C4H1*, el valor 1,00 de referencia se asignó a los frutos infectados y curados a 1 dpt (FI1) ya que no se detectó transcrito en el flavedo de frutos no tratados.

Generalmente, el nivel de expresión de los genes analizados en frutos no tratados fue mayor en el tejido de flavedo que en el albedo. El único caso en el que la acumulación del transcrito fue claramente mayor en el albedo fue el de los dos mRNAs correspondientes al gen *C4H1*.

La infección por *P. digitatum* incrementó ligeramente el nivel de expresión de los genes *PAL1*, *IRL1*, *COMT2* y *CAD3* en el flavedo y en el albedo. Sin embargo, la acumulación relativa de los transcritos de los genes *CCoAOMT2*, *CAD2*, *POX1* y *POX2* aumentó en el albedo como consecuencia de la infección por el patógeno pero no en el flavedo. En general, el almacenamiento posterior durante 3 d a 37 °C redujo la acumulación de los transcritos en el flavedo y/o albedo, excepto en el caso de los genes *COMT1* y *CS1*. En ambos casos el nivel de expresión aumentó a 0 dpt en el flavedo, y en el caso del gen *COMT1* también en el albedo.

Generalmente, las mayores inducciones se detectaron 1 día después del tratamiento térmico en frutos previamente infectados. El nivel de expresión de los genes *PAL1*, *COMT1*, *CCoAOMT1*, *CCoAOMT2*, *CAD3*, *SAD*, *POX1* y *CS1* aumentó en el flavedo y en el albedo. Así, la acumulación del transcrito correspondiente al gen *PAL1* aumentó 2 y 5 veces en el flavedo y albedo, respectivamente, respecto a frutos no tratados. Los genes *COMT1*, *SAD* y *CS1* fueron los que presentaron mayor inducción como consecuencia del tratamiento de infección más curado a 1 dpt ya que no se detectó acumulación del transcrito en frutos no tratados. El nivel de expresión del gen *COMT2* disminuyó como consecuencia del tratamiento inductor. En el caso de los genes *POX* se observó que, mientras que *POX1* alcanzó la máxima expresión como consecuencia del tratamiento de infección más curado a 1 dpt, el gen *POX2* en esta misma muestra presentó la menor expresión.

Cabe destacar que la inducción del nivel de expresión de algunos genes estudiados debida al tratamiento de infección más curado a 1 dpt fue diferente en ambos tejidos. Se observó una expresión diferencial en los genes *C4H2* y *CAD2*, detectándose un importante aumento en el nivel de expresión de estos genes en el albedo pero no en el flavedo. La inducción originada por el

tratamiento de infección más curado fue de aproximadamente 1,7 y 6 veces en el tejido interno.

Las acumulaciones más altas de los transcritos de los genes *CCoAOMT2*, *CAD3*, *POX1* y *CS1* que tuvieron lugar como consecuencia del tratamiento de infección más curado a 1 dpt se detectaron en el flavedo, mientras que en el caso de los genes *PAL1*, *COMT1*, *CCoAOMT1* y *SAD*, los niveles de expresión máximos se observaron en el albedo. Es más, en general, las inducciones más altas se detectaron en el tejido interno, destacando los genes *PAL1*, *CCoAOMT2* y *CAD3*, con inducciones de más de 4 veces respecto al albedo de frutos no tratados. Aunque no se detectó acumulación del transcrito de los genes *COMT1*, *CCoAOMT1*, *SAD*, *POX1* y *CS1* en el albedo de frutos no tratados, el tratamiento inductor incrementó el nivel de expresión de los mismos. La acumulación relativa de estos transcritos en el albedo fue mayor a la del flavedo, excepto en el caso de los genes *POX1* y *CS1*.

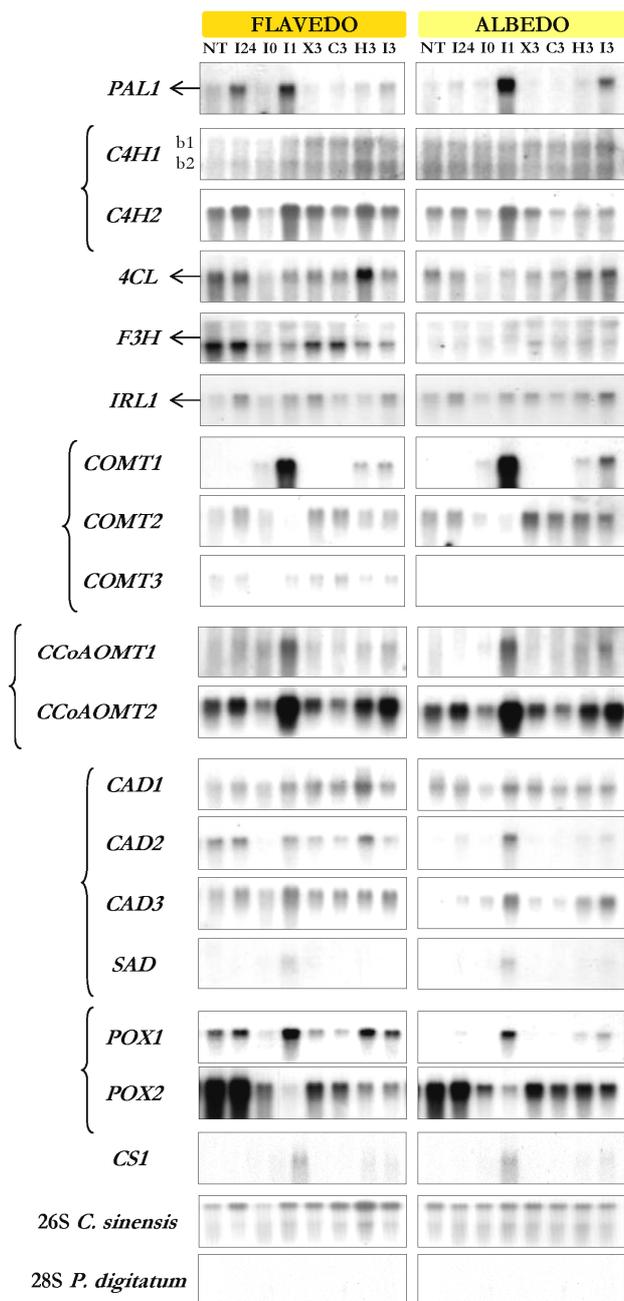


Figura 29. Análisis Northern de genes implicados en el metabolismo de los fenilpropanoides. El análisis se realizó en tejido de flavedo (◻) y albedo (◻) de naranjas 'Navelate' sometidas a distintos tratamientos a los 0, 1 y 3 dpt. NT) Naranjas no tratadas, I24) frutos inoculados con el aislado PHI-26 M1 de *P. digitatum* a las 24 hpi, X3) frutos intactos almacenados 3 d a 4 °C, C3) naranjas intactas y curadas (3 d a 37 °C), H3) naranjas heridas y curadas, I) frutos inoculados con *P. digitatum* a una concentración de 10⁵ conidios mL⁻¹ y curados. Todos los frutos se almacenaron 24 h a 20 °C antes de ser sometidos al tratamiento térmico. 10 µg de RNA por muestra fueron resueltos en un gel desnaturalizante, transferidos a una membrana de nylon (Hybond N+) y se hibridaron con la sonda de DNA monocatenario antisentido correspondiente marcada con ³²P. Todas las membranas se hibridaron posteriormente con un fragmento de los genes 26S rRNA de *C. sinensis* y 28S rRNA de *P. digitatum* (Ver nomenclatura de los genes en la Tabla 2).

Tabla 33. Acumulación relativa de los mRNAs de genes implicados en el metabolismo de fenilpropanoides en tejido de flavedo (F) () y albedo (A) () de frutos de naranjas 'Navelate' sometidos al tratamiento de infección más curado a los 0, 1 y 3 dpt. NT) Naranjas no tratadas, I24) frutos inoculados con el aislado PHI-26 M1 de *P. digitatum* e incubados 24 h a 20 °C, X) frutos intactos conservados 24 h a 20 °C y 3 d a 4 °C, C) naranjas intactas almacenadas 24 h a 20 °C y posteriormente curadas (3 d a 37 °C), H) naranjas heridas, incubadas 24 h a 20 °C y, posteriormente, curadas, I) frutos inoculados con PHI-26 M1 a una concentración de 10⁵ conidios mL⁻¹, incubados 24 h a 20 °C y posteriormente curados. Los valores de acumulación relativa reflejan el cociente entre las intensidades de las señales de hibridación obtenidas con cada una de las sondas y el obtenido con una sonda correspondiente al 26S rRNA de *C. sinensis*. (n.d.: no detectado). (Ver nomenclatura de los genes en la Tabla 2).

	FNT	FI24	FI0	FI1	FX3	FC3	FH3	FI3		ANT	AI24	AI0	AI1	AX3	AC3	AH3	AI3
<i>PAL1</i>	1,00	1,60	0,67	1,96	0,49	0,50	0,83	0,89		0,50	0,77	0,61	2,39	0,35	n.d.	0,32	0,94
<i>C4HI-mRNA1</i>	n.d.	n.d.	n.d.	1,00	1,75	1,96	2,12	1,93		1,83	1,70	1,53	1,58	2,27	2,23	2,26	3,31
<i>C4HI-mRNA2</i>	1,00	1,08	1,25	2,46	2,90	3,16	3,71	4,51		4,27	4,06	3,68	3,50	3,54	3,64	3,72	4,31
<i>C4H2</i>	1,00	1,11	0,47	1,13	0,84	0,52	0,61	0,63		0,57	0,60	0,42	0,96	0,52	0,36	0,46	0,63
<i>4CL</i>	1,00	0,61	0,46	0,36	0,40	0,36	0,36	0,29		0,40	0,47	0,25	0,26	0,31	0,37	0,51	0,53
<i>F3H</i>	1,00	0,88	0,42	0,37	0,70	0,61	0,49	0,39		0,20	0,27	0,21	0,16	0,21	0,18	0,19	0,18
<i>IRL1</i>	1,00	1,92	0,98	1,53	1,90	0,89	0,94	1,51		1,15	1,91	0,77	1,09	1,15	0,76	0,92	1,66
<i>COMT1</i>	n.d.	0,02	0,11	1,00	0,02	n.d.	0,10	0,16		n.d.	0,01	0,12	1,27	0,03	0,01	0,14	0,42
<i>COMT2</i>	1,00	1,30	0,71	0,44	1,40	1,15	0,97	0,91		1,06	1,44	0,57	0,44	1,66	1,18	1,05	1,00
<i>COMT3</i>	1,00	1,08	0,66	0,90	1,21	1,21	1,11	1,06		0,34	n.d.	n.d.	0,31	0,27	n.d.	n.d.	n.d.
<i>CCoAOMT1</i>	1,00	1,13	1,03	2,37	n.d.	n.d.	n.d.	0,83		n.d.	n.d.	n.d.	2,39	n.d.	n.d.	0,54	0,84
<i>CCoAOMT2</i>	1,00	1,03	0,40	1,83	0,83	0,37	0,54	0,56		0,36	0,60	0,22	1,65	0,29	0,18	0,34	0,62
<i>CAD1</i>	1,00	0,75	0,89	0,79	0,86	0,69	0,62	0,52		0,81	1,09	0,64	0,96	0,81	0,82	0,92	1,01
<i>CAD2</i>	1,00	0,89	0,27	0,70	0,50	0,37	0,53	0,41		0,15	0,29	0,16	0,87	0,12	0,08	0,17	0,31
<i>CAD3</i>	1,00	1,29	0,91	1,83	1,13	1,02	1,39	1,46		0,39	0,77	0,79	1,67	0,50	0,43	0,80	1,28
<i>SAD</i>	n.d.	n.d.	n.d.	1,00	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		n.d.	n.d.	n.d.	1,15	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>POX1</i>	1,00	1,01	0,35	1,42	0,55	0,37	0,73	0,83		n.d.	0,25	n.d.	0,87	n.d.	n.d.	0,18	0,42
<i>POX2</i>	1,00	0,97	0,18	0,05	0,28	0,19	0,14	0,11		0,54	0,80	0,18	0,07	0,28	0,14	0,16	0,13
<i>CSI</i>	n.d.	n.d.	0,16	1,00	n.d.	n.d.	0,13	0,17		n.d.	n.d.	n.d.	0,93	n.d.	n.d.	n.d.	0,30

5.2. Análisis de la expresión de genes implicados en el metabolismo de fenilpropanoides en naranjas ‘Navelina’ infectadas con *P. digitatum*

Una vez estudiada la expresión de genes implicados en el metabolismo de fenilpropanoides en respuesta al tratamiento de infección más curado, se analizaron sus patrones de expresión durante el desarrollo de la infección (Figura 30). Para ello, se inocularon naranjas de la variedad ‘Navelina’ con el aislado PHI-26 M1 de *P. digitatum* y se analizó la expresión de estos genes en tejido de flavedo y albedo a las 0, 24, 48 y 72 hpi. Los resultados de las distintas hibridaciones fueron analizados siguiendo la misma metodología que en el Apartado 5.1 de los Resultados. En todos los casos, excepto para los genes *SAD* y *CS1*, se asignó arbitrariamente un valor de acumulación relativa de 1,00 al valor de la muestra de flavedo antes de comenzar los tratamientos (FNT0), refiriendo el resto de valores a éste (Tabla 34). Para los genes *SAD* y *CS1* se asignó el valor de referencia a la muestra de flavedo de frutos infectados durante 24 h por *P. digitatum* (FI24).

En general, el nivel de expresión de los genes fue mayor en el flavedo que en el albedo de frutos no tratados. El único caso en el que la acumulación relativa fue mayor en el albedo correspondió al gen *CAD1*, cuya sonda hibridó con tres mRNAs de distinto tamaño. Generalmente, los patrones de expresión fueron similares en ambos tejidos. Se detectó un aumento en la acumulación de los transcritos de la mayor parte de los genes a las 24 h del almacenamiento a 20 °C en el flavedo y el albedo de los frutos intactos, manteniéndose o reduciéndose generalmente en los días posteriores.

La herida practicada en la corteza de los frutos cítricos aumentó ligeramente la acumulación del mRNA de la mayor parte de los genes analizados en el flavedo y/o albedo a las 24 h. Dicha acumulación se mantuvo o incluso aumentó en el caso de los genes *PAL1*, *C4H1*, *C4H2*, *IRL1*, *CCoAOMT2* y *CAD3*. La acumulación más elevada de los genes *C4H1*, *IRL1* y *COMT1* se detectó 72 h después de la incisión de la herida. El nivel de expresión de los genes *4CL*, *COMT3* y *POX2* aumentó específicamente en el albedo como consecuencia de la herida. Generalmente, la inducción debida a la herida practicada fue menor a la detectada en los frutos infectados con *P. digitatum*.

La infección por *P. digitatum* aumentó el nivel de expresión de gran parte de los genes estudiados en ambos tejidos a las 48 hpi, manteniéndose constante o descendiendo a las 72 hpi. Especialmente importantes fueron las inducciones en los genes *PAL1*, *COMT1*, *CAD3*, *SAD*, *POX1* y *CS1*. El único

caso en el que el nivel de expresión aumentó a las 72 hpi y no durante las horas previas fue el gen *F3H*. Sin embargo, el desarrollo de la infección redujo el nivel de expresión de los genes *4CL*, *COMT3* y *POX2* en ambos tejidos. Solamente en estos tres casos la acumulación del transcrito disminuyó hasta valores inferiores a los de los frutos no tratados como consecuencia del avance de la infección. Es importante señalar que el nivel de expresión de los genes *CAD2*, *SAD*, *POX1* y *CS1* se indujo solamente como consecuencia del desarrollo de la infección en el flavedo, mientras que la acumulación de los transcritos de estos cuatro genes aumentó en el albedo como consecuencia de la herida practicada, aumentando en mayor medida por el desarrollo de la infección.

La inducción del nivel de expresión de algunos genes estudiados debida al desarrollo de la infección fue diferente en ambos tejidos. Se observó una expresión diferencial en los genes *CAH*, observándose un importante aumento en la expresión del gen *CAH2* en ambos tejidos durante las primeras 48 h de desarrollo de la infección. La acumulación del transcrito descendió en el flavedo pero continuó aumentando en el albedo 24 h después. El nivel de expresión del gen *CAH1* se incrementó en ambos tejidos a medida que progresaba la infección. Algo similar ocurrió en el caso de los genes *COMT1*, *CCoAOMT1*, *CAD3* y *SAD*, en los que el mayor nivel de expresión se detectó en el flavedo a las 48 h de la inoculación con el patógeno, mientras que en el albedo fue a las 72 hpi.

Los valores más altos de acumulación relativa de los genes *PAL1*, *CAH1*, *IRL1*, *CCoAOMT1*, *CCoAOMT2*, *CAD2*, *POX1* y *CS1* se encontraron en el flavedo de frutos infectados por *P. digitatum*, mientras que en el albedo infectado, los valores más altos de expresión se observaron en los genes *F3H*, *COMT1*, *COMT2*, *CAD1*, *CAD3* y *SAD*. Sin embargo, las inducciones más altas en la expresión de la mayoría de estos genes tuvieron lugar en el tejido interno en respuesta a la infección. Los únicos casos en los que el nivel de expresión del gen aumentó en mayor medida en el flavedo correspondieron a los genes *IRL1* y *CS1*.

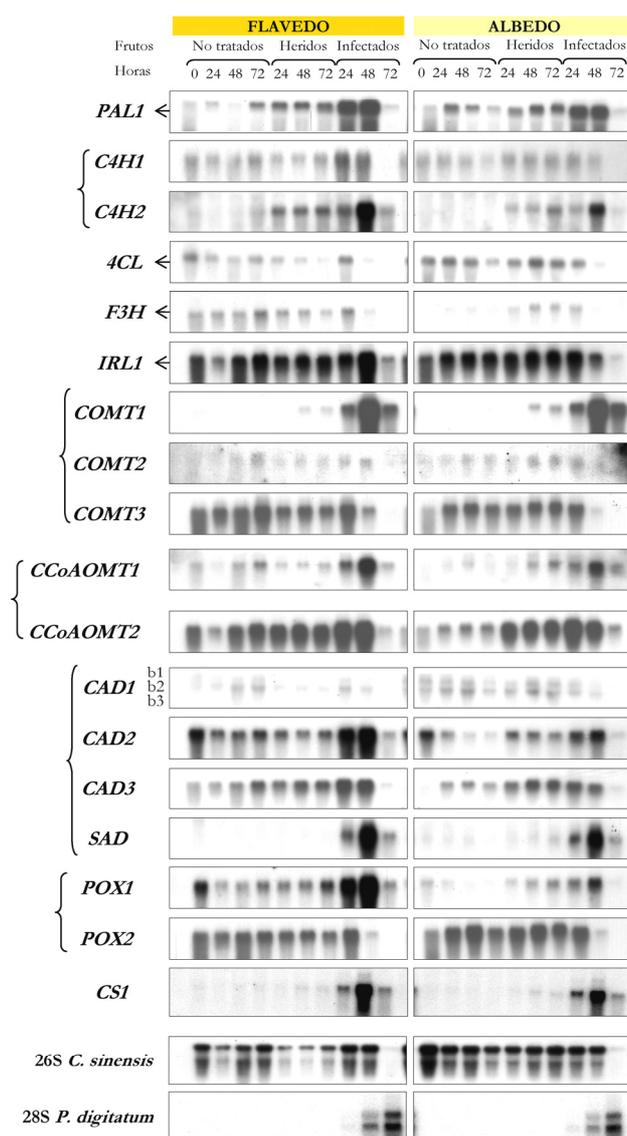


Figura 30. Análisis Northern de genes implicados en el metabolismo de fenilpropanoides. El análisis se realizó en tejido de flavedo (◐) y albedo (◑) de naranjas 'Navelina' procedente de NT) naranjas no tratadas, H) frutos heridos con un clavo de 5 mm de profundidad, e I) frutos inoculados con el aislado PHI-26 M1 de *P. digitatum* a una concentración de 10^6 conidios mL^{-1} . Todos los frutos se almacenaron durante 24, 48 y 72 h a 20 °C. 10 μg de RNA por muestra fueron resueltos en un gel desnaturizante, transferidos a una membrana de nylon (Hybond N+) y se hibridaron con la sonda de DNA monocatenario antisentido correspondiente marcada con ^{32}P . Todas las membranas se hibridaron posteriormente con un fragmento de los genes 26S rRNA de *C. sinensis* y 28S rRNA de *P. digitatum* (Ver nomenclatura de los genes en la Tabla 2).

Tabla 34. Acumulación relativa de los genes estudiados implicados en el metabolismo de fenilpropanoides. El análisis se realizó en tejido de flavedo (F) () y albedo (A) () de naranjas 'Navelina' procedente de NT) naranjas no tratadas, H) frutos heridos con un clavo de 5 mm de profundidad, e I) frutos inoculados con el aislado PHI-26 M1 de *P. digitatum* a una concentración de 10^6 conidios mL⁻¹. Todos los frutos se almacenaron durante 24, 48 y 72 h a 20 °C. 10 µg de RNA por muestra fueron resueltos en un gel desnaturalizante, transferidos a una membrana de nylon (Hybond N+) y se hibridaron con la sonda de DNA monocatenario antisentido correspondiente marcada con ³²P. Todas las membranas se hibridaron posteriormente con un fragmento del gen 26S rRNA de *C. sinensis*. (Ver nomenclatura de los genes en la Tabla 2).

	FNT0	FNT24	FNT48	FNT72	FH24	FH48	FH72	FI24	FI48	FI72	ANT0	ANT24	ANT48	ANT72	AH24	AH48	AH72	AI24	AI48	AI72
<i>PAL1</i>	1,00	1,85	0,53	1,42	3,83	4,79	4,56	8,99	18,64	6,74	1,02	2,04	1,39	1,31	2,25	3,34	3,17	7,41	13,90	5,59
<i>CAH1</i>	1,00	n.d.	0,69	0,97	2,78	2,89	3,25	1,88	6,38	6,85	0,40	0,48	0,39	0,58	0,80	0,74	1,19	0,92	2,70	3,68
<i>CAH2</i>	1,00	1,43	0,88	0,89	1,53	1,65	1,60	1,73	1,78	0,96	0,46	0,69	0,58	0,60	1,04	0,99	1,02	1,18	1,15	2,23
<i>4CL</i>	1,00	0,96	0,39	0,53	0,90	0,83	0,58	0,72	0,30	0,46	0,52	0,92	0,69	0,68	1,21	1,13	0,85	0,90	0,41	0,79
<i>F3H</i>	1,00	1,89	1,05	1,18	1,55	1,31	1,17	1,05	0,81	1,81	0,33	0,54	0,60	0,59	0,95	1,00	0,94	0,79	0,87	3,26
<i>IRL1</i>	1,00	1,21	1,10	1,30	1,74	1,80	2,05	1,11	3,47	4,60	0,94	1,18	1,24	1,20	1,38	1,32	1,63	1,12	1,38	1,90
<i>COMT1</i>	1,00	n.d.	0,59	0,70	1,82	4,50	5,21	9,72	92,02	77,07	0,62	0,48	0,35	0,41	0,74	2,49	3,40	9,87	80,24	138,73
<i>COMT2</i>	1,00	1,88	0,92	1,30	1,08	1,21	1,24	0,87	0,35	n.d.	0,94	1,45	1,86	1,47	1,27	1,41	1,72	1,08	1,04	3,11
<i>COMT3</i>	1,00	1,81	1,26	1,67	1,41	1,41	1,22	1,36	0,59	0,56	0,52	0,99	1,18	1,04	1,31	1,35	1,45	1,30	0,47	0,51
<i>CCoAOMT1</i>	1,00	n.d.	0,99	1,17	1,07	1,03	1,14	1,78	6,27	3,17	0,77	0,86	0,87	0,83	0,74	1,25	1,30	1,88	4,82	5,57
<i>CCoAOMT2</i>	1,00	1,12	0,95	1,31	2,67	2,49	2,57	2,48	3,67	2,55	0,38	0,42	0,44	0,48	1,57	1,35	1,65	1,96	3,09	2,91
<i>CAD1-mRNA1</i>	1,00	1,33	0,63	1,10	0,95	0,90	0,82	0,76	0,74	1,82	1,13	1,63	1,34	1,62	1,44	1,70	1,65	1,66	1,08	2,10
<i>CAD1-mRNA2</i>	1,00	1,34	0,90	1,21	1,22	1,29	0,93	1,09	0,86	1,91	1,22	1,79	1,70	1,58	2,36	2,30	2,04	2,11	1,26	2,02
<i>CAD1-mRNA3</i>	1,00	1,98	1,70	2,00	2,12	2,47	2,12	1,81	1,62	2,48	1,33	2,59	2,55	2,32	3,70	3,19	2,79	2,55	2,13	2,53
<i>CAD2</i>	1,00	0,95	0,57	0,59	1,05	0,92	0,87	1,22	2,10	2,05	0,32	0,24	0,12	0,17	0,49	0,39	0,31	0,64	1,21	1,25
<i>CAD3</i>	1,00	1,87	1,30	1,90	2,63	3,20	3,11	3,25	4,75	2,61	0,40	1,03	1,05	0,98	2,21	3,01	3,00	2,73	5,00	6,18
<i>SAD</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,00	6,12	5,96	0,17	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,25	0,35	1,34	5,88	6,93
<i>POX1</i>	1,00	0,70	0,46	0,50	1,15	1,27	1,45	2,11	5,85	3,78	0,16	0,16	n.d.	n.d.	0,25	0,33	0,39	0,59	1,40	1,63
<i>POX2</i>	1,00	1,22	0,88	0,67	1,01	1,13	0,84	1,03	0,26	0,22	0,56	0,79	1,11	0,75	1,12	1,36	1,07	1,04	0,31	0,14
<i>CSI</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,32	1,00	9,03	6,46	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,13	0,16	1,15	7,17	6,13

5.3. Validación de los resultados de las hibridaciones con las micromatrices mediante análisis Northern

Con el fin de validar y confirmar los resultados de los análisis de expresión de genes obtenidos mediante la hibridación con las micromatrices 7k y 12k, se realizó el análisis Northern de algunos genes implicados en el metabolismo de los fenilpropanoides, muchos de ellos incluidos en estas micromatrices. De los 18 genes estudiados mediante análisis Northern, 10 de ellos estaban presentes en la micromatriz 7k (*PAL1*, *C4H2*, *IRL1*, *COMT2*, *CCoAOMT1*, *CCoAOMT2*, *CAD2*, *SAD*, *POX1* y *POX2*) y 13 en la micromatriz 12k (*C4H1*, *C4H2*, *4CL*, *F3H*, *COMT1*, *COMT2*, *CCoAOMT1*, *CCoAOMT2*, *CAD1*, *CAD2*, *CAD3*, *SAD* y *CS1*). Hay que reseñar que el flavedo y el albedo de naranjas 'Navelate' sometidas al tratamiento de infección más curado cosechadas en Marzo de 2003 se emplearon en el análisis de expresión de genes mediante análisis Northern y el cDNA procedente del flavedo de estos mismos frutos se empleó en la hibridación de la micromatriz 7k, realizándose tres réplicas técnicas. Por lo tanto, podemos comparar los niveles de expresión génica de las mismas muestras empleando dos metodologías distintas, ya que en ambos casos se empleó el mismo RNA.

En la Figura 31 se muestra la acumulación relativa de los mRNAs de los genes analizados mediante Northern y mediante la hibridación con las micromatrices 7k y 12k. En casi todos los casos se asignó un valor de referencia de 1,0 al valor de la muestra de flavedo antes de comenzar los tratamientos (día 0 de inicio del experimento), refiriendo el resto de valores detectados en el flavedo y el albedo a éste. En los genes *COMT1* y *CS1* se asignó el valor de referencia al flavedo de frutos infectados y curados a 1 dpt en los análisis en los que están incluidos. El valor 1,0 de referencia en el gen *SAD* se asignó al flavedo de frutos no tratados en las hibridaciones con las micromatrices 7k y 12k y al flavedo de frutos infectados y curados a 1 dpt en el análisis Northern.

En general, se observó que en el flavedo el perfil de expresión de los 10 genes comunes fue similar en ambos análisis. Las mayores discrepancias se detectaron en los genes *SAD* y *POX1*. En el primer caso solamente se detectó acumulación del transcrito en los frutos infectados y curados a 1 dpt mediante análisis Northern, mientras que se observó en todos los tratamientos en la hibridación con la micromatriz 7k. En el caso del gen *POX1*, el perfil de expresión fue diferente empleando ambos sistemas.

Una vez comprobado que las dos técnicas de análisis empleadas mostraron resultados similares, se procedió a comprobar los resultados obtenidos con la micromatriz 12k con el fin de confirmar tendencias en los patrones de expresión. En general, las desviaciones de los niveles de expresión detectados mediante la hibridación con la micromatriz 12k fueron más elevadas. Hay que tener en cuenta que en este análisis se evaluaron tres réplicas biológicas independientes. Hay 6 genes comunes analizados en el flavedo mediante las tres técnicas: *C4H2*, *COMT2*, *CCoAOMT1*, *CCoAOMT2*, *CAD2* y *SAD*. Tres de ellos mostraron patrones de expresión muy similares (*CCoAOMT2*, *CAD2* y *C4H2*), mientras que en dos de ellos fueron más dispares (*CCoAOMT1* y *COMT2*). En el caso de la expresión del gen *CCoAOMT1*, el perfil de expresión fue similar en ambos casos, lo que cambió fue la magnitud de la expresión, siendo mayor en la hibridación con la micromatriz 12k. La acumulación del transcrito correspondiente al gen *SAD* solamente se detectó en frutos infectados y curados a 1 dpt por Northern, mientras que se detectó en todos los tipos de tejido analizados mediante hibridación con las micromatrices 7 y 12k. Aunque no se pudieron confirmar los resultados de la expresión de este gen obtenidos por hibridación con las micromatrices mediante análisis Northern, el perfil obtenido al emplear las micromatrices fue similar en ambos casos. El nivel de expresión del resto de genes analizados en el flavedo solamente se determinó mediante Northern y/o hibridación con la micromatriz 12k. El perfil de expresión del gen *COMT1* es idéntico en ambos análisis. Sin embargo, en el resto de genes es ligeramente diferente. Generalmente, los mayores niveles de expresión se detectaron mediante la hibridación con la micromatriz 12k, excepto en el gen *C4H1*.

Los perfiles de expresión en el albedo parecían más dispares a los detectados en el flavedo ya que el valor de referencia de 1,0 se asignó al flavedo de frutos no tratados. Sin embargo, los patrones de expresión de los genes *C4H2*, *4CL*, *COMT1*, *CCoAOMT2*, *CAD1*, *CAD2* y *CAD3* fueron similares analizándolos mediante Northern o mediante hibridación con la micromatriz 12k. Al igual que ocurrió en el flavedo, el perfil de expresión del gen *CCoAOMT1* fue similar empleando ambas técnicas, lo que cambió fue la magnitud de la expresión, siendo mayor al utilizar la micromatriz 12k. Los patrones de expresión de los genes *C4H1* y *COMT2* fueron ligeramente diferentes. De la expresión de los genes *F3H* y *SAD* no se pudieron obtener conclusiones ya que la expresión de los mismos no se detectó en todas las muestras analizadas.

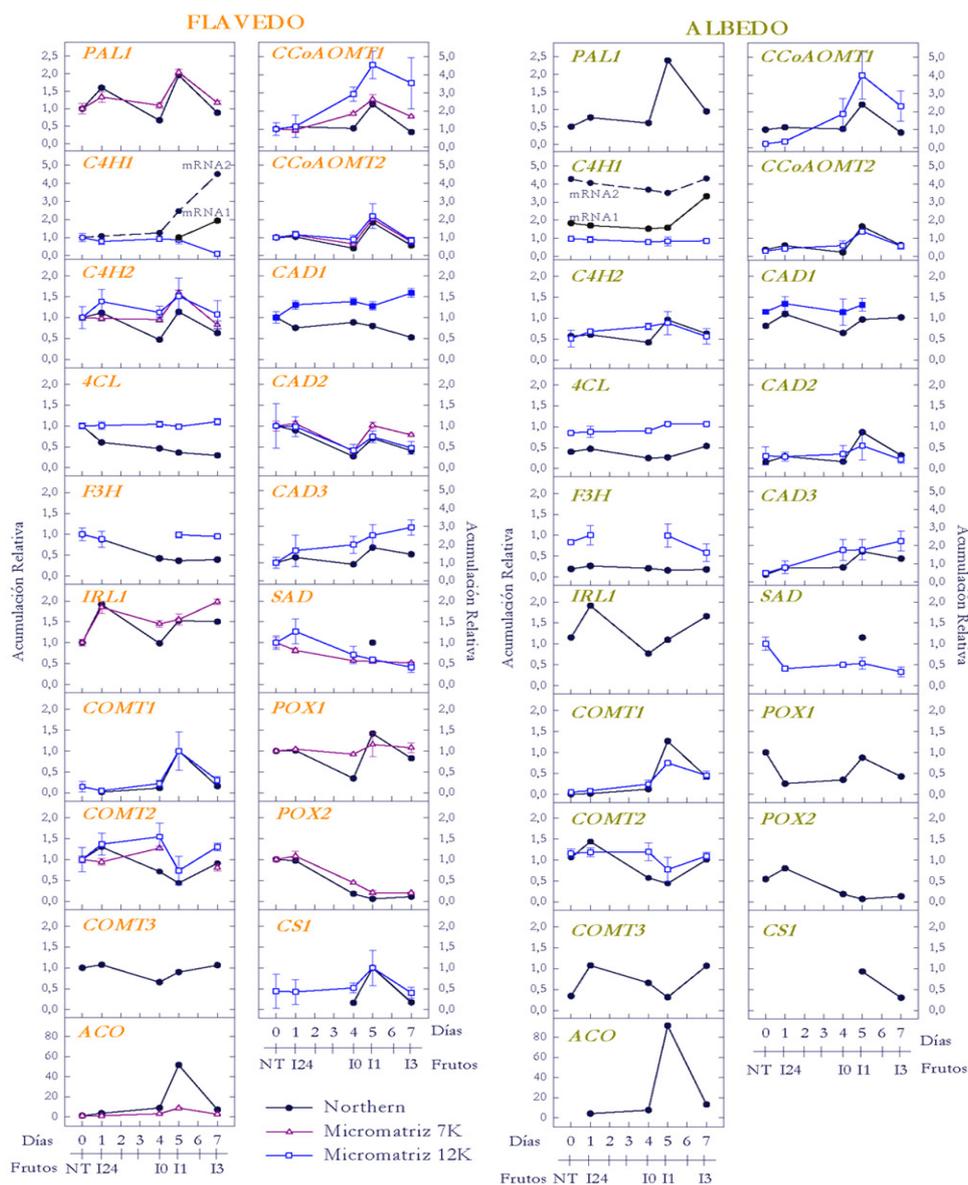


Figura 31. Acumulación relativa de genes estudiados implicados en el metabolismo de fenilpropanoides en frutos cítricos sometidos al tratamiento de infección más curado. El nivel de expresión de estos genes se analizó mediante hibridación Northern (□) o con las micromatrices 7k (○) y 12k (△). En general, en cada análisis se asignó un valor de referencia de 1,0 al valor de la muestra de flavedo antes de comenzar los tratamientos (día 0 de inicio del experimento), refiriendo el resto de valores a éste. El valor de referencia en los genes *COMT1* y *CS1* se asignó al flavedo de frutos infectados y curados a 1 dpt en los análisis empleados. El valor de referencia en el gen *SAD* se asignó al flavedo de frutos no tratados en las hibridaciones con las micromatrices y al flavedo de frutos infectados y curados a 1 dpt en el análisis Northern. Las barras indican la desviación estándar de tres réplicas.

6. PERFILES METABÓLICOS DE COMPUESTOS SECUNDARIOS EN FRUTOS CÍTRICOS: FENILPROPANOIDES

6.1. Cambios asociados a la inducción de resistencia en naranjas 'Navelate'

Con el fin de caracterizar los cambios inducidos en el metabolismo de fenilpropanoides por el tratamiento de infección más curado, se puso a punto un método cromatográfico (HPLC) que permitió separar y detectar mediante fluorescencia y espectrofotometría UV-visible (UV-vis) más de 75 compuestos fenólicos diferentes.

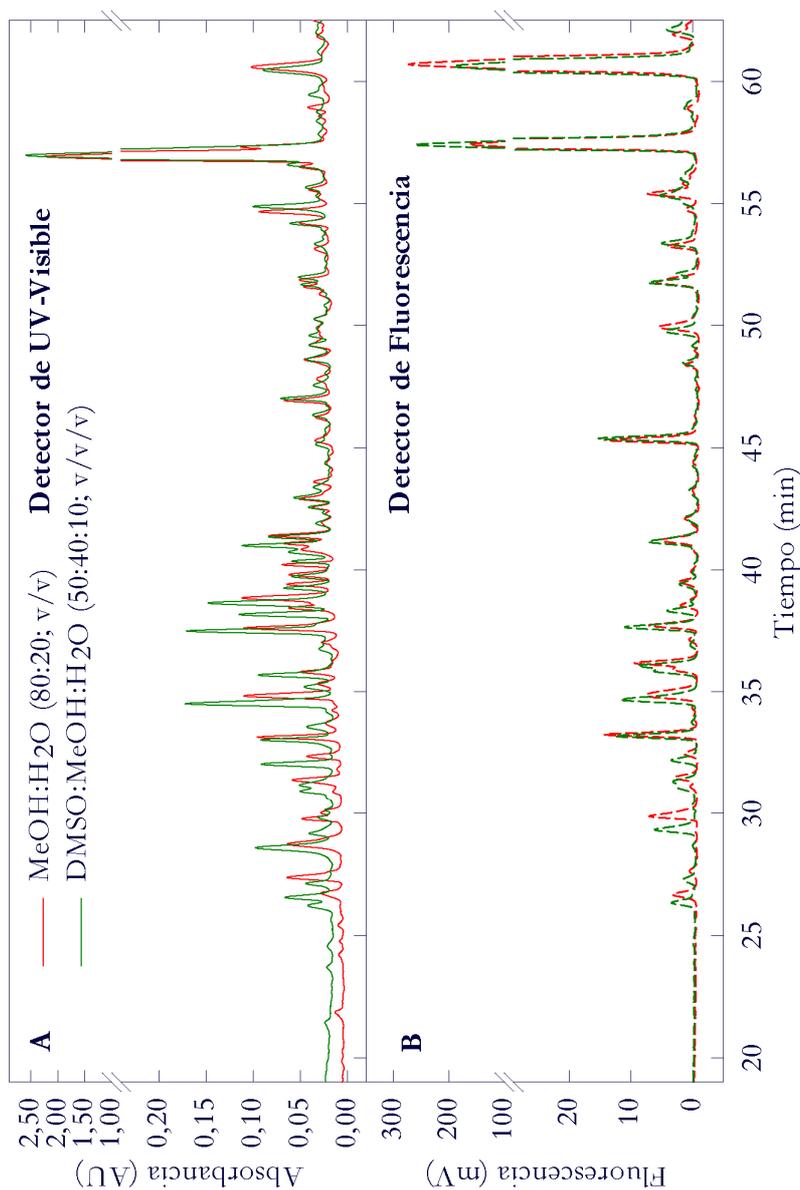
Para la puesta a punto del método de extracción de fenoles en el flavedo y el albedo de frutos cítricos se ensayaron disolventes de distinta polaridad. Así, se comparó la eficacia del MeOH al 80 % (MeOH:H₂O, 80:20, v/v), DMSO y de la mezcla DMSO:MeOH:H₂O (50:40:10, v/v/v). En los tres casos se obtuvo un perfil cromatográfico similar (Figura 32), por lo que se seleccionó el MeOH al 80 %.

También se comparó la resolución conseguida con columnas de fase reversa C18 de distinta longitud y de diversa hidrofobicidad relativa, todas ellas con un tamaño de partícula de 5 µm, y con la mezcla de eluyentes de distinta polaridad y distintos gradientes. Entre las diferentes columnas ensayadas se comprobó que la mayor eficacia se conseguía con una columna de 25 cm y fase estacionaria C18 de fase reversa (Luna C18 (2), Phenomenex), que presenta una hidrofobicidad media. Como eluyentes se ensayó la mezcla de agua conteniendo un 4 % de ácido acético y MeOH, y la mezcla de acetonitrilo y agua a pH 2,5 ajustado con ácido fosfórico. Teniendo en cuenta la resolución, se seleccionó la mezcla acetonitrilo: agua (pH 2,5) como eluyente en la fase móvil. Dada la complejidad de la muestra y la distinta polaridad de los compuestos fenólicos analizados fue necesario trabajar en gradiente partiendo de agua (pH 2,5) conteniendo un 1 % de acetonitrilo, hasta alcanzar un 99 % de acetonitrilo después de 105 min con un flujo de 0,8 mL min⁻¹. En estas condiciones se consiguió una buena separación de los compuestos fenólicos y una buena reproducibilidad en el análisis, tanto en las muestras de flavedo como de albedo, que pudieron ser determinados simultáneamente con los detectores de fluorescencia y de UV-vis (Figura 33).

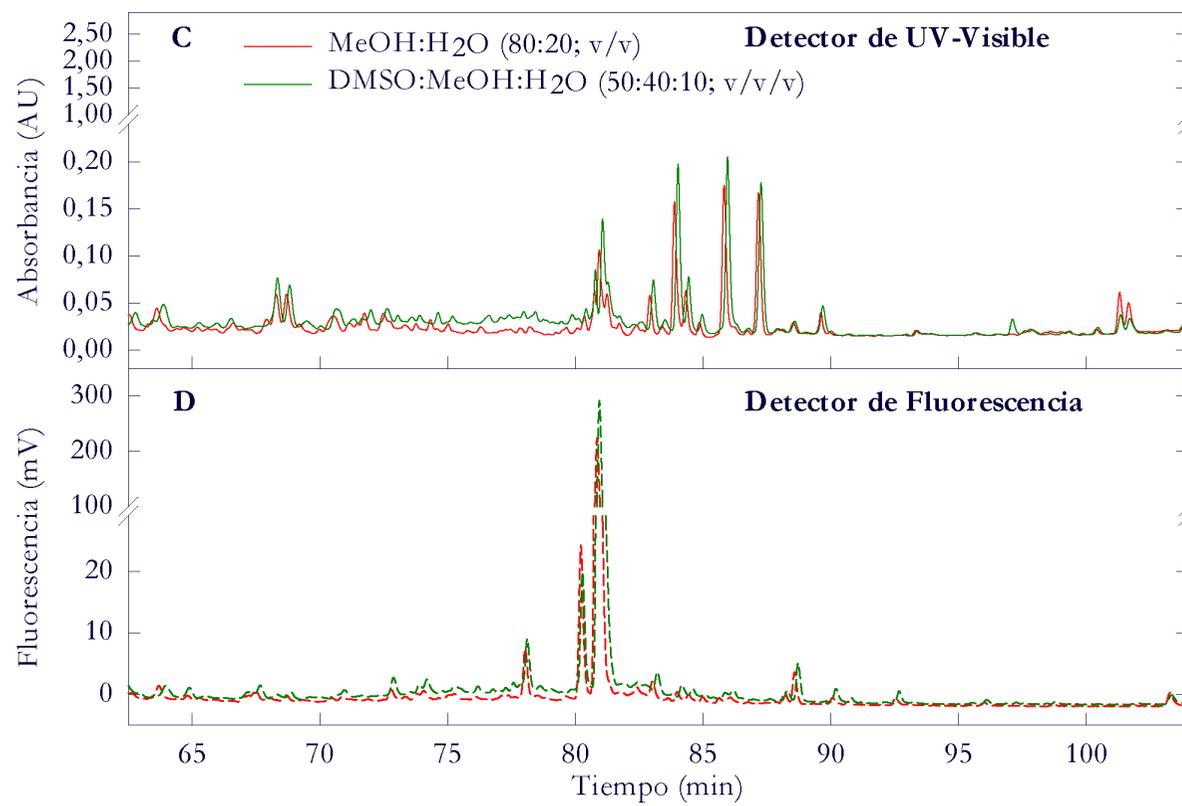
Una vez establecidas las condiciones cromatográficas, se estudió la estabilidad de los compuestos fenólicos en las muestras extraídas. Para ello, las

muestras se inyectaron inmediatamente después de ser extraídas y después de guardar los extractos a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante varios periodos de tiempo. También se ensayó la adición de bisulfito sódico y/o el ajuste del pH del disolvente a 2,5 con ácido fosfórico. En estas condiciones, no se observaron modificaciones en la mayoría de los compuestos fenólicos detectados. No obstante, se comprobó que aún después de 24 h, y manteniendo los extractos en oscuridad y bajo atmósfera de nitrógeno, algunos compuestos podían alterarse (Datos no mostrados). Por ello, las muestras se inyectaron inmediatamente después de ser extraídas en los distintos análisis.

Figura 32. Comparación del cromatograma obtenido mediante los detectores de UV-visible (A y C) y fluorescencia (B y D) a partir de la extracción de compuestos fenólicos del flavedo de naranjas 'Navelate' sometidas al tratamiento de infección más curado a los 3 dpt con diferentes disolventes: MeOH:H₂O (80:20, v/v) (—) o DMSO:MeOH:H₂O (50:40:10, v/v/v) (—). Los cromatogramas se subdividen del minuto 19 al 62 (A y B) y del 62 al 114 (C y D).



Continuación de la Figura 32.



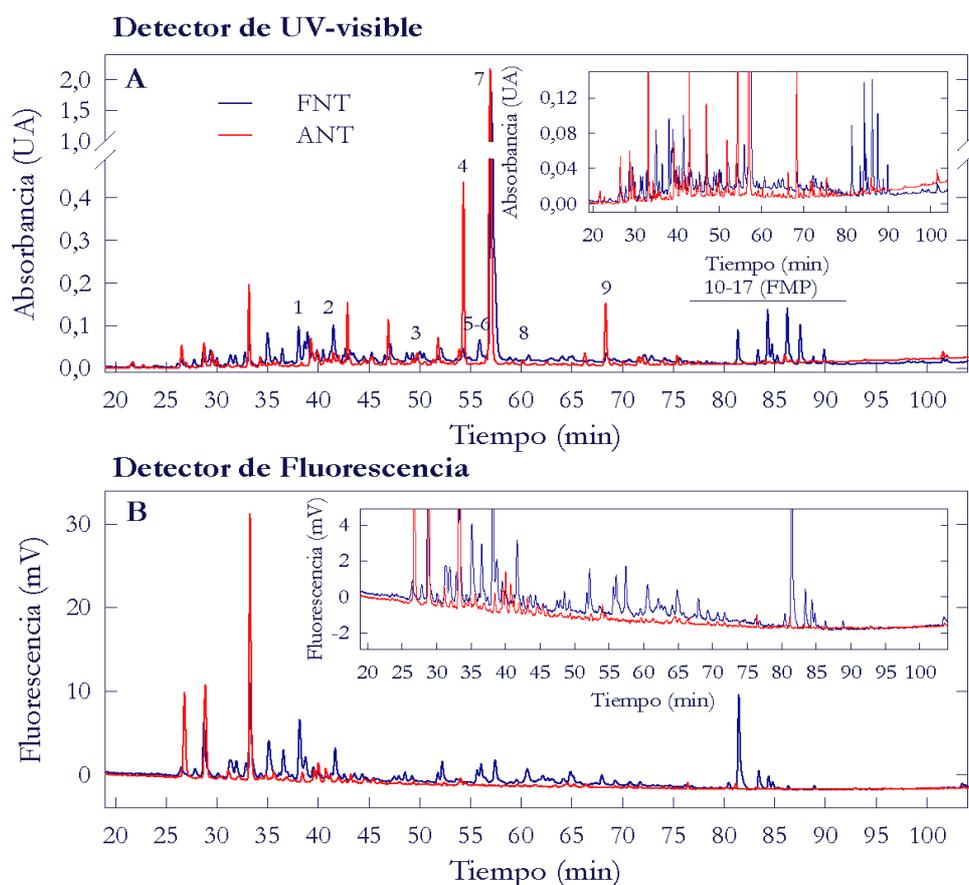


Figura 33. Determinación de compuestos fenólicos mediante HPLC en el flavedo (—) y el albedo (—) de frutos cítricos no tratados. Para cada muestra se obtuvo un cromatograma Maxplot en el detector de UV-visible (A), cuyo perfil de cada pico fenólico corresponde a la longitud de onda donde la absorbancia es máxima, y un cromatograma en mV en el caso de la fluorescencia (B). Mediante la numeración se reflejan los compuestos fenólicos identificados en el tejido analizado teniendo en cuenta la coincidencia con el T_R y el espectro de patrones conocidos: 1) Ácido clorogénico, 2) Ácido cafeico, 3) Eriocitrina, 4) Narirutina, 5) Isorroifolina, 6) Diosmina, 7) Hesperidina, 8) Escoparona (no se detectó en frutos no tratados), 9) Didimina, y las flavonas polimetoxiladas (FPM) 10) Isosinensetina, 11) Hexametil-O-gosipetina, 12) Sinensetina, 13) Hexametil-O-quercetagetina, 14) Nobiletina, 15) Tetrametil-O-escutelareina, 16) Heptametoxiflavona y 17) Tangeretina.

En el flavedo de naranjas de la variedad 'Navelate' no tratadas se observaron alrededor de 75 picos con el detector de UV-vis (Anexo 1.2, Tabla-I), los cuales mostraron un valor de absorbancia mayor a 0,005 unidades de absorbancia (UA), correspondientes al doble del ruido de fondo del cromatograma. La mayor parte de estos picos poseían espectros típicos de ácidos benzoicos (18 picos), ácidos cinámicos (19) y flavonas (20). También se detectaron 7 flavanonas y otros picos que no presentaban un espectro característico correspondiente a ninguno de estos grupos. A aquellos picos que se detectaron en dos o más de los tejidos analizados (flavedo y albedo de naranjas 'Navelate' (en este apartado) o 'Navelina' (Apartado 6.2 de los Resultados)), se les asignó un número, uv-X para los compuestos observados mediante el detector de UV-vis, y F-X para el de fluorescencia. Entre los picos detectados en el flavedo de naranjas 'Navelate' se encontraron 16 compuestos fenólicos cuyo tiempo de retención (T_R) y espectro correspondieron con los patrones hesperidina, ácido clorogénico, tetrametil-O-escutelareina, heptametoxiflavona, sinensetina, ácido cafeico, isorroifolina, didimina, eriocitrina, narirutina, nobiletina, diosmina, isosinensetina, hexametil-O-gosipetina, tangeretina y hexametil-O-gosipetina (Tabla 35). Además, entre los picos que presentaron mayores áreas se encontraron distintos compuestos que presentaban espectros característicos de ácidos cinámicos, benzoicos, flavonas y flavanonas, cuyos T_R no coincidían con ninguno de los 60 patrones analizados (Tabla 36 y Anexo 1 'Patrones'). La mayoría de estos patrones se seleccionaron ya que corresponden a compuestos fenólicos previamente descritos en los frutos cítricos por diversos autores y a su disponibilidad, bien por ser comerciales, o bien porque fueron cedidos por el Dr. Sendra (IATA-CSIC). Los compuestos derivados de los ácidos cinámicos se detectaron en la parte inicial del cromatograma ($T_R \approx 20-50$ min), las flavonas y flavanonas en la parte central ($T_R \approx 50-75$ min) y las flavonas polimetoxiladas, menos polares, entre los 75 y 90 min. Sin embargo, los ácidos benzoicos eluyeron a lo largo de todo el gradiente. Mediante la utilización del detector de fluorescencia, se observó la presencia de aproximadamente 60 compuestos fluorescentes, siendo el área de todos ellos al menos 2 veces superior al ruido de fondo (Anexo 1.2, Tabla- II).

El número de compuestos fenólicos detectados en el albedo de naranjas 'Navelate' con el detector UV-vis fue ligeramente menor a los del flavedo (Anexo 1.2, Tabla- III). Gran parte de los compuestos detectados en el albedo poseían espectros típicos de los ácidos benzoicos (25 picos), aunque

también se encontraron 15 compuestos con espectros similares a flavanonas, 12 derivados de ácidos cinámicos y 7 espectros tipo flavona. El T_R y el espectro de la mayor parte de los compuestos, al igual que ocurrió en el flavedo, no coincidía con ninguno de los 60 patrones estudiados. El compuesto mayoritario identificado en el albedo fue la hesperidina, seguida de la narirutina, didimina y eriocitrina (Tabla 35). Mientras que la concentración de todos estos compuestos detectados en el albedo fue superior a la del flavedo, la concentración de las flavonas polimetoxiladas del albedo de los frutos no tratados fue, en general, menor a la observada en el tejido coloreado. En el albedo se detectaron las flavonas polimetoxiladas hexametil-O-quercetagetina, heptametoxiflavona, tetrametil-O-escutelareina, sinensetina, nobiletina y tangeretina. Al igual que en el flavedo, se detectó ácido clorogénico, aunque en menor concentración que en el tejido externo. Del mismo modo, se detectaron menos compuestos fluorescentes en el albedo, que eluyeron fundamentalmente durante los 50 primeros minutos y se presentaron, en general, en menor concentración que en el flavedo (Anexo 1.2, Tabla- IV).

