



VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA



Tesis Doctoral

Aránzazu Gurrea Martínez

APROXIMACIONES

FISIOLÓGICAS Y MOLECULARES

A LA BIOSÍNTESIS DE COMPUESTOS

VOLÁTILES EN FRUTOS CÍTRICOS



Dirigida por

Dr. Lorenzo Zacarías García

Dra. M^a Jesús Rodrigo Esteve

Valencia, 2014



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



DEPARTAMENTO DE MEDICINA PREVENTIVA Y SALUD PÚBLICA,
CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN, TOXICOLOGÍA Y MEDICINA LEGAL
UNIVERSIDAD DE VALENCIA

Programa de Doctorado de Ciencias de la Alimentación

Aproximaciones fisiológicas y moleculares a la biosíntesis de compuestos volátiles en frutos cítricos

Tesis Doctoral presentada por Aránzazu Gurrea Martínez

Directores de Tesis

Dr. Lorenzo Zacarías García

Dra. M^a Jesús Rodrigo Esteve

Aránzazu Gurrea Martínez

Valencia, 2014



MINISTERIO DE
ECONOMÍA Y
COMPETITIVIDAD



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

INSTITUTO DE AGROQUÍMICA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS
(IATA)

D. Lorenzo Zacarías García, Doctor en Ciencias Biológicas y Profesor de Investigación, y Dña. M^a Jesús Rodrigo Esteve, Doctora en Ciencias Biológicas y Científico Titular, ambos pertenecientes al Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC):

CERTIFICAN: Que Aránzazu Gurra Martínez, licenciada en Ciencia y Tecnología de los Alimentos por la Universidad de Valencia, ha realizado bajo su dirección el trabajo que, con título “Aproximaciones fisiológicas y moleculares a la biosíntesis de compuestos volátiles en frutos cítricos”, presenta para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Valencia, a 30 de Abril de 2014

Dr. Lorenzo Zacarías García

Dra. M^a Jesús Rodrigo Esteve

DEPARTAMENT DE MEDICINA PREVENTIVA I SALUT PÚBLICA,
CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ, TOXICOLOGIA I MEDICINA LEGAL

Av. Vicent Andrés Estellés, s/n.
46100 Burjassot - València - Spain

Dña. M^a José Ocio Zapata, Catedrática de la Universidad de Valencia:

CERTIFICA: Que Aránzazu Gurrea Martínez, licenciada en Ciencia y Tecnología de los Alimentos por la Universidad de Valencia, ha realizado bajo su tutela el trabajo que, con título “Aproximaciones fisiológicas y moleculares a la biosíntesis de compuestos volátiles en frutos cítricos”, presenta para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Valencia, a 30 de Abril de 2014

Dra. María José Ocio Zapata

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradecer a mis directores de Tesis, el Dr. Lorenzo Zacarías y la Dra. M Jesús Rodrigo, la oportunidad que me han dado porque sin ellos no habría sido posible empezar ni terminar este trabajo.

Agradecer al Dr. Rouseff (CREC-Universidad de Florida) por acogerme y permitirme realizar una estancia en su laboratorio, y por hacerme sentir como en casa. A June y Jack por su ayuda.

Por otra parte, agradecer a todas las personas y entidades que han permitido la recolección de frutos: Banco de Germoplasma y Centro de Genómica del IVIA, y el Dr. José Luis Navarro en su explotación de Lliria; así como a todos los técnicos y especialistas responsables de las mismas.

Y ahora, dejando de lado las formalidades, y empezando por el lugar que ha sido mi segunda casa durante años, 'EL LAB', agradecer a Lorenzo y M^a Jesús, ya no como directores, sino como compañeros, por su cercanía y experiencia. A Amparo, que te voy a decir que no sepas; gracias por facilitarme el día a día, por tus consejos y ánimos, y como no por tus maravillosas extracciones; en resumen gracias por mimarme. A mis chicas, Enri 'Jefa' y Joanna por vuestra ayuda, confianzas, sonrisas y lágrimas, idas y venidas, dicen que lo bueno tarda en llegar pero llegasteis, creo que está claro ¿no?. A Fabio y Roger que, aunque por poco tiempo, también habéis formado parte de esta Tesis. Y finalmente, agradecer a Mónica, M^a José y José Marcos por su ayuda en los ensayos de infección, a Tere por su incondicional ¿Qué tal va todo? y a Ana Izquierdo por prestarme alguno de sus reactivos.

... y saliendo del 'LAB' agradecer a todas las personas que han contribuido a hacer de mi estancia en el IATA un lugar entrañable: las chicas del lab 114 (Marta, Eva, Sabi, Ester) por sus divertidas sobremesas, Gabi 'mi hermana brasileña', Manoli por estar ahí en todo momento, Sergio por esos 'raticos' de cafés, y como no a Eli por convertirte en una gran amiga. Además agradecer a los servicios generales del IATA (administración, informática, almacén, planta piloto, mantenimiento...) por la función que realizan.

Y como no, esta Tesis tampoco hubiese sido posible sin ellos, MI FAMILIA.

A mis PADRES, porque aunque suene un tópico, son los mejores. A ti PAPÁ, por tus consejos, por tu infinita paciencia y porque como tú no hay dos. A ti MAMÁ, por tu apoyo y confianza, por enseñarme como madre y entenderme como amiga... simplemente por ser TÚ.

A mí mejor amiga, MI HERMANA, porque contigo una mirada basta, por todas tus llamadas para un ¿Cómo va la tesis?, ¿Te ayudo?, y por darme un pequeño príncipe, JAVI Jr.,

con su incansable ‘Tía, ¿estás trabajando en el ordenador?’, y una pequeña princesa, ARÁNZAZU. A JAVI (‘cuñao’), por estar ahí cuando te he necesitado.

Y sobretodo, a mis IAIOS porque aunque este trabajo lo empecé con vosotros y lo he terminado sin vosotros sé que habéis estado ahí apoyándome, y lo seguiréis haciendo.

Por último a LUIS, por tu apoyo y comprensión, por tus ánimos, por estar siempre a mi lado... y como no, por poner tu granito de arena también en esta Tesis.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	XV
ABREVIATURAS	XXIII
RESUMEN	XXVII
INTRODUCCIÓN	1
1. Generalidades de los frutos cítricos	3
1.1 <i>Origen, difusión y clasificación</i>	3
1.2 <i>Situación actual de la producción de cítricos</i>	4
1.3 <i>Morfología, maduración y desarrollo de los frutos cítricos</i>	6
2. Compuestos volátiles en frutos	8
2.1 <i>Generalidades, función y síntesis</i>	8
2.2 <i>Compuestos volátiles en frutos cítricos</i>	13
3. Compuestos norisoprenoides	20
OBJETIVOS	25
MATERIALES Y MÉTODOS	29
1. Material vegetal	31
1.1 <i>Naranjas (Citrus sinensis, L.Osbeck)</i>	31
1.2 <i>Mandarinas (Citrus clementina)</i>	31
1.3 <i>Híbridos</i>	32
1.4 <i>Pomelos (Citrus paradisi, Macf.)</i>	32
2. Medida del color e índice de madurez	33
2.1 <i>Medida del color externo e interno</i>	33
2.2 <i>Índice de madurez</i>	34
3. Tratamientos postcosecha	34
3.1 <i>Desverdización con etileno</i>	34
3.2 <i>Tratamiento con etileno a frutos maduros</i>	35
3.3 <i>Ensayos de infección con Penicillium digitatum en el mutante de Clementina deg</i>	35

4. Extracción y cuantificación de CVs en frutos cítricos	36
4.1 <i>Extracción y análisis de la emisión de CVs de frutos cítricos intactos</i>	36
4.2 <i>Extracción y análisis del contenido de CVs del flavedo de frutos cítricos</i>	37
4.3 <i>Extracción y análisis de CVs en la pulpa de frutos cítricos</i>	38
4.4 <i>Extracción y análisis de compuestos norisoprenoides en el flavedo y la pulpa de frutos cítricos</i>	38
5. Extracción y cuantificación de carotenoides	38
5.1 <i>Extracción y cuantificación de carotenoides totales</i>	38
5.2 <i>Identificación y cuantificación de carotenoides mediante HPLC-PDA</i>	40
6. Extracción de RNA total	41
6.1 <i>Protocolo de extracción fenol-cloroformo</i>	41
6.2 <i>Extracción con RNeasy® Mini Kit</i>	42
7. Síntesis de cDNA	42
8. RT-PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR)	43
8.1 <i>Diseño de cebadores para la RT-qPCR</i>	43
8.2 <i>Verificación de los productos de RT-qPCR</i>	44
8.3 <i>Curvas de calibrado</i>	45
8.4 <i>Reacción de RT-qPCR</i>	45
8.5 <i>Análisis de la expresión relativa</i>	45
9. Programas informáticos	46

CAPITULO I: ESTUDIO COMPARATIVO DE LA BIOSÍNTESIS DE CVs EN FRUTOS DE DIFERENTES ESPECIES DE CÍTRICOS DURANTE LA MADURACIÓN NATURAL **49**

<u>Resultados</u>	51
1. Evolución del color e IM durante la maduración del fruto de la mandarina Clemenules, el híbrido de mandarina Ortanique y la naranja Navelate	51
2. Evolución de la emisión de CVs durante la maduración del fruto de la mandarina Clemenules, el híbrido de mandarina Ortanique y la naranja Navelate	53
2.1 <i>Emisión de CVs en frutos de la mandarina Clemenules</i>	61
2.2 <i>Emisión de CVs en frutos del híbrido Ortanique</i>	61
2.3 <i>Emisión de CVs en frutos de la naranja Navelate</i>	62
3. Evolución del contenido de CVs en el flavedo durante la maduración del fruto de la mandarina Clemenules, el híbrido de mandarina Ortanique y la naranja Navelate	62

3.1	<i>Contenido de CVs en frutos de la mandarina Clemenules</i>	66
3.2	<i>Contenido de CVs en frutos del híbrido Ortanique</i>	67
3.3	<i>Contenido de CVs en frutos de la naranja Navelate</i>	67
4.	Evolución de la composición de CVs en la pulpa durante la maduración del fruto de la mandarina Clemenules, el híbrido de mandarina Ortanique y la naranja Navelate	68
4.1	<i>Composición de CVs en la pulpa de frutos de la mandarina Clemenules</i>	72
4.2	<i>Composición de CVs en la pulpa de frutos del híbrido Ortanique</i>	72
4.3	<i>Composición de CVs en la pulpa de frutos de la naranja Navelate</i>	73
5.	Análisis de la expresión de genes de la biosíntesis de CVs en el flavedo y la pulpa durante la maduración del fruto de la mandarina Clemenules, el híbrido Ortanique y la naranja Navelate	73
	<u>Discusión</u>	77
	CAPITULO II: EFECTO DEL ETILENO EN LA BIOSÍNTESIS DE CVs DURANTE LA POSTCOSECHA DE FRUTOS DE DIFERENTES ESPECIES DE CÍTRICOS	91
<hr/>		
	<u>Resultados</u>	93
1.	Efecto de la aplicación de etileno y del inhibidor de su acción, 1-MCP, en la emisión de CVs en frutos virando de la mandarina Clemenules, el híbrido Ortanique y la naranja Navelate	99
2.	Efecto de la aplicación de etileno y del inhibidor de su acción, 1-MCP, en el contenido de CVs en el flavedo de frutos virando de la mandarina Clemenules, el híbrido Ortanique y la naranja Navelate	97
3.	Efecto de la aplicación de etileno y del inhibidor de su acción, 1-MCP, en la expresión de diferentes terpeno sintasas en el flavedo de frutos virando de la mandarina Clemenules, el híbrido Ortanique y la naranja Navelate	103
4.	Efecto de la aplicación de etileno exógeno y el inhibidor de su acción, 1-MCP sobre la biosíntesis de CVs en frutos maduros de naranja Navelate	107
4.1	<i>Efecto de la aplicación de etileno y del inhibidor de su acción, 1-MCP, en la emisión de CVs en frutos maduros de la naranja Navelate</i>	108
4.2	<i>Efecto de la aplicación de etileno y del inhibidor de su acción, 1-MCP, en el contenido de CVs en el flavedo de frutos maduros de la naranja Navelate</i>	110
4.3	<i>Efecto de la aplicación de etileno y del inhibidor de su acción, 1-MCP, en la expresión de genes implicados en la síntesis de CVs en frutos maduros de la naranja Navelate</i>	112

5. Efecto de la aplicación de etileno y del inhibidor de su acción, 1-MCP, en la expresión de un gen de una alcohol aciltransferasa en el flavedo de frutos cítricos	114
<u>Discusión</u>	117

CAPITULO III: CARACTERIZACIÓN DE LA EMISIÓN, ACUMULACIÓN Y BIOSÍNTESIS DE CVs EN FRUTOS DE LA MANDARINA DEG, UN MUTANTE DE CLEMENTINA CON NÚMERO REDUCIDO DE GLÁNDULAS DE ACEITE **125**

Resultados

1. Caracterización de la emisión, acumulación y biosíntesis de CVs en frutos del mutante deg durante la maduración natural	127
1.1 <i>Evolución del color e IM de frutos del mutante deg durante la maduración</i>	127
1.2 <i>Emisión de CVs en frutos del mutante deg durante la maduración</i>	128
1.3 <i>Contenido de CVs en el flavedo de frutos del mutante deg durante la maduración</i>	130
1.4 <i>Composición de CVs en la pulpa de frutos del mutante deg durante la maduración</i>	132
1.5 <i>Análisis de la expresión de genes de la biosíntesis de CVs en el flavedo y la pulpa de frutos del mutante deg durante la maduración</i>	134
2. Efecto del tratamiento de desverdización con etileno sobre la emisión, acumulación y biosíntesis de CVs en frutos del mutante deg	136
2.1 <i>Efecto del tratamiento con etileno sobre la emisión de CVs en frutos del mutante deg</i>	137
2.2 <i>Efecto del tratamiento con etileno sobre el contenido de CVs en el flavedo de frutos del mutante deg</i>	139
2.3 <i>Efecto del tratamiento con etileno sobre la expresión de genes de la biosíntesis de CVs en frutos del mutante deg</i>	141
3. Estudio de la susceptibilidad de los frutos del mutante deg a la infección por el hongo <i>Penicillium digitatum</i> y cambios asociados en la emisión de CVs	142
3.1 <i>Incidencia y progreso de la infección por P. digitatum en frutos del mutante deg</i>	142
3.2 <i>Efecto de la infección con P. digitatum en la emisión de CVs en frutos del mutante deg</i>	144
<u>Discusión</u>	147

CAPITULO IV: CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS NORISOPRENOIDES EN FRUTOS CÍTRICOS CON DISTINTA PIGMENTACIÓN	155
<hr/>	
<u>Resultados</u>	157
1. Composición de carotenoides en el flavedo y la pulpa de frutos de variedades de naranja (<i>Citrus sinensis</i>) y pomelo (<i>Citrus paradisi</i>) con distinta pigmentación	157
1.1 <i>Color del flavedo y la pulpa en frutos de las diferentes variedades de naranja y pomelo</i>	157
1.2 <i>Composición de carotenoides en el flavedo de frutos de las diferentes variedades de naranja y pomelo</i>	158
1.3 <i>Composición de carotenoides en la pulpa de frutos de las diferentes variedades de naranja y pomelo</i>	159
2. Identificación de compuestos norisoprenoides en el flavedo y la pulpa de frutos de variedades de naranja (<i>Citrus sinensis</i>) y pomelo (<i>Citrus paradisi</i>) con distinta pigmentación	162
2.1 <i>Composición de norisoprenoides en el flavedo de frutos de diferentes variedades de naranja y pomelo</i>	162
2.2 <i>Composición de norisoprenoides en la pulpa de frutos de diferentes variedades de naranja y pomelo</i>	164
<u>Discusión</u>	167
CONCLUSIONES	173
<hr/>	
BIBLIOGRAFÍA	177
<hr/>	
ANEXOS	193
<hr/>	

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Distribución de la producción total de cítricos en la Comunidad Valenciana en el año 2011, y porcentaje de producción de cada una de las variedades respecto a su grupo (% grupo) y a la producción total (% total). Datos de la CAPA (Generalitat Valenciana) 2011.....	6
Tabla 2. Composición (en %) del gradiente de elución utilizado para la separación de carotenoides por HPLC.....	36
Tabla 3. Relación de cebadores utilizados para la expresión relativa mediante RT-qPCR de los genes linalol sintasa (<i>LIN</i>), valenceno sintasa (<i>VAL</i>), limoneno sintasa 1 (<i>LIM 1</i>), limoneno sintasa 2 (<i>LIM 2</i>), β -pineno sintasa (β - <i>PIN</i>), ocimeno sintasa (<i>OCI</i>), sesquiterpeno sintasa multiproducto (<i>TPS3</i>) y alcohol aciltransferasa (<i>CsAAT</i>). S, Sentido; AS, Antisentido. a: GenBank; b: Phytozome V.7.0 database.....	40
Tabla 4. Características de calidad (color, °Brix, acidez e IM) de frutos de Clemenules, Ortanique y Navelate recién cosechados en cuatro estadios de maduración. El color de los frutos (parámetros Hunter <i>a/b</i>) es la media de 3 determinaciones en 6 frutos. El contenido en sólidos solubles (° Brix), el porcentaje de acidez (mg de ácido cítrico/100 ml de zumo) y el índice de madurez (IM) (° Brix/% de acidez) corresponden a la media de 3 grupos de 10 frutos. Los frutos se recolectaron durante las campañas 2007/08 y 2009/10. E.M: Estadio de maduración; n.a: no analizado.....	52
Tabla 5. CVs identificados en la emisión y en el contenido en el flavedo y en la pulpa de frutos de la mandarina Clemenules, el híbrido Ortanique y la naranja Navelate durante el desarrollo y la maduración. El símbolo \surd indica solo la presencia de ese CV.....	54
Tabla 6. Evolución de la emisión de los CVs mayoritarios durante la maduración natural de frutos de la mandarina Clemenules. Cada valor corresponde a la media \pm DE de al menos 3 réplicas de 6 a 15 frutos cada una. Los frutos se recolectaron en la campaña 2007/08. VI: Verde Inmaduro, VM: Verde Maduro, V: Virando, TC: Totalmente Coloreado. Tr: Trazas; N.D: no detectado.....	57
Tabla 7. Evolución de la emisión de los CVs mayoritarios durante la maduración natural de frutos del híbrido Ortanique. Cada valor corresponde a la media \pm DE de al menos 3 réplicas de 6 a 15 frutos cada una. Los frutos se recolectaron en la campaña 2007/08. VI: Verde Inmaduro, VM: Verde Maduro, V: Virando, TC: Totalmente Coloreado. Tr: Trazas; N.D: no detectado.....	58
Tabla 8. Evolución de la emisión de los CVs mayoritarios durante la maduración natural de frutos de la naranja Navelate. Cada valor corresponde a la media \pm DE de al menos 3 réplicas de 4 a 15 frutos cada una. Los frutos se recolectaron en la campaña 2009/10. VI: Verde Inmaduro, VM: Verde Maduro, V: Virando, TC: Totalmente Coloreado. Tr: Trazas; N.D: no detectado.....	59
Tabla 9. Evolución del contenido de los CVs mayoritarios en el flavedo de frutos de la mandarina Clemenules durante la maduración natural. Cada valor corresponde a la media \pm DE de al menos 2 réplicas. Los frutos se recolectaron en la campaña 2007/08. VI: Verde Inmaduro, VM: Verde Maduro, V: Virando, TC: Totalmente Coloreado. Tr: Trazas; N.D: no detectado.....	63
Tabla 10. Evolución del contenido de los CVs mayoritarios en el flavedo de frutos del híbrido Ortanique durante la maduración natural. Cada valor corresponde a la media \pm DE de al menos 2 réplicas. Los frutos se recolectaron en la campaña 2007/08. VI: Verde Inmaduro, VM: Verde Maduro, V: Virando, TC: Totalmente Coloreado. Tr: Trazas; N.D: no detectado.....	64

Tabla 11. Evolución del contenido de los CVs mayoritarios en el flavedo de frutos de la naranja Navelate durante la maduración natural. Cada valor corresponde a la media \pm DE de al menos 2 réplicas. Los frutos se recolectaron en la campaña 2009/10. VI: Verde Inmaduro, VM: Verde Maduro, V: Virando, TC: Totalmente Coloreado. Tr: Trazas; N.D: no detectado.	65
Tabla 12. Cambios en la composición de los CVs mayoritarios en la pulpa de frutos de la mandarina Clemenules durante la maduración natural. Cada valor corresponde a la media \pm DE de al menos 2 réplicas. Los frutos se recolectaron en la campaña 2007/08. VM: Verde Maduro, V: Virando, TC: Totalmente Coloreado. Tr: Trazas; N.D: no detectado.	69
Tabla 13. Cambios en la composición de los CVs mayoritarios en la pulpa de frutos del híbrido Ortanique durante la maduración natural. Cada valor corresponde a la media \pm DE de al menos 2 réplicas. Los frutos se recolectaron en la campaña 2007/08. VM: Verde Maduro, V: Virando, TC: Totalmente Coloreado. Tr: Trazas; N.D: no detectado.	70
Tabla 14. Cambios en la composición de los CVs mayoritarios en la pulpa de frutos de la naranja Navelate durante la maduración natural. Cada valor corresponde a la media \pm DE de al menos 2 réplicas. Los frutos se recolectaron en la campaña 2009/10. Tr: Trazas; N.D: no detectado. VM: Verde Maduro, V: Virando, TC: Totalmente Coloreado.	71
Tabla 15. Relación de CVs comunes y específicos identificados en la emisión de frutos de la mandarina Clemenules, el híbrido Ortanique y la Navelate durante el desarrollo y la maduración.	79
Tabla 16. Efecto de la aplicación postcosecha de etileno (5 ppm) y de 1-MCP (1 ppm) individualmente o en combinación sobre la emisión de los CVs mayoritarios en frutos virando de la mandarina Clemenules. Cada valor corresponde a la media \pm DE de al menos 3 réplicas de 6 frutos cada una. Los frutos se recolectaron en la campaña 2007/08.	95
Tabla 17. Efecto de la aplicación de etileno (5 ppm) y de 1-MCP (1 ppm) individualmente o en combinación sobre la emisión de los CVs mayoritarios en frutos virando del híbrido Ortanique. Cada valor corresponde a la media \pm DE de al menos 3 réplicas de 6 frutos cada una. Los frutos se recolectaron en la campaña 2007/08.	96
Tabla 18. Efecto de la aplicación de etileno (5 ppm) y de 1-MCP (1 ppm) individualmente o en combinación sobre la emisión de los CVs mayoritarios en frutos virando de la naranja Navelate. Cada valor corresponde a la media \pm DE de al menos 3 réplicas de 6 frutos cada una. Los frutos se recolectaron en campaña 2008/09.	97
Tabla 19. Efecto de la aplicación de etileno (5 ppm) y de 1-MCP (1 ppm) individualmente o en combinación en el contenido de CVs mayoritarios en el flavedo de frutos de la mandarina Clemenules. Cada valor corresponde a la media \pm DE de 2 réplicas. Los frutos se recolectaron en la campaña 2007/08.	100
Tabla 20. Efecto de la aplicación de etileno (5 ppm) y de 1-MCP (1 ppm) individualmente o en combinación en el contenido de CVs mayoritarios en el flavedo de frutos del híbrido Ortanique. Cada valor corresponde a la media \pm DE de 2 réplicas. Los frutos se recolectaron en la campaña 2007/08.	101
Tabla 21. Efecto de la aplicación de etileno (5 ppm) y de 1-MCP (1 ppm) individualmente o en combinación en el contenido de CVs mayoritarios en el flavedo de frutos de la naranja Navelate. Cada valor corresponde a la media \pm DE de 2 réplicas. Los frutos se recolectaron en la campaña 2009/10.	102
Tabla 22. Efecto de la aplicación de etileno (5 ppm) y de 1-MCP (1 ppm) individualmente o en combinación sobre la emisión de los CVs mayoritarios en frutos maduros de la naranja Navelate. Cada valor corresponde a la media \pm DE de al menos 3 réplicas de 6 frutos cada una. Los frutos se recolectaron en la campaña 2007/08.	109

Tabla 23. Efecto de la aplicación de etileno (5 ppm) y de 1-MCP (1 ppm) individualmente o en combinación en el contenido de CVs mayoritarios del flavedo de frutos maduros de la naranja Navelate. Cada valor corresponde a la media \pm DE de 2 réplicas. Los frutos se recolectaron en la campaña 2007/08.....	111
Tabla 24. Índice de color (Hunter <i>a/b</i>) y de madurez (IM) de frutos de la mandarina Clementina (control) y del mutante <i>deg</i> en diferentes estadios de maduración: Verde Inmaduro (VI), Verde Maduro (VM), Virando (V) y Totalmente Coloreado (TC). El color de los frutos corresponde a la media de al menos 6 frutos. El IM corresponde a la media de 3 grupos de 10 frutos. Los frutos se recolectaron durante la campaña 2010/11. n.a: no analizado.....	128
Tabla 25. Efecto del tratamiento postcosecha con etileno (5 ppm) en la emisión (ng/g PF) de CVs mayoritarios en frutos de la mandarina Clementina (control) y el mutante <i>deg</i> . Cada valor corresponde a la media \pm DE de al menos 3 réplicas de 6 frutos cada una. N.D: no detectado. Tr: trazas.....	138
Tabla 26. Efecto del tratamiento postcosecha con etileno (5 ppm) en la concentración (μ g/g PF) de los CVs mayoritarios en el flavedo de frutos de la mandarina Clementina (control) y el mutante <i>deg</i> . Cada valor corresponde a la media \pm DE de 2 réplicas. N.D: no detectado. ...	140
Tabla 27. Efecto de la inoculación con <i>P. digitatum</i> en la emisión (ng/g PF) de los CVs mayoritarios en frutos de la mandarina Clementina (control) y del mutante <i>deg</i> . La emisión de los CVs se evaluó a los 3 DPI en los frutos sometidos a los siguientes tratamientos: A, mutante <i>deg</i> con herida en ‘no glándula’ (NG) inoculado con agua; B, mutante <i>deg</i> con herida en ‘no glándula’ (NG) inoculado con hongo (<i>P. digitatum</i>); C, mutante <i>deg</i> con herida en ‘glándula’ (G) inoculado con agua; D, mutante <i>deg</i> con herida en ‘glándula’ (G) inoculado con hongo; E, frutos control con herida inoculados con agua; F, frutos control con herida inoculados con hongo. Cada valor corresponde a la media \pm DE de al menos 2 réplicas de 6 frutos cada una. N.D., no detectado.....	145
Tabla 28. Índice de color (Hunter <i>a/b</i>) del flavedo y la pulpa de frutos maduros de las variedades de naranjas (<i>Citrus sinensis</i>) Navel Frost y su mutante Cara Cara, y Navelate y su mutante Pinalate, y de las variedades de pomelo (<i>Citrus paradisi</i>) Star Ruby, Flame y Marsh. El color de los frutos es la media \pm DE de 3 determinaciones por fruto, en al menos 6 frutos.....	158
Tabla 29. Contenido de carotenoides (μ g/g PF) en el flavedo y la pulpa de frutos maduros de las variedades de naranjas (<i>Citrus sinensis</i>) Navel Frost y su mutante Cara Cara, y Navelate y su mutante Pinalate. Los datos son la media \pm DE de tres análisis independientes. (1) Traza: Carotenoides en concentraciones $< 0,05 \mu$ g/gPF. (2) No identificado.....	160
Tabla 30. Contenido de carotenoides (μ g/g PF) en el flavedo y la pulpa de frutos maduros de las variedades de pomelo (<i>Citrus paradisi</i>) Star Ruby, Flame y Marsh. Los datos son la media \pm DE de tres análisis independientes. (1) Traza: Carotenoides en concentraciones $< 0,05 \mu$ g/gPF. (2) No identificado.....	161
Tabla 31. Principales compuestos norisoprenoides identificados en el flavedo y la pulpa de frutos de naranja (<i>Citrus sinensis</i>) de las variedades Navel Frost, Cara Cara, Navelate y Pinalate, y de pomelo (<i>Citrus paradisi</i>) de las variedades Star Ruby, Flame y Marsh. Los compuestos identificados están ordenados por orden creciente del LRI. a: Índice de retención lineal en una columna capilar Stabilwax (Restek, Bellefonte, PA) (60m x 0,25mm d.i x 0,50 μ m).....	162

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Sección transversal de frutos de las principales especies de cítricos en las que se indican las distintas partes que componen su estructura.....7
- Figura 2.** Ruta esquemática de biosíntesis de terpenos en las plantas. Las abreviaturas indican: GA-3P: gliceraldehido-3-fosfato; MEV: ruta del mevalonato; MEP: ruta 2-C-metil-D eritritol-4-fosfato; DMAPP: dimetil-alil pirofosfato; IPP: isopentil pirofosfato; FPPS: farnesil difosfato sintasa; GPPS: geranil difosfato sintasa; FPP: farnesil difosfato; GPP: Geranil difosfato; GGPPS: geranil geranil difosfato sintasa; GGPP: geranil geranil bifosfato; TPS: terpeno sintasa; CCD: Dioxigenasa de corte de carotenoides. Adaptada de Dudareva et al., 2006.....10
- Figura 3.** Ruta esquemática de la biosíntesis de ésteres lineales y ramificados. Las abreviaturas indican: PDC: piruvato descarboxilasa; ADH: Aldehído deshidrogenasa; AAT: Alcohol aciltransferasa; AG: ácido graso; AGS: ácido graso saturado; AGI: ácido graso insaturado; AGPI: ácido graso poliinsaturado; LOX: lipooxigenasa. Adaptada de Ortiz (2011a).....11
- Figura 4.** Estructuras químicas de los CVs mono y sesquiterpenos relevantes en los frutos cítricos.....13
- Figura 5.** Estructura y origen biosintético propuesto de los principales norisoprenoides. A la izquierda se indican los carotenoides parentales de los que derivarían los distintos norisoprenoides (derecha) (adaptada de Lewinsohn et al., 2005).....22
- Figura 6.** Fotografía de una sección de un fruto del mutante *deg* (izquierda) con una única glándula de aceite y frutos parentales (derecha) con múltiples glándulas de aceite.....28
- Figura 7.** Esquema del diseño experimental del tratamiento con etileno y pre-tratamiento con 1-MCP a frutos virando de la variedad Navelate, Ortanique, Clemenules, y del mutante *deg* y su línea parental.....30
- Figura 8.** Esquema del diseño experimental del tratamiento con etileno y pre-tratamiento con 1-MCP a frutos maduros de las variedades Navelate.....31
- Figura 9.** Imagen comparativa de frutos de Clementina (control) y del mutante *deg* en la que se muestra la diferente densidad de glándulas de aceite entre ambos tipos de frutos y las dos áreas de flavedo del mutante (‘glándula’ y ‘no glándula’) donde se realizó la herida y/o inoculación del hongo.....32
- Figura 10.** Aspecto interno y externo de los frutos de Clemenules, Ortanique y Navelate en los distintos estadios del desarrollo y maduración utilizados en esta Tesis. Los estadios seleccionados fueron Verde Inmaduro (VI), Verde Maduro (VM), Virando (V) y Totalmente Coloreado (TC). Las fechas de recolección de los frutos, junto con otros parámetros de calidad se indican en la Tabla 1.....52
- Figura 11.** Expresión relativa de 7 genes de terpeno sintasas: β -pineno sintasa (β -PIN), limoneno sintasa 1 y 2 (*LIM 1* y *LIM 2*), ocimeno sintasa (*OCI*), linalol sintasa (*LIN*), valenceno sintasa (*VAL*) y sesquiterpeno sintasa multiproducto (*TPS3*) en el flavedo de frutos de Clemenules, Ortanique y Navelate durante la maduración natural. Los valores obtenidos para cada gen, están normalizados frente al nivel de expresión del flavedo de frutos de Ortanique en el estadio VI, al que se le asignó un valor relativo de 1, excepto para el gen *VAL* que se normalizó frente al flavedo de Ortanique en el estadio TC. CMN, Clemenules; ORT, Ortanique y NAV, Navelate.....75
- Figura 12.** Expresión relativa de 6 genes de terpeno sintasas: β -pineno sintasa (β -PIN), limoneno sintasa 1 y 2 (*LIM 1* y *LIM 2*), ocimeno sintasa (*OCI*), valenceno sintasa (*VAL*) y sesquiterpeno sintasa multiproducto (*TPS3*) en la pulpa de frutos de Clemenules, Ortanique y Navelate durante la maduración natural. Los valores obtenidos para cada gen, están normalizados frente al nivel de expresión del flavedo de frutos de Ortanique en el estadio VI,

- al que se le asignó un valor relativo de 1, excepto para el gen *VAL* que se normalizó frente al flavedo de Ortanique en el estadio TC. CMN, Clemenules; ORT, Ortanique y NAV, Navelate.....76
- Figura 13.** Diagrama que ilustra los CVs comunes y específicos identificados en la emisión de frutos de Clemenules, Ortanique y Navelate durante el desarrollo y la maduración.....79
- Figura 14.** Comparación entre la evolución de la emisión de CVs (ng/g PF) en frutos intactos y el contenido total en el flavedo (µg/g PF) de frutos de la mandarina Clemenules, el híbrido Ortanique y la naranja Navelate durante la maduración natural.....81
- Figura 15.** Aspecto y color externo de frutos virando de la mandarina Clemenules sometidos a los siguientes tratamientos postcosecha: atmósfera de aire (A), etileno (E) (5 ppm), 1-MCP (1 ppm)+aire (MA) y 1-MCP (1 ppm)+etileno (5 ppm) (ME). El color de los frutos (parámetro Hunter *a/b*) es la media de al menos 6 frutos. Los frutos se recolectaron durante la campaña 2008/09.....93
- Figura 16.** Aspecto y color externo de frutos virando del híbrido Ortanique sometidos a los siguientes tratamientos postcosecha: atmósfera de aire (A), etileno (E) (5 ppm), 1-MCP (1 ppm) +aire (MA) y 1-MCP (1 ppm) +etileno (5 ppm) (ME). El color de los frutos (parámetro Hunter *a/b*) es la media de al menos 6 frutos. Los frutos se recolectaron durante la campaña 2008/09.....94
- Figura 17.** Aspecto y color externo de frutos virando de la naranja Navelate sometidos a los siguientes tratamientos postcosecha: atmósfera de aire (A), etileno (E) (5 ppm), 1-MCP (1 ppm)+aire (MA) y 1-MCP (1 ppm)+etileno (5 ppm) (ME). El color de los frutos (parámetro Hunter *a/b*) es la media de al menos 6 frutos. Los frutos se recolectaron durante la campaña 2009/10.....94
- Figura 18.** Efecto de la aplicación de etileno (5 ppm) y 1-MCP (1 ppm) individualmente o en combinación, en la expresión relativa de 6 genes de terpeno sintasas en el flavedo de frutos de la mandarina Clemenules. Los genes analizados fueron: β-pineno sintasa (*β-PIN*), limoneno sintasa 1 y 2 (*LIM1* y *LIM2*), ocimeno sintasa (*OCI*), linalol sintasa (*LIN*) y valenceno sintasa (*VAL*). Los valores obtenidos para cada gen están normalizados frente al nivel de expresión del flavedo de frutos de Ortanique en el estadio V, al que se le asignó un valor relativo de 1, excepto para el gen *LIN* que se normalizó frente al flavedo de Clemenules tratado con etileno 6 días.....104
- Figura 19.** Efecto de la aplicación de etileno (5 ppm) y 1-MCP (1 ppm) individualmente o en combinación, en la expresión relativa de 6 genes de terpeno sintasas en el flavedo de frutos del híbrido Ortanique. Los genes analizados fueron: β-pineno sintasa (*β-PIN*), limoneno sintasa 1 y 2 (*LIM1* y *LIM2*), ocimeno sintasa (*OCI*), linalol sintasa (*LIN*) y valenceno sintasa (*VAL*). Los valores obtenidos para cada gen, están normalizados frente al nivel de expresión del flavedo de frutos de Ortanique en el estadio V, al que se le asignó un valor relativo de 1, excepto para el gen *LIN* que se normalizó frente al flavedo de Clemenules tratado con etileno 6 días.....105
- Figura 20.** Efecto de la aplicación de etileno (5 ppm) y 1-MCP (1 ppm) individualmente o en combinación, en la expresión relativa de 6 genes de terpeno sintasas en el flavedo de frutos de la naranja Navelate. Los genes analizados fueron: β-pineno sintasa (*β-PIN*), limoneno sintasa 1 y 2 (*LIM1* y *LIM2*), ocimeno sintasa (*OCI*), linalol sintasa (*LIN*) y valenceno sintasa (*VAL*). Los valores obtenidos para cada gen, están normalizados frente al nivel de expresión del flavedo de frutos de Ortanique en el estadio V, al que se le asignó un valor relativo de 1, excepto para el gen *LIN* que se normalizó frente al flavedo de Clemenules tratado con etileno 6 días.....106
- Figura 21.** Aspecto y color externo de frutos maduros de la naranja Navelate sometidos a los siguientes tratamientos postcosecha: atmósfera de aire (A), etileno (E) (5 ppm), 1-MCP (1 ppm)+aire (MA) y 1-MCP (1 ppm)+etileno (5 ppm) (ME). El color de los frutos (parámetro

- Hunter *a/b*) es la media de al menos 6 frutos. Los frutos se recolectaron durante la campaña 2007/08.108
- Figura 22.** Efecto de la aplicación de etileno (5 ppm) y 1-MCP (1 ppm) individualmente o en combinación, en la expresión relativa de 6 genes de terpeno sintasas en el flavedo de frutos maduros de la naranja Navelate. Los genes analizados fueron: β -pineno sintasa (β -*PIN*), limoneno sintasa 1 y 2 (*LIM 1* y *LIM 2*), ocimeno sintasa (*OCT*), linalol sintasa (*LIN*) y valenceno sintasa (*VAL*). Los valores obtenidos para cada gen, están normalizados frente al nivel de expresión del flavedo de frutos de Ortanique en el estadio V al que se le asignó un valor de 1.113
- Figura 23.** Efecto de la aplicación de etileno (5 ppm) y 1-MCP (1 ppm) individualmente o en combinación, en la expresión relativa de una alcohol aciltransferasa de cítricos (*CsAAT*) en el flavedo de frutos virando de Clemenules, Ortanique y Navelate, y de frutos maduros de Navelate. Los valores obtenidos están normalizados frente al nivel de expresión del flavedo de frutos virando de Navelate al inicio del experimento al que se le asignó un valor de 1. A: Aire; E: Etileno; MA: MCP+Aire; ME: MCP+Etileno.115
- Figura 24.** Corte transversal de frutos maduros (estadio TC, izquierda) y verdes inmaduros (estadio VI, derecha) de la mandarina Clementina (control) y del mutante *deg*, en los que se puede apreciar el menor número de glándulas y el grosor del flavedo de los frutos del mutante.127
- Figura 25.** Aspecto interno y externo de frutos de la mandarina Clementina (control) y del mutante *deg* en los distintos estadios de desarrollo y maduración utilizados en esta Tesis. Los estadios seleccionados fueron: Verde Inmaduro (VI), Verde Maduro (VM), Virando (V) y Totalmente Coloreado (TC). Las fechas de recolección de los frutos, junto con otros parámetros de calidad se indican en la Tabla 24.128
- Figura 26.** Perfil de emisión de los CVs mayoritarios de frutos de la mandarina Clementina (control) y del mutante *deg* durante la maduración. Dentro de cada panel la barra etiquetada como ‘otros’ representa CVs minoritarios de cada categoría. La barra ‘Otros’ del panel de monoterpenos hidrocarbonados incluye a: 3-careno, α -felandreno, α -pineno, 2- β -pineno, p-cimeno, ρ -terpineno y α -terpinoleno; en el panel de monoterpenos oxigenados y ésteres incluye a: 4-terpineol, L- α -terpineol, α -terpeneol acetato, geraniol acetato; en el panel de sesquiterpenos incluye a: α -cubebeno, ciclosativen, ρ -elemeno, β -elemeno, α -selineno, patchuleno, zingibereno, isocariofileno, aromadendreno, germacreno B, biciclogermacreno, δ -cadineno, δ -guayeno, α -muroleno, α -bergamoteno, epibiciclosesquifelandreno y β -sesquifelandreno; en el panel de alcoholes y aldehídos alifáticos incluye al nonanal y 2-octanol.129
- Figura 27.** CVs mayoritarios en el flavedo de frutos de la mandarina Clementina (control) y del mutante *deg* durante la maduración. En el apartado ‘otros’ se incluyen CV presentes en menor concentración. En el panel monoterpenos oxigenados la categoría ‘Otros’ incluye a: 4-terpineol, L- α -terpineol, nerol, geraniol e isogeraniol; en el panel de sesquiterpenos ‘Otros’ incluye a: δ -elemeno, α -humuleno, aromadendreno, β -sesquifelandreno; en el panel de alcoholes y aldehídos alifáticos la categoría ‘Otros’ incluye a: nonanal, cis-3-hexanol y dodecanal.131
- Figura 28.** Abundancia de CVs totales y porcentaje de CVs mayoritarios en la pulpa de frutos de la mandarina Clementina (control) y del mutante *deg* durante la maduración. En el apartado ‘Otros’ se incluyen CVs presentes en menor concentración. En el panel monoterpenos hidrocarbonados la categoría ‘Otros’ incluye a: α -pineno, 2- β -pineno; en el panel de monoterpenos oxigenados la categoría ‘Otros’ incluye a: 4-terpineol, L- α -terpineol, β -citronelol, geraniol; en el panel de alcoholes y aldehídos alifáticos ‘Otros’ incluye a: nonanal y cis-3-hexanol.133
- Figura 29.** Expresión relativa de diferentes terpeno sintasas en el flavedo de frutos de la mandarina Clementina (control) y del mutante *deg* durante la maduración natural. Las

- terpeno sintasas analizadas fueron: β -pineno sintasa (β -PIN), ocimeno sintasa (OCI), limoneno sintasa 1 y 2 (LIM 1 y LIM 2), linalol sintasa (LIN) y valenceno sintasa (VAL). Los valores de expresión obtenidos para cada gen están normalizados frente al nivel de expresión del flavedo de frutos control en el estadio VI, al que se le asignó un valor relativo de 1, excepto la VAL que está normalizada frente al flavedo de frutos control en el estadio TC. Las barras lisas corresponden a los frutos control y las rayadas corresponden a los frutos del mutante.135
- Figura 30.** Expresión relativa de diferentes terpeno sintasas en la pulpa de frutos de la mandarina Clementina (control) y del mutante *deg* durante la maduración natural. Las terpeno sintasas analizadas fueron: β -pineno sintasa (β -PIN), ocimeno sintasa (OCI), limoneno sintasa 1 y 2 (LIM 1 y LIM 2), linalol sintasa (LIN) y valenceno sintasa (VAL). Los valores de expresión obtenidos para cada gen están normalizados frente al nivel de expresión del flavedo de frutos control en el estadio VI, al que se le asignó un valor relativo de 1, excepto la VAL que está normalizada frente al flavedo de frutos control en el estadio TC. Las barras lisas corresponden a los frutos control y las rayadas corresponden a los frutos del mutante.136
- Figura 31.** Aspecto externo e índice color (Hunter *a/b*) de los frutos de mandarina Clementina (control) y del mutante *deg* durante el tratamiento de desverdización con etileno. Los frutos se incubaron durante 6 días en una atmósfera de aire (A) o de etileno (E) ($5 \mu\text{l l}^{-1}$ ppm). El color es la media de al menos 6 frutos.137
- Figura 32.** Efecto de la aplicación de etileno ($5 \mu\text{l l}^{-1}$) en la expresión relativa de diferentes terpeno sintasas en el flavedo de frutos de la mandarina Clementina (control) y del mutante *deg*. Las terpeno sintasas analizadas fueron: β -pineno sintasa (β -PIN), ocimeno sintasa (OCI), limoneno sintasa 1 y 2 (LIM 1 y LIM 2), linalol sintasa (LIN) y valenceno sintasa (VAL). Los valores de expresión obtenidos para cada gen están normalizados frente al nivel de expresión en el flavedo de frutos de Clementina control al inicio del experimento, al que se le asignó un valor relativo de 1, excepto la VAL que está normalizada frente al flavedo de frutos control tratados con etileno 6 días. Las barras lisas corresponden a los frutos control y las rayadas a los del mutante. A: Aire, E: Etileno.141
- Figura 33.** Progreso de la infección y porcentaje de heridas infectadas en frutos de la mandarina Clementina (control) y del mutante *deg* inoculados con *P. digitatum* (10^4 conidios/mL). A: Frutos *deg* con herida en zona 'no glándula' inoculados con agua; B: Frutos *deg* con herida en 'no glándula' inoculados con hongo; C: Frutos *deg* con herida en 'glándula' inoculados con agua; D: Frutos *deg* con herida en 'glándula' inoculados con hongo; E: Frutos control inoculados con agua; F: Frutos control inoculados con hongo. En cada tratamiento se inocularon 15 frutos (4 heridas por fruto), excepto en A y C que se inocularon 10 frutos (4 heridas por fruto). Los resultados son la media del porcentaje de heridas infectadas \pm DE para cada tratamiento y día post inoculación (DPI). Para cada día, letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$) en el porcentaje de heridas infectadas (test de Tukey).143
- Figura 34.** Progreso del diámetro del halo de infección en frutos de la mandarina Clementina (control) y del mutante *deg* inoculados con *P. digitatum* (10^4 conidios/mL). La descripción de cada tratamiento y el número de frutos utilizados se indica en la figura 33. Los resultados se representan como valores medios del diámetro de infección \pm DE para cada tratamiento y día. DPI: Días post inoculación.144
- Figura 35.** Aspecto externo e interno de los frutos maduros de naranjas (*Citrus sinensis*) de las variedades Cara Cara, Navel Frost, Pinalate y Navelate, y los pomelos (*Citrus paradisi*) de las variedades Star Ruby, Flame y Marsh utilizados en este estudio. Las características de color de los frutos se detallan en la Tabla 28.157
- Figura 36.** Niveles relativos de los norisoprenoides identificados en la piel de frutos de naranjas (*Citrus sinensis*) de las variedades Cara Cara (C.C), Navel Frost (N.F), Pinalate (P) y

Navelate (N). Los datos se expresan como porcentaje del total de compuestos volátiles identificados y son la media \pm DE de al menos 3 análisis independientes.....163

Figura 37. Niveles relativos de los norisoprenoides identificados en la flavedo de frutos de pomelo (*Citrus paradisi*) de las variedades Star Ruby (S.R), Flame (F) y Marsh (M). Los datos se expresan como porcentaje del total de compuestos volátiles identificados y son la media \pm DE de al menos 3 análisis independientes..... 164

Figura 38. Niveles relativos de los norisoprenoides identificados en la pulpa de frutos de naranja (*Citrus sinensis*) de las variedades Cara cara (C.C), Navel frost (N.F), Pinalate (P) y Navelate (N). Los datos se expresan como porcentaje del total de compuestos volátiles identificados y son la media \pm DE de al menos 3 análisis independientes.....165

Figura 39. Niveles relativos de los norisoprenoides identificados en la pulpa de frutos de pomelo (*Citrus paradisi*) de las variedades Star Ruby (S.R), Flame (F) y Marsh (M). Los datos se expresan como porcentaje del total de compuestos volátiles identificados y son la media \pm DE de al menos 3 análisis independientes..... 166

ABREVIATURAS

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AAT	Alcohol aciltransferasa
ACT	Actina
ACO	ACC Oxidasa
ADH	Alcohol deshidrogenasa
AG	Acido graso
AGI	Acido graso insaturado
AGPI	Acido graso poliinsaturado
AGS	Acido graso saturado
CCD	Dioxigenasa de corte de carotenoides
CG-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectómetro de masas
CMN	Clemenules
CsAAT	Alcohol aciltransferasa Cs
CV	Compuesto volátil
<i>deg</i>	Decreased oil glands
DMAPP	Dimetil-alil pirofosfato
Dpi	Días post infección
EST	Expressed Sequence Tag (Secuencia de un gen que se expresa en una determinada condición)
FPP	Farnesil difosfato
FPPS	Farnesil difosfato sintasa
GA-3P	Gliceraldehído-3-fosfato
GPP	Geranil difosfato
GPPS	Geranil difosfato sintasa
GGPP	Geranil geranil difosfato
GGPPS	Geranil geranil difosfato sintasa
HPL	Hiperóxido liasa
IM	Indice de madurez
IPP	Isopentil pirofosfato
LIM 1	Limoneno sintasa 1
LIM 2	Limoneno sintasa 2
LIN	Linalol sintasa
LOX	Ruta de la lipooxigenasa
LRI	Indice de Retención Lineal
1-MCP	1-Metil ciclopropeno
MEP	2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato
MEV	Mevalonato
NAV	Navelate
OCI	Ocimeno sintasa
ORT	Ortanique
β -PIN	β -pineno sintasa
PF	Peso fresco
PDC	Piruvato descarboxilasa
PDMS	Poli(dimetilsiloxano)
RT-qPCR	PCR cuantitativa a tiempo real
SPME-HS	Microextracción en fase sólida del espacio de cabeza estático
TC	Totalmente Coloreado
TPS	Terpeno sintasa
TPS3	Sesquiterpeno sintasa multiproducto
V	Virando
VAL	Valenceno sintasa
VI	Verde Inmaduro
VM	Verde Maduro

RESUMEN

El aroma es uno de los componentes de calidad de los frutos y su percepción por los consumidores se produce por la interacción del sistema sensorial con múltiples compuestos volátiles (CVs). Además de esta propiedad, los CVs también desempeñan importantes funciones en los mecanismos de defensa de las plantas, y en las flores y frutos actúan como atrayentes o repelentes de insectos polinizadores, dispersores de semillas y de depredadores. En los frutos cítricos la mayoría de los CVs responsables del aroma son de naturaleza terpenoide y se acumulan en estructuras especializadas, glándulas de aceite en el flavedo y los cuerpos de aceite en la pulpa, siendo el limoneno el mayoritario, así como otros monoterpenos y sesquiterpenos o sus derivados oxigenados, y los norisoprenoides. La mayoría de los estudios realizados sobre CVs en los frutos cítricos en las últimas décadas se han centrado en el contenido y composición de aceites esenciales presentes en el flavedo y en la pulpa o zumo, pero existe muy poca información sobre la emisión de los mismos de frutos intactos. Así, el objetivo general de esta Tesis Doctoral ha sido estudiar los mecanismos fisiológicos y moleculares implicados en el aroma de frutos de diferentes variedades y especies de cítricos durante la maduración natural y en diferentes situaciones postcosecha. Este objetivo general se ha abordado en cuatro apartados específicos, cuyos objetivos y resultados más relevantes se resumen a continuación.

Se ha realizado un estudio comparativo de la emisión por frutos intactos y del contenido en el flavedo y la pulpa de CVs durante la maduración del fruto en tres especies de cítricos: la naranja Navelate (*Citrus sinensis*), la mandarina Clemenules (*Citrus clementina*) y el híbrido Ortanique (*Citrus sinensis* x *Citrus reticulata*). Mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas se han podido identificar la mayoría de los CVs emitidos y presentes en el flavedo y pulpa de los frutos seleccionados, revelando la mayor capacidad aromática del híbrido, seguido de los frutos de naranja y de mandarina. Se detectaron mayores diferencias en el número y cantidad de CVs en la emisión que en el contenido, y destaca que no se encontró relación entre el contenido y la emisión de CVs, lo que sugiere que pueden ser procesos independientes o con una regulación distinta. El estudio de la expresión de siete genes de terpeno sintasas a lo largo de la maduración mostró una mayor acumulación de transcritos en la piel que en la pulpa y que no parece existir relación con la acumulación de CVs, excepto el aumento de la valenceno sintasa (*VAL*) y el descenso del gen *TPS3*, que fue paralelo con el aumento de valenceno y la disminución de determinados sesquiterpenos, respectivamente.

La aplicación de etileno exógeno a frutos de las tres variedades produjo efectos similares, ya que a la vez que aceleraba la coloración del fruto produjo una reducción de la emisión de los monoterpenos limoneno y linalol, la estimulación de la emisión de ocimeno y, especialmente, de valenceno. Destacó especialmente la estimulación por etileno de la emisión de ésteres

alifáticos exclusivamente en los frutos del híbrido y de naranja. Este efecto del etileno parece dependiente del estadio de maduración del fruto y se correlacionó con la estimulación de la expresión del gen *VAL*. Además, se ha identificado un gen de una nueva alcohol aciltransferasa (*AAT*) en cítricos, cuya expresión parece estar regulada por etileno y que es paralela a la emisión de ésteres.

Por otro lado, se ha utilizado un nuevo mutante de la mandarina Clementina, denominado *deg* (“decreased oil gland”), cuya principal característica fenotípica fue una reducción de entre 4-5 veces la cantidad de glándulas de aceite en la piel. Como cabía esperar, el contenido total de CVs estaba sustancialmente reducido en proporción al número de glándulas de aceite, pero la emisión era muy superior a la de los frutos parentales. Este mutante también emitía de forma natural algunos CVs relacionados con respuestas de defensa y tenía alterada la expresión de algunos genes de terpeno sintasas. Además, la capacidad infectiva del hongo *P. digitatum* en el mutante parecía ligeramente afectada en áreas del flavedo libres de glándulas. Estos resultados refuerzan la conclusión anterior de la falta de relación entre el contenido y la emisión de CVs e indican el papel de algunos volátiles en las respuestas al estrés que este mutante parece tener constitutivamente alteradas.

Finalmente, se han utilizado frutos de variedades de naranja y de pomelo con diferente pigmentación para analizar la relación entre el contenido y composición de carotenoides y la de norisoprenoides volátiles. El análisis de norisoprenoides en frutos que acumulan licopeno en la piel y especialmente en la pulpa, o en un mutante de naranja que acumula carotenos lineales y con muy bajos niveles de xantofilas, permitió comprobar una relación directa sustrato-producto entre determinados carotenoides y norisoprenoides, que fue en general más evidente en la pulpa que en la piel.

INTRODUCCIÓN

1. Generalidades de los frutos cítricos

1.1 Origen, difusión y clasificación

Desde la antigüedad, los cítricos han constituido un cultivo de gran importancia, tanto a nivel comercial por su gran producción y consumo, como en la salud humana por su aporte en nutrientes y beneficios para la salud. Se han formulado diferentes hipótesis respecto al origen geográfico de los cítricos y casi todas ellas apuntan a regiones tropicales y subtropicales del Sureste Asiático y posterior dispersión por otros continentes (Webber, 1967; Calabrese, 1992). La cita más antigua que se conoce procede de China y pertenece al *Libro de la Historia* (500 años a.C) (Agustí, 2000). Desde el punto de vista filogenético se postula que todos los cítricos derivan de tres especies ancestrales originales: el cidro (*Citrus medica* L.), probablemente originario de India y el primer cítrico conocido en Europa, la mandarina (*Citrus reticulata* Blanco), originaria de China, y el pumelo (*Citrus grandis*. L. Osb.), originario de los archipiélagos Malasios y del Este de India (Scora, 1975; Barrett y Rhodes, 1976; Nicolosi, 2007; Xu et al., 2013). El resto de las especies y variedades de cítricos cultivadas en la actualidad o en épocas precedentes han debido de originarse probablemente por hibridaciones sucesivas entre las diferentes especies originales o sus descendientes y mediante la selección posterior de mutaciones naturales o inducidas (Nicolosi, 2007).

El origen del cultivo de los cítricos en España también es incierto, aunque se cree que originalmente pudo iniciarse como plantas para usos medicinales y ornamentales, y con menor preponderancia para el consumo. El cidro se estima que puede estar presente desde el siglo VII, mientras que el naranjo amargo y el limonero se introdujeron en nuestro país por los árabes en el siglo XI. El cultivo y la expansión del naranjo dulce es posterior y se data desde el siglo XV, seguido con posterioridad por el mandarino y el pomelo (Agustí, 2000).

Los cítricos pertenecen a la clase *Angiospermae*, subclase dicotiledónea, orden *rutae*, familia *Rutaceae* y género *Citrus* y cuenta con más de 145 especies, entre las que se destacan: la naranja dulce (*C. sinensis*), mandarina (*C. reticulata*), limón (*C. limon*) y pomelo (*C. paradisi*), que son las principales especies cultivadas en la actualidad (Deves y Albrigo, 1999). Cada especie está constituida por diferentes variedades y es posible distinguirlas mediante la observación de una serie de caracteres y parámetros representativos de cada una de ellas, atendiendo a características morfológicas. El naranjo dulce (*C. sinensis*) está representado por 3 grandes grupos; el grupo Navel, caracterizado por presentar un ombligo en la región estilar, y en el que destacan las variedades Navelina, Washington Navel y Navelate; el grupo Sanguina que se caracteriza por acumular antocianos en el fruto, proporcionando un color rojo-

violáceo, en el que destaca las variedades Sanguinelli, Tarocco y Moro; y el grupo Blancas, caracterizadas por presentar una pigmentación amarillo-naranja a naranja y no presentar ombligo, y en el que destacan las variedades Salustiana y Valencia Late. Dentro de la especie de mandarinas encontramos 3 grandes grupos: Clementinas, Satsumas e híbridos. El grupo Clementinas se caracterizan por presentar una piel muy fina y colores que van desde el naranja a naranja intenso, formas esféricas o aplanadas y no presentar semillas, destacan las variedades Clementina de Nules, Marisol, Oronules, Fina y Hernandina. En el grupo de las Satsumas, caracterizadas por ser frutos amarillo-naranja a naranja asalmonado, presentar formas aplanadas y no contener semillas, destacan las variedades Hashimoto, Okitsu, Clausellina y Owari. Por último, cabe mencionar el grupo de los híbridos que pueden presentar semillas y en ocasiones un ombligo en la corteza. Los frutos presentan colores naranja y rojizos, generalmente más intensos que los no híbridos y destacan en nuestra Comunidad las variedades Nova, Ellendale, Fortune y Ortanique (Soler, 1999).

En cuanto a la especie pomelo, es la especie de más reciente aparición y de limitada importancia en España. El fruto es grande o muy grande, sin semillas o pocas, y con importantes diferencias en el color tanto en la piel, del amarillo al rosado, como en la pulpa, también amarilla hasta rojo intenso. En función de la coloración las variedades se han agrupado en blancas y rojas. Entre las primeras destaca la variedad Marsh, que es la más cultivada en España, y se caracteriza por presentar frutos de color de la piel y pulpa amarillo pálido. Existen diferentes variedades de pulpa de color roja, entre las que se pueden mencionar la variedad Red Blush, de pigmentación rosada sólo en las membranas y paredes de las vesículas de zumo, por lo que el zumo no es escasamente coloreado. La variedad Rio Red también presenta coloración roja intensa en la pulpa, pero la variedad coloreada de más relevancia en España es Star Ruby, que se caracteriza por presentar áreas de color rojo intenso en la piel y pulpa roja sin semillas. Es un fruto excelente para consumo en fresco y para la industria (Bono et al., 1985; Berzal y Porras, 1989).

1.2 Situación actual de la producción de cítricos

Actualmente, los cítricos, son el primer cultivo frutal del mundo, tanto en producción como en consumo. Su cultivo se extiende a la mayoría de regiones tropicales y subtropicales, ocupando una extensión de más de 7 millones de hectáreas (Ha), con una producción total de alrededor de 130 millones de toneladas (Tm) (faostat3.fao.org). Concretamente España, es el mayor productor de cítricos de la Unión Europea y el sexto país del mundo, con una producción anual media alrededor de los 6 millones de Tm; 6,09 en el año 2010 y 5,77 en el año 2011, y una superficie cultivada que supera las 319.000 Ha. La citricultura española se caracteriza, principalmente, por la producción de frutos para el consumo en fresco. Es interesante reseñar que la producción de cítricos ha ido cambiando durante los últimos años y en décadas pasadas

estaba básicamente dominada por las naranjas y, aunque su producción sigue siendo la mayor de entre los distintos grupos de cítricos a nivel nacional, se ha producido un progresivo incremento en los últimos años en la producción de las distintas variedades de mandarina. Así, la distribución española de la producción se sitúa de la siguiente forma: 34% naranjas Navel, 35% mandarinas Clementinas e híbridos, 13% naranjas Blancas, 14% limones, 3% satsuma y 1% pomelos. Entre comunidades autónomas, la producción en la Comunidad Valenciana es la mayoritaria, con alrededor del 60% (81% de mandarinas y 48% de naranjas del total producidas en España, seguido de Andalucía con un 38,4% de naranjas y 6,2% de mandarinas, Murcia (10% de naranjas y 4% de mandarinas), Cataluña (1,5% de naranjas y 8,4% de mandarinas) y una producción menor al 1% en la islas Baleares.

En la Comunidad Valenciana el área destinada al cultivo de los cítricos supone un total de 178.361 Ha con una producción de 3.168.500 Tm en el año 2011, y una tendencia bastante variable, en función de las condiciones climáticas anuales, la tendencia de los mercados y la crisis económica del sector, como se manifiesta en la reducción de cerca 350.000 Tm respecto a la campaña de 2010. La **Tabla 1** muestra el total de la producción de frutos de las distintas variedades y especies en el año 2011, y los porcentajes relativos de producción de cada variedad respecto a su grupo y a la producción total. La distribución de la producción en la Comunidad Valenciana marca diferencias interesantes respecto a la nacional, ya que está dominada por cerca del 50% por la producción de mandarinas, que es la mayoritaria, seguida por algo más del 43% de naranjas. Entre las primeras destaca claramente la producción de Clementinas, que supone un 66% de las mandarinas y un tercio del total de cítricos, y donde la variedad Clemenules alcanza una producción superior a 580.000 Tm, mayoritaria entre las distintas variedades. El resto de producción de mandarinas está muy repartido entre las Satsumas, Clementinas tempranas, tardías e híbridos, con producciones relativamente menores de cada una de ellas. Respecto a las naranjas, la producción sigue dominada por la variedad Navelina, pero seguida muy próxima por naves tardías, especialmente LaneLate que está experimentando un considerable aumento en los últimos años. Finalmente la producción de limones en la Comunidad Valenciana es baja, con menos del 7% del total, y la de pomelo muy reducida (<http://www.agricultura.gva.es/documents>).

Tabla 1. Distribución de la producción total de cítricos en la Comunidad Valenciana en el año 2011, y porcentaje de producción de cada una de las variedades respecto a su grupo (% grupo) y a la producción total (% total). Datos de la CAPA (Generalitat Valenciana) 2011.

ESPECIES CÍTRICAS	% grupo	% total	TM
SATSUMAS	8,31	4,12	130609
Clausellina-Okitsu	3,57	1,77	56.170
Satsuma	4,73	2,35	74.439
CLEMENTINAS	66,59	33,05	1.047.144
Marisol	10,62	5,27	167.014
Oronules	1,59	0,79	25.066
Otras Clementinas tempranas	4,57	2,27	71.890
Clementina Fina	0,30	0,15	4.792
Clementina Oroval	1,30	0,64	20.422
Orogrande	5,93	2,94	93.270
Clementina de Nules	37,04	18,38	582.473
Clementinas tardías	5,23	2,59	82.217
HIBRIDOS	25,11	12,46	394.816
Clemenvilla o nova	9,60	4,77	151.020
Fortune	4,19	2,08	65.900
Ortanique	9,99	4,96	157.155
Otras mandarinas e híbridos	1,32	0,65	20.741
TOTAL MANDARINAS		49,63	1.572.569
NAVEL	79,87	34,59	1.095.916
Navelina y Newhall	37,50	16,24	514.536
W. Navel y Thompson	7,98	3,45	109.440
Navelate y Lanelate	34,39	14,89	471.940
BLANCAS	19,89	8,61	272.864
Salustiana	4,87	2,11	66.770
Valencia Late	15,02	6,50	206.094
SANGUINAS	0,25	0,11	3.381
Sanguinas	0,25	0,11	3.381
TOTAL NARANJAS		43,31	1.372.161
Fino	56,46	3,88	122.878
Verna	43,54	2,99	94.764
TOTAL LIMONES		6,87	217.642
Pomelos	100,00	0,19	6.178
TOTAL POMELOS		0,19	6.178
TOTAL CÍTRICOS			3.168.550

1.3 Morfología, maduración y desarrollo de los frutos cítricos

Los frutos cítricos son un tipo de bayas modificadas o especializadas denominadas hesperidio. Los frutos, generalmente, tienen entre 8 y 16 segmentos que contienen las vesículas de zumo conectados al eje central, excepto el pomelo que puede llegar a tener hasta 18, mientras que el número de semillas es variable entre las diferentes especies (Agustí, 2000; Ladaniya, 2008). El pericarpio (o corteza), está constituido por el flavedo y albedo, y representa las capas más externas del fruto. El flavedo (o exocarpio) es la parte más externa pigmentada, mientras que el albedo (o mesocarpio) es la parte interna del pericarpio y suele ser de color blanco y esponjoso. Las glándulas de aceite se encuentran alojadas principalmente en el flavedo y en ellas se almacenan los aceites esenciales característicos de cada especie y variedad. La parte comestible o pulpa (endocarpio) es la parte más interna y está formada por segmentos

rellenos de pequeñas vesículas que contienen el zumo además de pequeños cuerpos de aceites esenciales (Tadeo et al., 2003). En la **Figura 1** se muestran frutos representativos de las principales especies de cítricos y se indica las distintas partes del fruto.



Figura 1. Sección transversal de frutos de las principales especies de cítricos en las que se indican las distintas partes que componen su estructura.

La descripción inicial de Bain (1958) define tres fases de crecimiento y desarrollo en los frutos cítricos: fase I, primera fase o de división celular en la que se produce un lento y escaso incremento en el peso o tamaño del fruto, pero en el que se producen la mayoría de las células que posteriormente completaran su crecimiento y que comprenden de alrededor de 8 semanas; fase II o de alargamiento celular en la que se produce un aumento del tamaño y peso del fruto, se reduce el espesor del albedo y un concomitante aumento de volumen de las vesículas de zumo de la pulpa, puede comprender períodos de entre 3-4 meses; fase III o maduración del frutos, que puede durar entre 1-2 meses dependiendo de las variedades, en el que el fruto alcanza su máximo tamaño y completa su desarrollo, y se producen las transformaciones externas e internas que determinan sus características de calidad (color, textura, aroma, incremento de azúcares, descenso de acidez total, etc.). El índice de madurez (IM), definido como el cociente de la relación sólidos solubles ($^{\circ}\text{Brix}$)/% acidez (mg de ácido/100 mL de zumo), es un parámetro muy utilizado junto con el color externo del fruto para la decisión de la recolección y comercialización de los frutos. Valores de IM interna entre 7 y 10 son generalmente aceptados como el mínimo valor de madurez para naranjas y mandarinas, respectivamente. Este conjunto de atributos físico-químicos son los que determinan la calidad organoléptica y sensorial de los frutos, y la aceptabilidad por parte del consumidor, por tanto, el concepto de calidad es muy amplio e incluye tanto aspectos internos como externos influyendo de forma decisiva el momento de la recolección (Baldwin, 1993; Agustí, 2000; Rodrigo et al., 2004; El-Otmani et al., 2011).

2. Compuestos volátiles en frutos

2.1 Generalidades, función y síntesis

Los compuestos volátiles (CVs) son moléculas de bajo peso molecular con bajo punto de ebullición y una elevada presión de vapor a temperatura ambiente y que, por tanto, les permite difundirse con facilidad en el aire (Pichersky et al., 2006). La combinación de diferentes CVs en proporciones determinadas es lo que da lugar a la formación del aroma característico de cada fruto. Además de su función principal de formación del aroma, algunos CVs actúan como mecanismos de defensa en respuesta a patógenos o herbívoros oportunistas, o señales de atracción de animales, insectos polinizadores y dispersores de semillas (Pichersky y Gang, 2000; Kant et al., 2009; Granell y Rambla., 2013).

El aroma, por tanto, es uno de los rasgos más complejos y determinantes de la calidad organoléptica de los frutos y puede definirse como la sensación global producida por una compleja combinación de CVs que interaccionan con las terminaciones nerviosas sensitivas del gusto y del olfato (Sanz et al., 1997; Abbot, 1999; Dudareva et al., 2004; Gang, 2005; Riu-Amatell, 2005; Kant et al., 2009). Aunque se han identificado cientos de CVs en la mayoría de frutos, sólo unos pocos, presentes en concentraciones superiores al umbral de percepción, tienen una influencia significativa en el aroma (Schieberle y Hofmann, 1997; Baldwin et al., 2000), por lo que el aroma característico de un fruto no solo está determinado por la composición y concentración de los CVs sino también por la intensidad aromática de cada CV. Por ejemplo, existen CVs muy minoritarios, como los norisoprenoides volátiles (ver apartado 3), que presentan un fuerte impacto en el aroma debido a su extremadamente bajo umbral de percepción (Winterhater y Rouseff, 2002). Así pues, por ejemplo, el limoneno que es el CV mayoritario en el zumo de frutos cítricos contribuye moderadamente al aroma por tener un umbral de percepción elevado, mientras que otros CVs como ciertos alcoholes o ésteres alifáticos, presentes en concentraciones muy inferiores, contribuyen de forma importante en las notas características del aroma de los zumos (Attaway y Oberbacher, 1968, Ruiz Pérez-Cacho y Rouseff, 2008).

El aroma característico de cada fruto suele desarrollarse durante la maduración, por tanto, el estado de maduración en el momento de la cosecha junto con otros factores precosecha como la temperatura, condiciones de luz o del cultivo, así como la presencia de otros metabolitos primarios (azúcares o ácidos orgánicos) pueden alterar el perfil de volátiles y, con ello, el aroma de un fruto. Esta compleja relación entre el aroma químico y el aroma percibido explica por qué las variaciones químicas en el aroma no necesariamente se correlacionan con lo que percibe el consumidor (Fellman y Mattheis, 1995; Hui, 2010; Granell y Rambla., 2013). En este sentido, la comparación de frutos de variedades o incluso especies del mismo género con características aromáticas diferentes está ofreciendo resultados muy interesantes acerca de las

bases bioquímicas del aroma de los frutos o de los mecanismos de regulación de su biosíntesis (Cohen et al., 1990; Saunt, 2000; Aharoni et al., 2005; DeOliveira y Radmann, 2005; Beltrán et al., 2007). Los CV más abundantes responsables del aroma en plantas se dividen en 3 grandes grupos: terpenoides, fenilpropanoides/benzenoides y derivados de ácidos grasos y de aminoácidos (Dudareva et al., 2006; Takita et al., 2007).

Los terpenos se clasifican como metabolitos secundarios y derivan bien de la ruta del mevalonato (MEV), que tiene lugar en el citosol y que produce los CVs sesquiterpenos (C15), o de la ruta plastídica 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP), que da lugar a la síntesis de los CVs mono- (C10) y diterpenos (C20). En la **Figura 2** se representan las rutas básicas de la biosíntesis de terpenos. El primer paso de la biosíntesis de estos compuestos es la condensación de isopentil pirofosfato (IPP) (C5) y su isómero el dimetil-alil pirofosfato (DMAPP). En la ruta del MEV, las unidades de isopreno se generan a partir del acetyl-CoA, mientras que en la ruta MEP se generan a partir de piruvato y gliceraldehído-3-fosfato (GA-3P). En consecuencia, el IPP y el DMAPP son utilizados por prenil transferasas para producir precursores de geranyl difosfato (GPP) (precursor inmediato de los monoterpenos), farnesil difosfato (FPP) (precursor inmediato de los sesquiterpenos) y geranyl geranyl difosfato (GGPP) (precursor de los diterpenos y tetraterpenos). Sobre los diferentes precursores inmediatos actúan diferentes enzimas denominadas genéricamente como terpeno sintasas (TPSs) que producen los distintos tipos de terpenoides (Aharoni et al., 2005; Roberts, 2007; Kant et al., 2009; Granell y Rambla., 2013). Específicamente se denominan mono-, sesqui- y diterpeno sintasas en función de su acción sobre GPP, FPP y GGPP, respectivamente. Existen múltiples familias de TPSs que pueden dar lugar a la formación de un único o varios terpenos, siendo así las responsables de la formación del más abundante y diverso grupo de metabolitos en plantas (Bohlmann y Keeling, 1998; Chang et al., 2007). En fresa, se ha observado la presencia de terpenos específicos, como los monoterpenos mirceno y pineno, que tienen un fuerte impacto sobre el aroma del fruto (Aharoni et al., 2004). En bayas de uva, el valenceno, germacreno D y terpineol son los CVs de naturaleza terpenoide más importantes en el aroma (Lücker et al., 2004). En frutos de manzana, el sesquiterpeno lineal (*E,E*)-farneseno, es uno de los mayores CVs y su emisión predomina durante el almacenamiento (Anet y Coggiola, 1974). En mango, entre los terpenos destacan mirceno, limoneno, cariofileno y humuleno (Hunter et al., 1974), sin embargo existen diferencias importantes en la composición de CVs entre las diferentes variedades (Hui, 2010). En el aroma de piña, aunque los terpenos no son los compuestos más relevantes, se han identificado algunos como 4-terpineol, linalol, limoneno, β -mirceno, sabineno, ocimeno y β -cariofileno, entre otros (Brat et al., 2004; Elss et al., 2005).

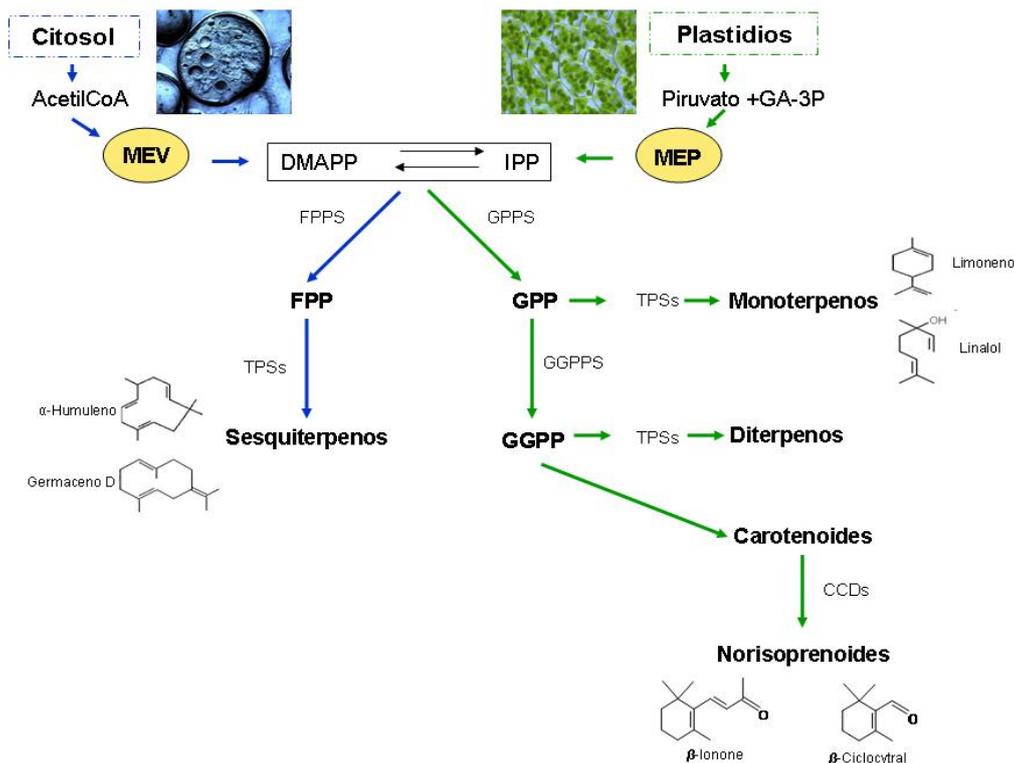


Figura 2. Ruta esquemática de biosíntesis de terpenos en las plantas. Las abreviaturas indican: GA-3P: gliceraldehido-3-fosfato; MEV: ruta del mevalonato; MEP: ruta 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato; DMAPP: dimetil-alil pirofosfato; IPP: isopentil pirofosfato; FPPS: farnesil difosfato sintasa; GPPS: geranil difosfato sintasa; FPP: farnesil difosfato; GPP: Geranil difosfato; GGPPS: geranil geranil difosfato sintasa; GGPP: geranil geranil difosfato; TPS: terpeno sintasa; CCD: Dioxigenasa de corte de carotenoides. Adaptada de Dudareva et al., 2006.

Otro grupo de CVs frecuente en el aroma de los frutos son los aldehídos, alcoholes y ésteres (lineales y ramificados), cuyas rutas de biosíntesis y regulación han sido ampliamente estudiadas en los últimos años en diferentes especies vegetales (**Figura 3**). Una de las rutas biosintéticas es a partir de proteínas sobre las que actúan proteasas dando lugar a aminoácidos como leucina, alanina, isoleucina, valina y fenilalanina que pueden ser transformados a aldehídos por la acción de la piruvato descarboxilasa (PDC). La alcohol deshidrogenasa (ADH), actúa sobre los aldehídos dando lugar a la formación de alcoholes (Wyllie et al., 1996; Baldwin, 2002). La otra vía biosintética es la de los lípidos, a partir de los cuales las lipasas dan lugar a ácidos grasos de tipo saturado o insaturado que mediante la β -oxidación se transforman en los correspondientes acil-CoAs. La ruta de la lipoxigenasa (LOX) da lugar a aldehídos y oxo-ácidos por acción de la hidropéroxido liasa (HPL) y estos aldehídos posteriormente pasan a alcoholes por la acción de la ADH. La ruta LOX es poco activa en frutos inmaduros, pero su contribución se incrementa en los frutos maduros (Sanz et al., 1997). En cualquier caso, el paso final de formación de ésteres a partir de alcoholes y acil-CoAs es un paso clave que ha sido ampliamente estudiado. Esta reacción está catalizada por un grupo de enzimas denominadas alcohol

aciltransferasas (AAT), que son capaces de realizar múltiples combinaciones entre diversos alcoholes y acil-CoAs (Fellman y Mattheis, 1995; Olias et al., 2002; Wyllie y Fellman, 2000; Granell y Rambla., 2013). En el aroma de determinados frutos como plátano, manzana y fresa se han descrito CVs de tipo alcohol, aldehído y éster que derivan de aminoácidos de cadena ramificada como la valina, leucina, isoleucina y metionina (Dudareva et al., 2006). Por ejemplo, en frutos de fresa incubados con L-isoleucina se detectaron en el espacio de cabeza 14 compuestos no detectados antes de la incubación con el aminoácido, principalmente ésteres de tipo 2-metilbutanoato y 2-metilbutil, siendo los mayoritarios el etil-2-metilbutanoato y 2-metilbutil acetato, respectivamente (Perez et al., 2002). El aroma de plátano es rico en ésteres de tipo 3-metilbutil acetato derivados de leucina y 2-metilpropil derivado de valina. Estudios en frutos de plátano maduros (tanto frutos enteros como pulpa) demostraron que la incubación con los alcoholes y aminoácidos precursores se traducía en cambios importantes en el perfil de ésteres en el aroma, sugiriendo que la disponibilidad de sustratos es el mayor determinante en la composición final del aroma (Wyllie y Fellman, 2000). Por último, en frutos de manzana Golden delicious a los que se les inyectó una solución de L-isoleucina se observó un cambio en la producción de alcoholes libres, así como en la producción de ésteres de tipo 2-metilbut-2-enil, 2/3-metilbutil y 2/3-metilbutanoato, siendo los mayoritarios el 2-metilbut-2-enil acetato, 2/3-metilbutil acetato y hexil 2/3-metilbutanoato, respectivamente (Hansen y Poll, 1993).

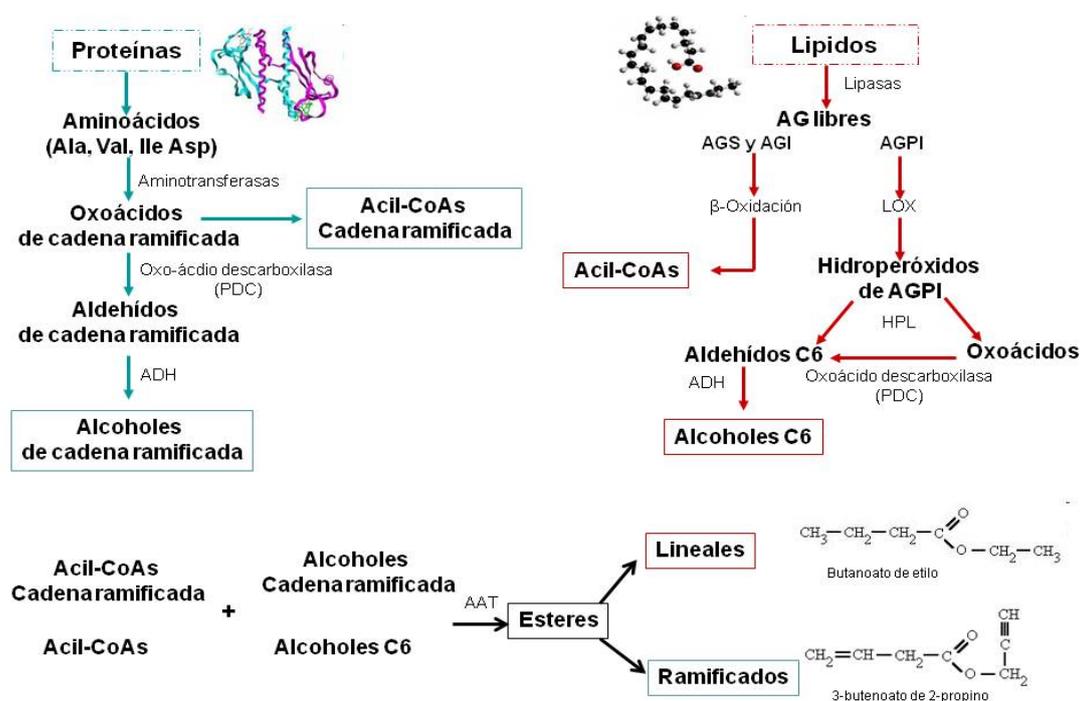


Figura 3. Ruta esquemática de la biosíntesis de ésteres lineales y ramificados. Las abreviaturas indican: PDC: piruvato descarboxilasa; ADH: Alcohol deshidrogenasa; AAT: Alcohol aciltransferasa; AG: ácido graso; AGS: ácido graso saturado; AGI: ácido graso insaturado; AGPI: ácido graso poliinsaturado; LOX: lipooxigenasa. Adaptada de Ortiz (2011a).

Se han aislado y caracterizado numerosas AATs en plantas superiores, caracterizándose con detalle su expresión génica, regulación molecular y su actividad enzimática en frutos (Olias et al., 2002; Beekwilder et al., 2004; Defilippi et al., 2005a; El-Sharkawy et al., 2005). El primer gen AAT se obtuvo a partir de fresa y mostró un perfil de expresión que se correlacionó con la actividad enzimática correspondiente y la emisión de ésteres (Aharoni et al., 2004). En manzana, se han identificado hasta 15 AATs en el genoma, pero únicamente una isoforma (AAT1) es inducida por etileno y se expresa principalmente en la piel de frutos maduros (Schaffer et al., 2007). Otros estudios de la emisión de CVs en frutos de manzana Mondial Gala en tres estadios de maduración, junto con el análisis de la actividad enzimática (AAT) mostraron que la emisión de ésteres se incrementaba con la maduración de los frutos, sin embargo, la actividad enzimática permaneció a niveles constantes a lo largo del proceso, lo que sugiere que la producción de ésteres está determinada principalmente por la disponibilidad de sustratos (Lara et al., 2008). Similarmente, estudios posteriores realizados en manzana Golden Reinders confirmaron que el estadio de maduración juega un papel importante en el aroma de los frutos, siendo los estadios maduros los más ricos en CVs de tipo éster, mientras que se observaron pequeñas variaciones en AATs. Por otra parte, la mayor actividad lipoxigenasa e hidropéroxido liasa tuvo lugar en la piel sugiriendo un importante papel de este tejido en la síntesis de ésteres (Ortiz et al., 2011b). En melón, la nota característica de su aroma viene impartida por la combinación de ésteres alifáticos y ramificados, y la contribución de una nueva aminoacidotransferasa de cadena ramificada y una AATs específica parece ser crucial para la regulación del proceso (El-Sharkawy et al., 2005; Gonda et al., 2010).

Por otro lado, existen numerosos estudios sobre el papel del etileno endógeno (frutos climatéricos) y exógeno (frutos no climatéricos) en la regulación de la biosíntesis de CVs en frutos. Trabajos en plátano y manzana han demostrado que la síntesis de ésteres se estimula durante la maduración natural de los frutos (Wyllie y Fellman, 2000; Defilippi et al., 2005 a y b; Li et al., 2008). En frutos de tomate recolectados en estadio verde-maduro y tratados con etileno exógeno se ha observado un efecto importante en la emisión de CVs, como por ejemplo el (Z)-3-hexenal, donde el tratamiento con etileno redujo la emisión de CVs respecto a tomates madurados de forma natural (Buttery et al., 1988). Por el contrario, el tratamiento con etileno exógeno en melones produjo el efecto contrario al observado en tomates, incrementando el aroma de los frutos (Arora et al., 1994). La acción del etileno puede manipularse mediante diferentes técnicas, entre las que destaca la aplicación exógena del 1-metilciclopropeno (1-MCP), un potente inhibidor de la acción del etileno que se une covalente e irreversiblemente a los receptores del etileno, impidiendo así la unión del etileno y la transducción de la señal hormonal (Watkins, 2002 y 2006). El tratamiento con 1-MCP a frutos de manzana Golden delicious y Delicious inhibió de forma muy efectiva la emisión de ésteres (Kondo et al., 2005). En frutos de melón, el tratamiento con 1-MCP, también inhibió la actividad AAT en un 50%,

sugiriendo que las actividades AAT pueden ser tanto dependientes como independientes de etileno (Flores et al., 2002). Por otro lado, la utilización de plantas transgénicas en las que se ha manipulado biotecnológicamente la acción del etileno, en concreto la actividad ACC oxidasa (ACO), han sido muy valiosas para entender el papel de la hormona en la regulación de la emisión de CVs. En frutos de manzana con reducida capacidad de producción de etileno derivados de dos trabajos diferentes se ha demostrado que existen etapas de la emisión de CVs dependientes e independientes del etileno; y en particular la acción de la hormona parece ejercerse principalmente en las etapas finales de las rutas de biosíntesis (Schaffer et al., 2007; Defilippi et al., 2009). La disponibilidad de nuevas plantas transgénicas en las que se ha modificado otras enzimas o bien de las rutas de síntesis de CVs o de otros elementos reguladores, así como los estudios transcriptómicos están permitiendo caracterizar nuevas etapas importantes en la síntesis de CVs, o la implicación de nuevos reguladores, como el metil-salicilato (Tieman et al., 2010), y han sido objeto de revisiones recientes (Gapper et al., 2013).

2.2 Compuestos volátiles en frutos cítricos

En los frutos cítricos la mayoría de los CVs responsables del aroma son de naturaleza terpenoide y se acumulan en estructuras especializadas, glándulas de aceite en el flavedo y cuerpos de aceite en la pulpa, en forma de monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15) o de sus derivados alcoholes, aldehídos o ésteres, principalmente. En la **Figura 4** se muestran las estructuras químicas de los terpenos más relevantes descritos en los frutos cítricos.

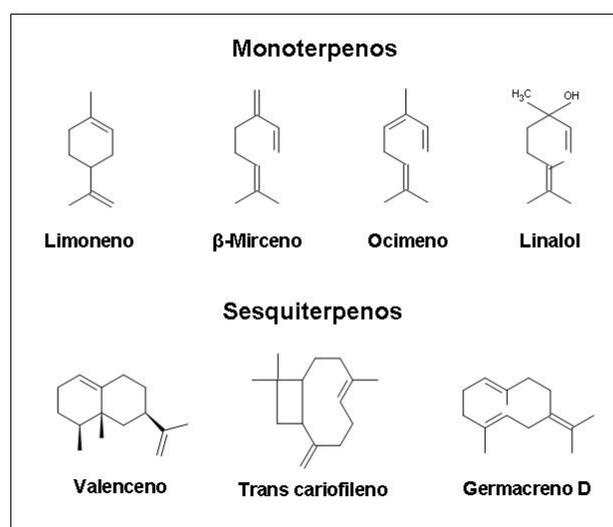


Figura 4. Estructuras químicas de los CVs mono- y sesquiterpenos relevantes en los frutos cítricos.

En frutos cítricos la composición específica de CVs terpenos depende no sólo de la especie y variedad, sino también del tipo de tejido, del estado de maduración e incluso de las

condiciones postcosecha (Rouseff et al., 1994; Weiss, 1997; Sawamura, 2000; Ruberto, 2002; Herrera, 2007a). La mayoría de especies de cítricos tienen sus propios componentes distintivos en el aroma. Los estudios realizados sobre los CVs presentes en los frutos cítricos, principalmente se han centrado en variedades muy concretas y en la identificación y cuantificación de los volátiles extraídos de la piel del fruto o del zumo (Ruiz Pérez-Cacho y Rouseff, 2008), pero apenas existen trabajos de la emisión de volátiles en frutos cítricos intactos, que también puede ser una información relevante sobre el comportamiento fisiológico del fruto durante la maduración o en determinadas situaciones durante la vida postcosecha (Herrera et al., 2009). En zumo de diferentes especies cítricas se ha observado que los monoterpenos hidrocarbonados (fundamentalmente limoneno) junto con el monoterpeno alcohol linalol son los componentes más abundantes, mientras que el valenceno, presente en cantidades traza en el zumo de mandarina, se encuentra en concentraciones más elevadas en zumo del híbrido Ortanique y en naranjas Valencia (Carbonell, 2006). En 1979, Shaw realizó una revisión sobre el perfil de CVs en el flavedo de diferentes variedades cítricas resumiendo que en el fruto de naranja el limoneno es el componente mayoritario pero otros compuestos alcoholes (linalol), aldehídos (octanol, neral y sinensal) así como algunos ésteres (octil y nerol acetato), influyen de forma determinante en el aroma de la misma. En el aceite esencial de mandarina, también es el limoneno el componente mayoritario, seguido de γ -terpineno además de compuestos oxigenados, aldehídos (octanol y α -sinensal) y alcoholes (linalol y terpineol). Sin embargo, el metil-N-metil antranilato es un componente característico, ya que está presente únicamente en cantidades traza en el aceite esencial de Clementina y no en otras especies de cítricos (Shaw, 1979; Rouseff et al., 1994; Ruberto, 2002). En pomelos, el limoneno también es el CV mayoritario, seguido de octanol, decanal, linalol y algunos ésteres, sin embargo, en esta especie, la nota característica del aroma la confiere el sesquiterpeno nookatona (Ortuño et al., 1995). En general, se ha descrito que los frutos de mandarina son menos aromáticos que los de otras especies de cítricos (Rouseff et al., 1994; Moshonas y Shaw, 1997; Ruberto, 2002; Ruiz Pérez-Cacho y Rouseff, 2008). Por último, se ha observado que la composición química de los aceites esenciales de frutos cítricos parentales, contribuyen significativamente a las características aromáticas de especies híbridas derivadas, como es el caso del híbrido Ortanique, que es un cruce entre una naranja y una mandarina (*Citrus sinensis* x *Citrus reticulata*) y está descrito como una variedad especialmente aromática (Ruberto et al., 1997). El análisis de la emisión de CVs de frutos intactos de dicha variedad mostró que de forma natural estos frutos emiten una mayor concentración de diferentes terpenos y ésteres (Herrera, 2007a).