Tabla 35. Compuestos detectados en el flavedo y el albedo de naranjas 'Navelate' no tratadas cuyo tiempo de retención (T_R) y espectro coincide con patrones conocidos. Se muestra el T_R , la nomenclatura asignada y la concentración ($\mu\text{g g}^{-1}$ PF) de los mismos. En aquellos casos marcados con asterisco (*) se indica el área (mAU s).

Compuesto	T_R (min)	Nomenclatura	Área (mAU s) o Concentración ($\mu\text{g g}^{-1}$ PF)	
			FLAVEDO	ALBEDO
Ácido clorogénico	37,3	uv-15	161,0	14,2
Ácido cafeico	40,5	uv-29	68,8	
Eriocitrina	49,8	uv-53	34,8	15,3
Narirutina	54,0	uv-63	33,1	434,3
Isorroifolina	54,5	uv-64	65,8	
Diosmina	55,5	uv-65	26,5	
Hesperidina	57,0	uv-69	1.840,9	2.027,1
Didimina	68,3	uv-77	56,8	348,6
Isosinensetina	77,8	uv-93	3,5	
Hexametil-O-gosipetina	79,7	uv-94	1,0	
Sinensetina	80,9	uv-95	100,5	3,9
Hexametil-O-quercetagetina*	83,0	uv-96	420,7	39,3
Nobiletina	84,0	uv-97	29,7	1,4
Tetrametil-O-escutelareina	84,5	uv-98	140,8	12,5
Heptametoxiflavona	86,0	uv-99	125,4	20,4
Tangeretina*	87,1	uv-100	1.283,5	83,4

Tabla 36. Patrones empleados para la identificación de compuestos fenólicos de la corteza de los frutos cítricos. En la tabla se muestran ordenados por el tiempo de retención (T_R), indicando la fluorescencia de los mismos, si procede (si el cociente Fluorescencia / Absorbancia es mayor a 0,01 se indica con ++ y si es menor de este valor, con +). Asimismo, se indica las longitudes de onda máximas (λ máx.) de los picos. Entre paréntesis se presentan los nombres asignados a cada compuesto asociados a aquellos patrones identificados en el flavedo y el albedo mediante los detectores de UV-vis o de fluorescencia.

Nombre	T_R (min)	Fluor.	λ máx. (nm)
 Ácido gálico	17,5		214,6-271,2-369,7
 Teobromina	26,3		202,9-272,4-369,7
 Ácido protocatecuico	26,8	+	205,3-259,4-293,7-370,9
 Escopolamina	29,0	+	257,0-360,9-390,2
 Teofilina	30,1		202,9-271,2
 Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	34,7		254,7
 Cafeína	36,2	+	205,3-272,4
 Ácido clorogénico (uv-15)	37,0	++	217,0-240,5-324,6
 Ác. 1,2,3,4-tetrahydroharmane 3-carboxílico (THHCA)	37,2		219,3-271,2-370,9
 Ácido gentísico	37,3	++	211,1 328,2
 Esculetina	38,7		202,9-297,3-344,9
 Ácido vanílico	39,9		218,2-261,8-294,9-367,3
 Ácido cafeico (uv-29)	39,9		217,0-238,2-323,4
 Ácido <i>m</i> -hidroxibenzoico	40,7	+	206,4-237,0-296,1
 Ácido β -resorcílico	41,1		207,6-255,8-294,9
 Ácido <i>p</i> -cumárico	48,1	++	226,4-309,2
 Eriocitrina (uv-53)	49,4		284,2-329,4
 Umbeliferona	49,7	++	323,4
 Escopoletina	50,1	++	204,1-227,6-296,1-342,5
 Rutina	50,3		204,1-255,8-355,7
 Ácido metil salicílico	50,8		202,9-235,8-296,1-369,7-385,3
 Neohesperidina	51,1		284,2
 Ácido sinápico	51,1		237,0-323,4
 Ácido ferúlico	51,2	++	218,2-235,8-323,4
 Quercetina 3- β -D-glucósido	52,2		204,1-255,8-353,3
 Sanguinarina	53,9		273,6-328,2-395,0
 Narirutina (uv-63)	54,5	+	283,0-328,2
 Ácido benzoico	56,4	+	229,9-273,6
 Isorroifolina (uv-64)	56,5		266,5-336,6
 Naringina	56,7		283,0-325,8

Espectros coloreados indican: Benzoicos Cínámicos Cumarinas Flavonas polimetoxiladas Flavononas Alcaloides

200 nm 400

Continuación de la Tabla 36.

Espectros coloreados indican: Benzoicos Cinámicos Cumarinas Flavonas Flavanonas polimetoxiladas Flavanonas Alcaloides	Nombre	T _R (min)	Fluor.	λ máx. (nm)
		Diosmina (uv-65)	56,8	
	Berberina	57,1		228,7-264,1-346,1
	Hiosciamina	57,4		258,2-313,9-330,6-354,5
	Hesperidina (uv-69)	57,7		284,2-328,2
	Roifolina	57,9		266,5-331,8
	Ácido o-cumárico	58,6	++	212,3-275,9-324,6
	Neohesperidina	58,9		284,2
	4-hidroxycumarina	60,5	+	279,5-303,2
	Escoparona (uv-72, F-17)	60,9	++	204,1-228,7-293,7-342,5
	Ácido salicílico	62,4	++	204,1-235,8-303,2
	Ácido γ-resorcílico	62,4		206,4-246,4-305,6-372,1-389,0
	Didimina (uv-77)	69,1		225,2-283,0-327,0
	Eriodictiol	69,4		287,8
	Herniarina	70,8	++	322,2
	Quercetina	70,9		202,9-254,7-372,1
	Ácido cinámico	72,1		215,8-277,1
	Apigenina	76,1		266,5-336,6
	Naringenina	76,3		289,0
	Diosmetina	77,1		207,6-251,1-344,9
	Kaempferol	77,2		265,3-363,9
	Hesperetina	77,6		286,6
	Isosinensetina (uv-93)	78,1		204,1-248,8-270,0-342,5
	Limetina	79,2	++	206,4-254,7-327,0
	Hexametil-O-gosipetina (uv-94)	79,9	+	205,3-252,3-270,0-352,1
	Sinensetina (uv-95)	80,9	++	213,5-330,6
	Tetrametil-O-isoescutelareina	81,3		270,0-313,9-336,6
	Nobiletina (uv-97)	84,1	++	208,8-248,8-270,0-333,0
	Tetrametil-O-escutelareina (uv-98)	84,7	++	215,8-266,5-319,9
	Heptametoxiflavona (uv-99)	86,1	+	205,3-253,5-341,3
	Tangeretina (uv-100)	87,6	+	208,8-272,4-324,6

En el anexo 1.2 ‘Compuestos fenólicos en el flavedo y el albedo de naranjas ‘Navelate’ sometidas al tratamiento de inducción de resistencia’ se muestran los compuestos cuya área o concentración se modificó más de 1,5 veces en estos tejidos como consecuencia del tratamiento inductor respecto de los niveles detectados en los frutos no tratados, la desviación estándar de la media de, al menos, dos extracciones independientes con una inyección cromatográfica de cada una de ellas, así como el incremento o disminución relativa del área/concentración.

A 1 dpt se detectó en el flavedo un aumento significativo de la concentración de 21 compuestos fenólicos, entre los que predominaban aquellos de tipo benzoico (Tabla 37 y Anexo 1.2, Tabla- I). Ninguno de estos compuestos correspondió ni al ácido salicílico ni al gentísico, que se han relacionado con la patogénesis en distintos sistemas vegetales (Rojo y col., 2003). Dentro de este grupo destacó un compuesto con $T_R \approx 28,4$ min cuya área aumentó 7,8 veces a 1 dpt y continuó aumentando hasta casi 9 veces a los 3 dpt. Además, se comprobó que del total de los 12 compuestos incluidos dentro de este grupo, 7 de ellos no se detectaban en los frutos no tratados pero se inducían en el flavedo a 1 y/o 3 dpt después de haber sometido los frutos al tratamiento de inducción de resistencia. Dos de estos compuestos ($T_R \approx 49,2$ y $71,6$ min) se indujeron también en los frutos heridos y curados, siendo el área del compuesto correspondiente al $T_R \approx 49,2$ min superior en estos frutos que en los infectados y curados, por lo que su incremento podría no estar exclusivamente relacionado con la inducción de resistencia mediante inoculación previa con el patógeno.

Tabla 37. Compuestos derivados del ácido benzoico observados con el detector de UV-visible que modifican el área de integración más de 1,5 veces en el flavedo de naranjas sometidas al tratamiento de inducción de resistencia a 1 y 3 dpt respecto a los frutos no tratados. Se indica la nomenclatura arbitraria asignada cuando este compuesto se encontraba representado en diversos tipos de tejidos, las absorbancias máximas de cada compuesto y el T_R . Las flechas indican los aumentos o disminuciones en los compuestos no detectados en alguna de las muestras comparadas.

Nomenclatura	Abs máx (nm)	T_R (min)	FI24/ FNT	FI0/ FNT	FI1/ FNT	FX3/ FNT	FC3/ FNT	FH3/ FNT	FI3/ FNT
	232,3	28,4	3,1	4,3	7,8	7,6	4,8	0,9	8,9
uv-5	205,3-257,0-298,5	29,6	0,5	0,4	0,3	1,2	0,6	0,9	1,1
uv-24	241,7-328,2	40,0	1,5	1,4	1,1	1,1	1,4	2,3	1,6
	205,3-241,7	49,2	↑	↑				↑	↑
	274,8-374,5-392,6	63,5			↑				↑
	225,2-265,3	70,8			↑				
	274,8-328,2-370,9	71,6					↑	↑	↑
uv-84	227,6-283,0-330,6-374,5	73,9	1,2	1,4	2,1	1,3	1,0	1,7	0,7
uv-106	218,5-262,9	81,0			↑				↑
	222,9-275,9-367,3	81,6			↑				↑
	260,6	82,2		↑	↑				↑
uv-101	238,2-309,2-324,6	88,5	0,6	0,7	0,7	1,0	0,8	1,0	0,6

En cuanto a los derivados de los ácidos cinámicos, el tratamiento de inducción de resistencia originaba disminuciones importantes en los niveles de una alta proporción de este tipo de compuestos fenólicos observados en el flavedo mediante el detector de UV-vis, sobre todo a 1 dpt (Tabla 38). Así, se comprobó que la concentración de aproximadamente la mitad de los compuestos de este grupo disminuía hasta alcanzar valores de incluso el 20 % de los detectados en los frutos no tratados. No obstante, estas diferencias se redujeron en general a los 3 dpt. Otros compuestos dentro de este grupo aumentaron, sobre todo a los 3 dpt, en las muestras sometidas al tratamiento de inducción de resistencia, destacando 4 de ellos (uv-7, uv-22 y $T_R \approx 69,0$ y $70,3$ min) cuya concentración aumentó más de dos veces a los 1 y/o 3 dpt respecto de los frutos no tratados. Excepto en el primero de ellos, este aumento no se produjo en los frutos heridos y curados o durante la exposición de los frutos a 37°C .

Tabla 38. Compuestos derivados del ácido cinámico observados con el detector de UV-visible que modifican el área de integración más de 1,5 veces en el flavedo de naranjas sometidas al tratamiento de inducción de resistencia a 1 y 3 dpt respecto a los frutos no tratados (Ver indicaciones en la Tabla 37).

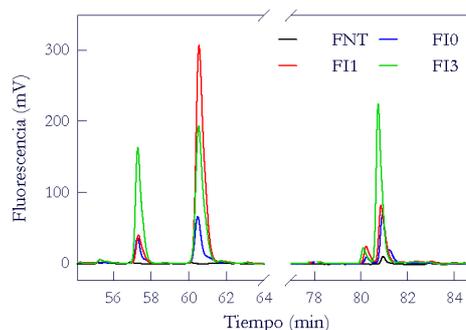
Nomenclatura	Abs máx (nm)	T _R (min)	FI24/ FNT	FI0/ FNT	FI1/ FNT	FX3/ FNT	FC3/ FNT	FH3/ FNT	FI3/ FNT
uv-2	227,6-312,7	27,0	0,8	0,6	0,4	0,6	0,8	1,0	↓
	226,4-312,7-390,2	30,8	0,7	0,6	0,3	0,3	0,6	0,7	0,8
uv-7	218,2-324,6	31,1	1,4	1,4	2,3	0,9	2,6	2,2	1,6
	227,6-312,7	31,8	0,7	0,6	0,5	0,7	0,6	0,8	0,6
uv-13	227,6-311,5-389,0	35,3	0,3	0,3	0,2	0,8	0,7	0,7	0,8
uv-14	218,2-235,8-327,0	35,4	0,7	0,7	0,3	1,4	1,0	1,3	0,8
uv-17	211,1-315,1	38,0	0,9	0,9	0,6	0,6	0,8	1,3	1,0
uv-22	218,2-239,3-315,1	39,0	0,7	1,1	1,0	0,7	0,7	0,8	2,2
uv-23	239,3-330,6	39,5	0,9	1,2	1,2	1,5	1,1	1,4	1,8
	287,8-323,4-392,6	42,1	6,0	0,6	↓	↓	0,4	0,6	0,4
	237,0-323,4-395,0	43,1	↓	0,7	0,6	1,0	0,4	0,6	0,6
	217,0-291,3-323,4	54,1	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
	235,8-323,4	63,0	1,3	0,3	1,5	1,5	1,4	0,1	0,3
	235,8-328,2	69,0	1,1	1,8	3,3	0,7	0,4	1,0	4,6
	234,6-328,2	70,3	↓	1,1	2,5	0,7	↓	↓	2,1

En la Tabla 39 puede observarse además que todas las cumarinas detectadas por UV-vis (uv-72 y T_R ≈ 47,4 y 69,5 min) en el flavedo de frutos infectados y curados no se encontraban en los frutos no tratados, y que su área/concentración fue mayor a 1 dpt. El incremento de dos de estos compuestos (uv-72 y T_R ≈ 47,4 min) parece deberse exclusivamente al tratamiento de inducción de resistencia ya que no se observaron en los frutos heridos y curados o en los almacenados a 37 °C. En cambio, el compuesto que eluyó a un T_R ≈ 69,5 min se detectó también en los frutos heridos y curados, presentando un área similar a la detectada en los frutos infectados y curados a los 3 dpt. El compuesto uv-72 observado aproximadamente a los 60,5 min coincidió en espectro y T_R con la escoparona, previamente relacionada con la defensa de los frutos cítricos frente a la infección por *P. digitatum*, cuya concentración en el flavedo infectado y curado fue de aproximadamente 85 µg g⁻¹ PF a 1 dpt, reduciéndose a 52 µg g⁻¹ a los 3 dpt. Este resultado se confirmó con el detector de fluorescencia (Figura 34 y Tabla- II del Anexo 1.2).

Tabla 39. Cumarinas observadas con el detector de UV-visible que modifican el área de integración/concentración más de 1,5 veces en el flavedo de naranjas sometidas al tratamiento de inducción de resistencia a 1 y 3 dpt respecto a los frutos no tratados (Ver indicaciones en la Tabla 37).

Nomenclatura	Abs máx (nm)	T _R (min)	FI24/ FNT	FI0/ FNT	FI1/ FNT	FX3/ FNT	FC3/ FNT	FH3/ FNT	FI3/ FNT
uv-72	202,9-227,6-299,7-348,5	47,4			↑				↑
	Escoparona	60,5		↑	↑			↑	↑
	232,3-334,2	69,5		↑	↑	↑	↑	↑	↑

Figura 34. Cromatograma parcial en el que se presentan tres compuestos fluorescentes del flavedo de naranjas 'Navelate' que se indujeron como consecuencia del tratamiento de infección más curado a 0 (—), 1 (—) y 3 (—) dpt respecto de frutos no tratados (—). El compuesto detectado a los 60,5 min coincide en T_R y espectro con el patrón de escoparona.



A pesar de que las flavonas y flavanonas constituyen los compuestos fenólicos más abundantes, destacando la hesperidina y las flavonas polimetoxiladas, sufrieron cambios poco relevantes en el flavedo como consecuencia del tratamiento de inducción de resistencia en comparación con los otros grupos fenólicos. Del total de los 19 flavonoides incluidos en la Tabla- I del Anexo 1.2, cabe señalar que sólo se observó un incremento ligero en la concentración de las flavonas polimetoxiladas hexametil-O-gosipetina (uv-94), hexametil-O-quercetagetina (uv-96) y tangeretina (uv-100) a 1 dpt, que no se mantuvo a los 3 dpt. Dentro del grupo de las flavonas, se observaron ligeras disminuciones en dos compuestos desconocidos, en un caso sólo a 1 dpt, mientras que en el otro sólo a los 3 dpt (Tabla 40). En cuanto a las flavanonas, se comprobó que el tratamiento de inducción de resistencia favorecía la caída de la concentración de 3 de estos compuestos en los frutos infectados y curados a 1 dpt, presentando dos de ellos el espectro característico y el T_R de la eriocitrina (uv-53) y narirutina (uv-63). A los 3 dpt no se observaron diferencias relevantes en la eriocitrina. Las otras dos flavanonas, hesperidina (uv-69) y didimina (uv-77), mostraron incrementos significativos

en la concentración como consecuencia del tratamiento de inducción de resistencia. Así, la hesperidina mostró un máximo a 1 dpt, mientras que la didimina lo mostró a los 3 dpt. En ambos casos, las concentraciones observadas fueron mayores a las detectadas en los frutos heridos y curados.

Tabla 40. Flavonas y flavanonas observadas con el detector de UV-visible que modifican el área de integración/concentración más de 1,5 veces en el flavedo de naranjas sometidas al tratamiento de inducción de resistencia a 1 y 3 dpt respecto a los frutos no tratados (Ver indicaciones en la Tabla 37).

Nomenclatura	Abs máx (nm)	T _R (min)	FI24/ FNT	FI0/ FNT	FII/ FNT	FX3/ FNT	FC3/ FNT	FH3/ FNT	FI3/ FNT
uv-30	212,3-271,2-346,1	42,3	0,4	0,9	1,0	1,7	0,8	1,3	0,6
	252,3-338,9	46,0	0,4	1,0	0,7	1,5	0,6	0,9	0,9
	220,5-331,8	61,0		↑		↑		↑	↑
uv-53	Eriocitrina	49,8	0,3	0,5	0,5	0,2	1,1	0,7	0,7
uv-94	Hexametilo-gosipetina	79,7	1,2	0,7	1,7	1,3	0,9	1,3	1,3
	205,3-254,7-358,0	84,8	0,7	0,7	0,9	0,9	0,7	0,9	0,6
	281,9	52,6	↓	↓	↓	0,2	0,1	↓	0,3
uv-63	Narirutina	54,0	↓	↓	↓	↓	↓	↓	0,5
uv-100	Tangeretina	87,1	1,1	1,2	1,6	1,4	1,3	1,4	1,4

Además de los compuestos anteriores, se separaron otros 5 compuestos cuya área aumentó siempre en el flavedo de los frutos sometidos al tratamiento de inducción de resistencia (Tabla 41). Tres de ellos (uv-33, uv-104 y uv-105) presentaron un máximo a 272 nm, máximo muy próximo al del espectro característico de diversos alcaloides, comprobándose que el T_R no coincidía con diversos alcaloides que se han descrito en distintos sistemas vegetales, incluidos los cítricos (Kretschmar y Baumann, 1999; Herraiz y Galisteo, 2003). Los picos uv-104 y uv-105 parece que son fluorescentes, al igual que alguno de los alcaloides mencionados, ya que el T_R coincidió con dos picos observados mediante el detector de fluorescencia que también se indujeron como consecuencia del tratamiento de infección más curado (F-16 y F-22) (Figura 34). En ambos casos, la máxima concentración se observó a los 3 dpt en el flavedo de los frutos infectados y curados, detectándose una ligera inducción en los frutos heridos y curados.

Tabla 41. Otros compuestos observados por el detector de UV-visible que modifican el área de integración más de 1,5 veces en el flavedo de naranjas sometidas al tratamiento de inducción de resistencia a 1 y 3 dpt respecto a los frutos no tratados (Ver indicaciones en la Tabla 37).

Nomenclatura	Abs máx (nm)	T _R (min)	FI24/ FNT	FI0/ FNT	FI1/ FNT	FX3/ FNT	FC3/ FNT	FH3/ FNT	FI3/ FNT
uv-33	201,8-273,6-336,6	45,1	0,9	0,4	1,8	2,3	0,8	0,9	0,8
uv-104	266,5-329,4	57,7	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
uv-107	232,3-305,6	66,3		↑	↑			↑	
	232,3-306,8	67,2		↑	↑			↑	↑
uv-105	205,3-270,0-327,0	80,7		↑	↑			↑	↑

En la Tabla- II del Anexo 1.2 se muestran los cambios en 34 compuestos detectados en el flavedo mediante la utilización del detector de fluorescencia. Además de compuestos fenólicos como los derivados de los ácidos benzoicos y cumarina, podrían detectarse otros compuestos que presentasen grupos funcionales aromáticos con transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ de baja energía o compuestos alifáticos o alicíclicos con grupos carbonilo y compuestos con dobles enlaces conjugados. La mayor parte de los picos incluidos mostraron un aumento en el área/concentración como consecuencia del tratamiento de inducción de resistencia. Destacó el incremento en más de 10 veces en el área de diversos compuestos fluorescentes, bien a 1 dpt (F-7, F-8, F-13, F-21, F-25 y T_R \approx 41,0-56,7 y 61,8 min) o a los 3 dpt (F-12, F-16, F-22 y T_R \approx 36,7-51,9-55,5 y 58,7 min). En la mayor parte de los casos los valores observados en el flavedo de los frutos infectados y curados fueron mayores a los de los frutos heridos y posteriormente curados y en los almacenados a 37 °C. Entre los 10 compuestos fluorescentes no detectados en los frutos no tratados y que se observaron en los frutos sometidos al tratamiento de inducción de resistencia se encontró la escoparona (F-17), que alcanzó una concentración superior a los 85 $\mu\text{g g}^{-1}$ a 1 dpt. Sin embargo, sus precursores umbeliferona, esculetina y escopoletina no se detectaron en respuesta al tratamiento inductor. Asimismo, se observaron dos compuestos fluorescentes cuyo espectro de absorción es similar al de algunos alcaloides. El tratamiento de infección más curado solamente redujo el área de 5 picos a 1 dpt, llegando 4 de ellos a ser inapreciables. Sin embargo, su valor aumentó a los 3 dpt hasta alcanzar niveles similares o incluso superiores a los iniciales (T_R \approx 62,9-68,7 y 71,3 min).

En el albedo también se observó a 1 dpt una modificación del área/concentración de diversos picos. Destacó la alteración en la concentración de al menos 23 compuestos con espectro tipo benzoico (Tabla 42 y Anexo 1.2, Tabla- III). Al igual que ocurrió en el flavedo, el área/concentración de la mayor parte de este tipo de compuestos aumentó como consecuencia del tratamiento de inducción de resistencia. Los niveles de 8 compuestos aumentaron a 1 dpt más de 1,5 veces respecto de los observados en los frutos no tratados. En general, los niveles de estos compuestos descendieron a los 3 dpt, excepto en el compuesto uv-105 con $T_R \approx 80,0$ min cuya concentración fue máxima a este tiempo. Este compuesto es el que más aumentó como consecuencia del tratamiento inductor a los 3 dpt y no se detectó en los frutos heridos y curados ni en los almacenados a 37 °C.

Tabla 42. Compuestos derivados del ácido benzoico que modifican el área en más de 1,5 veces o menos de 0,67 en el albedo de naranjas sometidas al tratamiento inductor a 1 y/o 3 dpt respecto de los frutos no tratados.

Nomenclatura	Abs máx (nm)	T_R (min)	AI24/ ANT	AI0/ ANT	AI1/ ANT	AX3/ ANT	AC3/ ANT	AH3/ ANT	AI3/ ANT
	227,6-272,4	21,5	0,2	0,4	0,5	↓	0,5	0,5	1,0
	202,9-266,5	22,5	0,9	0,9	1,1	↓	0,9	0,5	0,2
uv-1	217,0-279,5-315,1	26,4	0,7	0,9	1,2	0,3	1,1	1,2	0,1
uv-4	232,3	29,3	1,4	1,2	0,5	0,9	1,3	1,1	1,0
	277,1-316,3	34,2	1,3	1,2	1,1	0,5	1,0	0,7	0,5
uv-13	234,6-274,8-311,5	35,7	1,4	1,1	1,6	1,2	1,2	1,0	0,7
uv-18	233,5-275,9-311,5	39,1	1,1	1,1	1,1	0,7	1,1	0,9	0,6
uv-24	241,7-328,2	40,1	1,5	1,6	1,6	0,6	1,2	1,3	0,8
uv-28	231,1-283,0-321,1	41,3	2,7	3,6	1,4	↓	2,3	2,3	3,1
uv-42	220,5-266,5-374,5-390,2	45,3	0,9	0,8	0,6	0,5	0,5	0,5	1,0
uv-57	228,7-284,2-352,1-373,3	51,3	1,9	2,1	2,6	1,1	2,1	1,3	1,1
uv-75	207,6-262,9-303,2	64,6	1,5	0,9	1,7	↓	1,2	↓	↓
	210,0-297,3-372,1-389,0	66,2	0,7	0,5	0,7	0,2	0,9	0,6	0,1
uv-78	232,3	69,0	1,1	1,4	1,1	2,2	1,1	↓	1,9
uv-83	232,3-316,3-355,7-370,9	71,9	2,3	2,5	1,9	1,1	1,3	1,4	0,8
uv-85	225,2-283,0	72,3	1,9	0,6	0,8	0,6	0,6	0,7	0,2
uv-87	232,3-308,0	73,9	1,1	1,2	1,3	1,6	1,2	1,0	1,8
uv-88	231,1-273,6-287,8	74,3	1,6	1,3	1,6	1,8	1,4	1,4	↓
uv-89	232,3-274,8-333,0	75,3	1,2	1,0	1,2	0,2	0,9	0,7	0,2
uv-90	232,3	75,9	1,0	1,1	1,1	0,5	1,1	↓	↓
uv-105	226,4-273,6	80,0	1,1	4,4	4,8	↓	↓	↓	17,1
uv-106	212,3-264,1-375,7	81,3			↑				
	238,2-300,8-313,9	86,5	1,2	0,8	0,5	0,5	0,8	0,6	0,1

El número de compuestos derivados de los ácidos cinámicos que se alteraron en el albedo como consecuencia del tratamiento inductor fue menor al observado en el flavedo (Tabla 43). Dentro de este grupo se observó un compuesto (uv-15) cuyo T_R y espectro coincidió con el ácido clorogénico y cuya concentración aumentó 1,7 veces hasta los 24,7 $\mu\text{g g}^{-1}$ PF a 1 dpt y

posteriormente descendió hasta los $10,6 \mu\text{g g}^{-1}$ a los 3 dpt. Igual ocurrió en el caso del pico uv-14 ($T_R \approx 36,6 \text{ min}$), cuya área a 1 dpt fue 1,7 veces superior a la observada en los frutos no tratados. En cuanto a los compuestos que redujeron la concentración como consecuencia del tratamiento inductor, se observó una disminución del área de los picos uv-35 y uv-68 a 1 dpt, pasando a no detectarse a los 3 dpt.

Tabla 43. Compuestos derivados del ácido cinámico que modifican el área/concentración en más de 1,5 veces o menos de 0,67 en el albedo de naranjas sometidas al tratamiento inductor a 1 y/o 3 dpt respecto de los frutos no tratados.

Nomenclatura	Abs máx (nm)	T_R (min)	AI24/ ANT	AI0/ ANT	AI1/ ANT	AX3/ ANT	AC3/ ANT	AH3/ ANT	AI3/ ANT
uv-3	218,2-233,5-317,5	28,8	1,1	1,0	2,1	0,6	1,3	1,1	1,3
	227,6-316,3	35,3	2,7	1,7	1,3	0,9	1,8	1,0	0,6
uv-14	329,4-348,5-368,5	36,6	1,7	1,4	1,7		1,5	1,2	
uv-15	Ác. Clorogénico	38,2	2,1	1,8	1,7	1,2	1,7	1,6	0,7
uv-23	238,2-331,8	39,9	0,8	1,0	0,7	0,5	0,5	0,3	0,6
	220,5-238,2-	42,0	0,5	0,7	0,6	↓	0,9	↓	↓
uv-35	308,0-323,4-395,0	56,4	0,8	0,7	0,6	↓	0,7	0,8	↓
uv-68	217,0-323,4-392,6	63,9	1,1	1,5	1,4	↓	1,3	1,0	1,8

El tratamiento de infección más curado solamente dio lugar a la modificación de la concentración de tres cumarinas (Tabla 44). El compuesto uv-60 ($T_R \approx 53,8 \text{ min}$) disminuyó significativamente a los 1 y 3 dpt respecto de los frutos no tratados, aunque esta reducción fue más pronunciada en los frutos heridos y curados. Aunque la tercera cumarina detectada (uv-72), cuyo T_R y espectro coincidió con el patrón de la escoparona, no se detectó en los frutos no tratados, su concentración aumentó en el albedo de los frutos infectados y curados, alcanzando un valor superior a los $16 \mu\text{g g}^{-1}$ a los 3 dpt. Por el contrario, en el flavedo la máxima concentración se observó a 1 dpt. Aunque este compuesto también se detectó en los frutos heridos y curados, la concentración observada en los frutos sometidos al tratamiento de inducción de resistencia fue significativamente mayor.

Tabla 44. Compuestos tipo cumarinas que modifican el área/concentración en más de 1,5 veces o menos de 0,67 en el albedo de naranjas sometidas al tratamiento inductor a 1 y/o 3 dpt respecto de los frutos no tratados.

Nomenclatura	Abs máx (nm)	T_R (min)	AI24/ ANT	AI0/ ANT	AI1/ ANT	AX3/ ANT	AC3/ ANT	AH3/ ANT	AI3/ ANT
uv-40	329,4	44,6	1,1	0,8	1,5	0,1	1,2	0,9	0,6
uv-60	201,8-327,0	53,8	0,9	0,6	0,5	0,6	0,7	0,4	0,6
uv-72	Escoparona	60,5		↑	↑			↑	↑

Mientras que en el flavedo no se observaron cambios importantes en la concentración de las flavonas polimetoxiladas, en el albedo la mayor parte de ellas aumentaron más de dos veces a 1 dpt respecto a las detectadas en los frutos no tratados, descendiendo ligeramente a los 3 dpt (Tabla 45). En el albedo de frutos infectados durante 24 h o en los heridos y curados también se observó un aumento en la concentración de la mayoría de las flavonas polimetoxiladas, siendo este incremento mayor al observado en los frutos sometidos al tratamiento inductor. Entre los compuestos mayoritarios del albedo destacan las flavanonas que, en general, se encuentran en mayor concentración que en el flavedo. Las flavanonas cuyo T_R y espectro coincidió con el de patrones conocidos como la hesperidina (uv-69), eriocitrina (uv-53), narirutina (uv-63) y didimina (uv-77), no mostraron cambios importantes como consecuencia del tratamiento de inducción de resistencia. Sin embargo, conviene destacar el compuesto uv-59 ($T_R \approx 52,2$ min), cuya concentración aumentó más de 6 veces a 1 dpt respecto de los frutos no tratados y descendió ligeramente a los 3 dpt. No obstante, este incremento también se observó en el albedo de frutos heridos y curados.

Tabla 45. Compuestos tipo flavonas y flavanonas que modifican el área/concentración en más de 1,5 veces o menos de 0,67 en el albedo de naranjas sometidas al tratamiento inductor a 1 y/o 3 dpt respecto de los frutos no tratados.

Nomenclatura	Abs máx (nm)	T_R (min)	AI24/ ANT	AI0/ ANT	AI1/ ANT	AX3/ ANT	AC3/ ANT	AH3/ ANT	AI3/ ANT
uv-34	225,2-271,2-336,6	41,7	1,0	0,9	0,9	0,9	1,2	1,4	0,6
uv-53	Eriocitrina	49,8	0,9	0,9	1,2	1,1	1,1	0,8	0,8
	283,0	51,8	0,5	0,4	0,6	0,5	0,4	0,5	0,4
uv-59	283,0	52,2	5,4	5,4	6,3	5,2	5,6	7,5	3,6
uv-70	289,0-353,3	59,0	1,5	1,1	1,6	1,8	1,0	1,4	1,2
	284,2-360,9-372,1	62,6	1,0	0,9	1,2	0,9	1,0	0,8	0,6
uv-79	285,4	70,1	1,3	1,1	1,2	0,7	1,2	1,0	0,5
uv-95	Sinensetina	80,9	1,7	1,7	2,3	1,0	1,5	1,8	0,9
uv-96	Hexametil-O-querquetagatina	83,0	1,9	1,5	1,6	0,8	1,3	1,3	1,6
uv-97	Nobiletina	84,0	2,8	2,0	2,3	1,2	1,6	1,9	1,8
uv-99	Heptametoxiflavona	86,0	1,7	1,6	1,8	0,9	1,3	1,3	1,7
uv-100	Tangeretina	87,3	2,7	2,0	2,9	1,4	1,3	1,3	2,4

Al igual que en el flavedo, en el tejido interno se detectaron diversos compuestos que no presentaron espectros característicos de los ácidos benzoicos, cinámicos, de flavonoides o de cumarinas, cuya área aumentó específicamente como consecuencia del tratamiento de infección más curado a 1 y 3 dpt (Tabla 46). Se detectaron compuestos cuya máxima concentración se observó a 1 dpt, no detectándose en el albedo de frutos heridos y posteriormente curados ni en los almacenados a 37 °C. Los picos uv-104 y uv-

105, con $T_R \approx 57,7$ y $80,7$ min respectivamente, también observados en el flavedo, poseen un máximo de absorbancia de aproximadamente 270 nm que es próximo al espectro característico de diversos alcaloides.

Tabla 46. Compuestos que modifican el área en más de 1,5 veces o menos de 0,67 en el albedo de naranjas sometidas al tratamiento inductor a 1 y/o 3 dpt respecto de los frutos no tratados.

Nomenclatura	Abs máx (nm)	T_R (min)	AI24/ ANT	AI0/ ANT	AI1/ ANT	AX3/ ANT	AC3/ ANT	AH3/ ANT	AI3/ ANT
uv-104	271,2-329,4	57,7		↑	↑				↑
	201,8-291,3	61,4			↑				
uv-105	205,3-268,8-324,6	80,7			↑				↑

El tratamiento de infección más curado a 1 dpt provocó un aumento del área/concentración de la mayor parte de los compuestos fluorescentes detectados en el albedo (Anexo 1.2, Tabla- IV). Algo similar se observó en el flavedo, en el que más del 75 % de los compuestos observados mediante el detector de fluorescencia (Anexo 1.2, Tabla- II) aumentaron su concentración como consecuencia del tratamiento inductor. De los 20 compuestos detectados en el albedo, 9 aumentaron a 1 dpt y 8 no se detectaron en los frutos no tratados. Entre estos últimos se encontró la escoparona (F-17), cuya concentración máxima se observó a los 3 dpt, y dos compuestos que mostraron el mayor valor de área de integración (F-16 y F-22) de todos los picos observados mediante el detector de fluorescencia también a los 3 dpt. Estos tres compuestos también se observaron en el flavedo de frutos infectados y curados. Aunque la mayor parte de los compuestos fluorescentes también se detectaron en el albedo de los frutos heridos y curados, el incremento fue menor que en los frutos sometidos al tratamiento de inducción de resistencia. Algunos compuestos cuya concentración aumentó a 1 dpt no fueron detectados a los 3 dpt ($T_R \approx 31,1-41,2$ y $66,5$ min). Así, 7 compuestos redujeron el nivel de fluorescencia hasta pasar en algunos casos a ser inapreciables a los 3 dpt.

El desarrollo de *P. digitatum* en el flavedo de los frutos cítricos durante 24 h (FI24) modificó significativamente la concentración de diversos compuestos fenólicos observados por los detectores de UV-vis y de fluorescencia. En cuanto a los compuestos con espectro similar a los derivados de los ácidos benzoicos, solamente la concentración de 2 compuestos de los mostrados en la Tabla- I del Anexo 1.2 disminuyó significativamente respecto

a la observada en los frutos no tratados. Entre los compuestos derivados del ácido cinámico, 3 de ellos no se detectaron a las 24 hpi, coincidiendo uno de ellos en espectro y T_R con el ácido cafeico (uv-29). Solamente la concentración de dos compuestos de esta familia aumentó significativamente ($T_R \approx 42,1$ y $54,1$ min). En general, las flavonas polimetoxiladas no se vieron afectadas por el desarrollo del patógeno durante 24 h, mientras que la concentración de diversas flavonas y flavanonas como la eriocitrina, narirutina e isorroifolina disminuyó hasta ser prácticamente indetectable en algunos casos. Aproximadamente la concentración de 13 compuestos observados en el flavedo mediante el detector de fluorescencia disminuyó a las 24 hpi, 8 de los cuales no se detectaron en los frutos infectados. Solamente 9 compuestos fluorescentes aumentaron con el desarrollo del patógeno, destacando los picos F-4 y F-16 con $T_R \approx 30,5$ y $57,7$ min, cuya área aumentó más de 3,5 veces respecto a los frutos no tratados.

Los cambios en la concentración de los compuestos fenólicos del albedo como consecuencia del desarrollo de *P. digitatum* durante 24 h (AI24) fueron diferentes a los observados en el flavedo. En el albedo, la concentración de 18 de los compuestos fenólicos mostrados en la Tabla- III del Anexo 1.2 aumentó como consecuencia del avance del patógeno, mientras que en el tejido externo prevaleció el número de compuestos cuya concentración disminuía en respuesta a la infección. Dentro de los compuestos similares a los derivados de los ácidos benzoicos, 7 aumentaron a las 24 hpi. Este incremento fue, en general, inferior al detectado en los frutos infectados y curados. De los compuestos con espectro similar al de los ácidos cinámicos, 3 de ellos, entre los que se encontraba el ácido clorogénico, aumentaron más de 2 veces respecto a los frutos no tratados. Esta inducción fue mayor a la observada en los frutos infectados y curados. Entre los compuestos cuya concentración aumentó más de dos veces respecto a los frutos no tratados se encontraron la mayor parte de las flavonas polimetoxiladas y algunas flavonas, siendo este incremento similar al observado en los frutos sometidos al tratamiento inductor. En cuanto a los compuestos fluorescentes mostrados en la Tabla- II del Anexo 1.2 que modificaron la concentración como consecuencia del desarrollo de *P. digitatum*, no se observaron variaciones significativas en la concentración de los mismos.

El desarrollo de *P. digitatum* durante 24 h en el flavedo y el posterior almacenamiento a 37°C (FI0) dio lugar a pocas modificaciones en los compuestos mostrados en Tabla- I del Anexo 1.2. Se detectaron dos

compuestos con espectros similares a los ácidos benzoicos que no se habían observado en el flavedo de los frutos no tratados, así como un incremento de más de 4 veces en el compuesto con un $T_R \approx 28,4$ min. Sin embargo, las mayores concentraciones de este tipo de compuestos se observaron a los 3 dpt. Los derivados de los ácidos cinámicos fueron los que mostraron mayores modificaciones como consecuencia de la infección y el posterior curado a los 0 dpt. Seis de estos compuestos redujeron la concentración que, generalmente, continuó descendiendo a los 1 y 3 dpt. Cabe destacar la detección de 2 cumarinas y 3 compuestos con máximos a 232 nm o 270 nm, que no se observaron en los frutos no tratados ni en los infectados por *P. digitatum* durante 24 h. Uno de estos compuestos pudo ser identificado como la escoparona (uv-72), mientras que los otros parecen ser derivados de alcaloides. Aunque estos compuestos se detectaron a 0 dpt, las máximas concentraciones se observaron en los frutos infectados y curados a los 1 ó 3 dpt. En general, las flavonas y flavanonas no mostraron cambios relevantes como consecuencia de la infección y posterior almacenamiento a 37 °C. El área/concentración de la mayor parte de los compuestos fluorescentes del flavedo mostrados en la Tabla- II aumentó a los 0 dpt como consecuencia de la infección y el posterior almacenamiento a 37 °C. Aproximadamente 9 de estos compuestos no habían sido detectados en los frutos no tratados. En todos los casos las mayores concentraciones no se observaron en el flavedo de estos frutos, sino que generalmente se detectaron en los frutos infectados y curados a los 1 ó 3 dpt, o en los frutos heridos y curados.

De los compuestos similares a los ácidos benzoicos detectados en el albedo, solamente 5 aumentaron más de 1,5 veces a los 0 dpt debido a la infección y el curado de los frutos (Tabla- III). Sin embargo, estos incrementos fueron en general similares a los detectados en los frutos infectados por *P. digitatum* durante 24 h. Aproximadamente 3 compuestos derivados del ácido cinámico aumentaron a los 0 dpt, aunque los máximos niveles tuvieron lugar a las 24 hpi, hecho similar al observado en los compuestos derivados de los ácidos benzoicos. Al igual que ocurrió en el flavedo, a los 0 dpt se observaron pequeñas concentraciones de escoparona, aunque en el albedo el máximo se alcanzó a los 3 dpt, y también dos compuestos con máximos de absorbancia similar al que presentan los alcaloides. En contraposición a lo que se observó en el flavedo, la concentración de las flavonas polimetoxiladas aumentó en el albedo de frutos infectados y curados a 0 dpt. Sin embargo, las mayores concentraciones se observaron ya en los frutos infectados por *P. digitatum* durante 24 h. Entre las flavanonas detectadas, solamente la concentración de la

hesperidina se redujo significativamente frente a los frutos infectados por *P. digitatum*. Gran parte de los compuestos fluorescentes mostrados en la Tabla-IV aumentaron a los 0 dpt, aunque las mayores concentraciones se observaron a 1 ó 3 dpt. Alrededor de 7 compuestos no habían sido previamente detectados en el albedo de los frutos no tratados.

6.2. Cambios asociados a la infección de *P. digitatum* en naranjas ‘Navelina’

Después de analizar los cambios en compuestos fenólicos presentes en naranjas ‘Navelate’ sometidas al tratamiento de inducción de resistencia, se llevó a cabo este estudio en naranjas ‘Navelina’ infectadas con *P. digitatum* con el fin de conocer los cambios que tienen lugar en la piel de los frutos cítricos durante el desarrollo del patógeno.

En el flavedo no tratado de naranjas ‘Navelina’ se detectaron más de 100 compuestos por UV-visible que mostraron un valor de absorbancia mayor al doble del ruido de fondo (5 mAU). El perfil cromatográfico observado en estos frutos fue similar al obtenido en las naranjas ‘Navelate’ sometidas al tratamiento de inducción de resistencia (Ver apartado 6.1), aunque en las naranjas ‘Navelina’ se observó que una proporción elevada de los compuestos fenólicos se encontraban en mayor concentración que en las ‘Navelate’. Así, por ejemplo, se observó que generalmente las concentraciones de los compuestos identificados mediante patrones se duplicaron (Tabla 47). Las diferencias más importantes se encontraron en la isorroifolina y las flavonas polimetoxiladas, cuyas concentraciones fueron al menos 4 veces superiores respecto a las de las naranjas ‘Navelate’. Entre estas últimas destacan la isosinensetina y la sinensetina que fueron al menos 6 veces mayores que en las naranjas ‘Navelate’. En cambio, el número y concentración de los compuestos fluorescentes detectados en el flavedo no tratado de naranjas ‘Navelina’ fue similar al observado en las ‘Navelate’.

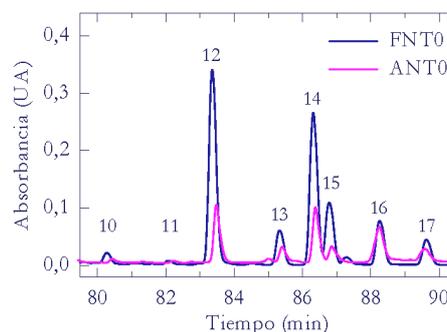
Tabla 47. Compuestos detectados en el flavedo y el albedo de naranjas 'Navelina' no tratadas cuyo tiempo de retención (TR) y espectro coincide con patrones conocidos. Se muestra en TR, la nomenclatura asignada y la concentración ($\mu\text{g g}^{-1}$ PF) de los mismos. En aquellos casos marcados con asterisco (*) se indica el área (mAU s).

Compuesto	T_R (min)	Nomenclatura	Área (mAU s) o Concentración ($\mu\text{g g}^{-1}$ PF)	
			FLAVEDO	ALBEDO
Ácido clorogénico	37,5	uv-15	83,6	31,2
Ácido cafeico	44,3	uv-29	165,6	
Eriocitrina	50,7	uv-53		40,7
Narirutina	53,5	uv-63	125,1	921,1
Isorroifolina	55,7	uv-64	587,6	
Diosmina	56,4	uv-65	142,5	
Hesperidina	58,5	uv-69	3.856,6	3.201,1
Didimina	70,0	uv-77	108,0	481,3
Isosinensetina	79,4	uv-93	26,2	3,8
Hexametil-O-gosipetina	81,2	uv-94	3,7	0,7
Sinensetina	82,5	uv-95	659,1	102,3
Hexametil-O-quercetagetina*	84,5	uv-96	1.370,8	305,5
Nobiletina	85,5	uv-97	136,8	22,6
Tetrametil-O-escutelareina	86,0	uv-98	474,5	92,4
Heptametoxiflavona	87,5	uv-99	178,9	54,5
Tangeretina*	88,7	uv-100	2.073,1	369,6

El número de compuestos detectados en el albedo de naranjas 'Navelina' no tratadas fue ligeramente superior al de las 'Navelate'. Al igual que en el flavedo, en el tejido interno se observó un perfil cromatográfico similar en ambas variedades y, en general, se observaron también mayores concentraciones de fenoles en 'Navelina'. Cabe destacar la mayor concentración de las flavonas polimetoxiladas, que llegaron a ser hasta 26 veces superiores en las naranjas 'Navelina'. Las mayores diferencias se encontraron en la concentración de sinensetina, nobiletina, hexametil-O-quercetagetina y tetrametil-O-escutelareina, que presentaban concentraciones al menos 7 veces superiores en 'Navelina'. Por otra parte en ambas variedades se comprobó que, en general, la concentración de las flavonas polimetoxiladas en el albedo de los frutos no tratados fue menor a la del flavedo (Figura 35). La concentración de compuestos mayoritarios como la hesperidina, narirutina y didimina fue también mayor en el albedo de naranjas 'Navelina', mientras que la narirutina

y didimina fueron menores en estos frutos respecto a las naranjas ‘Navelate’. Al igual que se observó en el flavedo, el número de compuestos fluorescentes detectados fue similar en ambas variedades.

Figura 35. Cromatograma MaxPlot de las flavonas polimetoxiladas presentes en el flavedo (FNT0) (—) y el albedo (ANT0) (—) de naranjas ‘Navelina’ no tratadas observadas con el detector de UV-visible. Los números incluidos corresponden a los siguientes compuestos fenólicos: 10) Isosinensetina, 11) Hexametil-O-gosipetina, 12) Sinensetina, 13) Hexametil-O-quercetagetina, 14) Nobiletina, 15) Tetrametil-O-escutelaraina, 16) Heptametoxiflavona y 17) Tangeretina.



En el anexo 1.3 ‘Compuestos fenólicos en el flavedo y el albedo de naranjas ‘Navelina’ infectadas con *P. digitatum*’ presentan los compuestos detectados mediante espectrofotometría de UV-vis y fluorescencia cuya área (mUA s) o concentración ($\mu\text{g g}^{-1}$ PF) aumentó o disminuyó más de 1,5 veces como consecuencia del avance de *P. digitatum* en la corteza de los frutos respecto a los no tratados, así como su incremento o disminución relativas. Asimismo se indica la desviación estándar de la media de, al menos, dos extracciones independientes, realizándose una inyección por cada extracción. Se asignó un valor arbitrario a los compuestos que se observaron mediante el detector de UV-vis (uv-X) o por fluorescencia (F-X) en dos o más de los tejidos analizados (flavedo o albedo de naranjas ‘Navelina’ o ‘Navelate’). En estas tablas se presentan también aquellos compuestos cuyo T_R y espectro coincidía con patrones conocidos, sufrieran o no modificaciones en la concentración.

En respuesta a la infección por *P. digitatum* se observó que en el flavedo se producía un incremento de los compuestos fenólicos derivados del ácido benzoico a las 72 hpi (Tabla 48). Del total de 23 compuestos de este tipo incluidos en la Tabla- V del Anexo 1.3, la concentración de 15 aumentaba en los frutos a las 72 hpi, comprobándose que dichos aumentos, excepto en un caso ($T_R \approx 67,5$ min), fueron mayores en los frutos infectados con respecto a los heridos. A pesar de que a las 72 hpi es cuando se observaron, en general, los mayores aumentos, cabe señalar que al menos 6 derivados del ácido benzoico aumentaron con respecto a los frutos heridos incluso a las 24 hpi.

Dentro de este tipo de compuestos se observó que a las 72 hpi en el flavedo de los frutos infectados disminuía la concentración de 7 picos. Sin embargo, es importante señalar que solo en 3 casos dichas disminuciones fueron inferiores a las observadas en los frutos heridos (uv-1, uv-24 y $T_R \approx 35,3$ min).

Tabla 48. Compuestos derivados de ácido benzoico que modifican el área en más de 1,5 veces o menos de 0,67 en el flavedo de naranjas infectadas por *P. digitatum* durante 24-48h.

Nomenclatura	Abs máx (nm)	T_R (min)	FNT24	FNT48	FNT72	FH24/	FH48/	FH72/	FI24/	FI48/	FI72/
			/FNT0	/FNT0	/FNT0	FNT0	FNT0	FNT0	FNT0	FNT0	FNT0
	215,8-279,5-318,7	27,6			↑			↑	↑	↑	↑
	229,9-274,8-367,3	29,4	↓	0,9	1,1	1,5	1,0	2,2	3,9	2,3	3,9
	228,7-272,4-346,1-372,1	33,6	9,1	4,2	5,4	3,6	3,2	4,0	3,5	9,0	5,2
uv-10	213,5-258,2-363,0	34,2	2,0	1,2	1,6	1,8	1,5	1,6	1,8	1,5	2,3
	224,0-266,5-373,3	35,3	0,5	0,2	1,2	0,2	0,2	0,7	1,0	0,03	↓
	233,5-318,7-342,5-370,9	40,9			↑			↑		↑	↑
	233,5-283,0-334,2	41,0	1,2	0,8	1,0	0,9	1,0	0,7	0,6	1,2	1,5
uv-24	241,7-328,2	41,7	1,2	2,9	1,3	1,5	2,3	1,6	0,6	0,5	↓
	225,2-285,4-331,8	60,2	0,6	↓	0,4	0,7	0,6	0,5	↓	0,7	0,3
	222,3-271,2-333,0	61,2	0,7	↓	0,6	0,9	0,4	0,1	↓	0,6	0,8
	224,0-374,8-391,4	64,2						↑	↑	↑	↑
	232,3-280,7-369,7	65,7						↑	↑	↑	↑
	228,7-306,8-369,7	75,4	0,3	0,3	0,6	0,2	0,4	0,2	1,5	0,5	1,5
	229,9-280,7-340,1	75,8						↑	↑	↑	↑
	228,7-277,1-315,1	80,7						↑	↑	↑	↑
	273,6-327,0	81,9									↑
	225,2-274,8-325,8	82,5									↑
	279,5-374,5	84,7		↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑

En cuanto al comportamiento de los ácidos cinámicos en el flavedo (Tabla 49) se observó que el número de picos que aumentaron (7) o disminuyeron (5) en respuesta a la infección en comparación con los cambios observados en los frutos heridos fueron similares. Dentro de este grupo pudo identificarse el ácido clorogénico (uv-15) cuya concentración a las 72 hpi aumentó 2,4 veces respecto a los frutos heridos almacenados a 20 °C durante 72 h, mientras que no aumentó en los frutos heridos ni en los no tratados almacenados durante diversos días. Al menos 5 compuestos redujeron la concentración a las 48 hpi respecto a los frutos heridos y a los no tratados. Aproximadamente 4 compuestos de esta familia no se habían observado en los frutos no tratados, mientras que fueron detectados en los frutos infectados por *P. digitatum* a las 48 hpi.

Tabla 49. Compuestos derivados de ácido cinámico que modifican el área/concentración en más de 1,5 veces o menos de 0,67 en el flavedo de naranjas infectadas por *P. digitatum* durante 24-48 h.

Nomenclatura	Abs máx (nm)	T _R (min)	FNT24	FNT48	FNT72	FH24/	FH48/	FH72/	FI24/	FI48/	FI72/
			/FNT0	/FNT0	/FNT0	FNT0	FNT0	FNT0	FNT0	FNT0	FNT0
	225,2-310,4	31,4	0,3	0,4	0,6	0,6	1,0	0,4	0,4	0,3	1,4
	219,3-316,3	32,9	0,7	0,9	0,5	0,8	1,0	0,4	0,8	0,3	0,2
uv-22	218,2-235,8-327,0	39,6	0,7	0,8	0,7	0,6	0,7	0,5	0,5	0,7	0,6
uv-25	227,6-312,7	40,2	1,9	1,5	1,4	2,0	1,2	1,6	1,8	1,5	0,5
	218,2-241,7-330,6	40,3			↑	↑	↓	↑	↑	↑	↑
uv-29	Ác. cafeico	44,3	0,9	0,9	0,2	0,4	0,7	0,3	0,1	0,4	0,3
uv-31	286,6-318,7-393,8	44,6	0,8	0,9	1,0	0,6	0,8	1,0	1,0	0,5	1,1
uv-66	244,1-325,8	57,7	1,7	1,8	0,1	↓	↓	0,5	2,2	1,5	2,4
	215,5-238,2-328,2	59,8	0,6	↓	0,7	↓	↓	0,8	↓	0,1	1,0
	285,4-324,6-389,0	63,0						↑	↑	↑	↑
	238,2-330,6-393,8	63,5						↑	↑	↑	↑
	201,8-218,2-240,-329,4	63,9	↓	↓	↓	↓	0,7		1,3	0,5	0,5
	220,5-327,0	64,9	0,6	0,5	1,0	↓	0,6	0,3	0,7	0,4	↓
	217,0-241,7-325,8	66,6	0,9	0,6	0,2	0,8	0,8	0,3	0,8	↓	0,3
	274,8-324,6	66,8							↑	↑	↑
	283,0-329,4	73,9	0,9	↓	0,5	0,6	1,1	0,5	0,4	0,6	0,2

De las dos cumarinas observadas mediante el detector de UV-vis cabe destacar el incremento en el pico correspondiente a la escoparona (uv-72), cuya concentración fue aproximadamente 7 veces superior respecto a los frutos heridos e incluso 12 veces superior a los no tratados almacenados a 20 °C durante 72 h. Este resultado se confirmó utilizando el detector de fluorescencia (F-17) (Tabla- VI). Por otra parte, la disminución observada en la cumarina con T_R ≈ 48,8 min en los frutos infectados fue similar a la que tuvo lugar en los frutos heridos o en los no tratados para un mismo tiempo de almacenamiento.

Tabla 50. Cumarinas que modifican el área/concentración en más de 1,5 veces o menos de 0,67 veces en el flavedo de naranjas infectadas por *P. digitatum* durante 24-48 h.

Nomenclatura	Abs máx (nm)	T _R (min)	FNT24	FNT48	FNT72	FH24/	FH48/	FH72/	FI24/	FI48/	FI72/
			/FNT0	/FNT0	/FNT0	FNT0	FNT0	FNT0	FNT0	FNT0	FNT0
	275,9-352,1	48,8	0,7	0,3	0,6	0,8	0,5	0,5	0,5	0,6	0,6
uv-72	Escoparona	60,7			↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑

Dentro del grupo de las flavonas y flavanonas se observó también una modificación en las concentraciones como consecuencia del avance del patógeno. De las 26 flavonas mostradas en la Tabla 51, 10 redujeron su concentración a las 72 hpi, mostrando, en general, una disminución mayor a la observada a los 3 d en los frutos heridos. La concentración de las flavonas polimetoxiladas no sufrió cambios importantes como consecuencia del avance

de *P. digitatum*, mientras que se observó una ligera disminución a las 72 h en los frutos heridos y en los no tratados. En cuanto a las flavanonas, mediante el detector de UV-vis se observó un aumento en la concentración de 3 de ellas a las 72 hpi (uv-71, uv-77 y $T_R \approx 42,9$ min), incremento que no se observó en los frutos heridos ni en los no tratados para el mismo tiempo de almacenamiento. Cabe destacar el pico de $T_R \approx 42,9$ min que no se detectó en los frutos no tratados y sólo se detectó a las 72 h, mientras que las mayores concentraciones se observaron en los frutos infectados por el patógeno incluso a las 24 hpi. La hesperidina (uv-69) y narirutina (uv-63) no mostraron cambios importantes en respuesta a la infección, mientras que la concentración de didimina (uv-77) aumentó ligeramente a las 72 hpi respecto a los frutos heridos.

Tabla 51. Flavonas y flavanonas que modifican el área/concentración en más de 1,5 veces o menos de 0,67 veces en el flavedo de naranjas infectadas por *P. digitatum* durante 24-48 h.

Nomenclatura	Abs máx (nm)	T_R (min)	FNT24/ FNT0	FNT48/ FNT0	FNT72/ FNT0	FH24/ FNT0	FH48/ FNT0	FH72/ FNT0	FI24/ FNT0	FI48/ FNT0	FI72/ FNT0
	285,4	42,9	↑		↑			↑	↑	↑	↑
uv-30	204,1-270,0-349,7	44,1	0,7	0,3	0,5	0,4	0,8	0,4	0,3	0,3	0,4
uv-32	202,9-257,0-355,7	45,1	1,7	1,3	2,5	↓	2,0	0,9	5,8	3,3	1,7
	202,9-258,2-297,3-353,3	45,9	2,3		2,1	1,9	1,8	0,7	2,0	1,2	1,3
	211,1-268,8-350,9	46,7	0,8	0,5	1,2	0,9	0,9	0,9	↓	↓	↓
uv-33	204,1-255,8-352,1	47,2	1,7	0,9	1,0	2,0	4,3	2,6	3,4	1,3	0,4
uv-43	213,5-270,0-337,7	50,0	0,9	0,6	0,2	0,8	1,0	0,6	0,7	0,2	0,03
uv-44	268,8-337,7	50,6	0,7	0,3	0,3	0,6	0,6	0,7	0,6	0,8	0,7
	201,8-350,9	50,7	1,2	0,6	1,0	↓	↓		↓	0,8	0,9
uv-45	204,1-266,5-349,7	51,5	0,8	0,2	0,2	0,5	0,8	0,5	0,6	0,5	1,1
uv-47	204,1-254,7-348,5	52,8	1,0	0,8	2,3	2,3	1,7	0,1	0,4	1,7	2,0
	205,3-270,0-350,9	54,0	↓	↓	0,2	0,8	0,3	0,1	↓	0,6	0,9
	201,8-259,4-334,2-370,3	54,3	0,8	↓	1,1	0,7	↓	0,8	1,4	0,5	0,6
uv-64	Isorroifolina	55,7	0,8	0,6	0,6	0,6	0,8	0,9	0,6	0,6	0,1
uv-65	Diosmina	56,4	0,8	0,3	1,0	1,1	1,0	0,5	0,2	0,4	0,5
uv-67	202,9-267,7-348,5	57,6	1,2	0,4	1,1	0,2	0,5	0,7	0,2	1,0	0,7
uv-71	211,1-280,7-395,0	62,0	↓	↓	1,8	0,9	5,0	0,8	↓	3,0	3,2
	201,8-283,0-346,1	63,3	1,1	↓	2,1	1,6	1,0	1,9	↓	2,1	↓
uv-77	Didimina	70,0	1,2	1,0	1,4	1,6	1,4	1,4	1,5	1,3	1,7
	201,8-253,5-335,4	72,2	3,4	1,6	1,6	3,0	4,7	1,1	↓	2,9	1,5
	273,6-331,8	74,4			↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
	280,7-334,2	75,9	↑		↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
uv-45	204,1-266,5-349,7	51,5	0,8	0,2	0,2	0,5	0,8	0,5	0,6	0,5	1,1
uv-47	204,1-254,7-348,5	52,8	1,0	0,8	2,3	2,3	1,7	0,1	0,4	1,7	2,0

Mediante el detector de UV-vis se observó un compuesto a los 59,4 min (uv-104) con un máximo de absorbancia de aproximadamente 270 nm cuya concentración aumentó en los frutos infectados y que previamente no se había detectado en los no tratados. Sin embargo, las mayores concentraciones de este compuesto se observaron a los 3 d en los frutos heridos. El compuesto uv-105 aumentó la concentración en respuesta al

tratamiento de inducción de resistencia, mientras que la redujo en los frutos infectados por *P. digitatum*.

En cuanto a los compuestos fluorescentes, se observó una modificación en la concentración de 39 picos, de los cuales casi la mitad no se detectó en el flavedo de frutos no tratados (Tabla- VI). Treinta de estos compuestos aumentaron a las 72 hpi y, aunque en algunos casos también incrementaron en los frutos heridos o en los no tratados, la inducción fue mayor en los frutos infectados. Destacan dos picos ($T_R \approx 35,2$ y $85,6$ min) cuya concentración a las 72 hpi fue más de 26 veces superior respecto a los frutos control. Entre los compuestos fluorescentes se encontró la escoparona (F-17), cuya concentración aumentó a medida que progresaba el avance de *P. digitatum*, alcanzando el valor máximo a las 72 hpi. Aunque la escoparona también se detectó en los frutos heridos, esta concentración fue inferior a la observada en los frutos infectados. Solamente 8 compuestos redujeron la concentración a las 72 hpi, reducción que, en algunos casos, ya se detectó a las 72 h en los frutos heridos.

En la Tabla- VII del Anexo 1.3 se muestran los compuestos fenólicos con espectro similar a los ácidos benzoicos analizados en el albedo cuya concentración varió como consecuencia de la infección por *P. digitatum*. Se observó una disminución en 11 picos, aunque en solo 2 de ellos esta disminución fue específica en frutos infectados (Tabla 52). Aunque en otros picos también se observó una disminución en la concentración en respuesta a la infección por el patógeno, esta reducción ya se había observado en los frutos heridos o en los no tratados. Entre los 7 compuestos que se indujeron a los 3 d del inicio del desarrollo de la infección, cabe destacar el que presentó un $T_R \approx 67,2$ min, ya que solo se detectó en frutos infectados.

Tabla 52. Compuestos derivados del ácido benzoicos que modifican el área en más de 1,5 veces o menos de 0,67 en el albedo de naranjas infectadas por *P. digitatum* durante 24-48 h.

Nomenclatura	Abs máx (nm)	T _R (min)	ANT24	ANT48	ANT72	AH24/	AH48/	AH72/	AI24/	AI48/	AI72/
			/ANT0	/ANT0	/ANT0	ANT0	ANT0	ANT0	ANT0	ANT0	ANT0
	201,8-272,4-352,1-372,1	27,6	1,3	2,2	2,3	2,0	1,8	1,7	1,9	2,2	1,9
uv-4	232,3	30,3	1,1	1,3		1,0	0,9	↓	↓	↓	↓
uv-5	202,9-257,0-386,5	31,0	1,1	1,3	1,3	2,4	0,8	1,0	2,5	4,7	↓
uv-24	241,7-328,2	41,6	1,7	2,3	1,5	2,4	↓	1,1	1,1	1,6	0,5
	228,7-331,8-363,0-391,4	46,9				↑	↑	↑	↑	↑	↑
uv-55	225,2-271,2-354,5	52,3		↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
	208,8-259,4-354,5	54,6	0,9		0,1	0,1	↓	↓	↓	↓	↓
uv-71	210,0 317,5 374,5	67,1	0,9	0,7	0,6	0,6	0,9	0,5	0,5	1,3	1,2
	232,3-349,7-386,5	67,2							↑	↑	↑
uv-78	231,1	71,9	1,2	1,6	0,6	0,5	0,4	0,4	0,2	0,5	0,2
	273,6-311,5	73,7	1,3	0,3	0,7	1,4	0,6	0,9	↓	↓	0,5
	232,3-273,6-354,5	74,9	1,0	0,5	0,2	0,1	↓	0,2	0,2	0,3	0,3
uv-90	232,3	76,5	1,2	3,3	3,0	3,9	3,1	2,2	1,8	2,8	2,9
uv-92	231,1-270,0-312,7	78,6	0,9	2,3	1,8	2,2	2,2	1,8	2,1	3,1	4,2
	225,2-305,6-322,3	84,1	1,1	1,8	1,6	1,0	2,7	↓	↓	1,9	3,8
uv-101	238,2-305,6-329,4	90,3	1,1	1,6	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
uv-102	238,2	91,4	1,0	1,1	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓

Entre los 12 compuestos derivados de los ácidos cinámicos mostrados en la Tabla- VII, destacó la inducción de 3 de ellos a las 72 hpi respecto a los frutos heridos y a los no tratados almacenados durante 3 d a 20 °C. Entre ellos, al igual que se observó en el flavedo, se encontró el ácido clorogénico, que se indujo más de 2 veces respecto a los controles (Tabla 53). Aunque la concentración de 4 compuestos disminuyó como consecuencia del desarrollo de *P. digitatum*, también se observó una disminución de 3 de ellos en los frutos heridos y en los no tratados.

Tabla 53. Compuestos derivados del ácido cinámico que modifican el área/concentración en más de 1,5 veces o menos de 0,67 en el albedo de naranjas infectadas por *P. digitatum* durante 24-48 h.

Nomenclatura	Abs máx (nm)	T _R (min)	ANT24	ANT48	ANT72	AH24/	AH48/	AH72/	AI24/	AI48/	AI72/
			/ANT0	/ANT0	/ANT0	ANT0	ANT0	ANT0	ANT0	ANT0	ANT0
	232,3-316,3-391,4	29,9		↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
uv-3	218,2-233,5-316,3	31,6	1,1	↓	↓	↓	↓	↓	0,1	0,2	0,2
uv-2	228,7-311,5	33,6	↓	↓	0,6	1,7	1,3	0,4	0,1	0,7	1,9
	226,4-325,8	37,0	1,0	0,4	0,3	0,4	0,4	0,2	0,3	0,3	0,6
uv-15	Ác. clorogénico	40,6	1,1	1,5	1,2	1,1	1,7	1,1	1,7	1,6	2,3
	218,2-328,2	42,3	0,7	0,3	0,6	0,1	↓	↓	↓	↓	↓
	231,1-285,4-322,3	52,7								↑	↑
uv-76	287,8-329,4	69,5	1,1	1,3	1,7	↓	↓	0,6	↓	↓	0,7
uv-79	201,8-284,2-327,0	72,8	1,1	↓	↓	2,3	3,8	1,9	3,6	2,2	2,2
uv-91	242,9-330,6	77,6	1,0	1,1	0,9	1,6	1,1	0,8	3,9	1,2	↓

Al igual que ocurrió en el flavedo, se encontraron niveles de escoparona muy bajos en los frutos heridos y en los no tratados, ambos almacenados durante 72 h a 20 °C. Sin embargo, a medida que avanzaba la infección, aumentó la concentración de este compuesto hasta alcanzar un máximo a las 72 hpi. La escoparona también se observó mediante el detector de fluorescencia (F-17) (Tabla- VIII).

Como se muestra en la Tabla 54, la concentración de diversas flavonas y flavanonas del albedo también se modificó en respuesta al avance del patógeno. En general, la concentración de las flavonas polimetoxiladas disminuyó en los frutos infectados a las 72 hpi. Sin embargo, esta reducción ya se observó en los frutos heridos a las 48-72 h de realizar una herida al fruto. Solamente se observó un aumento de la concentración de más de 3 veces de la isosinensetina y de la hexametil-O-gosipetina a las 72 hpi respecto a los frutos no tratados, incremento que no fue detectado en los frutos heridos ni en los no tratados almacenados a 20 °C durante 72 h. En lo que respecta a las flavanonas, no se observaron cambios significativos en los compuestos mayoritarios hesperidina, narirutina y didimina. Sin embargo, se detectó una reducción de la flavanona con $T_R \approx 63,9$ min en los frutos heridos y fue prácticamente indetectable en los infectados por *P. digitatum*.

Tabla 54. Flavonas y flavanonas que modifican el área/concentración en más de 1,5 veces o menos de 0,67 en el albedo de naranjas infectadas por *P. digitatum* durante 24-48 h.

Nomenclatura	Abs máx (nm)	T_R (min)	ANT24	ANT48	ANT72	AH24/	AH48/	AH72/	AI24/	AI48/	AI72/
			/ANT0	/ANT0	/ANT0	ANT0	ANT0	ANT0	ANT0	ANT0	ANT0
uv-28	214,6-271,2-338,9	42,6	0,9	1,4	1,5	0,7	1,3	1,2	1,6	1,5	2,5
	272,4-337,7	43,8	1,0	0,5	0,8	1,0	1,0	0,6	↓	↓	↓
uv-53	Eriocitrina	50,7	0,6	1,2	1,1	3,0	0,9	0,7	1,1	0,7	1,0
uv-58	281,9	53,1	1,2	1,1	0,5	1,2	0,7	0,6	1,0	0,6	0,4
uv-59	283,0	53,5	1,1	0,2	0,6	0,2	1,0	1,2	↓	1,0	0,9
	291,3-337,7-370,9	63,9	0,9	1,5	0,5	0,5	0,6	0,5	↓	0,4	↓
uv-77	Didimina	70,0	0,9	1,0	1,0	1,0	0,9	1,0	1,0	1,0	1,1
uv-94	Hexametil-O-gosipetina	81,5	1,0	0,9	1,0	1,3	1,0	0,7	1,3	2,0	5,0
uv-97	Nobiletina	85,5	1,0	0,7	0,9	0,7	0,7	0,5	0,8	0,6	0,6
uv-99	Heptametoxiflavona	87,5	1,1	0,7	0,8	0,5	0,6	0,5	0,6	0,5	0,5
uv-100	Tangeretina	88,8	1,0	0,9	0,8	0,5	0,6	0,7	0,5	1,3	0,7

De los 31 compuestos fluorescentes mostrados en la Tabla- VIII del Anexo 1.3, al menos la concentración de 18 aumentó a las 72 hpi en respuesta al avance de *P. digitatum* por el albedo. A pesar de que a las 72 hpi fue cuando se observaron los mayores incrementos, cabe señalar que en 13 de ellos este aumento ya se había observado a las 24-48 hpi. Entre los compuestos que redujeron la concentración a las 72 hpi, solamente 3 la disminuyeron en

respuesta a la infección en mayor medida que en los frutos no tratados o en los heridos para un mismo tiempo de almacenamiento (F-4, F-22 y $T_R \approx 42,4$ min). Cabe destacar que 4 compuestos fluorescentes que no se detectaron en los frutos no tratados a ningún tiempo de almacenamiento, se indujeron a las 72 hpi.

7. OBSERVACIÓN DE COMPUESTOS FLUORESCENTES POR MICROSCOPIA ÓPTICA

Una vez comprobada la existencia de compuestos fluorescentes en el flavedo y el albedo de los frutos cítricos mediante HPLC, nos propusimos observarlos mediante el empleo de un microscopio estereoscópico binocular equipado con sistema de fluorescencia. Para ello se emplearon naranjas de la variedad 'Navelina' inoculadas con el aislado PHI-26 M1 de *P. digitatum* y curadas y almacenadas 3 d a 20 °C.

Al realizar un corte transversal en la corteza de las naranjas se observó que la incisión de una herida con un clavo de 3 mm alcanzó parcialmente el albedo del fruto (Figura 36 H). Sin embargo, si en esta misma herida se inoculaba el hongo *P. digitatum*, la zona herida fue más pronunciada y se pudo apreciar un halo rojizo alrededor del punto de inoculación (Figura 36 I).

Al observar estos cortes transversales de la corteza de los frutos cítricos mediante un microscopio de fluorescencia, no se observaron compuestos fluorescentes en la corteza de los frutos no tratados (X), al igual que ocurría en la corteza de los frutos curados (C). Sin embargo, al realizar un corte transversal que atravesara la herida practicada en el fruto, se observó un halo de fluorescencia alrededor del punto de incisión en la corteza de las naranjas heridas y curadas (H). Este halo de fluorescencia era todavía mayor en los frutos inoculados con *P. digitatum* previamente a la inactivación térmica del mismo (I). Este halo de fluorescencia coincidía con el halo rojizo que se observaba con el microscopio pero sin utilizar el filtro de fluorescencia.

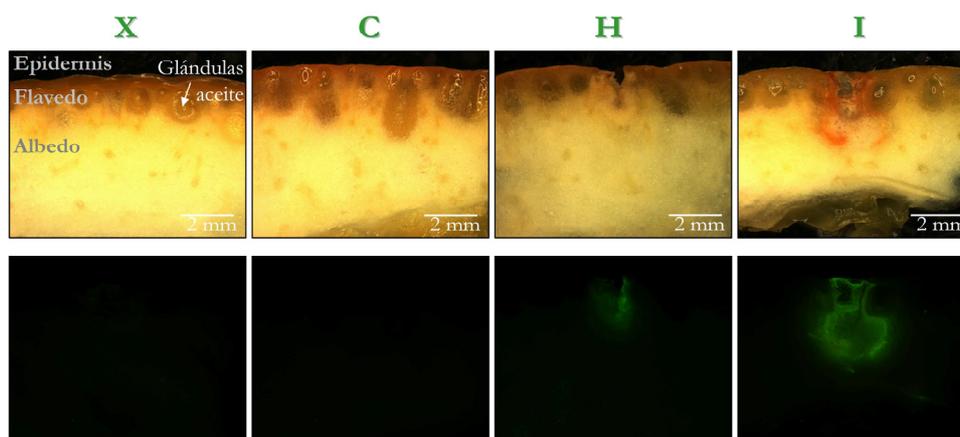


Figura 36. Fotografías de cortes transversales de la corteza de frutos de naranja de la variedad 'Navelina' realizadas con un microscopio estereoscópico binocular equipado con un sistema de fluorescencia. Nomenclatura: X) frutos no tratados, C) frutos curados (3 d a 37 °C), H) frutos heridos y curados, I) frutos infectados con el aislado PHI-26 M1 de *P. digitatum* y curados. Los cortes transversales a la corteza de los frutos se realizaron con un escalpelo 3 días después del tratamiento térmico.

8. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE COMPUESTOS FENÓLICOS

8.1. Ensayos *in vitro*

Los resultados obtenidos a partir del estudio por cromatografía apuntaban hacia una implicación de los compuestos fenólicos en la inducción de resistencia de los frutos cítricos. Por ello se decidió analizar la posible actividad antifúngica *in vitro* de compuestos fenólicos sobre diversos hongos patógenos.

Los hongos patógenos ensayados son los descritos anteriormente: los aislados PHI-26 M1 y CECT 2954 de *P. digitatum*, CMP1 de *P. expansum* y PHI-1 M1 de *P. italicum*. Se emplearon tres medios de cultivos diferentes: PDB, como medio de cultivo estándar, y los extractos acuosos de flavedo y de albedo para intentar reproducir los nutrientes reales presentes en la corteza de los frutos cítricos.

El crecimiento en el medio PDB de los cuatro patógenos estudiados en placas de microtítulo de 96 pocillos fue diferente (Figura 37). El aislado CMP1 de *P. expansum* inoculado en PDB a una concentración de 10^4 conidios mL^{-1} fue

el que mostró un mayor aumento de la A_{492} con el tiempo, alcanzando un valor de A_{492} de 1,3 a las 72 h de crecimiento. Los aislados PHI-26 M1 y CECT 2954 de *P. digitatum* y PHI-1 M1 de *P. italicum* obtuvieron un menor valor de absorbancia con el tiempo, siendo similar en estos tres hongos.

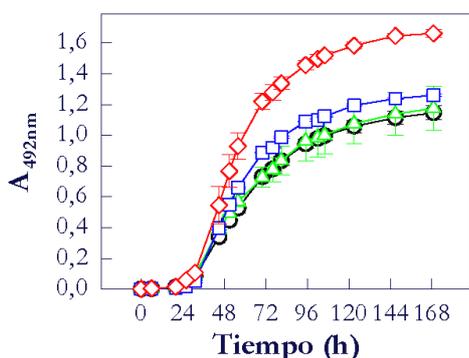


Figura 37. Crecimiento en medio PDB de los aislados PHI-26 M1 (\square) y CECT 2954 (\triangleleft) de *P. digitatum*, CMP1 de *P. expansum* (\blacktriangledown) y PHI-1 M1 de *P. italicum* (\circ). La concentración empleada en todos los casos fue de 10^4 conidios mL^{-1} . Los resultados se muestran como el valor medio de la $A_{492} \pm$ la desviación estándar de tres réplicas por muestra frente al tiempo (horas).

Al estudiar el comportamiento del crecimiento del aislado PHI-26 M1 de *P. digitatum* en tres medios de cultivo diferentes, se observó que el mayor valor de A_{492} con el tiempo se obtuvo en PDB. Utilizando el extracto acuoso de flavedo y de albedo como medio de cultivo, el crecimiento del patógeno se redujo, alcanzándose los menores valores de A_{492} en el extracto acuoso de albedo (Figura 38). Algo similar ocurriría al ensayar los otros tres hongos en estudio, en los que el mayor crecimiento se observó en PDB, reduciéndose al utilizar el extracto acuoso de flavedo o de albedo (datos no mostrados). Ya que los patógenos en estudio crecieron mejor en PDB y las diferencias de crecimiento encontradas al emplear diversas concentraciones de compuestos fenólicos fueron mayores en este medio de cultivo, generalmente nos referiremos al medio PDB en la exposición de los resultados.

En la Figura 38 se presenta el crecimiento del aislado PHI-26 M1 de *P. digitatum* en los tres medios de cultivo ensayados suplementados con diversas concentraciones de las cumarinas estudiadas (umbeliferona: 7-hidroxicumarina, esculetina: 6-7-dihidroxicumarina, escopoletina: 7-hidroxi-6-metoxicumarina y escoparona: 6-7-dimetoxicumarina). Además, se muestra el crecimiento de este patógeno en PDB suplementado con diferentes concentraciones de las flavanonas hesperetina (3'-5-7-trihidroxi-4-metoxiflavanona), hesperidina (hesperetina-7-rutinósido), naringenina (4'-5-7-trihidroxi-7-metoxiflavanona) y naringina (naringenina-7-O-neohesperidósido) (Figura 39) o con diversos alcaloides (teofilina, cafeína, teobromina, THHCA, sanguinarina, berberina, hiosciamina y escopolamina) (Figura 40).

En la mayor parte de los casos no se pudo determinar los valores MIC (mínima concentración del compuesto a la cual no se observa crecimiento durante 7 d en las condiciones experimentales) e IC50 (concentración necesaria para obtener un 50 % de inhibición del crecimiento) ya que con las concentraciones empleadas no se inhibió suficientemente el crecimiento del patógeno.

En la Tabla 55 se muestran los datos relativos de absorbancia de los cuatro hongos ensayados incubados en los tres medios de cultivo suplementados con la concentración de cumarinas más alta ensayada. Como las diferencias encontradas al emplear los tres medios de cultivo fueron más acusadas con el medio PDB, los ensayos de actividad antifúngica de diferentes flavanonas y diversos alcaloides se realizó solamente en este medio de crecimiento (Tabla 56 y Tabla 57). Los valores se han normalizado teniendo en cuenta el valor de A_{492} en cada uno de los medios empleados sin adición de compuesto, refiriendo el resto de valores a éste.

Las disoluciones más concentradas de los compuestos se hicieron en MeOH, excepto en el caso de la hesperidina, que fue en DMSO. La concentración máxima de MeOH fue del 5 % y de DMSO del 1,3 % en la mayor de las concentraciones de cada uno de los compuestos estudiados. La máxima concentración de MeOH en el ensayo redujo el crecimiento de los aislados PHI-26 M1 y CECT 2954 de *P. digitatum* en PDB, mientras que solamente se observó una reducción del crecimiento del primer aislado en el extracto acuoso de albedo (Tabla 55). La presencia de DMSO al 1,3 % en PDB también redujo el crecimiento de los aislados de *P. digitatum* (Tabla 56). El crecimiento del aislado CMP1 de *P. expansum* no solo no se vio afectado por la presencia de MeOH en el medio, sino que aumentó al emplear el extracto acuoso de albedo.

Los dos aislados de *P. digitatum* mostraron comportamientos similares frente a los diversos compuestos adicionados al medio de cultivo (Tabla 55, Tabla 56 y Tabla 57). El compuesto más efectivo fue la sanguinarina, que detuvo por completo el crecimiento del aislado PHI-26 M1 a una concentración de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$. Sin embargo, la adición de este compuesto en el extracto acuoso de flavedo no fue tan efectiva ya que solamente redujo el crecimiento un 30 %. Los 4 alcaloides descritos en cítricos (teofilina, cafeína, teobromina y THHCA) redujeron significativamente el crecimiento de *P. digitatum* crecido en extracto acuoso de flavedo y albedo. Otros compuestos que actuaron sobre el desarrollo de *P. digitatum* fueron la umbeliferona y la

hesperidina que redujeron el valor de A_{492} a las 72 h de crecimiento hasta un 70 % respecto al control crecido en PDB. Los demás compuestos redujeron también el crecimiento de los dos aislados de *P. digitatum*, desde un valor relativo de A_{492} de 0,96 aplicando naringina y teobromina, hasta de 0,35 con la escopoletina en las concentraciones más elevadas ensayadas.

Los compuestos que más retrasaron el crecimiento del aislado PHI-1 M1 de *P. italicum* fueron las cumarinas, en especial la escopoletina que, a una concentración de $1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$, redujo el crecimiento fúngico en medio PDB en un 80 % respecto al control sin compuesto. La flavanona naringina no solamente no redujo el crecimiento fúngico a las 72 h, sino que lo incrementó en un 50 % respecto al crecimiento en medio PDB sin la adición del compuesto.

El crecimiento del aislado CMP1 de *P. expansum* se vio seriamente afectado con la adición al medio PDB de escoparona o de escopoletina a una concentración de $1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$, retardando el crecimiento fúngico, pero no deteniéndolo. La adición de esculetina al medio PDB retrasó ligeramente el crecimiento fúngico. Sin embargo, la adición de este compuesto a una concentración de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ en los medios constituidos por extracto acuoso de flavedo o de albedo lo incrementó ligeramente. Las flavanonas adicionadas al medio PDB también redujeron el crecimiento de este patógeno un 50 % en el caso de la hesperidina y de naringenina, y un 30 % con hesperetina y naringina. La sanguinarina adicionada al medio PDB anuló el desarrollo del patógeno completamente y la adición de THHCA redujo la A_{492} hasta un valor relativo de 0,54 a las 73 h de crecimiento. Sin embargo, la adición de alcaloides al medio acuoso de flavedo incrementó ligeramente el crecimiento de *P. expansum*. Este hecho también se observó en el albedo pero no de forma tan acusada.

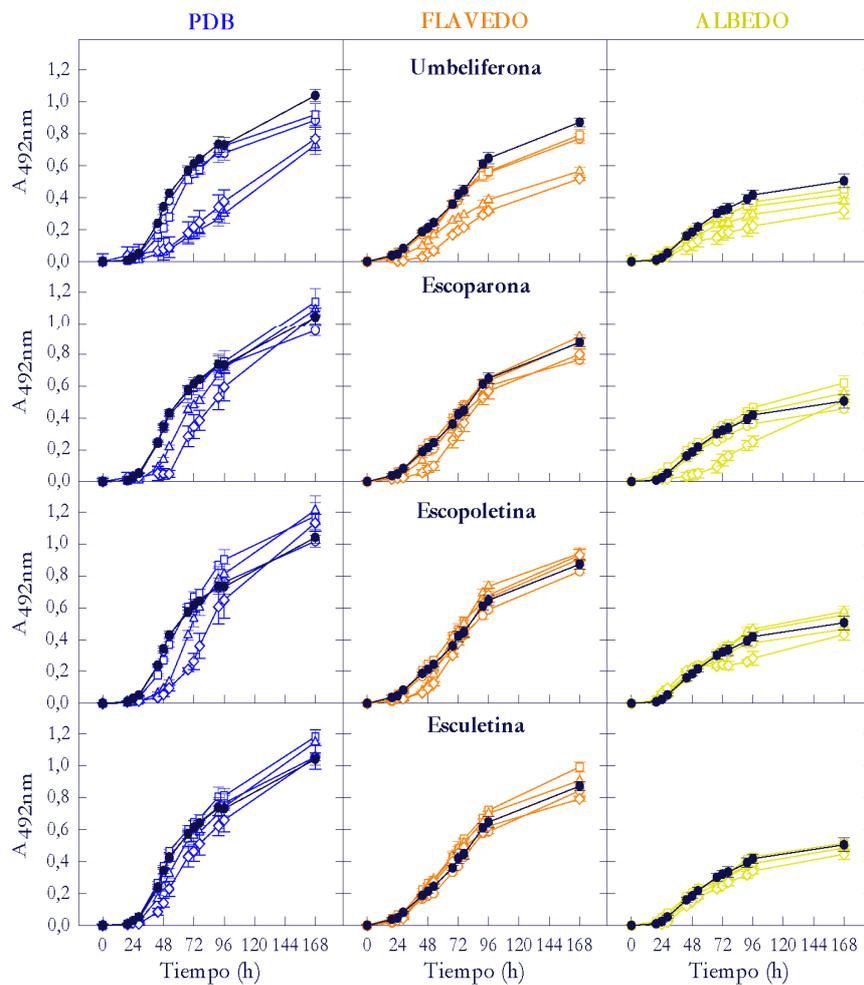


Figura 38. Ensayos de la actividad antifúngica de diversas cumarinas (umbeliferona, escoparona, escopoletina y esculetina) sobre el aislado PHI-26 M1 de *P. digitatum*. Se emplearon tres medios de cultivo diferentes: PDB (■), extracto acuoso de flavedo (■) y extracto acuoso de albedo (■). Los resultados se muestran como los valores medios de la $A_{492} \pm$ la desviación estándar frente al tiempo (h) para las muestras control en ausencia de compuesto (□) y en presencia de 15 (□), 125 (▨), 500 (▩) y 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (▾) de umbeliferona, escoparona y escopoletina, o de 7,8 (□), 65 (▨), 250 (▩) y 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (▾) de esculetina.

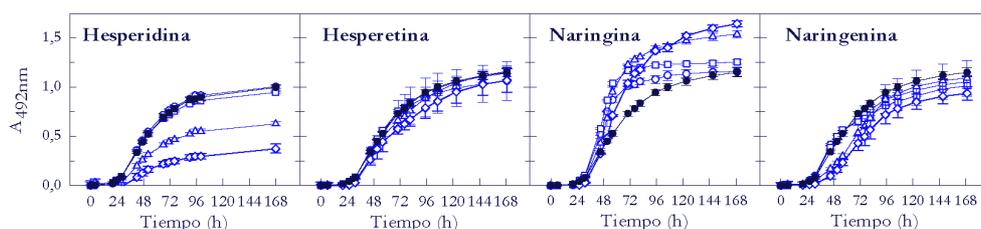


Figura 39. Ensayo de la actividad antifúngica de cuatro flavanonas (hesperidina, hesperetina, naringina y naringenina) sobre el aislado PHI-26 M1 de *P. digitatum* a una concentración de 10^4 conidios mL^{-1} en medio PDB. Los resultados se muestran como los valores medios de la $A_{492} \pm$ la desviación estándar frente al tiempo (h) para las muestras control en ausencia de compuesto (\square) y en presencia de 156 (\square), 625 (\triangle), 2.500 (ρ) y 5.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (\downarrow) de hesperidina, 156 (\square), 1.250 (\triangle), 5.000 (ρ) y 10.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (\downarrow) de naringina y 15,6 (\square), 125 (\triangle), 500 (ρ) y 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (\downarrow) de hesperetina y naringenina.

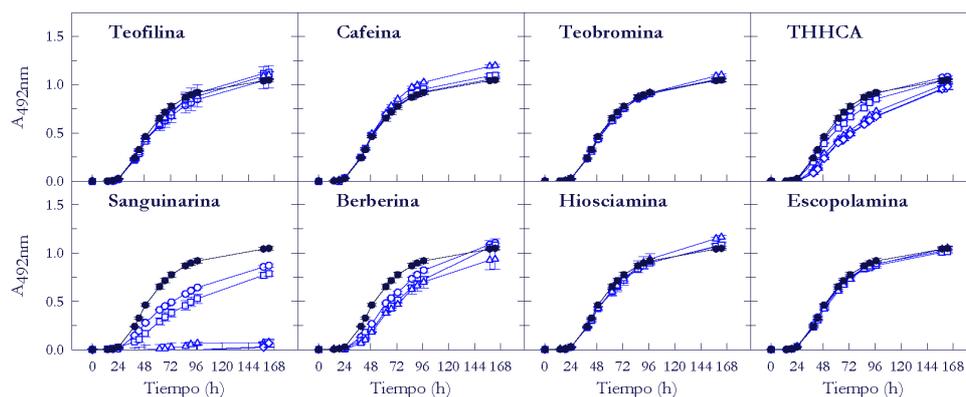


Figura 40. Ensayo de la actividad antifúngica de ocho alcaloides (teofilina, sanguinarina, cafeína, teobromina, ácido 1, 2, 3, 4-tetrahidroharmane 3-carboxílico (THHCA), berberina, hiosciamina y escopolamina) sobre el aislado PHI-26 M1 de *P. digitatum* a una concentración de 10^4 conidios mL^{-1} en medio PDB. Los resultados se muestran como los valores medios de la $A_{492} \pm$ la desviación estándar frente al tiempo (h) para las muestras control en ausencia de compuesto (\square) y en presencia de 25 (\square), 50 (\triangle) y 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (ρ), excepto para la sanguinarina que fue 12,5 (\square), 25 (\triangle), 50 (ρ) y 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (\downarrow) y para THHCA con 6,25 (\square), 12,5 (\triangle) 25 (ρ) y 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (\downarrow).

Tabla 55. Valores relativos de A_{492} a las 72 h de incubación de los aislados PHI-26 M1 y CECT 2954 de *P. digitatum*, CMP1 de *P. expansum* y PHI-1 M1 de *P. italicum* inoculados a una concentración de 10^4 conidios mL^{-1} en tres medios de cultivo diferentes: PDB, extracto acuoso de flavedo y de albedo. En el medio de cultivo se adicionaron las cumarinas umbeliferona, escoparona, escopoletina a una concentración de $1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$ y de esculetina a $500 \mu\text{g mL}^{-1}$. A las 72 h se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) empleando el test LSD de los datos obtenidos a partir del crecimiento de cada hongo en cada medio de cultivo suplementado con diversas cumarinas. Diferencias de $p < 0,05$ fueron consideradas significativas.

		Control	MeOH 5%	Umbeliferona $1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$	Escoparona $1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$	Escopoletina $1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$	Esculetina $500 \mu\text{g mL}^{-1}$
PHI-26 M1 <i>P. digitatum</i>	PDB	1,00 a	0,77 b	0,35 d	0,56 c	0,43 cd	0,76 b
	FLAVEDO	1,00	1,02	0,46	0,74	0,90	1,08
	ALBEDO	1,00 a	0,85 b	0,56 c	0,42 d	0,76 b	0,78 b
CECT 2954 <i>P. digitatum</i>	PDB	1,00 a	0,88 b	0,26 c	0,29 d	0,35 d	0,76 c
	FLAVEDO	1,00 a	0,96 a	0,36 d	0,63 c	0,39 d	0,84 b
	ALBEDO	1,00 a	1,03 a	0,57 e	0,28 d	0,47 e	0,91 a
PHI-1 M1 <i>P. italicum</i>	PDB	1,00 a	0,94 a	0,35 cd	0,42 bc	0,21 d	0,53 b
	FLAVEDO	1,00 a	0,91 b	0,61 c	0,39 d	0,45 d	0,85 b
	ALBEDO	1,00 a	0,89 ^a _b	0,58 c	0,12 d	0,81 b	0,87 ab
CMP1 <i>P. expansum</i>	PDB	1,00	1,05	0,40	0,05	0,14	0,76
	FLAVEDO	1,00 b	0,96 b	0,75 c	0,34 d	0,38 d	1,37 a
	ALBEDO	1,00 c	1,15 b	0,36 e	0,39 e	0,74 d	1,33 a

Tabla 56. Valores relativos de A_{492} a las 72 h de incubación de los aislados PHI-26 M1 y CECT 2954 de *P. digitatum*, CMP1 de *P. expansum* y PHI-1 M1 de *P. italicum* inoculados a una concentración de 10^4 conidios mL^{-1} en el medio PDB. La flavanona hesperidina se adicionó al medio a una concentración de $5.000 \mu\text{g mL}^{-1}$, mientras que la hesperetina y la naringina a $1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$ y la naringina a $10.000 \mu\text{g mL}^{-1}$. A las 72 h se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) empleando el test LSD de los datos obtenidos a partir del crecimiento de cada hongo en cada medio de cultivo suplementado con diversas flavanonas. Diferencias de $p < 0,05$ fueron consideradas significativas.

		Control	MeOH 5%	DMSO 1,3%	Hesperidina $5.000 \mu\text{g mL}^{-1}$	Hesperetina $1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$	Naringina $10.000 \mu\text{g mL}^{-1}$	Naringenina $1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$
PHI-26 M1 <i>P. digitatum</i>	PDB	1,00 a	0,78 c	0,75 cd	0,32 f	0,72 d	0,87 b	0,48 e
CECT 2954 <i>P. digitatum</i>	PDB	1,00	1,04	0,72	0,28	0,75	0,96	0,53
PHI-1 M1 <i>P. italicum</i>	PDB	1,00 b	0,86 c	0,89 c	0,62 d	0,87 c	1,58 a	0,45 e
CMP1 <i>P. expansum</i>	PDB	1,00	1,00	0,94	0,48	0,71	0,75	0,49

Tabla 57. Valores relativos de A_{492} a las 73 h desde el inicio del crecimiento de los aislados PHI-26 M1 de *P. digitatum* y CMP1 de *P. expansum* en el medio PDB. Los ensayos de actividad antifúngica se realizaron empleando una concentración de los compuestos de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. A las 73 h se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) empleando el test LSD de los datos obtenidos a partir del crecimiento de cada hongo en cada medio de cultivo suplementado con los diversos compuestos. Diferencias de $p < 0,05$ fueron consideradas significativas.

Compuesto	Concentración	PHI-26 M1 <i>P. digitatum</i>			CMP1 <i>P. expansum</i>		
		PDB	Flavado	Albedo	PDB	Flavado	Albedo
Sin compuesto		1,00 b	1,00 a	1,00 a	1,00 cd	1,00 c	1,00 a
MeOH	2,5 %	0,71 d	0,98 a	0,98 a	0,92 de	1,26 ab	1,01 a
Teofilina	$100 \mu\text{g mL}^{-1}$	0,92 c	0,89 b	0,90 b	1,08 abc	1,11 abc	0,88 a
Cafeína	$100 \mu\text{g mL}^{-1}$	1,09 a	0,77 def	0,90 b	1,03 bc	1,14 abc	1,01 a
Teobromina	$100 \mu\text{g mL}^{-1}$	0,96 bc	0,84 bcd	0,88 bc	1,13 ab	1,31 ab	0,56 b
THHCA	$100 \mu\text{g mL}^{-1}$	0,61 e	0,88 bc	0,81 d	0,54 f	1,11 abc	0,88 a
Sanguinarina	$100 \mu\text{g mL}^{-1}$	0,00 f	0,70 f	0,00 e	0,00 g	0,99 c	0,00 c
Berberina	$100 \mu\text{g mL}^{-1}$	0,59 e	0,72 ef	0,88 bc	1,11 ab	1,08 bc	0,57 b
Hiosciamina	$100 \mu\text{g mL}^{-1}$	0,93 bc	0,86 bc	0,88 bc	0,85 e	0,98 c	0,88 a
Escopolamina	$100 \mu\text{g mL}^{-1}$	0,94 bc	0,80 cde	0,84 cd	1,17 a	1,32 a	0,53 b

8.2. Ensayos *in vivo*

Con el fin de completar el estudio de la posible actividad antifúngica *in vitro* de los diversos compuestos fenólicos que fueron más efectivos reduciendo la infección, se realizaron experimentos de inoculación controlada sobre frutos cítricos. Así, analizando los resultados obtenidos de los ensayos en placas de microtítulo de 96 pocillos se decidió emplear en los ensayos *in vivo* las cuatro cumarinas y la hesperidina, así como sus mezclas. Al igual que en los ensayos *in vitro*, los stocks se realizaron en MeOH para las cumarinas y en DMSO para la hesperidina. Posteriormente, las diluciones se realizaron en MeOH hasta alcanzar la concentración deseada de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ en las cumarinas o de $20.000 \mu\text{g mL}^{-1}$ en la hesperidina. Por ello, se empleó como control la adición de MeOH y de MeOH:DMSO (80:20, v/v) antes de la inoculación del patógeno.

Del primer ensayo realizado en el que solamente se emplearon como compuestos antifúngicos las cumarinas, se determinó que la aplicación de escoparona, escopoletina y umbeliferona en heridas practicadas artificialmente 2 h antes de la inoculación de *P. digitatum* redujo significativamente el porcentaje de heridas infectadas y el área media de la zona macerada respecto al control de MeOH a los 5 dpi (Figura 41 y Tabla 58). En los tres casos la

incidencia de la lesión también se redujo significativamente frente a frutos no tratados. Un segundo ensayo mostró que solamente la aplicación de escoparona redujo la incidencia de la infección respecto al control con MeOH (Tabla 58).

Posteriormente se realizaron dos ensayos más, esta vez añadiendo las cumarinas y la hesperidina, junto con mezclas de todos ellos, 2 h antes de la inoculación de *P. digitatum*. En los dos experimentos, la aplicación de la mezcla de escoparona y umbeliferona redujo significativamente el porcentaje de heridas infectadas a los 5 dpi respecto a los frutos a los que se añadió MeOH. Sin embargo, el área media de la zona de maceración en frutos tratados con umbeliferona o con la mezcla de escoparona más umbeliferona se redujo significativamente a los 5 dpi solamente en el primer ensayo.

Estos experimentos sugieren que la aplicación de las cumarinas escoparona y umbeliferona y, en algunos casos de escopoletina, a una concentración de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ reducen el porcentaje de heridas infectadas y el área media de la zona macerada en frutos posteriormente infectados con *P. digitatum*.

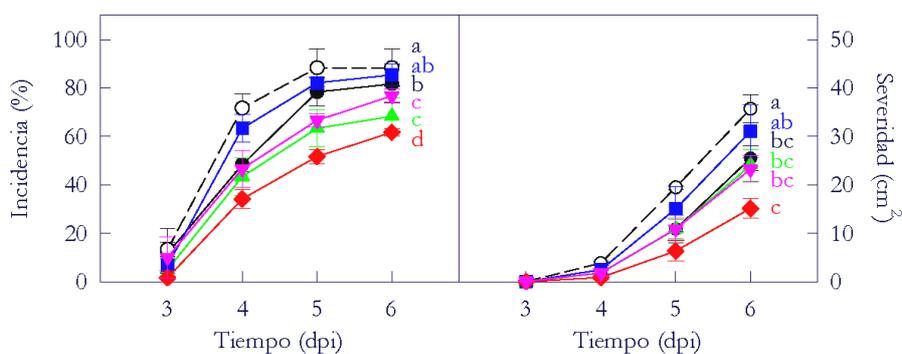


Figura 41. Ensayos de la actividad antifúngica de diversas cumarinas en naranjas 'Navelina' infectadas con el aislado PHI-26 M1 de *P. digitatum*. Control (□), MeOH absoluto (◻), umbeliferona (▲), esculetina (◌), escopoletina (◄), escoparona (▼). Los frutos se mantuvieron 2 h a 20 °C y posteriormente se inoculó una concentración de 10^5 conidios mL^{-1} de *P. digitatum*. Los compuestos se aplicaron a una concentración de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$. A los 5 dpi se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) empleando el test LSD. Diferencias de $p < 0,05$ fueron consideradas significativas.

Tabla 58. Ensayos *in vivo* de la actividad antifúngica de diversos compuestos fenólicos sobre el aislado PHI-26 M1 de *P. digitatum* en frutos de naranja. Las cumarinas se aplicaron a una concentración de 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y la hesperidina a 20.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en una herida realizada artificialmente y dos horas después se inoculó el patógeno a una concentración de 10^5 conidios mL^{-1} . Se determinó el porcentaje de heridas infectadas y el área media de la zona de maceración. A los 5 dpi se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) empleando el test LSD. Diferencias de $p < 0,05$ fueron consideradas significativas.

Compuesto (Concentración)	Experimento A		Experimento B	
	Incidencia (%)	Severidad (cm^2)	Incidencia (%)	Severidad (cm^2)
Control	78,3 b	10,9 bc	81,7 bc	10,3 a
MeOH	88,3 a	19,5 a	76,7 cd	10,0 a
Escoparona (500 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	66,7 c	10,9 bc	65,0 e	8,7 ab
Escopoletina (500 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	51,7 d	6,4 c	71,7 d	6,4 b
Umbeliferona (500 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	63,3 c	10,9 bc	90,0 a	10,7 a
Esculetina (500 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	82,1 ab	15,0 ab	86,7 ab	9,3 ab

Compuesto (Concentración)	Experimento C		Experimento D	
	Incidencia (%)	Severidad (cm^2)	Incidencia (%)	Severidad (cm^2)
Control	68,3 b	12,6 bc	78,3 de	18,9 de
MeOH	93,3 a	16,5 a	90,0 ab	17,0 def
Escoparona (500 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	91,7 a	14,1 ab	90,0 ab	23,7 bc
Escopoletina (500 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	86,7 a	13,8 abc	95,0 a	31,2 a
Umbeliferona (500 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	88,3 a	10,4 c	86,7 bc	14,8 efg
Escoparona + Escopoletina	91,7 a	13,8 abc	91,7 ab	25,6 b
Escoparona + Umbeliferona	70,0 b	11,2 bc	83,3 cd	13,1 fg
MeOH:DMSO (80:20, v/v)	88,3 a	13,5 abc	80,0 de	12,0 g
Hesperidina (20.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	90,0 a	11,6 bc	76,7 e	14,4 fg
Escoparona + Hesperidina	90,0 a	12,1 bc	83,0 cde	14,1 fg
Todos	93,3 a	16,6 a	90,0 ab	20,5 cd

DISCUSIÓN

1. EFECTIVIDAD DE LOS DISTINTOS TRATAMIENTOS DE INDUCCIÓN DE RESISTENCIA

Debido al rechazo actual que existe por parte de los consumidores en la utilización de fungicidas, así como las mayores restricciones impuestas por la legislación actual y la aparición de cepas resistentes, se hace necesario desarrollar sistemas alternativos que, al menos, permitan reducir la utilización de los mismos. Una de estas alternativas consiste en la inducción de resistencia natural frente a patógenos. Aunque los estudios de inducción de resistencia en la parte vegetativa de la planta están mucho más desarrollados, existe un creciente interés por su potencialidad en postcosecha (Terry y Joyce, 2004), incluyendo los frutos cítricos (Ben Yehoshua y col., 2000). Por este motivo se decidió evaluar algunos métodos de inducción de resistencia frente a la infección por *P. digitatum* en los frutos cítricos ya descritos (Kim y col., 1991; Ortuño y col., 1997; Droby y col., 1999; Porat y col., 2003; Terry y Joyce, 2004; Ballester y col., 2006; Ferreira y col., 2006) con el fin de optimizar y seleccionar el sistema objeto de estudio para profundizar en el conocimiento de los mecanismos relacionados con la resistencia inducida.

En general, los tratamientos de inducción de resistencia en los frutos cítricos tienen carácter local, es decir, se manifiesta en zonas cercanas al punto de aplicación del elicitador, disminuyendo la efectividad progresivamente en zonas más distales. Este hecho fue descrito por Porat y col. (2003), que observaron que a medida que aumenta la distancia entre la inoculación del patógeno y el punto de aplicación del inductor de resistencia disminuye la efectividad del tratamiento, siendo máxima a 1-2 cm del punto de aplicación. Por lo tanto, para estudiar la efectividad de los diversos tratamientos, se realizó una inoculación posterior con el patógeno a una distancia de 0,5 cm del punto de aplicación del elicitador.

En la bibliografía se ha descrito la diferente efectividad de los tratamientos inductores de resistencia atendiendo al tiempo que transcurre entre la aplicación del elicitador y la posterior inoculación con el patógeno ya que el efecto es transitorio. Así, Pavoncello y col. (2001) mostraron que la mayor efectividad de un cepillado y lavado de los frutos cítricos a 62 °C durante 20 s se producía cuando la inoculación posterior con *P. digitatum* se realizaba a los 1 y 3 dpt. Por ello, en este trabajo se realizó una segunda inoculación a diferentes tiempos. En caso de los tratamientos químicos y biológicos, la inoculación tuvo lugar a las 48 h posteriores al tratamiento, mientras que en el

caso de la inoculación con *P. digitatum* y posterior inactivación del patógeno, se realizó a los 0, 1 y 3 dpt.