Durante la maduración de los frutos cítricos se observan cambios cualitativos y cuantitativos importantes en el perfil aromático, destacando una mayor abundancia de CVs en estadios tempranos de la maduración. Cabe destacar que los frutos inmaduros de diferentes especies presentan una mayor proporción de glándulas de aceite que los frutos maduros (Takita

et al., 2007; Ladaniya, 2008; Voo et al., 2012). Así, Liang et al., (2006) demostraron que en frutos de *Citrus medica* la producción de aceite esencial y la densidad de glándulas de aceite fueron máximas en los estadios iniciales de maduración, mientras que en estadios más avanzados se reduce el contenido de aceite esencial al facilitarse la mayor difusión. Recientemente, en un estudio llevado a cabo por Bourgou et al. (2012) sobre el perfil de CVs durante la maduración en frutos de diferentes especies de cítricos se ha observado que en el aceite esencial de naranja amarga la proporción de monoterpenos hidrocarbonados (CVs mayoritarios) varía de forma significativa durante el proceso (70-95%), alcanzando el máximo en el estadio totalmente maduro, mientras que los monoterpenos oxigenados, el segundo grupo más abundante, fue máximo en estadios tempranos e intermedios del desarrollo (8 y 22 %, respectivamente) y se redujo drásticamente en estadios maduros (2%) (Bourgou et al., 2012). Los sesquiterpenos a lo largo de todo el periodo de maduración se acumularon en proporciones bajas. En cualquier caso, en el aceite esencial de naranja amarga, el limoneno fue el CV mayoritario (68 a 91%). El canfor, se identificó principalmente en el aroma de frutos inmaduros, mientras que 1,8-cineol podría participar activamente en el aroma de frutos en estadios intermedios. En cuanto a frutos maduros, destaca la presencia de α -terpineno, α -terpineol y carvacrol. Es importante resaltar que, cuando el limoneno muestra sus niveles más bajos en el estadio intermedio (68%), una gran cantidad de compuestos minoritarios como 1,8-cineol, terpinoleno, sabineno hidrato y linalol oxido alcanzaron sus máximos contenidos. El limoneno también fue el componente mayoritario en el aceite esencial de naranja sanguina Maltaise a lo largo de la maduración, presentando un descenso en estadios intermedios. El resto de compuestos fueron minoritarios (1%). Es interesante mencionar que en dicha variedad, algunos terpenos como el β -pineno alcanzaron su nivel máximo en el estadio intermedio mientras que los sesquiterpenos, α -humuleno (0,16–0,34%) seguido de germacreno D (trazas-0,12%), fueron más representativos de estadios maduros (Bourgou et al., 2012). En otros estudios llevados a cabo en naranja dulce se ha observado que el compuesto mayoritario en la piel fue el limoneno, aunque durante la maduración y especialmente en estadios avanzados, hubo un claro descenso de los niveles de este CV (Droby et al., 2008) y un aumento muy significativo del sesquiterpeno valenceno (Sharon-Asa et al., 2000). En mandarinas, el análisis del aceite esencial durante la maduración indica que los estadios inmaduros se caracterizan por el predominio de monoterpenos hidrocarbonados, como limoneno (65%) seguido por γ -terpineno (12%), cuyos niveles descendieron en el estadio intermedio. Este descenso fue acompañado de un incremento de los niveles de 1,8-cineole (26%) y E- β -ocimeno (8%) (Bourgou et al., 2012).

En cuanto a las diferencias observadas entre los diferentes tejidos de frutos cítricos, los estudios se han centrado principalmente y, por su importancia comercial, en la caracterización de los aceites esenciales del flavedo y del aroma de los zumos (Sawamura, 2000; Merle et al.,

2004; Rouseff et al., 2009). En el aceite esencial se ha observado que el limoneno es el volátil mayoritario representando hasta el 90% del contenido total, seguido de otros monoterpenos (β -pineno, α -terpineno, mirceno, sabineno, β -ocimeno), derivados alcoholes (linalol) o sesquiterpenos (β -elemeno, valenceno, cariofileno), principalmente (Shaw, 1979; Sawamura, 2000). En zumo fresco, aunque el limoneno es un componente mayoritario del aroma, otros CVs como ésteres alifáticos (etil butanotato, hexanoato y octanoato), aldehídos (citrinal, Z-3-hexenal, dodecanal o nonanal), alcoholes (linalol y hexanol) y cetonas tienen un fuerte impacto sobre el mismo (Ruiz Perez-Cacho y Rouseff, 2008), poniendo así de manifiesto las diferencias de perfil aromático entre diferentes tejidos del fruto. Por otra parte, apenas existen estudios relativos a la emisión de CVs en frutos intactos (Herrera, 2007a; Herrera et al., 2009). Al comparar los principales CVs, emitidos al espacio de cabeza, entre distintas variedades de mandarina recién recolectados en diferentes estadios de maduración, se observó una disminución de la emisión en frutos en estadios de maduración más avanzados (Herrera, 2007a). Además, es importante destacar los cambios en el perfil de CVs que tiene lugar en diferentes situaciones postcosecha, como la conservación a bajas temperaturas, el tratamiento con etileno o la infección por patógenos. La conservación a bajas temperaturas, que prolonga la vida útil de los frutos, en general provoca un incremento en la emisión de limoneno en los frutos de la mayoría de variedades, mientras que el linalol se incrementa solamente en los frutos de mandarinas que desarrollan daños por frío (Herrera, 2007a). Estos resultados sugieren, por una parte que, el limoneno parece ser una respuesta general al estrés por frío y, por otra, que la emisión de linalol parece estar relacionada con los daños por frío. Además, las bajas temperaturas parecen influir de forma diferente en el aroma dependiendo de la variedad, por ejemplo, en la mandarina híbrido Fortune el ocimeno se incrementó de forma importante a 2 °C mientras que en la clementina Hernandina este compuesto fue superior durante la conservación a 12 °C (Herrera, 2007a). En limón, se ha observado que alteraciones en la emisión de limoneno pueden ser una respuesta fisiológica a situaciones postcosecha como la temperatura, que provocan lesiones en la piel. Concretamente, se ha observado un incremento del limoneno durante la conservación a bajas temperaturas, principalmente a partir de la tercera semana de almacenamiento a 1 °C con posterioridad a la aparición de los primeros síntomas de daño por frío (Obeland et al., 1997), así como un incremento de la emisión de limoneno en frutos tratados con agua caliente (Obeland et al., 1996). En naranja Navel sometidas a congelación parcial y transferidas posteriormente a 23°C, se detectó un incremento en la emisión de ciertos ésteres, no detectados en el momento inicial (Obeland et al., 2003). Tietel et al. (2012) demostraron que la temperatura de conservación es un factor fundamental que afecta al aroma de las mandarinas y que varía en función de cada variedad. En un trabajo en el que se examinaron los efectos de las diferentes temperaturas de almacenamiento (2, 5 y 8°C) en la calidad del zumo de las variedades de mandarina Or y Odem, seleccionadas por ser variedades

resistentes y sensibles al frío, respectivamente, se observó que en la variedad resistente los cambios en la temperatura de almacenamiento no tuvieron efectos significativos en el aroma del zumo, mientras que en la variedad sensible las temperaturas menores a 5°C y especialmente a 2°C, provocaron una disminución considerable en el aroma. Además, las bajas temperaturas provocaron la acumulación de determinados terpenos relacionados con la pérdida de calidad del aroma en los frutos de la variedad sensible (Tietel et al., 2012).

Por otra parte, la desverdización postcosecha, que consiste en acelerar la coloración externa de los frutos mediante la aplicación de etileno exógeno (entre 1-10 ppm), es una práctica comercial habitual en frutos cítricos de maduración temprana (Agustí, 2000; Salvador et al., 2003; Porat, 2008). El etileno acelera la degradación de las clorofilas y estimula la síntesis de carotenoides, provocando el cambio de color en la piel de los frutos (Rodrigo y Zacarías, 2007). Sin embargo, existen pocos estudios sobre el efecto del etileno en los CVs del fruto (Herrera, 2007a). En frutos de híbridos de mandarina, el tratamiento exógeno con etileno estimuló la emisión de sesquiterpenos y ésteres alifáticos e inhibió la de monoterpenos, principalmente limoneno y linalol. Es interesante remarcar que no se identificaron ésteres en ausencia de etileno. Además, el efecto del tratamiento con etileno sobre los CVs fue dependiente de la concentración de etileno y precisó la presencia continua de la hormona (Herrera, 2007a). En frutos de manzana, el sesquiterpeno lineal (*E,E*)-farneseno, está estrechamente ligado a la producción de etileno (Watkins et al., 1993).

Durante la postcosecha, los frutos cítricos pueden verse afectados por el ataque de patógenos, lo que constituye uno de los principales problemas en la comercialización y vida útil y ocasiona importantes pérdidas económicas. Los agentes infecciosos más habituales en la postcosecha de los frutos cítricos son los hongos *Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum* (Tuset, 1987; Ritenour et al., 2003; Droby et al., 2008), que son patógenos de herida ya que necesitan pequeñas lesiones en la piel del fruto para infectar (Kavanagh y Wood, 1967). En plantas se ha observado que el ataque por herbívoros (insectos fundamentalmente) provoca la liberación localizada de volátiles específicos, por ejemplo, linalol, ocimeno y farneseno, que pueden desencadenar y activar señales de defensa en la propia planta o en plantas cercanas (Denis, 1983; Paré y Tumlinson, 1999; Kant et al., 2009). Los estudios de los efectos de los aceites esenciales de los frutos cítricos en el crecimiento y desarrollo de los hongos postcosecha son de alguna forma confusos. Por un lado, desde hace años se piensa que determinados CVs, como por ejemplo el citral, pueden actuar como antifúngicos (Darvill y Albersheim, 1984; Hopke et al., 1994; Paré y Tumlinson, 1999; Tarchevsky, 2001), mientras que otros estudios indican que la capacidad infectiva del hongo es superior o necesita del contacto con las glándulas de aceite (Rodov et al., 1995). Se ha descrito que la germinación *in vitro* de esporas de *P. digitatum* y *P. italicum* se estimula en presencia de terpenos volátiles que normalmente están presentes en la piel de los frutos cítricos (limoneno, α -pineno, β -pineno y mircenolol).

(Droby et al., 2008). Recientemente, mediante una aproximación biotecnológica de genética reversa se ha estudiado el papel del limoneno presente en la piel de frutos de naranja dulce en la susceptibilidad al ataque de diferentes tipo de patógenos en el fruto (Rodríguez et al., 2011). Frutos transgénicos de *Citrus sinensis* transformados con el gen antisentido de la limoneno sintasa presentaban niveles de limoneno aproximadamente 100 veces inferiores a los de los frutos control. Al estudiar la respuesta de estos frutos a la infección por tres agentes patógenos diferentes, la bacteria *Xantomonas citri*, la mosca de la fruta *Ceratitis capitata* o el hongo postcosecha *Penicillium digitatum*, se observó una mayor resistencia frente a los diferentes patógenos. Además, diferentes ensayos demostraron que el suplemento de limoneno a los frutos transgénicos revertía la respuesta y se aumentaba la infección. Este conjunto de resultados demuestra que el limoneno, monoterpeneo que se acumula en grandes cantidades en la piel de los frutos cítricos, parece jugar un papel crucial en la interacción patógeno-fruto y podría actuar como un atrayente de los patógenos, posiblemente como una respuesta evolutiva en la que se ha seleccionado el volátil que se acumula en mayores concentraciones como atracción frente a patógenos que pueden ayudar a la dispersión de las semillas (Rodríguez et al., 2011). Los trabajos de los cambios transcriptómicos asociados a la infección por el hongo *P. digitatum* apoyan las observaciones anteriores, ya que en esta interacción hongo-fruto se induce principalmente el metabolismo secundario, incluyendo la ruta de isoprenoides, lo que sugiere un redireccionamiento del metabolismo hacia la síntesis de dichos compuestos (González-Candelas et al., 2010)

En cítricos el estudio de la regulación molecular de la biosíntesis de CVs se ha centrado fundamentalmente en TPSs, dado que los terpenos son los CVs más abundantes. Estudios *in silico* sobre bases de datos EST de cítricos han identificado al menos 49 secuencias de TPSs, procedentes de 6 especies distintas de cítricos (Dornelas y Mazzafera, 2007). En otro estudio llevado a cabo de forma independiente han descrito un mínimo de 44 genes en cítricos que codifican para TPSs, lo que podrían estar en relación con la elevada diversidad de terpenos encontrados en estos frutos (Takita et al., 2007). Los diferentes transcritos de TPSs se acumulaban en hojas y en flavedo de los frutos, especialmente durante estadios tempranos del desarrollo y, además, la expresión no solo era diferencial entre las diferentes especies sino también entre diferentes tejidos y estadios de maduración. Los análisis filogenético de las diferentes secuencias de TPSs sugieren que la diferenciación de las distintas clases de TPSs tuvo lugar antes que la especiación de los cítricos y que las especies ancestrales poseen al menos un miembro de cada una de las clases/subgrupos de las TPSs identificadas (Dornelas y Mazzafera, 2007).

En la última década se han aislado y caracterizado funcionalmente diversas TPSs de cítricos implicadas en la síntesis de mono- y sesquiterpenos. En el flavedo de frutos inmaduros de limón se aislaron cuatro genes responsables de la formación de más del 90% de los CVs del

aceite esencial; dos limoneno sintasas (CILIMS 1 y CILIMS 2), una β -pineno sintasa (CI β PINS) y una γ -terpineno sintasa (CI γ TS) (Lücker et al., 2002). En mandarina Satsuma (*Citrus unshiu* Marc.) también se han aislado y caracterizado funcionalmente mediante ensayos *in vitro* cuatro nuevos clones de cDNA (CitMTSE1, CitMTS3, CitMTS61 y CitMTS62) de monoterpeno sintasas (*d*-limoneno sintasa, γ -terpineno sintasa, γ -terpineno sintasa, y β -pineno sintasa, respectivamente) (Shimada et al., 2004). En frutos de esta misma especie también se identificó una nueva *d*-limoneno sintasa, CitMTSE2, que presentaba un 84% de identidad con CitMTSE1, que presentaba un patrón de expresión diferente a la anterior (Shimada et al., 2005a). Otras monoterpeno sintasas, responsables de la biosíntesis de 1,8 cineol y (E)- β -ocimeno, mostraron una expresión especialmente elevada en flores y que disminuía progresivamente durante el desarrollo del fruto (Shimada et al., en 2005b).

Por otro lado, también se han realizado importantes avances en la caracterización de genes relacionados con la síntesis de sesquiterpenos. La (E)- β -farneseno sintasa fue el primer gen de sesquiterpeno clonado en cítricos, en particular en hojas jóvenes de la variedad Yuzu (*Citrus junos*), y que se caracterizó funcionalmente la actividad de la proteína correspondiente (Maruyama et al., 2001). Cabe destacar la caracterización de la sesquiterpeno valenceno sintasa (Cstps1). Este gene se aisló en la naranja Valencia (*Citrus sinensis*) y el análisis de su expresión mostró un aumento durante la maduración del fruto y en respuesta a la aplicación de etileno exógeno, concordante con el aumento del sesquiterpeno valenceno en el flavedo de frutos maduros (Sharon-Asa et al., 2003).

Recientemente, se ha realizado una aproximación integrada de transcriptómica y metabolómica de la regulación y biosíntesis de CVs en el flavedo de frutos de pomelo (Voo et al., 2012). Se ha propuesto que las células epiteliales que recubren las glándulas de aceite del flavedo de los frutos cítricos podrían ser las responsables de la síntesis de los CVs que forman parte de los aceites esenciales, ya que hasta el momento no existían evidencias directas de este hecho. Para esclarecer esta hipótesis se aislaron células epiteliales y células parenquimáticas (como controles que no sintetizan CVs) mediante microdissección láser del flavedo de frutos de pomelo (*Citrus paradisi* cv. Duncan), y se evaluaron cambios en el transcriptoma en ambos tipos de células. Los patrones de expresión mostraron un enriquecimiento en las células epiteliales de genes implicados en la biosíntesis de terpenos volátiles y no volátiles en comparación con las células de parénquima. El análisis morfométrico demostró que las glándulas de aceite se forman en estadios muy tempranos del desarrollo del fruto, mientras que la expansión de las glándulas y, por lo tanto la acumulación de los CVs, se correlaciona con las etapas posteriores del desarrollo del fruto.

Otras aproximaciones experimentales al estudio de genes implicados en la síntesis de CVs en cítricos han utilizado la disponibilidad de mutantes con características alteradas. En particular, es interesante el estudio en un mutante de naranja semienano, que desarrolla flores y

frutos de menor tamaño y de una fragancia alterada. Este mutante, denominado *alf* (*altered fragrance*) presentó un menor contenido de CVs totales, tanto en las flores como en los frutos y en particular de β -sinensal y trans-farneseno (Carrera et al., 2007). Estudios transcriptómicos en frutos del mutante *alf* y la naranja Navel demostraron una importante diferencia en la expresión de un gen, denominado *TPS3*, que tenía una elevada homología con otras sesquiterpeno sintasas caracterizadas en plantas (Carrera et al., 2006) y podría, por lo tanto, estar implicado en la síntesis de sesquiterpenos en los cítricos. Ensayos funcionales de la proteína recombinante *TPS3* indicaron que podría tratarse de una sesquiterpeno sintasa multiproducto con capacidad para generar diferentes sesquiterpenos presentes en el flavedo de naranjas (Carrera et al., comunicación personal). Por otro lado, también se ha descrito un mutante de mandarina Clementina que se caracteriza por presentar un reducido número de glándulas de aceites esenciales en la piel de los frutos, y por lo tanto se le denominó *deg* (*decreased oil glands*), aunque hasta el momento no se sabe cómo se ve afectada la emisión y el contenido de CVs en frutos de este mutante.

3 Compuestos norisoprenoides

Los carotenoides (C40) son isoprenoides que comparten un origen biosintético común con otros terpenos, ya que derivan del IPP y su isómero DMAPP (Croteau et al., 2000). Los carotenoides son los pigmentos responsables del color externo e interno de los frutos cítricos, confiriendo tonalidades que van desde amarillo pálido hasta rojo intenso pasando por diversas tonalidades de naranja (Alquézar et al., 2008; Rodrigo et al., 2013). En general, en frutos cítricos la biosíntesis de carotenoides es más activa en la piel que en la pulpa, acumulándose una mayor cantidad de estos pigmentos en la piel. El contenido total y la composición de carotenoides tanto a nivel cualitativo como cuantitativo, pueden variar no sólo entre especies sino también entre variedades, además, puede diferir en función de las condiciones climáticas, prácticas de cultivo y estadio de maduración. Además, la piel y la pulpa no muestran únicamente diferencias a nivel cuantitativo sino también cualitativo, y en los patrones temporales de acumulación de carotenoides (Gross, 1987; Alquézar et al., 2008; Kato, 2012).

Por otro lado, se han descrito diferentes mutantes de cítricos con frutos con coloración alterada y con diferente composición en carotenoides respecto a los frutos de las líneas parentales de los que provienen (Alquézar et al., 2008). Dos ejemplos destacables son los frutos de la naranja Pinalate, que derivan de la naranja Navelate, y que presentan coloración amarilla en la piel y en la pulpa (Rodrigo et al., 2003) o la naranja Cara Cara, un mutante identificado en Venezuela cuyos frutos tienen un aspecto externo similar a su parental Navel, pero con pulpa de color rojo (Alquézar et al., 2008). Además, es bien conocido la disponibilidad de mutaciones de pomelo de coloración roja en la pulpa, principalmente, y que puede afectar en mayor o menor

medida al flavedo, y que derivan, bien por mutación espontánea o inducida, de las variedades incoloras o amarillas (Gmitter, 1995). En Pinalate el contenido y composición de carotenoides están alterados, presentando altas concentraciones de carotenoides lineales, concretamente el flavedo de frutos maduros es rico en fitoeno (44%), fitoflueno (21%), ζ -caroteno (25 %), mientras que contiene reducida concentración de xantofilas (10%), en comparación con el flavedo del fruto maduro de Navelate que contiene un 98% de xantofilas (Rodrigo et al., 2003). El estudio de la composición de carotenoides en frutos maduros de la naranja Cara Cara reveló que acumulaba fitoeno en el flavedo y carotenoides lineales (fitoeno, fitoflueno y licopeno) y β -caroteno en la pulpa, mientras que su parental Navel fue especialmente rico en xantofilas (94%) tanto en el flavedo como en la pulpa (Alquézar et al., 2008). En las variedades blancas de pomelos destaca la variedad Marsh por su relevancia comercial, mientras que en pomelos de pigmentación rosada y rojiza son relevantes las variedades Flame y Star Ruby, respectivamente. Los frutos maduros de pomelo Marsh tienen un contenido muy bajo en carotenoides tanto en el flavedo como en la pulpa, siendo los principales los incoloros fitoeno y fitoflueno, (Yokoyama y White, 1967; Alquézar et al., 2013), mientras que en los pomelos rosados o rojos la coloración se debe a la acumulación de licopeno, que constituye el principal pigmento de la pulpa, junto con otros carotenos como fitoeno, fitoflueno y β -caroteno (Gross 1987; Xu et al., 2006; Alquézar et al., 2013).

Los carotenoides son los precursores de un importante grupo de compuestos volátiles: los norisoprenoides (C9–C13), que se generan *in vivo* a través de la actuación específica de enzimas denominadas dioxigenasas/oxigenasas de corte de carotenoides (CCD/CCO, 'carotenoid cleavage dioxygenases/oxygenases') (Baumes et al., 2002; Simkin et al., 2004; Walter et al., 2010; Brandi et al., 2011), o por degradación inespecífica no enzimática que da lugar a la formación de una mezcla de productos dependiente del carotenoide precursor y de las condiciones de reacción.

Aunque los compuestos norisoprenoides suelen estar presentes en los frutos en muy bajas concentraciones, algunos de ellos se caracterizan por presentar un umbral de percepción olfativa muy bajo, por lo que su intensidad aromática es muy elevada (Winterhater y Rouseff, 2002). Por ejemplo, el umbral de percepción del norisoprenoide β -ionona es de 0,007 ppm mientras que el del monoterpeneo limoneno es 1400 veces superior (Ohloff, 1978). Los norisoprenoides volátiles (C9-C13) son compuestos con elevada repercusión en el aroma de numerosos frutos como el tomate, melocotón, membrillo, sandía, uva, manzana, lichi o mango y, sin embargo, el estudio de su origen biosintético y su regulación es limitado y ha sido abordado de forma reciente (Schneider et al., 2001; Simkin et al., 2004; Britton et al., 2008; Klee, 2010; Vogel et al., 2010). En este sentido el fruto de tomate ha sido un buen modelo de estudio y Kanasawud y Crouzet (1990), identificaron volátiles derivados de la degradación del β -caroteno, como el β -ciclocitral, la β -ionona y 2-metil-2-hepten-6-ona y del licopeno, como el neral y geranial.

Simkin et al. (2004) estudiaron la implicación de las CCDs en flores y hojas tomate, así como en frutos en diferentes estadios de maduración y la formación de β -ionona, pseudoionona y geranil acetona. Otros estudios más exhaustivos sobre la relación carotenoides-norisoprenoides en tomate han sugerido el posible origen biosintético de los principales norisoprenoides, donde el geranial, pseudoionona y 6-metil-5-hepten-2-ona pueden derivar de la degradación enzimática del licopeno, prolicopeno o δ -caroteno, mientras que α -ionona puede formarse por degradación de δ -caroteno, y el β -ciclocitral y la β -ionona derivan aparentemente del catabolismo oxidativo de β -caroteno (Vogel et al., 2010). Los principales carotenoides descritos como precursores de norisoprenoides geranil acetona, 6-metil-5-hepten-2-ona, neral, geranial, β -ionona, β -ciclocitral y damascenona son el fitoteno, fitoflueno, ζ -caroteno, licopeno, β -caroteno y β -criptoxantina. La β -ionona y damascenona, son los compuestos norisoprenoides más abundantes entre los compuestos volátiles derivados de carotenoides (Lewinshon et al., 2005; Britton et al., 2008). En la **Figura 5** se muestra las estructuras de los principales norisoprenoides y los carotenoides de los que pueden derivarse.

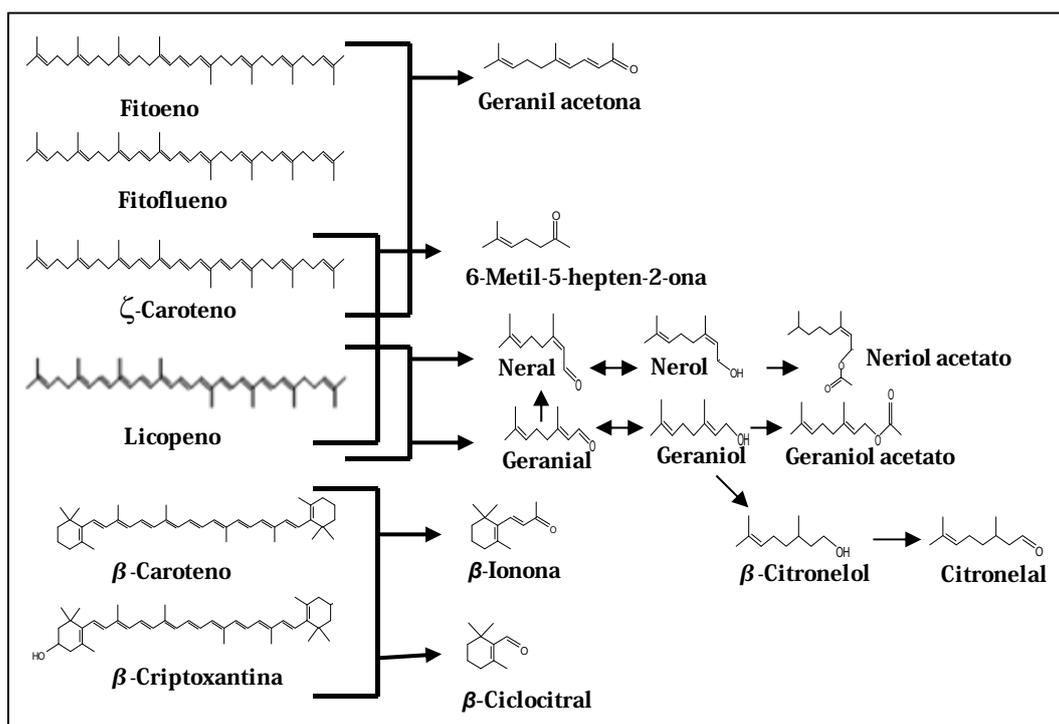


Figura 5. Estructura y origen biosintético propuesto de los principales norisoprenoides. A la izquierda se indican los carotenoides parentales de los que derivarían los distintos norisoprenoides (derecha) (adaptada de Lewinsohn et al., 2005).

Existe un número muy limitado de trabajos que han abordado el posible origen biosintético de los norisoprenoides en frutos a partir de carotenoides. La oxidación no enzimática *in vitro* del licopeno dio lugar a un gran número de compuestos de degradación,

como geranial y otros compuestos norisoprenoides no cíclicos que también se han descrito como CVs importantes en el aroma de tomate y melón (Caris-Veyrat et al. 2003; Lewinson et al., 2005). Por otra parte, la oxidación enzimática de β -caroteno, llevada a cabo mediante ensayos *in vitro*, dio lugar a β -ciclocitral y β -ionona (Wache et al., 2003). Muchos de los estudios que se han llevado a cabo están basados en correlaciones positivas entre el contenido de determinados carotenoides y norisoprenoides como por ejemplo los llevados a cabo en sandía, tomate, melocotón, nectarina o algunos frutos cítricos. En particular, en frutos de diferentes variedades de sandía y tomate con diferente pigmentación se ha observado una clara correlación entre la concentración de carotenoides y la de determinados norisoprenoides. En concreto, los frutos ricos en prolicopeno, fitoeno, fitoflueno y ζ -caroteno tenían mayores niveles de 6-metil-5-hepten-2-ona y geranil acetona (Lewinson et al., 2005). Vogel et al. (2010) demostraron que la emisión de norisoprenoides en tomate depende de la composición de carotenoides, de modo que frutos deficientes en éstos presentaban una importante reducción en la emisión de β -ciclocitral, β -ionona, 6-metil-5-hepten-2-ona y geranil acetona, mientras que frutos ricos en carotenoides lineales emitían niveles reducidos de β -ciclocitral y β -ionona. En melocotón, Brandi et al. (2011) estudiaron las diferencias entre la variedad Red haven y un mutante blanco, observando que los primeros presentaban menor contenido en norisoprenoides que el mutante blanco en el estadio maduro. En nectarinas se ha demostrado que la degradación enzimática de carotenoides juega un papel esencial en la formación de compuestos norisoprenoides en el aroma de estos frutos (Baldermann et al., 2005). Recientemente, un estudio realizado con 12 variedades de sandía con diferente composición de carotenoides ha mostrado una correlación positiva entre la β -ionona y el β -caroteno y entre la geranil acetona y el prolicopeno (Liu et al., 2012). En cítricos existe un único trabajo hasta la fecha en el que se ha identificado en zumos de frutos cítricos la presencia simultánea de α - y β -ionona, β -ciclocitral y β -damascenona y sus carotenoides precursores α - y β -caroteno, α y β -criptoxantina y neoxantina (Mahattanatawee et al., 2005). Sin embargo, no existen estudios que relacionen la composición cualitativa y cuantitativa de carotenoides en variedades/especies de frutos cítricos con su perfil de norisoprenoides, lo que ha constituido uno de los objetivos de esta Tesis.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El objetivo general planteado en esta Tesis Doctoral ha sido estudiar los mecanismos fisiológicos y moleculares implicados en el aroma de frutos de diferentes variedades y especies de cítricos durante la maduración natural y en diferentes situaciones postcosecha. Para el desarrollo de este objetivo general se llevaron a cabo los siguientes objetivos parciales:

1. Realizar un estudio comparativo de la emisión, el contenido en la piel y en la pulpa de compuestos volátiles (CVs) y de la expresión de genes que codifican diferentes terpeno sintasas durante la maduración natural en frutos de variedades de cítricos con diferencias importantes en su capacidad aromática. Para ello, se seleccionaron frutos de la mandarina Clemenules, el híbrido de mandarina Ortanique y la naranja Navelate.
2. Caracterizar el efecto de la aplicación postcosecha de etileno en la biogénesis y evolución de CVs en frutos de la mandarina Clemenules, el híbrido Ortanique y la naranja Navelate. Adicionalmente, se pretende analizar el efecto del estadio de maduración del fruto en la respuesta al etileno modificando la génesis y emisión de CVs.
3. Caracterizar la relación entre contenido en CVs y su emisión, y la expresión de genes de terpeno sintasas, en frutos del mutante *deg*, un mutante de mandarina Clementina con reducido número de glándulas de aceite en el flavedo. Además, se ha planteado el estudio del efecto del reducido número de glándulas de aceite en la piel sobre los cambios en el perfil de CVs durante la desverdización postcosecha con etileno y la capacidad de infección por el hongo *Penicillium digitatum*.
4. Estudiar la posible relación entre el contenido y composición de carotenoides y el perfil de compuestos norisoprenoides volátiles (C9-C13) en el flavedo y en la pulpa de frutos cítricos. Para ello se utilizaron frutos de variedades y mutantes de naranja y pomelo con diferente grado de pigmentación, como las naranjas Navel Frost, Cara Cara, Navelate y Pinalate, y los pomelos Marsh, Flame y Star Ruby.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material vegetal

En los distintos experimentos realizados en esta Tesis Doctoral se han utilizado frutos de diferentes variedades de naranjas, mandarinas, híbridos y pomelos, en distintos estadios de maduración y sometidos a diferentes tratamientos. Las principales características de las variedades utilizadas se describen a continuación.

1.1 Naranjas (*Citrus sinensis*, L. Osbeck)

- Navelate: Originaria de España (Vinaroz, Castellón), procede de una mutación espontánea de Washington Navel. Naranja de recolección tardía, caracterizada por presentar frutos de tamaño medio y coloración naranja pálida, con corteza suave y lisa y pulpa fina. Presenta forma elipsoidal o esférica, y sin ombligo aparente. Sus características organolépticas la convierten en una variedad de calidad excelente (Soler, 1999; Agustí, 2000).

- Pinalate: Originaria de España (San Pedro del Pinatar, Murcia), procede de una mutación espontánea de la naranja Navelate. Naranja de recolección tardía, caracterizada por presentar frutos maduros de tamaño medio y coloración amarillenta del flavedo y pulpa debido al bloqueo parcial en la biosíntesis de carotenoides en el fruto (Rodrigo et al., 2003).

- Navel Frost: Origen incierto. Posiblemente surge por mutación gemaria de una de las variedades Selecta. Naranja de recolección media, caracterizada por presentar frutos de tamaño medio-grande, redondos o ligeramente ovales. El flavedo es de coloración naranja intenso y ligeramente rugoso. La pulpa es firme y presenta mucho zumo de sabor muy agradable y adecuado contenido de ácidos (Agustí, 2000).

- Cara Cara: Originaria de Venezuela en la finca 'La Caracara' (San Diego - Estado Carabobo) por una mutación espontánea de la naranja Navel. Naranja de recolección de estación media, caracterizada por presentar frutos similares a la variedad de la que procede, pero con pulpa de coloración rojo intenso debido a la acumulación de licopeno (Soler, 1999; Saunt, 2000; Lee, 2001; Alquézar et al., 2008).

1.2 Mandarinas (*Citrus clementina*)

- Clemenules: Procedente de mutación espontánea de la Clementina Fina originada en Nules, Castellón (España), en 1953. Corteza algo rugosa, pulpa jugosa de muy buena calidad, elevado contenido en zumo y sin semillas. Excelente calidad organoléptica. Es una variedad de temporada media. La pérdida rápida de zumo tras su maduración impide mantenerla en el árbol más allá de mediados de enero (Agustí, 2000).

- Mutante de Clementina *deg* (*decreased oil glands*): Mutante generado mediante mutagénesis física con rayos gamma de yemas de Clementina (**Figura 6**). Se caracteriza por mostrar una drástica reducción del número de glándulas de aceite del flavedo (32 ± 3 glándulas/cm²) respecto a frutos parentales (148 ± 8 glándulas/cm²) (Carrera et al., 2007).

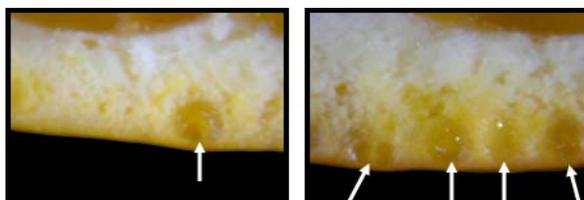


Figura 6. Fotografía de una sección de un fruto del mutante *deg* (izquierda) con una única glándula de aceite y frutos parentales (derecha) con múltiples glándulas de aceite.

1.3 Híbridos

- Ortanique: Híbrido entre naranja dulce (*Citrus sinensis*) y mandarina (*Citrus reticulata*), originario de Jamaica (1920). Frutos de tamaño medio-grande, ligeramente aplanados por su zona estilar, donde desarrollan un ombligo poco prominente, corteza ligeramente rugosa, gruesa, de color rojizo intenso y muy adherida a la pulpa. Presenta elevado contenido de zumo y buen sabor. Puede tener semillas. De recolección tardía pudiendo mantenerse en el árbol hasta finales de mayo sin pérdida apreciable de calidad (Agustí, 2000).

1.4 Pomelos (*Citrus paradisi*, Macf.)

- Star Ruby: Obtenido en Texas (1959) mediante mutación inducida por irradiación de semillas de la variedad Hudson. Se caracteriza por presentar frutos de tamaño medio a grande, corteza fina, con áreas de color rojo fuerte. La pulpa es de coloración rojo intensa debido a la acumulación de licopeno. No presenta semillas y tiene un elevado contenido en zumo (Soler, 1999; Agustí, 2000).

- Flame: Originario de Florida, procede de semillas irradiadas de pomelo Henderson. El fruto es similar a la variedad Star Ruby pero presenta un color externo e interno menos intenso debido a su menor acumulación de licopeno.

- Marsh: Pomelo blanco originado a partir de Duncan. Se caracteriza por presentar frutos de tamaño medio. La corteza es de color amarillo fina y brillante y la pulpa es amarilla y muy jugosa (Agustí, 2000).

Los frutos utilizados en un mismo experimento fueron recolectados durante la misma campaña, precisando 4 campañas consecutivas para alcanzar todos los objetivos planteados en esta Tesis Doctoral (2008-2011). La recolección de frutos tuvo lugar en diferentes parcelas de la provincia de Valencia, dependiendo de la campaña, variedad recolectada y posterior tratamiento postcosecha.

Los frutos se seleccionaron en diferentes estadios de maduración dependiendo de las diferentes especies y variedades, con el fin de obtener una buena representación del desarrollo del fruto, así como los estadios de maduración óptimos para la aplicación de los diferentes tratamientos postcosecha.

Los frutos de naranja y mandarina en los que se evaluó su comportamiento durante la maduración del fruto y el tratamiento postcosecha con etileno, se recolectaron en una plantación comercial localizada en Liria (Valencia), de forma que estuvieron sometidos a las mismas condiciones climáticas y de cultivo. El resto de frutos utilizados en los diferentes experimentos se recolectaron en el Banco de Germoplasma de cítricos, localizado en el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) (Moncada, Valencia), y el mutante de Clementina *deg* se obtuvo de una colección de mutantes generados en el Centro de Genómica del IVIA.

La recolección y selección de los frutos se realizó al azar, alrededor de la zona exterior de al menos 3 árboles de cada variedad. Inmediatamente después de la recolección, los frutos se trasladaron a las instalaciones del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC) (Paterna, Valencia), donde se realizó una nueva selección de los frutos descartando aquellos que presentaban daños y/o defectos.

En general, en todos los experimentos se realizaron al menos dos lotes de 6 a 15 frutos, según el tamaño de los mismos, para evaluar la emisión de volátiles en los frutos intactos recién cosechados. Las muestras de tejido de flavedo (parte externa coloreada de la piel del fruto) y pulpa se obtuvieron de al menos 6 frutos. El flavedo, se separó del resto de tejidos utilizando un cuchillo o bisturí, se congeló inmediatamente en N₂ líquido, se homogeneizó con un molinillo preenfriado y se almacenó a -80 °C hasta su análisis. La separación de la pulpa del resto de tejidos y su almacenamiento hasta el análisis se llevó a cabo del mismo modo que el flavedo.

2. Medida del color e índice de madurez

La medida del color externo e interno de los frutos y el índice de madurez del zumo fueron los criterios utilizados para seleccionar los estadios de maduración óptimos para llevar a cabo los experimentos.

2.1 Medida del color externo e interno

La medida del color externo (flavedo) e interno (pulpa) de los frutos se realizó con un colorímetro Minolta CR-330. Se determinaron los parámetros Hunter *a*, *b* y *L*, y los datos se expresaron como la relación de color Hunter *a/b* (Stewart y Wheaton, 1972). La coordenada *a* (croma) representa cambios en el color desde verde (valores negativos) hasta rojo (valores positivos), y la coordenada *b* (tono) representa cambios de color desde azul (valores negativos) hasta amarillo (valores positivos), de modo que una relación *a/b* negativa se correlaciona con

frutos verdes, alrededor de cero con frutos amarillos (estado virando) y positiva con frutos coloreados. Las medidas de color, se realizaron en lotes de al menos 10 frutos y en cada fruto se tomaron datos en 3 puntos del plano ecuatorial. En la pulpa se realizaron las determinaciones de color en secciones transversales del fruto.

2.2 Índice de madurez

La estimación del índice de madurez (IM) de los frutos se determinó como el cociente de la relación °Brix/% acidez. Los sólidos solubles y el porcentaje de acidez se analizaron en el zumo obtenido de 10 frutos.

Los sólidos solubles, expresados como °Brix, se midieron con un refractómetro digital (Atago). La determinación del porcentaje de acidez, expresado como porcentaje de ácido cítrico (mg de ácido/100 mL de zumo), se realizó en tres alícuotas de 5 mL de zumo, utilizando para la valoración una solución de NaOH 0,1N y fenoltaleína (Sigma-Aldrich) como indicador.

3. Tratamientos postcosecha

3.1 Desverdización con etileno

Se recolectaron frutos virando de las variedades Navelate, Ortanique, Clemenules, y del mutante *deg* y su línea parental, y se trataron con etileno (5 ppm) durante 6 días, tal y como se indica en la **Figura 7**. Los frutos control se mantuvieron durante el mismo periodo de tiempo en atmósfera de aire. Adicionalmente, para estudiar el posible papel del etileno endógeno en la biosíntesis, acumulación y emisión de CV, un lote de frutos se pre-trató durante 16 h con 1-Metilciclopropeno (1-MCP, SmartFresh™) (1ppm), inhibidor competitivo de los receptores de la hormona, siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras el periodo de incubación con 1-MCP los frutos se airearon y se dividieron en dos grupos, uno se mantuvo en aire (1-MCP+aire) y otro fue tratado con etileno (5 ppm) (1-MCP + etileno). Se tomaron muestras para los diferentes análisis al inicio del experimento y a los 3 y 6 días. Todos los tratamientos se desarrollaron en cámaras termostataadas a 20 °C y al 90% HR.

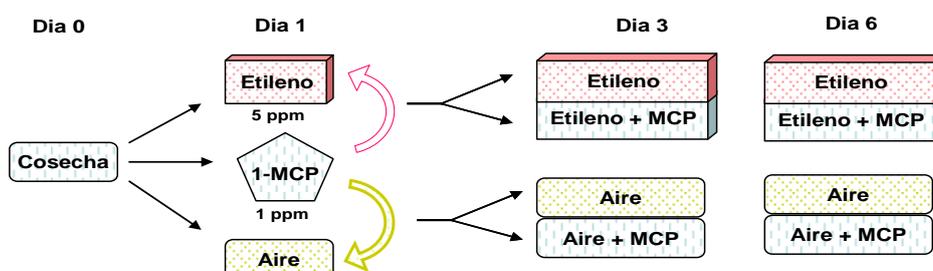


Figura 7. Esquema del diseño experimental del tratamiento con etileno y pre-tratamiento con 1-MCP a frutos virando de las variedades Navelate, Ortanique, Clemenules, y del mutante *deg* y su línea parental.

3.2 Tratamiento con etileno a frutos maduros

Frutos maduros de la variedad Navelate se trataron con etileno (5 ppm) durante 7 días, tal y como se indica en la **Figura 8**. De forma análoga a los experimentos de desverdización, un lote de frutos se pre-trató durante 16 h con 1-MCP (1ppm). Tras el período de incubación con 1-MCP los frutos se airearon y se dividieron en dos grupos, uno se mantuvo en aire (1-MCP+aire) y otro fue tratado con etileno (5 ppm) (1-MCP + etileno). Se tomaron muestras para los diferentes análisis al inicio del experimento y a los 2, 4 y 7 días. Todos los tratamientos se desarrollaron en cámaras termostatadas a 20 °C y al 90% HR.

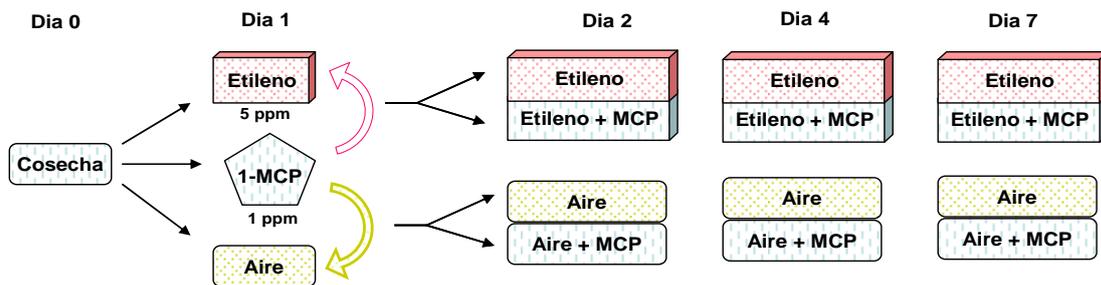


Figura 8. Esquema del diseño experimental del tratamiento con etileno y pre-tratamiento con 1-MCP a frutos maduros de la variedad Navelate.

3.3 Ensayos de infección con *Penicillium digitatum* en el mutante de Clementina *deg*

Recientemente se ha descrito que los CV del flavedo de los frutos cítricos, en concreto, el monoterpeno limoneno, puede tener un papel importante en la susceptibilidad o resistencia a la infección con diferentes patógenos, entre ellos *P. digitatum* (Rodríguez et al., 2011 y 2014). Con el objetivo de evaluar la influencia de las glándulas de aceite en la incidencia y progresión de la infección con *P. digitatum* se utilizó el mutante de Clementina *deg*. Este mutante, como se ha descrito previamente se caracteriza por presentar una reducción drástica en el número de glándulas de aceites esenciales en el flavedo (**Figura 9**), por lo que es posible hacer inoculaciones controladas en zonas del flavedo sin glándulas.