Entre los compuestos químicos descritos como posibles inductores de resistencia en los frutos cítricos, se estudió el efecto del Brotomax (mezcla líquida de oligoelementos que se emplea como inductor de autodefensas frente a distintas situaciones de estrés), BABA y MeJA. La aplicación de estos compuestos en naranjas 'Navel' redujo significativamente el porcentaje de infección y el área media de lesión respecto a los frutos no tratados (Tabla 3). Sin embargo, excepto en el caso del MeJA a 1 μ M, estas diferencias no se apreciaron respecto a los frutos heridos. Otros autores ya habían indicado que la herida practicada al fruto podría ser responsable de la reducción del porcentaje de infección en naranjas inoculadas con *P. digitatum* a las 24, 48 o 72 h posteriores a la realización de la herida (Brown y col., 1978). Se ha descrito que la lesión causada por *P. parasitica* en frutos tangelo 'Nova' es menor cuando estos frutos son previamente bañados en una solución con Brotomax (Ortuño y col., 1997). Sin embargo, en el presente trabajo no se observó una reducción significativa del porcentaje de infección ni del área de lesión de *P. digitatum* en naranjas 'Navel' previamente tratadas con este compuesto químico. El tratamiento con MeJA a una concentración de 1 μ M fue muy efectivo reduciendo el área media de lesión respecto a los frutos heridos. Estos datos concuerdan con los obtenidos por Droby y col. (1999) en pomelos, donde la aplicación de MeJA en heridas practicadas artificialmente 24 h antes de la inoculación con *P. digitatum* reducía el porcentaje de infección a un 47 % respecto a frutos heridos. En otros frutos también se ha observado un efecto de la aplicación pre y postcosecha de MeJA en la reducción del porcentaje de infección durante el almacenamiento (Yao y Tian, 2005a; 2005b). La aplicación de BABA a una concentración de 200 mM redujo significativamente la incidencia y severidad de *P. digitatum* respecto a los frutos control, aunque estas diferencias no se apreciaron respecto a los frutos heridos. Sin embargo, en pomelos tratados con BABA 24 h antes de la inoculación con *P. digitatum* se redujo el porcentaje de infección en un 65 % respecto a los frutos heridos no tratados (Porat y col., 2003). La aplicación de estos elicitores en los frutos cítricos se ha relacionado con un aumento en la actividad PAL y una inducción de la expresión de genes que codifican una quitinasa y una β -1,3-glucanasa (Porat y col., 2002; 2003).

Diversos constituyentes de la pared celular de los hongos pueden actuar como elicitores de las respuestas de defensa de las plantas (Terry y Joyce,

2004; Ferreira y col., 2006). Así, Takenaka y col. (2003) mostraron que el tratamiento de semillas de remolacha con paredes celulares del micoparásito *Pythium olegandrum* induce resistencia frente a una infección causada por *R. solani*. Además, se observó un incremento en las actividades enzimáticas PAL y quitinasa y un aumento significativo en compuestos fenólicos. En el presente trabajo se ha ensayado la efectividad de la aplicación de diferentes elicitors fúngicos, como las paredes celulares de *P. digitatum* y otros hongos menos infectivos en cítricos en las condiciones del ensayo, en naranjas 'Navel'. Estos tratamientos redujeron el porcentaje de infección entre un 40 y un 60 % en los frutos, así como el área media de heridas infectadas, que disminuyó alrededor de un 65 % respecto a los frutos no tratados. La aplicación de paredes celulares de *P. digitatum* a una concentración equivalente a 1 mg mL⁻¹ fue el tratamiento más efectivo en naranjas 'Navel' reduciendo significativamente el porcentaje de heridas infectadas respecto a frutos no tratados y a frutos heridos.

Además de la aplicación de paredes celulares de *P. digitatum* y de otros patógenos no infectivos en las condiciones del ensayo, se empleó *P. digitatum* como posible agente de inducción de resistencia en frutos cítricos, basándose en el estudio de Kim y col. (1991). Estos autores mostraron que una inoculación previa a un tratamiento térmico incrementaba la concentración de escoparona, correlacionado el aumento en la concentración de este compuesto con una menor capacidad de germinación de esporas y de elongación del tubo germinativo de *P. digitatum*. La aplicación de calor (3 d a 37 °C) posterior a la inoculación del hongo fue necesaria para detener el desarrollo de la infección ya que *P. digitatum* es un patógeno en cítricos. Otros autores ya observaron el efecto curativo de los tratamientos de calor en frutos cítricos frente a infecciones previas (Brown y col., 1978; Nafussi y col., 2001). Sin embargo, la aplicación del tratamiento térmico previamente a la inoculación de *P. digitatum* reduce en menor medida la infección por el patógeno e, incluso, puede incrementar la susceptibilidad de los frutos a la infección. La aplicación de *P. digitatum* y posterior inactivación térmica del patógeno redujo significativamente el porcentaje de infección y el área media de la zona macerada en naranjas 'Navelina' respecto a los frutos no tratados (Figura 10 y Figura 11). Como se ha comentado, la efectividad del tratamiento depende del tiempo que transcurre entre el tratamiento y la posterior inoculación del patógeno. Por ello, en este trabajo se realizó una segunda inoculación a los 0, 1 y 3 dpt para comprobar cuando se manifiesta la máxima inducción de resistencia. Al igual que observaron Pavoncello y col. (2001), la menor

susceptibilidad de los frutos cítricos a una infección por *P. digitatum* posterior al tratamiento inductor tuvo lugar 1 y 3 días después del curado, observándose diferencias significativas respecto a los frutos no tratados.

Entre todos los tratamientos ensayados en este trabajo, el más efectivo reduciendo el porcentaje de infección y el área media de lesión fue la adición de MeJA 48 h antes de la inoculación con el patógeno. Sin embargo, atendiendo a resultados previos obtenidos en el Laboratorio de Fisiología y Biotecnología de Postcosecha del IATA (Ballester y col., 2006) y a la reproducibilidad del experimento, los ensayos para profundizar en el estudio de las bases fisiológicas y moleculares de los frutos cítricos se realizaron con el tratamiento inductor consistente en una infección con *P. digitatum* y posterior inactivación térmica del patógeno. No obstante, hay que tener en cuenta que este tratamiento inductor solamente puede emplearse como una herramienta básica para el estudio de las bases fisiológicas y moleculares de la resistencia inducida en los frutos cítricos, no pudiendo emplearse como herramienta comercial para la reducción de posibles infecciones fúngicas durante la postcosecha de los cítricos, mientras que el resto de los tratamientos ensayados podrían emplearse de forma más generalizada durante la postcosecha de estos frutos.

2. ESTUDIO DE CAMBIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA EN NARANJAS ‘NAVELATE’ EN RESPUESTA AL TRATAMIENTO DE INDUCCIÓN DE RESISTENCIA

Los estudios de los cambios moleculares relacionados con los mecanismos de defensa de los frutos cítricos en respuesta a un tratamiento de inducción de resistencia se han centrado en la caracterización de genes individuales. Así, la aplicación de diversos elicitores como luz UV, etileno, JA, BABA, heridas o el cepillado y lavado de los frutos con agua a 62 °C durante 20 s puede aumentar la expresión de genes que codifican una quitinasa, una β -1,3-glucanasa, una PAL y proteínas de choque térmico (HSP: ‘Heat-shock protein’) (Lers y col., 1998; Pavoncello y col., 2001; Porat y col., 2001; 2002; Marcos y col., 2005). Además del estudio de genes individuales, también se han llevado a cabo estudios de los cambios en diversas actividades enzimáticas. Así, Fajardo y col. (1998) estudiaron las modificaciones en las actividades POX, quitinasa y β -1,3-glucanasa en naranjas tratadas con diversos productos químicos o biológicos que inducen resistencia (Margosan, Quitosano, Aspire, y sus combinaciones), así como en frutos infectados por *P. digitatum*. Estos autores observaron que estos tratamientos reducen significativamente el

porcentaje de heridas infectadas respecto a los frutos no tratados, aunque no tienen un efecto pronunciado en la síntesis de proteínas de defensa. También se ha estudiado la acumulación de estas proteínas en pomelos en respuesta a otro tratamiento inductor consistente en cepillar y duchar los frutos con agua caliente a 62 °C durante 20 s, observándose que este tratamiento induce resistencia frente a una infección posterior por *P. digitatum* (Pavoncello y col., 2001).

Una aproximación para el estudio global de la expresión de genes es el análisis de bibliotecas substractivas de cDNA. Así, en mandarinas 'Fortune' se ha aislado un conjunto de genes que se expresan diferencialmente en frutos acondicionados a 37 °C durante 3 d previamente a un almacenamiento a 1,5 °C durante 7 d. El análisis de los mismos puso de manifiesto que la tolerancia al frío inducida por el tratamiento de calor es un proceso activo que requiere la activación de nuevos factores de transcripción, así como la puesta en marcha del metabolismo secundario y la activación de proteínas de estrés en plantas (Sánchez-Ballesta y col., 2003). Sin embargo, en la bibliografía no existen estudios relacionados con la determinación de los cambios globales en la expresión génica de los frutos cítricos en respuesta a un tratamiento de inducción de resistencia frente a un ataque por patógenos o en respuesta a una infección fúngica. Actualmente se está profundizando en el estudio global de la expresión génica de los frutos cítricos en respuesta a una infección por *P. digitatum* en el Laboratorio de Fisiología y Biotecnología de Postcosecha en el IATA (González-Candelas y col., 2005).

El creciente desarrollo de las técnicas de análisis global o a gran escala, denominadas 'ómicas', nos permite abordar el análisis del transcriptoma desde un punto de vista más amplio, analizando simultáneamente la expresión de un elevado número de genes. En el CFGP, en el que participa el Laboratorio de Fisiología y Biotecnología de Postcosecha del IATA, se han desarrollado dos micromatrices de cDNA, conteniendo aproximadamente 7.000 (7k) y 12.000 (12k) genes de cítricos. La primera micromatriz (7k) se empleó para la puesta a punto y optimización del análisis transcriptómico. Se utilizaron réplicas técnicas con el fin de minimizar la variabilidad intrínseca al uso de réplicas biológicas. Una vez optimizado el conjunto de procedimientos y teniendo ya disponible una micromatriz más completa (12k), se llevó a cabo el estudio detallado en flavedo y albedo de tres réplicas biológicas. Se realizó un estudio conjunto de los genes presentes en las micromatrices mediante el análisis de anotación funcional por ontologías génicas. Las categorías funcionales de los

genes de cítricos presentes en las micromatrices fueron automáticamente asignadas mediante homólogos de *A. thaliana* (Forment y col., 2005). Aproximadamente el 71 y 77 % de los genes presentes en las micromatrices 7k y 12k, respectivamente, poseen homólogo de *A. thaliana*. Mediante hibridaciones con las micromatrices, se ha abordado el estudio de los cambios de expresión génica en naranjas en respuesta al tratamiento de inducción de resistencia consistente en una infección con *P. digitatum* y posterior inactivación térmica del patógeno para conocer parte del metabolismo potencialmente implicado en estos mecanismos de defensa (Apartado 2 de Resultados).

Posteriormente, en el análisis de anotación funcional se utilizó el paquete informático FatiGO+ en el que se comparan aquellos genes con expresión diferencial con el conjunto total de los genes presentes en la micromatriz. Sin embargo, este análisis elimina de la lista aquellos genes de *A. thaliana* que están repetidos. Por ejemplo, en la micromatriz 7k hay 14 genes correspondientes a diferentes OMTs que presentan el mismo homólogo de *A. thaliana*, At5g54160. Entre ellos, como se muestra en la Figura 42, se observan dos patrones de expresión diferentes. Ocho genes prácticamente no mostraron cambios de expresión en respuesta al tratamiento de infección más curado. Sin embargo, el nivel de expresión de 6 de ellos aumentó más de 10 veces a 1 dpt respecto a los frutos no tratados. Por ello, aunque el nivel de expresión de seis de las OMTs con el mismo homólogo asignado fuera significativo, solamente uno de ellos estaría representado en el análisis FatiGO+. Por lo tanto, este análisis de anotación funcional presenta dos limitaciones ya que no todos los genes de cítricos incluidos en las micromatrices poseen homólogo en *A. thaliana* y, además, no quedan representados en el análisis todos los genes cuya expresión varía en respuesta al tratamiento inductor. Aun siendo conscientes de estas limitaciones, este análisis es útil para tener una visión general de los cambios que se producen en diversos procesos metabólicos en respuesta al tratamiento inductor. Por ello,

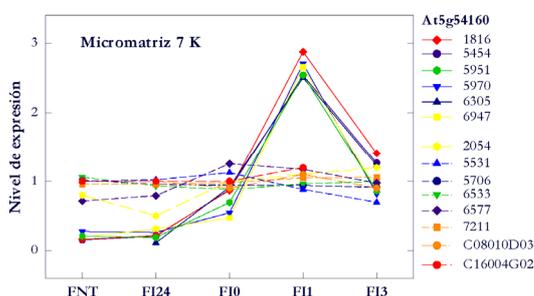


Figura 42. Nivel de expresión de diversos genes presentes en la micromatriz 7k que codifican OMTs. Todos ellos mostraron el mismo homólogo de *A. thaliana*.

como herramienta de apoyo para los estudios de los cambios de expresión asociados a rutas metabólicas se utilizó la herramienta informática ‘OMICS Viewer’ incluida en el paquete informático ‘AraCyc 3.5’ de *Arabidopsis* que proporciona una representación gráfica de las rutas metabólicas de esta especie y que tiene en cuenta la media de los cambios de expresión de todos los genes significativos para un mismo homólogo de *A. thaliana* en una misma comparación. Dicha aplicación informática tiene además en cuenta el nivel de expresión de los mismos.

El tratamiento de inducción de resistencia consistente en una infección por *P. digitatum* y posterior inactivación térmica del patógeno modificó significativamente la expresión de 1.808 y 1.857 genes analizados a 1 dpt en el flavedo y albedo, respectivamente, incluidos en la micromatriz 12k. El análisis de anotación funcional por ontologías génicas mostró que los genes del flavedo cuya expresión se induce en respuesta al tratamiento inductor a 0 y 1 dpt se incluyen mayoritariamente en los procesos metabólicos secundarios, procesos metabólicos de compuestos aromáticos, de derivados de aminoácidos y de fenilpropanoides (Tabla 29), formando parte de las rutas de biosíntesis de fenilpropanoides, suberina, flavonoles, metionina y ciclo de SAM representados mediante el programa ‘AraCyc 3.5’ (Figuras 20, 21 y 22). Este mismo análisis en el albedo mostró que el número de procesos metabólicos y biosintéticos inducidos en respuesta al tratamiento fue mayor a los del flavedo, destacando los procesos metabólicos y biosintéticos de aminoácidos, aminoácidos azufrados, derivados de aminoácidos, compuestos azufrados y nitrogenados, así como procesos biosintéticos celulares y de hormonas. Sin embargo, las rutas modificadas en respuesta al tratamiento inductor fueron similares a las del flavedo, siendo la intensidad de esta modificación mayor en el tejido interno. Estos resultados sugieren que el metabolismo secundario y la síntesis de aminoácidos están directamente implicados en la respuesta de los frutos cítricos al tratamiento de inducción de resistencia.

Los análisis de los cambios de expresión en respuesta al tratamiento de inducción de resistencia mediante el empleo de la micromatriz 7k indicaron que más de 1.500 genes modifican su expresión en respuesta a la infección con *P. digitatum* y posterior inactivación térmica del patógeno en el flavedo de naranjas ‘Navelate’ a los 0, 1 y 3 dpt, siendo máximos a 1 dpt (3.495 genes) respecto de los frutos no tratados. En la mayoría de los casos el número de genes inducidos en respuesta al tratamiento fue mayor que los reprimidos (Tabla 4). En el análisis de la micromatriz 12k el número de genes con

expresión diferencial fue menor al de la 7k. En la micromatriz 12k se observó que 1.808 genes modificaron su expresión en el flavedo a 1 dpt. Esta diferencia en el número de genes con expresión diferencial puede ser debida en parte a que en la hibridación con la micromatriz 7k se emplearon tres réplicas técnicas de una muestra biológica, mientras que en la micromatriz 12k se analizaron tres réplicas biológicas. Además, en los análisis estadísticos de este segundo estudio se analizaron dos tejidos diferentes: flavedo y albedo. A pesar de las diferencias observadas en la cantidad de genes cuya expresión se modificaba en respuesta a la infección y posterior curado, los genes claramente influenciados por el tratamiento inductor son básicamente los mismos empleando ambas micromatrices, destacando como inducidos genes que codifican OMTs y ACOs. Sin embargo, se encontraron ligeras diferencias en los genes cuya expresión se reprimió en respuesta al tratamiento en la hibridación con ambas micromatrices, aunque destacaron aquellos de función desconocida o que no presentaban homólogo en *A. thaliana*.

Solamente el 4,4 % de los genes analizados con la micromatriz 7k mostraron cambios de expresión diferencial en respuesta a la infección por *P. digitatum*. Esta misma infección modificó la expresión del 13,6% de los genes analizados en el flavedo incluidos en la micromatriz 12k. No obstante, la mayor parte de estos genes corresponden a aquellos cuya expresión no se detectó a las 24 h posteriores a la inoculación con el patógeno y sí se detectó en los frutos no tratados. Las diferencias en el número de genes que se expresan significativamente entre ambas micromatrices, como se ha comentado anteriormente, puede ser debido a los tejidos analizados en cada caso: flavedo y albedo procedentes de tres réplicas biológicas en la micromatriz 12k y solamente flavedo con tres réplicas técnicas de un mismo tejido biológico en la 7k. Además, el número de genes que modifican su expresión en respuesta a la infección por *P. digitatum* es menor que en el resto de los análisis, siendo esta diferencia más relevante en la micromatriz 7k. Una explicación plausible a este hecho es el tipo de muestreo realizado para la obtención del tejido. En el experimento de inducción de resistencia se emplearon discos de 13 mm de diámetro centrado en el punto de inoculación. Así, el efecto de la infección por *P. digitatum* sobre la expresión de los genes puede diluirse con el tejido adyacente. Sin embargo, este diámetro es efectivo para observar las respuestas inducidas que tienen lugar a 1-2 cm del punto de inoculación. No obstante, entre los genes que mostraron una mayor inducción en respuesta a la infección por el patógeno se observaron dos que codifican ácido salicílico metiltransferasas dependientes de SAM. Esta enzima cataliza el paso a ácido

metil salicílico a partir de SA y SAM. Estos genes se han relacionado con la respuesta de defensa en plantas frente a patógenos ya que se ha observado un aumento de la expresión en respuesta a infecciones por patógeno, heridas o tratamientos con SA, BTH o MeJA (Zheng y col., 2001; Xu y col., 2006). También se observaron cambios en la expresión de un gen que codifica una anexina. Esta gran familia de proteínas interactúa con componentes de la membrana celular que están implicados en la organización estructural de la célula, en la señalización intercelular, en el control del crecimiento y también pueden actuar como canales de calcio (Gerke y Moss, 2002; Moss y Morgan, 2004).

Los mayores cambios de expresión génica se observaron en los frutos infectados con *P. digitatum* y posteriormente curados en los tres días estudiados (0, 1 y 3 dpt). El tratamiento de inducción de resistencia redujo la expresión de 1.355, 1.488 y 783 genes incluidos en la micromatriz 12k en el flavedo y de 536, 1.259 y 1.500 en el albedo a los 0, 1 y 3 dpt, respectivamente (Tabla 14). Sin embargo, la mayor parte de estos genes codifican proteínas de función desconocida o sin homólogo en *A. thaliana*. Entre los genes que mostraron mayor aumento en la expresión en respuesta al tratamiento inductor en el flavedo y albedo de frutos cítricos destacaron aquellos que codifican diversas OMTs. Estas enzimas catalizan la reacción de O-metilación de diversos compuestos, dando lugar a la formación de sus derivados metil éter y S-adenosil-L-homocisteína como producto. Los metabolitos secundarios más comunes que actúan como moléculas aceptoras de grupos metilo son los compuestos fenólicos, los alcaloides y en menor extensión, algunos terpenoides. La metilación de compuestos fenólicos juega un papel muy importante en diferentes procesos de las plantas como la pigmentación o la síntesis de compuestos frente a diversas situaciones de estrés (Dixon y Paiva, 1995). Así, las OMTs están implicadas en la síntesis de cumarinas y flavonoides. Se han aislado dos OMTs que participan en la formación de flavonoides en cítricos (Benavente-García y col., 1995; 1997) y un gen *COMT* de mandarinas 'Fortune' que se induce por la combinación de calor y frío (Sánchez-Ballesta y col., 2003). En este último caso se han realizado ensayos *in vitro* que apuntaban a la implicación de la proteína codificada por este gen en la síntesis de escoparona (Lluch, 2007). Este gen *COMT* implicado en la síntesis de escoparona presenta una identidad del 99 % con el unigen 6305 incluido en la micromatriz 7k (Figura 42). Este unigen mostró un pico de inducción transitoria, siendo la expresión máxima en el flavedo 1 dpt, coincidiendo con la detección de la concentración más elevada de escoparona en este tejido. Las

cumarinas y flavonoides se han relacionado con la defensa de los frutos cítricos frente a diversos estreses como la radiación gamma (Riov y col., 1971), la luz UV (Rodov y col., 1992) y la infección por patógenos (Del Río y col., 2004; Kuniga y Matsumoto, 2006).

Sin embargo, la función de las OMTs se ha caracterizado fundamentalmente en plantas en relación con la biosíntesis de lignina (Anterola y Lewis, 2002; Humphreys y Chapple, 2002). La lignina se forma a partir de compuestos fenólicos metoxilados denominados monolignoles, derivados de los alcoholes coniferílico, 4-cumarílico y sinapílico. Su formación se ha relacionado con las respuestas de defensa de las plantas frente al ataque por patógenos. Así, el contenido en ligninas se ha correlacionado negativamente con la incidencia de *P. expansum* en manzanas (Valentines y col., 2005). La implicación de ligninas en la defensa de los frutos cítricos frente a la infección por *P. digitatum* fue propuesta por Brown y col. (1978) teniendo en cuenta la tinción con fluoroglucinol de los tejidos heridos e infectados. Estos autores pusieron de manifiesto que el incremento en ligninas ocasionado durante la cicatrización de las heridas en el flavedo reducía la susceptibilidad de los frutos a la infección por este patógeno. Además, se ha demostrado mediante análisis químico que la infección por *P. digitatum* induce la acumulación de ligninas alrededor del punto de inoculación en limones a las 24 hpi comparado con los frutos control (Nafussi y col., 2001). Dicha acumulación fue potenciada en frutos infectados durante 24 h y posteriormente sometidos a tratamiento de inmersión en agua caliente a 53 °C durante 2 min. Estos estudios sugieren que la síntesis de ligninas está relacionada con los mecanismos de defensa de los frutos cítricos frente a patógenos. Sin embargo, trabajos posteriores sugieren que el material que se acumula en los frutos cítricos infectados por *P. digitatum* es suberina (Lai y col., 2003). Estos autores también observaron una reacción positiva al fluoroglucinol en tejidos adyacentes a la zona herida e inoculada. No obstante, y teniendo en cuenta que el fluoroglucinol puede reaccionar tanto con ligninas como con gomas, un hidrato de carbono insoluble unido a aldehídos aromáticos y otros aldehídos análogos a los monómeros de ligninas, estos investigadores llevaron a cabo un estudio más exhaustivo del compuesto en cuestión mediante el empleo de resonancia magnética nuclear comprobando que no eran ligninas, sino un material asociado a la formación de suberinas. Los genes implicados en la síntesis de suberina son similares a los de la biosíntesis de lignina, entre los que se incluyen genes de la ruta de fenilpropanoides como *PAL*, *CAH*, *4CL*, lacasa y OMTs. Además, en la síntesis de este polímero participan genes implicados en la síntesis y

metabolismo de lípidos como aquellos que codifican LOXs o transportadores ABC para la transferencia de lípidos y diversas monooxigenasas y POXs (Soler y col., 2007).

La participación de las OMTs en la lignificación se ha relacionado con la participación de las mismas en la metilación de compuestos como cafeil CoA o 5-hidroxiferulil CoA (Busam y col., 1997), pudiendo estar por ello implicadas en las respuestas de defensa de los frutos. Además de estas enzimas, el tratamiento de inducción de resistencia aumentó significativamente el nivel de expresión de otros genes implicados en la biosíntesis de ligninas (Humphreys y Chapple, 2002; Boerjan y col., 2003). Entre ellos se encuentran cuatro genes que codifican una PAL, una 4CL, una CCR y una CAD, respectivamente. Los niveles de expresión de estos genes aumentaron significativamente en el albedo, generalmente a los 0, 1 y 3 dpt, mientras que en el flavedo solamente aumentó la expresión de los genes que codifican CCR y CAD. La enzima CAD está implicada en el último paso en la síntesis de monolignoles mediante la catalización de la reducción de los cinamil aldehídos a sus alcoholes (alcohol 4-cumarílico, coniferílico y sinapílico) en presencia de NADPH, lo que apoya la idea que el tratamiento inductor de resistencia puede favorecer la inducción de polímeros tipo ligninas y/o suberinas.

La infección y posterior inactivación térmica del patógeno aumentó la expresión de diversos genes que codifican factores de transcripción. El tratamiento inductor aumentó la expresión de dos factores de transcripción tipo WRKY en ambos tejidos. Sin embargo, la expresión de ningún gen de esta familia se redujo como consecuencia de la infección más curado. Miembros de esta familia de factores de transcripción se han relacionado con las respuestas de defensa de las plantas (Eulgem y Somssich, 2007). Otros genes que codifican factores de transcripción que modificaron la expresión en respuesta al tratamiento inductor son aquellos que codifican proteínas tipo MYB. Solamente el gen que codifica el MYB103 aumentó la expresión en ambos tejidos y en las dos micromatrices analizadas. Este factor de transcripción está incluido dentro de la subfamilia más amplia de MYBs caracterizada por el dominio R2R3. Esta subfamilia se ha relacionado con la regulación del metabolismo secundario, durante el desarrollo y diferenciación celular y algunos son activados durante la respuesta a hormonas o las reacciones de defensa de las plantas (Kranz y col., 1998; Stracke y col., 2001). Sin embargo, otros factores de transcripción MYB pertenecientes a esta subfamilia redujeron la expresión en respuesta al tratamiento inductor. Es de reseñar entre los genes

reprimidos la existencia de un factor de transcripción homólogo al gen *SNC1* de *A. thaliana*. Este gen está relacionado con las respuestas de defensa dependientes de salicílico, regulando negativamente los mecanismos de defensa ya que se ha observado que el mutante *snc1* de *A. thaliana* es más resistente a la infección por *P. syringae* y *P. parasitica*, no estando asociada esta resistencia con la muerte celular (Li y col., 2001).

Los genes de defensa y las proteínas PR han sido descritos en muchas plantas en respuesta al ataque por patógenos fúngicos, bacterias o virus (van Loon, 1997). Entre estas proteínas antifúngicas destacan quitinasas, glucanasas, LTPs e inhibidores de proteasas (Ye y col., 2000; Selitrennikoff, 2001). Se ha descrito la activación de estas proteínas en respuesta a la aplicación de diversos tratamientos como JA, etileno y SA. Sin embargo, la regulación de estos genes en cítricos no es muy conocida. Recientemente se ha observado que los genes que codifican una miraculina, un inhibidor de proteasas, están implicados en la ruta dependiente de JA puesto que se acumulan tras la inoculación fúngica o el tratamiento con MeJA en cítricos, mientras que la inducción dependiente de SA antagoniza la expresión de miraculina y la ruta de señalización del JA (Tsukuda y col., 2006). Los resultados obtenidos en este trabajo mediante la hibridación con la micromatriz 7k en la que estaban incluidos 18 genes que codifican miraculinas puso de manifiesto la importancia de las miraculinas en la defensa de los frutos cítricos frente a *P. digitatum* ya que se observó que el tratamiento de inducción de resistencia indujo la expresión de 11 de estos genes en el flavedo a los 0 y 3 dpt, mientras que esta inducción no se observó a 1 dpt.

El tratamiento de inducción de resistencia modificó también la expresión de genes que codifican quitinasas (PR-3, PR-4, PR-8, PR-11). Así, la expresión de un gen en el flavedo y de tres en el albedo de los 11 genes incluidos en la micromatriz 12k se inducen en los frutos infectados y posteriormente curados en los tres días analizados (0, 1 y 3 dpt). En frutos cítricos se ha observado un aumento de la expresión de genes que codifican estas PRs mediante la aplicación de diversos tratamientos que inducen resistencia. Así, el nivel de expresión del gen *chit* que codifica una quitinasa aumenta en respuesta a la aplicación de luz UV, etileno, herida, BABA o el agente de biocontrol *C. oleophilla* en pomelos, pudiendo estar relacionado este hecho con un aumento de la resistencia de estos frutos frente al ataque por patógenos (Porat y col., 2001). Este gen presenta una identidad del 98,6 % con el unigen *6931* incluido en la micromatriz 12k, observándose también una

inducción de la expresión en respuesta al tratamiento de inducción de resistencia a los 0, 1 y 3 dpt en el flavedo y el albedo de naranjas 'Navelate'.

El nivel de expresión de un gen que codifica una β -1,3-glucanasa incluido en la micromatriz 7k y de dos en la 12k se redujo en el flavedo de naranjas 'Navelate' en respuesta al tratamiento inductor (Tabla 15), mientras que ninguno disminuyó la expresión en el albedo a 1 dpt. Solamente aumentó la expresión de un gen en el flavedo y el albedo como consecuencia de la infección y posterior curados. En frutos cítricos se ha observado la inducción de un gen que codifica una β -1,3-glucanasa en respuesta a diversos tratamientos como herida, etileno, UV, BABA, JA, la infección por *P. digitatum* y bajas temperaturas (Porat y col., 2002; Sánchez-Ballesta y col., 2006). No obstante, no puede descartarse el hecho de la implicación de las glucanasas en las respuestas de defensa de las naranjas ya que los genes *gns1* y *CrglcQ* aislados por estos autores que aumentan la expresión en respuesta a tratamientos inductores no estaban incluidos en las micromatrices analizadas.

La expresión de 7 genes en el flavedo y 9 en el albedo que codifican otras proteínas PR entre las que se encuentran distintas PR-5 (taumatina), PR-6 (inhibidor de proteinasa), PR-10 (similar a ribonucleasa) y PR-14 (LTP) presentes en la micromatriz 12k mostraron cambios significativos de expresión en el flavedo y el albedo de naranjas 'Navelate' en respuesta al tratamiento de infección y posterior inactivación térmica en los tres días analizados (0, 1 y 3 dpt) (Tabla 24). Esta diferencia de expresión en los diversos genes que codifican proteínas PR puede ser debida a que no todas estas proteínas están asociadas únicamente a la patogénesis. Este resultado podría explicarse, además, por el hecho que los genes presentes en la micromatriz proceden de genotecas de cDNA, substractivas y no substractivas, generadas a partir de diferentes tejidos de cítricos en múltiples situaciones del desarrollo y de respuesta a estreses bióticos y abióticos. Esta situación ha sido descrita en *Arabidopsis* y arroz, observándose la existencia de diversas proteínas PR-1, de las cuales solamente dos se inducen en respuesta al ataque de patógenos fúngicos y virus. El resto son genes constitutivos en raíces o tejidos florales, lo que apunta a la implicación de estas proteínas PR en el desarrollo de las plantas (van Loon y col., 2006). Además, se han descrito diversas isoformas y clases de quitinasas con un patrón de expresión diferente frente a diversas situaciones de estrés en tabaco (Brunner y col., 1998). Esto podría indicar que algunos de los genes de defensa incluidos en las micromatrices no correspondieran con genes que modifican la expresión en respuesta al tratamiento inductor.

El estrés oxidativo se ha relacionado con las respuestas de defensa de los frutos cítricos frente a estreses bióticos y abióticos (Sala, 1998; Sala y Lafuente, 2004; Ballester y col., 2006). En relación con la infección de hongos fitopatógenos se ha sugerido que las actividades SOD, POX insoluble y PAL estarían implicadas en la respuesta de los frutos cítricos frente a la infección por *P. digitatum* (Ballester y col., 2006). Los resultados obtenidos en la micromatriz 7k parecen indicar que el tratamiento de inducción de resistencia altera los niveles de expresión de genes implicados en el estrés oxidativo. Se ha observado una reducción en la expresión de genes que codifican proteínas encargadas de la eliminación del H_2O_2 en plantas como la enzima POX y CAT y diversas enzimas implicadas en el ciclo Halliwell-Asada como APX, glutathion peroxidasa y monodeshidroascorbato reductasa. Además, dos SODs, generadoras de este compuesto oxidativo, junto con tres POXs, aumentan la expresión en el flavedo en respuesta al tratamiento inductor. Así, los cambios en la expresión de estos genes podrían estar relacionados con una acumulación de H_2O_2 que participaría como mecanismo de defensa de las plantas frente al ataque con patógenos (De Gara y col., 2003). Sin embargo, estos resultados no fueron corroborados en las hibridaciones realizadas con la micromatriz 12k.

El tratamiento de inducción de resistencia modifica la expresión de diversos genes específicamente en ambos tejidos. Así, a 1 dpt se observó una inducción de genes que codifican diversas OMTs, una naringenina-chalcona sintasa y una glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en el flavedo, mientras que en el albedo, además de OMTs, se inducen específicamente genes que codifican una proteína similar a germina, otra de unión a DNA, una cisteína sintasa y diversos citocromos P450. Se observó una inducción de la expresión de genes que codifican OMTs y citocromos P450 específicamente en el flavedo a los 3 dpt, mientras que se encontraron OMTs, germina, GST y tocoferol poliprentiltransferasa en el albedo. Los citocromos P450 están implicados en diversas rutas metabólicas que conducen a la formación de componentes estructurales (fenilpropanoides, ácidos grasos y esteroides), de moléculas señalizadoras (oxilipinas, brasinoesteroides, ácido abscísico, ácido giberélico) y compuestos de defensa (cumarinas, alcaloides, terpenos) (Schuler y col., 2006). Los resultados obtenidos del análisis de la hibridación con la micromatriz 12k indican que 9, 8 y 6 genes que codifican citocromos P450 se inducen significativamente en el albedo a los 0, 1 y 3 dpt, respectivamente, mientras que en el flavedo aumentan la expresión de 6, 4 y 10 genes en los mismos días. Los cambios de expresión de estos genes podrían estar implicados en los mecanismos de defensa de los frutos cítricos ya que estos citocromos se han

relacionado con la síntesis de compuestos procedentes del metabolismo secundario como cumarinas (Bourgaud y col., 2006), flavonoides (Ayabe y Akashi, 2006) y compuestos fenólicos (Ehltng y col., 2006). Sin embargo, no se conoce la función de los citocromos P450 incluidos en la micromatriz 12k. Solamente dos de los 6 genes cuya expresión se induce en el albedo 1 dpt se han relacionado con la biosíntesis de benzilglucosinolato y con el flavonoide 3'-hidroxilasa (F3'H).

En este trabajo se han analizado genes que modifican la expresión en respuesta al tratamiento inductor. Sin embargo, este tratamiento consiste en una infección y posterior inactivación térmica del patógeno. Por lo tanto, se hace necesario elucidar las posibles respuestas que tienen lugar por esta infección y compararla con los cambios obtenidos en respuesta al tratamiento inductor. Así, solamente existen cinco genes en la micromatriz 7k cuya expresión aumentó significativamente en respuesta a la infección en el flavedo, pero no como consecuencia del tratamiento inductor a los 0, 1 y 3 dpt. Estos genes codifican una piro fosfatasa, una geranilgeranil difosfato sintasa, una piruvato descarboxilasa y dos proteínas sin homólogo de *A. thaliana*. Entre los genes que reducen la expresión en respuesta a la infección por *P. digitatum* y aumentan a los 0, 1 y 3 dpt se encuentra un gen que codifica una PR-5 y otro sin homólogo en *A. thaliana*. Todos los genes incluidos en la micromatriz 12k con expresión diferencial no se detectaron en uno de los dos tratamientos comparados.

Uno de los resultados más relevantes obtenidos del análisis global de la expresión génica mediante micromatrices de cDNA es que las rutas de biosíntesis de etileno y el metabolismo de fenilpropanoides parecen estar implicadas en los mecanismos de defensa de los frutos cítricos en respuesta a un tratamiento de inducción de resistencia consistente en una infección por *P. digitatum* y posterior inactivación térmica del patógeno. Estos mecanismos conducirían a la síntesis de diversos compuestos que favorecerían las barreras físicas (generación de polímeros de ligninas y/o suberinas) y químicas (síntesis de cumarinas y flavonoides) del fruto frente a la infección por *P. digitatum*

3. IMPLICACIÓN DEL ETILENO EN LAS RESPUESTAS DE DEFENSA DE LOS FRUTOS CÍTRICOS

En las plantas superiores las últimas reacciones en la biosíntesis del etileno están catalizadas por las enzimas ACS y ACO, ambas codificadas por familias multigénicas (Wang y col., 2002). Hasta el momento se han descrito

tres genes implicados en esta ruta biosintética en los frutos cítricos: *Cs-ACS1*, *Cs-ACS2* y *CsACO* (Mullins y col., 1999; Wong y col., 1999; Katz y col., 2004; Marcos y col., 2005). En las genotecas de cDNA generadas en el marco del CFGP a partir de diversos tejidos de cítricos en diferentes estados de maduración y sometidos a varios estreses, se ha detectado la presencia de otros genes que presuntamente codifican ACOs y ACSs. Mediante análisis de secuencias y búsqueda en la bases de datos del NCBI, se determinó que la secuencia nucleotídica de diversos genes obtenidos en las genotecas de cDNA de cítricos presentaban un grado de identidad elevado (superior al 95 %) con distintas proteínas de la familia de las ACOs. Así, en la micromatriz 12k se incluyeron 4 presuntos genes *ACO* (unigenes 6621, 3377, 6409 y 4356). El análisis comparativo de las secuencias nucleotídicas de estos genes muestra que comparten un 29-60 % de identidad entre ellos. Por lo tanto, esta diferencia en la secuencia nucleotídica indicaría que estos 4 genes incluidos en la micromatriz 12k serían diferentes y no se trata de variantes alélicas. En otras especies como *Lycopersicon esculentum* (Nakatsuka y col., 1998; Sell y Hehl, 2005), *Nicotiana glutinosa* (Kim y col., 1998) y *Fragaria x ananassa* (Trainotti y col., 2005) se ha descrito el aislamiento de diversos genes que codifican ACOs. Entre los genes *ACO* incluidos en la micromatriz 12k destaca el incremento en el nivel de expresión de uno de estos genes. La expresión del unigen 3377, con una identidad del 100 % con el unigen 7230 incluido en la micromatriz 7k, y del 97 % con el gen *CsACO* (McCollum y Betz, 2001, datos no publicados) (número de acceso en NCBI: AF321533), aumenta en la corteza de naranjas 'Navelate' a los 0, 1 y 3 dpt, alcanzando una inducción máxima de 18 y 25 veces en el flavedo y el albedo, respectivamente, 24 h después de la inactivación térmica del patógeno (1 dpt). La expresión de otro gen *ACO* (unigen 6409) también se indujo en los dos tejidos. Sin embargo, otros dos unigenes (6621 y 4356) no variaron su expresión de forma significativa en respuesta al tratamiento inductor. En la micromatriz 12k estaban incluidos tres genes *ACS*, los unigenes 6055, C04027C10 y C08005B11. El unigen 6055 presenta una identidad del 99 % con el gen *Cs-ACS2* (AJ012696) (Wong y col., 1999; Katz y col., 2004), mientras que los unigenes C04027C10 y C08005B11 mostraron una identidad del 67 % entre ellos e inferior al 30 % con el gen *Cs-ACS1* (AJ12550) previamente identificado en cítricos (Wong y col., 1999; Katz y col., 2004). Solamente el gen *Cs-ACS2* se indujo ligeramente, menos de dos veces, en respuesta al tratamiento de infección más curado a 1 dpt. En la micromatriz 12k estaban incluidos otros genes implicado en la biosíntesis del etileno. Se encontraron 6 unigenes (7186, 5095, 6866, 7119, C08030G11 y

C31207B09) que codifican SAM sintetasas, con una identidad del 31 al 78 % entre ellos. De estos, solamente los unigenes *5095*, *6866* y *C31207B09* mostraron una inducción de 1,6, 1,7 y 2,5 veces, respectivamente, en respuesta al tratamiento de inducción de resistencia a 1 dpt en ambos tejidos, siendo la inducción observada en el albedo ligeramente superior a la del flavedo. Como se deduce de los resultados obtenidos de las micromatrices, no todos los genes que codifican enzimas de la biosíntesis del etileno responden de igual forma a diversos estreses (Figura 15 y Figura 20). Este hecho ya fue constatado por Zacarías y col. (2003) y Marcos y col. (2005), que mostraron diferencias de expresión de los genes *ACS1*, *ACS2* y *ACO* en respuesta al almacenamiento de los frutos cítricos a bajas temperaturas o a la infección por *P. digitatum*, respectivamente.

Se realizó un estudio más detallado de la expresión del gen *CsACO* en respuesta al tratamiento inductor en naranjas 'Navelate' mediante hibridación Northern (Figura 23), corroborando los datos obtenidos con las micromatrices. Así, se observó una ligera inducción en la expresión de este gen en respuesta a la infección por *P. digitatum* a las 24 hpi en el flavedo y el albedo, que aumentó posteriormente con la inactivación térmica del patógeno. Los mayores niveles de expresión se observaron 24 h después del tratamiento en ambos tejidos, alcanzando una acumulación relativa de aproximadamente 52 y 92 en el flavedo y el albedo, respectivamente. Además de alcanzarse la mayor expresión 1 dpt en el albedo, también se observó la inducción más elevada en este tejido ya que no se detectó expresión del gen en el tejido interno de frutos no tratados. Este mayor nivel de expresión en ambos tejidos estaba acompañado por un incremento en la producción de etileno en estos frutos en respuesta al tratamiento inductor (Figura 25). Este aumento en la producción de etileno podría estar relacionado con la inducción de mecanismos de defensa en los frutos, incluyendo la modificación de la expresión de genes, de actividades enzimáticas o la producción de fitoalexinas. Este hecho ya fue descrito mediante el empleo de diversos sistemas de inducción de resistencia. Droby y col. (2002) mostraron que la aplicación de *C. oleophilla* incrementa la producción de etileno en pomelos y, a su vez, aumenta la expresión de genes que codifican una quitinasa y una β -1,3-glucanasa, la actividad PAL y la acumulación de fitoalexinas como escoparona, escopoletina y umbeliferona. Estos hechos se relacionaron con una menor incidencia de la infección por *P. digitatum* en esos frutos. También se ha observado un aumento transitorio en la actividad PAL en frutos cítricos tratados con etileno (Lafuente y col., 2001) o en respuesta a la infección por *P. digitatum* (McCollum, 2000), implicando al

metabolismo de fenilpropanoides en las respuestas de defensa de los cítricos frente a la infección por patógenos (Marcos y col., 2005). Además, el tratamiento previo de los frutos con etileno reduce el porcentaje de infección y el tamaño de la lesión causada por *P. digitatum* (El-Kazzaz y col., 1983; Marcos y col., 2005). Sin embargo, el tratamiento continuo durante la infección o el empleo de elevadas concentraciones de etileno aumentaban el desarrollo del patógeno en los cítricos (El-Kazzaz y col., 1983). Esto puede ser debido a que dosis elevadas o tiempos de exposición prolongados favorecerían la senescencia de los frutos, lo que facilitaría la degradación del tejido vegetal por parte del patógeno.

Además del tratamiento de inducción de resistencia, en la bibliografía se muestran datos referentes al aumento en la expresión de genes implicados en la biosíntesis del etileno y en la producción de esta hormona en frutos cítricos en respuesta a la infección por *P. digitatum* (Achilea y col., 1985a; Marcos y col., 2005). Para confirmar este hecho y comparar las respuestas de los frutos cítricos a un tratamiento inductor de resistencia con las desencadenadas frente a la infección, se planteó estudiar el efecto de dicho tratamiento tanto en la producción de etileno como en la expresión del gen *CsACO* en naranjas 'Navelina' en respuesta a la infección por *P. digitatum*. La expresión del gen *CsACO* aumentó a las 24 hpi con el desarrollo de la infección, con una acumulación relativa de aproximadamente 7 y 10 en el flavedo y el albedo de naranjas 'Navelina', respectivamente (Figura 24). Sin embargo, estos valores son superiores a los observados a las 24 hpi en naranjas 'Navelate' sometidas al tratamiento de inducción de resistencia. Además de la posible diferencia en expresión génica debida al empleo de dos variedades diferentes, este hecho podría explicarse atendiendo al tipo de muestreo realizado en cada uno de los experimentos. En el tratamiento de infección más curado se analizaron discos de 13 mm de diámetro para estudiar la inducción en zonas próximas al punto de inoculación y diluir así el efecto en la expresión génica debida a la herida realizada. Sin embargo, el muestreo con tejido de naranjas 'Navelina' infectadas con *P. digitatum* se analizaron discos de 7 mm para que el efecto que sobre la expresión génica tuviera el desarrollo de la infección no quedara diluido por el tejido adyacente.

A las 48 hpi, el tejido comienza a presentar síntomas de infección, mientras que a las 72 hpi la corteza ya está prácticamente colonizada por el patógeno. Sin embargo, la expresión del gen *CsACO* todavía es elevada, aunque ligeramente inferior a la de las 48 hpi. Además, se ha observado que la

mayor producción de etileno tenía lugar a las 48-72 h posteriores a la inoculación (Figura 25). Esta elevada producción de etileno a las 72 h, en las que el patógeno ha colonizado casi por completo el tejido de las naranjas, corroboraría la idea de que el patógeno también es capaz de producir etileno para favorecer la senescencia de los tejidos vegetales (Achilea y col., 1985a; 1985b). Estos autores mostraron que, durante los primeros estadios de la infección por *P. digitatum*, la producción de etileno procedía del fruto. Sin embargo, a medida que avanzaba la infección, el patógeno era el responsable de los elevados niveles de etileno producidos en el tejido infectado. Posteriormente, cuando el tejido está totalmente colonizado por el patógeno, la producción de etileno desciende drásticamente a las 96 hpi (Figura 25). Este hecho quedó patente al emplear discos de corteza de naranjas infectadas por *P. digitatum* que, a las 96 hpi estaban totalmente infectados por el hongo y, a este tiempo, no se detectó producción de etileno.

El tratamiento de infección y posterior inactivación térmica del patógeno también aumentó la producción de etileno en discos de naranjas, alcanzando un máximo similar al observado a las 48-72 hpi. Es de destacar el hecho que en el primer caso todo el etileno generado procedía de los frutos ya que no se detectó acumulación del rRNA 28S de *P. digitatum* en frutos sometidos al tratamiento inductor, mientras que en frutos infectados, la gran producción de etileno es debida al hongo, ya que a las 72 hpi el patógeno había colonizado el tejido hasta tal punto que apenas quedaba rRNA del fruto.

4. IMPLICACIÓN DEL METABOLISMO DE FENILPROPANOIDES EN LAS RESPUESTAS DE DEFENSA DE LOS FRUTOS CÍTRICOS

4.1. Importancia del metabolismo de fenilpropanoides en los mecanismos de inducción de resistencia de naranjas ‘Navelate’

Los estudios dirigidos a determinar la implicación del metabolismo secundario en los mecanismos de inducción de resistencia en frutos cítricos son escasos. En general, solamente se han llevado a cabo estudios en genes individuales, actividades enzimáticas o síntesis de compuestos en respuesta a distintos tratamientos. Por ejemplo, la aplicación de calor o de luz UV aumenta la concentración de fitoalexinas procedentes del metabolismo de fenilpropanoides y de proteínas PR en limones, kumquat, naranjas y pomelos (Kim y col., 1991; Rodov y col., 1992; D'hallewin y col., 2000; Pavoncello y col., 2001). Sin embargo, un estudio global de la expresión de genes implicados

en el metabolismo de fenilpropanoides y de las modificaciones en compuestos fenólicos que tienen lugar en la corteza de los frutos cítricos en respuesta a un tratamiento de inducción de resistencia aun no ha sido realizado. En el presente trabajo se ha llevado a cabo este tipo de estudio en tejido de flavedo y albedo de naranjas 'Navelate' sometidas al tratamiento inductor consistente en una infección por *P. digitatum* y posterior inactivación térmica del patógeno.

El análisis de anotación funcional por ontologías génicas obtenido a partir de los genes de la micromatriz 12k con expresión diferencial mostró que los procesos biológicos modificados significativamente en respuesta al tratamiento inductor estaban relacionados con procesos metabólicos y biosintéticos de aminoácidos, aminoácidos azufrados, de derivados de aminoácidos, de compuestos nitrogenados y de flavonoides (Tabla 29). Estos genes del flavedo y albedo cuya expresión aumentó en respuesta al tratamiento inductor forman parte de las rutas de biosíntesis de fenilpropanoides, suberina, flavonoles, metionina y ciclo de SAM (Figuras 20, 21 y 22). Por ello, se decidió profundizar en el estudio del metabolismo secundario, en concreto del metabolismo de fenilpropanoides, en frutos cítricos sometidos al tratamiento de inducción de resistencia.

Los resultados obtenidos a partir de las hibridaciones con las micromatrices mostraron una modificación en la expresión de genes del metabolismo secundario, en concreto, de la biosíntesis y metabolismo de compuestos fenólicos en el flavedo y el albedo de naranjas 'Navelate'. Los cambios en el metabolismo de fenilpropanoides podrían ser uno de los mecanismos responsables de la inducción de resistencia cuando los frutos cítricos son previamente inoculados con el patógeno ya que una infección previa modifica la expresión de genes incluidos en esta ruta metabólica. Diversos autores han sugerido la relación del metabolismo de fenilpropanoides con las respuestas de los frutos cítricos frente a diversos estreses, como la radiación gamma, la aplicación de etileno o el desarrollo de la infección por *P. digitatum* (Riov y col., 1968; McCollum, 2000; Lafuente y col., 2001; Marcos y col., 2005). Por ello, atendiendo a los resultados obtenidos a partir de las hibridaciones con las micromatrices, se decidió profundizar en el estudio de los genes implicados en esta ruta metabólica mediante análisis Northern. Además, se procedió a la determinación de la actividad enzimática PAL y POX en el flavedo y albedo de frutos cítricos infectados por *P. digitatum* y posteriormente curados.

La enzima PAL es clave en el metabolismo secundario ya que es la primera en la ruta de fenilpropanoides, que da lugar a la formación de diversos compuestos implicados en las respuestas de defensa de las plantas frente a estreses bióticos y abióticos. Sin embargo, la mayor parte de los estudios relacionados con PAL e infecciones fúngicas en frutos cítricos se han centrado en los cambios de expresión del gen en respuesta al ataque por patógenos (McCollum, 2000; Ballester y col., 2006) o en la actividad enzimática en respuesta a tratamientos de inducción de resistencia como la luz UV (Droby y col., 1993) o el empleo de elicitores químicos o biológicos (Fajardo y col., 1998). Los resultados de este trabajo ponen de manifiesto la existencia de cambios de expresión de genes que codifican PAL en respuesta a un tratamiento de infección más curado. En la micromatriz 12k se incluyen dos genes que codifican enzimas PAL (unigenes 2545 y 6764), que presentan una identidad de secuencias nucleotídicas del 70 %. Además, el unigen 6764 presenta una identidad del 99 % con el gen *FPal1* (AJ238753) (Sánchez-Ballesta y col., 2000). El estudio de la expresión de los genes incluidos en la micromatriz 12k indica que una inoculación previa con *P. digitatum* seguida de un proceso de curado favorece la acumulación del mRNA en el flavedo y el albedo de frutos a los 1 y 3 dpt, aunque el nivel de expresión de estos genes disminuye a los 3 dpt respecto a 1 dpt en ambos tejidos. Sin embargo, la mayor inducción se observó en el albedo 1 dpt, siendo 4 veces superior respecto al albedo de frutos no tratados. Estos datos fueron corroborados mediante análisis Northern del gen *PAL1* (unigen 6764).

Otros genes que codifican enzimas implicadas en la ruta de biosíntesis de fenilpropanoides (Figura 28) y en las derivaciones hacia la formación de ligninas o del dominio aromático de suberinas, flavonoides e isoflavonoides y cumarinas (Dixon y col., 2002) están incluidos en las micromatrices de cDNA. En la micromatriz 12k estaban incluidos genes como *C4H*, *4CL*, *COMT*, *CCoAOMT*, *CAD*, *SAD*, *POX*, *CCR*, lacasa, *CHS*, *F3H*, *F3'H*, flavonoide 3',5'-hidroxilasa (*F3'5'H*), la mayor parte de los cuales modificaron el nivel de expresión en respuesta al tratamiento de inducción de resistencia, especialmente a los 1 y 3 dpt. En general, los niveles de expresión de estos genes fueron ligeramente superiores en el flavedo de frutos infectados y curados a los 1 y 3 dpt. Sin embargo, las mayores inducciones se detectaron en el albedo. Esta inducción a 1 dpt llegó a ser de más de 2 veces en 7 genes que codifican una *4CL*, una *CCR*, dos *CAD*, una *IRL1*, una *F3'H* y una *F3'5'H*. Además, el número de genes implicados en el metabolismo de fenilpropanoides que se induce significativamente en respuesta al tratamiento

de inducción de resistencia fue mayor en el albedo que en el flavedo. Es interesante resaltar que de las 25 OMTs presentes en la micromatriz 12k, aproximadamente el 30 % se inducen en respuesta al tratamiento inductor en el flavedo y albedo a los 1 y 3 dpt. Diversos autores han sugerido la implicación de estas enzimas en las respuestas de defensa de las plantas frente a diversos estreses. Es el caso de un gen *COMT*, cuya expresión está regulada por las altas temperaturas en mandarinas 'Fortune' (Sánchez-Ballesta y col., 2003), o el gen *COMT II*, que responde de diferente forma a diversos estreses químicos o biológicos como la herida, MeJA, luz UV e infección por patógenos en tabaco (Toquin y col., 2003). La expresión de un grupo importante de estos genes implicados en el metabolismo de fenilpropanoides también se analizó mediante Northern (Figura 29 y Tabla 33), obteniéndose resultados similares. En general, los mayores niveles de expresión se detectaron en el flavedo de frutos infectados y curados a 1 dpt, mientras que las mayores inducciones se observaron en el albedo a 1 dpt en frutos previamente infectados. Por lo tanto, el tratamiento de inducción de resistencia podría favorecer la síntesis de compuestos fenólicos muy diversos como flavonoides, activando genes del inicio de la ruta como *4CL* y otros más específicos como *F3'H*, *F3'5'H*, *IRL1* y *OMTs*, de fenoles implicados en la síntesis de ligninas/ suberinas mediante la activación de los genes *C4H*, *CCR*, *CAD* y *OMTs* y de cumarinas fundamentalmente mediante la activación de *OMTs*.

En la Figura 43 se representa una versión resumida de la ruta del metabolismo de fenilpropanoides en la que se indica la expresión de los genes obtenida a partir del análisis Northern que están implicados en el metabolismo de fenilpropanoides en el flavedo y el albedo de naranjas 'Navelate' a 1 dpt respecto el de los frutos no tratados. Según este esquema, se observa un incremento en el nivel de expresión de aquellos genes que conducen a la formación de ligninas y del dominio aromático de suberinas en la ruta del metabolismo de compuestos fenólicos (Goujon y col., 2003), como son los genes *PAL1*, *COMT1*, *CCoAOMT1*, *CCoAOMT2*, *CAD3*, *SAD* y *POX1*. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Benhamou (2004) en los que la aplicación del agente de biocontrol *Verticillium lecanii* o de quitosano y posterior inoculación con *P. digitatum* induce respuestas de defensa en el punto de inoculación, entre los que se encuentra una deposición de callosa y lignina. Además de la implicación de algunos de estos genes en el reforzamiento de la célula mediante la formación de callosa o lignina, se ha establecido su relación con la síntesis de otros compuestos fenólicos. Es el caso de las *OMTs*, que también están implicadas en la metilación de compuestos fenólicos como

flavonoides, cumarinas o furanocumarinas (Ibrahim y col., 1998; Lluch, 2007). Estos compuestos se han asociado con los mecanismos de defensa de los frutos cítricos frente a diversos estreses como la luz UV (Kuniga y col., 2006) o la infección por patógenos (Brown y Lee Hyoung, 1993; Afek y col., 1999; D'hallewin y col., 1999). Así, Brown y Lee Hyong (1993) mostraron una correlación entre la acumulación de escoparona y ligninas y la reducción de la enfermedad causada por *Diplodia natalensis* en naranjas ‘Valencia’ tratadas con bajas concentraciones de etileno seguido de altos niveles de inóculo o viceversa.

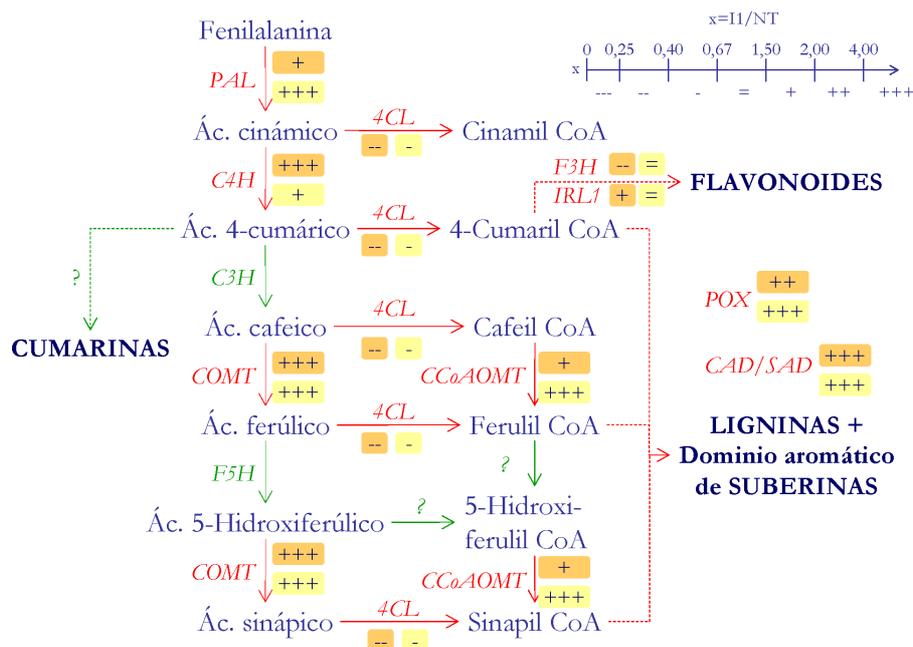


Figura 43. Ruta resumida del metabolismo de fenilpropanoides en la que se indica la expresión relativa de los genes estudiados mediante análisis Northern en el flavedo (◐) y albedo (◑) de naranjas ‘Navelate’ sometidas al tratamiento de inducción de resistencia 1 dpt (I1) respecto al de los frutos no tratados (NT), esquematizado con + (inducción) o - (represión). En rojo se muestran los genes analizados en este trabajo. (Ver abreviaturas de los genes en la Figura 28).

Aunque a nivel molecular no se han realizado muchos estudios en relación a la inducción de resistencia en frutos cítricos, sí se ha observado que en el flavedo de frutos inoculados con agentes de biocontrol se produce un

aumento de las actividades enzimáticas quitinasa, β -1,3-glucanasa, PAL y POX, así como un incremento en los niveles de las fitoalexinas escoparona y escopoletina (Fajardo y col., 1998; Droby y col., 2002). Los resultados de las determinaciones enzimáticas de PAL y POX obtenidos en este trabajo concuerdan con los publicados por estos autores. En los experimentos de inducción de resistencia se ha observado un incremento de la actividad PAL de 2 y 5 veces en el flavedo y el albedo, respectivamente, a 1 dpt en las muestras inoculadas previamente al curado (Figura 27). Sin embargo, aun siendo el aumento en la actividad mayor en el albedo que en el flavedo, el valor absoluto fue inferior en el tejido interno. Este aumento en la actividad enzimática en respuesta al tratamiento inductor se correlaciona con un incremento en la acumulación del transcrito, siendo máxima también en el albedo (Figura 29 y Tabla 33). Los mayores niveles de expresión génica y de actividad enzimática coinciden con la menor susceptibilidad del fruto a una infección posterior por *P. digitatum*, que tiene lugar a los 1 y 3 dpt. En cuanto a la actividad POX, se observaron aumentos significativos de la actividad POX soluble a los 1 y 3 dpt respecto a los frutos no tratados en los dos tejidos analizados (Figura 26). Sin embargo, estos datos no concuerdan con la expresión de genes *POX*, que fue diferente dependiendo del gen analizado. Esta diferencia podría explicarse en base a que los cambios en la actividad enzimática estarían causados por diversas *POX* y no solo por una. Mediante la hibridación con la micromatriz 12k se ha observado que, generalmente, el tratamiento de inducción de resistencia no modifica significativamente la expresión de genes *POX*. Sin embargo, de los 11 unigenes *POX* distintos incluidos en la micromatriz 7k, la expresión de 3 de estos genes disminuye hasta ser prácticamente indetectables en respuesta al tratamiento inductor. Uno de estos genes fue analizado mediante Northern (*POX2*) (Figura 29 y Tabla 33), corroborando los resultados obtenidos con la micromatriz. Además, se analizó la expresión del gen *POX1*, que no estaba incluido en ninguna de las micromatrices empleadas, cuya expresión fue diferente a la del gen *POX2*. En este caso, la expresión del gen aumentó con el tratamiento de infección más curado a los 1 y 3 dpt en los dos tejidos analizados. Es de destacar la inducción observada en el albedo a los 1 y 3 dpt ya que no se detectó expresión del gen en los frutos no tratados. Una explicación plausible a la diferencia en los niveles de expresión de estos genes es la procedencia de los mismos. El gen *POX2* fue aislado a partir de frutos de mandarina 'Fortune' pretratadas a 37 °C y posteriormente almacenadas a 2 °C, mientras que el gen *POX1* fue aislado a partir de corteza de frutos de mandarina maduros infectados por *P. digitatum* durante 24 h. Así, la expresión

de estos genes es dependiente del estrés aplicado a los frutos. En concordancia con esta hipótesis, se ha aislado el gen *CEVI-1* de plantas de tomate que codifica una POX aniónica cuya expresión se induce por infecciones virales compatibles, pero no por interacciones incompatibles o por moléculas señal como SA, MeJA o etileno (Mayda y col., 2000).

La enzima POX, al igual que PAL, puede participar en los procesos de lignificación y es inducida en diversos sistemas vegetales en respuesta a la herida. Un aumento en la actividad PAL, acumulación de ligninas y compuestos fenólicos ha sido observada en frutos cítricos heridos (Ismail y Brown, 1975; 1979; Nafussi y col., 2001). Además, Lagrimini y col. (1993) detectaron en tomate una sobreproducción de una isozima POX como consecuencia de las heridas practicadas en el fruto resultando en una acumulación de compuestos fenólicos y ligninas. Los resultados del presente trabajo ponen de manifiesto que los tratamientos de inducción de resistencia que podrían favorecer la síntesis de ligninas incrementarían la resistencia a la infección. Estudios preliminares realizados en el Laboratorio de Fisiología y Biotecnología de Postcosecha del IATA están encaminados a la determinación de ligninas en los frutos cítricos en respuesta al tratamiento inductor. Se ha observado una mayor concentración de ligninas en el albedo que en el flavedo, aunque todavía no se pueden extraer conclusiones referentes a la acumulación de este compuesto en respuesta a la infección por *P. digitatum* y posterior inactivación térmica del patógeno. Recientemente se ha descrito la acumulación de suberina de pomelos infectados por *P. digitatum* (Lai y col., 2003), por lo que no podría descartarse el hecho que el material acumulado fuera suberina ya que ambos polímeros comparten ciertos precursores.

Los estudios relativos a la composición de compuestos fenólicos en la corteza de los frutos cítricos son escasos y, en general, se refieren a frutos maduros no tratados. Se ha determinado la composición de diversas clases de compuestos fenólicos (flavonoides, derivados de cumarinas y ácidos cinámicos y psoralenos) en hojas, flavedo, albedo y aceites esenciales de diversas especies y cultivares de la familia de las Rutáceas (Berhow y col., 2005; Nogata y col., 2006). También se han analizado las concentraciones de flavanonas en algunos frutos cítricos de interés comercial (Peterson y col., 2006a; 2006b). Sin embargo, no existen trabajos relacionados con los cambios globales en compuestos fenólicos como consecuencia de diversos estreses o tratamientos que inducen resistencia en frutos cítricos. Únicamente existen estudios de este estilo referentes a modificaciones en la concentración de algunos compuestos

fenólicos, tratados de forma individualizada (Kim y col., 1991; D'hallewin y col., 1999; 2000; Arcas y col., 2000; Del Río y col., 2004). Por ello, en este trabajo, y atendiendo a los resultados obtenidos al analizar la expresión génica de los frutos en relación al tratamiento de infección y posterior inactivación térmica del patógeno, se profundizó en el estudio de los cambios en la concentración de compuestos fenólicos en el flavedo y el albedo de naranjas 'Navelate' en respuesta al tratamiento inductor.

La implicación de diversos compuestos derivados de los ácidos benzoicos que se inducen en respuesta a diversos estreses está documentada (Bellés y col., 1999; Fayos y col., 2006). Entre estos compuestos destacan el ácido salicílico y el ácido gentísico cuya acumulación, o cambios en la expresión de genes que conducen a su formación, se ha relacionado con las respuestas de las plantas frente a distintos estreses como la infección por patógenos (Yalpani y col., 1991; Bellés y col., 2006) o las bajas temperaturas (Scott y col., 2004). En este trabajo no se han detectado estos compuestos en la corteza de naranjas 'Navelate' sometidas al tratamiento de infección y posterior inactivación térmica del patógeno, aunque este tratamiento incrementó la concentración de un número elevado de compuestos tipo benzoico, especialmente a 1 dpt, en ambos tejidos.

La mayor parte de los trabajos referentes a cambios en la concentración de compuestos fenólicos en la corteza de los frutos cítricos en respuesta a tratamientos de inducción de resistencia se refieren mayoritariamente a flavonas, flavanonas y cumarinas. Así, la aplicación de luz UV (D'hallewin y col., 1999; 2000) o bicarbonato sódico (Vendetti y col., 2005) antes de infectar los frutos con *P. digitatum* incrementa la concentración de escoparona y escopoletina en la corteza de frutos cítricos. Además, el tratamiento con luz UV o la aplicación del compuesto químico 6-benzilaminopurina alteran la concentración de diversos flavonoides como naringina y algunas flavonas polimetoxiladas en la corteza de frutos de tangelo 'Nova' y *Citrus aurantium* (Arcas y col., 2000; Ortuño y col., 2002), pudiendo participar estos compuestos en la mayor resistencia de los frutos frente a una infección por patógenos fúngicos. En este trabajo se ha observado que la infección y posterior inactivación térmica del patógeno modifica la concentración de compuestos fenólicos en el flavedo y albedo de naranjas 'Navelate'. Sin embargo, las flavonas y flavanonas, aunque son compuestos abundantes en la corteza, no mostraron cambios importantes en la concentración en respuesta al tratamiento inductor.

Como se ha comentado anteriormente, las cumarinas se han relacionado tradicionalmente con la respuesta de los frutos cítricos frente a diversos estreses, tanto bióticos como abióticos. El tratamiento de inducción de resistencia empleado en este trabajo modificó la concentración de diversos compuestos con espectros similares a los de las cumarinas. Tres de estos compuestos no fueron detectados en los frutos no tratados. Uno se identificó como escoparona atendiendo al espectro y T_R del producto comercial. La concentración de escoparona aumentó en respuesta al tratamiento inductor, observándose un máximo de aproximadamente $82 \mu\text{g g}^{-1}$ PF en el flavedo 1 dpt. Sin embargo, la máxima concentración en el albedo fue más de $16 \mu\text{g g}^{-1}$ PF 3 dpt. La concentración de este compuesto en respuesta al tratamiento inductor sería superior a la concentración media efectiva de inhibición del crecimiento de *P. digitatum*, que es de aproximadamente $50 \mu\text{g g}^{-1}$ (Angioni y col., 1998). Anteriormente, Kim y col. (1991) observaron que la infección y posterior tratamiento térmico incrementa la concentración de escoparona en el flavedo de limones hasta casi $110 \mu\text{g g}^{-1}$ a las 72 hpt. Sin embargo, el curado por sí solo no incrementa la concentración de este compuesto. La concentración de escoparona en respuesta a la infección y posterior curado fue inferior a la observada en naranjas tratadas con bicarbonato e inoculadas posteriormente con *P. digitatum*, en las que se alcanzó una concentración de $382 \mu\text{g g}^{-1}$ PF a los 22 dpt (Vendetti y col., 2005). Aunque la ruta de biosíntesis de cumarinas es poco conocida, se sabe que las metilaciones y diversos citocromos P450 estarían implicados en la formación de estos compuestos (Bourgau y col., 2006). Así, el hecho del aumento en el nivel de expresión de genes que codifican OMTs, como se ha observado mediante las hibridaciones con las micromatrices y análisis Northern, podría estar relacionado con un incremento en la concentración de escoparona en respuesta al tratamiento inductor. Como se ha comentado, ensayos *in vitro* apuntaban a la implicación de la proteína codificada por el gen *COMT* en la síntesis de escoparona (Lluch, 2007). Este gen mostró un 99 % de identidad con el unigen 6305 que mostró la máxima expresión 1 dpt, coincidiendo con la mayor concentración de escoparona en el flavedo de naranjas 'Navelate'. Por ello, no podría descartarse la implicación de estos compuestos fenólicos en los mecanismos de defensa de las naranjas 'Navelate' frente al tratamiento inductor. Este hecho quedó patente al estudiar la actividad antifúngica de este compuesto (Apartado 8 de Resultados). Los experimentos llevados a cabo *in vitro* sugieren que la escoparona, junto con otras cumarinas ensayadas, retrasan el desarrollo de diversos patógenos. La cumarina más efectiva reduciendo el crecimiento de los

dos aislados de *P. digitatum* fue la umbeliferona, que redujo el valor de A_{492} a las 72 h de crecimiento hasta un 70 % respecto al control crecido en PDB. La escoparona redujo el crecimiento del aislado PHI-26 M1 de *P. digitatum* en PDB un 46 %, mientras que detuvo el desarrollo de *P. expansum* por completo. No obstante, este compuesto fue menos efectivo cuando el patógeno crecía en extracto acuoso de flavedo. Además, en este trabajo se realizaron ensayos para estudiar la actividad antifúngica de estos compuestos *in vivo*. Se observó que la aplicación de cumarinas retrasaba el crecimiento del patógeno, especialmente con la adición de escoparona y umbeliferona. Este hecho podría ser importante para la defensa de los frutos cítricos ya que éstos, aprovechando el retraso del desarrollo del patógeno, podrían ser capaces de activar otros mecanismos de defensa más eficaces que ayudarían a reducir el porcentaje de heridas infectadas y el área media de la zona macerada de una infección posterior causada por *P. digitatum*. Entre estos mecanismos de defensa podría incluirse la cicatrización de heridas ya que se ha observado que el tiempo transcurrido entre la realización de la herida y la posterior inoculación del patógeno es fundamental para reducir la susceptibilidad de los frutos a la infección por patógenos, relacionándose con un incremento en la concentración de ligninas y de compuestos fenólicos en la zona herida (Brown y col., 1978). No obstante, no puede descartarse el hecho que el material acumulado en frutos cítricos en respuesta al tratamiento inductor fuera suberina, como se ha mostrado en pomelos infectados con *P. digitatum* (Lai y col., 2003).

4.2. Implicación del metabolismo de fenilpropanoides en la respuesta de naranjas 'Navelina' frente a una infección por *P. digitatum*

Los trabajos relacionados con la expresión génica global de los frutos en respuesta a infecciones fúngicas son escasos. En fresas se han empleado las bibliotecas substractivas de cDNA para progresar en el estudio de la expresión diferencial de genes durante el proceso de infección (Casado-Díaz y col., 2006). Estos autores mostraron que genes putativamente implicados en los mecanismos de defensa de las plantas como quitinasas, POXs y β -1,3-glucanasas pueden ser reprimidos en fresa como consecuencia del ataque por el patógeno *Colletotrichum acutatum*. En cítricos no existen estudios a tal respecto. No obstante, actualmente se está llevando a cabo una tesis doctoral en el Laboratorio de Fisiología y Biotecnología de Postcosecha del IATA para profundizar en el estudio de la expresión global de genes en frutos cítricos en respuesta a la infección por *P. digitatum* mediante el empleo de macro- y micromatrices de cDNA y de bibliotecas substractivas de cDNA (González-

Candelas y col., 2005). Algunos trabajos previos han relacionado el metabolismo de fenilpropanoides con las respuestas de defensa de los cítricos frente a infecciones fúngicas (McCollum, 2000; Marcos y col., 2005). Sin embargo, estos estudios se centraban en el estudio de unos pocos genes como, por ejemplo, aquellos que codifican una PAL y una POX. Por ello, en este trabajo se planteó un estudio detallado de la implicación del metabolismo de fenilpropanoides en las respuestas de defensa de naranjas 'Navelina' a partir de tejido de flavedo y albedo con diferentes grados de colonización por *P. digitatum*. Además, este estudio serviría para poder dilucidar las diferencias existentes entre las respuestas de los frutos cítricos frente a una infección fúngica y los mecanismos de defensa inducidos por un tratamiento consistente en una infección y posterior inactivación térmica del patógeno.

En primer lugar se llevó a cabo un estudio de los cambios de expresión de genes implicados en el metabolismo de compuestos fenólicos mediante análisis Northern (Figura 30 y Tabla 34). Algunos autores habían mostrado que la herida practicada en los frutos cítricos aumenta la expresión de diversos genes, como *PAL1* y *ACR311* (gen que codifica una quitinasa) en naranjas 'Navelina' (Marcos y col., 2005) o del gen *C4H1* en naranjas 'Valencia' (Betz y col., 2001). Este hecho también quedó patente en este trabajo. Así, la herida realizada en naranjas 'Navelina' aumentó ligeramente la expresión de la mayor parte de los genes estudiados en el flavedo y/o albedo a las 24 h (Figura 30 y Tabla 34). Entre los genes que aumentan su expresión en el flavedo en respuesta a la herida se encuentran *PAL1*, *C4H1*, *C4H2*, *IRL1*, *COMT1*, *CCoAOMT2* y *CAD3*, con un máximo en ambos tejidos a las 48-72 h de haber realizado la incisión. Solamente la expresión de los genes *4CL*, *COMT3* y *POX2* aumentó específicamente en el albedo como consecuencia de la herida. La mayor parte de estos genes están implicados en la síntesis de ligninas (Humphreys y Chapple, 2002; Boerjan y col., 2003) y, como ya mostraron Brown y col. (1978), se produce una acumulación de material similar a las ligninas y de compuestos fenólicos en heridas realizadas en el flavedo de naranjas 'Valencia', observándose un máximo a las 48-72 h. No obstante, el aumento en el nivel de expresión de los genes estudiados debida a la herida generalmente era inferior a la detectada en frutos infectados con *P. digitatum*.

El desarrollo de la infección durante 48 h a 20 °C incrementó notablemente el nivel de expresión de los genes *PAL1*, *C4H1*, *COMT1*, *CCoAOMT1*, *CAD2*, *CAD3*, *SAD*, *POX1* y *CS1* en el flavedo y el albedo, mientras que la acumulación de los transcritos de los genes *4CL*, *COMT3* y

POX2 disminuyó con el desarrollo de la infección. El aumento en el nivel de expresión del gen que codifica una PAL como consecuencia de una infección por *P. digitatum* concuerda con los resultados obtenidos tanto en pomelos como en naranjas ‘Navelina’ (McCollum, 2000; Marcos y col., 2005; Ballester y col., 2006). Además, la infección por este patógeno incrementó la expresión de un gen que codifica una IRL en pomelos (Lers y col., 1998), al igual que se observó en este trabajo, cuya expresión aumentó 4,6 veces a las 72 hpi en el flavedo respecto al tejido no tratado, pero no lo hizo en el albedo. Del resto de genes no hay información disponible en cítricos, aunque se han descrito varios sistemas planta-patógeno en los que hay un aumento en la expresión de los mismos en respuesta a patógenos (Dixon y col., 2002; Saunders y O'Neill, 2004). Estos últimos autores mostraron un incremento en la expresión de genes que codifican una PAL, una IRL y una C4H en hojas de alfalfa en respuesta a la infección por *C. trifolii*.

En la Figura 44 se indica de forma resumida el nivel de expresión relativa de los genes del metabolismo de fenilpropanoides en el flavedo y el albedo de frutos infectados por *P. digitatum* durante 72 h. Como se puede apreciar, hay un importante aumento en el nivel de expresión de los genes *PAL1*, *COMT1*, *CAD3*, *SAD* y *POX1* en respuesta al desarrollo de la infección, que conducen hacia la formación de compuestos relacionados con la cicatrización de heridas en el metabolismo de fenilpropanoides (Goujon y col., 2003). Así, parece ser que la redirección de la ruta hacia la formación de dichos compuestos es un mecanismo importante de defensa de los frutos, como se ha comentado anteriormente. No obstante, también se observa un aumento en la expresión de genes que conducen a la síntesis de flavonoides, destacando la inducción del gen *IRL1* en el flavedo, y de *4CL* y *F3H* en el albedo. Por lo tanto, no podría descartarse el hecho que estos compuestos fenólicos estuvieran también implicados en la respuesta de defensa de las naranjas ‘Navelina’ frente a una infección por *P. digitatum*. Así, se han observado alteraciones en las concentraciones de algunas flavonas polimetoxiladas y flavanonas en frutos cítricos en respuesta a una infección por *P. citrophthora* (Del Río y col., 2004). Es de reseñar que algunos compuestos de estas familias inhiben el crecimiento *in vitro* de este patógeno, de *P. digitatum* y de *Geotrichum* sp. (Del Río y col., 1998; Ortuño y col., 2002; 2006).

Aunque existen trabajos encaminados a determinar la composición global de los derivados de fenilpropanoides presentes en la corteza de los frutos cítricos (Nogata y col., 2006; Peterson y col., 2006a; 2006b), se sabe poco acerca de las variaciones en compuestos fenólicos producidas en los cítricos en respuesta a una infección por patógenos (Del Río y col., 2004). Por ello, en este trabajo se ha profundizado en el estudio de los cambios en compuestos fenólicos en el flavedo y albedo de naranjas 'Navelina' infectadas con *P. digitatum* (Apartado 6.2 de Resultados).

El desarrollo de la infección durante 48-72 h aumentó específicamente la concentración de 15 y 7 compuestos derivados del ácido benzoico en el flavedo y el albedo de naranjas 'Navelina', respectivamente. Entre estos compuestos no se detectó ni el ácido salicílico ni el gentísico, relacionados previamente con la infección por patógenos en otros sistemas vegetales como *A. thaliana* (Bellés y col., 2006) o tabaco (Yalpani y col., 1991). No obstante, al igual que se ha observado en estas plantas, los resultados del presente trabajo indican que, en comparación con otros compuestos fenólicos, diversos derivados del ácido benzoico jugarían un papel importante en las respuestas de defensa de los cítricos frente a un ataque por patógenos.

El número de compuestos derivados del ácido cinámico cuya concentración aumentó o disminuyó en respuesta a la infección fue similar en un mismo tejido. Sin embargo, el número total de compuestos cuya concentración varió fue mayor en el flavedo que en el albedo. Entre los compuestos que aumentaron en respuesta a la infección en las naranjas 'Navelina' se detectó el ácido clorogénico, cuya concentración aumentó 2,8 y 2,3 veces en el flavedo y el albedo, respectivamente, a las 72 hpi. Este compuesto está presente en otros frutos como el tomate, en los que se ha observado una variación en la concentración en respuesta a la infección por *A. alternata* (Ruelas y col., 2006). Estos autores observaron, además, que este compuesto inhibe la germinación de las esporas de este patógeno, actuando como una anticipina en este fruto. En este sentido, los compuestos derivados de los ácidos cinámicos podrían participar en las respuestas de defensa de los frutos cítricos frente a una infección por patógenos actuando como fitoanticipinas, modificando la concentración mayoritariamente en el flavedo en respuesta a la infección.

Los trabajos relativos al estudio de la composición de compuestos fenólicos en la corteza de los frutos cítricos en respuesta a la infección por patógenos se han centrado en cumarinas y flavonoides. Afek y col. (1999)

detectaron un aumento en la concentración de umbeliferona en el albedo de pomelos infectados con *P. digitatum*, siendo máxima a los 4 dpi en frutos inmaduros. Sin embargo, en el presente trabajo realizado con naranjas 'Navelina' no se detectó este compuesto. Este hecho podría ser debido al estado de maduración de los frutos ya que las naranjas se cosecharon maduras y Afek y col. (1999) mostraron que la concentración de este compuesto en pomelos maduros era muy baja en comparación a la de los frutos verdes. Además de la umbeliferona, la escoparona se ha relacionado con las respuestas de defensa de los cítricos. Se ha descrito una acumulación de esta fitoalexina en frutos cítricos infectados con *P. digitatum* o *B. cinerea* (Kim y col., 1991; Vendetti y col., 2005; Kuniga y Matsumoto, 2006) o tratados con etileno e inoculados con *D. natalensis* (Brown y Lee Hyoungh, 1993). Al igual que en los frutos infectados por estos patógenos, se ha observado un aumento de la concentración de escoparona en el flavedo y albedo de naranjas 'Navelina' infectadas con *P. digitatum*, alcanzando la mayor concentración a las 72 hpi. Sin embargo, las mayores acumulaciones de este compuesto tuvieron lugar en respuesta al tratamiento de inducción de resistencia consistente en una infección y posterior inactivación térmica del patógeno, corroborando los datos obtenidos por Kim y col. (1991). La escoparona y, sobre todo, la umbeliferona retrasan el crecimiento de *P. italicum*, *P. expansum* y de los aislados PHI-26 M1 y PHI-1 M1 de *P. digitatum in vitro* (Tabla 55). La escoparona reduce un 50 % el crecimiento del aislado PHI-26 M1 de *P. digitatum* y detiene por completo el desarrollo de *P. expansum* crecido en medio PDB. Sin embargo, la umbeliferona es más efectiva frente a los dos aislados de *P. digitatum* y frente a *P. italicum*. Además, la aplicación de estos compuestos en naranjas 2 h antes de la inoculación con *P. digitatum* reduce el porcentaje de infección (Tabla 58). Por lo tanto, las cumarinas actuarían directamente sobre el patógeno retrasando el desarrollo del mismo y así el fruto podría activar entonces otros mecanismos de defensa capaces de retrasar o detener el avance de esta infección fúngica. Como se ha comentado, entre estos mecanismos de defensa estaría incluida la cicatrización de heridas, que imposibilitaría la colonización del tejido por parte del patógeno (Brown y col., 1978; Lai y col., 2003).

Además de cambios en cumarinas, se han descrito modificaciones en la concentración de flavanonas y flavonas polimetoxiladas en naranjas 'Valencia' infectadas con *P. citrophthora* (Del Río y col., 2004). Estos autores observaron un descenso en la concentración de hesperidina y narirutina a medida que avanza la infección en la corteza de los frutos, mientras que las flavonas polimetoxiladas heptametoxiflavona, nobiletina, sinensetina y tangeretina

aumentaron en el tejido infectado por el patógeno. Sin embargo, en este trabajo no se observaron cambios en las flavanonas hesperidina y narirutina en los dos tejidos de naranjas 'Navelina' estudiados. En cuanto a las flavonas polimetoxiladas, generalmente disminuyó la concentración en respuesta a la herida y no se observaron cambios significativos con el desarrollo de la infección de *P. digitatum* en ambos tejidos. Solamente se detectó un aumento significativo en la concentración de isosinensetina y hexametil-O-gosipetina en el albedo a las 72 hpi. Aunque no se han observado cambios importantes en las concentraciones de flavonas y flavanonas, no puede descartarse el hecho de que estos compuestos afecten al crecimiento de los patógenos fúngicos de cítricos. Así, Ortuño y col. (2006) observaron una reducción en el crecimiento radial de *P. digitatum in vitro* mediante la adición al medio de cultivo de hesperidina y naringina. De acuerdo con estos resultados, la adición al medio de cultivo de diversas flavanonas, especialmente de hesperidina, reducía el crecimiento de patógenos fúngicos, siendo más efectiva frente a los aislados de *P. digitatum* que frente a *P. italicum* o *P. expansum*. Sin embargo, este hecho no se detectó en ensayos *in vivo*, donde no se observó ni una disminución en el porcentaje de heridas infectadas ni un retraso en la progresión de la enfermedad.

Al igual que las cumarinas y los flavonoides, diversos alcaloides pueden tener un efecto antimicrobiano. Así, se ha demostrado que la tomatina y la solanina reducen el crecimiento *in vitro* de *S. cerevisiae* y *A. brassicicola* (Fewell y Roddick, 1993; Simons y col., 2006) y la cafeína y teobromina el de *C. pernicioso* (Aneja y Gianfagna, 2001). Estos dos últimos compuestos, junto con teofilina y paraxantina, se han detectado en flores de cítricos (Kretschmar y Baumann, 1999), mientras que en frutos y zumos de naranjas y pomelos se ha detectado la presencia de THHCA (Herraiz y Galisteo, 2003). En este trabajo se ha comprobado que el tratamiento de inducción de resistencia aumentó la expresión del gen *CS1* en el flavedo y albedo de naranjas 'Navelate' a los 0 dpt, alcanzándose un máximo 1 dpt, mientras que no se detectó en los frutos no tratados. Los resultados del análisis de compuestos fenólicos por HPLC han puesto de manifiesto que dicho tratamiento favorece la síntesis de cafeína, aunque se observaron dos compuestos fluorescentes, con máximos de absorbancia similares al de diversos alcaloides, que presentaron la máxima concentración a los 3 dpt. Por lo tanto, no se puede descartar la participación de derivados de alcaloides en los mecanismos de defensa de los frutos cítricos. Teniendo en cuenta este hecho y que el desarrollo de *P. digitatum* en naranjas 'Navelina' también aumentó la expresión del gen *CS1* en ambos tejidos y que

se detectó un compuesto con espectro similar al de los alcaloides que se indujo solamente en el flavedo, se estudió la actividad antifúngica de diversos alcaloides detectados en flores, frutos y zumo de cítricos como son cafeína, teobromina, teofilina y THHCA (Stewart, 1985; Kretschmar y Baumann, 1999; Herraiz y Galisteo, 2003) y de otros alcaloides no descritos en cítricos que poseen actividad antimicrobiana (Giuliana y col., 1999; Freile y col., 2003; Erdemoglu y col., 2007). Entre los compuestos no descritos en cítricos se seleccionaron sanguinarina, berberina, hiosciamina y escopolamina ya que son representantes de distintas subfamilias de alcaloides. La adición al medio PDB o al extracto acuoso de flavedo o de albedo de algunos de los alcaloides mencionados presentes en los cítricos, redujo significativamente el crecimiento de *P. digitatum*, siendo la cafeína y THHCA los compuestos más efectivos. Aunque estos compuestos no se han detectado en el flavedo y el albedo en este trabajo, estos resultados indicarían que otros compuestos de la familia de los alcaloides podrían estar relacionado con la defensa de los frutos al ataque por *P. digitatum*. Entre los alcaloides ensayados que no están descritos en cítricos, el más efectivo fue la sanguinarina, que inhibió por completo el desarrollo de los dos patógenos. No obstante, este compuesto no se detectó en la corteza de las naranjas en respuesta al tratamiento de inducción de resistencia o de la infección por *P. digitatum*. Es de resaltar que los alcaloides ensayados detectados en los cítricos por otros autores afecten al crecimiento de *P. digitatum*, que es un patógeno de cítricos, mientras que no afecten sustancialmente al desarrollo de *P. expansum*, que es un patógeno fúngico de frutos de pepita y hueso.

De la comparación de los cambios que se producen en compuestos fenólicos en respuesta al tratamiento de inducción de resistencia y a la infección por *P. digitatum* cabe destacar el aumento en la concentración en ambas situaciones de diversos compuestos derivados de los ácidos benzoicos, de la cumarina escoparona y de compuestos fluorescentes. Especialmente relevante fue el aumento en escoparona, cuya concentración fue mayor en las muestras sometidas al tratamiento inductor. En el flavedo, ninguno de los derivados del ácido benzoico que aumentó o disminuyó en respuesta al tratamiento de inducción de resistencia coincidió con los que cambiaron en respuesta a la infección. Sin embargo, en el albedo, uno de ellos aumentó y otro disminuyó en ambos casos. El número de compuestos derivados del ácido cinámico cuya concentración disminuyó en los dos sistemas estudiados fue mayor que aquellos que la aumentaban. Entre estos compuestos, sólo el ácido clorogénico aumentó en respuesta a ambas condiciones en el albedo. En

general, no se observaron cambios importantes en la concentración de las flavonas y flavanonas en respuesta a ambos tratamientos. Conviene señalar además que la concentración de dos de los compuestos que presentaban un máximo similar al de distintos alcaloides aumentó en respuesta al tratamiento inductor, mientras que solamente uno de éstos la incrementó con el desarrollo de la infección de *P. digitatum*.

5. COMPORTAMIENTO ESPECÍFICO DEL FLAVEDO Y EL ALBEDO EN LA INDUCCIÓN DE RESISTENCIA Y EN RESPUESTA A LA INFECCIÓN POR *P. digitatum*

Un estudio de la expresión de genes en el flavedo, albedo y zumo de mandarinas ‘Satsuma’ en diferentes estados de desarrollo mostró las diferencias en número de genes que se expresan diferencialmente en estos tejidos, aunque no aportó información sobre la identidad de dichos genes (Shimada y col., 2005). Además, existen estudios referentes a la concentración de derivados de fenilpropanoides como cumarinas, flavonas, flavanonas y flavonoles en la corteza y el zumo de frutos de diversas especies y cultivares *Citrus* (Sendra y col., 1988; Gil-Izquierdo y col., 2001; Berhow y col., 2005; Nogata y col., 2006; Peterson y col., 2006a; 2006b). Sin embargo, aun no se han estudiado conjuntamente los cambios en expresión génica y en compuestos fenólicos existentes en los dos tejidos que conforman la corteza de los frutos cítricos. Por ello, en este trabajo se planteó dicho estudio en naranjas ‘Navelina’ y ‘Navelate’ no tratadas, así como la comparación de los dos tejidos en frutos sometidos al tratamiento de infección y posterior inactivación térmica del patógeno y en frutos infectados por *P. digitatum*.

Los resultados obtenidos mediante la hibridación con la micromatriz 12k mostraron un mayor número de genes con expresión diferencial en el albedo de naranjas ‘Navelate’ en casi todas las condiciones, llegando a alcanzar una diferencia de más de 1.000 genes entre ambos tejidos en frutos infectados con *P. digitatum* y curados a 0 y 1 dpt (I0-I1). Solamente en I3 el número de genes con expresión diferencial fue mayor en el flavedo que en el albedo. Sin embargo, solamente unos pocos genes mostraron una expresión específica de tejido en todas las condiciones estudiadas. Así, entre los genes que se expresaban únicamente en el flavedo se encontraron aquellos que codifican una proteína SRG1, un transportador ABC, dos LOXs, una CCR, una CHS y una glicosil transferasa. La mayor parte de estos genes están implicados en los procesos biosintéticos de flavonoides y ligninas. Por ejemplo, *CHS* es el primer

gen en la ruta de flavonoides y cataliza la formación del esqueleto de estos compuestos por condensación de *p*-cumaril-CoA y 3 moléculas de manoil CoA (Dixon y Paiva, 1995). La proteína SRG1 está implicada en procesos biosintéticos de flavonoides y en la senescencia de los órganos (Callard y col., 1996), mientras que las LOXs se han relacionado con la biosíntesis del JA, en respuesta a herida y a estreses bióticos (Royo y col., 1996). Sin embargo, los genes expresados específicamente en el albedo en cualquiera de las situaciones estudiadas codifican las proteínas P23 y P27 del virus de la tristeza de los cítricos (CTV) y varias proteínas sin homólogos en *A. thaliana*. Cabe resaltar el hecho de la expresión de los 2 genes que codifican las proteínas del CTV ya que estos genes se añadieron en la micromatriz como controles negativos, por lo que no se esperarían cambios en la expresión de los mismos. Esta expresión específica en el tejido interno podría significar que los árboles de los cuales se obtuvieron las naranjas 'Navelate' estaban infectados con este virus y que este patógeno se localiza en el albedo pero no en el flavedo de estos frutos. Sin embargo, en este trabajo no se ha confirmado la presencia de este virus en la corteza de los cítricos por métodos alternativos. El análisis de anotación funcional mostró diferencias entre ambos tejidos. Así, se observó una sobrerrepresentación de los procesos biosintéticos y metabólicos de macromoléculas y compuestos secundarios como fenilpropanoides, flavonoides y derivados de aminoácidos, en el tejido externo (Tabla 31). Esta sobrerrepresentación de rutas del metabolismo secundario y de genes implicados en la biosíntesis de flavonoides y ligninas que se expresan específicamente en el flavedo se correlaciona con que el tejido externo es un tejido más resistente que el albedo y que el tejido que debería actuar con mayor intensidad para detener una infección por patógenos sería el interno.

Estas diferencias también han sido patentes en los análisis Northern de genes implicados en el metabolismo de fenilpropanoides (Apartado 5 de Resultados). En general, los niveles de expresión fueron mayores en el flavedo que en el albedo y en las naranjas 'Navelina' mayores que en las 'Navelate'. Solamente la expresión de los genes *C4H1* en naranjas 'Navelate' y el gen *CAD* en 'Navelina' fue mayor en el tejido interno. Como se ha comentado, las diferencias existentes entre las variedades que son fácilmente apreciables al comparar el mismo tipo de muestra, frutos infectados con *P. digitatum* durante 24 h (I24), pueden ser debidas al tipo de muestreo realizado. Así, en el caso de naranjas 'Navelate' sometidas al tratamiento de infección por *P. digitatum* y posterior inactivación térmica del patógeno se analizaron discos de 13 mm de diámetro centrados en el punto de inoculación para poder estudiar la posible

inducción de resistencia en zonas próximas y diluir el efecto de la herida, mientras que en naranjas 'Navelina' se analizaron discos de 7 mm de diámetro. En este segundo caso, al ser el diámetro más pequeño, el efecto de la infección sobre la expresión génica estaría menos diluido por el tejido adyacente.

Los genes que mostraron la mayor expresión en respuesta al tratamiento inductor o a la infección por *P. digitatum* en ambas variedades fueron *CCoAOMT2*, *POX1* y *CS1* en el flavedo y *SAD* en el albedo. En general, las mayores inducciones del nivel de expresión de los genes implicados en el metabolismo de fenilpropanoides en respuesta al tratamiento de infección y posterior inactivación térmica del patógeno se observaron a 1 dpt en el flavedo y el albedo. En respuesta al desarrollo de *P. digitatum* en la corteza de naranjas 'Navelina', las mayores inducciones se observaron en los genes *COMT1*, *CCoAOMT1*, *CAD3* y *SAD* generalmente a las 48 hpi en el flavedo y a las 72 hpi en el albedo. No obstante, el nivel de inducción fue mayor en el albedo en las dos variedades empleadas. Este hecho estaría en concordancia con los resultados obtenidos a partir de las micromatrices de cDNA en los que se observó un mayor número de genes con expresión diferencial en el albedo respecto al flavedo en la mayor parte de las situaciones analizadas. Así, los resultados obtenidos a partir de las micromatrices y de los Northern indicarían que el tejido más susceptible a la infección por patógenos, el albedo, es el que debería activar con mayor intensidad los mecanismos de defensa necesarios para intentar detener una infección por *P. digitatum* posterior.

Otro hecho que apoyaría la hipótesis que el tejido externo es menos susceptible a una infección por patógenos y que el albedo es el tejido que debe activar rápida y eficazmente los mecanismos de defensa en respuesta al tratamiento inductor se ha obtenido a partir de las determinaciones enzimáticas realizadas en este trabajo. El perfil de los cambios en la actividad PAL en respuesta al tratamiento de inducción de resistencia en naranjas 'Navelate' fue similar en ambos tejidos (Figura 27). No obstante, conviene señalar que aunque el mayor incremento en esta actividad tuvo lugar 1 dpt en respuesta al tratamiento de infección más curado en el tejido interno, la actividad enzimática en este tejido fue inferior a la del flavedo.

La mayor resistencia del flavedo ha sido clásicamente asociada con su mayor concentración en compuestos antifúngicos en el tejido coloreado (Rodov y col., 1995). La mayor concentración de compuestos en este tejido en diversas especies y variedades de cítricos fue comprobada por Berhow y col. (2005). Un resultado similar se ha obtenido en este trabajo (Apartado 6 de

Resultados). Así, en el flavedo no tratado se detecta un mayor número de compuestos tanto por el detector UV-visible como por el de fluorescencia y, en general, la concentración de los mismos es superior respecto a la observada en el albedo sano. Los compuestos mayoritarios detectados en el flavedo pertenecen a las familias de los ácidos benzoicos, cinámicos y flavonas, mientras que en el albedo son los derivados de los ácidos benzoicos y las flavanonas. En el tejido interno, además de detectarse el doble de compuestos pertenecientes a la familia de las flavanonas, la concentración de las mismas fue superior a la del tejido coloreado. En el caso de la narirutina y didimina, llegaron a ser 13 y 6 veces superior en el albedo de naranjas 'Navelate'. El flavedo posee una mayor cantidad de compuestos similares a flavonas, y éstos están en mayor concentración, pudiendo ser la concentración de sinensetina y nobiletina hasta 20 veces superior en el flavedo de naranjas 'Navelate' respecto al albedo sano. Algunos de estos compuestos como la hesperidina, naringina y las flavonas polimetoxiladas se han relacionado con un menor desarrollo de diversos hongos como *P. digitatum*, *P. citrophthora* y *Geotrichum* sp. (Del Río y col., 1998; Del Río y col., 2004; Ortuño y col., 2006), por lo que estos compuestos podrían estar relacionados con la mayor resistencia del tejido externo a la infección por patógenos. Existen evidencias de la implicación de algunas cumarinas como la escoparona, umbeliferona y escopoletina en la menor susceptibilidad de los frutos cítricos a una infección por *P. digitatum* (Angioni y col., 1998; Afek y col., 1999). En este trabajo se ha observado un aumento de escoparona en respuesta al tratamiento de infección más curado, alcanzando una concentración de aproximadamente 82 y 10 $\mu\text{g g}^{-1}$ PF 1 dpt en el flavedo y el albedo, respectivamente, que coincide con una menor susceptibilidad de las naranjas 'Navelate' a una infección por *P. digitatum*. Este hecho apoyaría la hipótesis de la menor susceptibilidad del tejido coloreado a una infección por patógenos. Es interesante señalar que el incremento en escoparona fue acompañado por un mayor nivel de expresión del unigen 6305 que muestra una identidad del 99 % con un gen *COMT* relacionado con la resistencia de los frutos al frío (Sánchez-Ballesta y col., 2003) y que está implicada en la síntesis de esta cumarina (Lluch, 2007). Junto con esta cumarina, se ha descrito un incremento en otros compuestos como citral, naringina y tangeretina en respuesta a la aplicación de diversos tratamientos inductores de resistencia como carbonatos, Brotomax y luz UV en frutos cítricos. El aumento en la concentración de estos compuestos se ha relacionado con una mayor resistencia al ataque por *P. digitatum* en estos frutos (Ben Yehoshua y col., 1992; Ortuño y col., 1997; Arcas y col., 2000; Vendetti y

col., 2005). Así, en este trabajo se ha observado una reducción en el crecimiento *in vitro* de *P. digitatum* en medio de cultivo suplementado con diversas flavanonas, especialmente hesperidina.

Kavanagh y Wood (1967) mostraron que la profundidad de las heridas se relacionaba con la colonización de *P. digitatum* en naranjas. Así, cuando las esporas de *P. digitatum* se inoculaban en heridas practicadas entre las vesículas de aceite, el hongo solamente se desarrollaba si las heridas penetraban en el albedo, por lo que el flavedo parecía ser un tejido más resistente a la infección por patógenos. Posteriormente, Rodov y col. (1995) comprobaron que la inoculación de *P. digitatum* en glándulas de aceites en limones inmaduros originó un porcentaje de infección menor que las realizadas fuera de las mismas, apoyando la hipótesis de la existencia de diversos compuestos en estas glándulas que retrasan o impiden el desarrollo del patógeno. El hecho que *P. digitatum* avance más lentamente por el flavedo de los cítricos, sugiriendo que el albedo es menos resistente al avance de la infección fue demostrado recientemente por Ballester y col. (2006) mediante el empleo de sondas específicas de *P. digitatum* y *C. sinensis*. Sin embargo, en los ensayos realizados *in vitro* empleando extracto acuoso de albedo como medio de cultivo se ha observado la menor capacidad de crecimiento de los aislados de *P. digitatum*, *P. italicum* y *P. expansum* en este medio (Apartado 8.1 de Resultados), hecho que no concuerda con un mayor avance del patógeno *in vivo*. Por lo tanto, la estructura alveolar del albedo, con amplios espacios intercelulares (Schneider, 1968; Agustí, 2000), también tendría importancia en cuanto al desarrollo del patógeno se refiere. Así, atendiendo a los resultados obtenidos en este trabajo mediante el empleo de micromatrices de cDNA, análisis Northern y HPLC, podría sugerirse que el albedo es el tejido más susceptible a una infección fúngica y éste debería responder con mayor intensidad, alterando la expresión de genes y el metabolismo de compuestos fenólicos para intentar controlar esta posible infección.

CONCLUSIONES

1. El tratamiento de inducción de resistencia en frutos cítricos, consistente en la inoculación de *P. digitatum* y su posterior inactivación térmica, constituye una herramienta adecuada para estudiar las bases fisiológicas y moleculares de la resistencia inducida frente a este patógeno.
2. El estudio transcriptómico de frutos cítricos sometidos al tratamiento de inducción de resistencia reveló un aumento significativo de la expresión de genes que codifican enzimas implicados en el metabolismo de fenilpropanoides, en la síntesis de etileno, de proteínas PR y de un grupo elevado de oxidoreductasas.
3. El tratamiento de inducción de resistencia aumentó significativamente la producción de etileno de los frutos, que fue similar a la de los frutos infectados por *P. digitatum*. Este incremento fue paralelo a la inducción de la expresión de varios genes *ACO* en el flavedo y el albedo.
4. La expresión de genes implicados en la síntesis de ligninas/suberinas, flavonoides y cumarinas, especialmente de *OMT3*, aumentó como consecuencia del tratamiento de inducción de resistencia y en respuesta a la infección por *P. digitatum*.
5. El tratamiento inductor aumentó la concentración de compuestos fenólicos, fundamentalmente de ácidos benzoicos, cumarinas y otros compuestos fluorescentes, siendo especialmente relevante la inducción de escoparona.
6. Los resultados de los análisis transcriptómicos y metabolómicos indican que las mayores inducciones tuvieron lugar en el albedo, aunque los niveles de expresión o concentración de metabolitos fueron superiores en el flavedo. Este hecho sugiere que el albedo, al ser más susceptible a la infección por *P. digitatum*, es el tejido que responde con mayor intensidad para frenar la posterior infección por este patógeno.
7. Ninguno de los compuestos fenólicos analizados *in vitro* inhibió completamente el desarrollo de *P. digitatum* a concentraciones fisiológicas. Sólo la umbeliferona y la escoparona retrasaron el crecimiento de este patógeno tanto *in vitro* como en frutos inoculados.

BIBLIOGRAFÍA

- Abadias, M., Usall, J., Teixidó, N. y Viñas, I. (2003). Liquid formulation of the postharvest biocontrol agent *Candida sake* CPA-1 in isotonic solutions. *Phytopathology*, 93 (4): 436-442.
- Achilea, O., Chalutz, E., Fuchs, Y. y Rot, I. (1985a). Ethylene biosynthesis and related physiological changes in *Penicillium digitatum* infected grapefruit (*Citrus paradisi*). *Physiological Plant Pathology*, 26 (2): 125-134.
- Achilea, O., Fuchs, Y., Chalutz, E. y Rot, I. (1985b). The contribution of host and pathogen to ethylene biosynthesis in *Penicillium digitatum*-infected citrus fruit. *Physiological Plant Pathology*, 27: 55-63.
- Afek, U., Orenstein, J., Carmeli, S., Rodov, V. y Joseph, M. B. (1999). Umbelliferone, a phytoalexin associated with resistance of immature Marsh grapefruit to *Penicillium digitatum*. *Phytochemistry*, 50 (7): 1129-1132.
- Agrios, G. N. (1997). *Plant pathology*, (4^a ed.) Academic Press Inc. San Diego, USA.
- Agustí, M. (2000). Anatomía de los cítricos. En: *Citricultura*, Agustí, M. (ed.), Ediciones Mundi-Prensa, Madrid. pp. 65-87.
- Al-Shahrour, F., Minguez, P., Tárraga, J., Montaner, D., Alloza, E., Vaquerizas, J. M., Conde, L., Blaschke, C., Vera, J. y Dopazo, J. (2006). BABELOMICS: a systems biology perspective in the functional annotation of genome-scale experiments. *Nucleic Acids Research*, 34 (suppl_2): W472-W476.
- Alabouvette, C., Olivain, C. y Steinberg, C. (2006). Biological control of plant diseases: the European situation. *European Journal of Plant Pathology*, 114 (3): 329-341.
- Aneja, M. y Gianfagna, T. (2001). Induction and accumulation of caffeine in young, actively growing leaves of cocoa (*Theobroma cacao* L.) by wounding or infection with *Crinipellis pernicioso*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 59 (1): 13-16.
- Angioni, A., Cabras, P., D'hallewin, G., Pirisi, F. M., Reniero, F. y Schirra, M. (1998). Synthesis and inhibitory activity of 7-geranoxycoumarin against *Penicillium* species in *Citrus* fruit. *Phytochemistry*, 47 (8): 1521-1525.