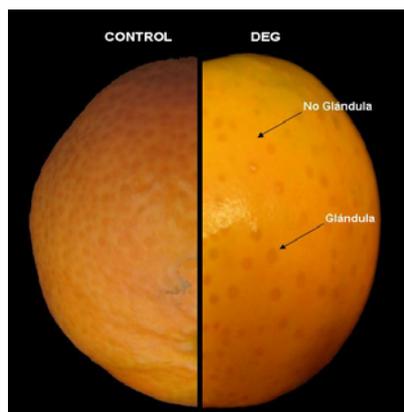


Figura 9. Imagen comparativa de frutos de Clementina (control) y del mutante *deg* en la que se muestra la diferente densidad de glándulas de aceite entre ambos tipos de frutos y las dos áreas de flavedo del mutante ('glándula' y 'no glándula') donde se realizó la herida y/o inoculación del hongo.

Los frutos se recolectaron en el estadio de maduración comercial y se lavaron con una solución de lejía al 5% durante 5 min, procediendo posteriormente a su inoculación. Los frutos del mutante *deg* se inocularon en glándulas de aceite o en zonas del flavedo sin glándulas, mientras que en los frutos de la línea parental Clementina todas las inoculaciones se realizaron en glándulas de aceite. Para las inoculaciones se efectuaron 4 heridas por fruto en la zona ecuatorial con un punzón de 3 mm. La herida se inoculó con 5 μ L de una suspensión de conidios de *P. digitatum* (cepa CECT20796, aislado PHI26), a una concentración de 10^4 conidios/mL. Posteriormente, los frutos se almacenaron hasta 6 días en cámaras de conservación a 20 °C y al 90% HR. En el tratamiento control de los frutos de Clementina y *deg* la suspensión de inoculación se sustituyó por agua. Durante el almacenamiento se evaluó diariamente el progreso de la infección en función de la medida del halo de infección (cm) en cada una de las heridas y a los 3 días los volátiles emitidos por los frutos.

4. Extracción y cuantificación de CVs en frutos cítricos

4.1 Extracción y análisis de la emisión de CVs de frutos cítricos intactos

La emisión de CV de frutos intactos se evaluó mediante la técnica de microextracción en fase sólida del espacio de cabeza estático (SPME-HS). Se utilizó una fibra de sílice fundida recubierta con poli (dimetilsiloxano) (PDMS) (Supelco) de 100 μ m de espesor. Se evaluaron, al menos, 2 lotes de frutos independientes de cada muestra con 6 a 15 frutos por lote, dependiendo del tamaño del fruto. Los frutos, previamente pesados, se colocaron en recipientes de vidrio de 4,5 L que se cerraron herméticamente durante 2 h a temperatura ambiente para permitir la acumulación de CVs en el espacio de cabeza. Posteriormente, la fibra se introdujo en los recipientes a través de un septum y se expuso al espacio de cabeza durante 15 min. Para la

desorción de los CVs la fibra se introdujo en el inyector del cromatógrafo de gases (CG) a una temperatura de 220 °C durante 4 min. Para la separación y determinación de CVs se utilizó un CG Thermo Trace™ GC Ultra, equipado con una columna capilar Innowax (Agilent Technologies) (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) acoplado a un espectrómetro de masas Termo DSQ. Como gas portador se utilizó He a un flujo constante de 1,5 mL/min. El horno se programó a 40 °C durante 5 min, incrementándose hasta 150 °C a 5 °C/min y hasta 250 °C a 20 °C/min, manteniendo 2 min la temperatura final. La temperatura de la interfase y fuente de ionización del MS fue de 260 y 200 °C, respectivamente. A partir de los 2 min se registró el espectro de los iones positivos (rango de masas de 30 a 400 m/z) obtenidos mediante impacto electrónico, utilizando un potencial de ionización de 70 eV. La identificación de los compuestos volátiles se realizó mediante comparación de los espectros de masas obtenidos con los de las bibliotecas Willey6, NISTDEMO, MANILIB y REPLIB y los estándares disponibles (**Tabla I Anexo**). El análisis de los cromatogramas y espectros resultantes se llevó a cabo utilizando el programa Xcalibur 1.4.z

La cuantificación de los CVs emitidos se llevó a cabo mediante curvas de calibrado. Cada curva se preparó con diluciones seriadas de soluciones de concentración conocida de los patrones disponibles. De cada una de las diluciones se depositaron 10 µL en un papel de filtro de 2 cm² situado en el fondo de los recipientes de vidrio. Adicionalmente, se utilizó 2-Octanol (Fluka) al 0,1% (p/v) como patrón interno. Todas las soluciones se prepararon en metanol (Pureza HPLC, Carlo Erba) y el rango de las mismas varió dependiendo del compuesto (**Tabla I Anexo**). Los CVs cuyos estándares comerciales no estaban disponibles, se cuantificaron a partir de curvas obtenidas para compuestos de familia y estructura similar a los disponibles en el laboratorio. Los estándares comerciales (Sigma-Aldrich y Fluka) utilizados se detallan en la **Tabla I (Anexo)**. Todas las curvas se prepararon por duplicado.

4.2 Extracción y análisis del contenido de CVs del flavedo de frutos cítricos

Para la extracción de los CVs del flavedo de los frutos se realizaron al menos 2 réplicas de cada muestra. La extracción se llevó en tubos de vidrio (Pyrex) con tapón de teflón en los que se añadió a cada uno 3 ml de pentano (Fluka) y 22,5 µg de patrón interno 2-Octanol (Fluka). A continuación, se pesó y añadió a cada tubo 200 mg de muestra finamente triturada y se homogeneizaron con un homogeneizador (Yellowline DI 25 basic) durante 30 s en frío. Las muestras se agitaron durante 15 s, se añadió 3 ml de agua bidestilada, se volvieron a agitar e inmediatamente se centrifugaron a 800 g durante 10 min a 4 °C, recuperándose la fase orgánica. El extracto acuoso se reextrajo 2 veces más con 3 ml de pentano, seguido de agitación y centrifugación a 1800 g durante 5 min a 4 °C, recuperando la fase orgánica. Finalmente, se midió el volumen final recuperado y 2 µL del extracto se inyectaron directamente en el CG-MS, utilizando los equipos, condiciones y software descritos en el apartado 4.1.

La cuantificación de los CVs en el flavedo de los frutos se llevó a cabo mediante curvas de calibrado. Cada curva, se preparó con diluciones seriadas de concentración conocida de los patrones disponibles. Todas las soluciones se prepararon en metanol (Pureza HPLC, Carlo Erba) y se utilizó 2-Octanol (Fluka) como patrón interno y se inyectaron 2 μL de cada una de las diluciones directamente en CG-MS. El rango de las mismas varió dependiendo del compuesto tal como se indica en la **Tabla II** del **Anexo**. Todas las curvas se prepararon por duplicado. Los CVs cuyos estándares comerciales no estaban disponibles se cuantificaron a partir de curvas obtenidas para compuestos de familia y estructura similar. Los estándares comerciales (Sigma-Aldrich y Fluka) y las curvas de calibrado resultantes se detallan en la **Tabla II** (Anexo).

4.3 Extracción y análisis de CVs en la pulpa de frutos cítricos

Para analizar los CVs de la pulpa de frutos cítricos se utilizó la técnica SPME-HS. Se utilizó una fibra de sílice fundida recubierta con Polydimethylsiloxane (PDMS) (Supelco) de un espesor de 100 μm . Se analizaron al menos 3 réplicas por muestra. Se utilizaron viales de vidrio (Supelco) de 7 ml con un septum de PTFE/silicona de 13 mm de diámetro. En cada vial se pesaron 0.45 g NaCl, posteriormente se añadieron 1,5 g de pulpa congelada (-80 °C) y se cerró el vial herméticamente. A cada vial se añadió 10 μg de 2-Octanol (Fluka) como patrón interno y se incubó a 37 °C durante 10 min en agitación. Posteriormente, el vial se incubó junto con la fibra expuesta al espacio de cabeza durante 30 min en un baño a 40 °C sin agitación. Los volátiles adsorbidos en la fibra se analizaron mediante CG-MS utilizando los equipos, condiciones y software descritos en el apartado 4.1.

4.4 Extracción y análisis de compuestos norisoprenoides en el flavedo y la pulpa de frutos cítricos

El análisis de compuestos norisoprenoides presentes en el flavedo y la pulpa de frutos cítricos se realizó mediante la técnica de SPME-HS. Las muestras de 1 y 2 g de flavedo y pulpa, respectivamente, fueron introducidas en viales de 42 mL dotados de un septum de PTFE/silicona y se incubaron 30 min a 40 °C y agitación constante. Tras el período de incubación se expuso la fibra al espacio de cabeza durante 40 min a 40 °C y agitación magnética constante. Para la extracción de CVs se utilizó una fibra trifásica Stableflex Divinylbenzene/Carboxen/Polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) (Supelco). El análisis de las muestras se llevó a cabo con un GC-MS Clarus 500 (Perkin-Elmer). La desorción de CV se realizó a 200 °C durante 5 min. La separación de volátiles se llevó a cabo utilizando una columna capilar Stabilwax (Restek) (60 m x 0,25 mm d.i x 0,50 μm). El horno se programó a 40 °C durante 2 min hasta alcanzar 240 °C en una rampa de 7 °C/min y manteniendo la temperatura final 9,5 min. Como gas portador se utilizó He con un flujo de 2 mL/min. Se registró el espectro de iones positivos (rango masas 25 a 300 m/z) obtenidos mediante impacto electrónico

utilizando una energía de 70 eV. Las temperaturas de la interfase y la fuente de iones fueron de 240 °C y 180 °C, respectivamente. Los cromatogramas se analizaron e integraron mediante el software Turbomass 500 (Perkin-Elmer). Los picos cromatográficos correspondientes a los diferentes compuestos fueron identificados por comparación de los espectros de masas disponibles en la base de datos de la biblioteca NIST 2005.

5. Extracción y cuantificación de carotenoides

5.1 Extracción y cuantificación de carotenoides totales

La extracción y cuantificación de carotenoides se llevó a cabo a partir de 0,5 g de flavedo y 1,5 g de pulpa siguiendo el método descrito por Rodrigo et al (2003; 2004) con ligeras modificaciones. El material vegetal, previamente triturado, se introdujo en tubos de cristal Pyrex con tapón de rosca y se mantuvieron en hielo hasta la adición de 2 mL de metanol (pureza HPLC, Carlo Erba) y 1,5 mL de una solución de Tris-HCl (50 mM, pH 7,5) y NaCl 1M. A continuación se homogeneizó la mezcla en el vórtex durante 1 min y en agitación magnética a 4 °C durante 5 min. Seguidamente, se añadieron 4 mL de cloroformo (Panreac), se volvió a homogeneizar en el vórtex y en agitación magnética. Posteriormente, se centrifugó a 450 g durante 5 min a 4 °C y se recuperó la fase orgánica en un matraz de fondo redondo. El extracto acuoso se volvió a reextraer con 3 mL de cloroformo y se repitió el proceso de extracción hasta que la fase orgánica fue incolora. La fase orgánica recuperada se evaporó completamente a 40 °C en evaporador rotatorio (Buchi). El residuo seco se resuspendió en 200 µL de acetona (pureza HPLC) y 2,8 mL de Solución A (éter de petróleo (40-60 °C): éter etílico, 9:1, v/v).

Los extractos se secaron completamente a 40 °C en un evaporador rotatorio y se saponificaron mediante la adición de 1,8 mL metanol (Pureza HPLC) y 200 µL de KOH 60% (p/v). La muestra se dejó reposar durante una noche a temperatura ambiente, en oscuridad y atmósfera de nitrógeno. Los carotenoides libres se recuperaron mediante lavados sucesivos hasta que el matraz quedó totalmente limpio, con 1 mL de cloroformo, 2 lavados sucesivos con 2 mL de Solución A y 2 mL de agua bidestilada, y recuperando las soluciones de todos los lavados en un mismo tubo (tipo Sarstedt o de vidrio Pyrex) de 15 mL con tapón de rosca. Tras homogeneizar la solución recuperada mediante agitación, se dejó reposar durante 5 min a temperatura ambiente para que las fases se separaran, y se recuperó la fase orgánica superior pasándola a un nuevo tubo. El extracto se reextrajo con 2 mL de Solución A hasta que la fase superior resultó incolora. El conjunto de las fases orgánicas recuperadas se llevaron a un volumen conocido mediante la adición de Solución A y se determinó la concentración de carotenoides midiendo la absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro Multiskan Spectrum, (Thermo Electron Corporation). La concentración de carotenoides totales, se calculó aplicando

la fórmula de Davies (1976) y el resultado se expresó como μg de equivalentes de β -caroteno por gramo de peso fresco de tejido:

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

donde:

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

Los extractos se llevaron a sequedad mediante corriente de nitrógeno, se resuspendieron con 1 mL de acetona con el fin de precipitar compuestos de naturaleza lipídica que interfieren en el análisis de carotenoides y se mantuvieron toda la noche a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tras este período, se centrifugaron a 11400 g durante 15 min y $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, se pasó el sobrenadante a otro tubo de microcentrífuga y se secó en corriente de N_2 . Las muestras se almacenaron en oscuridad a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y en atmósfera de nitrógeno hasta su análisis.

Durante todo el procedimiento, se tuvo especial cuidado en evitar la exposición a la luz de las muestras, trabajando en condiciones de baja luminosidad, con el fin de evitar la fotodegradación, isomerización y posibles cambios estructurales de los carotenoides. Todas las muestras se extrajeron al menos por duplicado.

5.2 Identificación y cuantificación de carotenoides mediante HPLC-PDA

La identificación y cuantificación de los carotenoides individuales se realizó por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de fotodiodos (HPLC-PDA). Los análisis se llevaron a cabo mediante un sistema de cromatografía líquida Waters, equipado con una bomba cuaternaria (600E) y un detector de fotodiodos (modelo 996) usando el programa informático Empower (Waters). La columna empleada fue de fase reversa C_{30} ($250\text{ mm} \times 4,6\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$) acoplada a una precolumna C_{30} ($20\text{ mm} \times 4,0\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$) (YMC). La separación de carotenoides se realizó mediante un gradiente de elución ternario de metanol (MeOH), agua y metil tert-butil eter (MTBE) (**Tabla 2**), optimizado previamente en el laboratorio (Alquézar et al., 2008).

Tabla 2. Composición (en %) del gradiente de elución utilizado para la separación de carotenoides por HPLC.

Tiempo (min)	0	12	20	30	50	70	75
MTBE	5	5	14	25	50	75	5
H_2O	5	0	0	0	0	0	5
MeOH	90	95	86	75	50	25	90

El flujo fue de 1 mL/min y se inyectó un volumen de muestra de 20 µl. El detector de fotodiodos (PDA) fue programado para registrar la absorbancia entre 250 hasta 540 nm. Para cada muestra se obtuvo un cromatograma Maxplot en el que se representa el tiempo frente a la absorbancia máxima en el rango de longitudes de onda registradas.

Los carotenoides se identificaron en función del tiempo de retención y el espectro de absorbancia por comparación con los estándares disponibles o con los descritos en la bibliografía utilizando condiciones cromatográficas similares (**Tabla III Anexo**) (Rouseff et al., 1996; Melendez Martinez et al., 2003; Rodrigo et al., 2003 y 2004). Los picos cromatográficos correspondientes a cada carotenoide se integraron en su longitud de onda máxima (cromatograma Maxplot) y su contenido se calculó mediante curvas de calibrado disponibles en el laboratorio (**Tabla IV anexo**). El β-apo-8'-carotenal (Hoffman-LaRoche) se utilizó para cuantificar β-citraurina, el β-caroteno (Sigma) para α- y β-caroteno, la β-criptoxantina (Extrasynthese) para α-y-β-criptoxantina, la luteína (Sigma) para luteína, neoxantina y violaxantina, el licopeno (Sigma) para licopeno y la zeaxantina (Extrasynthese) para zeaxantina y anteraxantina. Los estándares de fitoeno, fitoflueno y ζ-caroteno se purificaron en nuestro laboratorio del flavedo de frutos de Pinalate siguiendo el método descrito por Pascual et al. (1993) y se prepararon las correspondientes curvas de calibrado.

6. Extracción de RNA total

Para la extracción y purificación de RNA total se utilizaron dos protocolos en función del tipo de tejido y la cantidad de RNA total que se necesitaba extraer.

6.1 Protocolo de extracción fenol-cloroformo

Este protocolo se utilizó con tejido de flavedo cuando fue necesario obtener cantidades superiores a 10 µg de RNA total, y en todas las extracciones de tejido de pulpa. Para la extracción se pesó, en un tubo de 50 mL, 4 g de pulpa o 2 g de flavedo congelado y triturado, y se mezcló e incubó 15 min a 65 °C con 5 vol. (mL/g PF) de tampón de extracción (Tris-HCl 200 mM pH 8.0, NaCl 400 mM, EDTA 50 mM pH 8,8, Sarkosyl 2%, polivinil pirrolidona 40 (PVP-40) 1%, β-mercaptoetanol 1%) y 2,5 vol. de fenol equilibrado con Tris-HCl. Se dejó enfriar en hielo y se añadió 2,5 vol. de cloroformo:isoamílico (24:1; v/v). Los restos vegetales fueron eliminados por centrifugación a 4000 g durante 20 min a 4 °C y se recuperó la fase acuosa en otro tubo de 50 mL. Se adicionó de nuevo a este último tubo 2,5 vol. de fenol y 2,5 vol. de cloroformo:isoamílico (24:1; v/v) y se centrifugó la muestra de nuevo con el fin de obtener el máximo rendimiento en la extracción. La fase acuosa recuperada se pasó a un tubo de ultracentrífuga y se precipitaron los ácidos nucleicos mediante la adición de 1,5 vol de etanol 100% (v/v) frío. Inmediatamente, se centrifugó a 26900 g durante 20 min a 4 °C y el sedimento

se lavó con 5 ml de etanol 70%. El sedimento se resuspendió en 7,5 mL TESa (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; Na₂EDTA 5 mM; Sarkosyl 0,1%) y se calentó a 65 °C en baño de agua durante 15 min, se añadió 7,5 mL de agua bidestilada y 5 mL LiCl 12 M. El RNA se precipitó mediante incubación a 4 °C durante 16 h y posteriormente, se centrifugó a 26900g durante 30 min a 4 °C. El RNA precipitado se lavó con 1,5 mL de etanol frío al 70% y se resuspendió en 1 mL de acetato de sodio 3 M (pH 6,0). A continuación, se centrifugó a 11400g durante 5 min y se volvió a lavar con etanol 70%. Finalmente, el RNA total se resuspendió en agua bidestilada y se determinó su concentración espectrofotométricamente (Nanodrop ND-1000), midiendo la absorbancia entre 220 y 350 nm. En general, el RNA total obtenido se diluyó a una concentración final de entre 1-2 µg/µL. Se verificó su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) con bromuro de etidio. Las muestras de RNA total se almacenaron a -80 °C hasta su posterior utilización.

6.2 Extracción con RNeasy® Mini Kit

Este protocolo se utilizó con muestras de flavedo en la que no se requería obtener una cantidad de RNA total superior a 10 µg. La extracción de RNA se realizó utilizando el kit de extracción de RNA total RNeasy® Mini Kit (Qiagen), siguiendo las instrucciones especificadas por el fabricante con ligeras modificaciones. Para la extracción se pesaron 100 mg de tejido congelado previamente triturado, en un tubo de microcentrífuga (tipo Eppendorf). Inmediatamente se añadieron 450 µL de Buffer RLT (con β-Mercaptoetanol) y se incubó durante 3 min a 56 °C. Después se centrifugó a 2000 g para eliminar el sedimento, y se recuperó el sobrenadante. A este último se le añadió 0,5 vol. de etanol al 100%, se mezcló con la pipeta y se transfirió a una columna RNeasy acoplada a un tubo colector de 2 mL. Se centrifugó 15 s a 8000 g, se descartó el efluente, y se volvió a centrifugar a la misma velocidad durante 2 min. Para eluir el RNA de la columna se añadieron 30 µL de agua bidestilada estéril y se centrifugó durante 1 min a 8000 g. La concentración final de RNA total se determinó en un espectrofotómetro (Nanodrop ND-1000), midiendo la absorbancia entre 220 y 350 nm, y se verificó su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) con bromuro de etidio. Las muestras de RNA se almacenaron a -80 °C hasta su posterior utilización.

7. Síntesis de cDNA

La síntesis de cDNA se realizó en dos etapas. La primera etapa consistió en la eliminación de DNA genómico como posible contaminante de la muestra de RNA total. Para ello se trataron 10 µg de RNA total con DNasa I libre de RNasa (Ambion) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración final de RNA total purificado se cuantificó

espectrofotométricamente (Nanodrop ND-1000). La síntesis de cDNA se llevó a cabo incubando 2 µg de RNA total libre de DNA genómico con 1 µL de Oligo(dT)₁₈ (500 ng/µL) (Invitrogen) y 1 µL de dNTPs 10mM (Invitrogen) siendo el volumen de reacción de 11,5 µL. La mezcla se calentó a 80 °C durante 3 min y posteriormente se adicionó 4 µL de 5xStrandBuffer, 1 µL DTT (200mM), 0,5 µL de Inhibidor de RNase (Roche) y 1 µL de enzima SuperScript III (Invitrogen), obteniendo un volumen final de reacción de 20 µL que se incubó a 50 °C durante 90 min. La inactivación del enzima se realizó a 94 °C durante 10 min. El cDNA sintetizado se cuantificó espectrofotométricamente (Nanodrop ND-1000) y se almacenó a -20 °C hasta su utilización.

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

8.1 Diseño de cebadores para la RT-qPCR

El diseño de los cebadores se llevó a cabo de forma manual o mediante el programa DNAMAN (Version 4.03 Lynnon Biosoft) a partir de la secuencia parcial o completa de ESTs de *Citrus* identificadas en las bases de datos públicas de ESTs (Harvest: <http://harvest.ucr.edu/> y CFGP: <http://bioinfo.ibmcp.upv.es/genomics/cfgDB/>) o del genoma de *Citrus sinensis* (Phytozome-www.phytozome.org). Se estableció una longitud entre 19-25 pares de bases para los cebadores y de un máximo entre 100-150 pares de bases para el amplicón, así como un porcentaje mínimo de GC del 50% y una temperatura de hibridación próxima a 60 °C. Para la normalización de los resultados se utilizó el gen de la actina (*ACT*) como gen constitutivo (sentido: 5'-TTAACCCCAAGGCCAACAGA-3' y antisentido: 5'-TCCCTCATAGATTGGTACAGTATGAGAC-3') (Romero et al., 2012; Alós et al., 2013). Las secuencias de los cebadores utilizados en esta Tesis y la longitud de los amplicones resultantes se muestran en la **Tabla 3**.

Tabla 3: Relación de cebadores utilizados para la expresión relativa mediante RT-qPCR de los genes linalol sintasa (*LIN*), valenceno sintasa (*VAL*), limoneno sintasa 1 (*LIM 1*), limoneno sintasa 2 (*LIM 2*), β -pineno sintasa (β -*PIN*), ocimeno sintasa (*OCI*), sesquiterpeno sintasa multiproducto (*TPS3*) y alcohol aciltransferasa (*CsAAT*). S, Sentido; AS, Antisentido. a: GenBank; b: Phytozome V.7.0 database.

Gen	Nº Acc.	Cebador			T ^a Hibridación (°C)	Tamaño (pb)
		Nombre	Secuencia	Orientación		
<i>LIN</i>	CV885574 ^a	MJ162	5'-CCATTCTCAGCATCGTTCACGAGG -3'	S	60	97
		MJ163	5'-CGAGGCTTGGTAGGCGTTGG -3'	AS		
<i>VAL</i>	AF441124 ^a	MJ164	5'-CGTTGCCCGACCACTGCTCGG -3'	S	60	85
		MJ165	5'-ATGCGTATAGCCGTCGTCCTC -3'	AS		
<i>LIM1</i>	AB110637 ^a	MJ166	5'-GACTCGAACAACCTGCTGAGTTCC -3'	S	60	174
		MJ167	5'-CCAGGAGATGCTGTGAAAGCC -3'	AS		
<i>LIM2</i>	AB110636 ^a	MJ168	5'-CCATGGTAAGTACACGCCAAC -3'	S	60	80
		MJ169	5'-TCATTGTAACCATAGGGCCTCC -3'	AS		
β <i>PIN</i>	AB110641 ^a	MJ170	5'-CCGCATATCTCAAAGAATGGGTGGC-3'	S	60	130
		MJ171	5'-CACCTGCTCCAATCTTCGC-3'	AS		
<i>OCI</i>	AB110638 ^a	MJ172	5'-AGGGTGCAACCAAGAATTGA-3'	S	60	151
		MJ173	5'-GTAGCCGCTGAAGAGATCCTC -3'	AS		
<i>TPS3</i>	orange1.1g008620m ^b	MJ180	5'-AAAGATGCATAAGGCTTCC-3'	S	57	157
		MJ181	5'-TTTAAAGTTCCTCCGCTG-3'	AS		
<i>CsAAT</i>	CB292557 ^a	MJ392	5'-CTGGCTAGCTAGCTGGCTA -3'	S	55	145
		MJ393	5'-GGGATCCGGATGTTACATATCA -3'	AS		

8.2 Verificación de los productos de RT-qPCR

Con el fin de comprobar que los cebadores diseñados amplificaban el fragmento de DNA deseado, se realizaron reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) con 1xTampón de reacción, MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs 0,1 mM, cebador sentido 3 μ M, cebador antisentido 3 μ M y *EcoTaq* DNA polimerasa 0,04 U/ μ L (Ecogen, 5 U/ μ L) en un volumen final de 25 μ L.

Las condiciones de PCR fueron, 94 °C durante 5 min, seguido de 35 ciclos de 94/T/72 °C (siendo T la temperatura óptima de hibridación de cada gen) durante 30/30/30 s, y 72 °C durante 10 min. Estas reacciones se llevaron a cabo en termocicladores Techne (TC-312) y G-STORM y tamaño del producto de PCR se verificó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% (p/v) con bromuro de etidio y posteriormente se confirmó la identidad de la secuencia mediante secuenciación (Servicio de Secuenciación, Universitat de Valencia).

8.3 Curvas de calibrado

Para la cuantificación de la expresión génica mediante RT-qPCR se prepararon curvas de calibrado para cada gen a partir de diluciones seriadas 1:2 de un stock cDNA ($\approx 1000 \text{ ng}/\mu\text{L}$), representándose la concentración final del cDNA frente al número de ciclos necesarios para obtener señal de fluorescencia (C_p). Las reacciones de RT-qPCR se realizaron en placas de 96 pocillos en un termociclador LightCycler 480 (Roche) y los datos se analizaron mediante el programa LightCycler® 480 Software release 1.5.0 version 1.5.0.39. Los valores de cada una de las curvas corresponden a la media de 4 réplicas realizadas en 2 placas independientes. Los resultados de las curvas de calibrado para cada uno de los genes estudiados, se muestran en la **Tabla V** incluida en los anexos. Tras el análisis de las curvas de calibrado se seleccionó la dilución 1:10 de las muestras de cDNA para los análisis de expresión relativa.

8.4 Reacción de RT-qPCR

Con el fin de convertir las medidas de la intensidad de fluorescencia en valores de expresión relativa, se utilizó el equipo y software detallado en el apartado 8.3. Por cada reacción se utilizaron 100 ng cDNA, que fue la cantidad óptima según lo establecido en las curvas de calibrado. El volumen total de reacción fue de 10 μL y consistió en 1 μL de cDNA y 9 μL de Master Mix (2 μL agua bidestilada estéril, 1 μL de cebador S (3 μM), 1 μL de cebador AS (3 μM) y 5 μL de LightCycler® 480 Syber Green I Master 2x (Roche). En todas las placas se incluyeron controles negativos (exentos de cDNA) y una muestra referencia que permitió la comparación entre diferentes placas. Las condiciones de reacción fueron 95 °C durante 10 min (desnaturalización), 40 ciclos de amplificación a 95/T/72 °C durante 10/10/10 s, respectivamente, siendo T la temperatura específica de hibridación para cada gen (**Tabla 3**). Los valores de intensidad de la fluorescencia fueron adquiridos durante los pasos de extensión a 72 °C. La especificidad de la reacción se comprobó mediante el análisis de las curvas de disociación. Para la normalización de los resultados se utilizó el gen de la *ACT* (Romero et al., 2012; Alós et al. 2013).

8.5 Análisis de la expresión relativa

Para el análisis relativo de la expresión de los genes *LIN*, *VAL*, *LIM 1*, *LIM 2*, *B-PIN*, *OCI* y *TPS3* se utilizó el programa informático REST-MCS[®] (Relative Expression Software Tool-Multiple Condition Solver- version 2; Plaffl et al, 2002). El modelo matemático que utiliza este software está basado en la corrección de las eficiencias de la PCR y en la desviación de la media de los C_p s entre las muestras y la del gen de referencia (*ACT*) utilizando la fórmula:

$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta CP_{\text{target}} (MEAN \text{ control} - MEAN \text{ sample})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta CP_{\text{ref}} (MEAN \text{ control} - MEAN \text{ sample})}}$$

donde

target: gen en estudio (*LIN, VAL, LIM 1, LIM 2, B-PIN, OCI y TPS3*)

ref: gen de expresión constitutiva utilizado como referencia (*ACT*)

9. Programas informáticos

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

- Adobe PhotoShop: Procesado de imágenes (Adobe Design Premium CS4)
- DNAMAN: Análisis de secuencias (Version 4.03 Lynnon Biosoft)
- Empower (Waters): Programa para la adquisición y el tratamiento de datos del sistema cromatográfico HPLC-PDA.
- LightCycler® 480 (Roche): Tratamiento de datos obtenidos de RT-qPCR (Software release 1.5.0 versión 1.5.0.39)
- Microsoft Excel: Cálculos matemáticos y estadística
- Microsoft Word: Procesado de textos.
- Microsoft Power Point: Realización de figuras e imágenes
- Reference Manager: Manejo de bases bibliográficas
- REST: Análisis de expresión relativa de los genes estudiados (<http://www.REST.de.com>)
- SigmaPlot: Elaboración de gráficos y tratamiento estadístico (Versión 10.0).
- Symix Draw: Realización de estructuras químicas (Versión 3.2)
- Turbomass: Programa para la adquisición y el tratamiento de datos de cromatografía gaseosa (Versión 5.4.0).
- Xcalibur (Thermo): Programa para la adquisición y el tratamiento de datos de GC-MS.

También se utilizaron las aplicaciones *on line*:

- NCBI (National Center for Biotechnology Information): Búsqueda de secuencias publicadas en su base de datos. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Programa de comparación de secuencias: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>: (Altschul *et al.* 1990).

- CFGP (Citrus Functional Genomic Project. España): Búsqueda y análisis de ESTs de cítricos. <http://bioinfo.ibmcp.upv.es/genomics/cfgDB/>:
- HarvEST:Citrus: Búsqueda y análisis de ESTs de cítricos. <http://harvest.ucr.edu/>.
- <http://www.scopus.com>: Búsqueda de material bibliográfico.
- Phytozome V.7.0 database: Búsqueda y análisis de secuencias del genoma de *Citrus sinensis* y *Citrus clementina*. <http://www.phytozome.org>

CAPITULO I

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LA
BIOSÍNTESIS DE CVs EN FRUTOS DE
DIFERENTES ESPECIES DE CÍTRICOS
DURANTE LA MADURACIÓN NATURAL**

Para caracterizar la biosíntesis de compuestos volátiles (CVs), tanto la emisión como el contenido, durante la maduración de los frutos cítricos y comparar diferencias y similitudes entre especies, se eligieron la mandarina Clemenules (*Citrus clementina*), el híbrido de mandarina Ortanique (*Citrus reticulata* x *Citrus sinensis*) y la naranja Navelate (*Citrus sinensis* L. Osbeck), ya que, en principio, podrían representar un comportamiento relacionado entre ellas, además de la relativa importancia comercial de estas variedades en la Citricultura Valenciana. Se recolectaron frutos en cuatro estadios de maduración y se determinaron sus características de color y de maduración interna, y posteriormente se procedió al estudio de la emisión y del contenido en CVs, así como al análisis de la expresión de genes de terpeno sintasas.

1. Evolución del color e IM durante la maduración del fruto de la mandarina Clemenules, el híbrido de mandarina Ortanique y la naranja Navelate

El color externo (flavedo) e interno (pulpa) y el IM de los frutos se utilizaron como parámetros para establecer los cuatro estadios de maduración fisiológicamente equivalentes y realizar un análisis comparativo de los CVs emitidos y contenidos en el flavedo y pulpa de las tres variedades. La mandarina Clemenules se recolectó entre los meses de Julio a Diciembre, el híbrido Ortanique entre los meses de Julio a Febrero y la naranja Navelate desde el mes de Julio a Enero. En todos los casos se seleccionaron 4 estadios de maduración diferentes, correspondientes a frutos Verde Inmaduro (VI), Verde Maduro (VM), Virando (V) y Totalmente Coloreado (TC). Los parámetros de calidad de los frutos recolectados en los diferentes estadios se indican en la **Tabla 4** y en la **Figura 10** se muestra el aspecto de los mismos.

Tabla 4. Características de calidad (color, °Brix, acidez e IM) de frutos de Clemenules, Ortanique y Navelate recién cosechados en cuatro estadios de maduración. El color de los frutos (parámetros Hunter *a/b*) es la media de 3 determinaciones en 6 frutos. El contenido en sólidos solubles (° Brix), el porcentaje de acidez (mg de ácido cítrico/100 ml de zumo) y el índice de madurez (IM) (° Brix/% de acidez) corresponden a la media de 3 grupos de 10 frutos. Los frutos se recolectaron durante las campañas 2007/08 y 2009/10. E.M: Estadio de maduración: n.a: no analizado.

EM	Color (Hunter <i>a/b</i>)		° Brix	Acidez	IM	
	Flavado	Pulpa				
Clemenules						
VI	21 Jul.	-0,83 ± 0,01	-0,26 ± 0,01	n.a ± n.a	n.a ± n.a	n.a ± n.a
VM	18 Sep.	-0,77 ± 0,01	-0,10 ± 0,01	10,00 ± 0,03	3,27 ± 0,01	3,08 ± 0,02
V	28 Oct.	-0,21 ± 0,03	0,21 ± 0,01	11,00 ± 0,01	1,09 ± 0,01	10,09 ± 0,01
TC	10 Dic.	0,81 ± 0,04	0,22 ± 0,02	11,60 ± 0,02	0,81 ± 0,01	14,32 ± 0,01
Ortanique						
VI	21 Jul.	-0,83 ± 0,01	-0,42 ± 0,01	n.a ± n.a	n.a ± n.a	n.a ± n.a
VM	22 Oct.	-0,64 ± 0,01	-0,20 ± 0,01	9,40 ± 0,01	3,84 ± 0,01	2,46 ± 0,01
V	27 Nov.	-0,04 ± 0,02	0,10 ± 0,02	10,22 ± 0,01	2,47 ± 0,02	4,14 ± 0,01
TC	04 Feb.	1,01 ± 0,04	0,19 ± 0,02	11,16 ± 0,03	1,66 ± 0,01	6,72 ± 0,02
Navelate						
VI	15 Jul.	-0,67 ± 0,03	-0,27 ± 0,01	n.a ± n.a	n.a ± n.a	n.a ± n.a
VM	25 Sep.	-0,62 ± 0,01	-0,22 ± 0,01	8,00 ± 0,01	3,22 ± 0,02	2,48 ± 0,01
V	27 Oct.	-0,10 ± 0,02	0,08 ± 0,02	8,80 ± 0,01	1,94 ± 0,01	4,54 ± 0,01
TC	13 Ene.	0,52 ± 0,02	0,13 ± 0,02	10,40 ± 0,03	1,25 ± 0,01	8,32 ± 0,02

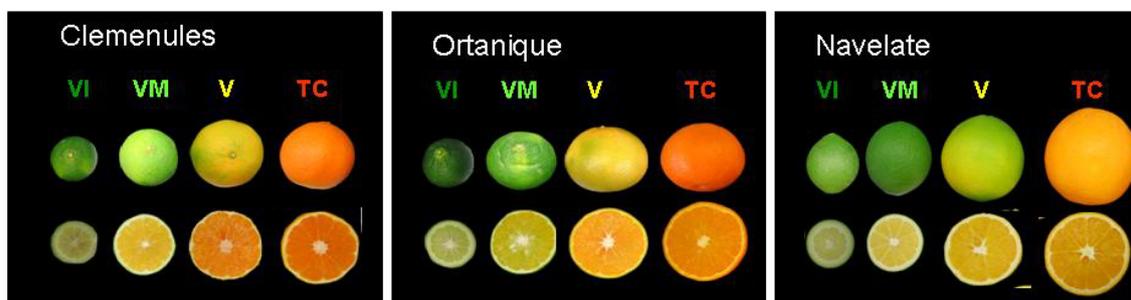


Figura 10. Aspecto interno y externo de los frutos de Clemenules, Ortanique y Navelate en los distintos estadios del desarrollo y maduración utilizados en esta Tesis. Los estadios seleccionados fueron Verde Inmaduro (VI), Verde Maduro (VM), Virando (V) y Totalmente Coloreado (TC). Las fechas de recolección de los frutos, junto con otros parámetros de calidad se indican en la Tabla 1.

En general, los valores *a/b* del flavado de Navelate fueron ligeramente inferiores a los observados en el resto de variedades en estadios de maduración fisiológicamente equivalentes. Los frutos en el estadio VI (Julio), presentaron un color externo verde intenso que se correspondió con valores *a/b* de -0,83 en Clemenules y Ortanique, y de -0,67 en la naranja Navelate. En el estadio TC también se observaron índices de color Hunter *a/b* superiores en Ortanique (1,01), seguidos de Clemenules (0,81) y Navelate (0,52), lo que estuvo en relación

con las diferencias en la intensidad del color visual externo. Sin embargo, al comparar la evolución temporal de los valores de color externo se observó un comportamiento más rápido en los frutos de la mandarina Clemenules, confirmando su carácter más precoz respecto a las otras dos. La evolución del color interno de los frutos también mostró diferencias entre variedades, resaltando en la pulpa el carácter temprano de la mandarina Clemenules, aunque el color final que se alcanzó fue similar al del híbrido Ortanique y ligeramente superior al de la naranja Navelate (**Tabla 4**).

El análisis del índice de maduración interna (IM) en los frutos de las tres especies reveló una rápida evolución del mismo en los frutos de la mandarina Clemenules. Así, en los frutos virando con un *a/b* negativo, ya tenían un IM ligeramente superior a 10, mientras que para una coloración externa similar los de las otras dos variedades tenían un IM superior a 4. Esta diferencia fue debida al rápido descenso de la acidez en la pulpa de Clemenules, que unido a unos valores de °Brix similares hizo que el IM en la mandarina fuera muy superior al de los frutos de las otras dos especies. El IM correspondiente a los estadios VI no pudo ser evaluado, ya que en estadios tan tempranos fue virtualmente imposible realizar una adecuada extracción de zumo. En conjunto, estos resultados confirmaron que los frutos de la mandarina Clemenules son de maduración más rápida y temprana que los del híbrido Ortanique y la naranja Navelate.

2. Evolución de la emisión de CVs durante la maduración del fruto de la mandarina Clemenules, el híbrido de mandarina Ortanique y la naranja Navelate

Mediante CG-MS se identificaron un total de 38, 48 y 62 CVs diferentes emitidos por los frutos de la mandarina Clemenules, el híbrido Ortanique y la naranja Navelate, respectivamente (**Tabla 5**). Los diferentes volátiles identificados se clasificaron en distintos grupos atendiendo a su estructura química, destacando los monoterpenos por su mayor abundancia y los sesquiterpenos por su mayor diversidad.

Tabla 5. CVs identificados en la emisión y en el contenido en el flavedo y en la pulpa de frutos de la mandarina Clementines, el híbrido Ortanique y la naranja Navelate durante el desarrollo y la maduración. El símbolo √ indica solo la presencia de ese CV.

Compuesto	EMISIÓN			CONTENIDO			PULPA		
	CMN	ORT	NAV	CMN	ORT	NAV	CMN	ORT	NAV
Monoterpenos hidrocarbonados									
α-Pineno	√	√	√	√	√	√	√	√	√
β-Pineno	√								
Sabineno	√	√	√	√	√	√	√	√	√
3-Careno			√			√	√		√
4-Careno						√	√	√	
β-Mirceno		√	√	√	√	√	√	√	√
Limoneno	√	√	√	√	√	√	√	√	√
Cis Ocimeno	√	√	√	√	√	√	√	√	√
α-Terpinoleno	√	√	√	√	√	√	√	√	√
ρ-Terpineno		√	√				√	√	√
Monoterpenos alcoholes									
Timol									√
Linalol	√	√	√	√	√	√	√	√	√
4-Terpineol				√	√	√	√	√	√
L-α-Terpineol	√	√	√	√		√	√		√
β-Terpineol				√	√	√			
Nerol		√	√	√	√	√	√	√	√
Geraniol				√	√	√	√	√	√
β-Citronelol		√		√	√	√	√	√	√
ρ-isogeraniol				√	√	√	√	√	
Perilla alcohol				√	√	√	√	√	√
Cis-p-menta-2,8-dienol				√	√	√	√	√	
Trans-p-menta-2,8-dienol							√	√	
Cis-p-ment-1-(7)-8-diene-2-ol				√	√	√	√	√	
Monoterpenos aldehídos y cetonas									
Citronelal		√	√	√	√	√	√	√	
β-Ciclocitral		√							
Neral			√	√	√	√	√	√	√
Geranial		√		√	√	√	√	√	√
Carvomentenal				√		√	√	√	√
Dihidrocarvona				√		√	√	√	
Perilla aldehído				√	√	√	√	√	√
Isopiperitenona	√		√	√	√	√	√	√	√
Geranil acetona		√	√				√	√	√
Piperitenona						√			
Monoterpenos ésteres									
Geraniol formato									√
Linalol acetato				√	√		√	√	
β-Terpenol acetato							√	√	√
α-Terpenol acetato	√			√			√		√
Nerol acetato				√	√	√	√	√	√
Citronelol acetato					√	√		√	√
Trans carvol acetato				√					
Limonen-10-ol-acetato							√	√	√

Tabla 5. Continuación

Compuesto	EMISIÓN			CONTENIDO			PULPA		
	CMN	ORT	NAVT	CMN	ORT	NAV	CMN	ORT	NAV
Sesquiterpenos cíclicos									
α -Cubebeno			√						
β -Cubebeno	√	√	√	√	√	√	√	√	√
δ -Elemeno	√	√	√	√	√	√		√	
β -Elemeno			√	√	√	√	√	√	√
ρ -Elemeno				√	√	√		√	
α -Copaeno	√	√	√	√	√	√	√	√	√
Sativen				√					
ρ -Selineno			√						
β -Selineno		√	√						
α -Selineno		√	√			√		√	√
δ -Selineno		√	√						
Zingibereno	√	√	√						
Isocariofileno		√	√						
Trans cariofileno	√	√	√	√	√	√	√	√	√
α -Humuleno	√	√	√		√	√		√	√
Aromadendreno	√	√	√			√		√	√
Trans- α -Bisaboleno	√								
ρ -Gurjuneno		√	√						
β -Chamigreno		√	√						
Germacreno D	√	√	√	√	√	√	√	√	√
Biciclogermacreno	√	√	√	√	√	√		√	√
δ -Guaieno				√	√				
Valenceno	√	√	√		√	√	√	√	√
α -Muroleno	√	√	√	√	√	√	√	√	√
ρ -Cadineno		√	√					√	
δ -Cadineno	√	√	√	√	√	√		√	√
Epi bicicosesquifelandreno			√			√			
β -Sesquifelandreno	√	√	√	√	√				
Sesquiterpenos lineales									
β -Farneseno	√	√	√	√	√	√	√		
α -Farneseno	√	√		√	√	√			
Sesquiterpenos alcoholes y aldehidos									
Carotol	√								
Farnesol				√	√	√			
α -Bisabolol				√	√	√			
Nerolidol			√	√	√	√	√		√
Elemol	√	√	√	√	√	√	√	√	√
Cedrol						√			
α -Cadinol				√	√	√			
Verdiflorol				√	√				
Trans trans farnesal			√	√					
β -Sinensal	√			√	√	√	√	√	
α -Sinensal	√	√		√	√	√	√	√	
Sesquiterpenos ésteres									
Farnesol acetato							√	√	√

Tabla 5. Continuación

Compuesto	EMISIÓN			CONTENIDO			PULPA		
	CMN	ORT	NAV	CMN	ORT	NAV	CMN	ORT	NAV
Aldehídos y alcoholes alifáticos									
Hexanal									√
2-Hexenal									√
Octanal	√	√	√	√	√	√	√	√	√
2-Heptenal								√	
Nonanal		√	√	√	√	√	√	√	√
Decanal	√	√	√	√	√	√	√	√	√
2-Nonenal							√	√	
Trans 2 decenal				√	√		√	√	√
Dodecanal				√	√	√	√		√
Trans trans 2,4-decadienal							√		
2,4-Decadienal						√	√		
2-Dodecenal							√		
Trans-2,6-nonadienal							√		
3-Cis-hexene-1-ol				√	√		√	√	√
1-Heptanol				√		√			√
2-Undecanol							√	√	√
1-Decanol							√	√	√
1-Octanol			√	√	√	√	√	√	√
Esteres alifáticos									
Butil butirato			√					√	
Butil octanoato			√						
Etil hexanoato									√
Etil Octanoato									√
Cis-3-hexenil acetato	√	√	√				√	√	
Hexil butanoato			√						
Hexil hexanoato			√						
1-Octil acetato							√	√	√
Octil butirato			√					√	√
Decil acetato							√	√	√
Dodecenil acetato							√		
Otros									
4,8-dimetil nonatrieno	√	√	√						√
6-metil-5-hepten-2-ona							√	√	
6-metil-5-hepten-2-ol							√		√
Cis epoxi ocimeno				√					
Cis-Limoneno oxido	√	√	√	√	√	√		√	
Trans limoneno Oxido	√	√	√	√	√	√			
Trans sabineno hidrato	√	√	√	√	√	√			
2,6-dimetil-1,3,5,7-octatetraeno			√						
Dendrolasin			√						
Juniper camfor			√	√	√	√			
Cariofileno oxido	√	√	√	√	√	√	√	√	√
4-acetil-1-metilciclohexano							√	√	√
Dihidrometil jasmonato			√						√

La **Tabla 5** muestra diferencias cualitativas importantes en cuanto a la emisión de los diferentes CVs en los frutos de las tres especies. Sin embargo, también se detectaron diferencias sustanciales de tipo cuantitativo en la emisión, expresada como la suma de todos los volátiles emitidos en un determinado estadio de maduración, no solo entre las diferentes especies sino también entre diferentes estadios de una misma variedad. La mayor emisión de CVs correspondió a los frutos verdes (VI y VM) reduciéndose incluso hasta 13 veces en los estadios coloreados (**Tablas 6, 7 y 8**). Debido a la limitada disponibilidad de patrones puros no todos los volátiles identificados pudieron ser cuantificados y, por ello, los resultados en esta sección se han centrado fundamentalmente en los CVs que se cuantificaron, aunque en algunos casos se mencionan algunos CVs que, a pesar de que no se pudieron cuantificar, se han descrito que son importantes en el aroma de los frutos cítricos (Rouseff et al., 2009).

Tabla 6. Evolución de la emisión de los CVs mayoritarios durante la maduración natural de frutos de la mandarina Clemenules. Cada valor corresponde a la media \pm DE de al menos 3 réplicas de 6 a 15 frutos cada una. Los frutos se recolectaron en la campaña 2007/08. VI: Verde Inmaduro, VM: Verde Maduro, V: Virando, TC: Totalmente Coloreado. Tr: Trazas; N.D: no detectado.

ng/g PF	VI	VM	V	TC
Monoterpenos hidrocarbonados				
α -Pinoeno	7,22 \pm 0,33	10,36 \pm 2,22	N.D	1,68 \pm 0,28
Sabineno	63,41 \pm 11,68	41,63 \pm 8,92	0,31 \pm 0,18	3,25 \pm 2,46
Limoneno	379,48 \pm 124,90	1167,03 \pm 219,93	22,90 \pm 4,67	88,60 \pm 38,34
Ocimeno	11,47 \pm 4,45	31,03 \pm 27,01	4,07 \pm 4,44	6,54 \pm 6,13
α -Terpinoleno	0,70 \pm 0,10	0,50 \pm 0,07	N.D	N.D
Monoterpenos alcoholes				
Linalol	1,73 \pm 1,23	1,05 \pm 0,18	0,04 \pm 0,01	0,05 \pm 0,01
L- α -Terpineol	0,11 \pm 0,01	0,18 \pm 0,14	N.D	Tr
Sesquiterpenos cíclicos				
β -Cubebeno	0,34 \pm 0,11	0,81 \pm 0,27	Tr	0,06 \pm 0,02
δ -Elemeno	0,56 \pm 0,17	1,40 \pm 0,45	Tr	0,11 \pm 0,03
α -Copaeno	0,42 \pm 0,13	0,97 \pm 0,27	Tr	0,07 \pm 0,03
Zingibereno	0,07 \pm 0,01	0,35 \pm 0,09	N.D	Tr
Trans cariofileno	2,02 \pm 0,58	2,47 \pm 1,74	0,65 \pm 0,05	0,16 \pm 0,06
Germacreno D	0,38 \pm 0,00	0,54 \pm 0,16	N.D	Tr
Biclogermacreno	0,23 \pm 0,05	0,22 \pm 0,07	Tr	Tr
Valenceno	Tr	Tr	Tr	0,04 \pm 0,01
α -Muroleno	Tr	0,08 \pm 0,03	N.D	N.D
δ -Cadineno	N.D	N.D	N.D	0,05 \pm 0,01
β -Sesquifelandreno	4,93 \pm 0,51	2,30 \pm 1,10	N.D	Tr
Sesquiterpenos lineales				
β -Farneseno	12,70 \pm 1,36	9,83 \pm 3,98	0,12 \pm 0,04	0,18 \pm 0,04
α -Farneseno	16,77 \pm 1,86	20,71 \pm 12,18	0,25 \pm 0,08	0,05 \pm 0,03
Emisión total CV	502,55 \pm 147,48	1291,45 \pm 278,79	28,34 \pm 9,47	100,83 \pm 47,44

Tabla 7. Evolución de la emisión de los CVs mayoritarios durante la maduración natural de frutos del híbrido Ortanique. Cada valor corresponde a la media \pm DE de al menos 3 réplicas de 6 a 15 frutos cada una. Los frutos se recolectaron en la campaña 2007/08. VI: Verde Inmaduro, VM: Verde Maduro, V: Virando, TC: Totalmente Coloreado. Tr: Trazas; N.D: no detectado.

ng/g PF	VI	VM	V	TC
Monoterpenos hidrocarbonados				
α -Pinoeno	23,77 \pm 7,30	7,34 \pm 0,75	4,32 \pm 0,27	4,41 \pm 2,11
Sabineno	96,51 \pm 28,96	5,26 \pm 0,90	1,53 \pm 0,44	2,11 \pm 1,07
β -Miraceno	101,50 \pm 12,37	32,77 \pm 7,02	7,92 \pm 1,80	12,91 \pm 9,39
Limoneno	2836,89 \pm 786,23	1380,81 \pm 289,24	292,44 \pm 60,40	437,60 \pm 92,47
Ocimeno	56,04 \pm 13,70	3,89 \pm 1,79	2,75 \pm 0,05	0,80 \pm 0,44
α -Terpinoleno	1,06 \pm 0,44	0,20 \pm 0,02	N.D	N.D
Monoterpenos alcoholes				
Linalol	0,50 \pm 0,04	0,13 \pm 0,07	0,07 \pm 0,01	0,17 \pm 0,13
L- α -Terpineol	0,07 \pm 0,02	0,04 \pm 0,03	N.D	N.D
β -Citronelol	N.D	0,06 \pm 0,03	N.D	0,09 \pm 0,06
Monoterpenos aldehidos y cetonas				
Citronelal	N.D	N.D	0,06 \pm 0,01	0,18 \pm 0,15
β -Ciclocitral	N.D	N.D	N.D	0,06 \pm 0,02
Sesquiterpenos cíclicos				
β -Cubebeno	1,17 \pm 0,26	0,14 \pm 0,03	Tr	0,09 \pm 0,09
δ -Elemeno	0,23 \pm 0,17	0,11 \pm 0,05	Tr	Tr
α -Copaeno	1,76 \pm 1,40	0,22 \pm 0,04	0,05 \pm 0,01	0,15 \pm 0,13
δ -Selineno	N.D	N.D	N.D	0,83 \pm 0,17
α -Selineno	Tr	Tr	0,17 \pm 0,01	1,19 \pm 0,03
Zingibereno	0,10 \pm 0,01	Tr	Tr	Tr
Trans cariofileno	4,16 \pm 0,22	0,54 \pm 0,47	1,06 \pm 0,09	2,01 \pm 0,16
α -Humuleno	0,41 \pm 0,07	0,06 \pm 0,01	Tr	0,09 \pm 0,02
ρ -Gurjuneno	N.D	N.D	Tr	0,41 \pm 0,10
β -Chamigreno	N.D	N.D	0,04 \pm 0,01	0,43 \pm 0,01
Germacreno D	0,10 \pm 0,02	Tr	0,04 \pm 0,01	0,08 \pm 0,08
Biclogermacreno	0,16 \pm 0,03	Tr	N.D	N.D
Valenceno	N.D	N.D \pm N.D	2,12 \pm 0,01	21,82 \pm 4,10
α -Muroleno	0,31 \pm 0,07	0,32 \pm 0,11	0,07 \pm 0,00	1,21 \pm 0,11
Sesquiterpenos lineales				
β -Farneseno	4,31 \pm 0,65	0,14 \pm 0,01	N.D	N.D
α -Farneseno	54,97 \pm 19,75	N.D	0,31 \pm 0,07	N.D
Alcoholes y aldehidos alifáticos				
Octanal	N.D	N.D	0,21 \pm 0,08	N.D
Decanal	N.D	0,06 \pm 0,06	0,05 \pm 0,00	0,07 \pm 0,04
Emisión total CV	3184,01 \pm 971,69	1432,08 \pm 300,65	313,19 \pm 63,27	486,68 \pm 110,88

Tabla 8. Evolución de la emisión de los CVs mayoritarios durante la maduración natural de frutos de la naranja Navelate. Cada valor corresponde a la media \pm DE de al menos 3 réplicas de 4 a 15 frutos cada una. Los frutos se recolectaron en la campaña 2009/10. VI: Verde Inmaduro, VM: Verde Maduro, V: Virando, TC: Totalmente Coloreado. Tr: Trazas; N.D: no detectado.

ng/g PF	VI	VM	V	TC
Monoterpenos hidrocarbonados				
α -Pino	19,95 \pm 8,74	4,12 \pm 1,13	1,37 \pm 0,06	0,58 \pm 0,15
Sabineno	133,85 \pm 19,17	5,67 \pm 1,64	2,38 \pm 0,39	1,86 \pm 1,60
β -Mirce	75,12 \pm 9,82	7,82 \pm 1,27	2,68 \pm 0,46	2,97 \pm 0,43
Limoneno	2006,23 \pm 565,72	344,97 \pm 65,33	142,01 \pm 10,64	113,83 \pm 20,67
Ocimeno	16,46 \pm 4,17	2,20 \pm 3,20	0,48 \pm 0,29	0,23 \pm 0,07
α -Terpinoleno	3,27 \pm 1,57	0,95 \pm 0,52	0,55 \pm 0,13	0,26 \pm 0,13
Monoterpenos alcoholes				
Linalol	1,97 \pm 0,31	0,25 \pm 0,10	0,04 \pm 0,02	0,24 \pm 0,12
L- α -Terpineol	0,20 \pm 0,07	0,04 \pm 0,02	N.D	N.D
Monoterpenos aldehídos y cetonas				
Neral	Tr	N.D	N.D	0,04 \pm 0,02
Sesquiterpeno cíclicos				
β -Cubebeno	0,76 \pm 0,32	N.D	Tr	Tr
β -Elemeno	0,04 \pm 0,02	N.D	N.D	0,07 \pm 0,05
α -Copaeno	1,01 \pm 0,38	0,10 \pm 0,01	Tr	0,05 \pm 0,02
β -Selineno	N.D	N.D	0,04 \pm 0,01	0,23 \pm 0,15
α -Selineno	N.D	N.D	0,09 \pm 0,03	2,57 \pm 1,02
δ -Selineno	N.D	N.D	0,05 \pm 0,02	2,77 \pm 1,67
Zingibereno	0,06 \pm 0,04	Tr	N.D	N.D
Trans cariofileno	9,11 \pm 6,64	2,97 \pm 2,96	19,28 \pm 3,23	25,45 \pm 10,77
α -Humuleno	0,26 \pm 0,09	Tr	0,10 \pm 0,02	0,55 \pm 0,37
ρ -Gurjuneno	N.D	N.D	Tr	1,08 \pm 0,59
β -Chamigreno	N.D	N.D	Tr	0,94 \pm 0,50
Germacreno D	0,41 \pm 0,19	Tr	Tr	Tr
Biciclogermacreno	0,11 \pm 0,05	Tr	N.D	N.D
Valenceno	N.D	N.D	1,44 \pm 0,48	63,34 \pm 12,02
α -Murolo	0,05 \pm 0,02	Tr	N.D	N.D
ρ -Cadineno	1,44 \pm 0,77	0,07 \pm 0,01	0,06 \pm 0,01	Tr
Sesquiterpeno lineales				
β -Farneseno	3,44 \pm 2,61	0,10 \pm 0,01	N.D	N.D
Alcoholes y aldehídos alifáticos				
Octanal	N.D	0,11 \pm 0,01	N.D	0,07 \pm 0,01
Decanal	0,12 \pm 0,02	0,06 \pm 0,04	Tr	0,07 \pm 0,01
1-Octanol	0,18 \pm 0,07	0,06 \pm 0,01	Tr	0,10 \pm 0,03
Esteres alifáticos				
Hexil hexanoato	N.D	N.D	N.D	0,27 \pm 0,27
Emisión total CV	2274,06 \pm 620,81	369,49 \pm 76,26	170,56 \pm 15,79	217,56 \pm 50,66

La emisión de los CVs de las diferentes familias presentaron tendencias distintas en los frutos de las tres especies estudiadas, tal y como se observa en las **Tablas 6, 7 y 8**, aunque fue posible establecer patrones de emisión comunes para la mayoría de CVs de una misma familia. Así, la emisión de los monoterpenos, en general, descendió durante la maduración de los frutos. La máxima emisión de monoterpenos correspondió al estadio VM en la mandarina Clemenules y al estadio VI en el híbrido Ortanique y la naranja Navelate. El monoterpeno limoneno fue el

CV mayoritario en todos los casos, representando en todas las variedades y estadios estudiados más del 90% respecto al total de CVs identificados. Otros monoterpenos importantes fueron el β -mirreno, sabineno, α -pineno y ocimeno. Es interesante destacar que en Clemenules el monoterpeno alcohol linalol redujo su emisión conforme avanzó la maduración del fruto, siendo 35 veces inferior en el estadio TC respecto al estadio VI, mientras que en Ortanique y Navelate disminuyó alrededor de 5 y 8 veces, respectivamente. El grupo de monoterpenos aldehídos y cetonas, como el citronelal, no se identificó en frutos intactos de Clemenules pero sí en frutos de Ortanique y Navelate, incrementándose durante la maduración del fruto.

El grupo de sesquiterpenos presentó diferentes tendencias entre las tres especies. En general, este grupo de CVs fue muy poco abundante en la mandarina mientras que en el híbrido y la naranja representaron entre el 5 y 45% del total de CVs emitidos en frutos TC, respectivamente. En Clemenules, el α -copaeno, trans cariofileno y germacreno D, presentaron su máxima emisión en el estadio VM reduciéndose drásticamente en los estadios V y TC. El α -humuleno se identificó por primera vez en los frutos V, donde presentó su máxima emisión (**Tabla 6**). En Ortanique y Navelate se identificaron diferentes patrones de emisión. El primero de ellos consistió en una disminución progresiva conforme avanzó la maduración, siendo los estadios V los que presentaron una menor emisión. En este grupo destacó por su abundancia el α -copaeno y β -cubebeno, u otros sesquiterpenos y sus derivados (α -farneseno y biciclogermacreno), que se detectaron principalmente en VI, siendo casi exclusivos de tejido verde. El segundo patrón correspondió a aquellos sesquiterpenos cíclicos que aumentan con la maduración de los frutos, como el valenceno y los selinenos, que se identificaron por primera vez en el estadio V e incrementaron su emisión durante la maduración para alcanzar en el estadio TC la máxima emisión (**Tablas 7 y 8**). Entre los sesquiterpenos cíclicos destacó el trans-cariofileno, aunque su evolución con la maduración dependió de la especie estudiada. Mientras que en Clemenules y Ortanique la emisión máxima fue en frutos verdes (VI y VM), en Navelate aumentó con la maduración, siendo máxima en frutos TC. Otro sesquiterpeno cíclico de relevancia en frutos de Ortanique y Navelate fue el valenceno, ya que su emisión aumentó de forma muy importante durante la maduración y fue el más abundante en frutos TC. En Clemenules la emisión de valenceno apenas experimentó variaciones durante la maduración del fruto y fue un CV muy minoritario.

El perfil de emisión de sesquiterpenos lineales fue similar en las tres variedades estudiadas presentando un máximo en frutos verdes (VI o VM), aunque los niveles fueron mayores en Clemenules y Ortanique.

Por último, es interesante destacar la emisión natural de ésteres alifáticos exclusivamente en frutos TC de Navelate y no en otros estadios de maduración ni en las otras variedades seleccionadas. Estos CVs, junto con aldehídos son los principales responsables del aroma de zumo fresco de naranja (Ruiz-Perez Cacho y Roussef, 2008).

2.1 Emisión de CVs en frutos de la mandarina *Clemenules*

La mayor emisión total de CVs en frutos de la mandarina *Clemenules* correspondió al estadio VM, con valores de 1291 ng/g PF, seguido por los estadios VI (502 ng/g PF), TC (101 ng/g PF) y V (28 ng/g PF). En la **Tabla 6** se muestran los principales volátiles identificados y las cantidades emitidas para cada uno de ellos. El análisis de los distintos CVs muestra que el monoterpeno limoneno fue el mayoritario, representando entre el 80-92% de la abundancia total y presentando su máximo en el estadio VM. Conforme avanzó la maduración descendió la emisión de limoneno y en los frutos coloreados se redujo a un 7,5% respecto a su máximo. El sabineno fue el segundo CV en abundancia, cuya emisión también descendió durante la maduración desde 63 ng/g PF a 3 ng/g PF en TC. El linalol fue el monoterpeno alcohol mayoritario, con una emisión máxima en los frutos VI y mínima en V. En el caso de los sesquiterpenos destacó el trans cariofileno, seguido del β -sesquifelandreno y α -copaeno. La emisión del sesquiterpeno valenceno fue minoritaria (<0,05%) en los frutos intactos de *Clemenules* en todos los estadios estudiados. Por otra parte, cabe destacar por su abundancia, la familia de sesquiterpenos lineales (α y β -farneseno) que alcanzaron valores entre 12,7 y 20 ng/g PF en los estadios VI y VM, respectivamente (**Tabla 6**).

2.2 Emisión de CVs en frutos del híbrido *Ortanique*

La mayor emisión total de CVs en frutos del híbrido *Ortanique* correspondió al estadio VI, alcanzando valores de 3184 ng/g PF, considerablemente superiores en todos los estadios de maduración al de los frutos de la mandarina *Clemenules*. Con la maduración descendió la emisión de CVs alrededor de un 50% y de un orden de magnitud en frutos VM y V, respectivamente, para aumentar ligeramente (1/6 respecto a VI) en frutos maduros coloreados (**Tabla 7**).

El análisis de los CVs totales mostró que el monoterpeno limoneno fue el mayoritario, representando entre el 76-97,5% de la emisión total de los volátiles cuantificados, seguido del β -mirceno (1,3-1,9%) y sabineno (0,2-1,7%), que se redujeron 12 y 60 veces del estadio VI al V, respectivamente. Entre los monoterpenos aldehído y cetona destacó el citronelal cuya emisión se inició en el estadio V y se incrementó durante la maduración hasta alcanzar valores de 0,18 ng/g PF en el estadio TC. El monoterpeno alcohol mayoritario fue el linalol que alcanzó 0,5 ng/g PF en el estadio VI y disminuyó considerablemente a lo largo de la maduración (**Tabla 7**).

En cuanto a los sesquiterpenos cíclicos destacaron el trans-cariofileno, cuya emisión fue máxima en el estadio VI (4,16 ng/g PF) seguido de α -copaeno, β -cubebeno y α -humuleno, respectivamente. El valenceno, fue el sesquiterpeno cíclico mayoritario con una abundancia total de 21,8 ng/g PF en el estadio TC, que fue incrementándose desde el estadio V donde se identificó por primera vez.

2.3 Emisión de CVs en frutos de la naranja Navelate

La mayor emisión total de CVs en la naranja Navelate se produjo en los frutos VI con valores de 2274 ng/g PF, que descendió drásticamente en los frutos VM hasta valores en torno a 200 ng/g PF en frutos V y TC (**Tabla 8**).

El monoterpeno limoneno fue el CV mayoritario en todo los estadios de maduración, pero su emisión de redujo alrededor de 20 veces en los frutos coloreados respecto al VI. Otros monoterpenos importantes fueron el β -mirceno y sabineno, que se redujeron 25 y 72 veces entre los estadios VI y TC, al igual que el α -pineno y ocimeno. Entre los monoterpenos aldehído y cetona destacó el neral, cuya emisión se identificó en el estadio TC, en valores cercanos a 0,04 ng/g PF. El monoterpeno alcohol mayoritario fue el linalol, que alcanzó una abundancia de 1,97 ng/g PF en el estadio VI, descendiendo su emisión de forma considerable durante la maduración hasta valores de 0,04 ng/g PF. El valenceno fue el sesquiterpeno mayoritario (63,3 ng/g PF) en el estadio TC. Además, destacaron otros sesquiterpenos cíclicos como el trans cariofileno (2,9-25,4 ng/g PF). Por último, es interesante destacar la emisión natural de ésteres alifáticos, principalmente hexil hexanoato, solamente en los frutos en el estadio de maduración más avanzado (TC) (**Tabla 8**).

3. Evolución del contenido de CVs en el flavedo durante la maduración del fruto de la mandarina Clemenules, el híbrido Ortanique y la naranja Navelate

El análisis del contenido de CVs en las glándulas de aceite del flavedo durante la maduración del fruto de la mandarina Clemenules, el híbrido Ortanique y la naranja Navelate permitió, por un lado, identificar 66, 60 y 66 CVs diferentes, respectivamente, y por otro, caracterizar las variaciones en el contenido de los distintos CVs a lo largo de la maduración, así como entre los frutos de las tres especies (**Tabla 5**). Además, este estudio ayudará a entender la relación entre el contenido y la emisión de los CVs y sus posibles mecanismos de regulación.

Los diferentes volátiles identificados se clasificaron en diferentes grupos atendiendo a su estructura química y, al igual que la emisión, destacaron los monoterpenos por su mayor abundancia y los sesquiterpenos por su mayor diversidad. Se observaron diferencias importantes en el contenido de CVs, expresado como la suma de todos los volátiles contenidos en las glándulas de aceite del flavedo en un determinado estadio de maduración, tanto a nivel cualitativo (**Tabla 5**), como cuantitativo (**Tablas 9, 10 y 11**), no sólo entre diferentes especies sino también entre diferentes estadios de una misma variedad.

Tabla 9. Evolución del contenido de los CVs mayoritarios en el flavedo de frutos de la mandarina *Clemenules* durante la maduración natural. Cada valor corresponde a la media \pm DE de al menos 2 réplicas. Los frutos se recolectaron en la campaña 2007/08. VI: Verde Inmaduro, VM: Verde Maduro, V: Virando, TC: Totalmente Coloreado. Tr: Trazas; N.D: no detectado.

$\mu\text{g/g}$ PF	VI	VM	V	TC
Monoterpenos hidrocarbonados				
α -Pinoeno	9,96 \pm 0,01	5,06 \pm 0,57	2,77 \pm 0,28	2,05 \pm 2,90
Sabineno	470,37 \pm 5,33	248,30 \pm 3,49	142,06 \pm 6,01	129,99 \pm 69,96
β -Miraceno	135,60 \pm 1,53	251,67 \pm 2,52	171,04 \pm 3,46	232,03 \pm 64,79
Limoneno	3803,25 \pm 125,94	6912,60 \pm 311,44	5595,97 \pm 453,22	9220,97 \pm 2601,22
Ocimeno	76,61 \pm 1,14	29,13 \pm 0,41	18,58 \pm 0,47	8,04 \pm 4,72
α -Terpinoleno	2,24 \pm 0,10	3,23 \pm 0,11	1,25 \pm 0,28	0,70 \pm 0,99
Monoterpenos alcoholes				
Linalol	81,44 \pm 2,94	52,24 \pm 0,16	36,94 \pm 0,70	54,45 \pm 16,43
L- α -Terpineol	19,85 \pm 1,04	18,20 \pm 0,09	10,98 \pm 0,04	11,96 \pm 2,66
Nerol	0,20 \pm 0,04	0,27 \pm 0,01	0,21 \pm 0,01	0,18 \pm 0,11
Geraniol	0,56 \pm 0,06	0,65 \pm 0,01	0,28 \pm 0,01	0,44 \pm 0,15
β -Citronelol	0,28 \pm 0,01	0,47 \pm 0,03	0,44 \pm 0,04	1,58 \pm 0,58
Monoterpenos aldehidos y cetonas				
Citronelal	1,41 \pm 0,06	2,44 \pm 0,19	1,65 \pm 0,17	5,88 \pm 0,77
Neral	0,67 \pm 0,02	0,86 \pm 0,02	0,51 \pm 0,01	0,76 \pm 0,16
Geranial	1,43 \pm 0,06	1,71 \pm 0,02	0,94 \pm 0,04	1,24 \pm 0,23
Monoterpenos ésteres				
Linalol acetato	0,41 \pm 0,03	0,59 \pm 0,05	0,45 \pm 0,01	0,88 \pm 0,14
α -Terpineol acetato	0,33 \pm 0,04	0,26 \pm 0,01	0,17 \pm 0,02	0,39 \pm 0,17
Nerol acetato	0,46 \pm 0,02	0,41 \pm 0,01	0,33 \pm 0,01	0,66 \pm 0,02
Sesquiterpenos cíclicos				
β -Cubebeno	0,07 \pm 0,01	0,06 \pm 0,01	N.D	N.D
δ -Elemeno	1,73 \pm 0,09	2,28 \pm 0,01	1,41 \pm 0,01	1,95 \pm 0,51
β -Elemeno	0,31 \pm 0,01	1,16 \pm 0,01	1,28 \pm 0,03	1,50 \pm 0,44
α -Copaeno	2,16 \pm 0,07	2,90 \pm 0,17	1,86 \pm 0,04	2,99 \pm 0,73
Trans cariofileno	2,98 \pm 0,13	2,12 \pm 0,02	1,18 \pm 0,02	0,44 \pm 0,21
Germacreno D	1,40 \pm 0,01	1,51 \pm 0,01	0,77 \pm 0,04	1,80 \pm 0,38
Biclogermacreno	1,81 \pm 0,10	2,95 \pm 0,04	7,57 \pm 0,76	4,17 \pm 1,46
α -Muroloeno	0,30 \pm 0,01	0,49 \pm 0,07	0,36 \pm 0,01	0,44 \pm 0,06
δ -Cadineno	N.D	N.D	N.D	4,56 \pm 1,51
Sesquiterpenos lineales				
β -Farneseno	115,26 \pm 4,52	73,18 \pm 0,70	91,57 \pm 5,31	47,84 \pm 20,03
α -Farneseno	149,69 \pm 4,69	120,78 \pm 0,73	64,66 \pm 1,25	N.D
Alcoholes y aldehidos alifáticos				
Octanal	9,98 \pm 0,61	41,79 \pm 0,47	33,86 \pm 1,09	53,01 \pm 8,58
Decanal	2,14 \pm 0,02	13,79 \pm 0,17	12,02 \pm 0,67	17,81 \pm 5,68
Dodecanal	0,38 \pm 0,02	2,55 \pm 0,03	2,05 \pm 0,18	3,68 \pm 0,99
3-cis-hexen-1-ol	0,18 \pm 0,03	0,33 \pm 0,09	0,14 \pm 0,01	N.D
1-Octanol	0,57 \pm 0,05	2,04 \pm 0,03	1,00 \pm 0,01	0,88 \pm 0,08
Contenido total CV	4894,02 \pm 148,75	7796,02 \pm 321,71	6204,32 \pm 474,24	9813,25 \pm 2806,65

Resultados

Tabla 10. Evolución del contenido de los CVs mayoritarios en el flavedo de frutos del híbrido Ortanique durante la maduración natural. Cada valor corresponde a la media \pm DE de al menos 2 réplicas. Los frutos se recolectaron en la campaña 2007/08. VI: Verde Inmaduro, VM: Verde Maduro, V: Virando, TC: Totalmente Coloreado. Tr: Trazas; N.D: no detectado.

$\mu\text{g/g}$ PF	VI	VM	V	TC
Monoterpenos hidrocarbonados				
α -Pinoeno	2,03 \pm 0,09	0,81 \pm 0,19	N.D	N.D
Sabineno	119,65 \pm 5,35	33,71 \pm 1,49	75,90 \pm 22,00	65,07 \pm 2,16
β -Miraceno	113,89 \pm 5,78	143,98 \pm 5,96	311,49 \pm 53,07	281,94 \pm 0,96
Limoneno	3123,95 \pm 219,18	3865,39 \pm 286,86	11826,66 \pm 2058,06	10385,74 \pm 47,60
Ocimeno	52,39 \pm 2,59	14,44 \pm 0,64	25,96 \pm 8,91	23,27 \pm 2,55
α -Terpinoleno	0,55 \pm 0,14	0,70 \pm 0,26	N.D	N.D
Monoterpenos alcoholes				
Linalol	15,28 \pm 1,08	8,35 \pm 0,20	14,85 \pm 2,86	12,04 \pm 0,15
Nerol	3,58 \pm 0,25	1,39 \pm 0,01	1,99 \pm 0,23	0,80 \pm 0,05
Geraniol	0,31 \pm 0,03	0,16 \pm 0,01	0,24 \pm 0,01	0,18 \pm 0,03
β -Citronelol	0,43 \pm 0,03	0,81 \pm 0,02	0,93 \pm 0,42	2,28 \pm 0,20
Monoterpenos aldehídos y cetonas				
Citronelal	0,81 \pm 0,08	2,72 \pm 0,07	3,87 \pm 0,67	9,20 \pm 0,34
Neral	2,06 \pm 0,14	2,07 \pm 0,05	3,86 \pm 0,76	0,29 \pm 0,03
Geranial	3,35 \pm 0,25	3,45 \pm 0,01	6,52 \pm 1,66	4,45 \pm 0,30
Monoterpenos ésteres				
Linalol acetato	0,05 \pm 0,01	0,08 \pm 0,01	N.D	N.D
Nerol acetato	Tr	0,09 \pm 0,02	0,25 \pm 0,11	0,21 \pm 0,06
Citronelol acetato	Tr	0,12 \pm 0,01	0,11 \pm 0,05	0,45 \pm 0,01
Sesquiterpenos cíclicos				
β -Cubebeno	Tr	Tr	N.D	N.D
δ -Elemeno	0,49 \pm 0,02	0,43 \pm 0,01	0,95 \pm 0,15	0,94 \pm 0,04
β -Elemeno	0,06 \pm 0,01	0,04 \pm 0,01	0,15 \pm 0,07	N.D
α -Copaene	0,72 \pm 0,02	0,66 \pm 0,02	1,31 \pm 0,14	1,62 \pm 0,01
Trans cariofileno	N.D	N.D	N.D	3,90 \pm 0,07
α -Humuleno	0,34 \pm 0,01	0,22 \pm 0,01	0,42 \pm 0,09	0,42 \pm 0,02
Germacreno D	0,72 \pm 0,13	0,54 \pm 0,01	1,83 \pm 0,19	1,33 \pm 0,05
Biclogermacreno	0,25 \pm 0,02	0,25 \pm 0,01	N.D	0,48 \pm 0,04
Valenceno	N.D	N.D	0,92 \pm 0,05	5,40 \pm 0,34
α -Muroloeno	2,88 \pm 0,19	2,26 \pm 0,04	3,08 \pm 0,10	3,85 \pm 0,02
δ -Guaiano	0,07 \pm 0,01	0,05 \pm 0,01	0,11 \pm 0,07	N.D
Sesquiterpenos lineales				
β -Farneseno	5,00 \pm 0,42	1,69 \pm 0,01	1,21 \pm 0,48	2,55 \pm 0,82
α -Farneseno	1,24 \pm 0,17	0,96 \pm 0,03	N.D	N.D
Alcoholes y aldehídos alifáticos				
Octanal	5,52 \pm 0,43	20,23 \pm 0,88	54,02 \pm 14,07	23,43 \pm 1,38
Decanal	1,00 \pm 0,07	3,47 \pm 0,08	7,94 \pm 2,04	6,33 \pm 0,29
Dodecanal	0,10 \pm 0,01	0,41 \pm 0,03	N.D	N.D
3-cis-hexen-1-ol	0,18 \pm 0,01	0,16 \pm 0,02	N.D	N.D
1-Octanol	0,40 \pm 0,04	0,51 \pm 0,01	0,82 \pm 0,17	0,57 \pm 0,24
Contenido total CV	3457,29 \pm 236,57	4110,15 \pm 297,04	12345,41 \pm 2166,42	10836,73 \pm 57,75

Tabla 11. Evolución del contenido de los CVs mayoritarios en el flavedo de frutos de la naranja Navelate durante la maduración natural. Cada valor corresponde a la media \pm DE de al menos 2 réplicas. Los frutos se recolectaron en la campaña 2009/10. VI: Verde Inmaduro, VM: Verde Maduro, V: Virando, TC: Totalmente Coloreado. Tr: Trazas; N.D: no detectado.

$\mu\text{g/g}$ PF	VI	VM	V	TC
Monoterpenos hidrocarbonados				
α -Pinoeno	8,68 \pm 0,57	2,78 \pm 0,06	3,54 \pm 0,11	3,34 \pm 0,08
Sabineno	452,66 \pm 5,54	158,44 \pm 24,61	181,41 \pm 5,14	115,09 \pm 0,67
β -Miraceno	241,40 \pm 1,84	285,23 \pm 43,25	323,93 \pm 10,38	264,90 \pm 0,33
Limoneno	7085,25 \pm 56,78	8532,02 \pm 1199,51	9429,76 \pm 374,64	8305,74 \pm 472,15
Ocimeno	75,98 \pm 49,16	18,33 \pm 1,47	21,62 \pm 0,34	14,75 \pm 0,56
α -Terpinoleno	2,31 \pm 0,01	18,37 \pm 2,95	22,61 \pm 13,80	19,14 \pm 0,81
Monoterpenos alcoholes				
Linalol	110,71 \pm 5,29	49,01 \pm 6,24	67,84 \pm 0,47	49,40 \pm 1,22
L- α -Terpineol	25,63 \pm 1,22	21,10 \pm 2,95	22,00 \pm 0,16	16,46 \pm 0,47
Nerol	1,11 \pm 0,06	1,01 \pm 0,11	1,25 \pm 0,07	0,42 \pm 0,01
Geraniol	1,07 \pm 0,09	0,78 \pm 0,08	1,03 \pm 0,06	0,38 \pm 0,01
β -Citronelol	0,78 \pm 0,05	0,47 \pm 0,03	0,61 \pm 0,05	0,40 \pm 0,01
Monoterpenos aldehídos y cetonas				
Citronelal	1,15 \pm 0,11	1,45 \pm 0,21	1,60 \pm 0,08	1,98 \pm 0,01
Neral	6,81 \pm 0,23	6,60 \pm 0,85	7,38 \pm 0,19	5,17 \pm 0,16
Geranial	11,12 \pm 0,46	10,85 \pm 1,46	12,03 \pm 0,58	8,84 \pm 0,23
Monoterpenos ésteres				
Nerol acetato	0,46 \pm 0,01	0,96 \pm 0,19	1,27 \pm 0,05	1,06 \pm 0,04
Citronelol acetato	N.D	N.D	0,10 \pm 0,01	0,05 \pm 0,01
Sesquiterpenos cíclicos				
β -Cubebeno	1,78 \pm 0,07	1,74 \pm 0,26	2,61 \pm 0,06	1,74 \pm 0,16
δ -Elemeno	2,33 \pm 0,14	1,16 \pm 0,21	1,59 \pm 0,02	N.D
β -Elemeno	N.D	N.D	0,13 \pm 0,01	0,40 \pm 0,03
α -Copaene	2,15 \pm 0,10	2,05 \pm 0,37	3,11 \pm 0,05	2,16 \pm 0,14
α -Selineno	N.D	N.D	N.D	0,40 \pm 0,02
Trans cariofileno	3,03 \pm 0,57	1,14 \pm 0,16	2,85 \pm 0,50	6,04 \pm 0,27
α -Humuleno	0,74 \pm 0,08	0,40 \pm 0,11	0,72 \pm 0,02	0,34 \pm 0,01
Germacreno D	1,74 \pm 0,11	1,61 \pm 0,31	2,54 \pm 0,13	1,57 \pm 0,09
Biciclogermacreno	0,49 \pm 0,08	0,37 \pm 0,11	0,68 \pm 0,12	0,47 \pm 0,01
Valenceno	N.D	N.D	N.D	8,13 \pm 0,53
α -Muroloeno	0,22 \pm 0,02	0,26 \pm 0,07	0,47 \pm 0,01	0,39 \pm 0,01
δ -Cadineno	8,46 \pm 0,28	3,99 \pm 0,69	5,90 \pm 0,20	4,20 \pm 0,26
Sesquiterpenos lineales				
β -farneseno	0,99 \pm 0,07	0,42 \pm 0,05	0,76 \pm 0,03	0,43 \pm 0,03
α -Farneseno	1,74 \pm 0,09	N.D	N.D	N.D
Alcoholes y aldehídos alifáticos				
Octanal	32,65 \pm 0,79	53,60 \pm 7,04	67,32 \pm 2,35	85,41 \pm 1,45
Decanal	7,34 \pm 4,75	12,96 \pm 1,87	16,85 \pm 0,34	23,62 \pm 0,78
Dodecanal	0,74 \pm 0,01	1,62 \pm 0,34	2,28 \pm 0,06	N.D
1-Octanol	1,87 \pm 0,20	1,36 \pm 0,18	1,87 \pm 0,03	1,75 \pm 0,12
Contenido total CV	8090,95 \pm 128,77	9189,10 \pm 1295,57	10206,37 \pm 410,01	8943,11 \pm 480,64

Los monoterpenos hidrocarbonados presentaron varias tendencias generales en todas las especies estudiadas. El limoneno fue con diferencia el componente mayoritario y su contenido aumentó progresivamente durante la maduración. El contenido en sabineno fue máximo en el estadio VI y disminuyó progresivamente hasta niveles mínimos en los frutos TC, mientras que

el β -mirreno, por ejemplo, alcanzó su máximo en estadios intermedios de maduración. En Ortanique destacó la presencia de monoterpenos hidrocarbonados específicos de tejido verde como el α -pineno y α -terpinoleno (**Tabla 10**), que en el resto de variedades se identificaron en todos los estadios estudiados.

Entre los monoterpenos de tipo aldehído y cetona destacaron el citronelal, con máximo contenido en frutos coloreados y el geranial cuyo contenido fue mayor en los estadios VM en Clemenules y V en Ortanique y Navelate. Los de tipo éster, como el nerol acetato presentaron su máximo contenido en el estadio TC en Clemenules y Ortanique y V en Navelate. Por último, entre los monoterpenos alcoholes, destacó el contenido de linalol, que experimentó una disminución progresiva en Clemenules y Navelate, mientras que en Ortanique se mantuvo con menores diferencias (**Tabla 9, 10 y 11**).

Entre los sesquiterpenos, al igual que en la emisión, se observaron diferentes tendencias entre especies para una misma familia de CVs. Así en Clemenules, el contenido de α -muroloeno y α -copaeno no varió de forma importante, mientras que el trans cariofileno disminuyó, y el germacreno D se incrementó. En Ortanique el β -elemeno, α -copaeno y germacreno D no mostraron variaciones importantes a lo largo de la maduración del fruto y el valenceno alcanzó un contenido máximo de 5,4 $\mu\text{g/g}$ PF en el estadio TC. Por último, en Navelate, destacaron el β -cubebeno, germacreno D y α -copaeno por su abundancia, que fue máxima en el estadio V y el trans cariofileno, valenceno y α -selineno que alcanzaron su máxima abundancia en el estadio TC; concretamente en este estadio el valenceno fue el sesquiterpeno mayoritario, alcanzando valores de 8,1 $\mu\text{g/g}$ PF. Cabe destacar que el valenceno no se identificó en los extractos del flavedo de frutos de la mandarina Clemenules. En todas las variedades destacó como sesquiterpeno lineal el α -farneseno.

Por último, en el grupo de alcoholes y aldehídos alifáticos destacaron por su abundancia el octanol y decanal que, en general, se incrementaron durante la maduración. El dodecanal se incrementó con la maduración en Clemenules mientras que en el resto de variedades fue máximo en estadios intermedios (**Tabla 9, 10 y 11**).

3.1 Contenido de CVs en frutos de la mandarina Clemenules

El limoneno fue el volátil mayoritario en el flavedo de los frutos de Clemenules en todos los estados de maduración seleccionados, con valores comprendidos entre 3803 y 9220 $\mu\text{g/g}$ PF (84 y 95% del contenido total de CVs). Dentro de los monoterpenos hidrocarbonados destacaron el β -mirreno y sabineno, con concentraciones entre 470 y 130 $\mu\text{g/g}$ PF seguidos de ocimeno, pineno y α -terpinoleno (entre 0,7 y 76 $\mu\text{g/g}$ PF). Entre los monoterpenos aldehídos y cetonas destacaron geranial, neral y citronelal con abundancias 3 y 4 órdenes de magnitud menores que las estimadas para el limoneno. El linalol, con una abundancia de 81,44 $\mu\text{g/g}$ PF en

el estadio VI, continuó siendo el monoterpeno alcohol más abundante, seguido del L- α -terpineol y β -citronelol. Los monoterpenos ésteres como nerol acetato y linalol acetato mantuvieron concentraciones entre 0,3 y 0,9 $\mu\text{g/g}$ PF a lo largo del proceso de maduración del fruto. En cuanto a los sesquiterpenos, los lineales fueron los más abundantes (β y α -farneseno) alcanzándose las concentraciones máximas en frutos VI (en torno a 100 $\mu\text{g/g}$ PF) y disminuyendo a lo largo de la maduración. Los sesquiterpenos cíclicos fueron mucho menos abundantes, destacando α -copaeno, trans cariofileno, biciclogermacreno y δ -cadineno, y la ausencia de valenceno en los diferentes estadios de maduración (**Tabla 9**).

3.2 Contenido de CVs en frutos del híbrido Ortanique

El volátil mayoritario fue el limoneno (con concentraciones entre 3123 y 10385 $\mu\text{g/g}$ PF) que representó entre un 92 y 97% del porcentaje total de CVs identificados. Entre los monoterpenos hidrocarbonados le siguieron el β -mirceno y sabineno (con concentraciones entre 33,71 y 311,49 $\mu\text{g/g}$ PF), con porcentajes cercanos al 2%. En cuanto a los de tipo aldehído y cetona destacaron el geranial, neral y el citronelal y en cuanto a los de tipo alcohol el linalol resultó ser de nuevo el CV mayoritario (con concentraciones entre 8,35 y 15,28 $\mu\text{g/g}$ PF) seguido del nerol, β -citronelol y geraniol. Entre los monoterpenos ésteres destacó el linalol propionato y citronelol acetato. Entre los sesquiterpenos destacaron los de tipo cíclico por su diversidad. El sesquiterpeno cíclico que alcanzó una mayor concentración fue el valenceno que únicamente se identificó en el estadio TC con una abundancia de 5,4 $\mu\text{g/g}$ PF. Otros sesquiterpenos relativamente abundantes fueron el α -muroleno y el trans cariofileno, con abundancias máximas cercanas a 4 $\mu\text{g/g}$ PF en frutos TC (**Tabla 10**).

3.3 Contenido de CVs en frutos de la naranja Navelate

En este caso, el limoneno fue de nuevo el volátil mayoritario, representando entre un 89 y 94% del porcentaje total de los CVs identificados con concentraciones entre 7085 y 9429 $\mu\text{g/g}$ PF). Entre los monoterpenos hidrocarbonados, le siguieron el β -mirceno y sabineno con concentraciones máximas de 323,93 y 452,66 $\mu\text{g/g}$ PF, respectivamente. En cuanto a los de tipo aldehído y cetona destacaron por su abundancia el geranial y el neral. Entre los monoterpenos de tipo alcohol, destacó de nuevo el linalol por ser el CV mayoritario dentro de esta familia, seguido del L- α -terpineol. Entre los monoterpenos ésteres destacó el nerol acetato. Por último, en el grupo de los sesquiterpenos destacaron el valenceno y el δ -cadineno por ser los sesquiterpenos que alcanzaron una mayor concentración (en torno a 8 $\mu\text{g/g}$ PF). Sin embargo el valenceno se identificó únicamente en el estadio TC, mientras que el δ -cadineno presentó los mayores niveles en los frutos VI aunque fue también un sesquiterpeno mayoritario en el resto de estadios analizados. Otros sesquiterpenos relativamente abundantes fueron el β -cubebeno, α -

copaeno, trans cariofileno y germacreno D, con abundancias medias de alrededor de 1-6 $\mu\text{g/g}$ PF (**Tabla 11**).

4. Evolución de la composición de CVs en la pulpa durante la maduración del fruto de la mandarina Clemenules, el híbrido de mandarina Ortanique y la naranja Navelate

En la pulpa de los frutos de Clemenules, Ortanique y Navelate a lo largo de la maduración se identificaron 67, 69 y 65 CVs diferentes, respectivamente (**Tabla 5**). Esta identificación permitió comprobar que este tejido es más rico en aldehídos y alcoholes que el resto de tejidos estudiados para el mismo estadio de maduración.

La evolución de la composición de los CVs representativos en la pulpa durante la maduración se detalla en las **Tablas 12, 13 y 14**. De las tres especies estudiadas, la pulpa de Ortanique fue la más rica en CVs (área total de CVs identificados), seguida de Clemenules y Navelate (**Tablas 12, 13 y 14**). Es interesante destacar que en las tres especies el estadio V fue el que presentó el menor contenido en CVs y el estadio VM fue el de mayor contenido.

Tabla 12. Cambios en la composición de los CVs mayoritarios en la pulpa de frutos de la mandarina Clemenules durante la maduración natural. Cada valor corresponde a la media \pm DE de al menos 2 réplicas. Los frutos se recolectaron en la campaña 2007/08. VM: Verde Maduro, V: Virando, TC: Totalmente Coloreado. Tr: Trazas; N.D: no detectado.