- Anterola, A. M. y Lewis, N. G. (2002). Trends in lignin modification: A comprehensive analysis of the effects of genetic manipulations/mutations on lignification and vascular integrity. *Phytochemistry*, 61 (3): 221-294.
- Arcas, M. C., Botía, J. M., Ortuño, A. y Del Río, J. A. (2000). UV irradiation alters the levels of flavonoids involved in the defence mechanism of *Citrus aurantium* fruits against *Penicillium digitatum*. *European Journal of Plant Pathology*, 106 (7): 617-622.
- Arras, G. (1996). Mode of action of an isolate of *Candida famata* in biological control of *Penicillium digitatum* in orange fruits. *Postharvest Biology and Technology*, 8 (3): 191-198.
- Audenaert, K., De Meyer, G. B. y Hofte, M. M. (2002). Abscisic acid determines basal susceptibility of tomato to *Botrytis cinerea* and suppresses salicylic acid-dependent signaling mechanisms. *Plant Physiology*, 128 (2): 491-501.
- Ayabe, S. y Akashi, T. (2006). Cytochrome P450s in flavonoid metabolism. *Phytochemistry Reviews*, 5 (2): 271-282.
- Bailey, B. A., Strem, M. D., Bae, H., de Mayolo, G. A. y Gultinan, M. J. (2005). Gene expression in leaves of *Theobroma cacao* in response to mechanical wounding, ethylene, and/or methyl jasmonate. *Plant Science*, 168 (5): 1247-1258.
- Ballester, A. R. (2001). Respuestas fisiológicas y moleculares de frutos cítricos frente a la infección por *Penicillium digitatum*. Trabajo Final de Carrera. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Universidad Politécnica de Valencia.
- Ballester, A. R., Lafuente, M. T. y González-Candelas, L. (2006). Spatial study of antioxidant enzymes, peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase in the citrus fruit-*Penicillium digitatum* interaction. *Postharvest Biology and Technology*, 39 (2): 115-124.
- Belhadj, A., Saigne, C., Telef, N., Cluzet, S., Bouscaut, J., Corio-Costet, M. F. y Merillon, J. M. (2006). Methyl jasmonate induces defense responses in grapevine and triggers protection against *Erysiphe necator*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (24): 9119-9125.
- Bellés, J. M., Garro, R., Fayos, J., Navarro, P., Primo, J. y Conejero, V. (1999). Gentisic acid as a pathogen-inducible signal, additional to salicylic acid for

- activation of plant defenses in tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 12 (3): 227-235.
- Bellés, J. M., Garro, R., Pallás, V., Fayos, J., Rodrigo, I. y Conejero, V. (2006). Accumulation of gentisic acid as associated with systemic infections but not with the hypersensitive response in plant-pathogen interactions. *Planta*, 223 (3): 500-511.
- 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.
- Ben Yehoshua, S., Rodov, V., Kim, J. J. y Carmeli, S. (1992). Preformed and induced antifungal materials of citrus fruit in relation to the enhancement of decay resistance by heat and ultraviolet treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40: 1217-1221.
- Ben Yehoshua, S., Rodov, V., Nafussi, B., Peretz, J. y Porat, R. (2000). Biotic and abiotic induction of resistance against pathogens in citrus fruits. *Proceedings of the International Society of Citriculture*, IX Congress: 1107-1112. Orlando, Florida 3-7 December 2000.
- Benavente-García, O., Castillo, J., Sabater, F. y Del Río, J. A. (1995). Characterization of a S-adenosyl-L-methionine - eriodictyol 4'-O-methyltransferase from *Citrus aurantium* - Developmental-changes in the levels of 4'-O-methoxyflavonoids and S-adenosyl-L-methionine - eriodictyol 4'-O-methyltransferase activity. *Plant Physiology and Biochemistry*, 33 (3): 263-271.
- Benavente-García, O., Castillo, J., Sabater, F. y Del Río, J. A. (1997). 4'-O-methyltransferase from Citrus. A comparative study in *Citrus aurantium*, *Citrus paradisi* and *Tangelo nova*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 35 (10): 785-794.
- Benhamou, N. (2004). Potential of the mycoparasite, *Verticillium lecanii*, to protect *Citrus* fruit against *Penicillium digitatum*, the causal agent of green mold: A comparison with the effect of Chitosan. *Phytopathology*, 94 (7): 639-705.
- Berhow, M., Tisserat, B., Kaness, K., y Vandercook, C. (2005). Survey of phenolic compounds produced in Citrus. *United States Department of*

- Agriculture* [On-line]. Disponible en:
<http://www.ars.usda.gov/is/np/phenolics/title.htm>.
- Berrocal-Lobo, M., Molina, A. y Solano, R. (2002). Constitutive expression of *ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1* in *Arabidopsis* confers resistance to several necrotrophic fungi. *The Plant Journal*, 29 (1): 23-32.
- Betz, C., McCollum, T. G. y Mayer, R. T. (2001). Differential expression of two cinnamate 4-hydroxylase genes in 'Valencia' orange (*Citrus sinensis* Osbeck). *Plant Molecular Biology*, 46 (6): 741-748.
- Bittner, M., Butow, R., DeRisi, J., Diehn, M., Eberwine, J., Epstein, C., Glynne, R., Grimmond, S., Ideker, T., Kacharina, J. E., Katsabanis, S., Khan, J., Lee, J., Liu, C. L., Marciano, P., Marincola, F. M., McInstosh, T., Monte, D., Pollack, J. R., Rhodius, V., Somerville, S., Tom, E., Wang, E., Wei, J. S., Willhite, D. y Ybarra, S. (2002). Expression analysis of RNA. En: *DNA Microarrays: A molecular cloning manual*, Bowtell, D. y Sambrook, J. (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. pp. 110-228.
- Boerjan, W., Ralph, J. y Baucher, M. (2003). Lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*, 54: 519-546.
- Boller, T. y Keen, N. T. (2001). Resistance genes and the perception and transduction of elicitors signals in host-pathogen interactions. En: *Mechanisms of resistance to plant diseases*, Slusarenko, A. J., Frase, R. S. S., y van Loon, L. C. (eds.), Kluwer Academic Publisher, Dordrecht (The Netherlands). pp. 189-229.
- Bonaterra, A., Mari, M., Casalini, L. y Montesinos, E. (2003). Biological control of *Monilinia laxa* and *Rhizopus stolonifer* in postharvest of stone fruit by *Pantoea agglomerans* EPS125 and putative mechanisms of antagonism. *International Journal of Food Microbiology*, 84 (1): 93-104.
- Bourgaud, F., Hehn, A., Larbat, R., Doerper, S., Gontier, E., Kellner, S. y Matern, U. (2006). Biosynthesis of coumarins in plants: A major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes. *Phytochemistry Reviews*, 5 (2-3): 293-308.
- Brown, G. E., Ismail, M. A. y Barmore, C. R. (1978). Lignification of injuries to citrus fruit and susceptibility to green mold. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 91: 124-126.

- Brown, G. E. y Lee Hyoung, S. (1993). Interactions of ethylene with citrus stem-end rot caused by *Diplodia natalensis*. *Phytopathology*, 83 (11): 1204-1208.
- Brunner, F., Stintzi, A., Fritig, B. y Legrand, M. (1998). Substrate specificities of tobacco chitinases. *The Plant Journal*, 14 (2): 225-234.
- Bus, V. G. (1992). ED50 levels of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* with reduced sensitivity to thiabendazole, benomyl and imazalil. *Postharvest Biology and Technology*, 1 (4): 305-315.
- Busam, G., Junghanns, K. T., Kneusel, R. E., Kassemeyer, H. H. y Matern, U. (1997). Characterization and expression of caffeoyl-coenzyme A 3-O-methyltransferase proposed for the induced resistance response of *Vitis vinifera* L. *Plant Physiology*, 115 (3): 1039-1048.
- Bussink, H. J. y Oliver, R. (2001). Identification of two highly divergent catalase genes in the fungal tomato pathogen, *Cladosporium fulvum*. *European Journal of Biochemistry*, 268 (1): 15-24.
- Caccioni, D. R. L., Guizzardi, M., Biondi, D. M., Agatino, R. y Ruberto, G. (1998). Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. *International Journal of Food Microbiology*, 43 (1-2): 73-79.
- Callard, D., Axelos, M. y Mazzolini, L. (1996). Novel molecular markers for late phases of the growth cycle of *Arabidopsis thaliana* cell-suspension cultures are expressed during organ senescence. *Plant Physiology*, 112 (2): 705-715.
- Casado-Díaz, A., Encinas-Villarejo, S., Santos, B. d. I., Schiliro, E., Yubero-Serrano, E. M., Amil-Ruíz, F., Pocovi, M. I., Pliego-Alfaro, F., Dorado, G., Rey, M., Romero, F., Muñoz-Blanco, J. y Caballero, J. L. (2006). Analysis of strawberry genes differentially expressed in response to *Colletotrichum* infection. *Physiologia Plantarum*, 128 (4): 633-650.
- CFGP. (2006). *Citrus Functional Genomics Project* [On-line]. Disponible en: <http://genomica.ibmcp.upv.es/>.
- Chappell, J. (1995). The biochemistry and molecular biology of isoprenoid metabolism. *Plant Physiology*, 107 (1): 1-6.
- Church, G. M. y Gilbert, W. (1984). Genomic sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81 (7): 1991-1995.

- Cohen, Y. (2001). The BABA story of induced resistance. *Phytoparasitica*, 29 (5): 375-378.
- Cohen, Y. (2002). β -aminobutyric acid-induced resistance against plant pathogens. *Plant Disease*, 86 (5): 448-457.
- Cohen, Y., Gisi, U. y Niderman, T. (1993). Local and systemic protection against *Phytophthora infestans* induced in potato and tomato plants by jasmonic acid and jasmonic methyl-ester. *Phytopathology*, 83 (10): 1054-1062.
- Conrath, U., Beckers, G. J. M., Flors, V., García-Agustín, P., Jakab, G., Mauch, F., Newman, M. A., Pieterse, C. M. J., Poinssot, B., Pozo, M. J., Pugin, A., Schaffrath, U., Ton, J., Wendehenne, D., Zimmerli, L. y Mauch-Mani, B. (2006). Priming: Getting ready for battle. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19 (10): 1062-1071.
- Conrath, U., Pieterse, C. M. J. y Mauch-Mani, B. (2002). Priming in plant-pathogen interactions. *Trends in Plant Science*, 7 (5): 210-216.
- Conway, W. S., Janisiewicz, W. J., Leverentz, B., Saftner, R. A. y Camp, M. J. (2007). Control of blue mold of apple by combining controlled atmosphere, an antagonist mixture, and sodium bicarbonate. *Postharvest Biology and Technology*, In Press, Corrected Proof.
- Croteau, R., Kutchan, T. M. y Lewis, N. G. (2000). Natural products (Secondary metabolites). En: *Biochemistry and molecular biology of plants*, Buchanan, B. B., Gruissem, W., y Jones, R. L. (eds.), American Society of Plant Physiologist, Rockville, Maryland, USA. pp. 1250-1318.
- D'hallewin, G., Schirra, M., Manueddu, E., Piga, A. y Ben Yehoshua, S. (1999). Scoparone and scopoletin accumulation and ultraviolet-C induced resistance to postharvest decay in oranges as influenced by harvest date. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 124 (6): 702-707.
- D'hallewin, G., Schirra, M., Pala, M. y Ben Yehoshua, S. (2000). Ultraviolet C irradiation at 0.5 kJ m⁻² reduces decay without causing damage or affecting postharvest quality of Star Ruby grapefruit (*C. paradisi* Macf.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (10): 4571-4575.
- De Gara, L., de Pinto, M. C. y Tommasi, F. (2003). The antioxidant systems vis-a-vis reactive oxygen species during plant-pathogen interaction. *Plant Physiology and Biochemistry*, 41 (10): 863-870.

- De Torres-Zabala, M., Truma, W., Bennett, M. H., Lafforgue, G., Mansfield, J. W., Rodríguez Egea, P., Bögre, L. y Grant, M. (2007). *Pseudomonas syringae* pv. tomato hijacks the *Arabidopsis abscisic acid* signalling pathway to cause disease. *EMBO Journal*, 26 (5): 1434-1443.
- De Vos, M., Van Oosten, V. R., Van Poecke, R. M. P., Van Pelt, J. A., Pozo, M. J., Mueller, M. J., Buchala, A. J., Métraux, J. P., van Loon, L. C., Dicke, M. y Pieterse, C. M. J. (2005). Signal signature and transcriptome changes of *Arabidopsis* during pathogen and insect attack. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18 (9): 923-937.
- Del Río, J. A., Arcas, M. C., Benavente-García, O. y Ortuño, A. (1998). Citrus polymethoxylated flavones can confer resistance against *Phytophthora citrophthora*, *Penicillium digitatum*, and *Geotrichum* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46 (10): 4423-4428.
- Del Río, J. A., Gómez, P., Báidez, A., Arcas, M. C., Botía, J. M. y Ortuño, A. (2004). Changes in the levels of polymethoxyflavones and flavanones as part of the defense mechanism of *Citrus sinensis* (cv. Valencia Late) fruits against *Phytophthora citrophthora*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (7): 1913-1917.
- Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R. A. y Lamb, C. (1998). Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature*, 394: 585-588.
- Díaz, J., ten Have, A. y van Kan, J. A. L. (2002). The role of ethylene and wound signaling in resistance of tomato to *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology*, 129 (3): 1341-1351.
- Dixon, M. T., Achnine, L., Kota, P., Liu, C. J., Reddy, S. y Wang, L. (2002). The phenylpropanoid pathway and plant defence- a genomics perspective. *Molecular Plant Pathology*, 3 (5): 371-390.
- Dixon, R. A. y Paiva, N. L. (1995). Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The Plant Cell*, 7 (7): 1085-1097.
- Dong, H., Delaney, T. P., Bauer, D. W. y Beer, S. V. (1999). Harpin induces disease resistance in *Arabidopsis* through the systemic acquired resistance pathway mediated by salicylic acid and the NIM1 gene. *Plant Journal*, 20 (2): 207-215.

- 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.
- Droby, S. y Chalutz, E. (1999). Biological control of postharvest decay in *Citrus* fruit. *Advances in Postharvest Diseases and Disorders Control of Citrus Fruit*, 107-122.
- Droby, S., Chalutz, E., Horev, B., Cohen, L., Gaba, V., Wilson, C. L. y Wisniewski, M. (1993). Factors affecting UV-induced resistance in grapefruit against the green mold decay caused by *Penicillium digitatum*. *Plant Pathology*, 42 (3): 418-424.
- Droby, S., Cohen, L., Daus, A., Weiss, B., Horev, B., Chalutz, E., Katz, H., Keren-Tzur, M. y Shachnai, A. (1998). Commercial testing of Aspire: a yeast preparation for the biological control of postharvest decay of citrus. *Biological Control*, 12 (2): 97-101.
- Droby, S., Porat, R., Cohen, L., Weiss, B., Shapiro, B., Philosoph-Hadas, S. y Meir, S. (1999). Suppressing green mold decay in grapefruit with postharvest jasmonate application. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 124 (2): 184-188.
- Droby, S., Vinokur, V., Weiss, B., Cohen, L., Daus, A., Goldschmidt, E. E. y Porat, R. (2002). Induction of resistance to *Penicillium digitatum* in grapefruit by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. *Phytopathology*, 92 (4): 393-399.
- Dubery, I. A. (1992). Elicitation of enhanced phenylpropanoid metabolism in citrus flavedo by gamma-radiation. *Phytochemistry*, 31 (8): 2659-2662.
- Durrant, W. E. y Dong, X. (2004). Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 42: 185-209.
- Eckert, J. W. y Ogawa, J. M. (1985). The chemical control of postharvest diseases: subtropical and tropical fruits. *Annual Review of Phytopathology*, 23: 421-454.
- Ehltling, J., Hamberger, B., Million-Rousseau, R. y Werck-Reichhart, D. (2006). Cytochromes P450 in phenolic metabolism. *Phytochemistry Reviews*, 5 (2-3): 239-270.

- El-Ghaouth, A., Smilanick, J. L. y Wilson, C. L. (2000). Enhancement of the performance of *Candida saitoana* by the addition of glycolchitosan for the control of postharvest decay of apple and citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 19 (1): 103-110.
- El-Ghaouth, A., Wilson, C. L. y Wisniewski, M. (2003). Control of postharvest decay of apple fruit with *Candida saitoana* and induction of defense responses. *Phytopathology*, 93 (3): 344-348.
- El-Kazzaz, M. K., Sommer, N. F. y Kader, A. A. (1983). Ethylene effects on *in vitro* and *in vivo* growth of certain post-harvest fruit-infecting fungi. *Phytopathology*, 73 (7): 998-1001.
- Erdemoglu, N., Ozhan, S. y Tosun, F. (2007). Alkaloid profile and antimicrobial activity of *Lupinus angustifolius* L. alkaloid extract. *Phytochemistry Reviews*, 6 (1): 197-201.
- Eulgem, T. y Somssich, I. E. (2007). Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 10 (4): 366-371.
- Fajardo, J. E., McCollum, T. G., McDonald, R. E. y Mayer, R. T. (1998). Differential induction of proteins in orange flavedo by biologically based elicitors and challenge by *Penicillium digitatum* Sacc. *Biological Control*, 13 (3): 143-151.
- Fallik, E., Grinberg, S., Alkalai, S., Yekutieli, O., Wiseblum, A., Regev, R., Beres, H. y Bar-Lev, E. (1999). A unique rapid hot water treatment to improve storage quality of sweet pepper. *Postharvest Biology and Technology*, 15 (1): 25-32.
- Fan, Q. y Tian, S. (2001). Postharvest biological control of grey mold and blue mold on apple by *Cryptococcus albidus* (Saito) Skinner. *Postharvest Biology and Technology*, 21 (3): 341-350.
- FAO. (2007). *Food and Agriculture Organization of the United Nations* [On-line]. Disponible en: <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567>.
- Fayos, J., Bellés, J. M., López-Gresa, M. P., Primo, J. y Conejero, V. (2006). Induction of gentisic acid 5-O-β-D-xylopyranoside in tomato and cucumber plants infected by different pathogens. *Phytochemistry*, 67 (2): 142-148.

- Ferreira, R. B., Monteiro, S., Freitas, R., Santos, C. N., Chen, Z., Batista, L. M., Duarte, J., Borges, A. y Teixeira, A. R. (2006). Fungal pathogens: the battle for plant infection. *Critical Reviews in Plant Science*, 25 (6): 505-524.
- Fewell, A. M. y Roddick, J. G. (1993). Interactive antifungal activity of the glycoalkaloids α -solanine and α -chaconine. *Phytochemistry*, 33 (2): 323-328.
- Flor, H. H. (1971). Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology*, 9: 275-296.
- Flors, V., Ton, J., Jakab, G. y Mauch-Mani, B. (2005). Abscisic acid and callose: Team players in defence against pathogens? *Journal of Phytopathology*, 153 (7-8): 377-383.
- Forment, J., Gadea, J., Huerta, L., Abizanda, L., Agusti, J., Alamar, S., Alos, E., Andres, F., Arribas, R., Beltrán, J. P., Berbel, A., Blazquez, M. A., Brumos, J., Canas, L. A., Cercos, M., Colmenero-Flores, J. M., Conesa, A., Establés, B., Gandia, M., García-Martínez, J. L., Gimeno, J., Gisbert, A., Gomez, G., González-Candelas, L., Granell, A., Guerri, J., Lafuente, M. T., Madueno, F., Marcos, J. F., Marques, C., Martinez, F., Martínez-Godoy, M. A., Miralles, S., Moreno, P., Navarro, L., Pallás, V., Perez-Amador, M. A., Perez-Valle, J., Pons, C., Rodrigo, I., Rodriguez, P. L., Royo, C., Serrano, R., Soler, G., Tadeo, F., Talón, M., Terol, J., Trenor, M., Vaello, L., Vicente, O., Vidal, Ch., Zacarías, L. y Conejero, V. (2005). Development of a citrus genome-wide EST collection and cDNA microarray as resources for genomic studies. *Plant Molecular Biology*, 57 (3): 375-391.
- Francés, J., Bonaterra, A., Moreno, M. C., Cabrefiga, J., Badosa, E. y Montesinos, E. (2006). Pathogen aggressiveness and postharvest biocontrol efficiency in *Pantoea agglomerans*. *Postharvest Biology and Technology*, 39 (3): 299-307.
- Freile, M. L., Giannini, F., Pucci, G., Sturniolo, A., Rodero, L., Pucci, O., Balzaret, V. y Enriz, R. D. (2003). Antimicrobial activity of aqueous extracts and of berberine isolated from *Berberis heterophylla*. *Fitoterapia*, 74 (7-8): 702-705.
- Friedrich, L., Lawton, K., Ruess, W., Masner, P., Specker, N., Rella, M. G., Meier, B., Dincher, S., Staub, T., Uknes, S., Métraux, J. P., Kessmann, H. y Ryals, J. (1996). A benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. *The Plant Journal*, 10 (1): 61-70.

- Fuchs, J. G., Möenne-Loccoz, Y. y Défago, G. (1997). Nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strain Fo47 induces resistance to Fusarium wilt in tomato. *Plant Disease*, 81 (5): 492-496.
- Gerke, V. y Moss, S. E. (2002). Annexins: From structure to function. *Physiological Reviews*, 82 (2): 331-371.
- Gil-Izquierdo, A., Gil, M. I., Ferreres, F. y Tomás-Barberán, F. A. (2001). In vitro availability of flavonoids and other phenolics in orange juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (2): 1035-1041.
- Giuliana, G., Pizzo, G., Milici, M. E. y Giangreco, R. (1999). In vitro activities of antimicrobial agents against *Candida* species. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*, 87 (1): 44-49.
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 43: 205-227.
- González-Candelas, L., Sánchez-Torres, P., Alamar, S., Establés, B., Ballester, A. R., Sánchez-Ballesta, M. T., Lluch, Y., Gosalbes, M. J., Zacarías, L., Marcos, J. F., Lafuente, M. T., Forment, J. y Granell, A. (2005). Genomic approaches to postharvest biotic and abiotic stresses of *Citrus* fruit. En: *Proceedings of the Fifth International Postharvest Symposium*, Mencarelli, F. y Tonutti, P. (eds.). pp. 247-251.
- Goujon, T., Sibout, R., Eudes, A., MacKay, J. y Joulanin, L. (2003). Genes involved in the biosynthesis of lignin precursors in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 41 (8): 677-687.
- Govrin, E. M. y Levine, A. (2000). The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current Biology*, 10 (13): 751-757.
- Gozzo, F. (2003). Systemic acquired resistance in crop protection: from nature to a chemical approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (16): 4487-4503.
- Hammerschmidt, R. (1999). Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens? *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 55 (2): 77-84.
- Hammond-Kosack, K. E. y Jones, J. D. G. (1996). Resistance gene-dependent plant defense responses. *The Plant Cell*, 8 (10): 1773-1791.

- Hammond-Kosack, K. E. y Jones, J. D. G. (2000). Responses to plant pathogens. En: *Biochemistry and molecular biology of plants*, Buchanan, B. B., Gruissem, W., y Jones, R. L. (eds.), American Society of Plant Physiologists. Rockville - Maryland - USA. pp. 1102-1156.
- Hancock, J. T., Desikan, R., Clarke, A., Hurst, R. D. y Neill, S. J. (2002). Cell signalling following plant/pathogen interactions involves the generation of reactive oxygen and reactive nitrogen species. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40 (6-8): 611-617.
- Herraiz, T. y Galisteo, J. (2003). Tetrahydro- β -carboline alkaloids occur in fruits and fruit juices. Activity as antioxidants and radical scavengers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (24): 7156-7161.
- Herrero, J., Díaz-Uriarte, R. y Dopazo, J. (2003). Gene expression data preprocessing. *Bioinformatics*, 19 (5): 655-656.
- Hofstein, R., Fridlender, B., Chalutz, E. y Droby, S. (1994). Large scale production and pilot testing of biological control agents for postharvest diseases. En: *Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables-theorie and practice*, Wilson, C. L. y Wisniewski, M. (eds.), CRC Press, Boca Ratón, FL., USA. pp. 89-100.
- Hukkanen, A. T., Kokko, H. I., Buchala, A. J., McDougall, G. J., Stewart, D., renlampi, S. O. y Karjalainen, R. O. (2007). Benzothiadiazole induces the accumulation of phenolics and improves resistance to powdery mildew in strawberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (5): 1862-1870.
- Humphreys, J. M. y Chapple, C. (2002). Rewriting the lignin roadmap. *Current Opinion in Plant Biology*, 5 (3): 224-229.
- Ibrahim, R. K., Bruneau, A. y Bantignies, B. (1998). Plant O-methyltransferases: Molecular analysis, common signature and classification. *Plant Molecular Biology*, 36 (1): 1-10.
- Ippolito, A., El-Ghaouth, A., Wilson, C. L. y Wisniewski, M. (2000). Control of postharvest decay of apple fruit by *Aureobasidium pullulans* and induction of defense responses. *Postharvest Biology and Technology*, 19 (3): 265-272.
- Ismail, M. A. y Brown, G. E. (1975). Phenolic content during healing of "Valencia" orange peel under high humidity. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 100 (3): 246-251.

- Ismail, M. A. y Brown, G. E. (1979). Postharvest wound healing in citrus fruit: induction of phenylalanine ammonia-lyase in injured 'Valencia' orange flavedo. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 104 (1): 126-129.
- Janisiewicz, W. J. y Jeffers, S. N. (1997). Efficacy of commercial formulation of two biofungicides for control of blue mold and gray mold of apples in cold storage. *Crop Protection*, 16 (7): 629-633.
- Janisiewicz, W. J. y Marchi, A. (1992). Control of storage rots on various pear cultivars with saprophytic strain of *Pseudomonas syringae*. *Plant Disease*, 76 (6): 555-560.
- 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.
- Kavanagh, J. A. y Wood, R. K. S. (1967). The role of wounds in the infection of oranges by *Penicillium digitatum* Sacc. *Annual of Applied Biology*, 60: 375-383.
- Kim, J. J., Ben Yehoshua, S., Shapiro, B., Henis, Y. y Carmeli, S. (1991). Accumulation of scoparone in heat-treated lemon fruit inoculated with *Penicillium digitatum* Sacc. *Plant Physiology*, 97: 880-885.
- Kim, Y. S., Choi, D., Lee, M. M., Lee, S. H. y Kim, W. T. (1998). Biotic and abiotic stress-related expression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene family in *Nicotiana glutinosa* L. *Plant and Cell Physiology*, 39 (6): 565-573.
- Kranz, H. D., Denekamp, M., Greco, R., Jin, H., Leyva, A., Meissner, R. C., Petroni, K., Urzainqui, A., Bevan, M., Martin, C., Smeekens, S., Tonelli, C., Paz-Ares, J. y Weisshaar, B. (1998). Towards functional characterisation of the members of the R2R3-MYB gene family from *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 16 (2): 263-276.
- Kretschmar, J. A. y Baumann, T. W. (1999). Caffeine in *Citrus* flowers. *Phytochemistry*, 52 (1): 19-23.
- Krishna, P. (2003). Brassinosteroid-mediated stress responses. *Journal of Plant Growth Regulation*, 22 (4): 289-297.

- Kuniga, T. y Matsumoto, R. (2006). Comparative study of scoparone accumulation in various citrus species after inoculation with gray mold. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 75 (5): 379-384.
- Kuniga, T., Tsumura, T., Matsuo, Y. y Matsumoto, R. (2006). Changes in scoparone concentrations in citrus cultivars after ultraviolet radiation. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 75 (4): 328-330.
- Kurtzman, C. P. y Droby, S. (2001). *Metschnikowia fructicola*, a new ascosporic yeast with potential for biocontrol of postharvest fruit rots. *Systematic and Applied Microbiology*, 24 (3): 395-399.
- Lafuente, M. T., Zacarías, L., Martínez-Téllez, M. A., Sánchez-Ballesta, M. T. y Dupille, E. (2001). 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.
- Lagrimini, L. M. y Rothstein, S. (1987). Tissue specificity of tobacco peroxidase isozymes and their induction by wounding and tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiology*, 84 (2): 438-442.
- Lagrimini, L. M., Vaughn, J., Erb, W. A. y Miller, S. A. (1993). Peroxidase overproduction in tomato - Wound-induced polyphenol deposition and disease resistance. *Hortscience: a Publication of the American Society for Horticultural Science*, 28 (3): 218-221.
- Lai, S., Lai, A., Stange, R. R., McCollum, T. G. y Schirra, M. (2003). Characterization of the wound-induced material in *Citrus paradisi* fruit peel by carbon-13 CP-MAS solid state NMR spectroscopy. *Phytochemistry*, 63 (2): 177-183.
- León, J., Yalpani, N., Raskin, I. y Lawton, M. A. (1993). Induction of benzoic acid 2-hydroxylase in virus-inoculated tobacco. *Plant Physiology*, 103 (2): 323-328.
- Lers, A., Burd, S., Lomaniec, E., Droby, S. y Chalutz, E. (1998). The expression of a grapefruit gene encoding an isoflavone reductase-like protein is induced in response to UV irradiation. *Plant Molecular Biology*, 36 (6): 847-856.

- Leubner-Metzger, G. y Meins, F. Jr. (1999). Functions and regulation of plant β -1,3-glucanases (PR-2). En: *Pathogenesis-related proteins in plants*, Datta, S. K. y Muthukrishnan, S. (eds.), CRC Press, Boca Ratón, Florida. pp. 49-76.
- Li, X., Clarke, J. D., Zhang, Y. y Dong, X. (2001). Activation of an EDS1-mediated R-gene pathway in the *snc1* mutant leads to constitutive, NPR1-independent pathogen resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14 (10): 1131-1139.
- Lisker, N., Cohen, L., Chalutz, E. y Fuchs, Y. (1983). Fungal infections suppress ethylene-induced phenylalanine ammonia-lyase activity in grapefruits. *Physiological Plant Pathology*, (3): 331-338.
- Liu, H., Jiang, W., Bi, Y. y Luo, Y. (2005). Postharvest BTH treatment induces resistance of peach (*Prunus persica* L. cv. Jiubao) fruit to infection by *Penicillium expansum* and enhances activity of fruit defense mechanisms. *Postharvest Biology and Technology*, 35 (3): 263-269.
- Lluch, Y. (2007). Bases moleculares del mecanismo de tolerancia al frío inducido por tratamientos de acondicionamiento a altas temperaturas en frutos cítricos. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia.
- López-García, B. (2002). Diseño y caracterización de péptidos antifúngicos con actividad frente a fitopatógenos. Aplicación a la conservación postcosecha. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad de Valencia.
- López-García, B., González-Candelas, L., Pérez-Payá, E. y Marcos, J. F. (2000). Identification and characterization of a hexapeptide with activity against phytopathogenic fungi that cause postharvest decay in fruits. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13 (8): 837-846.
- Lorenzo, O., Piqueras, R., Sánchez-Serrano, J. J. y Solano, R. (2003). ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *The Plant Cell*, 15 (1): 165-178.
- Lurie, S. (1998). Postharvest heat treatments. *Postharvest Biology and Technology*, 14 (3): 257-269.
- Lurie, S., Fallik, E., Handros, A. y Shapira, R. (1997). The possible involvement of peroxidase in resistance to *Botrytis cinerea* in heat treated tomato fruit. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 50 (3): 141-149.

- MAPYA. (2007). *Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación* [On-line]. Disponible en: <http://www.mapya.es>.
- Marcos, J. F., González-Candelas, L. y Zacarías, L. (2005). Involvement of ethylene biosynthesis and perception in the susceptibility of citrus fruit to *Penicillium digitatum* infection and the accumulation of defense-related mRNAs. *Journal of Experimental Botany*, 56 (148): 2183-2193.
- Mari, M., Torres, R., Casalini, L., Lamarca, N., Mandrin, J. F., Lichou, J., Larena, I., De Cal, M. A., Melgarejo, P. y Usall, J. (2007). Control of post-harvest brown rot on nectarine by *Epicoccum nigrum* and physico-chemical treatments. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87 (7): 1271-1277.
- Mayda, E., Marques, C., Conejero, V. y Vera, P. (2000). Expression of a pathogen-induced gene can be mimicked by auxin insensitivity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13 (1): 23-31.
- McCollum, T. G. (2000). Defensive proteins in grapefruit flavedo. Proceedings of the International Citrus Congress: 1113-1116. Proceedings of the International Citrus Congress.
- McDowell, J. M. y Dangl, J. L. (2000). Signal transduction in the plant immune response. *Trends in Biochemical Sciences*, 25 (2): 79-82.
- Mehdy, M. C. (1994). Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiology*, 105 (2): 467-472.
- Mercier, J., Roussel, D., Charles, M. T. y Arul, J. (2000). Systemic and local responses associated with UV- and pathogen-induced resistance to *Botrytis cinerea* in stored carrot. *Phytopathology*, 90: 981-986.
- Métraux, J. P. (2001). Systemic acquired resistance and salicylic acid: current state of knowledge. *European Journal of Plant Pathology*, 107 (1): 13-18.
- Métraux, J. P. (2002). Recent breakthroughs in the study of salicylic acid biosynthesis. *Trends in Plant Science*, 7 (8): 332-334.
- Moerschbacher, B. y Mendgen, K. (2001). Structural aspects of defense. En: *Mechanism of resistance to plant diseases*, Slusarenko, A. J., Frase, R. S. S., y van Loon, L. C. (eds.), Kluwer Academic Publisher, Dordrecht (The Netherlands).

- Mohr, P. G. y Cahill, D. M. (2007). Suppression by ABA of salicylic acid and lignin accumulation and the expression of multiple genes, in *Arabidopsis* infected with *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Functional and Integrative Genomics*, 7 (3): 181-91.
- Montaner, D., Tárrega, J., Huerta-Cepas, J., Burguet, J., Vaquerizas, J. M., Conde, L., Minguéz, P., Vera, J., Mukherjee, S., Valls, J., Pujana, M. A. G., Alloza, E., Herrero, J., Al-Shahrour, F. y Dopazo, J. (2006). Next station in microarray data analysis: GEPAS. *Nucleic Acids Research*, 34 (2): W486-W491.
- Moss, S. E. y Morgan, R. O. (2004). The annexins. *Genome Biology*, 5 (4): 219.
- Moy, O., Qutob, D., Chapman, B. P., Atkinson, I. y Gjizzen, M. (2004). Patterns of gene expression upon infection of soybean plants by *Phytophthora sojae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17 (10): 1051-1062.
- Mueller, L. A., Zhang, P. y Rhee, S. Y. (2003). AraCyc: A biochemical pathway database for Arabidopsis. *Plant Physiology*, 132 (2): 453-460.
- Mullins, E. D., McCollum, T. G. y McDonald, R. E. (2000). Consequences on ethylene metabolism of inactivating the ethylene receptor sites in diseased on-climateric fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 19 (2): 155-164.
- Mullins, E. D., McCollum, T. G. y McDonald, R. E. (1999). Ethylene: A regulator of stress-induced ACC synthase activity in nonclimacteric fruit. *Physiologia Plantarum*, 107 (1): 1-7.
- Murphy, A. M., Holcombe, L. J. y Carr, J. P. (2000). Characteristics of salicylic acid-induced delay in disease caused by a necrotrophic fungal pathogen in tobacco. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 57 (2): 47-54.
- Mysore, K. S. y Ryu, C. M. (2004). Nonhost resistance: how much do we know? *Trends in Plant Science*, 9 (2): 97-104.
- 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, 1-aminocyclopropane-1-

- carboxylate oxidase, and ethylene receptor genes in tomato fruit during development and ripening. *Plant Physiology*, 118 (4): 1295-1305.
- Neuhaus, J. M. (1999). Plant chitinases (PR-3, PR-4, PR-8, PR-11). En: *Pathogenesis-related proteins in plants*, Datta, S. K. y Muthukrishnan, S. (eds.), CRC Press, Boca Ratón, Florida. pp. 77-105.
- Nigro, F., Ippolito, A., Lattanzio, V., Di Venere, D. y Salerno, M. (2000). Effect of ultraviolet-C light on postharvest decay of strawberry. *Journal of Plant Pathology*, 82 (1): 29-37.
- Nimchuk, Z., Eulgem, T., Holt III, B. F. y Dangl, J. L. (2003). Recognition and response in the plant immune system. *Annual Review of Genetics*, 37 (1): 579-609.
- Nogata, Y., Sakamoto, K., Shiratsuchi, H., Ishii, T., Yano, M. y Ohta, H. (2006). Flavonoid composition of fruit tissues of Citrus species. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 70 (1): 178-192.
- Nürberger, T., Brunner, F., Kemmerling, B. y Piater, L. (2004). Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunological Reviews*, 198 (1): 249-266.
- Nürberger, T. y Lipka, V. (2005). Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. *Molecular Plant Pathology*, 6 (3): 335-345.
- Obagwu, J. y Korsten, L. (2003). Integrated control of citrus green and blue molds using *Bacillus subtilis* in combination with sodium bicarbonate or hot water. *Postharvest Biology and Technology*, 28 (1): 187-194.
- Ojala, T., Remes, S., Haansuu, P., Vuorela, H., Hiltunen, R., Haahtela, K. y Vuorela, P. (2000). Antimicrobial activity of some coumarin containing herbal plants growing in Finland. *Journal of Ethnopharmacology*, 73 (1-2): 299-305.
- Ortuño, A., Arcas, M. C., Botía, J. M., Fuster, M. D. y Del Río, J. A. (2002). Increasing resistance against *Phytophthora citrophthora* in tangelo nova fruits by modulating polymethoxyflavones levels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (10): 2836-2839.
- Ortuño, A., Báidez, A., Gómez, P., Arcas, M. C., Porras, I., García-Lidón, A. y Del Río, J. A. (2006). *Citrus paradisi* and *Citrus sinensis* flavonoids: Their

- influence in the defence mechanism against *Penicillium digitatum*. *Food Chemistry*, 98: 351-358.
- Ortuño, A., Botía, J. M., Fuster, M. D., Porras, I., García-Lidón, A. y Del Río, J. A. (1997). Effect of scoparone (6,7-dimethoxycoumarin) biosynthesis on the resistance of tangelo nova, *Citrus paradisi*, and *Citrus aurantium* fruits against *Phytophthora parasitica*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45 (7): 2740-2743.
- Palou, L., Smilanick, J. L., Usall, J. y Viñas, I. (2001). Control of postharvest blue and green molds of oranges by hot water, sodium carbonate, and sodium bicarbonate. *Plant Disease*, 85 (4): 371-376.
- Pavoncello, D., Lurie, S., Droby, S. y Porat, R. (2001). A hot water treatment induces resistance to *Penicillium digitatum* and promotes the accumulation of heat shock and pathogenesis-related proteins in grapefruit flavedo. *Physiologia Plantarum*, 111 (1): 17-22.
- Perucho, R. y Tuset, J. J. (2001). Hongos causantes del podrido en clementinas y mandarinas en postcosecha. *Levante Agrícola*, 355: 101-106.
- Peterson, J. J., Beecher, G. R., Bhagwat, S. A., Dwyer, J. T., Gebhardt, S. E., Haytowitz, D. B. y Holden, J. M. (2006a). Flavanones in grapefruit, lemons, and limes: A compilation and review of the data from the analytical literature. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19 (Supplement 1): S74-S80.
- Peterson, J. J., Dwyer, J. T., Beecher, G. R., Bhagwat, S. A., Gebhardt, S. E., Haytowitz, D. B. y Holden, J. M. (2006b). Flavanones in oranges, tangerines (mandarins), tangors, and tangelos: a compilation and review of the data from the analytical literature. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19 (Supplement 1): S66-S73.
- Plaza, P., Usall, J., Smilanick, J. L., Lamarca, N. y Viñas, I. (2004). Combining *Pantoea agglomerans* (CPA-2) and curing treatments to control established infections of *Penicillium digitatum* on lemons. *Journal of Food Protection*, 67 (4): 781-786.
- Poppe, L., Vanhoutte, S. y Höfte, M. (2003). Modes of action of *Pantoea agglomerans* CPA-2, an antagonist of postharvest pathogens on fruits. *European Journal of Plant Pathology*, 109 (9): 963-973.

- Porat, R., Lers, A., Dori, S., Cohen, L., Weiss, B., Daus, A., Wilson, C. L. y Droby, S. (1999a). Induction of chitinase and beta-1,3-endoglucanase proteins by UV irradiation and wounding in grapefruit peel tissue. *Phytoparasitica*, 27 (3): 1-6.
- Porat, R., McCollum, T. G., Vinokur, V. y Droby, S. (2002). Effects of various elicitors on the transcription of a β -1,3-endoglucanase gene in citrus fruit. *Journal of Phytopathology*, 150: 70-75.
- Porat, R., Vinokur, V., Holland, D., McCollum, T. G. y Droby, S. (2001). Isolation of a citrus chitinase cDNA and characterization of its expression in response to elicitation of fruit pathogen resistance. *Journal of Plant Physiology*, 158 (12): 1585-1590.
- Porat, R., Vinokur, V., Weiss, B., Cohen, L., Daus, A., Goldschmidt, E. E. y Droby, S. (2003). Induction of resistance to *Penicillium digitatum* in grapefruit by β -aminobutyric acid. *European Journal of Plant Pathology*, 109 (9): 901-907.
- Porat, R., Weiss, B., Cohen, L., Daus, A., Goren, R. y Droby, S. (1999b). Effects of ethylene and 1-methylcyclopropene on the postharvest qualities of 'Shamouti' oranges. *Postharvest Biology and Technology*, 15 (2): 155-163.
- Pozo, M. J., van Loon, L. C. y Pieterse, C. M. J. (2004). Jasmonates - Signals in plant-microbe interactions. *Journal of Plant Growth Regulation*, V23 (3): 211-222.
- Qin, G. Z., Tian, S. P., Xu, Y. y Wan, Y. K. (2003). Enhancement of biocontrol efficacy of antagonistic yeasts by salicylic acid in sweet cherry fruit. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 62 (3): 147-154.
- Ralph, S. G., Yueh, H., Friedmann, M., Aeschliman, D., Zeznik, J. A., Nelson, C. C., Butterfield, Y. S. N., Kirkpatrick, R., LIU, J. E. R. R., Jones, S. J. M., Marra, M. A., Douglas, C. J., Ritland, K. y Bohlmann, J. (2006). Conifer defence against insects: microarray gene expression profiling of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) induced by mechanical wounding or feeding by spruce budworms (*Choristoneura occidentalis*) or white pine weevils (*Pissodes strobi*) reveals large-scale changes of the host transcriptome. *Plant, Cell and Environment*, 29 (8): 1545-1570.
- Riov, J., Goren, R., Monselise, S. P. y Kahan, R. S. (1971). Effect of gamma radiation on the synthesis of scopoletin and scopolin in grapefruit peel in relation to radiation damage. *Radiation Research*, 45: 326-334.

- Riov, J., Monselise, S. P. y Kahan, R. S. (1968). Effect of gamma radiation on phenylalanine ammonia-lyase activity and accumulation of phenolic compounds in *Citrus* fruit peel. *Radiation Botany*, 8 (6): 463-466.
- Riov, J., Monselise, S. P. y Kahan, R. S. (1969). Ethylene-controlled induction of phenylalanine ammonia-lyase in *Citrus* fruit peel. *Plant Physiology*, 44 (5): 631-635.
- Ritenour, M., Zhang, J., Wardowski, W. F., y Brown, G. E. (2003). Postharvest decay control recommendations for Florida citrus fruit. *University of Florida* [On-line]. Disponible en: <http://edis.ifas.ufl.edu/CH081>.
- Rivera-Vargas, L. I., Schmitthenner, A. F. y Graham, T. L. (1993). Soybean flavonoid effects on and metabolism by *Phytophthora sojae*. *Phytochemistry*, 32 (4): 851-857.
- Rodov, V., Ben Yehoshua, S., Kim, J. J., Shapiro, B. y Ittah, Y. (1992). Ultraviolet illumination induces scoparone production in kumquat and orange fruit and improves decay resistance. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 117 (5): 788-792.
- Rodov, V., Ben Yehoshua, S., Qiu Fang, D., Kim, J. J. y Ashkenazi, R. (1995). Preformed antifungal compounds of lemon fruit: citral and its relation to disease resistance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43 (4): 1057-1061.
- Royo, E., Solano, R. y Sánchez-Serrano, J. (2003). Interactions between signaling compounds involved in plant defense. *Journal of Plant Growth Regulation*, V22 (1): 82-98.
- Romero-Puertas, M. C., Perazzolli, M., Zago, E. D. y Delledone, M. (2004). Nitric oxide signalling functions in plant-pathogen interactions. *Cellular Microbiology*, 6 (9): 795-803.
- Royo, J., Vancanneyt, G., Perez, A. G., Sanz, C., Stormann, K., Rosahl, S. y Sanchez-Serrano, J. J. (1996). Characterization of three potato lipoxygenases with distinct enzymatic activities and different organ-specific and wound-regulated expression patterns. *Journal of Biological Chemistry*, 271 (35): 21012-21019.
- Ruelas, C., Tiznado-Hernández, M. E., Sánchez-Estrada, A., Robles-Burgueño, M. R. y Troncoso-Rojas, R. (2006). Changes in phenolic acid content

- during *Alternaria alternata* infection in tomato fruit. *Journal of Phytopathology*, 154 (4): 236-244.
- Ryan, C. A. (2000). The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1477 (1-2): 112-121.
- Ryan, C. A. y Moura, D. S. (2002). Systemic wound signaling in plants: A new perception. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99 (10): 6519-6520.
- Saeed, A. I., Sharov, V., White, J., Li, J., Liang, W., Bhagabati, N., Braisted, J., Klapa, M., Currier, T., Thiagarajan, M., Sturn, A., Snuffin, M., Rezantsev, A., Popov, D., Ryltsov, A., Kostukovich, E., Borisovsky, I., Liu, Z., Vinsavich, A., Trush, V. y Quackenbush, J. (2003). TM4: A free, open-source system for microarray data management and analysis. *BioTechniques*, 34 (2): 374-378.
- Sala, J. M. (1998). Involvement of oxidative stress in chilling injury in cold-stored mandarin fruits. *Postharvest Biology and Technology*, 13 (3): 255-261.
- Sala, J. M. y Lafuente, M. T. (2004). Antioxidant enzymes activities and rindstaining in 'Navelina' oranges as affected by storage relative humidity and ethylene conditioning. *Postharvest Biology and Technology*, 31 (3): 277-285.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch y T. Maniatis. (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual*, (2^a ed.) Cold Spring Harbour, New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Sánchez-Ballesta, M. T., Gosalbes, M. J., Rodrigo, M. J., Granell, A., Zacarías, L. y Lafuente, M. T. (2006). Characterization of a β -1,3-glucanase from citrus fruit as related to chilling-induced injury and ethylene production. *Postharvest Biology and Technology*, 40 (2): 133-140.
- Sánchez-Ballesta, M. T., Lafuente, M. T., Zacarías, L. y Granell, A. (2000). Involvement of phenylalanine ammonia-lyase in the response of Fortune mandarin fruits to cold temperature. *Physiologia Plantarum*, 108 (4): 382-389.
- 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.

- Santos, T., Sánchez, M., Villanueva, J. R. y Nombela, C. (1979). Derepression of β -1,3-glucanases in *Penicillium italicum*: localization of the various enzymes and correlation with cell wall glucan mobilization and autolysis. *Journal of Bacteriology*, 137 (1): 6-12.
- Saunders, J. y O'Neill, N. (2004). The characterization of defense responses to fungal infection in alfalfa. *BioControl*, 49 (6): 715-728.
- Schirra, M. y Ben Yehoshua, S. (1999). Heat treatments: A possible new technology in citrus handling. En: *Advances in Postharvest Diseases and Control of Citrus Fruit*, Schirra, M. (ed.). pp. 133-147.
- Schirra, M., D'hallewin, G., Ben Yehoshua, S. y Fallik, E. (2000). Host-pathogen interactions modulated by heat treatment. *Postharvest Biology and Technology*, 21 (1): 71-85.
- Schneider, H. (1968). The anatomy of citrus. En: *The Citrus Industry. II: Anatomy, physiology, genetics and reproduction*, Reuther, W., Batchelor, L. D., y Webber, H. J. (eds.), Division of Agricultural Sciences. University of California. United States of America. pp. 1-85.
- Schuler, M., Duan, H., Bilgin, M. y Ali, S. (2006). Arabidopsis cytochrome P450s through the looking glass: a window on plant biochemistry. *Phytochemistry Reviews*, 5 (2): 205-237.
- Scott, I. M., Clarke, S. M., Wood, J. E. y Mur, L. A. J. (2004). Salicylate accumulation inhibits growth at chilling temperature in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 135 (2): 1040-1049.
- Selitrennikoff, C. P. (2001). Antifungal proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (7): 2883-2894.
- Sell, S. y Hehl, R. (2005). A fifth member of the tomato 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) oxidase gene family harbours a leucine zipper and is anaerobically induced. *DNA Sequence - Journal of DNA Sequencing and Mapping*, 16 (1): 80-82.
- Sendra, J. M., Navarro, J. L. y Izquierdo, L. (1988). C18 solid-phase isolation and high-performance liquid chromatography/ultraviolet diode array determination of fully methoxylated flavones in citrus juices. *Journal of Chromatographic Science*, 26 (9): 443-448.

- Shadle, G. L., Wesley, S. V., Korth, K. L., Chen, F., Lamb, C. y Dixon, R. A. (2003). Phenylpropanoid compounds and disease resistance in transgenic tobacco with altered expression of -phenylalanine ammonia-lyase. *Phytochemistry*, 64 (1): 153-161.
- Shimada, T., Fuiii, H., Endo, T., Yazaki, J., Kishimoto, N., Shimbo, K., Kikuchi, S. y Omura, M. (2005). Toward comprehensive expression profiling by microarray analysis in citrus: monitoring the expression profiles of 2213 genes during fruit development. *Plant Science*, 168 (5): 1383-1385.
- Simons, V., Morrissey, J. P., Latijnhouwers, M., Csukai, M., Cleaver, A., Yarrow, C. y Osbourn, A. (2006). Dual effects of plant steroidal alkaloids on *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50 (8): 2732-2740.
- Smilanick, J. L., Margosan, D. A., Mlikota, F., Usall, J. y Michael, I. F. (1999). Control of citrus green mold by carbonate and bicarbonate salts and the influence of commercial postharvest practices on their efficacy. *Plant Disease*, 83 (2): 139-145.
- Soler, M., Serra, O., Molinas, M., Huguet, G., Fluch, S. y Figueras, M. (2007). A genomic approach to suberin biosynthesis and cork differentiation. *Plant Physiology*, 144 (1): 419-431.
- Spalding, D. H. y Reeder, W. F. (1985). Effect of hot water and gamma radiation on postharvest decay fruit. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 98: 207-208.
- Stanley, W. L. y Jurd, L. (1971). Citrus coumarins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 19 (6): 1106-1110.
- Stewart, I. (1985). Identification of caffeine in citrus flowers and leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 33 (6): 1163-1165.
- Sticher, L., Mauch-Mani, B. y Métraux, J. P. (1997). Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 35: 235-270.
- Stoessl, A., Stothers, J. B. y Ward, E. W. B. (1976). Sesquiterpenoid stress compounds of the solanaceae. *Phytochemistry*, 15 (6): 855-872.
- Stracke, R., Werber, M. y Weisshaar, B. (2001). The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Current Opinion in Plant Biology*, 4 (5): 447-456.