% Area	VM	V	TC
Monoterpenos hidrocarbonados			
α -Pino	0,34 \pm 0,06	0,48 \pm 0,02	0,19 \pm 0,05
Sabineno	0,93 \pm 0,06	1,79 \pm 0,02	1,34 \pm 0,07
β -Mirceno	1,34 \pm 0,15	1,29 \pm 0,02	1,42 \pm 0,08
Limoneno	94,97 \pm 9,11	93,41 \pm 8,07	94,29 \pm 3,28
Ocimeno	0,09 \pm 0,01	0,04 \pm 0,01	N.D
Monoterpenos alcoholes			
Linalol	0,71 \pm 0,02	1,37 \pm 0,04	1,37 \pm 0,16
L- α -Terpineol	0,08 \pm 0,01	0,08 \pm 0,01	0,13 \pm 0,02
Nerol	Tr	0,12 \pm 0,01	0,16 \pm 0,01
Monoterpenos aldehídos y cetonas			
Citronelal	N.D	N.D	0,07 \pm 0,01
Neral	0,05 \pm 0,01	Tr	Tr
Geranial	0,08 \pm 0,01	Tr	0,05 \pm 0,01
Geranil acetona	Tr	Tr	0,10 \pm 0,01
Monoterpenos ésteres			
α -Terpenol acetato	Tr	Tr	0,04 \pm 0,01
Sesquiterpenos cíclicos			
Valenceno	N.D	0,04 \pm 0,01	0,11 \pm 0,02
α -Murolo	0,08 \pm 0,01	N.D	N.D
Sesquiterpenos alcoholes y aldehídos			
α -Sinensal	0,04 \pm 0,01	0,04 \pm 0,01	0,08 \pm 0,01
Aldehídos y alcoholes alifáticos			
Decanal	0,55 \pm 0,03	0,28 \pm 0,02	0,40 \pm 0,02
Dodecanal	0,16 \pm 0,01	Tr	N.D
3-cis-hexen-1-ol	0,05 \pm 0,01	Tr	Tr
1-Octanol	0,08 \pm 0,01	0,54 \pm 0,01	Tr
Ésteres alifáticos			
1-Octil acetato	0,10 \pm 0,01	Tr	N.D
Decil acetato	0,10 \pm 0,01	0,04 \pm 0,01	Tr
Otros			
6-metil-5-hepten-2-ol	N.D	0,11 \pm 0,02	Tr
Total CV (Area/g PF)	2,35E+10	6,00E+09	8,09E+09

Tabla 13. Cambios en la composición de los CVs mayoritarios en la pulpa de frutos del híbrido Ortanique durante la maduración natural. Cada valor corresponde a la media \pm DE de al menos 2 réplicas. Los frutos se recolectaron en la campaña 2007/08. VM: Verde Maduro, V: Virando, TC: Totalmente Coloreado. Tr: Trazas; N.D: no detectado.

% Area	VM	V	TC
Monoterpenos hidrocarbonados			
α -Pinoeno	0,19 \pm 0,03	0,19 \pm 0,02	0,21 \pm 0,01
Sabineno	0,69 \pm 0,03	0,72 \pm 0,03	0,62 \pm 0,12
β -Mirceno	1,72 \pm 0,01	1,43 \pm 0,12	1,14 \pm 0,12
Limoneno	95,78 \pm 3,82	96,34 \pm 7,23	96,78 \pm 26,78
Ocimeno	0,10 \pm 0,01	0,04 \pm 0,01	0,04 \pm 0,01
Monoterpenos alcoholes			
Linalol	0,18 \pm 0,01	0,29 \pm 0,04	0,16 \pm 0,01
Nerol	0,04 \pm 0,01	0,05 \pm 0,01	Tr
Monoterpenos aldehídos y cetonas			
Neral	Tr	0,08 \pm 0,01	Tr
Geranial	0,04 \pm 0,01	0,16 \pm 0,01	0,09 \pm 0,01
Monoterpenos ésteres			
Linalol acetato	Tr	0,10 \pm 0,02	Tr
Sesquiterpenos cíclicos			
δ -Elemeno	0,23 \pm 0,02	Tr	0,10 \pm 0,01
β -Elemeno	0,07 \pm 0,01	Tr	0,05 \pm 0,01
Germacreno D	0,32 \pm 0,04	Tr	0,13 \pm 0,01
Valenceno	Tr	0,08 \pm 0,01	0,13 \pm 0,01
δ -Cadineno	0,05 \pm 0,01	N.D	0,05 \pm 0,01
Alcoholes y aldehídos alifáticos			
Octanal	N.D	0,04 \pm 0,01	0,05 \pm 0,03
Decanal	Tr	0,15 \pm 0,03	0,07 \pm 0,01
1-Octanol	0,15 \pm 0,01	0,06 \pm 0,01	0,07 \pm 0,01
Ésteres alifáticos			
Octil acetato	0,07 \pm 0,01	N.D	Tr
Octil butirato	N.D	0,04 \pm 0,01	N.D
Total CV (Area/g PF)	3,10E+10	8,63E+09	2,86E+10

Tabla 14. Cambios en la composición de los CVs mayoritarios en la pulpa de frutos de la naranja Navelate durante la maduración natural. Cada valor corresponde a la media \pm DE de al menos 2 réplicas. Los frutos se recolectaron en la campaña 2009/10. Tr: Trazas; N.D: no detectado. VM: Verde Maduro, V: Virando, TC: Totalmente Coloreado.

% Area	VM	V	TC
Monoterpenos hidrocarbonados			
α -Pinenos	0,79 \pm 0,18	0,70 \pm 0,34	0,53 \pm 0,06
Sabineno	0,62 \pm 0,17	0,49 \pm 0,04	0,46 \pm 0,07
β -Mirceno	2,00 \pm 1,12	1,69 \pm 0,20	1,53 \pm 0,11
Limoneno	93,53 \pm 23,42	94,68 \pm 22,33	94,47 \pm 9,52
Ocimeno	0,04 \pm 0,03	Tr	Tr
α -Terpinoleno	0,04 \pm 0,01	Tr	Tr
Monoterpenos alcoholes			
Linalol	1,40 \pm 0,24	0,25 \pm 0,05	0,41 \pm 0,07
L- α -Terpineol	0,07 \pm 0,01	Tr	0,08 \pm 0,01
Nerol	0,04 \pm 0,01	Tr	Tr
Monoterpenos aldehídos y cetonas			
Neral	Tr	Tr	0,04 \pm 0,01
Geranial	0,05 \pm 0,01	0,06 \pm 0,01	0,11 \pm 0,01
Monoterpenos ésteres			
Geraniol formato	N.D	0,10 \pm 0,03	0,17 \pm 0,05
Nerol acetato	Tr	0,04 \pm 0,01	Tr
Sesquiterpenos cíclicos			
β -Cubebeno	0,13 \pm 0,06	0,18 \pm 0,03	0,10 \pm 0,01
β -Elemeno	Tr	0,05 \pm 0,01	0,04 \pm 0,01
α -Copaeno	0,16 \pm 0,07	0,19 \pm 0,03	0,11 \pm 0,02
Trans cariofileno	Tr	Tr	0,05 \pm 0,01
Germacreno D	0,07 \pm 0,02	0,09 \pm 0,01	0,05 \pm 0,01
Biciclogermacreno	Tr	0,07 \pm 0,01	0,05 \pm 0,01
Valenceno	N.D	0,15 \pm 0,02	0,59 \pm 0,03
α -Selineno	Tr	Tr	0,04 \pm 0,01
δ -Cadineno	0,14 \pm 0,04	0,20 \pm 0,03	0,14 \pm 0,01
Alcoholes y aldehídos alifáticos			
Octanal	0,10 \pm 0,04	0,32 \pm 0,36	0,29 \pm 0,34
Decanal	0,12 \pm 0,02	0,08 \pm 0,01	0,08 \pm 0,01
3-cis-hexen-1-ol	0,04 \pm 0,01	Tr	Tr
1-Octanol	0,18 \pm 0,04	0,11 \pm 0,01	0,17 \pm 0,04
Ésteres alifáticos			
Etil caprilato	N.D	N.D	0,04 \pm 0,02
Octil acetato	0,16 \pm 0,03	0,18 \pm 0,03	0,04 \pm 0,01
Etil caproato	N.D	N.D	0,08 \pm 0,01
Decil acetato	Tr	0,08 \pm 0,02	0,08 \pm 0,01
Total CV (Area/g PF)	1,05E+10	5,88E+09	7,06E+09

En cuanto a la composición de CVs, los monoterpenos hidrocarbonados representaron el grupo más abundante, destacando el limoneno como CV mayoritario, con valores comprendidos entre 93 y 97% del total, que se mantuvo relativamente constante en los tres estadios de maduración estudiados. En este grupo también destacaron el β -mirceno, sabineno y α -pineno,

cuyos porcentajes sobre el total de CVs se mantuvieron o bajaron ligeramente a lo largo de la maduración. Entre los monoterpenos alcohol, se identificó el linalol como CV mayoritario. El grupo de monoterpenos aldehídos y cetonas fue muy minoritario, y es interesante que en este tejido se identificó un mayor número de ésteres de monoterpenos aunque la mayoría de ellos en niveles traza.

El grupo de los sesquiterpenos (cíclicos, lineales y sus derivados oxigenados) representó un porcentaje muy bajo del total de CVs en las tres especies. En la pulpa del híbrido Ortanique y la naranja Navelate, en comparación con la mandarina Clemenules, se identificó un mayor número de sesquiterpenos y su proporción sobre el total de CVs también fue más elevada. Es interesante destacar que en la pulpa de frutos TC de las 3 especies el sesquiterpeno más abundante fue el valenceno.

Por último, es de destacar el mayor número de aldehídos, alcoholes y ésteres alifáticos identificados en las muestras de pulpa, en especial en la de naranja Navelate. Aunque la evolución de estos CVs fue variable, en Clemenules y Ortanique casi todos los CVs de este grupo disminuyeron con la maduración del fruto pero en Navelate el octanal y los ésteres etil hexanoato y octanoato aumentaron.

4.1 Composición de CVs en la pulpa de frutos de la mandarina Clemenules

El limoneno fue de nuevo el CV mayoritario, tal y como se muestra en la **Tabla 12**, con valores comprendidos entre 93 y 94%. En el grupo de monoterpenos hidrocarbonados le siguieron el β -mirceno (1,29-1,42%) y el sabineno (0,93-1,79). Entre los de tipo aldehído y cetona destacaron la geranil acetona (0,1%), citronelal (0,07%), geranial (0,08%) y neral (0,05%). Entre los monoterpenos alcoholes el linalol fue el mayoritario con un porcentaje de 1,37% sobre el total de CVs en el estadio V y TC. Entre los de tipo éster destacó el β -terpenol acetato.

El grupo de los sesquiterpenos fue muy minoritario, siendo los más abundantes el valenceno (0,11%) y α -muroleno (0,08). Entre los de tipo alcohol y aldehído destacó el α -sinensal. Por último, entre los aldehídos y alcoholes y ésteres alifáticos, un grupo relativamente bien representado, destacaron decanal, dodecanal y 1-octanol.

4.2 Composición de CVs en la pulpa de frutos del híbrido Ortanique

En la **Tabla 13** se observa que el limoneno fue nuevamente el monoterpeno hidrocarbonado mayoritario, con un porcentaje sobre el total de CVs que osciló entre el 95-97%. Al limoneno, le siguió el β -mirceno (1,1-1,7%) y el sabineno (0,6-0,7%) con abundancias muy inferiores. Además, entre los monoterpenos de tipo aldehído, cetona y ésteres que, en general, presentaron abundancias máximas en frutos V, destacaron el geranial (0,16%) y neral (0,08%) y

linalol acetato (0,10%). Entre los de tipo alcohol, el linalol fue el mayoritario con un porcentaje que osciló entre 0,2% a 0,3% durante todo el proceso de maduración.

En el grupo de sesquiterpenos de tipo cíclico destacaron por su abundancia el germacreno D, que osciló entre 0,1 y 0,3% en los estadios TC y VM, respectivamente, seguido de δ -elemeno y valenceno. Por último, destacaron aldehídos y alcoholes alifáticos como 1-octanol, decanal y octanol, y los ésteres alifáticos 1-octil acetato y butirato.

4.3 Composición de CVs en la pulpa de frutos de la naranja Navelate

En la **Tabla 14**, se observa que el limoneno fue nuevamente el CV mayoritario con un área que osciló entre el 93 y 95%. Otros monoterpenos importantes fueron el β -mirceno, el α -pineno y sabineno cuyo porcentaje se redujo de forma moderada a lo largo de la maduración. Entre los monoterpenos de tipo aldehído y cetona que, en general, presentaron una abundancia máxima en los frutos TC, destacó principalmente el geranial (0,11%). En cuanto a los de tipo alcohol, el linalol fue el mayoritario con una abundancia de 1,4% en el estadio VM, reduciéndose a 0,2 y 0,4%, en estadios posteriores. Entre los ésteres de monoterpenos destacaron por su abundancia el geraniol formato. Los sesquiterpenos cíclicos de mayor abundancia fueron el δ -cadineno, α -copaeno y β -cubebeno. El valenceno fue el sesquiterpeno más abundante en la pulpa de frutos TC, alcanzando un porcentaje de 0,59%. Por último, el 1-octanol, decanal y sobre todo el octanal fueron los más abundantes dentro del grupo de los aldehídos y alcoholes alifáticos. Es interesante destacar la presencia de 4 ésteres alifáticos en la pulpa de frutos TC.

5. Análisis de la expresión de genes de la biosíntesis de CVs en el flavedo y la pulpa durante la maduración del fruto de la mandarina Clemenules, el híbrido Ortanique y la naranja Navelate

Mediante RT-qPCR se analizó, en el flavedo y la pulpa de Clemenules, Ortanique y Navelate la expresión de 7 genes de terpeno sintasas a lo largo de la maduración del fruto. Cinco de ellas están implicadas en la biosíntesis de monoterpenos: β -pineno sintasa (β -PIN; CitMTS62), limoneno sintasa 1 (*LIM 1*; CitMTSE2), limoneno sintasa 2 (*LIM 2*; CitMTSE1), ocimeno sintasa (*OCI*; CitMTSL4) y linalol sintasa (*LIN*; Cv885911), y las otras dos en la biosíntesis de sesquiterpenos: valenceno sintasa (*VAL*; Cstps 1) y una sesquiterpeno sintasa multiproducto (α -copaeno, δ -cadineno, germancenoD y β -cubebeno) (*TPS3*; CsTPS3) (Carrera et al., 2007 y comunicación personal).

En todas las especies se observó que la expresión de las monoterpenos sintasas estudiadas (β -PIN, *LIM 1*, *LIM 2*, *OCI* y *LIN*) y la sesquiterpeno *TPS3* fue mayor en el flavedo de los frutos en estadios verdes (VI y VM), mientras que en los frutos V y TC mostraron valores más bajos

(**Figura 11**). La expresión de las terpeno sintasas *LIN*, *β -PIN* y *TPS3* disminuyó claramente con la maduración del fruto, mientras que *OCI* y *LIM 1* y *2* mostraron un patrón de expresión más variable dependiendo de la especie estudiada, pero en general, con tendencia a disminuir durante el desarrollo y maduración del fruto (**Figura 11**). La *VAL* presentó un patrón de expresión totalmente opuesto al resto de genes, ya que no se detectó acumulación de transcritos en el flavedo de frutos verdes y la máxima expresión se observó en frutos TC (**Figura 11**). Es interesante destacar que para todos los genes estudiados, excepto *TPS3*, los niveles de expresión más altos se detectaron en el híbrido Ortanique.

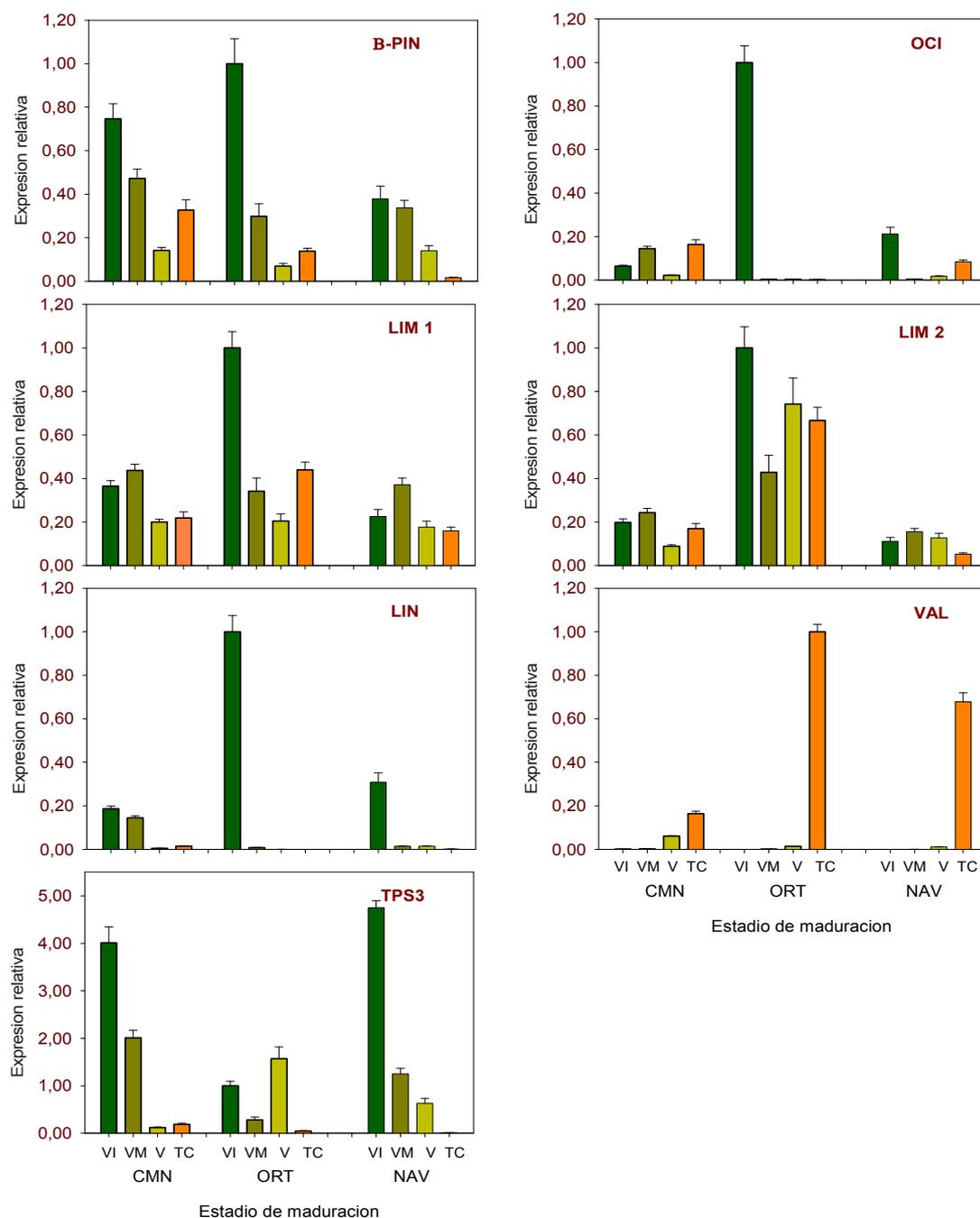


Figura 11. Expresión relativa de 7 genes de terpeno sintas: β -pineno sintasa (β -PIN), limoneno sintasa 1 y 2 (*LIM 1* y *LIM 2*), ocimeno sintasa (*OCI*), linalol sintasa (*LIN*), valenceno sintasa (*VAL*) y sesquiterpeno sintasa multiproducto (*TPS3*) en el flavedo de frutos de Clemenules, Ortanique y Navelate durante la maduración natural. Los valores obtenidos para cada gen, están normalizados frente al nivel de expresión del flavedo de frutos de Ortanique en el estadio VI, al que se le asignó un valor relativo de 1, excepto para el gen *VAL* que se normalizó frente al flavedo de Ortanique en el estadio TC. CMN, Clemenules; ORT, Ortanique y NAV, Navelate

En la pulpa de los frutos los niveles de expresión relativa de los genes estudiados fueron considerablemente menores que en el flavedo: *VAL* fue aproximadamente entre 5 y 10 veces menor, *LIM 1* y *LIM 2* 20 veces, y β -PIN, *OCI* y *TPS3* entre 300 y 1000 veces (**Figura 12**). Los

patrones de expresión también fueron variables en función del gen analizado y la especie estudiada. En las tres especies la expresión de *VAL* se incrementó durante la maduración del fruto y la de *β-PIN* se redujo, siguiendo de este modo la misma tendencia descrita para estos genes en el flavedo. La expresión de *LIM 2*, en general, disminuyó a lo largo de la maduración, mientras que apenas se detectó expresión de *TPS3* en todas las muestras analizadas excepto en el estadio VM de Navelate. El perfil de expresión de *LIM 1* y *OCI* fue variable dependiendo de la especie estudiada: mientras que en Clemenules su expresión disminuyó durante la maduración, en Ortanique se mantuvo relativamente estable y en Navelate aumentó. Conviene destacar que no se detectaron transcritos de *LIN* en ninguna de las muestras de la pulpa analizadas.

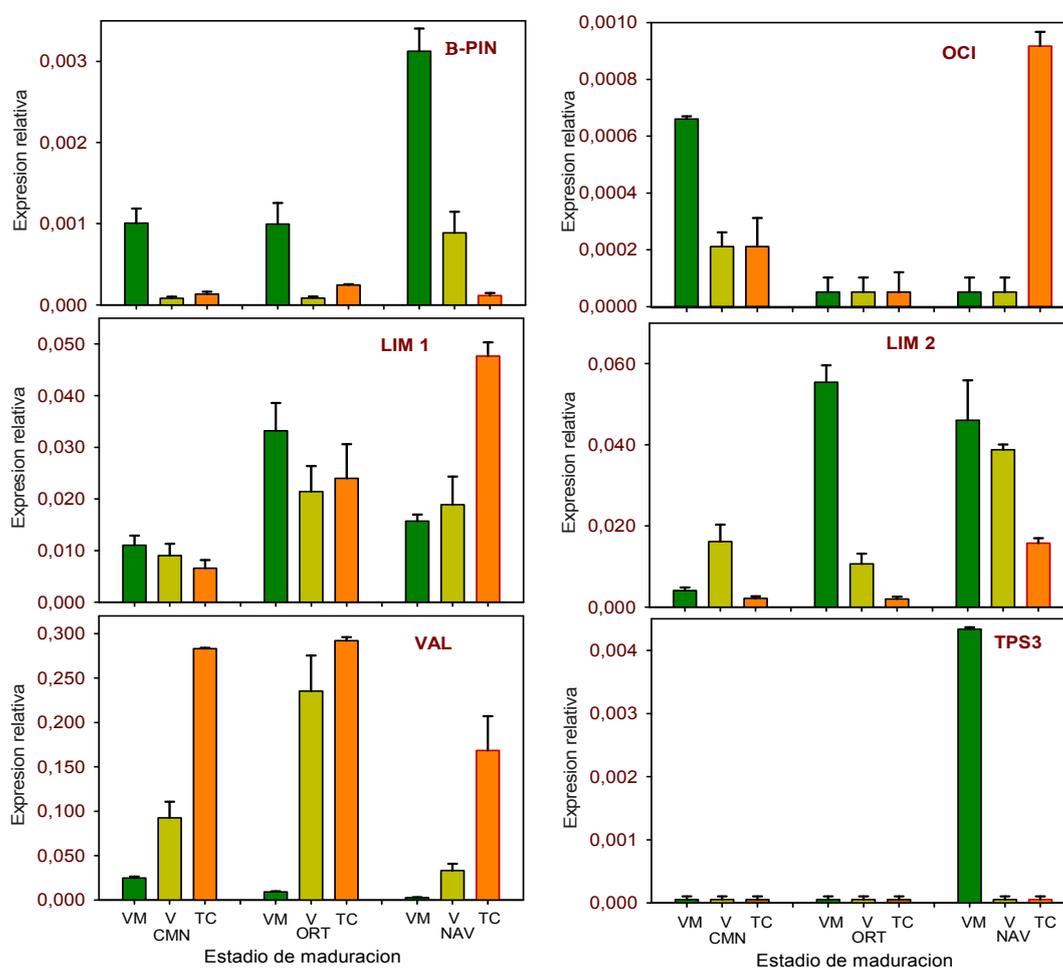


Figura 12. Expresión relativa de 6 genes de terpeno sintasas: β -pineno sintasa (*β-PIN*), limoneno sintasa 1 y 2 (*LIM 1* y *LIM 2*), ocimeno sintasa (*OCI*), valenceno sintasa (*VAL*) y sesquiterpeno sintasa multiproducto (*TPS3*) en la pulpa de frutos de Clemenules, Ortanique y Navelate durante la maduración natural. Los valores obtenidos para cada gen, están normalizados frente al nivel de expresión del flavedo de frutos de Ortanique en el estadio VI, al que se le asignó un valor relativo de 1, excepto para el gen *VAL* que se normalizó frente al flavedo de Ortanique en el estadio TC. CMN, Clemenules; ORT, Ortanique y NAV, Navelate.

El primer objetivo planteado en este capítulo de Tesis Doctoral ha sido realizar un estudio comparativo del perfil de emisión de CVs en frutos intactos, así como del contenido en el flavedo y en la pulpa de frutos de tres variedades de cítricos, la mandarina Clemenules, el híbrido Ortanique y la naranja Navelate a lo largo de la maduración, y su correlación con la expresión de varios genes que codifican para terpeno sintasas (**Tabla 4 a 14, Figura 10, 11 y 12**). La mandarina Clemenules y la naranja Navelate se han seleccionado por ser variedades de excelente calidad organoléptica y de una elevada producción en la citricultura española, mientras que el híbrido Ortanique, es el resultado de un cruce entre una naranja y una mandarina (*Citrus sinensis* x *Citrus reticulata*) (Saunt, 2000, DeOliveira y Radmann, 2005), y sus frutos son reconocidos por ser especialmente aromáticos, más que otras variedades similares en idénticas condiciones de cultivo (Cohen et al., 1990; Beltrán et al., 2007).

El aroma característico de los frutos cítricos varía considerablemente entre las diferentes variedades y está determinado principalmente por las proporciones específicas de cada uno de los numerosos compuestos que se encuentran en las glándulas de aceites esenciales o las vesículas de zumo de la pulpa (Merle et al., 2004) que, además, pueden cambiar cuantitativa y cualitativamente a lo largo de la maduración del fruto (Bourgou et al., 2012). Así, por ejemplo, un estudio reciente en el que se comparó el perfil aromático del zumo de cuatro especies diferentes de cítricos mediante la técnica de HS-SPME-GC-MS, reveló que las principales diferencias en el perfil de CVs eran de tipo cuantitativo y que solo unos pocos CVs son específicos de cada especie. En la variedad de naranja Navel se detectó una gran cantidad de ésteres alifáticos y monoterpenos, mientras que la mandarina Clemenules es rica en cetonas y β -ionona (González-Mas et al., 2011).

Los resultados de este trabajo muestran diferencias importantes tanto cualitativas como cuantitativas en los perfiles de los CVs entre los frutos de las diferentes variedades seleccionadas, que además fluctuaron en los cuatro estadios de maduración analizados. Es significativo señalar que, las principales diferencias cualitativas en el perfil de CVs entre las variedades se observaron en la emisión, ya que se identificaron 38, 48 y 62 CV diferentes en los frutos de Clemenules, Ortanique y Navelate, respectivamente. Sin embargo, en el contenido de las glándulas del flavedo el número de CV fue de 66 para la naranja y mandarina y 60 para los del híbrido y en la pulpa 67, 65 y 68 CV, respectivamente (**Tabla 5**). Estos resultados indican que no parecen existir diferencias relevantes en la diversidad de CVs que contienen las glándulas de aceite de las tres variedades, sino en la concentración como se discute más adelante, pero en la emisión es donde se manifiestan las principales diferencias para cada una de ellas y parece existir un mecanismo por el que los diferentes CVs se emiten de forma selectiva

en las distintas variedades y en diferentes proporciones. El análisis más detallado de la emisión de los diferentes CVs en frutos de cada una de las tres especies estudiadas revela que, existen 30 CVs que se emiten en las tres variedades, y en la intersección entre dos variedades son muchos más los que comparten entre el híbrido y la naranja (13) que con la mandarina (2) y solamente uno específico de la naranja y mandarina (**Tabla 15 y Figura 13**). Entre los compuestos que se detectaron específicamente en los frutos de una variedad destacó los de naranja con 18, frente a 5 en la mandarina Clemenules y 3 en Ortanique. Entre los específicos de naranja los más significativos son los ésteres que en los frutos maduros fueron muy numerosos y abundantes, no detectándose nunca en los frutos de las otras variedades. Esta abundancia de ésteres es característica y conocida en los frutos de *Citrus sinensis*, principalmente, pero también se han detectado en otros híbridos como Fortune (Herrera, 2007a) y también en otras variedades de mandarina o híbridos pero inducidos por el tratamiento por etileno, no de forma natural. Entre los CVs que se detectaron en Navelate y Ortanique destaca un buen número de sesquiterpenos, pero es cuestionable que el β -ciclocitral apareciera específicamente en Ortanique, ya que también se ha descrito su presencia en otras variedades. Es también reseñable la presencia de sinensales únicamente en los frutos de Clemenules, ya que estos CVs se han relacionado con el aroma característico de las mandarinas (Moshonas y Shaw, 1997; Hui, 2010).

Este tipo de distribución de CVs entre los frutos de las distintas variedades debe tomarse con precaución, ya que, por un lado los parentales originales del híbrido Ortanique fueron la naranja amarga y una mandarina no bien identificada (*Citrus reticulata*) (<http://www.citrusvariety.ucr.edu/citrus/ortanique.html>) que pueden tener un perfil de emisión de CVs diferente al de la naranja y mandarina utilizadas en este estudio. Sin embargo, los resultados pueden reflejar e ilustrar el tipo de CVs que se ha heredado en Ortanique y su procedencia que, en general, ha adquirido más CVs de naranja que de mandarina y, además, como se discute más adelante, se emiten en proporciones muy superiores a las de las otras dos. Un estudio reciente, llevado a cabo por Miyazaki et al. (2011), en el que se evaluó la presencia de CVs en zumo de 56 variedades de híbridos de mandarina mediante la técnica de SPME, permitió detectar un total de 203 volátiles diferentes entre todas las variedades estudiadas. El estudio reveló que los híbridos de mandarina con naranja, como Ortanique, presentaron una gran abundancia de sesquiterpenos, destacando el valenceno y ésteres. Del mismo modo, otro estudio del mismo grupo, en el que se analizó el aroma de 5 variedades de híbridos de mandarina, confirmó que los híbridos que presentaron un mayor contenido de CVs eran aquellos que procedían del cruce con una naranja dulce (Miyazaki et al., 2012). Por tanto, estos trabajos ponen de manifiesto la influencia genética de las variedades parentales sobre las variedades híbridas. Por otro lado, este análisis también desprende la poca diversidad de CVs que se emiten en los frutos de mandarina y en buena concordancia con observaciones previas de

las propiedades menos aromáticas de las mandarinas (Rouseff et al., 1994; Moshonas y Shaw, 1997; Ruberto, 2002; Ruiz Pérez-Cacho y Rouseff, 2008).

Tabla 15. Relación de CVs comunes y específicos identificados en la emisión de frutos de la mandarina Clemenules, el híbrido Ortanique y la naranja Navelate durante el desarrollo y la maduración.

NAV	NAV-ORT	ORT	CMN-ORT	CMN	CMN-NAV
3-Careno	β-Mirceno	β-Citronelol	α-Farneseno	β-Pineno	Isopiperitenona
Neral	ρ-Terpineno	β-Ciclocitral	α-Sinensal	α-Terpenol acetato	
α-Cubebeno	Nerol	Geranial		Trans-α-Bisaboleno	
β-Elemeno	Citronelal			Carotol	
ρ-Selineno	Geranil acetona			β-Sinensal	
Epi biciclosesquifelandreno	β-Selineno				
Nerolidol	α-Selineno				
Trans trans farnesal	Isocariofileno				
1-Octanol	ρ-Gurjuneno				
Butil butirato	β-Chamigreno				
Butil octanoato	ρ-Cadineno				
Hexil butanoato	Nonanal				
Hexil hexanoato					
Octil butirato					
2,6-dimetil-1,3,5,7-octatetraeno					
Dendrolasin					
Juniper canfor					
Dihidrometil jasmonato					

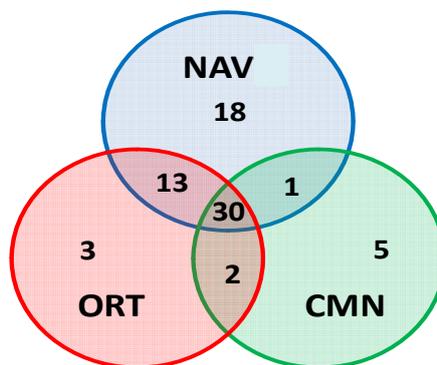


Figura 13. Diagrama que ilustra los CVs comunes y específicos identificados en la emisión de frutos de Clemenules, Ortanique y Navelate durante el desarrollo y la maduración.

Por otra parte, los resultados de este trabajo también han puesto de manifiesto que existe una tendencia o evolución distinta en la emisión de CVs por los frutos intactos y la su contenido en el flavedo. De forma genérica se puede afirmar que la mayor emisión de CVs se produce en los frutos verdes inmaduros, donde los frutos de Ortanique tuvieron la mayor emisión (3,18 µg/g PF), seguida de los frutos de Navelate, que fue aproximadamente un 30% menor (Tabla 7 y 8). Los frutos de la mandarina Clemenules en este mismo estadio tuvieron una emisión sustancialmente menor, pero alcanzó el máximo en el estadio verde maduro (Tabla 6). Conforme avanzó la maduración del fruto se produjo un progresivo descenso en la emisión de CV, pero las diferencias entre las variedades se continuaron manteniendo, con una emisión total

en la mandarina que fue un 50% menor que en la naranja y está a su vez algo menos que la mitad que en los frutos maduros de Ortanique (**Tablas 6, 7 y 8**). Estos resultados corroboran datos previos de otros autores en los que se concluye que las mandarinas tienen una intensidad aromática menor que las naranjas (Moshonas y Shaw, 1997). Nuestros datos evidencian, además, que los frutos de la mandarina Clemenules emiten menor cantidad de CVs y en proporciones más bajas, lo que determina su menor capacidad aromática. Por otro lado, numerosos estudios indican que la mayor biosíntesis y acumulación de CVs en las glándulas de aceite del flavedo y en los cuerpos de aceite de la pulpa de los frutos cítricos se produce en estadios tempranos del desarrollo (Rouseff y Leahy, 1995; Weiss, 1997; Dudareva et al., 2006; Tholl, 2006; Berger et al., 2007), lo que no parece consistente con los resultados de nuestro estudio. Sin embargo, un estudio reciente sobre la capacidad biosintética de las glándulas de aceite y sus características morfológicas en frutos de pomelo (*Citrus paradisi* Duncan) indica que éstas se forman en los estadios tempranos del crecimiento del fruto, mientras que la expansión y la mayor acumulación de CVs en el aceite esencial de las glándulas tiene lugar en estadios tardíos del desarrollo (Voo et al., 2012).

En los frutos de las tres variedades la evolución del contenido de CVs en el flavedo, como se ha indicado, aumentó con la maduración del fruto, y en los frutos maduros las diferencias entre las tres variedades fueron menores (**Figura 14**). Sin embargo, cada variedad presentó una tendencia distinta en cuanto a la acumulación de CVs en el flavedo, ya que mientras en la naranja fue relativamente constante a lo largo del proceso, en la mandarina experimentó mayores variaciones (x2 entre los frutos VI y TC) y en el híbrido experimentó el mayor aumento a lo largo de la maduración. Estas tendencias parecen ser características para cada variedad, y en el híbrido se han adquirido propiedades de los dos parentales. Es de destacar la tendencia diferente e inversa entre el contenido de CVs y su emisión, al menos la determinada en el espacio de cabeza. Las evoluciones de ambos parámetros para los frutos de cada variedad que se muestra en la **Figura 14** deben de tomarse de forma comparativa para cada parámetro y no entre ellos, ya que son unidades y magnitudes muy distintas, y pequeños errores en el contenido tendrían una relevancia importante en la emisión. Además, los datos del contenido están referidos al peso fresco de tejido de flavedo y los de emisión respecto al peso del fruto entero. Sin embargo, los dos parámetros muestran claramente que, a pesar de que el contenido aumenta durante la maduración la emisión descende, lo que indica que deben existir cambios en los procesos fisiológico, morfológicos o estructurales en las capas celulares que rodea la glándulas de aceite de la piel que pueden modificar su permeabilidad y la capacidad de emisión al medio ambiente.

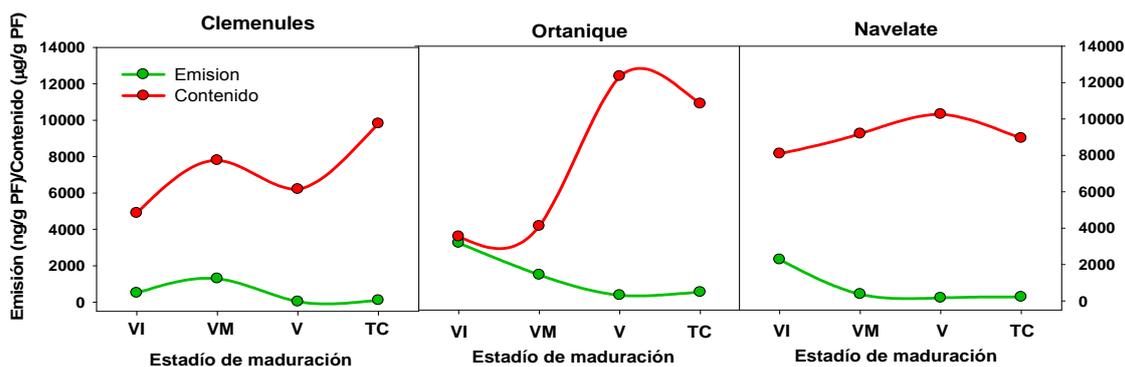


Figura 14. Comparación entre la evolución de la emisión de CVs (ng/g PF) en frutos intactos y el contenido total en el flavedo (µg/g PF) de frutos de la mandarina Clemenules, el híbrido Ortanique y la naranja Navelate durante la maduración natural.

Al igual que ocurre en la emisión total de CVs, el perfil de emisión de determinados volátiles como limoneno, β -mirceno, α -terpinoleno, β -farneseno, α -copaeno o trans cariofileno a lo largo de la maduración tampoco se correlaciona con su contenido de las glándulas de flavedo, ni en la pulpa. Por ejemplo, mientras que la emisión de los monoterpenos limoneno y β -mirceno, y el sesquiterpeno α -copaeno disminuyeron claramente durante la maduración (**Tablas 6, 7 y 8**) sus contenidos en los correspondientes extractos de flavedo y pulpa aumentaron o se mantuvieron (**Tablas 9 a 14**). Estos resultados indican que las variaciones en las emisiones no pueden explicarse por cambios en la composición del aceite esencial. Nuestros resultados demuestran que la fracción de un determinado CV que se emite en un momento de la maduración del fruto es una pequeña proporción del contenido de dicho CV en las glándulas de aceites esenciales del flavedo, en concordancia con las observaciones realizadas por Herrera (2007a) en otras variedades de cítricos. Esta situación es similar a la que se produce en la mayoría de plantas, como en menta, donde se acumulan grandes cantidades de CVs en los tricomas glandulares de las hojas pero se libera solamente una pequeña fracción del total (Gershenzon et al., 2000).

Como se ha mencionado anteriormente, los resultados de este trabajo indican que la emisión de CVs por los frutos cítricos al ambiente no parece estar directamente relacionada con la síntesis o acumulación de cada compuesto, sino que podría estar determinada por mecanismos de permeabilidad selectiva que pueden cambiar frente a diferentes situaciones de estrés o del desarrollo y la maduración del fruto. En otras plantas u órganos el concepto generalizado establece que la emisión de CVs por un tejido vegetal depende, en parte, de la cantidad de cada CVs que sintetiza y acumula (Dudareva et al., 2004; Baldwin, 2009), a diferencia de los resultados de este trabajo. Diferentes estudios han aportado evidencias de la influencia de otros factores, al margen de la síntesis y acumulación, en la emisión de CVs en plantas, como la permeabilidad selectiva, la presión de vapor, el factor de difusión para cada

CV, etc., que pueden afectar de forma importante la emisión de cada CV (Peñuelas y LLusía, 2001; Niinemets et al., 2010; Blanc et al., 2011; Harrison et al., 2013). Un segundo factor que puede ser relevante en la emisión de CVs, y al que últimamente se le está dando mayor importancia, es la existencia de posibles transportadores específicos responsables de la emisión al medio exterior de los CVs, actuando como lanzadera controlada de la emisión de los diferentes CVs. A pesar de que su existencia se ha propuesto y podría explicar muchas evidencias experimentales, no existen evidencias directas de su naturaleza ni se han caracterizado todavía en las plantas (Baldwin, 2009). Otro efecto que puede estar implicado en las diferencias entre la emisión y el contenido de CVs en los frutos cítricos tendría en cuenta los cambios en la permeabilidad de la cutícula como consecuencia de las diferencias en la acumulación y composición de ceras, tanto intra como epicuticulares, durante la maduración del fruto. Así, durante el desarrollo y los estadios iniciales de la maduración las ceras que se acumulan en la superficie de los frutos son de naturaleza más amorfa, formando estructuras flexibles que hacen que la cutículas de los frutos sean más permeables al paso del vapor de agua, y posiblemente también a otros CVs. Conforme avanza la maduración del fruto, las ceras cambian a una conformación más cristalina formando los llamados “platelets” que son estructuras más rígidas, en las que aumenta la proporción de n-alcanos y hacen que las cutículas sean más impermeables al paso de agua (El-Otmani et al., 2011; Lara et al., 2014). Alférez y Zacarias (2014) han determinado que conforme avanza la maduración de los frutos de la naranja Navelina se reduce progresivamente el potencial hídrico tanto del flavedo como del albedo, en los frutos recién recolectados que fueron más impermeables a la pérdida de agua. Sería, por lo tanto, razonable asumir que esta progresiva impermeabilización de las cutículas y epidermis de los frutos cítricos reduzca la capacidad de emisión de los CVs que se van acumulando en las glándulas de aceite del flavedo. Así, una menor permeabilidad de la capa exterior que protege las glándulas del intercambio con el medio ambiente dificultaría la emisión de volátiles, tal como se ha observado a lo largo de la maduración en los frutos de las tres variedades estudiadas en este trabajo. Finalmente, otra característica a tener en cuenta y que podría justificar parcialmente la menor emisión de CVs de los frutos de mandarina respecto a los de naranja y el híbrido sería la mayor resistencia de los frutos de mandarina al paso de gases. En un estudio sobre las causas de la mayor acumulación de etanol y acetaldehído (off-flavours) en los frutos de la mandarina Murcott respecto a los del pomelo Star Ruby, se comprobó que no se debía a una mayor capacidad fermentativa, ya que la expresión de genes y actividades de enzimas implicadas en estos procesos eran prácticamente similares entre ambas. Sin embargo, un análisis de la permeabilidad al paso de gases (oxígeno, dióxido de carbono y etileno) reveló una menor permeabilidad de las capas de la piel en la mandarina, tanto desde el flavedo al albedo como en sentido inverso. Esta mayor impermeabilidad de la mandarina respecto al pomelo parece deberse a un mayor grosor de la capa del flavedo y mayor compactación de las células del

albedo, lo que ocasiona menor difusión de los gases (Shi et al., 2007). En resumen, la reducción en la permeabilidad al paso de gases con la maduración del fruto y las características más impermeables del flavedo de la mandarina respecto a otras variedades, pueden ayudar a explicar la discrepancia entre el aumento en el contenido de CVs durante la maduración y la menor emisión de los mismos, y que estos procesos sean más acusados en los frutos de mandarina.

Todos los estudios llevados a cabo hasta la actualidad coinciden en que los terpenos, y concretamente el monoterpeno limoneno, son los CVs mayoritarios en los frutos cítricos (Rouseff et al., 1994; Weiss, 1997; Buettner et al., 2003; Sharon-Asa et al., 2003; Elston et al., 2005; Takita et al., 2007). Sin embargo, la mayor influencia aromática se atribuye también a CVs presentes en concentraciones minoritarias como terpenos oxigenados, alcoholes, aldehídos y ésteres alifáticos (Shaw, 1979; Rouseff et al., 1994; Weiss, 1997; Sharon-Asa et al., 2003; Gomez-Ariza et al., 2004; Pérez-López et al., 2006; Takita et al., 2007; Rouseff et al., 2009). Concretamente, el limoneno junto con el linalol y algunos aldehídos alifáticos y sesquiterpenos aldehídos (citronelal, β -sinensal y β -ionona) se han descrito como CVs responsables de la percepción de frescura y del intenso aroma del aceite esencial de algunas variedades de cítricos (Tadeo et al., 2008). En el aroma de naranja destaca la presencia del sesquiterpeno valenceno, de ésteres alifáticos (etil butanoato, etil propionato, metil butanoato) y de los aldehídos decanal, nonanal y octanal (Shaw, 1991; Sharon-Asa et al., 2003; Lückner et al., 2004; Hui, 2010). El valenceno y los ésteres, principalmente, se detectan en el aroma de frutos maduros, no siendo CVs habituales del aroma de mandarina, donde destaca la mayor abundancia de metilantranilato y timol, aldehídos (decanal y octanal) y sinensales, pero son más pobres en neral y geranial que otros frutos cítricos (Moshonas y Shaw, 1997; Hui, 2010).

El limoneno, aunque está descrito como el CV mayoritario (90%) en el aroma de la mayoría de frutos cítricos (Rouseff et al., 1994; Weiss, 1997) no se usa ni es buen indicador de la calidad organoléptica, ya que es sensible a la oxidación dando lugar a la aparición de CV que confieren aromas desagradables como α -terpineol y 4-terpineol (Elstón et al., 2005). Nuestros resultados muestran que el limoneno fue el CV mayoritario en todos los casos estudiados, observándose una disminución progresiva de su emisión durante la maduración en todas las variedades analizadas. El α -terpineol se identificó principalmente, en estadios verdes mientras que el 4-terpineol no fue detectado en la emisión de frutos intactos (**Tabla 5**). La emisión de limoneno expresada en $\mu\text{g/g}$ PF, fue mayor en el híbrido Ortanique (0,29-2,84), seguido de la naranja (0,11-2) y la mandarina (0,023-1,17), respectivamente. El contenido en el flavedo, por el contrario, se incrementó durante la maduración, siendo de nuevo Ortanique la que mayor contenido de limoneno presentó, seguida de Navelate y Clemenules. En la pulpa el porcentaje de limoneno se mantuvo constante a lo largo de la maduración (**Tablas 6 a 14**).

El linalol se ha descrito como el monoterpeno alcohol mayoritario en frutos cítricos (Shaw, 1979; Quintero et al., 2003; Hui, 2010), detectándose tanto en la emisión como en el

contenido del flavedo y de la pulpa de todas las muestras analizadas en este trabajo, principalmente en estadios inmaduros (**Tablas 6 a 14**). Nuestro estudio permitió observar diferencias cuantitativas en la emisión y contenido de linalol entre las diferentes especies, siendo la naranja la más rica en este compuesto. Otros monoterpenos importantes fueron el β -mirceno, sabineno, α -pineno y ocimeno, cuya tendencia fue similar a la seguida por el limoneno.

En cuanto a los sesquiterpenos, su abundancia total es menor que la de los monoterpenos, pero tienen una importante contribución al aroma de los frutos cítricos. Por ejemplo, los sesquiterpenos valenceno, α y β -sinensal son muy importantes en el aroma de naranja aunque están presentes en bajas cantidades (Weiss, 1997; Maccarone et al., 1998) o la nookatona, CV derivado del valenceno, que se presenta en baja cantidad en los aceites esenciales de pomelo, pero es un volátil clave en el aroma de estos frutos (Shaw y Wilson, 1981). Los resultados de este trabajo muestran que los sesquiterpenos fueron menos abundantes, siendo Clemenules la más pobre en este tipo de CVs, destacando el α -copaeno, trans cariofileno, β -cubebeno, germacreno D y α -farneseno, cuya emisión se redujo con la maduración, mientras que su contenido en el flavedo permaneció relativamente constante. El valenceno y los selinenos, por contra, incrementaron gradualmente su emisión y contenido durante la maduración (**Tablas 6 a 14**). El valenceno, descrito como el sesquiterpeno más abundante en frutos maduros de naranja (*Citrus sinensis*), se acumula durante la maduración del fruto (Sharon-Asa et al., 2003; Lückner et al., 2004), además se correlaciona con una buena calidad de los aceites esenciales de estos frutos, dado que su acumulación está directamente relacionada con el grado de maduración del fruto (Elstón et al., 2005). En mandarinas, el valenceno no se ha descrito como un volátil mayoritario ni determinante del aroma del fruto. En esta tesis se ha observado que la naranja Navelate es la más rica en dicho CV, seguida del híbrido Ortanique (**Tablas 6 a 14**), mientras que en Clemenules no se identificó valenceno en los extractos de flavedo, pero sorprendentemente sí en la emisión de los frutos intactos. Esta aparente anomalía en la presencia de valenceno exclusivamente en la emisión de los frutos de mandarina pero no en el contenido se debe muy probablemente a problemas analíticos y a la sensibilidad de cada técnica, ya que el análisis de CVs emitidos en el espacio de cabeza mediante SPME es más sensible y puede detectar concentraciones más bajas de determinados CVs frente a pequeñas cantidades en extractos de la piel. En frutos maduros, Navelate emitió 3 veces más valenceno que Ortanique y 1580 veces más que Clemenules. Es interesante mencionar que las pulpas de las mandarinas fueron especialmente ricas en los sesquiterpenos aldehídos y sinensales, descritos como compuestos característicos del aroma de mandarina (Moshonas y Shaw, 1997; Buettner et al., 2003; Chishlom et al., 2003), los cuales no se identificaron en la emisión ni en la pulpa de naranja pero sí en el híbrido. Por otra parte, los sesquiterpenos cíclicos gurjuneno y chamigreno se identificaron en el híbrido y la naranja, pero no en la mandarina. Estos datos, junto con lo

comentado previamente para el valenceno, podrían aportar indicios del carácter híbrido de Ortanique, ya que conserva las características intermedias del aroma de las especies de las cuales deriva y que no son comunes entre ellas (Tschardt et al., 2001; Maes, 2002; Merle et al., 2004; Lückner et al., 2004; Yamasaki et al., 2007).

Los aldehídos y alcoholes aunque están presentes en bajas concentraciones influyen de modo importante en el aroma del zumo de naranja y se ha observado que en frutos cítricos tienden a acumularse en la pulpa siendo importantes el octanal, nonanal y decanal (Brat et al., 2003; Ruiz Perez-Cacho y Rouseff, 2008; Rouseff et al., 2009). Los resultados de esta Tesis (**Tablas 12, 13 y 14**) muestran que la variedad Navelate fue la que mayor concentración de aldehídos y alcoholes alifáticos presentó (1-hexanol, cis-3-hexen-1-ol, 1-decanol y decanal).

Por último, el grupo de ésteres alifáticos aunque suele estar presentes en bajas concentraciones o concentraciones traza, está descrito como CVs de elevada importancia en el aroma fresco de naranja (Ruiz-Perez Cacho y Rouseff, 2008), aunque no en mandarina. En estudios previos realizados en el laboratorio por Herrera (2007a) en los que analizó la emisión de CVs en frutos maduros de diferentes variedades de mandarina no se detectaron ésteres alifáticos, excepto en el híbrido Ortanique en el que identificaron acetato de hexilo, butil octanoato y etil octanoato de forma natural. Sin embargo, en los resultados obtenidos en esta Tesis, no se detectó emisión de ésteres alifáticos en frutos intactos del híbrido de forma natural durante la maduración (**Tabla 7**).

Además, en frutos maduros del híbrido Ortanique recién cosechados y en comparación con otras mandarinas, Herrera (2007a) detectó una mayor emisión de otros CVs de naturaleza terpénica como el β -mirceno, limoneno, sabineno, cubebeno, linalol, terpineol, citral, β -citronelol, β -elemeno, trans cariofileno, valenceno, cadineno y α -panasinseno. En general, estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en esta Tesis, ya que los frutos maduros de Ortanique emiten una mayor concentración de CVs que los frutos de Clemenules (4 veces superior), destacando la mayor emisión de limoneno y valenceno, además de β -mirceno, linalol y trans cariofileno (**Tabla 6 y 7**). En conjunto, esta mayor abundancia de CVs junto con la identificación de 11 CVs más en la emisión de Ortanique respecto a Clemenules y otras mandarinas, apoya la idea previamente propuesta en la literatura (Cohen et al, 1990; Carbonell, 2006; Beltrán et al, 2007) de que el híbrido Ortanique es una variedad especialmente aromática y refleja el comportamiento intermedio respecto a sus parentales.

En esta Tesis se planteó analizar la expresión de diferentes genes implicados en la síntesis de CVs en el flavedo y la pulpa durante la maduración de los frutos de las tres variedades y comprobar cómo se correlacionan con la emisión de cada CV. Para ello, se seleccionaron diferentes TPSs a partir de secuencias de genes previamente aislados e identificados en frutos de otras variedades de cítricos, y cuya funcional se ha estudiado en algunos casos (Maruyama et al., 2001; Lucker et al., 2002, 2004; Sharon-Asa et al., 2003; Shimada et al., 2004, 2005a y

2005b; Berger et al., 2007). En particular se seleccionaron 7 genes, correspondientes a cinco monoterpeno sintasas: limoneno sintasa 1 (*LIM 1*; AB110637, CitMTSE2) y limoneno sintasa 2 (*LIM 2*; AB110636, CitMTSE1); pineno sintasa (β -*PIN*; AB110641, CitMTS62), ocimeno sintasa (*OCI*; AB110638, CitMTSL4) y linalol sintasa (*LIN*; UCRS04_2_016E01_T7, Cv885911) y 2 sesquiterpeno sintasas; valenceno sintasa (*VAL*; AF441124, Cstps1) y una sesquiterpeno sintasa multiproducto (*TPS3*; orange1.1g008620m, CsTPS3) responsable de la síntesis de α -copaeno, δ -cadineno, germancenoD y β -cubebeno (Carrera, et al., 2006).

Trabajos previos en frutos de otras especies de cítricos han comprobado que la expresión de diferentes monoterpeno sintasas alcanzan los máximos en estadios finales del desarrollo del fruto, y antes del inicio de la maduración (Shimada et al., 2004, 2005a, 2005b; Berger et al., 2007). En general, los resultados de este trabajo muestran que, con la excepción de la *VAL* que aumenta su expresión con la maduración del fruto, el resto de genes analizados en el flavedo de los frutos de las tres variedades se reduce durante la maduración del fruto (**Figura 11**). En la pulpa, el comportamiento de los genes fue también similar, donde la *VAL* fue el único que aumentó claramente durante la maduración en las tres variedades, y el resto de genes se inhibieron. Es de destacar que la expresión de todos los genes fue sustancialmente más baja en la pulpa que en el flavedo, llegando incluso a diferencias de más de 2 órdenes de magnitud (**Figura 12**).

En frutos de mandarina Satsuma (*Citrus unshiu* Marc.) se han identificado dos genes para la limoneno sintasa, con una identidad del 84,2%, y que presentaron una expresión diferencial en distintos tejidos. Así, *LIM 1* fue específica de flores mientras que la *LIM 2* se expresó en frutos (Shimada et al. en 2005a). Nuestros resultados muestran que ambos genes se expresan tanto en la piel como en la pulpa y en las tres variedades la acumulación de ambos mRNA fue superior en el flavedo (**Figura 11 y 12**). La mayor expresión de *LIM 1* y *LIM 2* se detectó en los frutos inmaduros del híbrido Ortanique y conforme avanzó la maduración descendió la expresión de ambos genes, de forma acusada para *LIM 1* y menos intensamente en *LIM 2*. Este patrón de expresión de ambos genes está más relacionado con los cambios en la emisión de limoneno durante la maduración que con el contenido. Además, esta aparente discrepancia entre la expresión de genes de síntesis de limoneno y la acumulación de este monoterpeno, también se manifiesta al comparar los contenidos entre variedades, ya que, por ejemplo, en los frutos inmaduros de Ortanique el contenido en limoneno fue inferior al de los frutos de Navelate, mientras que la expresión de *LIM 1* y *LIM 2* era muy superior. Por el contrario, el contenido de limoneno durante la maduración de los frutos de Ortanique se multiplica alrededor de tres veces (**Tabla 10**) y la expresión de ambos genes descendió. Estas evidencias sugieren que deben existir otros genes implicados en la síntesis y acumulación de limoneno que no se han caracterizado todavía y que pueden influir en la acumulación de este monoterpeno. Alternativamente, también pueden existir otros mecanismos aparte del control transcripcional,

como cambios postranscripcionales, actividades enzimáticas o procesos más complejos de control de la emisión de limoneno que pueden influir en los cambios que se producen durante la maduración del fruto. Las tendencias opuestas que se han observado entre la evolución del contenido y la emisión de este CV durante la maduración del fruto podrían interpretarse como que el descenso en la emisión a niveles muy bajos provocaría la acumulación progresiva del CV, a pesar de que la expresión de los genes es más baja. Sin embargo, el hecho de que la cantidad de CV que se emite es muy reducida respecto al contenido total hace cuestionar esta hipótesis.

En la pulpa, los niveles de transcritos de *LIM 1* y *LIM 2* fueron sustancialmente menores que los del flavedo, en concordancia con el menor contenido de limoneno en este tejido. La expresión de ambos genes en los tres estadios de maduración analizados fue distinta, ya que mientras que *LIM 1* se redujo ligeramente en Clemenules y Ortanique, aumentó en Navelate. Sin embargo, la acumulación del mRNA correspondiente a *LIM 2* fue más variable, y descendió de forma acusada en Ortanique y más lentamente en Navelate (**Figura 12**). Este patrón de cambios tampoco guarda relación con la evolución del contenido en limoneno en la pulpa, que fue relativamente constante durante la maduración y sin diferencias entre variedades (**Tablas 12, 13 y 14**). Estos resultados refuerzan los obtenidos en el flavedo e indican que la expresión de los genes *LIM 1* y *LIM 2*, implicados en la síntesis de limoneno no explican los patrones de acumulación de este CV en los dos tejidos del fruto estudiados.

La expresión de la β -pineno sintasa (*β -PIN*), que presentó elevada homología con el clon CitMTS62 de mandarina Satsuma (Shimada et al., 2004), también descendió de forma acusada en el flavedo durante la maduración de los frutos de las tres variedades (**Figura 11**). La máxima expresión de este gen correspondió al flavedo de frutos inmaduros del híbrido Ortanique, en los que la emisión del CV era similar a la de la naranja Navelate y el contenido menor a las otras dos variedades. Los resultados en la pulpa también corroboran los del flavedo, ya que en todos los casos la expresión de *β -PIN* descendió a pesar de que fueron sustancialmente inferiores a los del flavedo, pero los niveles de transcrito fueron mayores en la pulpa de Navelate (**Figura 12**), que no tuvieron mayor contenido en pineno (**Tablas 12, 13 y 14**). Por lo tanto, la evolución de este gen parece seguir una tendencia similar a la emisión y el contenido, pero los niveles cuantitativos y las diferencias entre variedades no se correlacionaron. Shimada et al., (2004) mostró expresión de este gen en todos los tejidos estudiados (flores, hojas, tallos, piel y zumo) de la mandarina Satsuma, pero a niveles más reducidos que otros de los genes analizados (CitMTSE1, CitMTSE3, CitMTS61).

La expresión del gen *OCI* fue más variable en el flavedo y la pulpa de las tres variedades y destaca las diferencias entre ambos tejidos por los bajos niveles de transcritos detectados en la pulpa. (**Figura 11 y 12**). Además, los resultados muestran una expresión máxima en el flavedo de frutos inmaduros de Ortanique, mientras que en la pulpa fue Ortanique la de menor expresión

relativa. En la mandarina Satsuma, Shimada et al. (2005b) observaron que el gen *OCI* (CitMTSL4) tenía una alta expresión en las flores y mucho menor en los frutos, que además, descendía durante el desarrollo del fruto. Nuestros resultados de nuevo son consistentes con los obtenidos en las otras terpeno sintasas discutidas, donde la expresión del gen no se correlaciona con los contenidos de los diferentes CVs y con las variaciones cuantitativas entre variedades.

Por último, en esta Tesis se ha caracterizó por primera vez en los cítricos el gen responsable de la síntesis del monoterpeno alcohol linalol, la linalol sintasa (*LIN*). A partir de la secuencia de una S-linalol sintasa (terpeno sintasa 14) de *Arabidopsis thaliana*, y se seleccionó un EST de las bases de datos de cítricos (UCRS04_2_016E01_T7) con alta homología de secuencia. Nuestros estudios mostraron una baja expresión de *LIN* en todas las variedades estudiadas. La expresión máxima correspondió a los estadios inmaduros, siendo más elevada en Ortanique y entre 3 a 5 veces menor en el flavedo de las otras dos variedades (**Figura 11 y 12**). En este caso la emisión y contenido de linalol en el flavedo no guardó paralelismo con la evolución de la expresión del gen *LIN*, ya que la naranja fue la que presentó mayor emisión y contenido mientras que en Ortanique se detectaron los menores valores. En la pulpa, no se detectó expresión de *LIN* en ninguna de las variedades estudiadas, a pesar de detectarse el monoterpeno alcohol linalol en este tejido, pero a niveles muy reducidos (**Tablas 9, 10 y 11**). Otros estudios han caracterizado diferentes linalol sintasas en otras especies, como en kiwi (*Actinidia arguta*), donde se ha comprobado la expresión preferencial del gen en flores (Chen et al., 2010). Recientemente, Sugiura et al. (2011), han clonado y caracterizado una linalol sintasa de mirto (*Lemon Myrtle*). El análisis funcional de este gen en *E. coli* mostró la capacidad de la proteína recombinante para catalizar la conversión de geranil difosfato a linalol y otros monoterpenos acíclicos. El gen correspondiente se expresaba de forma constitutiva y se inducía por el tratamiento con ácido jasmónico. Por último, Del Terra et al. (2013) han aislado a partir de flores, frutos, hojas y semillas de café (*C. arabica* L. cv. Catuai Red), 3 monoterpeno sintasas, una responsable de la síntesis de limoneno y 2 de la síntesis de linalol y β -mirceno.

Diferentes trabajos han abordado la expresión de sesquiterpeno sintasas en los cítricos (Sharon-Asa et al., 2003; Lückner et al, 2004; Carrera et al., 2007). Nuestro estudio se ha enfocado concretamente en el análisis de la valenceno sintasa (*VAL*) y de una sesquiterpeno sintasa multiproducto (*TPS3*), por ser responsables de la síntesis de los sesquiterpenos mayoritarios en cítricos. En este caso, y a diferencia de lo que ocurre con las monoterpeno sintasas, la expresión de la *VAL* se correlaciona muy ajustadamente con la evolución del contenido en los frutos de las tres variedades, tanto en flavedo como en la pulpa, como también se ha observado en otras situaciones (Sharon-Asa et al., 2003; Lückner et al, 2004). Los resultados muestran que la expresión de la *VAL* se incrementó gradualmente con la maduración del fruto, alcanzando la máxima expresión en frutos TC, tanto en el flavedo como en la pulpa (**Figura 11 y 12**). La máxima expresión se alcanzó en el híbrido Ortanique en los dos tejidos,

pero mientras en el flavedo de Navelate la acumulación de mRNA fue relativamente alta y muy baja en Clemenules, en la pulpa fue muy alta en ambos genotipos (**Figura 12**). De forma paralela, la emisión y el contenido de valenceno también se incrementó con la maduración del fruto, pero los máximos niveles se alcanzaron en el flavedo y la pulpa de Navelate (**Tabla 6 a 14**). En la mandarina Clemenules, tal y como se ha comentado previamente, el valenceno se detectó en la emisión del fruto intacto pero no en el contenido, lo que probablemente puede ser debido a que se encuentra en muy baja concentración y posiblemente por debajo de la sensibilidad de la técnica utilizada. Sin embargo, en el flavedo se detectó acumulación del mRNA correspondiente a la *VAL*, aunque a menor nivel que en los otros dos frutos, lo que apoya la hipótesis anterior.

El gen referenciado como *TPS3*, se ha comprobado que es responsable de la síntesis de diversos sesquiterpenos, como el α -copaeno, δ -cadineno, germanceno D y β -cubebeno (Carrera et al., 2007). Esta conclusión se basa en el hecho de que en el mutante de mandarina Clementina *alf*, que se caracteriza por una dramática reducción de la emisión de terpenos en flores y frutos, tiene prácticamente suprimida la expresión de este gen, que tiene una alta homología de secuencia con genes que codifican terpeno sintetas implicadas en la formación de sesquiterpenos. Además, estudios *in vitro* han demostrado la capacidad de la proteína recombinante de actuar sobre diferentes precursores, lo que demuestra su funcionalidad multiproducto (Omar et al., resultados no publicados). El análisis de la expresión de la *TPS3* en la naranja Navelate, el híbrido Ortanique y la mandarina Clemenules durante la maduración mostró una expresión diferencial entre las diferentes variedades y tejidos. Así, la expresión relativa de la *TPS3* en el flavedo fue elevada respecto al resto de genes analizados y con ligeras excepciones los niveles de transcritos eran altos en los frutos inmaduros y se reducían con la maduración (**Figura 11**). La mayor expresión correspondió a los frutos de naranja, tanto en el flavedo como en la pulpa, pero mientras las otras variedades tenían un nivel de expresión moderado en el flavedo, en la pulpa era prácticamente mínimo (**Figuras 11 y 12**). La emisión de α -copaeno, δ -cadineno, germanceno D y β -cubebeno en los frutos intactos (**Tablas 6, 7 y 8**) se redujo durante la maduración al igual que la expresión de *TPS3*, pero el contenido de los mismos en el flavedo se incrementó o se mantuvo constante (**Tablas 9, 10 y 11**). La comparación de los resultados de la concentración de los citados CVs revela que fueron mayores en los frutos de naranja y menores en el híbrido, coincidiendo así con los datos de expresión (**Figura 11**). En la pulpa los contenidos de estos CVs fueron muy bajos, en buena concordancia con la expresión de la *TPS3* (**Figura 12**). En conclusión, la expresión del gen *TPS3* se inhibe durante la maduración del fruto, y muestra un buen paralelismo con la acumulación de varios sesquiterpenos (α -copaeno, δ -cadineno, germanceno D y β -cubebeno) tanto en la piel como en la pulpa, lo que apoya su potencial multifuncionalidad e implicación de la formación de varios sesquiterpenos.

CAPITULO II

**EFEECTO DEL ETILENO EN LA
BIOSÍNTESIS DE CVs DURANTE LA
POSTCOSECHA DE FRUTOS DE
DIFERENTES ESPECIES DE CÍTRICOS**

RESULTADOS

Con el fin de estudiar el posible efecto de la aplicación de etileno durante la desverdización sobre el perfil de emisión y contenido de CVs, así como su efecto en la expresión de diferentes terpeno sintasas, se seleccionaron frutos de las mismas especies de cítricos utilizadas en el capítulo I; mandarina Clemenules (*Citrus clementina*), el híbrido Ortanique (*Citrus reticulata* x *Citrus sinensis*) y la naranja Navelate (*Citrus sinensis*, L.Osbeck). Se utilizaron frutos virando de color y se trataron con etileno (5 ppm) durante 6 días o en una atmósfera de aire (controles). Adicionalmente, un grupo de frutos se trataron con el inhibidor de la acción del etileno, 1-MCP (1 ppm) durante 16 h y, posteriormente, se sometieron a los mismos tratamientos con etileno (MCP+Etileno) o aire (MCP+Aire) (**Figura 7**).

Al inicio del experimento los frutos recién cosechados de Clemenules presentaron un índice de color $a/b = -0,21 \pm 0,03$, similar al de los de Navelate ($a/b = -0,28 \pm 0,02$), mientras que los frutos de Ortanique tenían un índice ligeramente superior ($-0,04 \pm 0,02$). A los 3 días de tratamiento sólo se observaron cambios en el color externo de los frutos tratados con etileno, que alcanzaron valores de $0,03 \pm 0,01$ en Clemenules y Navelate y $0,32 \pm 0,06$ en Ortanique. En los frutos incubados en aire el color externo experimentó un ligero aumento después de 6 días, mientras que con etileno alcanzaron tonalidades naranja-rojiza y valores a/b superiores ($0,61 \pm 0,07$ en Clemenules, $0,56 \pm 0,02$ en Ortanique y $0,30 \pm 0,02$ en Navelate). En las tres variedades el color de los frutos pre-tratados con 1-MCP y posteriormente tratados o no con etileno experimentaron solamente ligeras variaciones a lo largo del experimento (**Figuras 15, 16 y 17**).

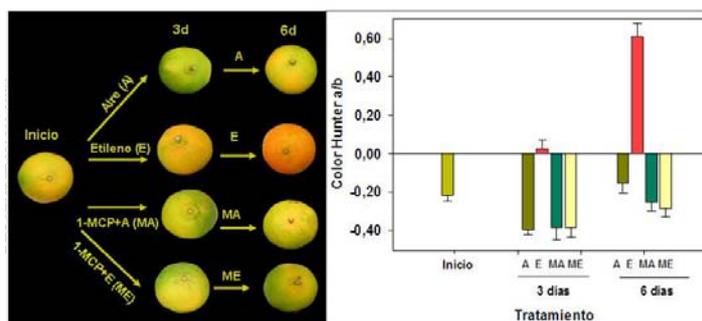


Figura 15. Aspecto y color externo de frutos virando de la mandarina Clemenules sometidos a los siguientes tratamientos postcosecha: atmósfera de aire (A), etileno (E) (5 ppm), 1-MCP (1 ppm)+aire (MA) y 1-MCP (1 ppm)+etileno (5 ppm) (ME). El color de los frutos (parámetro Hunter a/b) es la media de al menos 6 frutos. Los frutos se recolectaron durante la campaña 2008/09.

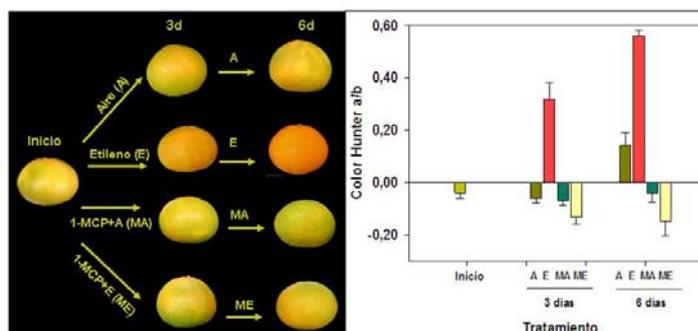


Figura 16. Aspecto y color externo de frutos virando del híbrido Ortanique sometidos a los siguientes tratamientos postcosecha: atmósfera de aire (A), etileno (E) (5 ppm), 1-MCP (1 ppm)+aire (MA) y 1-MCP (1 ppm)+etileno (5 ppm) (ME). El color de los frutos (parámetro Hunter *a/b*) es la media de al menos 6 frutos. Los frutos se recolectaron durante la campaña 2008/09.

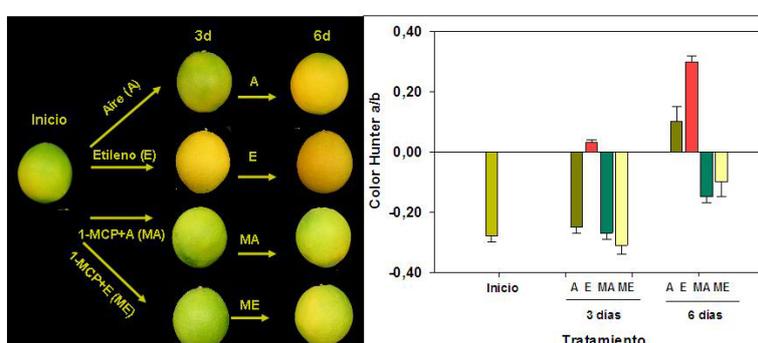


Figura 17. Aspecto y color externo de frutos virando de la naranja Navelate sometidos a los siguientes tratamientos postcosecha: atmósfera de aire (A), etileno (E) (5 ppm), 1-MCP (1 ppm)+aire (MA) y 1-MCP (1 ppm)+etileno (5 ppm) (ME). El color de los frutos (parámetro Hunter *a/b*) es la media de al menos 6 frutos. Los frutos se recolectaron durante la campaña 2009/10.

1. Efecto de la aplicación de etileno y del inhibidor de su acción, 1-MCP, en la emisión de CVs en frutos virando de la mandarina Clemenules, el híbrido Ortanique y la naranja Navelate

Durante los diferentes tratamientos postcosecha se analizó el perfil de emisión de CVs por los frutos, identificándose un total de 37, 61 y 86 compuestos diferentes en Clemenules, Ortanique y Navelate, respectivamente. La emisión total de volátiles, expresada como suma de todos los CVs cuantificados, fue máxima al inicio del experimento, presentando mayor concentración en los frutos de Ortanique (242 ng/g PF), seguido de la naranja Navelate (172 ng/g PF) y finalmente en la mandarina Clemenules (29 ng/g PF) (**Tablas 16, 17 y 18**). En general, en el aroma de los frutos recién recolectados de las tres variedades destacaron los monoterpenos por su mayor abundancia y los sesquiterpenos por su mayor diversidad.

Tabla 16. Efecto de la aplicación postcosecha de etileno (5 ppm) y de 1-MCP (1 ppm) individualmente o en combinación sobre la emisión de los CVs mayoritarios en frutos virando de la mandarina Clementines. Cada valor corresponde a la media \pm DE de al menos 3 réplicas de 6 frutos cada una. Los frutos se recolectaron en la campaña 2007/08.

ng/g PF	INICIO	3d			6d				
		Aire	Etileno	MCP+Aire	MCP+Etileno	Aire	Etileno	MCP+Aire	MCP+Etileno
Monoterpenos hidrocarbonados									
α -Pino	0,48 \pm 0,17	0,30 \pm 0,21	N.D	0,22 \pm 0,03	0,68 \pm 0,48	N.D	N.D	N.D	N.D
Sabineno	0,31 \pm 0,18	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
Limoneno	22,90 \pm 4,67	2,11 \pm 0,27	3,11 \pm 1,55	0,75 \pm 0,30	1,54 \pm 0,87	0,67 \pm 0,10	3,08 \pm 0,23	5,21 \pm 1,23	2,20 \pm 0,34
Ocimeno	4,07 \pm 4,44	5,92 \pm 0,90	1,45 \pm 0,02	22,18 \pm 1,29	13,22 \pm 7,85	11,82 \pm 1,48	0,19 \pm 0,08	0,16 \pm 0,14	N.D
Perillen	0,34 \pm 0,23	0,77 \pm 0,02	0,17 \pm 0,01	11,39 \pm 3,11	6,49 \pm 2,15	1,00 \pm 0,22	0,20 \pm 0,01	0,21 \pm 0,14	0,19 \pm 0,06
Monoterpenos alcoholes									
Linalol	0,04 \pm 0,01	0,04 \pm 0,02	N.D	0,11 \pm 0,03	0,08 \pm 0,01	Tr	Tr	0,17 \pm 0,01	0,05 \pm 0,03
Sesquiterpenos cíclicos									
α -Selineno	N.D	N.D	0,04 \pm 0,01	N.D	N.D	Tr	0,16 \pm 0,03	N.D	Tr
β -Selineno	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	0,16 \pm 0,01	N.D	N.D
Trans cariofileno	0,65 \pm 0,05	0,58 \pm 0,26	1,93 \pm 0,06	1,18 \pm 0,12	0,91 \pm 0,15	1,18 \pm 0,25	1,78 \pm 0,34	0,85 \pm 0,27	0,73 \pm 0,05
α -Humuleno	Tr	Tr	0,08 \pm 0,00	0,04 \pm 0,01	Tr	Tr	0,09 \pm 0,01	Tr	Tr
Aromadendreno	N.D	N.D	Tr	N.D	N.D	N.D	0,07 \pm 0,01	N.D	N.D
α -Gurjuneno	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	0,04 \pm 0,01	N.D	N.D
β -Chamigreno	N.D	N.D	Tr	N.D	N.D	N.D	0,06 \pm 0,02	N.D	N.D
Valenceno	Tr	Tr	0,41 \pm 0,07	Tr	Tr	0,13 \pm 0,01	2,75 \pm 0,63	0,04 \pm 0,01	0,07 \pm 0,01
Sesquiterpenos lineales									
β -Farneseno	0,12 \pm 0,04	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
α -Farneseno	0,25 \pm 0,08	0,45 \pm 0,37	0,70 \pm 0,01	1,59 \pm 0,29	0,74 \pm 0,34	0,48 \pm 0,15	1,99 \pm 0,46	0,89 \pm 0,41	0,30 \pm 0,03
Alcoholes y aldehídos alifáticos									
Emisión total CV	29,37 \pm 9,95	10,22 \pm 2,10	7,95 \pm 1,75	37,57 \pm 5,19	23,03 \pm 11,73	15,35 \pm 2,24	10,67 \pm 1,91	7,74 \pm 2,25	3,64 \pm 0,53

Tabla 17. Efecto de la aplicación de etileno (5 ppm) y 1-MCP (1 ppm) individualmente o en combinación sobre la emisión de los CVs mayoritarios en frutos virando del híbrido Ortanique. Cada valor corresponde a la media \pm DE de al menos 3 réplicas de 6 frutos cada una. Los frutos se recolectaron en la campaña 2007/08.

ng/g PF	INICIO	3d			6d				
		Aire	Etileno	MCP+Aire	MCP+Etileno	Aire	Etileno	MCP+Aire	MCP+Etileno
Monoterpenos hidrocarbonados									
α -Pinoeno	1,20 \pm 0,18	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
β -Mirceeno	6,58 \pm 3,05	N.D	1,16 \pm 0,85	0,30 \pm 0,21	1,41 \pm 1,00	0,66 \pm 0,46	0,52 \pm 0,15	N.D	0,73 \pm 0,51
Limoneno	229,11 \pm 108,49	2,28 \pm 2,63	37,51 \pm 24,68	4,22 \pm 5,14	26,11 \pm 32,60	9,54 \pm 13,08	14,60 \pm 6,55	0,44 \pm 0,01	11,78 \pm 15,77
Ocimeno	0,33 \pm 0,23	0,46 \pm 0,27	0,26 \pm 0,12	2,15 \pm 0,47	0,35 \pm 0,03	0,17 \pm 0,01	0,88 \pm 0,58	0,69 \pm 0,50	0,16 \pm 0,03
Monoterpenos alcoholes									
Linalol	0,07 \pm 0,05	Tr	N.D	Tr	Tr	Tr	N.D	Tr	Tr
Monoterpenos aldehidos y cetonas									
Citronelal	0,05 \pm 0,06	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
Geranil acetona	Tr	Tr	0,07 \pm 0,05	Tr	N.D	N.D	0,07 \pm 0,02	Tr	Tr
Sesquiterpenos cíclicos									
α -Copaeno	0,04 \pm 0,03	N.D	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr
β -Selineno	0,07 \pm 0,02	0,07 \pm 0,01	0,12 \pm 0,01	0,06 \pm 0,01	0,04 \pm 0,01	0,16 \pm 0,01	0,26 \pm 0,01	0,15 \pm 0,01	0,10 \pm 0,01
α -Selineno	0,10 \pm 0,02	0,09 \pm 0,01	0,14 \pm 0,02	0,07 \pm 0,01	0,05 \pm 0,01	0,20 \pm 0,01	0,28 \pm 0,01	0,19 \pm 0,01	0,14 \pm 0,02
Trans cariofileno	1,43 \pm 0,30	0,91 \pm 0,11	1,12 \pm 0,09	0,83 \pm 0,07	0,50 \pm 0,07	1,49 \pm 0,43	0,92 \pm 0,01	1,62 \pm 0,04	1,13 \pm 0,22
α -Humuleno	Tr	Tr	0,05 \pm 0,01	Tr	Tr	0,06 \pm 0,01	0,04 \pm 0,01	0,06 \pm 0,01	0,04 \pm 0,01
Aromadendreno	0,05 \pm 0,01	0,04 \pm 0,01	0,08 \pm 0,01	Tr	Tr	0,09 \pm 0,01	0,15 \pm 0,01	0,09 \pm 0,01	0,06 \pm 0,01
α -Gurjuneno	0,04 \pm 0,01	Tr	0,04 \pm 0,01	Tr	Tr	0,05 \pm 0,00	0,08 \pm 0,01	0,05 \pm 0,01	0,04 \pm 0,01
β -Chamigreno	0,04 \pm 0,01	0,04 \pm 0,01	0,05 \pm 0,01	Tr	Tr	0,07 \pm 0,01	0,10 \pm 0,01	0,06 \pm 0,01	0,05 \pm 0,01
Germacreno D	0,04 \pm 0,02	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	0,07 \pm 0,08	Tr	0,04 \pm 0,04
Valenceno	2,32 \pm 0,39	1,79 \pm 0,31	2,18 \pm 0,02	1,55 \pm 0,16	0,91 \pm 0,16	3,30 \pm 0,12	4,28 \pm 0,25	3,12 \pm 0,15	2,13 \pm 0,34
α -Panansineno	0,11 \pm 0,01	0,09 \pm 0,01	0,20 \pm 0,01	0,07 \pm 0,02	0,04 \pm 0,01	0,19 \pm 0,01	0,33 \pm 0,02	0,17 \pm 0,01	0,13 \pm 0,02
Alcoholes y aldehidos alifáticos									
Nonanal	0,04 \pm 0,01	0,04 \pm 0,01	N.D	Tr	N.D	Tr	N.D	N.D	N.D
Esteres alifáticos									
Hexil acetato	N.D	N.D	0,10 \pm 0,02	N.D	N.D	N.D	0,19 \pm 0,01	N.D	N.D
Butil octanoato	N.D	N.D	Tr	N.D	N.D	N.D	0,08 \pm 0,01	N.D	N.D
Hexil hexanoato	N.D	Tr	0,11 \pm 0,01	N.D	N.D	N.D	0,40 \pm 0,01	N.D	Tr
Emisión total CV	241,91 \pm 112,95	5,96 \pm 3,39	43,34 \pm 25,92	9,46 \pm 6,14	29,54 \pm 33,89	16,16 \pm 14,19	23,44 \pm 7,75	6,77 \pm 0,75	16,62 \pm 17,03

Tabla 18. Efecto de la aplicación de etileno (5 ppm) y 1-MCP (1 ppm) individualmente o en combinación sobre la emisión de los CVs mayoritarios en frutos virando de la naranja Navelate. Cada valor corresponde a la media \pm DE de al menos 3 réplicas de 6 frutos cada una. Los frutos se recolectaron en campaña 2008/09.

ng/g PF	INICIO	3d				6d			
		Aire	Etileno	MCP+Aire	MCP+Etileno	Aire	Etileno	MCP+Aire	MCP+Etileno
Monoterpenos hidrocarbonados									
α -Pinoeno	1,37 \pm 0,06	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
Sabineno	2,38 \pm 0,39	N.D	N.D	N.D	N.D	0,30 \pm 0,24	0,81 \pm 0,81	N.D	0,64 \pm 0,32
3-Careno	0,99 \pm 0,39	N.D	N.D	N.D	N.D	0,30 \pm 0,29	0,17 \pm 0,01	N.D	N.D
β -Mirceeno	2,68 \pm 0,46	N.D	N.D	N.D	N.D	0,85 \pm 0,91	0,96 \pm 0,52	0,51 \pm 0,13	0,78 \pm 0,76
Limoneno	142,01 \pm 10,64	2,36 \pm 0,96	1,10 \pm 0,35	2,53 \pm 1,15	28,07 \pm 0,66	35,99 \pm 38,72	40,33 \pm 23,62	14,08 \pm 7,23	24,30 \pm 25,61
Ocimeno	0,48 \pm 0,29	6,48 \pm 3,94	0,22 \pm 0,04	6,33 \pm 5,03	7,39 \pm 3,01	1,26 \pm 0,74	1,47 \pm 1,01	N.D	N.D
α -Terpinoleno	0,55 \pm 0,13	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
Monoterpenos alcoholes									
Linalol	0,04 \pm 0,02	0,04 \pm 0,03	N.D	0,10 \pm 0,10	0,14 \pm 0,09	Tr	Tr	0,12 \pm 0,02	Tr
Monoterpenos ésteres									
Geranil acetona	Tr	N.D	0,11 \pm 0,01	N.D	N.D	0,10 \pm 0,02	0,21 \pm 0,08	Tr	0,04 \pm 0,01
Sesquiterpenos cíclicos									
β -Elemeno	Tr	Tr	Tr	N.D	N.D	Tr	2,17 \pm 0,39	Tr	Tr
β -Selineno	0,04 \pm 0,01	0,04 \pm 0,01	0,15 \pm 0,04	Tr	Tr	0,13 \pm 0,01	0,46 \pm 0,02	0,04 \pm 0,01	0,06 \pm 0,01
δ -Selineno	0,05 \pm 0,02	0,11 \pm 0,02	0,40 \pm 0,08	0,06 \pm 0,02	0,05 \pm 0,01	0,39 \pm 0,04	1,15 \pm 0,04	0,11 \pm 0,01	0,15 \pm 0,01
α -Selineno	0,09 \pm 0,03	0,13 \pm 0,03	0,49 \pm 0,06	0,09 \pm 0,03	0,08 \pm 0,01	0,48 \pm 0,06	1,52 \pm 0,04	0,16 \pm 0,01	0,22 \pm 0,02
Isocariofileno	0,06 \pm 0,01	Tr	Tr	Tr	Tr	N.D	N.D	N.D	Tr
Trans cariofileno	18,63 \pm 4,64	26,99 \pm 1,01	28,93 \pm 0,15	23,89 \pm 2,68	21,97 \pm 0,64	14,15 \pm 0,43	5,92 \pm 2,24	17,5 \pm 2,41	17,51 \pm 2,82
α -Humuleno	0,10 \pm 0,02	0,45 \pm 0,05	1,03 \pm 0,04	0,39 \pm 0,09	0,40 \pm 0,01	0,48 \pm 0,02	0,33 \pm 0,07	0,51 \pm 0,06	0,57 \pm 0,11
Aromadendreno	N.D	Tr	0,04 \pm 0,01	N.D	Tr	0,04 \pm 0,01	0,15 \pm 0,02	Tr	Tr
α -Gurjuneno	Tr	Tr	0,10 \pm 0,02	Tr	Tr	0,10 \pm 0,01	0,32 \pm 0,01	Tr	Tr
β -Chamigreno	Tr	0,04 \pm 0,01	0,13 \pm 0,02	Tr	Tr	0,13 \pm 0,01	0,40 \pm 0,01	0,05 \pm 0,01	0,04 \pm 0,01
Valenceno	1,44 \pm 0,48	2,64 \pm 0,34	7,22 \pm 1,26	1,62 \pm 0,58	1,21 \pm 0,07	6,67 \pm 0,75	20,09 \pm 1,02	2,66 \pm 0,05	3,62 \pm 0,29
Sesquiterpenos lineales									
α -Farneseno	N.D	0,87 \pm 0,80	20,94 \pm 3,30	6,52 \pm 0,64	12,68 \pm 6,27	2,36 \pm 1,05	3,69 \pm 0,07	5,44 \pm 2,49	10,69 \pm 2,02
Alcoholes y aldehidos alifáticos									
1-Hexanol	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	0,17 \pm 0,01	0,62 \pm 0,19	N.D	N.D
1-Octanol	Tr	N.D	N.D	N.D	N.D	Tr	0,09 \pm 0,06	0,12 \pm 0,04	0,28 \pm 0,29
Esteres alifáticos									
1-Hexil acetato	N.D	N.D	0,05 \pm 0,03	N.D	N.D	0,12 \pm 0,03	0,29 \pm 0,04	N.D	N.D
Butil hexanoato	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	Tr	0,31 \pm 0,22	N.D	N.D
Hexil butanoato	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	Tr	0,69 \pm 0,55	N.D	N.D
Hexil hexanoato	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	0,38 \pm 0,07	4,10 \pm 3,04	Tr	Tr
Butil octanoato	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	Tr	0,15 \pm 0,07	N.D	N.D
Butil trans-2-hexanoato	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	0,06 \pm 0,04	N.D	N.D
Hexil octanoato	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	Tr	0,22 \pm 0,15	N.D	N.D
Otros									
β -Ionona	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	0,04 \pm 0,01	0,07 \pm 0,03	N.D	N.D
Emisión total CV	172,57 \pm 17,80	40,38 \pm 7,24	61,34 \pm 5,61	41,7 \pm 10,4	73,7 \pm 10,9	65,7 \pm 43,9	89,2 \pm 35,0	42,0 \pm 12,9	59,5 \pm 32,9

En las **Tablas 16, 17 y 18** se muestran los cambios en la emisión de los CVs de los frutos de Clemenules, Ortanique y Navelate a los 3 y 6 días de tratamiento. En las tres variedades, las diferentes familias de CVs identificados siguieron las mismas tendencias en respuesta al etileno o 1-MCP. Dentro del grupo de los monoterpenos hidrocarbonados destacó el limoneno, por ser el CV mayoritario, con valores de emisión comprendidos entre 23 y 220 ng/g PF, que se redujeron drásticamente respecto a los iniciales, con independencia del tratamiento, más de 30 veces en Clemenules, y cerca de 500 y 100 veces en Ortanique y Navelate, respectivamente. Otros monoterpenos relativamente abundantes, como el sabineno, α -pineno y β -mirceno con valores iniciales de emisión comprendidos entre 0,3-2,4; 0,5-1,4 y 2,7-6,6 ng/g PF, respectivamente, mostraron una clara disminución en los frutos a lo largo de los tratamientos. El ocimeno también fue un CV relativamente abundante, con una concentración inicial entre 0,33 y 4,07 ng/g PF, siendo mayoritario en la mandarina. En contraste con la evolución observada para el resto de monoterpenos, el ocimeno aumentó de forma importante y transitoria (a los 3 días) en los frutos pre-tratados con 1-MCP, alcanzando valores entre 5-10 veces superiores a los iniciales, y disminuyó también de forma transitoria en los frutos de Clemenules y Navelate tratados con etileno.

El linalol fue el único monoterpeno alcohol que se detectó en el espacio de cabeza de los frutos al inicio del experimento y, tanto en Clemenules como en Navelate, su emisión se mantuvo o aumentó en los frutos pre-tratados con 1-MCP y disminuyó en los tratados con etileno. En los frutos de Ortanique su emisión sólo se detectó a niveles cuantificables en los frutos recién recolectados (0,07 ng/g PF).