- Takenaka, S., Nishio, Z. y Nakamura, Y. (2003). Induction of defense reactions in sugar beet and wheat by treatment with cell wall protein fractions from the mycoparasite *Pythium oligandrum*. *Phytopathology*, 93 (10): 1228-1232.
- Tao, Y., Xie, Z., Chen, W., Glazebrook, J., Chang, H. S., Han, B., Zhu, T., Zou, G. y Katagiri, F. (2003). Quantitative nature of *Arabidopsis* responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *The Plant Cell*, 15 (2): 317-330.
- Tarchevsky, I. A. (2001). Pathogen-induced plant proteins. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 37 (5): 441-455.
- Teixidó, N., Viñas, I., Usall, J. y Magan, N. (1998). Control of blue mold of apples by preharvest application of *Candida sake* grown in media with different water activity. *Phytopathology*, 88 (9): 960-964.
- Terry, L. A. y Joyce, D. C. (2004). Elicitors of induced disease resistance in postharvest horticultural crops: a brief review. *Postharvest Biology and Technology*, 32 (1): 1-13.
- Thomma, B. P. H. J., Eggermont, K., Broekaert, W. F. y Cammue, B. P. A. (2000). Disease development of several fungi on *Arabidopsis* can be reduced by treatment with methyl jasmonate. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38 (5): 421-427.
- Tian, S., Wan, Y., Qin, G. y Xu, Y. (2006). Induction of defense responses against *Alternaria* rot by different elicitors in harvested pear fruit. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70 (6): 729-734.
- Ton, J. y Mauch-Mani, B. (2004). β -amino-butyric acid-induced resistance against necrotrophic pathogens is based on ABA-dependent priming for callose. *Plant Journal*, 38 (1): 119-130.
- Toquin, V., Grausem, B., Geoffroy, P. y Legrand, M. (2003). Structure of the tobacco caffeic acid O-methyltransferase (COMT) II gene: identification of promoter sequences involved in gene inducibility by various stimuli. *Plant Molecular Biology*, 52 (3): 495-509.
- Torres, R., Nunes, C., García, J. M., Abadías, M., Viñas, I., Manso, T., Olmo, M. y Usall, J. (2007). Application of *Pantoea agglomerans* CPA-2 in combination with heated sodium bicarbonate solutions to control the

- major postharvest diseases affecting citrus fruit at several mediterranean locations. *European Journal of Plant Pathology*, 118 (1): 73-83.
- 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.
- Tsukuda, S., Gomi, K., Yamamoto, H. y Akimitsu, K. (2006). Characterization of cDNAs encoding two distinct miraculin-like proteins and stress-related modulation of the corresponding mRNAs in *Citrus jambhiri* Lush. *Plant Molecular Biology*, 60 (1): 125-136.
- Tuset, R. (1987). *Podredumbres de los frutos cítricos*, (Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias ed.) Conselleria de Agricultura y Pesca de la Generalitat Valenciana.
- Tusher, V. G., Tibshirani, R. y Chu, G. (2001). Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98 (9): 5116-5121.
- Valentines, M. C., Vilaplana, R., Torres, R., Usall, J. y Larrigaudiere, C. (2005). Specific roles of enzymatic browning and lignification in apple disease resistance. *Postharvest Biology and Technology*, 36 (3): 227-234.
- van Loon, L. C. (1997). Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *European Journal of Plant Pathology*, V103 (9): 753-765.
- van Loon, L. C., Bakker, P. A. H. M. y Pieterse, C. M. J. (1998). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 36: 453-483.
- van Loon, L. C., Rep, M. y Pieterse, C. M. J. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology*, 44 (1): 135-162.
- Vaquerizas, J. M., Dopazo, J. y Díaz-Uriarte, R. (2004). DN MAD: web-based diagnosis and normalization for microarray data. *Bioinformatics*, 20 (18): 3656-3658.
- Vendetti, T., Molinu, M. G., Dore, A., Agabbio, M. y D'hallewin, G. (2005). Sodium carbonate treatment induces scoparone accumulation, structural

- changes, and alkalization in the albedo of wounded *Citrus* fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (9): 3510-3518.
- Wang, K. L. C., Li, H. y Ecker, J. R. (2002). Ethylene biosynthesis and signaling networks. *The Plant Cell*, 14 (90001): S131-S151.
- Wei, Z. M., Laby, R. J., Zumoff, C. H., Bauer, D. W., He, S. Y., Collmer, A. y Beer, S. V. (1992). Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science*, 257 (5066): 85-88.
- Wojtaszek, P. (1997). Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochemical Journal*, 322 (3): 681-692.
- 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* Osbeck) fruit. *Plant Molecular Biology*, 41 (5): 587-600.
- Wuryatmo, E., Klieber, A. y Scott, E. S. (2003). Inhibition of citrus postharvest pathogens by vapor of citral and related compounds in culture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (9): 2637-2640.
- Xu, R., Song, F. y Zheng, Z. (2006). *OsBISAMT1*, a gene encoding S-adenosyl-L-methionine:salicylic acid carboxyl methyltransferase, is differentially expressed in rice defense responses. *Molecular Biology Reports*, 33 (3): 223-231.
- Yalpani, N., Silverman, P., Wilson, T. M., Kleier, D. A. y Raskin, I. (1991). Salicylic acid is a systemic signal and an inducer of pathogenesis-related proteins in virus-infected tobacco. *The Plant Cell*, 3 (8): 809-818.
- Yang, S. F. (1984). Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 35: 155-189.
- Yang, Y., Shah, J. y Klessing, D. F. (1997). Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes and Development*, 11: 1621-1639.
- Yao, H. J. y Tian, S. P. (2005a). Effects of a biocontrol agent and methyl jasmonate on postharvest diseases of peach fruit and the possible mechanisms involved. *Journal of Applied Microbiology*, 98 (4): 941-950.

- Yao, H. y Tian, S. (2005b). Effects of pre- and post-harvest application of salicylic acid or methyl jasmonate on inducing disease resistance of sweet cherry fruit in storage. *Postharvest Biology and Technology*, 35 (3): 253-262.
- Ye, X. Y., Wang, H. X. y Ng, T. B. (2000). Sativin: A novel antifungal miraculin-like protein isolated from legumes of the sugar snap *Pisum sativum* var. *macrocarpon*. *Life Sciences*, 67 (7): 775-781.
- Yu, T. y Zheng, X. D. (2006). Salicylic acid enhances biocontrol efficacy of the antagonist *Cryptococcus laurentii* in apple fruit. *Journal of Plant Growth Regulation*, 25 (2): 166-174.
- Zacarias, L., Lafuente, M. T., Marcos, J. F., Saladié, M. y Dupille, E. (2003). Regulation of ethylene biosynthesis during cold storage of the chilling-sensitive Fortune mandarin fruit. En: *Biology and biotechnology of the plant hormone ethylene III*, Vendrell, M., Klee, H. J., Pech, J. C., y Romojaro, F. (eds.), Amsterdam, IOS Press. pp. 112-117.
- Zhao, J., Davis, L. C. y Verpoorte, R. (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 23 (4): 283-333.
- Zheng, Z., Uchacz, T. M. y Taylor, J. L. (2001). Isolation and characterization of novel defence-related genes induced by copper, salicylic acid, methyl jasmonate, abscisic acid and pathogen infection in *Brassica carinata*. *Molecular Plant Pathology*, 2 (3): 159-169.

ANEXOS

1. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS MEDIANTE HPLC

1.1. Patrones

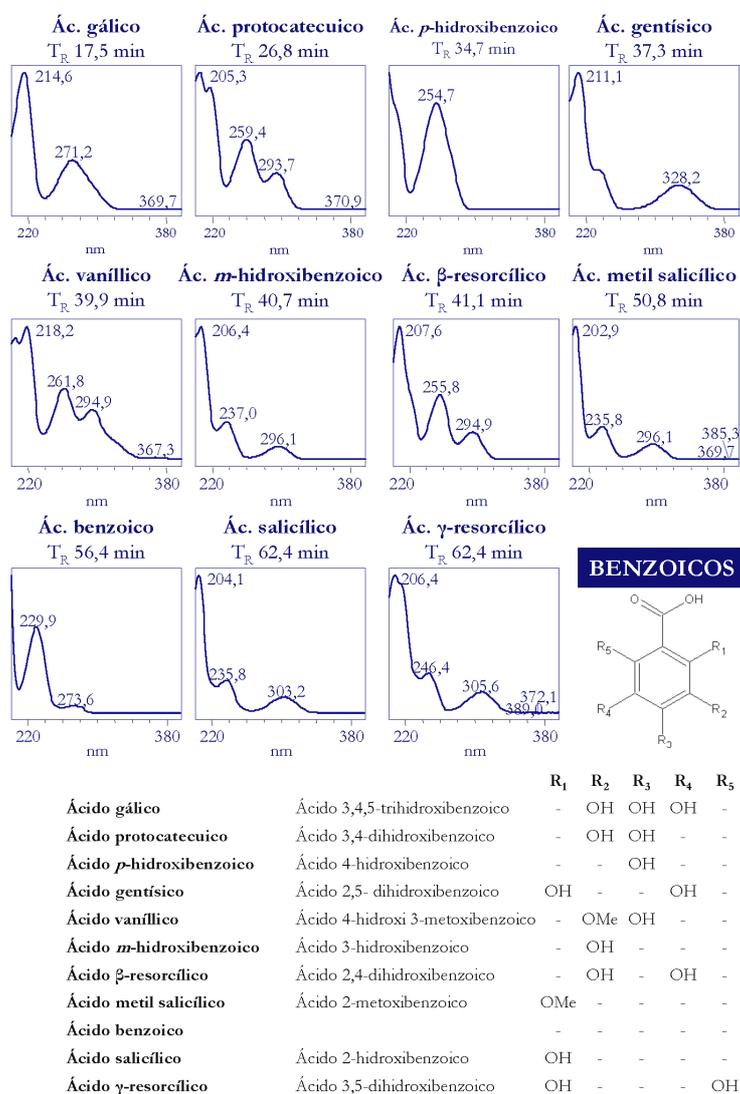
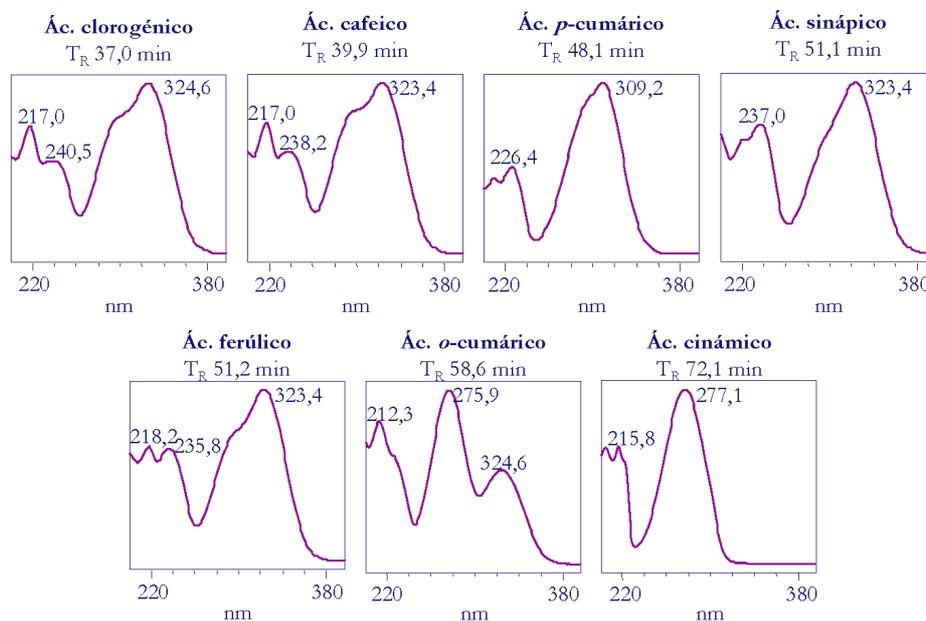
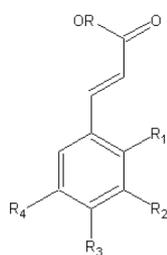


Figura- I. Espectros UV-visible y tiempo de retención (T_R) de patrones correspondientes a derivados del ácido benzoico.

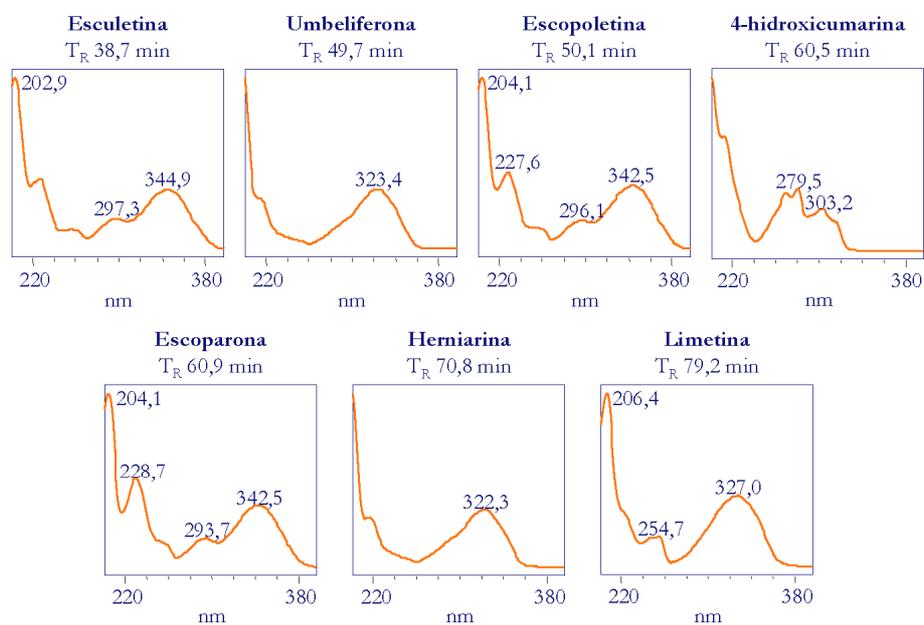


CINÁMICOS



	R	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	
Ácido clorogénico	Ác. 1,3,4,5-tetrahidrociclohexano carboxílico 3-(3,4-dihidroxicinámico)	CHC	-	OH	OH	-
Ácido cafeico	Ác. 3,4-dihidroxicinámico	-	-	OH	OH	-
Ácido p-cumárico	Ác. 4-hidroxicinámico	-	-	-	OH	-
Ácido sinápico	Ác. 3,5-metoxi 4 hidroxicinámico	-	-	OMe	OH	OMe
Ácido ferúlico	Ác. 4-hidroxi 3-metoxicinámico	-	-	OMe	OH	-
Ácido o-cumárico	Ác. 2-hidroxicinámico	-	OH	-	-	-
Ácido cinámico		-	-	-	-	-

Figura- II. Espectros UV-visible y tiempo de retención (T_R) de patrones correspondientes a derivados del ácido cinámico



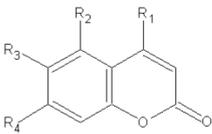
CUMARINAS	Chemical Name	Substitution	R ₁ R ₂ R ₃ R ₄			
			R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
	Esculetina	6,7-dihidroxicumarina	-	-	OH	OH
	Umbeliferona	7-hidroxicumarina	-	-	-	OH
	Escopoletina	7-hidroxi 6-metoxicumarina	-	-	CH ₃	OH
	4-hidroxicumarina		OH	-	-	-
	Escoparona	6,7-dimetoxicumarina	-	-	CH ₃	CH ₃
	Herniarina	7-metoxicumarina	-	-	-	CH ₃
	Limetina	5,7-dimetoxicumarina	-	CH ₃	-	CH ₃

Figura- III. Espectros UV-visible y tiempo de retención (T_R) de patrones correspondientes a cumarinas.

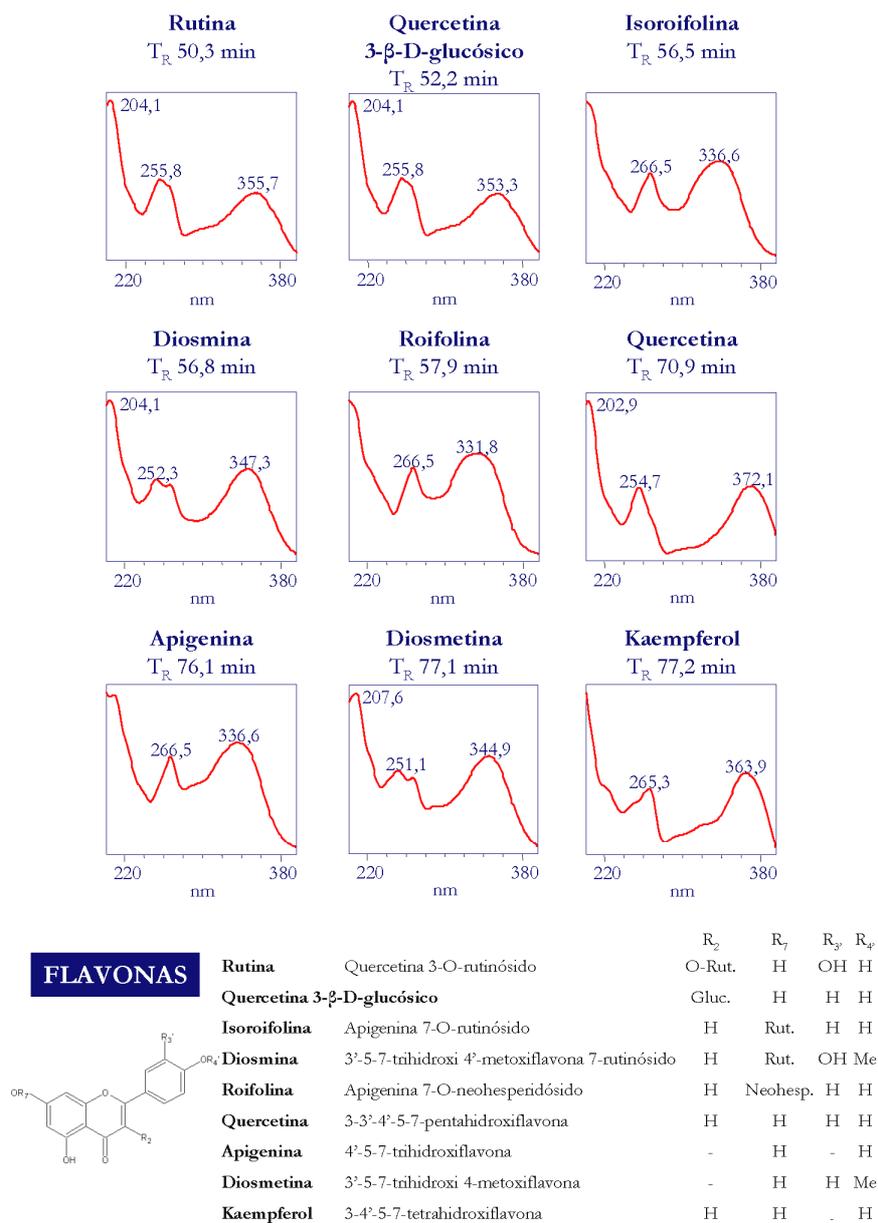
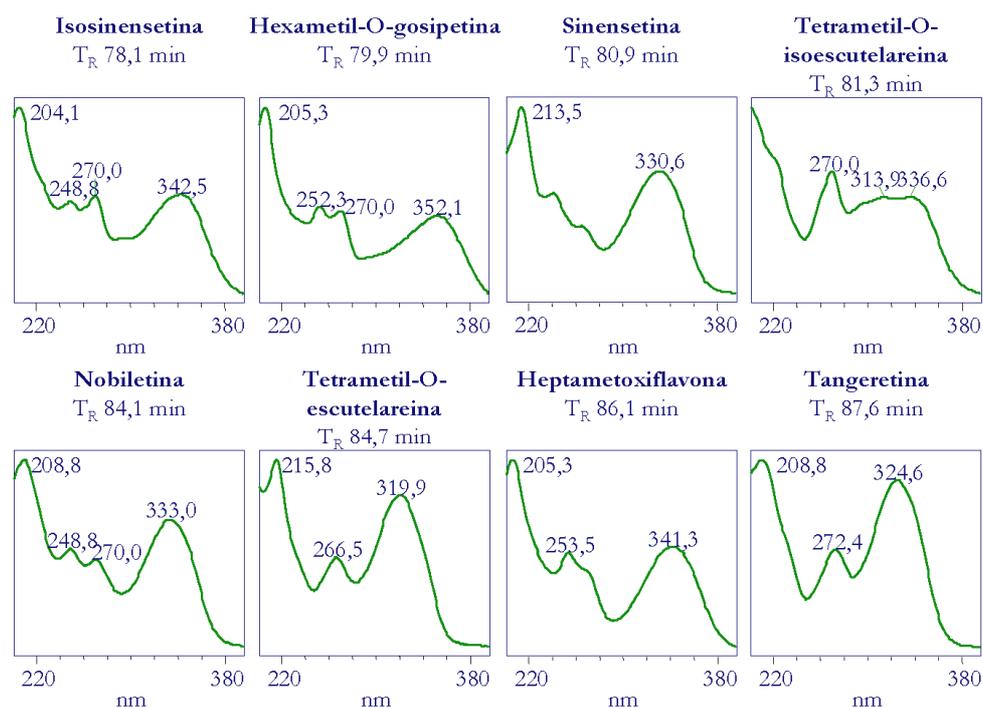
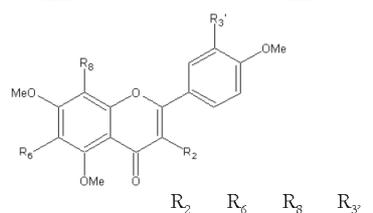


Figura- IV. Espectros UV-visible y tiempo de retención (T_R) de patrones correspondientes a flavonas.



FLAVONAS POLIMETOXILADAS



	R ₂	R ₆	R ₈	R _{3'}
Isosinensetina	3',4',5,7,8-pentametoxiflavona	H	H	OMe
Hexametil-O-gosipetina	2,3',4',5,7,8-hexametoxiflavona	OMe	H	OMe
Sinensetina	3',4',5,6,7-pentametoxiflavona	H	OMe	H
Tetrametil-O-isoescutelareina	4',5,7,8-tetrametoxiflavona	H	H	OMe
Hexametil-O-quercetagetina	2,3',4',5,6,7-hexametoxiflavona	OMe	OMe	H
Nobiletina	3',4',5,6,7,8-hexametoxiflavona	H	OMe	OMe
Tetrametil-O-escutelareina	4',5,6,7-tetrametoxiflavona	H	OMe	H
Heptametoxiflavona	2,3',4',5,6,7,9-heptametoxiflavona	OMe	OMe	OMe
Tangeretina	4',5,6,7,8-pentametoxiflavona	H	OMe	OMe

Figura- V. Espectros UV-visible y tiempo de retención (T_R) de patrones correspondientes a flavonas polimetoxiladas.

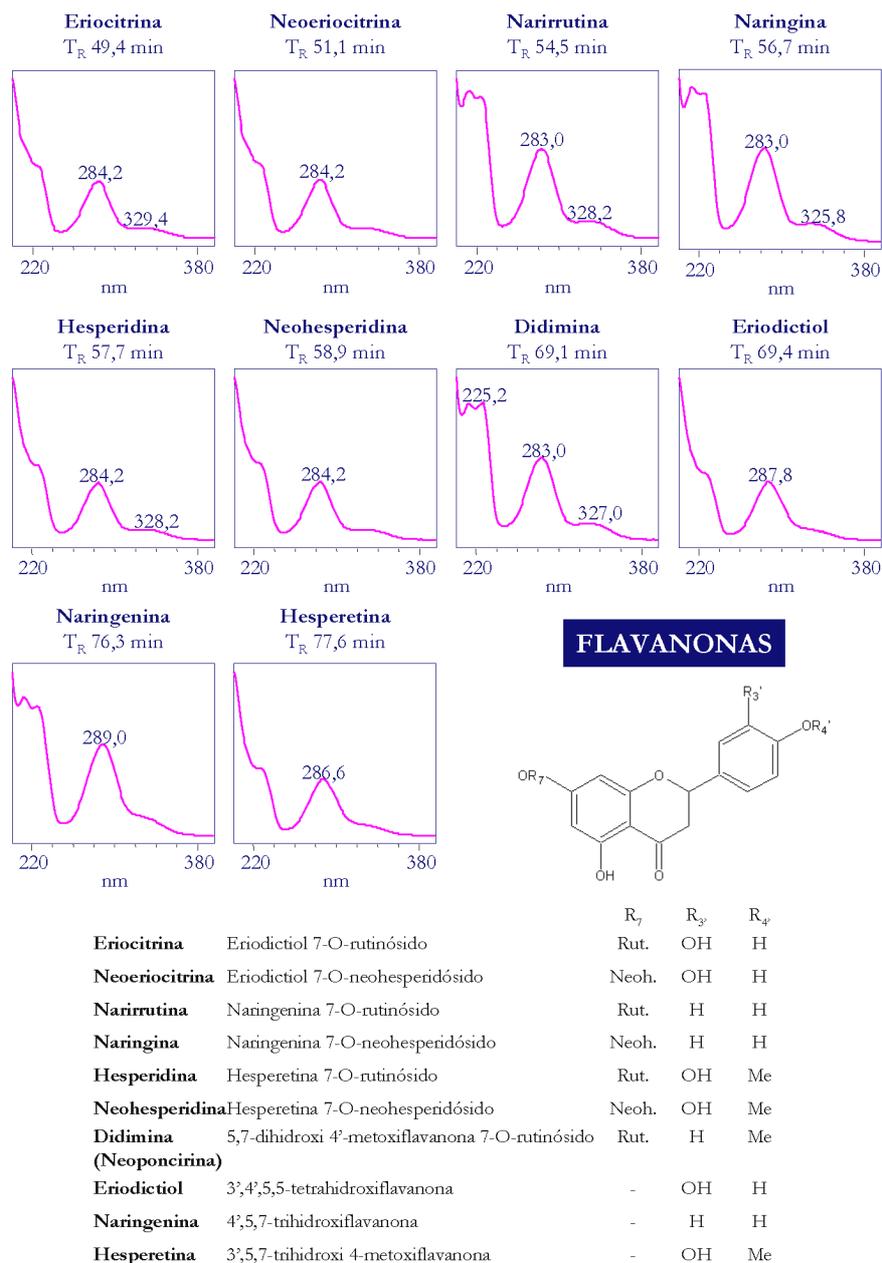


Figura- VI. Espectros UV-visible y tiempo de retención (T_R) de patrones correspondientes a flavanonas.

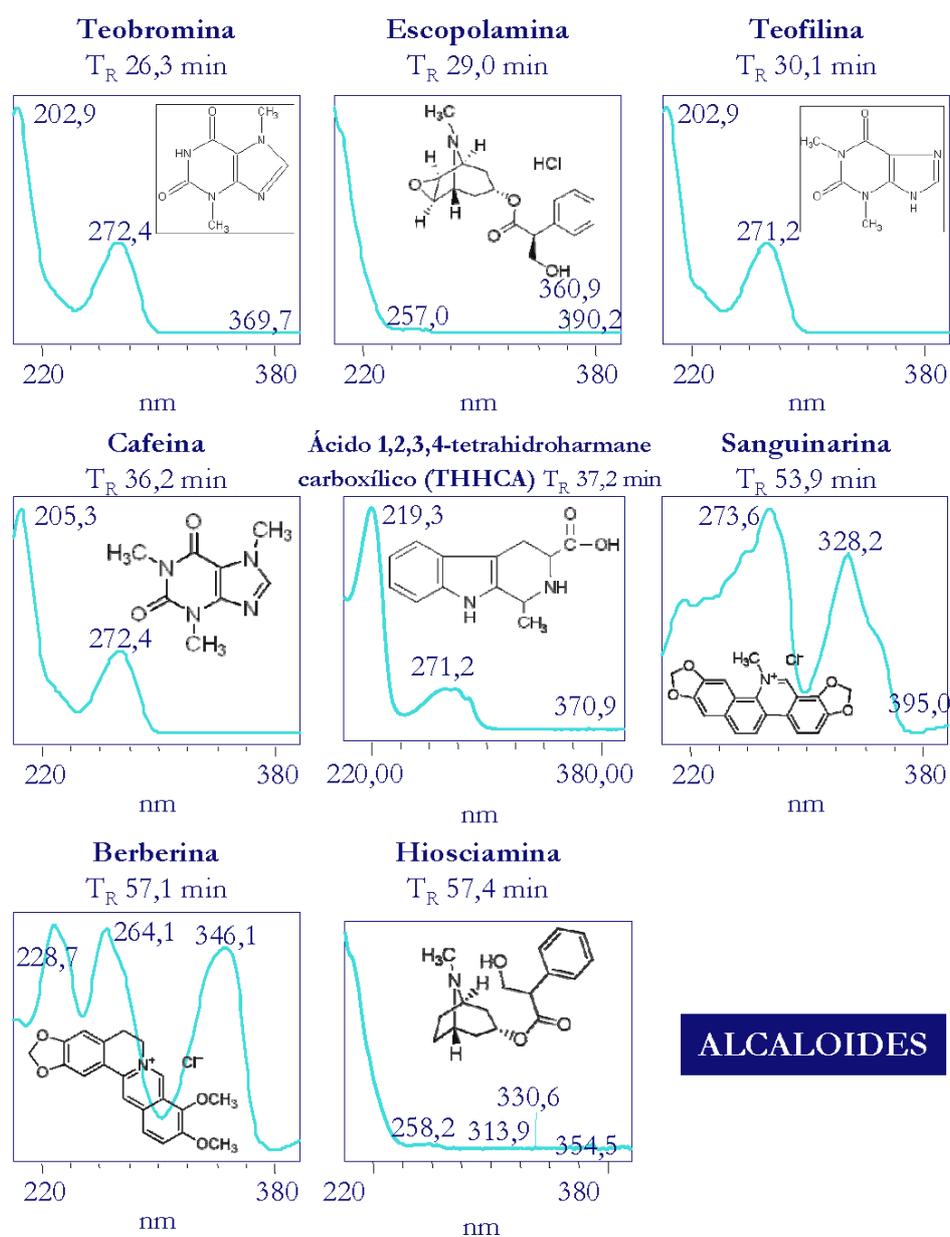


Figura- VII. Espectros UV-visible y tiempo de retención (T_R) de patrones correspondientes a alcaloides.

1.2. Compuestos fenólicos en el flavedo y el albedo de naranjas 'Navelate' sometidas al tratamiento de inducción de resistencia

Tabla- I. Determinación de compuestos fenólicos mediante el detector de UV-visible en el flavedo de naranjas 'Navelate' sometidas al tratamiento de inducción de resistencia. Se muestran aquellos picos cuya área de integración (mUA s) varió en más de 1,5 (°) veces o menos de 0,67 veces (°) como consecuencia del tratamiento de infección más curado a 1 y/o 3 dpt respecto de los frutos no tratados; y aquellos correspondientes a los de los patrones conocidos (*) ($\mu\text{g g}^{-1}$ PF). Las flechas indican los aumentos o disminuciones en compuestos no detectados en alguna de las muestras comparadas. Se realizaron, al menos, dos extracciones independientes. Se aplicó el análisis ANOVA empleando el test LSD. Letras diferentes para un mismo T_R indican diferencias significativas ($p < 0,05$). (Ver nomenclatura en el apartado 3.4 de Materiales y Métodos).

Detector UV-visible	T_R	FNT		FI24		FI0		FI1		FX3		FC3		FH3		FI3						
		Área/ Conc.	Stat	Área/ Conc.	FI24/ FNT	Stat	Área/ Conc.	FI0/ FNT	Stat	Área/ Conc.	FI1/ FNT	Stat	Área/ Conc.	FX3/ FNT	Stat	Área/ Conc.	FH3/ FNT	Stat	Área/ Conc.	FI3/ FNT	Stat	
BENZOICOS																						
	232,3	28,4	142	441	3,1	611	4,3	1.113	7,8	1.076	7,6	684	4,8	121	0,9	1.261	8,9					
uv-5	205,3-257,0-298,5	29,6	244 a	130	0,5	97	0,4	74	0,3	291	1,2	156	0,6	220	0,9	272	1,1	a				
uv-24	241,7-328,2	40,0	249 b	368	1,5	341	1,4	265	1,1	273	1,1	356	1,4	578	2,3	390	1,6	a				
	205,3-241,7	49,2	c	85	↑	103	↑							186	↑	124	↑					
	274,8-374,5-392,6	63,5	c					101	↑							294	↑					
	225,2-265,3	70,8	b					256	↑													
	274,8-328,2-370,9	71,6	c									163	↑	191	↑	241	↑					
uv-84	227,6-283,0-330,6-374,5	73,9	109 cd	126	1,2	155	1,4	231	2,1	142	1,3	110	1,0	182	1,7	73	0,7					
uv-106	218,5-262,9	81,0	b					498	↑							479	↑					
	222,9-275,9-367,3	81,6	c					97	↑							44	↑					
	260,6	82,2	c			33	↑	93	↑							121	↑					
uv-101	238,2-309,2-324,6	88,5	200 a	130	0,6	139	0,7	133	0,7	192	1,0	163	0,8	195	1,0	111	0,6					
CINÁMICOS																						
uv-2	227,6-312,7	27,0	265 a	213	0,8	156	0,6	93	0,4	170	0,6	203	0,8	262	1,0							
	226,4-312,7-390,2	30,8	372 a	273	0,7	224	0,6	120	0,3	106	0,3	225	0,6	264	0,7	295	0,8					
uv-7	218,2-324,6	31,1	436 a	609	1,4	589	1,4	999	2,3	390	0,9	1.114	2,6	966	2,2	692	1,6					
	227,6-312,7	31,8	633	462	0,7	367	0,6	316	0,5	413	0,7	377	0,6	530	0,8	407	0,6					
uv-13	227,6-311,5-389,0	35,3	318	95	0,3	109	0,3	64	0,2	266	0,8	212	0,7	233	0,7	243	0,8					
uv-14	218,2-235,8-327,0	35,4	481 bc	360	0,7	355	0,7	154	0,3	674	1,4	489	1,0	609	1,3	382	0,8					
uv-15	Ácido clorogénico*	37,3	161 ab	162	1,0	134	0,8	150	0,9	177	1,1	164	1,0	181	1,1	153	0,9					
uv-17	211,1-315,1	38,0	500 ab	443	0,9	465	0,9	295	0,6	316	0,6	394	0,8	629	1,3	495	1,0					
uv-22	218,2-239,3-315,1	39,0	219	150	0,7	246	1,1	223	1,0	155	0,7	152	0,7	175	0,8	485	2,2					
uv-23	239,3-330,6	39,5	312 d	271	0,9	368	1,2	369	1,2	465	1,5	336	1,1	422	1,4	560	1,8					
uv-29	Ácido cafeico*	40,5	69 a			64	0,9	57	0,8	62	0,9	69	1,0	75	1,1	60	0,9					
	287,8-323,4-392,6	42,1	97 b	580	6,0	57	0,6					40	0,4	57	0,6	36	0,4					
	237,0-323,4-395,0	43,1	311 ab			224	0,7	181	0,6	326	1,0	127	0,4	184	0,6	180	0,6					
	217,0-291,3-323,4	54,1	e	674	↑	940	↑	1.128	↑	716	↑	766	↑	1.132	↑	1.026	↑					
	235,8-323,4	63,0	225 ab	290	1,3	68	0,3	327	1,5	341	1,5	312	1,4	28	0,1	65	0,3					
	235,8-328,2	69,0	172 cd	190	1,1	315	1,8	562	3,3	118	0,7	76	0,4	168	1,0	792	4,6					
	234,6-328,2	70,3	87 bc			100	1,1	220	2,5	57	0,7					186	2,1					

Continuación Tabla- I.

Detector UV-visible	T _R	FNT		FI24		FI0		FI1		FX3		FC3		FH3		FI3									
		Área/ Conc.	Stat	Área/ Conc.	FI24/ FNT	Stat	Área/ Conc.	FI0/ FNT	Stat	Área/ Conc.	FI1/ FNT	Stat	Área/ Conc.	FX3/ FNT	Stat	Área/ Conc.	FC3/ FNT	Stat	Área/ Conc.	FH3/ FNT	Stat	Área/ Conc.	FI3/ FNT	Stat	
CUMARINAS																									
202,9-227,6-299,7-348,5	47,4	c		c		c		243	↑	a		c		c		143	↑	b							
uv-72 Escoparona*	60,5	d		d		29	↑	c	81	↑	a	d		d		6	↑	d	52	↑	b				
232,3-334,2	69,5	d		d		176	↑	ab	267	↑	a	44	↑	cd	138	↑	bc	204	↑	ab	192	↑	ab		
FLAVONAS																									
uv-30 212,3-271,2-346,1	42,3	362	c	156	0,4	e	325	0,9	bcd	372	1,0	bc	603	1,7	a	275	0,8	cd	470	1,3	b	210	0,6	de	
252,3-338,9	46,0	142	ab	57	0,4	b	149	1,0	b	93	0,7	b	211	1,5	a	90	0,6	b	128	0,9	ab	135	0,9	ab	
uv-64 Isorroifolina*	54,5	66	b			↓	b	131	2,0	a	59	0,9	b	39	0,6	b	48	0,7	b	55	0,8	b	65	1,0	b
uv-65 Diosmina*	55,5	27	b	26	1,0	b	22	0,8	b	26	1,0	b	49	1,8	a	26	1,0	b	30	1,1	b	24	0,9	b	
220,5-331,8	61,0		b			b	146	↑	a		b	66	↑	ab		b	122	↑	a	95	↑	ab			
uv-93 Isosinsetina*	77,8	3,5	abc	2,2	0,6	c	2,7	0,8	bcd	3,6	1,0	ab	3,7	1,1	ab	3,0	0,9	bc	4,6	1,3	a	4,0	1,1	ab	
uv-94 Hexametil-O-gosipetina*	79,7	1,0	ab	1,2	1,2	ab	0,7	0,7	b	1,7	1,7	a	1,3	1,3	ab	0,9	0,9	b	1,3	1,3	ab	1,3	1,3	ab	
uv-95 Sinsetina*	80,9	101	bc	82	0,8	d	120	1,2	a	102	1,0	b	88	0,9	cd	101	1,0	bc	121	1,2	a	81	0,8	d	
uv-96 Hexametil-O-quercetina	83,0	421	cd	377	0,9	d	429	1,0	cd	580	1,4	a	479	1,1	bc	415	1,0	cd	597	1,4	a	532	1,3	ab	
uv-97 Nobiletina*	84,0	30	d	28	1,0	d	29	1,0	d	36	1,2	ab	34	1,1	bc	31	1,1	cd	39	1,3	a	31	1,0	cd	
uv-98 Tetrametil-O-escutelaireina*	84,5	141	a	130	0,9	a	153	1,1	a	142	1,0	a	127	0,9	a	159	1,1	a	151	1,1	a	129	0,9	a	
205,3-254,7-358,0	84,8	267	a	180	0,7	de	193	0,7	bcd	238	0,9	a	228	0,9	ab	199	0,7	bc	248	0,9	a	156	0,6	e	
uv-99 Heptametoxiflavona*	86,0	125	bc	113	0,9	c	132	1,1	ab	143	1,1	a	127	1,0	bc	128	1,0	b	145	1,2	a	126	1,0	bc	
uv-100 Tangeretina	87,1	1.284	d	1.442	1,1	cd	1.580	1,2	bcd	2.076	1,6	a	1.819	1,4	ab	1.667	1,3	bc	1.813	1,4	ab	1.859	1,4	ab	
FLAVANONAS																									
uv-53 Eriocitrina*	49,8	35		9	0,3		17	0,5		18	0,5		8	0,2		40	1,1		23	0,7		25	0,7		
281,9	52,6	605	a			↓	d		↓	d		↓	d	105	0,2	bc	74	0,1	cd		↓	d	165	0,3	b
uv-63 Narirutina*	54,0	33	a			↓	c		↓	c		↓	c		↓	c		↓	c		↓	c	15	0,5	b
uv-69 Hesperidina*	57,0	1.841	bc	1.786	1,0	bc	2.104	1,1	a	2.179	1,2	a	1.447	0,8	d	1.529	0,8	d	1.668	0,9	cd	1.979	1,1	ab	
uv-77 Didimina*	68,3	57	b	45	0,8	bc	67	1,2	ab	67	1,2	ab	17	0,3	d	62	1,1	cd	54	0,9	b	79	1,4	a	
OTROS																									
uv-33 201,8-273,6-336,6	45,1	370	b	340	0,9	bc	140	0,4	a	664	1,8	a	845	2,3	a	298	0,8	bc	315	0,9	bc	304	0,8	bc	
uv-104 266,5-329,4	57,7		e	40	↑	de	101	↑	c	143	↑	c	64	↑	d	150	↑	c	219	↑	b	863	↑	a	
uv-107 232,3-305,6	66,3						137	↑		291	↑								40	↑					
232,3-306,8	67,2		c			c	91	↑	b	89	↑	b			c			c	74	↑	b	154	↑	a	
uv-105 205,3-270,0-327,0	80,7		c			c	141	↑	b	155	↑	b			c			c	28	↑	c	334	↑	a	

Tabla- II. Determinación de compuestos fluorescentes en el flavedo de naranjas 'Navelate' sometidas al tratamiento de infección más curado. Todos los valores muestran el área de integración (mUA s), excepto en el caso del $T_R \approx 60,5^*$ que corresponde al compuesto escoparona y los datos mostrados son de concentración ($\mu\text{g g}^{-1}$ PF). (Ver Tabla- I).

Fluor.	FNT			FI24			FI0			FI1			FX3			FC3			FH3			FI3		
	T_R	Área/ Conc.	Stat	Área/ Conc.	FI24/ FNT	Stat	Área/ Conc.	FI0/ FNT	Stat	Área/ Conc.	FI1/ FNT	Stat	Área/ Conc.	FX3/ FNT	Stat	Área/ Conc.	FC3/ FNT	Stat	Área/ Conc.	FH3/ FNT	Stat	Área/ Conc.	FI3/ FNT	Stat
F-1	26,5	25		17	0,7		17	0,7		19	0,8		12	0,5		29	1,2		39	1,6		44	1,8	
F-4	30,5	20	e	90	4,4	a	59	2,9	cd	87	4,3	b	86	4,2	b	44	2,2	d	97	4,8	b	75	3,7	bc
F-5	32,2	39	a	39	1,0	a	19	0,5	b	26	0,6	ab	28	0,7	ab	29	0,7	ab	28	0,7	ab	29	0,7	ab
F-7	34,4	118		96	0,8		186	1,6		217	1,8		105	0,9		103	0,9		114	1,0		174	1,5	
F-8	36,0	53		50	0,9		106	2,0		219	4,1		59	0,1		61	1,1		26	0,5		133	2,5	
	36,7	6	b		↓	c	3	0,5	bc	8	1,3	b	3	0,6	bc		↓	c		↓	c	14	2,3	a
	39,3			10	↑		17	↑		19	↑		13	↑		8	↑		13	↑		35	↑	
	40,0		c	6	↑	b	4	↑	b	6	↑	b	12	↑	ab	5	↑	b			c	15	↑	a
	41,0	10	bc		↓	c	37	3,7	a	41	4,1	a	32	3,2	ab	21	2,1	abc	17	1,7	abc	18	1,8	abc
	41,9		c			c	12	↑	b	19	↑	ab			c			c			c	26	↑	a
	42,9			10	↑		5	↑		4	↑								5	↑		13	↓	d
	44,4	8	bc		↓	d	16	2,1	ab	20	2,6	a	6	0,8	cd		↓	d		↓	d	205	30,1	
F-12	45,3	7		15	2,2		126	18,5		133	19,5		36	5,3		18	2,7		180	26,4		6	0,4	b
	49,3	16	a	7	0,4	b	6	0,4	b	7	0,4	b	8	0,5	b	6	0,4	b	8	0,5	b			
F-13	49,9	7		12	1,8		23	3,4		251	36,7			↓			↓			↓		130	19,0	
F-14	51,7			68	↑		88	↑		88	↑		19	↑		7	↑		31	↑		151	↑	
	51,9	32	d	30	0,9	d	48	1,5	b	65	2,0	a	29	0,9	d	37	1,1	cd	46	1,4	bc	70	2,2	a
	54,0		c	13	↑	b	11	↑	b	21	↑	a	15	↑	ab		↑	c	13	↑	b			c
	55,5	38	c	13	0,3	d	23	0,6	d	78	2,1	b	14	0,4	cd	36	0,9	c	8	0,2	d	111	2,9	a
	56,7	30	b	13	0,4	cd	24	0,8	bc	48	1,6	a	13	0,4	cd		0,0	d	9	0,5	bc	42	1,4	a
F-16	57,7	28		100	3,5		755	26,6		1.121	39,5		243	8,6		527	18,5		2.357	83,0		3.250	114,4	
	58,7		c			c	8	↑	bc	13	↑	b			c			b	12	↑	b	32	↑	a
F-17	60,5*			0,1	↑		29,7	↑		90,5	↑		0,1	↑		0,3	↑		5,7	↑		54,0	↑	
	61,8	28	d	27	0,9	d	93	0,9	a	104	3,7	a	27	1,0	d	51	1,8	c	56	2,0	bc	81	2,9	bc
	62,9	8	b		↓	c		↓	c		↓	c		↓	c		↓	c		↓	c	18	2,4	a
	63,5	15	ab		↓	c		↓	c		↓	c		↓	c	16	1,1	ab		↓	bc		↓	a
	68,7	9			↓		12	1,3			↓			↓			↓		7	0,8		16	1,7	
	71,3	6			↓		8	1,3			↓			↓		4	0,7		14	2,4		32	5,3	
F-18	77,9		b			b	125	↑	a	133	↑	a			b			b	18	↑	b	116	↑	a
F-21	80,1	14		7	0,5		189	13,3		408	28,8		6	0,4		19	1,4		23	1,6		325	22,9	
F-22	80,7	178		158	0,9		930	5,2		1.538	8,6		179	1,0		202	1,1		532	3,0		3.310	18,6	
F-25	84,4	12	bc		↓	d	9	0,8	bc	21	1,7	a	11	0,9	bc	17	1,4	ab		↓	d	6	0,5	cd
	88,0		c			c			c	9	↑	b			c			c			c	22	↑	a
	88,5	4	cd		↓	d	11	2,4	bcd	11	2,4	bcd	20	4,5	b	17	3,8	bc	17	3,9	bc	56	12,7	a

Tabla- III. Determinación de compuestos fenólicos mediante el detector de UV-visible asociado al HPLC en el albedo de naranjas 'Navelate' sometidas al tratamiento de inducción de resistencia. En la tabla se muestran aquellos picos que modificaron el área de integración (mUA s) en más de 1,5 (↑) veces o menos de 0,67 veces (↓) como consecuencia del tratamiento de infección más curado a 1 y/o 3 dpt respecto de los frutos no tratados, y aquellos correspondientes a los patrones conocidos (*) ($\mu\text{g g}^{-1}$ PF). Las flechas indican los aumentos o disminuciones en compuestos no detectados en alguna de las muestras comparadas. Se realizaron, al menos, dos extracciones independientes. Se aplicó el análisis ANOVA empleando el test LSD. Letras diferentes para un mismo T_R indican diferencias significativas ($p < 0,05$). (Ver nomenclatura en el apartado 3.4 de Materiales y Métodos).

Detector UV-visible	T_R	ANT		AI24		AI0		AI1		AX3		AC3		AH3		AI3							
		Área/ Conc.	stat	Área/ Conc.	AI24/ ANT	stat	Área/ Conc.	AI0/ ANT	stat	Área/ Conc.	AI1/ ANT	stat	Área/ Conc.	AX3/ ANT	stat	Área/ Conc.	AC3/ ANT	stat	Área/ Conc.	AH3/ ANT	stat	Área/ Conc.	AI3/ ANT
BENZOICOS																							
	227,6-272,4	21,5	321 a	72 0,2	d	127 0,4	c	147 0,5	bc		↓	e	148 0,5	bc	176 0,5	b	315 1,0	a					
	202,9-266,5	22,5	104 a	98 0,9	a	95 0,9	a	109 1,1	a		↓	c	96 0,9	a	49 0,5	b	16 0,2	c					
uv-1	217,0-279,5-315,1	26,4	994 b	689 0,7	c	907 0,9	b	1.143 1,2	a	276 0,3	d	1.057 1,1	ab	1.144 1,2	a	138 0,1	d						
uv-4	232,3	29,3	533 bc	748 1,4	a	657 1,2	ab	259 0,5	c	487 0,9	d	695 1,3	a	607 1,1	abc	546 1,0	bc						
	277,1-316,3	34,2	299	379 1,3		349 1,2		331 1,1		145 0,5		313 1,0		221 0,7		141 0,5							
uv-13	234,6-274,8-311,5	35,7	198	278 1,4		214 1,1		312 1,6		240 1,2		235 1,2		192 1,0		131 0,7							
uv-18	233,5-275,9-311,5	39,1	938 ab	1.062 1,1	a	1.005 1,1	ab	1.064 1,1	a	621 0,7	c	1.022 1,1	ab	879 0,9	b	583 0,6	c						
uv-24	241,7-328,2	40,1	143 bcd	217 1,5	ab	231 1,6	ab	232 1,6	a	91 0,6	d	171 1,2	abcd	186 1,3	abc	115 0,8	cd						
uv-28	231,1-283,0-321,1	41,3	105	280 2,7		381 3,6		145 1,4			↓	239 2,3		242 2,3		322 3,1							
uv-42	220,5-266,5-374,5-390,2	45,3	285 a	266 0,9	a	236 0,8	ab	172 0,6	bc	131 0,5	c	135 0,5	c	132 0,5	c	284 1,0	a						
uv-57	228,7-284,2-352,1-373,3	51,3	55	107 1,9		114 2,1		145 2,6		58 1,1		116 2,1		72 1,3		62 1,1							
uv-75	207,6-262,9-303,2	64,6	77 ab	118 1,5	a	73 0,9	ab	130 1,7	a		↓	b	96 1,2	ab		↓	b						
	210,0-297,3-372,1-389,0	66,2	463 a	324 0,7	b	212 0,5	c	323 0,7	b	83 0,2	d	434 0,9	a	288 0,6	b	68 0,1	d						
uv-78	232,3	69,0	113 b	122 1,1	b	153 1,4	b	127 1,1	b	246 2,2	a	124 1,1	b		↓	c	215 1,9	a					
uv-83	232,3-316,3-355,7-370,9	71,9	231 cd	536 2,3	a	587 2,5	a	438 1,9	b	250 1,1	cd	302 1,3	c	313 1,4	c	181 0,8	d						
uv-85	225,2-283,0	72,3	90	168 1,9		50 0,6		71 0,8		49 0,6		53 0,6		60 0,7		17 0,2							
uv-87	232,3-308,0	73,9	161 c	175 1,1	c	198 1,2	bc	214 1,3	abc	259 1,6	ab	189 1,2	bc	156 1,0	c	288 1,8	a						
uv-88	231,1-273,6-287,8	74,3	47 a	73 1,6	a	62 1,3	a	76 1,6	a	82 1,8	a	67 1,4	a	63 1,4	a		↓	b					
uv-89	232,3-274,8-333,0	75,3	286 ab	348 1,2	a	280 1,0	ab	332 1,2	a	64 0,2	c	268 0,9	ab	201 0,7	b	68 0,2	c						
uv-90	232,3	75,9	53 a	56 1,0	a	56 1,1	a	60 1,1	a	24 0,5	b	60 1,1	a		↓	c							
uv-105	226,4-273,6	80,0	4	5 1,1		19 4,4		21 4,8			↓		↓		↓		73 17,1						
uv-106	212,3-264,1-375,7	81,3						48 ↑															
	238,2-300,8-313,9	86,5	71	83 1,2		59 0,8		38 0,5		38 0,5		58 0,8		46 0,6		10 0,1							

Continuación de la Tabla- III.

Detector UV-visible	ANT		AI24		AI0		AI1		AX3		AC3		AH3		AI3										
	T _R	Área/ Conc.	stat	Área/ Conc.	AI24/ ANT	stat	Área/ Conc.	AI0/ ANT	stat	Área/ Conc.	AI1/ ANT	stat	Área/ Conc.	AX3/ ANT	stat	Área/ Conc.	AC3/ ANT	stat	Área/ Conc.	AH3/ ANT	stat	Área/ Conc.	AI3/ ANT	stat	
CINÁMICOS																									
uv-3	218,2-233,5-317,5	28,8	708	760	1,1		699	1,0		1.516	2,1		437	0,6		930	1,3		793	1,1		911	1,3		
	227,6-316,3	35,3	117 cd	315	2,7	a	197	1,7	b	158	1,3	bc	101	0,9	cd	206	1,8	b	117	1,0	cd	66	0,6	d	
uv-14	329,4-348,5-368,5	36,6	44	76	1,7		60	1,4		77	1,7					66	1,5		54	1,2					
uv-15	Ác. Clorogénico*	38,2	14 cd	30	2,1	a	25	1,8	ab	25	1,7	b	17	1,2	c	24	1,7	b	22	1,6	b	11	0,7	d	
uv-23	238,2-331,8	39,9	498 a	401	0,8	ab	495	1,0	a	361	0,7	abc	253	0,5	cd	231	0,5	cd	166	0,3	d	286	0,6	bcd	
uv-35	220,5-238,2-308,0-323,4-395,0	42,0	77	37	0,5		54	0,7		43	0,6			↓		70	0,9			↓			↓		
uv-68	217,0-323,4-392,6	56,4	97 ab	81	0,8	a	67	0,7	ab	61	0,6	b		↓	ab	65	0,7	ab	81	0,8	a		↓	b	
uv-74	235,8-331,8	63,9	84	96	1,1		129	1,5		117	1,4			↓		107	1,3		82	1,0		155	1,8		
CUMARINAS																									
uv-40	329,4	44,6	129	141	1,1		105	0,8		191	1,5		16	0,1		149	1,2		114	0,9		72	0,6		
uv-60	201,8-327,0	53,8	635 a	582	0,9	ab	394	0,6	c	341	0,5	c	389	0,6	c	432	0,7	bc	251	0,4	c	398	0,6	bc	
uv-72	Escoparona*	60,5	d			d	5,0	↑	c	10,8	↑	b			d			d	3,2	↑	cd	16,4	↑	a	
FLAVONAS																									
uv-34	225,2-271,2-336,6	41,7	175	178	1,0		153	0,9		162	0,9		151	0,9		214	1,2		243	1,4		100	0,6		
uv-95	Sinensetina*	80,9	3,9 bc	6,8	1,7	abc	6,7	1,7	abc	8,9	2,3	a	4,0	1,0	bc	6,0	1,5	abc	7,2	1,8	abc	3,7	0,9	c	
uv-96	Hexametil-O-quercetagina	83,0	39 bc	73	1,9	a	59	1,5	abc	64	1,6	ab	32	0,8	c	50	1,3	abc	50	1,3	abc	63	1,6	ab	
uv-97	Nobiletina*	84,0	1,4 e	4,0	2,8	a	2,8	2,0	bc	3,3	2,3	ab	1,7	1,2	de	2,3	1,6	cde	2,8	1,9	bc	2,6	1,8	bcd	
uv-98	Tetrametil-O-escutelareina*	84,5	13 bc	27	2,2	a	13	1,0	b	11	0,9	bc	5	0,4	d	12	1,0	bc	9	0,7	c	14	1,1	b	
uv-99	Heptametoxiflavona*	86,0	20	35	1,7		32	1,6		37	1,8		18	0,9		27	1,3		27	1,3		34	1,7		
uv-100	Tangeretina	87,3	83 c	228	2,7	a	165	2,0	b	239	2,9	a	121	1,4	c	112	1,3	c	108	1,3	c	203	2,4	ab	
FLAVANONAS																									
uv-53	Eriocitrina*	49,8	15 ab	13	0,9	ab	14	0,9	ab	19	1,2	a	17	1,1	ab	16	1,1	ab	12	0,8	b	12	0,8	b	
	283,0	51,8	909 a	487	0,5	b	399	0,4	bc	538	0,6	b	417	0,5	bc	407	0,4	bc	465	0,5	bc	326	0,4	c	
uv-59	283,0	52,2	55 d	299	5,4	b	297	5,4	b	348	6,3	ab	289	5,2	b	310	5,6	b	418	7,5	a	201	3,6	c	
uv-63	Narirutina*	54,0	434 ab	379	0,9	bcd	308	0,7	d	400	0,9	abc	324	0,7	cd	461	1,1	a	350	0,8	cd	373	0,9	bcd	
uv-69	Hesperidina*	57,0	2.027 a	1.956	1,0	a	1.518	0,7	b	1.801	0,9	ab	1.996	1,0	ab	1.880	0,9	a	1.962	1,0	a	2.061	1,0	a	
uv-70	289,0-353,3	59,0	54	79	1,5		62	1,1		88	1,6		99	1,8		55	1,0		73	1,4		66	1,2		
	284,2-360,9-372,1	62,6	128 abc	133	1,0	ab	118	0,9	abc	149	1,2	a	120	0,9	abc	134	1,0	ab	96	0,8	bc	79	0,6	c	
uv-77	Didimina*	68,3	349	312	0,9		254	0,7		328	0,9		261	0,7		352	1,0		311	0,9		307	0,9		
uv-79	285,4	70,1	161	217	1,3		172	1,1		195	1,2		116	0,7		194	1,2		160	1,0		84	0,5		
OTROS																									
uv-104	271,2-329,4	57,7					48	↑		66	↑											47	↑		
	201,8-291,3	61,4								66	↑														
uv-105	205,3-268,8-324,6	80,7	b			b	60	a		72	↑	a		b			b				b	54	↑	a	

Tabla- IV. Determinación de compuestos fluorescentes en el albedo de naranjas 'Navelate' sometidas al tratamiento de infección más curado. Los datos mostrados corresponden al área de integración (mUA s) excepto para el TR $\approx 60,5^*$ que se muestra como una concentración ($\mu\text{g g}^{-1}$ PF) ya que coincide en TR con el patrón de escoparona. Las flechas indican los aumentos o disminuciones en compuestos no detectados en alguna de las muestras comparadas. Se realizaron, al menos, dos extracciones independientes. Se aplicó el análisis ANOVA empleando el test LSD. Letras diferentes para un mismo T_R indican diferencias significativas ($p < 0,05$). (Ver nomenclatura en el apartado 3.4 de Materiales y Métodos).

Fluor.	ANT			AI24			AI0			AI1			AX3			AC3			AH3			AI3		
	T_R	Área/ Conc.	stat	Área/ Conc.	AI24/ ANT	stat	Área/ Conc.	AI0/ ANT	stat	Área/ Conc.	AI1/ ANT	stat	Área/ Conc.	AX3/ ANT	stat	Área/ Conc.	AC3/ ANT	stat	Área/ Conc.	AH3/ ANT	stat	Área/ Conc.	AI3/ ANT	stat
F-1	26,5	163	bc	197	1,2	ab	174	1,1	bc	232	1,4	a	54	0,3	d	140	0,9	c	208	1,3	ab	51	0,3	d
	31,1	12	bc	15	1,3	ab	19	1,6	a	21	1,8	a		↓	c	17	1,5	ab	17	1,5	ab		↓	c
	35,4	13	e	24	1,8	d	52	3,9	b	72	5,4	a	15	1,1	e	24	1,8	d	12	0,9	e	48	3,6	c
F-8	36,7	5	d	9	1,8	d	52	9,7	b	85	16,0	a	7	1,3	d	11	2,1	cd	15	2,9	c	46	8,6	b
	40,8	28	ab	30	1,1	a	34	1,2	a	29	1,0	ab	30	1,1	a	35	1,2	a	13	0,5	d	17	0,6	cd
	41,2	8	bc	10	1,2	b	13	1,6	a	14	1,7	a	3	0,3	c		↓	d		↓	d		↓	d
	41,8	7	bc	10	1,4	ab	9	1,2	ab	12	1,7	a	1	0,1	c	10	1,4	ab	10	1,4	ab	2	0,2	c
F-12	44,7	6	c	5	0,8	c	25	4,3	b	32	5,4	b		↓	c		↓	c	33	5,6	b	50	8,6	a
F-13	49,4			2	↑					44	↑					2	↑					20	↑	
F-14	52,4	4	d	4	1,1	d	14	3,6	c	26	6,8	b		↓	d	4	1,0	d	3	0,9	d	37	9,5	a
F-15	55,7		d			d	7	↑	c	27	↑	b			d	3	↑	cd	2	↑	d	32	↑	a
F-16	57,7		d			d	82	↑	cd	178	↑	bc			d			d	282	↑	b	521	↑	a
F-17	60,5*		d			d	6,2	↑	c	12,2	↑	b			d	0,0	↑	d	0,6	↑	d	24,7	↑	a
	66,5	3	bc		↓	c		↓	c	4	1,7	a		↓	c		↓	c		↓	c		↓	c
	69,1		d			d	13	↑	d	10	↑	b			d			d			d	7	↑	c
	76,4	7	ab	9	1,2	a	5	0,6	cd	6	0,8	bc	5	0,6	cd	4	0,5	d	3	0,5	d	3	0,4	d
F-18	78,2					53	↑		47	↑								1	↑		52	↑		
F-21	80,3		b	1	↑	b	121	↑	a	142	↑	a			b			b	2	↑	b	147	↑	a
F-22	80,7		c			c	397	↑	b	518	↑	b	10	↑	c			c	169	↑	c	971	↑	a
F-23	81,2	7		13	1,9			↓		15	2,1			↓		12	1,7		15	2,1		61	8,6	

1.3. Compuestos fenólicos en el flavedo y el albedo de naranjas 'Navelina' infectadas con *P. digitatum*

Tabla- V. Determinación de compuestos fenólicos mediante el detector de UV-visible en el flavedo de naranjas 'Navelina' infectadas con *P. digitatum*. En la tabla se muestran aquellos picos que modificaron el área de integración (mUA s) en más de 1,5 (↑) veces o menos de 0,67 veces (↓) como consecuencia de la infección de *P. digitatum* respecto del flavedo de frutos no tratados (FNT0), y la concentración (µg g⁻¹ PF) de aquellos correspondientes a patrones conocidos. Las flechas indican los aumentos o disminuciones en compuestos no detectados en alguna de las muestras comparadas. Se realizaron, al menos, dos extracciones independientes. Se aplicó el análisis ANOVA empleando el test LSD. Letras diferentes para un mismo T_R indican diferencias significativas (p<0,05). (Ver nomenclatura en el apartado 5 de Materiales y Métodos).

Detector UV-visible	T _R	FNT0		FNT24		FNT48		FNT72		FH24		FH48		FH72		FI24		FI48		FI72											
		Área/ Conc.	Stat	Área/ Conc.	FC24/ FNT0	Stat	Área/ Conc.	FC48/ FNT0	Stat	Área/ Conc.	FC72/ FNT0	Stat	Área/ Conc.	FC24/ FNT0	Stat	Área/ Conc.	FC48/ FNT0	Stat	Área/ Conc.	FC72/ FNT0	Stat	Área/ Conc.	FC24/ FNT0	Stat	Área/ Conc.	FC48/ FNT0	Stat	Área/ Conc.	FC72/ FNT0	Stat	
BENZOICOS																															
uv-1	217,0-279,5-315,1	27,4	727	645	0,9		↓		440	0,6		413	0,6		708	1,0		359	0,5		574	0,8		392	0,5		89	0,1			
	215,8-279,5-318,7	27,6	b			b		b	57	↑	b		b		55	↑	b		97	↑	b	227	↑	a	396	↑	a				
	229,9-274,8-367,3	29,4	302	cd		↓	d	285	0,9	cd	341	1,1	bcd	447	1,5	bc	295	1,0	cd	679	2,2	bc	1.162	3,9	a	705	2,3	b	1.177	3,9	a
	228,7-272,4-346,1-372,1	33,6	113		1.027	9,1		475	4,2		612	5,4		409	3,6		358	3,2		455	4,0				1.012	9,0		587	5,2		
uv-10	213,5-258,2-363,0	34,2	579	b	1.168	2,0	ab	696	1,2	ab	920	1,6	ab	1.070	1,8	ab	849	1,5	ab	927	1,6	ab	1.051	1,8	ab	891	1,5	ab	1.336	2,3	a
	224,0-266,5-373,3	35,3	485	ab	219	0,5	cd	107	0,2	cde	564	1,2	a	111	0,2	cde	115	0,2	cde	316	0,7	bc	508	1,0	ab	16	0,03	de		↓	e
	233,5-318,7-342,5-370,9	40,9		c			c		85	↑	bcd		c		448	↑	ab		448	↑	ab		c		331	↑	ab	528	↑	a	
	233,5-283,0-334,2	41,0	1.767	bc	2.128	1,2	ab	1.331	0,8	c	1.798	1,0	bcd	1.618	0,9	bc	1.680	1,0	bc	1.256	0,7	c	1.144	0,6	c	2.207	1,2	ab	2.716	1,5	a
uv-24	241,7-328,2	41,7	103	bc	128	1,2	abc	296	2,9	ab	131	1,3	abc	159	1,5	abc	234	2,3	ab	166	1,6	abc	60	0,6	c	47	0,5	c		↓	c
	225,2-285,4-331,8	60,2	311	ab	185	0,6	ab		↓	b	121	0,4	ab	229	0,7	ab	195	0,6	ab	165	0,5	ab		↓	b	204	0,7	ab	81	0,3	ab
	222,3-271,2-333,0	61,2	383	ab	260	0,7	abc		↓	e	237	0,6	abc	326	0,9	ab	156	0,4	cd	53	0,1	de		↓	e	214	0,6	bc	325	0,8	ab
	224,0-374,8-391,4	64,2		b			b			b		b		b		b		b	199	↑	a	198	↑	a	231	↑	a	259	↑	a	
	232,3-280,7-369,7	65,7		c			c			c		c		c		c		c	64	↑	c			c	146	↑	b	441	↑	a	
	231,1-369,7	67,5	140	bcd	50	0,4	cb		↓	d	94	0,7	bcd	298	2,1	a	185	1,3	abc	213	1,5	ab	163	1,2	abc	188	1,3	abc	239	1,7	ab
	228,7-306,8-369,7	75,4	331		111	0,3		91	0,3		211	0,6		78	0,2		139	0,4		77	0,2		511	1,5		160	0,5		504	1,5	
	229,9-280,7-340,1	75,8		b			b			b		b		b		b		b	94	↑	ab	173	↑	a	185	↑	a	183	↑	a	
	228,7-277,1-315,1	80,7												46	↑										32	↑		535	↑		
	273,6-327,0	81,9		b			b			b		b		b		b		b									b	380	↑	a	
	225,2-274,8-325,8	82,5		b			b			b		b		b		b		b									b	190	↑	a	
	229,9-278,3-327,0	84,1	123		118	1,0		133	1,1			↓		160	1,3		241	2,0		45	0,4		156	1,3		58	0,5		58	0,5	
	279,5-374,5	84,7		d			d	107	↑	c	123	↑	c	105	↑	c		↑	d	110	↑	c	130	↑	c	218	↑	b	470	↑	a
uv-101	238,2	90,1	682	ab	848	1,2	a	705	1,0	ab	561	0,8	ab	582	0,9	ab	556	0,8	ab	356	0,5	bc	489	0,7	bc	544	0,8	abc	196	0,3	c
uv-102	238,2	91,2	1.122	ab	1.326	1,2	a	1.164	1,0	ab	836	0,7	bc	959	0,9	abc	980	0,9	abc	589	0,5	cd	857	0,8	bc	749	0,7	bcd	285	0,3	d
CINÁMICOS																															
	225,2-310,4	31,4	404	ab	140	0,3	b	152	0,4	ab	226	0,6	ab	223	0,6	ab	424	1,0	ab	142	0,4	b	155	0,4	b	108	0,3	b	568	1,4	a
	219,3-316,3	32,9	1.629	a	1.149	0,7	bc	1.427	0,9	cd	810	0,5	cd	1.383	0,8	ab	1.559	1,0	a	600	0,4	de	1.319	0,8	ab	535	0,3	de	260	0,2	e
uv-15	Ác. Clorogénico*	37,5	84	b	285	3,4	a	118	1,4	b	112	1,3	b	106	1,3	b	139	1,7	b	96	1,1	b	92	1,1	b	119	1,4	b	233	2,8	a

Continuación de la Tabla- V.

Detector UV-visible	T _R	FNT0		FNT24		FNT48		FNT72		FH24		FH48		FH72		FI24		FI48		FI72												
		Área/ Conc.	Stat	Área/ Conc.	FC24/ FNT0	Stat	Área/ Conc.	FC48/ FNT0	Stat	Área/ Conc.	FC72/ FNT0	Stat	Área/ Conc.	FH24/ FNT0	Stat	Área/ Conc.	FH48/ FNT0	Stat	Área/ Conc.	FH72/ FNT0	Stat	Área/ Conc.	FI24/ FNT0	Stat	Área/ Conc.	FI48/ FNT0	Stat	Área/ Conc.	FI72/ FNT0	Stat		
CINÁMICOS (Continuación)																																
uv-22 218,2-235,8-327,0	39,6	3.006	a	2.100	0,7	b	2.333	0,8	ab	2.086	0,7	ab	1.839	0,6	b	2.198	0,7	ab	1.516	0,5	b	1.478	0,5	b	2.018	0,7	b	1.792	0,6	bc		
uv-25 227,6-312,7	40,2	611	bc	1.153	1,9	ab	931	1,5	abc	840	1,4	abc	1.195	2,0	a	728	1,2	abc	948	1,6	abc	1.109	1,8	ab	909	1,5	ab	327	0,5	c		
218,2-241,7-330,6	40,3		e			e			cd	285	↑	cd	585	↑	ab	↓	e		477	↑	bc	244	↑	d	609	↑	ab	729	↑	a		
uv-29 Ác. cafeico*	44,3	166		146	0,9		152	0,9		27	0,2		59	0,4		115	0,7		52	0,3		24	0,1		61	0,4		54	0,3			
uv-31 286,6-318,7-393,8	44,6	483	a	409	0,8	a	432	0,9	a	478	1,0	a	267	0,6	a	404	0,8	a	498	1,0	a	490	1,0	a	248	0,5	a	518	1,1	a		
uv-66 244,1-325,8	57,7	670	abc	1.162	1,7	ab	1.197	1,8	bc	85	0,1	bc	↓	c		↓	c		334	0,5	bc	1.465	2,2	a	978	1,5	abc	1.610	2,4	a		
215,5-238,2-328,2	59,8	149	a	93	0,6	abc	↓	ab		103	0,7	ab	↓	c		↓	c		119	0,8	ab	↓	c	15	0,1	bc	148	1,0	a			
285,4-324,6-389,0	63,0		d			d			d			d						d	132	↑	c		d	161	↑	b	203	↑	a			
238,2-330,6-393,8	63,5		c			c			c			c						c	38	↑	bc	210	↑	a	61	↑	b	172	↑	a		
201,8-218,2-240,-329,4	63,9	151	ab	↓	c		↓	c		↓	c		↓	c	109	0,7	abc				202	1,3	a	73	0,5	bc	80	0,5	abc			
220,5-327,0	64,9	283	a	182	0,6	ab	146	0,5	a	293	1,0	a	↓	c	165	0,6	b		94	0,3	bc	188	0,7	ab	103	0,4	bc		↓	c		
217,0-241,7-325,8	66,6	648	a	555	0,9	ab	416	0,6	cd	102	0,2	cd	497	0,8	b	494	0,8	b		176	0,3	c	494	0,8	b		↓	de	176	0,3	c	
274,8-324,6	66,8		b			b			b			b			b			b					b	130	↑	a	106	↑	a			
235,8-329,4	71,3	86		171	2,0		149	1,7		128	1,5		170	2,0		41	0,5		73	0,8		95	1,1		58	0,7		303	3,5			
283,0-329,4	73,9	892	a	783	0,9	ab	↓	cde		404	0,5	cde	542	0,6	bcd	1.025	1,1	abc		431	0,5	cde	318	0,4	def	510	0,6	bcd	144	0,2	ef	
CUMARINAS																																
275,9-352,1	48,8	1.939	a	1.408	0,7	b	613	0,3	c	1.094	0,6	bc	1.471	0,8	ab	1.020	0,5	bc	915	0,5	bc	929	0,5	bc	1.194	0,6	b	1.106	0,6	bc		
uv-72 Escoparona*	60,7									0,5	↑				1,1	↑		0,9	↑		0,1	↑		4,0	↑		6,3	↑				
FLAVONAS																																
uv-30 204,1-270,0-349,7	44,1	2.068	a	1.532	0,7	b	704	0,3	c	939	0,5	c	821	0,4	c	1.613	0,8	ab	759	0,4	c	706	0,3	c	704	0,3	c	739	0,4	c		
uv-32 202,9-257,0-355,7	45,1	166	cd	279	1,7	bcd	220	1,3	bcd	408	2,5	bc	↓	d	334	2,0	bcd		151	0,9	cd	966	5,8	a	553	3,3	b	290	1,7	bcd		
202,9-258,2-297,3-353,3	45,9	330		766	2,3		↓			706	2,1		633	1,9		603	1,8		222	0,7		662	2,0		402	1,2		436	1,3			
211,1-268,8-350,9	46,7	545	ab	422	0,8	bc	252	0,5	c	675	1,2	a	484	0,9	ab	479	0,9	b	474	0,9	b	↓	d		↓	d		↓	d			
uv-33 204,1-255,8-352,1	47,2	409	de	685	1,7	cd	353	0,9	de	389	1,0	de	824	2,0	cde	1.764	4,3	a	1.047	2,6	bc	1.405	3,4	ab	526	1,3	de	163	0,4	e		
uv-43 213,5-270,0-337,7	50,0	1.025	a	906	0,9	a	574	0,6	b	174	0,2	c	859	0,8	ab	992	1,0	a	570	0,6	b	737	0,7	ab	234	0,2	c	27	0,03	c		
uv-44 268,8-337,7	50,6	1.187	a	811	0,7	b	414	0,3	c	300	0,3	c	752	0,6	b	757	0,6	b	818	0,7	b	759	0,6	b	912	0,8	b	876	0,7	b		
201,8-350,9	50,7	708	ab	820	1,2	a	412	0,6	c	699	1,0	ab	↓	d		↓	d		↓	d		↓	d		↓	d	583	0,8	b	657	0,9	ab

Continuación de la Tabla- V.

Detector UV-visible	T _R	FNT0		FNT24		FNT48		FNT72		FH24		FH48		FH72		FI24		FI48		FI72														
		Área/ Conc.	Stat	Área/ Conc.	FC24/ FNT0	Stat	Área/ Conc.	FC48/ FNT0	Stat	Área/ Conc.	FC72/ FNT0	Stat	Área/ Conc.	FH24/ FNT0	Stat	Área/ Conc.	FH48/ FNT0	Stat	Área/ Conc.	FH72/ FNT0	Stat	Área/ Conc.	FI24/ FNT0	Stat	Área/ Conc.	FI48/ FNT0	Stat	Área/ Conc.	FI72/ FNT0	Stat				
FLAVONAS (Continuación)																																		
uv-45	204,1-266,5-349,7	51,5	2.178	a	1.661	0,8	b	529	0,2	d	529	0,2	d	1.025	0,5	c	1.802	0,8	b	1.184	0,5	c	1.238	0,6	c	1.103	0,5	c	2.428	1,1	a			
uv-47	204,1-254,7-348,5	52,8	652	c	670	1,0	c	526	0,8	cd	1.497	2,3	a	1.472	2,3	a	1.126	1,7	b	53	0,1	e	285	0,4	def	1.079	1,7	b	1.311	2,0	ab			
	205,3-270,0-350,9	54,0	357	a			↓	e		↓	e		↓	75	0,2	bcd	272	0,8	abc	123	0,3	abcd	41	0,1	de		↓	e	229	0,6	abcd	317	0,9	ab
	201,8-259,4-334,2-370,3	54,3	146		113	0,8					160	1,1		97,4	0,7							115	0,8		203	1,4		79	0,5		91	0,6		
uv-64	Isorroifolina*	55,7	588	a	470	0,8	a	335	0,6	a	374	0,6	a	342	0,6	a	480	0,8	a	510	0,9	a	358	0,6	a	355	0,6	a	56	0,1	b			
uv-65	Diosmina*	56,4	143		119	0,8		41	0,3		140	1,0		153	1,1		139	1,0		76	0,5		22	0,2		61	0,4		68	0,5				
uv-67	202,9-267,7-348,5	57,6	1.024		1.238	1,2		388	0,4		1.101	1,1		204	0,2		492	0,5		701	0,7		226	0,2		978	1,0		674	0,7				
	201,8-283,0-346,1	63,3	104		111	1,1				↓	219	2,1		167	1,6		104	1,0		196	1,9			↓		215	2,1			↓				
	201,8-253,5-335,4	72,2	114		386	3,4		183	1,6		182	1,6		340	3,0		539	4,7		130	1,1			↓		328	2,9		177	1,5				
	273,6-331,8	74,4		c				c			84	↑	b	174	↑	a	224	↑	a	206	↑	a			c	82	↑	b	208	↑	a			
	280,7-334,2	75,9			189	↑					110	↑		174	↑		142	↑		130	↑		523	↑		80	↑		214	↑				
uv-93	Isosinensetina*	79,4	26	abc	27	1,0	ab	19	0,7	d	20	0,8	cd	26	1,0	abc	29	1,1	a	19	0,7	d	28	1,1	a	21	0,8	bcd	28	1,1	ab			
uv-94	Hexametil-O-gospipetina*	81,2	3,7		3,3	0,9		2,7	0,7		2,6	0,7		3,6	1,0		4,2	1,1		2,8	0,8		3,8	1,0		3,3	0,9		2,3	0,6				
uv-95	Sinensetina*	82,5	659	ab	623	0,9	abc	524	0,8	de	467	0,7	e	585	0,9	bcd	710	1,1	a	481	0,7	e	613	0,9	abcd	553	0,8	cde	660	1,0	ab			
uv-96	Hexametil-O-quercetagetina	84,5	1.371	bc	1.371	1,0	b	1.106	0,8	de	1.102	0,8	de	1.330	1,0	bc	1.510	1,1	a	1.045	0,8	e	1.341	1,0	bc	1.265	0,9	bcd	1.277	0,9	bcd			
uv-97	Nobiletina*	85,5	137	a	126	0,9	abc	112	0,8	bcd	96	0,7	d	133	1,0	ab	145	1,1	a	94	0,7	d	124	0,9	abc	111	0,8	cd	133	1,0	ab			
uv-98	Tetrametil-O-escutelareina*	86,0	474	ab	473	1,0	ab	380	0,8	bc	354	0,7	c	447	0,9	abc	539	1,1	a	359	0,8	c	453	1,0	abc	446	0,9	abc	489	1,0	ab			
uv-99	Heptametoxiflavona*	87,5	179	abc	179	1,0	ab	95	0,5	e	128	0,7	cd	156	0,9	abc	194	1,1	a	133	0,7	bcd	170	0,9	abc	158	0,9	abc	178	1,0	abc			
uv-100	Tangeretina	88,7	2.073	a	1.935	0,9	a	1.703	0,8	ab	1.606	0,8	ab	1.625	0,8	ab	1.986	1,0	a	1.333	0,6	b	1.679	0,8	ab	2.102	1,0	a	1.938	0,9	a			
FLAVANONAS																																		
	285,4	42,9		d	44	↑	d				251	↑	c				d			691	↑	b	1.143	↑	a	1.096	↑	a	1.163	↑	a			
uv-63	Narirutina*	53,5	125		124	1,0		87	0,7		127	1,0		169	1,4		140	1,1		134	1,1		152	1,2		135	1,1		119	0,9				
uv-69	Hesperidina*	58,5	3.857	ab	3.414	0,9	bcd	3.292	0,9		3.235	0,8	d	3.817	1,0	abc	4.155	1,1	a	3.337	0,9	bcd	3.954	1,0	a	3.067	0,8	d	3.280	0,9	cd			
uv-71	211,1-280,7-395,0	62,0	73	c			↓	c		↓	131	1,8	bc	67	0,9	c	369	5,0	a	62	0,8	c		↓	c	221	3,0	b	238	3,2	ab			
uv-77	Didimina*	70,0	108		126	1,2		109	1,0		150	1,4		173	1,6		148	1,4		148	1,4		167	1,5		140	1,3		182	1,7				
OTROS																																		
uv-104	267,7-330,0	59,4		c				c					c				92	↑	b	151	↑	a	22	↑	c	105	↑	b	141	↑	a			
uv-105	271,2-329,4	87,8	435	a	340	0,8	a			↓	c		↓	c		373	0,9	a	421	1,0	a		↓	c		↓	c		↓	c	171	0,4	b	

Tabla- VI. Determinación de compuestos fluorescentes en el flavedo de naranjas 'Navelina' infectadas con *P. digitatum*. (Ver Tabla- V).

Fluor.	FNT0			FNT24			FNT48			FNT72			FH24			FH48			FH72			FI24			FI48			FI72			T _R			
	T _R	Área/ Conc.	Stat	Área/ Conc.	FC24/ FNT0	Stat	Área/ Conc.	FC48/ FNT0	Stat	Área/ Conc.	FC72/ FNT0	Stat	Área/ Conc.	FH24/ FNT0	Stat	Área/ Conc.	FH48/ FNT0	Stat	Área/ Conc.	FH72/ FNT0	Stat	Área/ Conc.	FI24/ FNT0	Stat	Área/ Conc.	FI48/ FNT0	Stat	Área/ Conc.	FI72/ FNT0	Stat				
	29,1	16	a				14	0,9	a	16	1,0	a	15	0,9	a	14	0,9	a	14	0,9	a	12	0,8	a						29,1				
F-3	29,8	135	abc		128	0,9	ab	133	1,0	ab	151	1,1	a	143	1,1	ab	158	1,2	a	118	0,9	b	156	1,1	a	132	1,0	ab	26	0,2	c	29,8		
	31,9	14	c								24	1,7	b	27	1,9	ab	30	2,2	a	29	2,1	ab			bd				29	2,1	ab	31,9		
F-4	32,8	30			27	0,9					45	1,5		95	3,1		102	3,4		43	1,4							62	2,0		32,8			
	33,2	115			108	0,9		103	0,9		50	0,4		28	0,2					43	0,4		12	0,1				30	0,3		33,2			
F-5	31,9		b				b		b						b				19		a	28	↑	a	27	↑	a	30	↑	a	31,9			
	33,6		c				c		c						c							24	↑	b				29	↑	a	33,6			
	35,2	9			14	1,6					12	1,3							10	1,1		183	21,1		163	18,9	226	26,1		35,2				
	34,7		b				b		b						b									b		22	↑	ab	62	↑	a	34,7		
	37,0	42	d				e		e		47	1,1	d	86	2,1	c	136	3,3	b	59	1,4	cb	121	2,9	b	141	3,4	b	177	4,3	a	37,0		
F-8	37,8	96			97	1,0		93	1,0		98	1,0							72	0,8		103	1,1		134	1,4		55	0,6		37,8			
	39,9	195			192	1,0		191	1,0		205	1,1		190	1,0		196	1,0		161	0,8		168	0,9		105	0,5		316	1,6		39,9		
F-9	40,2	41	c		58	1,4	c	52	1,3	c	51	1,2	c	49	1,2	c	48	1,2	c	47	1,2	c	46	1,1	c	213	5,2	a	175	4,3	b	40,2		
	40,9	18	c		22	1,2	bc	19	1,1	c	31	1,7	abc	43	2,4	ab	43	2,4	ab	39	2,1	abc	35	1,9	abc	84	4,6	a	45	2,5	b	40,9		
F-10	41,4	25	bcd		18	0,7	cd	15	0,6	ed	25	1,0	bcd	25	1,0	bcd	27	1,1	bc	13	0,5	d	21	0,8	bcd	34	1,4	b	71	2,9	a	41,4		
	40,6	8	b				c		c		11	1,5	b							12	1,6	b					9	1,1	b	23	2,9	a	40,6	
	43,2		d				d		d		10	↑	b	8	↑	bc	9	↑	bc	7	↑	c	9	↑	bc	9	↑	bc	15	↑	a	43,2		
	44,1		b				b		b		11	↑	ab	12	↑	ab	13	↑	ab	9	↑	ab	16	↑	a	14	↑	ab	13	↑	a	44,1		
	45,4		b				b		b				b				8	↑	a									12	↑	a	45,4			
F-12	46,3	12	a		12	1,0	a	26	2,2	a	28	2,4	a	36	3,1	a	138	11,6	b	203	17,1	a	36	3,0	a	118	9,9	b	227	19,1	a	46,3		
	47,5	13			12	0,9		7	0,6		8	0,6		10	0,8		17	1,3		12	0,9		11	0,9		16	1,2		5	0,4		47,5		
	48,6	8	abc		8	1,1	ab	5	0,7	bcd	4	0,5	d	9	1,2	a	5	0,6	cd	6	0,8	abcd	8	1,0	abc	4	0,6	cd	3	0,5	d	48,6		
F-13	49,6	5	cd		10	1,9	abc	13	2,3	a	11	2,0	ab	5	1,0	cd			e	5	0,9	d	5	0,9	de	7	1,2	bcd	14	2,6	a	49,6		
	52,0	10	b		12	1,2	ab	14	1,4	a	11	1,1	b						↓	d	4	0,4	c				↓	d		d	52,0			
	52,3	23	cd		31	1,4	bc	29	1,3	bcd	27	1,2	bc	10	0,5	e	15	0,7	de	34	1,5	b	11	0,5	e	52	2,2	a	33	1,4	bc	52,3		
F-14	51,7																		11	↑		12	↑		22	↑		297	↑		51,7			
F-15	55,6															13	↑		11	↑		14	↑		31	↑		57	↑		55,6			
	56,5						32	↑		37	↑								31	↑		32	↑		37	↑		14	↑		56,5			
	58,6	62			48	0,8		40	0,6		35	0,6		39	0,6		50	0,8		572	9,3		102	1,7		497	8,1		947	15,4		58,6		
F-16	59,8										35	↑		115	↑		443	↑		571	↑		99	↑		490	↑		931	↑		59,8		
F-17	61,6*										1,6	↑							0,9	↑		4,2	↑		0,1	↑		7,3	↑		14,8	↑	61,6*	
	64,7	82			12	0,2		42	0,5		19	0,2		15	0,2		112	1,4		10	0,1		12	0,1		33	0,4		42	0,5		64,7		
	65,1	27	bcd		29	1,1	cd	22	0,8	cd	20	0,7	cd	15	0,6	d			↓	d	22	0,8	cd	68	2,5	a	61	2,3	ab	54	2,0	abc	65,1	
	66,1		c				c		c				c														8	↑	b	19	↑	a	66,1	
	68,3	82	a		63	0,8	ab	50	0,6	b	52	0,6	b	62	0,8	ab	83	1,0	a	20	0,2	c	9	0,1	c	18	0,2	c	20	0,2	c	68,3		
	74,3	10									4	0,4							↓		4	0,4						↓		11	1,1		74,3	
	75,4		c				c		c				c							6	↑	b				4	↑	bc		c	21	↑	a	75,4
F-18	78,6		b				b		b				b														13	↑	b	226	↑	a	78,6	
F-19	79,1		b				b		b				b														5	↑	b	99	↑	a	79,1	
F-21	80,7															83	↑		20	↑		10	↑		37	↑		33	↑		80,7			
	85,6	9			8	0,8		7	0,8		7	0,8		20	2,2		11	1,2					9	1,0		26	2,8		463	50,2		85,6		

Tabla- VII. Determinación de compuestos fenólicos mediante el detector de UV-visible en el albedo de naranjas ‘Navelina’ infectadas por *P. digitatum*. En la tabla se muestran aquellos picos que modificaron el área de integración (mUA s) en más de 1,5 (°) veces o menos de 0,67 veces (°) como consecuencia de la infección de *P. digitatum* respecto del flavedo de frutos no tratados (ANT0), y la concentración ($\mu\text{g g}^{-1}$ PF) de aquellos correspondientes a patrones conocidos. Las flechas indican los aumentos o disminuciones en compuestos no detectados en alguna de las muestras comparadas. Se realizaron, al menos, dos extracciones independientes. Se aplicó el análisis ANOVA empleando el test LSD. Letras diferentes para un mismo T_R indican diferencias significativas ($p < 0,05$). (Ver nomenclatura en el apartado 5 de Materiales y Métodos).

Detector UV-visible	T_R	ANT0			ANT24			ANT48			ANT72			AH24			AH48			AH72			AI24			AI48			AI72		
		Área / Conc.	Stat	Área / Conc. / ANT0	Área / Conc. / ANT0	Stat	Área / Conc. / ANT0	Stat	Área / Conc. / ANT0	Stat	Área / Conc. / ANT0	Stat	Área / Conc. / ANT0	Stat	Área / Conc. / ANT0	Stat	Área / Conc. / ANT0	Stat	Área / Conc. / ANT0	Stat	Área / Conc. / ANT0	Stat	Área / Conc. / ANT0	Stat	Área / Conc. / ANT0	Stat	Área / Conc. / ANT0	Stat			
BENZOICOS																															
	201,8-272,4-352,1-372,1	27,6	173 c	227 1,3 bc	376 2,2 a	395 2,3 a	338 2,0 ab	309 1,8 ab	297 1,7 abc	331 1,9 ab	379 2,2 a	335 1,9 ab																			
uv-4	232,3	30,3	659 bc	716 1,1 b	861 1,3 a	674 1,0 bc	591 0,9 c	207 1,0 cd	489 2,5 b	938 4,7 a	591 0,9 c	207 1,0 cd	489 2,5 b	938 4,7 a	591 0,9 c	207 1,0 cd	489 2,5 b	938 4,7 a	591 0,9 c	207 1,0 cd	489 2,5 b	938 4,7 a	591 0,9 c	207 1,0 cd	489 2,5 b	938 4,7 a	591 0,9 c	207 1,0 cd	489 2,5 b	938 4,7 a	
uv-5	202,9-257,0-386,5	31,0	199 cd	211 1,1 cd	258 1,3 c	250 1,3 c	482 2,4 b	167 0,8 d	207 1,0 cd	1.829 1,0	1.982 1,1	1.206 0,7																			
uv-10	212,3-257,0-368,5-391,4	34,3	1.841	2.044 1,1	2.239 1,2	2.074 1,1	2.213 1,2	1.994 1,1	1.556 0,8	1.829 1,0	1.982 1,1	1.206 0,7																			
uv-24	241,7-328,2	41,6	62 cd	104 1,7 abc	144 2,3 ab	95 1,5 c	147 2,4 a	275 ↑	248 ↑	214 ↑	233 ↑	245 ↑	224 ↑																		
	228,7-331,8-363,0-391,4	46,9																													
uv-54	221,7-277,1-375,7	51,3	308 ab	285 0,9 abc	432 1,4 a	410 1,3 a	445 1,4 a	398 1,3 a	163 0,5 b	443 1,4 a	335 1,1 ab	200 0,6 b																			
uv-55	225,2-271,2-354,5	52,3	d	d	120 ↑ cd	84 ↑ c	237 ↑ b	156 ↑ bc	135 ↑ c	174 ↑ bc	105 ↑ c	666 ↑ a																			
	208,8-259,4-354,5	54,6	317 a	271 0,9 b	d	17 0,1 d	46 0,1 c	↓ d	↓ d	↓ d	↓ d	↓ d																			
uv-71	210,0-317,5-374,5	67,1	647	562 0,9	442 0,7	388 0,6	413 0,6	560 0,9	347 0,5	331 0,5	826 1,3	755 1,2																			
	232,3-349,7-386,5	67,2	b	b	b	b	b	b	b	↓ b	147 ↑ a	179 ↑ a																			
uv-78	231,1	71,9	408 b	470 1,2 b	634 1,6 a	231 0,6 c	188 0,5 cd	167 0,4 cde	152 0,4 def	98 0,2 def	188 0,5 cd	92 0,2 f																			
	273,6-311,5	73,7	320 bc	407 1,3 ab	103 0,3 fg	235 0,7 cde	462 1,4 a	194 0,6 def	286 0,9 cd	↓ cd	↓ g	157 0,5 ef																			
	232,3-273,6-354,5	74,9	471 b	488 1,0 a	214 0,5 bc	113 0,2 bcd	63 0,1 cd	↓ d	96 0,2 bcd	86 0,2 bcd	132 0,3 bcd	132 0,3 bcd																			
uv-90	232,3	76,5	97	116 1,2	322 3,3	295 3,0	378 3,9	299 3,1	216 2,2	176 1,8	274 2,8	287 2,9																			
uv-92	231,1-270,0-312,7	78,6	53	48 0,9	120 2,3	98 1,8	119 2,2	118 2,2	93 1,8	113 2,1	162 3,1	225 4,2																			
	225,2-305,6-322,3	84,1	55	60 1,1	99 1,8	86 1,6	55 1,0	148 2,7	↓	↓	102 1,9	208 3,8																			
uv-101	238,2-305,6-329,4	90,3	74	83 1,1	115 1,6	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓																			
uv-102	238,2	91,4	112 a	111 1,0 a	126 1,1 a	↓ b	↓ b	↓ d	↓ b	↓ b	↓ b	↓ b																			
CINÁMICOS																															
	232,3-316,3-391,4	29,9	d	d	1.036 ↑ ab	1.478 ↑ a	940 ↑ cd	854 ↑ bc	1.368 ↑ abc	819 ↑ bc	621 ↑ bc	1.026 ↑ ab																			
uv-3	218,2-233,5-316,3	31,6	1.152 b	1.234 1,1 a	↓ e	↓ e	↓ e	↓ e	↓ e	148 0,1 d	189 0,2 c	183 0,2 c																			
uv-2	228,7-311,5	33,6	101 bcd	↓ e	↓ e	65 0,6 cde	175 1,7 ab	131 1,3 abc	37 0,4 de	9 0,1 e	70 0,7 cde	188 1,9 a																			
uv-12	227,6-311,5-378,1-392,6	36,1	101	105 1,0	166 1,7	162 1,6	101 1,0	73 0,7	178 1,8	122 1,2	107 1,1	204 2,0																			
uv-14	218,2-245,2-336,6	36,5	77 c	62 0,8 cd	78 1,0 c	119 1,5 abc	65 0,8 c	99 1,3 abc	196 2,5 abc	98 1,3 bc	64 0,8 c	207 2,7 a																			

Continuación de la Tabla- VII.

Detector UV-visible	T _R	ANT0			ANT24			ANT48			ANT72			AH24			AH48			AH72			AI24			AI48			AI72			
		Área / Conc.	Stat		Área / Conc.	ANT24 /ANT0	Stat	Área / Conc.	ANT48 /ANT0	Stat	Área / Conc.	ANT72 /ANT0	Stat	Área / Conc.	AH24/ ANT0	Stat	Área / Conc.	AH48/ ANT0	Stat	Área / Conc.	AH72/ ANT0	Stat	Área / Conc.	AI24/ ANT0	Stat	Área / Conc.	AI48/ ANT0	Stat	Área / Conc.	AI72/ ANT0	Stat	
CINÁMICOS (Continuación)																																
	226,4-325,8	37,0	352	a	350	1,0	a	144	0,4	c	116	0,3	cd	141	0,4	c	125	0,4	c	82	0,2	d	121	0,3	c	118	0,3	cd	198	0,6	b	
uv-15	Ác. clorogénico*	40,6	31	ab	33	1,1	abc	47	1,5	cd	38	1,2	abc	35	1,1	d	53	1,7	bcd	34	1,1	abc	52	1,7	abc	51	1,6	bcd	70	2,3	a	
	218,2-328,2	42,3	532	a	375	0,7	b	154	0,3	c	337	0,6	b	65	0,1	cd																
	231,1-285,4-322,3	52,7																														
uv-76	287,8-329,4	69,5	109		120	1,1		140	1,3		183	1,7																				
uv-79	201,8-284,2-327,0	72,8	164	bc	177	1,1	bc							374	2,3	b	623	3,8	a	309	1,9	b	592	3,6	b	357	2,2	b	355	2,2	b	
uv-91	242,9-330,6	77,6	70	bc	69	1,0	c	77	1,1	bc	64	0,9	c	116	1,6	b	79	1,1	bc	58	0,8	c	273	3,9	c	83	1,2	c			d	
CUMARINAS																																
uv-72	Escoparona*	62,6		c			c				1,0																					
FLAVONAS																																
uv-28	214,6-271,2-338,9	42,6	355	cd	319	0,9	d	515	1,4	b	521	1,5	b	260	0,7	b	457	1,3	bc	424	1,2	bc	553	1,6	b	519	1,5	b	893	2,5	a	
	272,4-337,7	43,8	169	ab	172	1,0	a	86	0,5	b	143	0,8	ab	167	1,0	ab	175	1,0	a	105	0,6	abc										
uv-93	Isosinensetina*	80,0	3,8	bc	4,1	1,1	bc	2,4	0,6	bc	3,2	0,8	bc	4,2	1,1	b	3,1	0,8	bc	2,2	0,6	c	4,1	1,1	b	2,6	0,7	bc	12,9	3,4	a	
uv-94	Hexametil-O-gospetina*	81,5	0,7		0,7	1,0		0,6	0,9		0,7	1,0		0,9	1,3		0,7	1,0		0,5	0,7		0,9	1,3		1,4	2,0		3,5	5,0		
uv-95	Sinensetina*	82,6	103	ab	106	1,0	a	70	0,7	cd	88	0,9	abc	94	0,9	abc	74	0,7	d	57	0,6	cd	89	0,9	abc	69	0,7	cd	79	0,8	bcd	
uv-96	Hexametil-O-queretajetina	84,6	306	a	312	1,0	a	243	0,8	ab	258	0,8	ab	262	0,9	ab	227	0,7	bc	154	0,5	cd	243	0,8	ab	218	0,7	bcd	142	0,5	d	
uv-97	Nobiletina*	85,5	23	a	23	1,0	a	17	0,7	bc	19	0,9	ab	17	0,7	bc	16	0,7	bcd	12	0,5	d	18	0,8	bc	14	0,6	cd	13	0,6	d	
uv-98	Tetrametil-O-escutelareina*	86,0	92	a	96	1,0	a	84	0,9	abc	86	0,9	ab	73	0,8	bcd	73	0,8	bcd	57	0,6	d	77	0,8	abc	66	0,7	cd	39	0,4	e	
uv-99	Heptametoxiflavona*	87,5	54	a	59	1,1	a	39	0,7	bc	46	0,8	ab	29	0,5	c	35	0,6	bc	29	0,5	c	34	0,6	bc	27	0,5	c	27	0,5	c	
uv-100	Tangeretina	88,8	370	b	373	1,0	b	341	0,9	b	312	0,8	bc	203	0,5	de	231	0,6	de	261	0,7	cd	187	0,5	e	481	1,3	a	251	0,7	cde	
FLAVANONAS																																
uv-53	Eriocitrina*	50,7	41	bc	25	0,6	c	47	1,2	b	44	1,1	bc	123	3,0	a	37	0,9	bc	30	0,7	bc	44	1,1	bc	27	0,7	bc	39	1,0	bc	
uv-58	281,9	53,1	1.089	ab	1.273	1,2	a	1.221	1,1	ab	574	0,5	cd	1.295	1,2	a	764	0,7	c	672	0,6	cd	1.041	1,0	b	640	0,6	cd	485	0,4	d	
uv-59	283,0	53,5	278		309	1,1		63	0,2		166	0,6		45	0,2		264	1,0		346	1,2											
uv-63	Narirutina*	55,7	921	ab	734	0,8	d	779	0,8	cd	868	0,9	abc	818	0,9	bcd	927	1,0	ab	845	0,9	abcd	947	1,0	a	877	1,0	abc	945	1,0	ab	
uv-69	Hesperidina*	58,5	3.201	a	3.220	1,0	a	3.038	0,9	ab	2.851	0,9	ab	2.776	0,9	b	2.783	0,9	b	2.935	0,9	ab	3.150	1,0	ab	3.111	1,0	ab	3.050	1,0	ab	
	291,3-337,7-370,9	63,9	163	ab	140	0,9	bc	247	1,5	a	83	0,5	bcd	75	0,5	bcd	96	0,6	bc	75	0,5	bcd										
uv-77	Didimina*	70,0	481	ab	448	0,9	b	472	1,0	b	468	1,0	b	458	1,0	b	446	0,9	b	478	1,0	ab	485	1,0	ab	480	1,0	ab	545	1,1	a	
OTROS																																
uv-35	208,8-254,7-358,0	43,6	130	bcd	175	1,3	bc	270	2,1	a	208	1,6	ab	288	2,2	a	155	1,2	bcd	134	1,0	bcd	116	0,9	cd	82	0,6	d	156	1,2	bcd	
uv-41	273,6-363,9	46,3	162		165	1,0		215	1,3		195	1,2		75	0,5																	
uv-104	267,7-330,6	59,6	113	bc	108	1,0	bc	361	3,2	a	353	3,1	a	143	1,3	a	54	0,5	c	241	2,1	abc	228	2,0	abc	72	0,6	bc	250	2,2	ab	

Tabla- VIII. Determinación de compuestos fluorescentes en el albedo de naranjas 'Navelina' infectadas con *P. digitatum*. (Ver Tabla- VII).

Fluor.	T _R	ANT0			ANT24			ANT48			ANT72			AH24			AH48			AH72			AI24			AI48			AI72			T _R
		Área/ Conc.	Stat		Área/ Conc.	ANT24 /ANT0	Stat	Área/ Conc.	ANT48 /ANT0	Stat	Área/ Conc.	ANT72 /ANT0	Stat	Área/ Conc.	AH24/ ANT0	Stat	Área/ Conc.	AH48/ ANT0	Stat	Área/ Conc.	AH72/ ANT0	Stat	Área/ Conc.	AI24/ ANT0	Stat	Área/ Conc.	AI48/ ANT0	Stat	Área/ Conc.	AI72/ ANT0	Stat	
F-1	28,2	43	cd		30	0,7	d	77	1,8	ab	99	2,3	a	63	1,5	bc	100	2,3	a	59	1,4	bc	88	2,0	a	99	2,3	a	98	2,3	a	28,2
	29,8	4	a		4	1,0	a	3	0,7	a	3	0,8	a		↓	b	3	0,7	a	3	0,8	a	2	0,4	ab	4	1,0	a	4	1,0	a	29,8
	30,5	2	bc		3	1,4	b	2	0,9	c	4	2,2	a		↓	d		↓	d		↓	d		↓	d		↓	d		↓	d	30,5
	31,6	6	a		5	0,9	a		↓	b		↓	b		↓	b		↓	b		↓	bc		↓	b		↓	b		↓	b	31,6
F-4	32,5	227	ab		241	1,1	a	219	1,0	bc	208	0,9	bcd	196	0,9	de	204	0,9	cd	155	0,7	f	185	0,8	e	184	0,8	e	63	0,3	g	32,5
	33,2	3	b		7	2,4	ab	9	3,2	a	3	1,0	b	7	2,4	ab	7	2,7	ab	6	2,2	ab	9	3,2	a	6	2,1	ab	6	2,0	ab	33,2
F-6	34,5	348			375	1,1		434	1,2		400	1,1		424	1,1		380	1,1		304	0,9		365	1,0		378	1,1		239	0,7		34,5
	36,2	40	a		30	0,8	ab	19	0,5	cd	24	0,6	bcd		↓	e	9	0,2	de		↓	e		↓	e	10	0,2	de		↓	e	36,2
	36,7	16			20	1,2		34	2,1		32	2,0			↓		22	1,3		36	2,2		27	1,7		31	1,9		40	2,5		36,7
F-8	37,5	109			23	0,2		181	1,7		123	1,1		34	0,3		110	1,0		39	0,4		45	0,4		166	1,5		178	1,6		37,5
F-9	38,9	26	d		41	1,5	a	35	1,3	ab	31	1,2	cd	5	0,2	e		↓	e	33	1,3	abc	29	1,1	cd	29	1,1	cd	40	1,5	a	38,9
	42,4	44	c		54	1,2	a	24	0,6	d	23	0,5	d	52	1,2	ab	47	1,1	bc	23	0,5	d	25	0,6	d	9	0,2	e	9	0,2	e	42,4
	44,7	12	d		13	1,1	d	31	2,6	a	2	0,2	e	22	1,9	b	16	1,3	c	2	0,2	e	11	0,9	d	23	1,9	b			e	44,7
F-12	46,9	13	cde		9	0,7	e	12	0,9	de	15	1,1	cde	26	1,9	ab	21	1,6	abc	19	1,5	bcd	15	1,2	cde	20	1,5	bcd	29	2,2	a	46,9
	50,8	5	b		5	0,9	b	12	2,2	ab	9	1,7	ab	10	1,8	ab	9	1,7	ab	5	1,0	b	11	2,1	ab	16	3,1	a	13	2,5	a	50,8
F-14	53,6	7			9	1,4		7	1,0		11	1,6		5	0,7		4	0,6		8	1,2		6	0,9		5	0,7		52	7,7		53,6
	55,5	7			11	1,6		10	1,4		12	1,7		11	1,6		10	1,4		7	1,1		10	1,5		11	1,6		11	1,5		55,5
F-15	57,1	3	d			↓	e		↓	e	9	2,8	ab		↓	e		↓	e	3	0,8	de	4	1,3	cd	10	3,1	a	7	2,0	bc	57,1
F-16	59,4																14	↑		35	↑		26	↑		50	↑		50	↑		59,4
F-17	62,9*		d			d				d			d		d		0,3	↑	d	1,3	↑	c	0,3	↑	d	2,8	↑	b	5,3	↑	a	62,9*
	70,3	20	abc			e		15	0,7	c	23	1,1	ab		↓	e	18	0,9	bc	9	0,4	d	25	1,2	c	15	0,7	c	16	0,8	a	70,3
	75,4	6	ab			↓	c		↓	c	4	0,7	ab		↓	c	7	1,2	a		↓	c		↓	c		↓	c	3	0,4	bc	75,4
	78,9	1				↓			↓		6	4,2			↓			↓			↓			↓			↓		4	3,0		78,9
F-18	79,6																											56	↑		79,6	
F-19	80,0																											28	↑		80,0	
F-20	81,6		d			d		4	↑	c			d		d		4	↑	c	8		b	3	↑	c	13	↑	a	3	↑	c	81,6
F-21	82,5							7	↑		3	↑		4	↑		19	↑		48			7	↑		51	↑		73	↑		82,5
F-22	84,7	23	a		24	1,0	a	17	0,7	bc	19	0,8	ab	16	0,7	bc	15	0,6	bc	12	0,5	c	17	0,7	bcd	14	0,6	bc	5	0,2	d	84,7
F-23	85,7	16	ab		17	1,1	a	11	0,7	cde	14	0,8	bc	11	0,7	cde	11	0,7	cde	9	0,5	de	11	0,7	cde	8	0,5	e	12	0,8	cd	85,7
F-24	86,2	7			8	1,1		6	0,8		6	0,8		5	0,6		5	0,6		3	0,4		5	0,7		3	0,4		9	1,3		86,2
	87,5				2	↑																					8	↑		84	↑	87,5