En el grupo de sesquiterpenos cíclicos se observaron dos claros perfiles de emisión en respuesta a los distintos tratamientos: en un primer grupo se agruparon aquellos con una emisión inicial muy baja que se redujo a lo largo de los diferentes tratamientos, como el α -copaeno o el β -cubebeno, sólo presentes en concentraciones traza en algunos tratamientos. El segundo grupo lo componen un mayor número de sesquiterpenos que se estimularon por el tratamiento con etileno, bien de forma transitoria, como el α -humuleno, o de forma progresiva, como los selinenos, aromadendreno y valenceno, entre otros. Cabe destacar la emisión de trans cariofileno en Navelate y Clemenules como el sesquiterpeno más abundante (en un rango de 0,5 a 29 ng/g PF) al inicio del experimento y cuya emisión fue mayor en los frutos tratados con etileno. Dentro de este grupo, el valenceno fue el sesquiterpeno que mostró un aumento más notable en respuesta a la aplicación de etileno exógeno, siendo el mayoritario en todas las variedades a los 6 días de exposición al gas, alcanzando concentraciones en el espacio de cabeza de 3, 5 y 20 ng/g PF, en Clemenules, Ortanique y Navelate, respectivamente.

Es interesante mencionar que el tratamiento con etileno estimuló la emisión de ésteres alifáticos, principalmente en Navelate y, en menor medida Ortanique, alcanzándose valores máximos de emisión a los 6 días del tratamiento (**Tabla 17 y 18**). Entre los ésteres destacaron el

hexil acetato, con valores similares en ambas variedades (0,2-0,3 ng/g PF) y hexil hexanoato que en Navelate alcanzó una emisión 10 veces superior a la de Ortanique. Además, el tratamiento con etileno estimuló la emisión de CVs norisoprenoides (derivados de carotenoides) como la β -ionona, geranil acetona o β -ciclocitral, aunque este último en niveles traza.

2. Efecto de la aplicación de etileno y del inhibidor de su acción, 1-MCP, en el contenido de CVs en el flavedo de frutos virando de la mandarina Clemenules, el híbrido Ortanique y la naranja Navelate

El efecto de la aplicación de etileno y de 1-MCP en el contenido y la composición de CVs del flavedo de los frutos de las tres variedades se muestra en las **Tablas 19, 20 y 21**. La variedad que presentó mayor diversidad de CVs fue la mandarina Clemenules (115), mientras que en los extractos de Navelate y Ortanique se identificaron solo 79 y 72 CVs, respectivamente. Es interesante, sin embargo, que el mayor contenido de CVs se cuantificó en el flavedo de Ortanique, llegando a valores próximos a 14 mg/g PF, seguidos de 10,2 y 6,1 mg/g PF en el flavedo de Navelate y Clemenules, respectivamente (**Tablas 19, 20 y 21**).

En general, dentro de una misma variedad no se observaron variaciones importantes en la concentración de los diferentes CVs entre los diferentes tratamientos y el tiempo de los mismos, y se mantuvieron las diferencias entre las variedades (**Tablas 19, 20 y 21**). El limoneno fue el componente mayoritario en todas las situaciones, representando alrededor del 90% del total de CVs. El contenido de limoneno se redujo a los 3 días del tratamiento con etileno, especialmente en los frutos de Ortanique y Navelate con mayores contenidos iniciales. Dentro el grupo de los monoterpenos hidrocarbonados, el sabineno y β -mirceno estuvieron en proporciones más abundantes (en torno a 100 μ g/g PF). El ocimeno también fue un CV relativamente abundante, principalmente en los frutos de Ortanique cuyo contenido fue 3 veces superior al de las otras dos variedades. El linalol fue el monoterpeno alcohol mayoritario, con concentraciones entre 16 y 67 μ g/g PF, seguido del L- α -terpineol (entre 10 y 26 μ g/g PF) y, en general, sus concentraciones se mantuvieron relativamente constantes a lo largo del experimento. Otros monoterpenos de interés fueron los de tipo aldehído, como el geranial que fue más abundante en Navelate (10-16 μ g/g PF) y el citronelal que presentó su máximo contenido en Ortanique (5,5-13 μ g/g PF).

Tabla 19. Efecto de la aplicación de etileno (5 ppm) y 1-MCP (1 ppm) individualmente o en combinación en el contenido de CVs mayoritarios en el flavedo de frutos de la mandarina Clementines. Cada valor corresponde a la media \pm DE de 2 réplicas. Los frutos se recolectaron en la campaña 2007/08.

µg/g PF	INICIO	3d			6d				
		Aire	Etileno	MCP+Aire	MCP+Etileno	Aire	Etileno	MCP+Aire	MCP+Etileno
Monoterpenos hidrocarbonados									
α-Pineno	2,77 ± 0,28	4,55 ± 0,41	3,24 ± 0,22	3,28 ± 0,14	4,08 ± 0,24	5,69 ± 0,85	3,68 ± 0,06	3,27 ± 0,24	2,82 ± 0,06
Sabineno	142,06 ± 6,01	220,32 ± 13,43	140,54 ± 41,94	160,34 ± 30,86	189,52 ± 6,66	251,97 ± 4,35	183,94 ± 10,39	189,03 ± 23,93	133,11 ± 3,96
β-Mirceno	171,04 ± 3,46	267,15 ± 19,95	161,05 ± 52,65	264,94 ± 71,48	178,92 ± 2,13	234,23 ± 6,60	215,56 ± 3,51	230,48 ± 24,16	208,54 ± 0,18
Limoneno	5595,97 ± 453,22	8794,77 ± 358,36	5511,87 ± 1591,65	8262,28 ± 1862,98	6166,69 ± 220,40	8249,82 ± 178,51	7419,93 ± 172,08	8036,37 ± 571,91	7456,67 ± 42,21
Ocimeno	17,39 ± 0,47	11,94 ± 1,47	12,68 ± 5,52	21,24 ± 5,51	13,52 ± 1,15	18,78 ± 0,76	21,60 ± 0,85	15,26 ± 1,63	10,90 ± 0,38
α-Terpinoleno	1,25 ± 0,28	3,00 ± 0,55	1,57 ± 0,96	5,30 ± 1,72	1,90 ± 0,81	1,71 ± 0,90	3,72 ± 0,50	2,10 ± 0,49	1,36 ± 0,47
α-Tujeno	0,09 ± 0,04	0,27 ± 0,08	0,05 ± 0,02	0,04 ± 0,03	0,23 ± 0,06	0,47 ± 0,04	0,21 ± 0,02	0,30 ± 0,04	0,25 ± 0,01
Monoterpenos alcoholes									
Linolol	36,94 ± 0,70	55,87 ± 6,66	27,94 ± 11,09	47,94 ± 12,89	44,05 ± 3,15	50,25 ± 2,64	42,25 ± 0,39	51,10 ± 2,52	46,37 ± 1,63
4-Terpineol	0,53 ± 0,03	0,66 ± 0,09	0,29 ± 0,15	0,57 ± 0,26	0,51 ± 0,03	0,33 ± 0,01	0,22 ± 0,04	0,30 ± 0,08	0,23 ± 0,04
L-α-Terpineol	10,98 ± 0,04	17,09 ± 1,91	10,18 ± 4,30	15,57 ± 4,07	13,59 ± 0,96	17,03 ± 0,90	14,05 ± 0,33	16,79 ± 0,80	13,28 ± 0,37
Nerol	0,21 ± 0,01	0,30 ± 0,03	0,11 ± 0,06	0,20 ± 0,01	0,26 ± 0,03	0,40 ± 0,01	0,23 ± 0,01	0,30 ± 0,01	0,27 ± 0,02
Geraniol	0,28 ± 0,01	0,29 ± 0,08	0,15 ± 0,09	0,33 ± 0,15	0,25 ± 0,04	0,21 ± 0,02	0,16 ± 0,03	0,22 ± 0,04	0,19 ± 0,02
β-Citronelol	0,44 ± 0,04	N/D	N/D	N/D	N/D	5,05 ± 0,30	N/D	N/D	N/D
p-isogeraniol	0,29 ± 0,01	0,44 ± 0,01	0,21 ± 0,06	0,32 ± 0,10	0,28 ± 0,02	1,32 ± 0,08	0,29 ± 0,01	0,42 ± 0,06	0,39 ± 0,07
Monoterpenos aldehídos y cetonas									
Citronelal	1,65 ± 0,17	2,74 ± 0,43	1,72 ± 0,76	3,22 ± 0,88	1,88 ± 0,15	2,13 ± 0,07	2,51 ± 0,09	2,56 ± 0,27	2,94 ± 0,08
Nerol	0,51 ± 0,01	0,81 ± 0,16	0,48 ± 0,21	0,66 ± 0,17	0,56 ± 0,04	0,68 ± 0,03	0,70 ± 0,01	0,62 ± 0,02	0,67 ± 0,04
Geraniol	0,94 ± 0,04	1,43 ± 0,17	0,89 ± 0,36	1,19 ± 0,28	1,00 ± 0,06	1,13 ± 0,08	1,06 ± 0,08	1,11 ± 0,09	1,21 ± 0,03
Monoterpenos ésteres									
Nerol acetato	0,33 ± 0,01	0,39 ± 0,05	0,24 ± 0,12	0,35 ± 0,09	0,29 ± 0,04	0,33 ± 0,04	0,34 ± 0,02	0,32 ± 0,08	0,29 ± 0,04
Sesquiterpenos cíclicos									
β-Cubebena	1,41 ± 0,00	3,30 ± 0,43	1,54 ± 0,63	10,62 ± 0,06	1,61 ± 0,11	2,40 ± 0,27	2,34 ± 0,01	2,50 ± 0,26	2,37 ± 0,11
Bergamoteno	N/D	0,33 ± 0,07	0,15 ± 0,06	0,26 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,41 ± 0,10	0,24 ± 0,01	0,28 ± 0,01	0,19 ± 0,01
β-Elemeno	N/D	0,98 ± 0,12	0,44 ± 0,29	1,02 ± 0,46	0,49 ± 0,02	0,61 ± 0,12	0,75 ± 0,01	0,73 ± 0,09	0,67 ± 0,01
α-Copaeno	1,86 ± 0,04	4,02 ± 0,52	2,01 ± 0,87	3,87 ± 1,00	2,10 ± 0,08	3,04 ± 0,22	3,03 ± 0,01	3,11 ± 0,30	3,05 ± 0,13
Ciclosativen	N/D	0,21 ± 0,01	0,09 ± 0,08	0,15 ± 0,06	0,07 ± 0,03	0,19 ± 0,07	0,21 ± 0,04	0,20 ± 0,01	0,18 ± 0,02
Sativen	0,18 ± 0,04	0,24 ± 0,01	0,13 ± 0,03	0,30 ± 0,05	0,14 ± 0,01	0,15 ± 0,06	0,19 ± 0,04	0,18 ± 0,01	0,22 ± 0,01
Trans cariofileno	1,18 ± 0,02	0,98 ± 0,11	0,56 ± 0,12	0,63 ± 0,10	0,58 ± 0,03	0,92 ± 0,19	0,88 ± 0,09	0,76 ± 0,12	0,64 ± 0,04
Aromadendreno	N/D	0,10 ± 0,03	0,08 ± 0,02	N/D	N/D	0,16 ± 0,03	N/D	N/D	N/D
α-Bisaboleno	0,77 ± 0,04	0,16 ± 0,03	0,05 ± 0,02	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,20 ± 0,03	0,13 ± 0,01	0,16 ± 0,02	0,14 ± 0,01
Germaaceno D	0,36 ± 0,01	2,61 ± 0,37	1,24 ± 0,56	2,47 ± 0,68	1,25 ± 0,02	1,48 ± 0,11	1,74 ± 0,03	1,63 ± 0,18	1,54 ± 0,01
α-Murroleno	1,28 ± 0,03	11,15 ± 1,78	5,38 ± 2,29	9,06 ± 2,55	7,16 ± 0,29	6,77 ± 0,24	7,19 ± 0,10	6,68 ± 0,10	6,13 ± 0,09
Epi biciclosesquifelandreno	1,01 ± 0,08	3,16 ± 0,52	1,60 ± 0,72	2,35 ± 0,40	1,39 ± 0,04	2,36 ± 0,29	2,25 ± 0,24	2,22 ± 0,20	2,30 ± 0,14
β-Sesquifelandreno	1,01 ± 0,08	3,09 ± 0,27	1,39 ± 0,37	2,14 ± 0,36	1,96 ± 0,10	3,39 ± 0,16	2,17 ± 0,01	3,73 ± 0,31	3,06 ± 0,08
Sesquiterpenos lineales									
β-Farneseno	11,55 ± 1,22	8,74 ± 2,59	3,27 ± 1,38	6,92 ± 2,17	4,29 ± 0,63	6,34 ± 1,05	5,03 ± 0,28	4,30 ± 0,89	4,58 ± 0,26
α-Farneseno	64,66 ± 1,25	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
Alcoholes y aldehídos alifáticos									
1-Heptanol	0,15 ± 0,11	0,29 ± 0,08	0,17 ± 0,01	0,20 ± 0,03	0,19 ± 0,12	0,36 ± 0,09	0,21 ± 0,04	0,27 ± 0,10	0,36 ± 0,12
1-Octanol	1,00 ± 0,01	1,31 ± 0,16	0,77 ± 0,29	1,10 ± 0,34	1,06 ± 0,08	0,75 ± 0,03	0,90 ± 0,09	0,88 ± 0,05	1,10 ± 0,03
1-Nonanol	0,19 ± 0,06	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
Nonanal	1,72 ± 0,03	1,46 ± 0,23	0,99 ± 0,30	1,45 ± 0,42	1,16 ± 0,22	2,18 ± 0,12	1,31 ± 0,09	1,40 ± 0,25	1,89 ± 0,02
Decanal	12,02 ± 0,67	13,15 ± 1,03	9,10 ± 3,16	10,88 ± 2,77	9,37 ± 0,19	12,44 ± 0,75	10,42 ± 0,03	10,30 ± 1,31	12,13 ± 0,05
Contenido total CV	6135,88 ± 470,78	9503,47 ± 419,04	5941,93 ± 1735,89	8891,47 ± 2018,42	6710,73 ± 240,11	8965,26 ± 205,47	8004,18 ± 190,07	8651,13 ± 636,60	7990,04 ± 53,45

Tabla 20. Efecto de la aplicación de etileno (5 ppm) y 1-MCP (1 ppm) individualmente o en combinación en el contenido de CVs mayoritarios en el flavedo de frutos del híbrido Ortanique. Cada valor corresponde a la media \pm DE de 2 réplicas. Los frutos se recolectaron en la campaña 2007/08.

$\mu\text{g/g PF}$	3d				6d			
	Aire	Etileno	MCP+Aire	MCP+Etileno	Aire	Etileno	MCP+Aire	MCP+Etileno
Monoterpenos hidrocarbonados								
Sabineno	80,56 \pm 11,99	94,08 \pm 5,20	65,11 \pm 4,91	72,38 \pm 9,77	66,05 \pm 7,33	78,62 \pm 2,02	133,02 \pm 0,15	85,92 \pm 2,66
α -Felandreno	ND	ND	ND	ND	1,28 \pm 0,09	1,64 \pm 0,02	2,23 \pm 0,05	1,89 \pm 0,11
3-Careno	1,60 \pm 0,10	1,27 \pm 0,22	1,72 \pm 0,21	2,00 \pm 0,63	1,13 \pm 0,12	1,29 \pm 0,20	2,06 \pm 0,27	1,63 \pm 0,51
β -Mirreno	479,12 \pm 56,84	357,31 \pm 19,47	323,39 \pm 8,84	346,60 \pm 13,57	330,36 \pm 39,85	366,47 \pm 3,64	481,48 \pm 6,38	325,71 \pm 1,23
Limoneno	13173,79 \pm 339,06	10287,07 \pm 384,01	10090,56 \pm 182,89	10726,21 \pm 15,15	10425,01 \pm 1154,30	11491,29 \pm 257,75	14751,93 \pm 590,87	10534,04 \pm 423,65
Ocimeno	42,91 \pm 4,71	40,32 \pm 2,28	26,13 \pm 0,89	26,82 \pm 1,54	29,81 \pm 4,80	35,46 \pm 0,57	62,49 \pm 0,41	39,84 \pm 0,21
α -Terpineno	2,68 \pm 0,48	1,58 \pm 0,09	2,65 \pm 0,54	2,17 \pm 0,10	1,67 \pm 0,75	3,23 \pm 0,70	3,23 \pm 0,51	1,94 \pm 0,22
Monoterpenos alcoholes								
Linalol	24,21 \pm 2,26	55,84 \pm 1,31	17,00 \pm 1,00	18,16 \pm 1,02	18,38 \pm 2,58	18,41 \pm 0,77	24,45 \pm 0,39	18,50 \pm 1,10
4-Terpineol	0,75 \pm 0,03	0,49 \pm 0,01	0,42 \pm 0,01	0,48 \pm 0,04	0,43 \pm 0,11	0,52 \pm 0,03	0,72 \pm 0,01	0,42 \pm 0,09
L- α -Terpineol	20,67 \pm 2,30	16,34 \pm 0,50	14,40 \pm 0,94	3,97 \pm 0,40	14,89 \pm 2,27	15,89 \pm 0,84	21,29 \pm 0,31	15,25 \pm 1,04
Nerol	2,30 \pm 0,32	2,35 \pm 0,13	1,42 \pm 0,10	0,08 \pm 0,01	1,70 \pm 0,26	1,85 \pm 0,13	2,41 \pm 0,24	1,87 \pm 0,08
Geraniol	0,61 \pm 0,02	0,57 \pm 0,04	0,37 \pm 0,03	0,45 \pm 0,02	0,33 \pm 0,03	0,71 \pm 0,02	0,73 \pm 0,10	0,54 \pm 0,01
β -Citronelol	3,92 \pm 0,43	1,61 \pm 0,11	1,86 \pm 0,16	2,87 \pm 0,13	2,40 \pm 0,37	3,03 \pm 0,10	3,10 \pm 0,06	1,53 \pm 0,12
Isogeraniol	0,35 \pm 0,01	0,23 \pm 0,01	0,20 \pm 0,03	0,24 \pm 0,01	0,05 \pm 0,01	0,20 \pm 0,01	0,34 \pm 0,01	0,20 \pm 0,01
Monoterpenos aldehídos y cetonas								
Citronelal	12,36 \pm 1,23	5,92 \pm 0,36	7,24 \pm 0,45	7,66 \pm 0,44	8,57 \pm 1,12	9,37 \pm 0,08	9,43 \pm 0,23	5,59 \pm 0,20
β -Cicloctral	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,11 \pm 0,01	N/D
Neral	4,45 \pm 0,49	3,95 \pm 0,19	3,27 \pm 0,21	3,32 \pm 0,13	3,42 \pm 0,51	3,32 \pm 0,16	4,78 \pm 0,02	3,67 \pm 0,19
Geraniol	8,18 \pm 0,69	7,65 \pm 0,35	6,37 \pm 0,23	2,85 \pm 0,28	6,19 \pm 0,77	7,03 \pm 0,12	9,52 \pm 0,21	7,27 \pm 0,58
Monoterpenos ésteres								
Geraniol acetato	0,42 \pm 0,04	0,45 \pm 0,04	0,34 \pm 0,04	1,73 \pm 0,18	0,37 \pm 0,07	0,62 \pm 0,03	0,69 \pm 0,01	0,45 \pm 0,01
Citronelol acetato	1,17 \pm 0,08	0,36 \pm 0,02	0,55 \pm 0,09	0,62 \pm 0,08	0,89 \pm 0,08	1,07 \pm 0,00	0,60 \pm 0,02	0,40 \pm 0,03
Sesquiterpenos cíclicos								
β -Cubebeno	0,11 \pm 0,04	0,25 \pm 0,04	0,08 \pm 0,01	0,10 \pm 0,01	0,09 \pm 0,02	0,10 \pm 0,02	0,14 \pm 0,00	0,07 \pm 0,02
δ -Elemeno	1,06 \pm 0,17	1,06 \pm 0,02	0,98 \pm 0,08	0,96 \pm 0,02	0,85 \pm 0,19	1,05 \pm 0,07	1,31 \pm 0,09	1,16 \pm 0,01
β -Elemeno	3,16 \pm 0,48	0,10 \pm 0,01	0,95 \pm 0,24	0,98 \pm 0,07	1,17 \pm 0,22	1,14 \pm 0,17	1,58 \pm 0,16	0,96 \pm 0,08
p-Elemeno	0,14 \pm 0,04	0,12 \pm 0,02	0,12 \pm 0,01	0,09 \pm 0,03	0,10 \pm 0,03	0,15 \pm 0,04	0,16 \pm 0,01	0,14 \pm 0,02
α -Copaeno	2,87 \pm 0,26	1,71 \pm 0,09	1,66 \pm 0,09	1,81 \pm 0,11	2,00 \pm 0,22	2,25 \pm 0,06	2,37 \pm 0,13	1,53 \pm 0,11
β -Selineno	0,28 \pm 0,05	0,07 \pm 0,01	0,19 \pm 0,03	0,23 \pm 0,04	0,19 \pm 0,02	0,26 \pm 0,03	0,30 \pm 0,03	0,18 \pm 0,02
α -Selineno	0,10 \pm 0,02	0,13 \pm 0,01	ND	0,10 \pm 0,02	0,11 \pm 0,04	0,22 \pm 0,02	0,10 \pm 0,04	0,14 \pm 0,02
Trans cariofileno	1,08 \pm 0,36	0,97 \pm 0,06	0,68 \pm 0,11	0,93 \pm 0,06	0,83 \pm 0,03	0,73 \pm 0,23	1,14 \pm 0,06	0,93 \pm 0,20
α -Humuleno	1,55 \pm 0,13	0,93 \pm 0,06	0,88 \pm 0,05	0,96 \pm 0,05	1,05 \pm 0,15	1,24 \pm 0,03	1,30 \pm 0,11	0,89 \pm 0,05
Germacreno D	3,02 \pm 0,43	2,23 \pm 0,11	2,07 \pm 0,20	3,08 \pm 0,28	2,25 \pm 0,28	2,49 \pm 0,06	2,82 \pm 0,12	2,26 \pm 0,04
Germacreno B	0,67 \pm 0,20	0,46 \pm 0,05	0,46 \pm 0,15	1,167 \pm 0,76	0,45 \pm 0,07	0,54 \pm 0,12	1,36 \pm 0,06	0,45 \pm 0,07
Valenceno	2,65 \pm 0,03	2,56 \pm 0,21	2,16 \pm 0,10	0,09 \pm 0,04	2,23 \pm 0,25	4,96 \pm 0,13	3,85 \pm 0,20	3,13 \pm 0,05
α -Muroloeno	8,47 \pm 1,23	6,11 \pm 0,53	4,77 \pm 0,24	0,35 \pm 0,02	5,27 \pm 0,57	6,61 \pm 0,25	7,94 \pm 0,28	5,27 \pm 0,01
δ -Cadineno	0,23 \pm 0,01	0,14 \pm 0,04	0,10 \pm 0,00	0,46 \pm 0,02	0,11 \pm 0,03	0,15 \pm 0,01	0,10 \pm 0,01	0,12 \pm 0,00
Epi biciclosesquifelandreno	1,76 \pm 0,33	0,11 \pm 0,03	0,96 \pm 0,11	0,99 \pm 0,02	1,16 \pm 0,12	1,33 \pm 0,07	1,34 \pm 0,05	0,91 \pm 0,01
Sesquiterpenos lineales								
β -Farneseno	4,72 \pm 0,19	3,56 \pm 0,53	2,76 \pm 0,71	2,73 \pm 0,13	2,67 \pm 0,46	4,66 \pm 0,22	7,54 \pm 0,30	3,65 \pm 0,15
Aldehídos y alcoholes alifáticos								
Decanal	10,04 \pm 1,29	8,55 \pm 0,48	7,50 \pm 0,34	7,83 \pm 0,40	6,93 \pm 0,80	8,62 \pm 0,10	11,22 \pm 0,20	8,43 \pm 0,10
1-Octanol	1,85 \pm 0,21	3,91 \pm 0,18	1,09 \pm 0,14	1,45 \pm 0,04	1,22 \pm 0,14	1,94 \pm 0,05	1,80 \pm 0,09	1,46 \pm 0,03
Contenido total CV	13959,22 \pm 431,49	10928,48 \pm 417,17	10634,96 \pm 206,75	11312,13 \pm 43,50	11403,76 \pm 1152,21	12120,34 \pm 270,73	15625,43 \pm 603,50	11126,97 \pm 435,36

Tabla 21. Efecto de la aplicación de etileno (5 ppm) y 1-MCP (1 ppm) individualmente o en combinación en el contenido de CVs mayoritarios en el flaveado de frutos de la naranja Navelate. Cada valor corresponde a la media \pm DE de 2 réplicas. Los frutos se recolectaron en la campaña 2009/10.

µg/g PF	INICIO			3d			6d			
	Aire	Etileno	MCP+Aire	Aire	Etileno	MCP+Etileno	Aire	Etileno	MCP+Aire	MCP+Etileno
Monoterpenos hidrocarbonados										
β-Pineno	3.51 ± 0.11	N.D.	N.D.	81,12 ± 9.59	N.D.	N.D.	122,96 ± 0.49	N.D.	N.D.	N.D.
Sabineno	179,82 ± 5,10	112,69 ± 21,27	6,68	58,69 ± 3,65	55,81 ± 6,68	63,95 ± 11,63	56,46 ± 0,76	167,30 ± 18,89	87,86 ± 7,42	129,90 ± 7,64
3-Careno	74,97 ± 4,35	55,81 ± 6,68	6,68	58,69 ± 3,65	55,81 ± 6,68	63,95 ± 11,63	56,46 ± 0,76	167,30 ± 18,89	87,86 ± 7,42	129,90 ± 7,64
β-Mirceno	321,08 ± 10,29	241,05 ± 42,96	19,10	253,21 ± 19,10	241,05 ± 42,96	294,86 ± 17,70	290,73 ± 3,54	273,30 ± 35,84	253,12 ± 23,41	283,76 ± 7,78
Limoneno	9346,93 ± 371,35	6753,61 ± 997,04	495,11	7903,18 ± 403,02	6753,61 ± 997,04	8596,59 ± 20,29	8309,63 ± 1308,32	8628,86 ± 1187,38	7525,81 ± 389,66	8204,22 ± 114,15
Ocimeno	21,43 ± 0,34	15,16 ± 3,47	0,81	10,85 ± 0,06	15,16 ± 3,47	20,57 ± 0,81	16,01 ± 0,84	12,80 ± 0,08	14,27 ± 2,46	15,41 ± 0,19
α-Terpineno	22,13 ± 0,67	25,33 ± 5,77	0,31	15,42 ± 0,31	15,06 ± 2,71	17,56 ± 0,33	17,03 ± 1,96	17,57 ± 2,64	18,16 ± 2,79	20,72 ± 0,97
α-Tujeno	3,74 ± 0,81	3,00 ± 0,05	0,46	2,63 ± 0,46	3,00 ± 0,05	2,77 ± 0,18	3,73 ± 0,56	2,21 ± 0,03	3,05 ± 0,37	2,87 ± 1,20
Monoterpenos alcoholes										
Linalol	67,25 ± 0,47	42,55 ± 7,22	2,58	37,18 ± 2,58	42,55 ± 7,22	48,23 ± 0,78	43,80 ± 1,88	46,33 ± 3,02	41,50 ± 4,08	52,43 ± 0,25
4-Terpineol	0,61 ± 0,05	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
L-α-Terpineol	21,81 ± 0,16	21,20 ± 3,66	0,54	19,51 ± 0,54	21,20 ± 3,66	19,87 ± 2,56	20,49 ± 3,65	23,68 ± 2,03	14,61 ± 2,08	23,25 ± 0,10
Nerol	1,24 ± 0,07	1,24 ± 0,27	0,03	1,03 ± 0,03	1,24 ± 0,27	1,32 ± 0,02	1,14 ± 0,01	1,08 ± 0,01	0,80 ± 0,12	1,78 ± 0,03
Geraniol	1,02 ± 0,06	1,07 ± 0,17	0,02	1,06 ± 0,02	1,07 ± 0,17	1,35 ± 0,02	1,10 ± 0,14	0,86 ± 0,09	0,58 ± 0,04	0,87 ± 0,32
β-Citronelol	0,60 ± 0,05	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0,86 ± 0,16
p-isogeraniol	0,26 ± 0,02	0,40 ± 0,09	N.D.	N.D.	0,30 ± 0,03	0,31 ± 0,06	0,25 ± 0,06	N.D.	N.D.	0,25 ± 0,02
Monoterpenos aldehídos y cetonas										
Citronelal	1,59 ± 0,08	0,91 ± 0,11	0,86 ± 0,08	0,86 ± 0,08	0,91 ± 0,11	1,21 ± 0,12	1,08 ± 0,10	1,02 ± 0,07	0,91 ± 0,11	1,38 ± 0,14
Neral	7,31 ± 0,18	6,71 ± 1,01	0,20	6,17 ± 0,20	6,71 ± 1,01	7,26 ± 0,01	7,17 ± 0,46	6,93 ± 0,49	6,83 ± 0,88	8,87 ± 0,08
Geraniol	11,92 ± 0,57	11,02 ± 1,93	0,38	10,54 ± 0,38	11,02 ± 1,93	11,41 ± 0,16	11,52 ± 0,81	11,31 ± 0,90	9,97 ± 0,94	14,81 ± 0,08
Monoterpenos ésteres										
Nerol acetato	1,26 ± 0,05	1,66 ± 0,20	1,80 ± 0,31	1,80 ± 0,31	1,66 ± 0,20	1,75 ± 0,02	1,64 ± 0,02	1,22 ± 0,08	1,09 ± 0,34	2,55 ± 0,11
Citronelol acetato	0,10 ± 0,01	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Sesquiterpenos cíclicos										
β-Cubebeno	2,73 ± 0,06	1,61 ± 0,26	1,59 ± 0,04	1,59 ± 0,04	1,61 ± 0,26	1,70 ± 0,11	2,07 ± 0,26	1,70 ± 0,06	1,25 ± 0,05	1,84 ± 0,07
β-Biomeno	1,57 ± 0,02	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
α-Copaeno	3,08 ± 0,04	2,45 ± 0,41	0,14	2,31 ± 0,14	2,45 ± 0,41	2,72 ± 0,05	2,94 ± 0,41	2,31 ± 0,13	1,94 ± 0,12	2,69 ± 0,05
Ciclosativen	0,12 ± 0,01	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Trans cariofileno	2,82 ± 0,49	0,46 ± 0,04	0,03	N.D.	0,46 ± 0,04	4,52 ± 0,18	6,39 ± 2,52	3,13 ± 0,20	0,27 ± 0,09	0,43 ± 0,06
α-Humuleno	0,71 ± 0,02	0,52 ± 0,08	0,04	0,47 ± 0,04	0,52 ± 0,08	0,60 ± 0,09	0,54 ± 0,05	0,51 ± 0,01	0,35 ± 0,04	0,60 ± 0,01
Aromadendreno	N.D.	3,50 ± 1,94	0,26	4,05 ± 0,26	3,50 ± 1,94	N.D.	N.D.	0,76 ± 0,01	2,67 ± 0,07	4,95 ± 0,01
Germacreno D	2,52 ± 0,12	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Germacreno B	0,68 ± 0,12	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
α-Murroleno	0,46 ± 0,01	4,26 ± 0,70	0,20	3,22 ± 0,20	4,26 ± 0,70	4,46 ± 0,17	4,36 ± 0,69	4,46 ± 0,15	2,56 ± 0,17	4,51 ± 0,15
δ-Cadineno	5,85 ± 0,20	3,81 ± 0,38	0,09	3,22 ± 0,20	3,81 ± 0,38	0,89 ± 0,09	2,66 ± 0,98	4,46 ± 0,15	0,88 ± 0,13	4,51 ± 0,15
Epiciclosesquifelandreno	1,63 ± 0,16	3,50 ± 1,94	0,09	3,22 ± 0,20	3,50 ± 1,94	0,89 ± 0,09	2,66 ± 0,98	4,46 ± 0,15	0,88 ± 0,13	4,51 ± 0,15
Sesquiterpenos lineales										
β-Farneseno	8,57 ± 0,32	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	4,26 ± 0,79	4,18 ± 2,03	N.D.
Alcoholes y aldehídos alifáticos										
Octanal	66,73 ± 2,33	55,78 ± 10,69	2,96	53,22 ± 2,96	55,78 ± 10,69	67,21 ± 1,10	93,56 ± 4,44	72,82 ± 5,49	64,16 ± 5,20	55,79 ± 0,75
Nonanal	8,45 ± 0,32	8,11 ± 1,14	1,14	6,16 ± 0,73	8,11 ± 1,14	7,43 ± 0,13	9,54 ± 0,69	7,56 ± 0,42	7,25 ± 0,61	5,96 ± 0,56
Decanal	16,70 ± 0,33	14,58 ± 2,33	1,68	12,90 ± 0,67	14,58 ± 2,33	16,86 ± 0,09	22,72 ± 1,96	18,60 ± 0,88	16,11 ± 0,97	13,51 ± 0,15
Dodecanal	2,26 ± 0,06	2,28 ± 0,38	0,25	2,16 ± 0,33	2,28 ± 0,38	2,30 ± 0,01	4,01 ± 0,46	3,86 ± 0,45	2,12 ± 0,55	2,07 ± 0,16
1-Octanol	1,85 ± 0,03	3,45 ± 0,41	0,41	1,73 ± 0,09	3,45 ± 0,41	2,71 ± 0,40	4,95 ± 0,04	2,64 ± 0,43	2,61 ± 0,14	3,07 ± 0,79
Contenido total CV	10228,07 ± 399,94	8494,31 ± 532,60	532,60	8496,97 ± 446,08	7388,51 ± 1110,88	9375,97 ± 68,15	9068,92 ± 1337,82	9381,77 ± 1273,65	8154,82 ± 453,31	8941,31 ± 141,81

En las tres variedades estudiadas se identificaron un amplio número de sesquiterpenos, mayor en los frutos de Navelate y Ortanique al inicio del experimento. Entre los cíclicos destacó, por su abundancia y por estar presente en todas las variedades, el α -copaeno (2-4 $\mu\text{g/g}$ PF). Otros sesquiterpenos importantes fueron el muroleno (en Clemenules y Ortanique, entre 4 y 10 $\mu\text{g/g}$ PF), el germacreno D (en Clemenules y Ortanique, entre 1 y 3 $\mu\text{g/g}$ PF) y el β -cubebeno (en Clemenules y Navelate, entre 1 y 3 $\mu\text{g/g}$ PF). El epi-biciclosesquifelandreno también se detectó en las 3 variedades, aunque en concentraciones variables, y el δ -cadineno fue exclusivo de Navelate, en concentraciones relativamente elevadas (entre 2,5 y 5,6 $\mu\text{g/g}$ PF). El β -sesquifelandreno sólo se encontró en Clemenules (entre 1 y 3,7 $\mu\text{g/g}$ PF), mientras que el valenceno únicamente se detectó en el flavedo de frutos de Ortanique y alcanzó su contenido máximo en los frutos tratados 6 días con etileno (4,96 $\mu\text{g/g}$ PF).

El grupo de los aldehídos y alcoholes alifáticos fue relativamente abundante, siendo el principal representante el octanal en Navelate, y el decanal en Clemenules y Ortanique. Por último, destacar que no se identificaron ésteres alifáticos en los extractos del flavedo en ninguna de las variedades, ni por ningún tratamiento, a diferencia de su marcada emisión en los frutos de las variedades Ortanique y Navelate en respuesta al etileno (**Tablas 19, 20 y 21**).

3. Efecto de la aplicación de etileno y del inhibidor de su acción, 1-MCP, en la expresión de diferentes terpeno sintasas en el flavedo de frutos virando de la mandarina Clemenules, el híbrido Ortanique y la naranja Navelate

El efecto del tratamiento con etileno y del inhibidor de su acción, 1-MCP, sobre la expresión de genes implicados en la biosíntesis de CVs se analizó en el flavedo de los frutos de las tres variedades estudiadas. Mediante RT-qPCR se determinó la expresión relativa de siete terpeno sintasas: β -pineno sintasa (β -PIN), limoneno sintasa 1 (*LIM 1*), limoneno sintasa 2 (*LIM 2*), ocimeno sintasa (*OCl*), linalol sintasa (*LIN*), valenceno sintasa (*VAL*) y *TPS3* (sesquiterpeno sintasa multiproducto) (**Figuras 18, 19 y 20**). Para comparar con exactitud la expresión de un mismo gen entre las diferentes variedades, los valores de expresión para cada gen, excepto el gen *LIN*, se normalizaron respecto a los valores obtenidos en el flavedo de frutos de Ortanique recién recolectados, a los que se les asignó un valor relativo de 1. Los valores de expresión del gen *LIN* se normalizaron respecto al de los frutos de Clemenules tratados con etileno durante 6 días, ya que en frutos de Ortanique la expresión del gen *LIN* fue extremadamente baja.

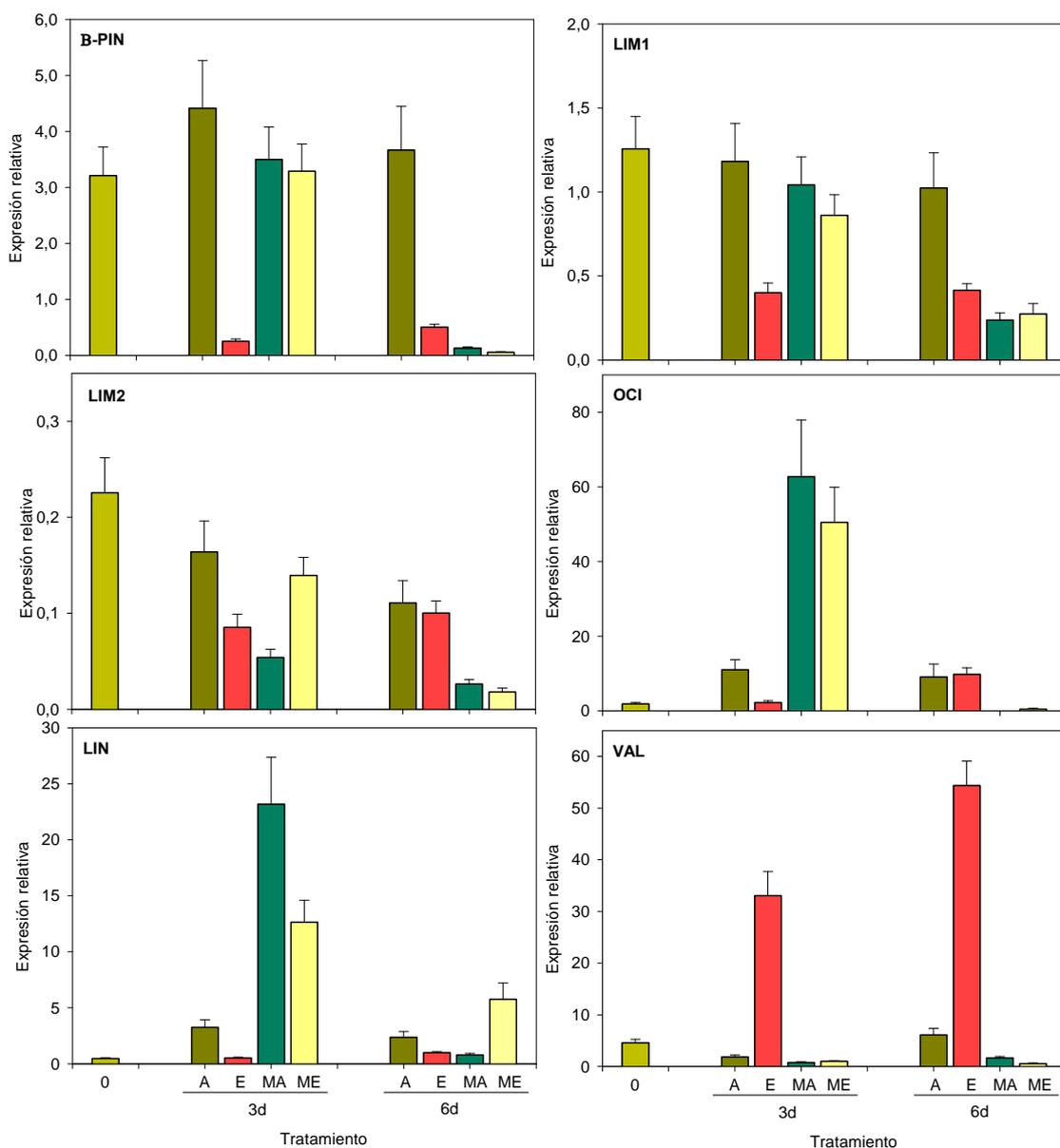


Figura 18. Efecto de la aplicación de etileno (5 ppm) y 1-MCP (1 ppm) individualmente o en combinación, en la expresión relativa de 6 genes de terpeno sintasas en el flavedo de frutos de la mandarina Clemenules. Los genes analizados fueron: β -pineno sintasa (*β -PIN*), limoneno sintasa 1 y 2 (*LIM 1* y *LIM 2*), ocimeno sintasa (*OCI*), linalol sintasa (*LIN*) y valenceno sintasa (*VAL*). Los valores obtenidos para cada gen están normalizados frente al nivel de expresión del flavedo de frutos de Ortanique en el estadio V, al que se le asignó un valor relativo de 1, excepto para el gen *LIN* que se normalizó frente al flavedo de Clemenules tratado con etileno 6 días.

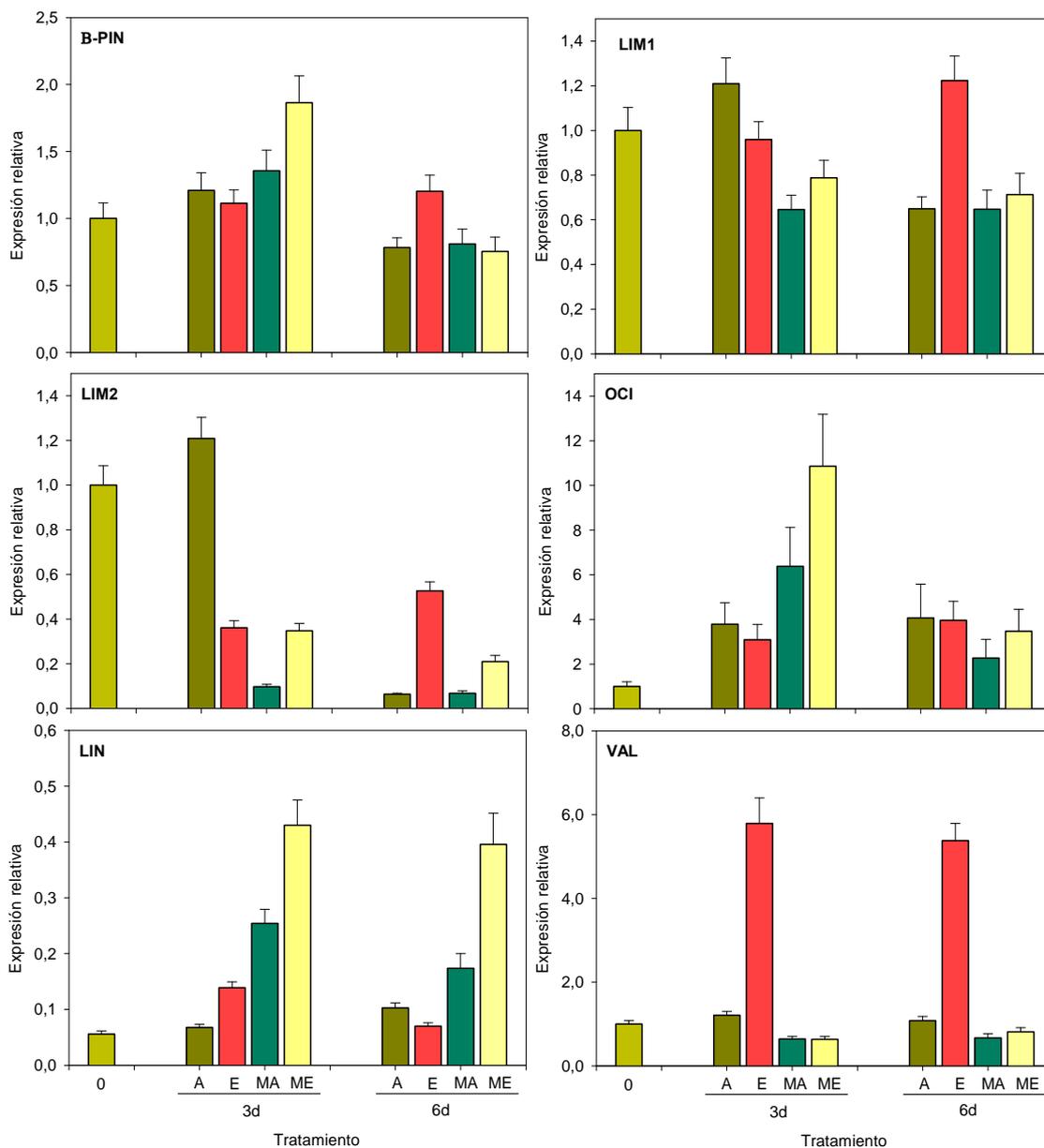


Figura 19. Efecto de la aplicación de etileno (5 ppm) y 1-MCP (1 ppm) individualmente o en combinación, en la expresión relativa de 6 genes de terpeno sintasas en el flavedo de frutos del híbrido Ortanique. Los genes analizados fueron: β -pineno sintasa (β -PIN), limoneno sintasa 1 y 2 (LIM 1 y LIM 2), ocimeno sintasa (OCI), linalol sintasa (LIN) y valenceno sintasa (VAL). Los valores obtenidos para cada gen, están normalizados frente al nivel de expresión del flavedo de frutos de Ortanique en el estadio V, al que se le asignó un valor relativo de 1, excepto para el gen LIN que se normalizó frente al flavedo de Clemenules tratado con etileno 6 días.

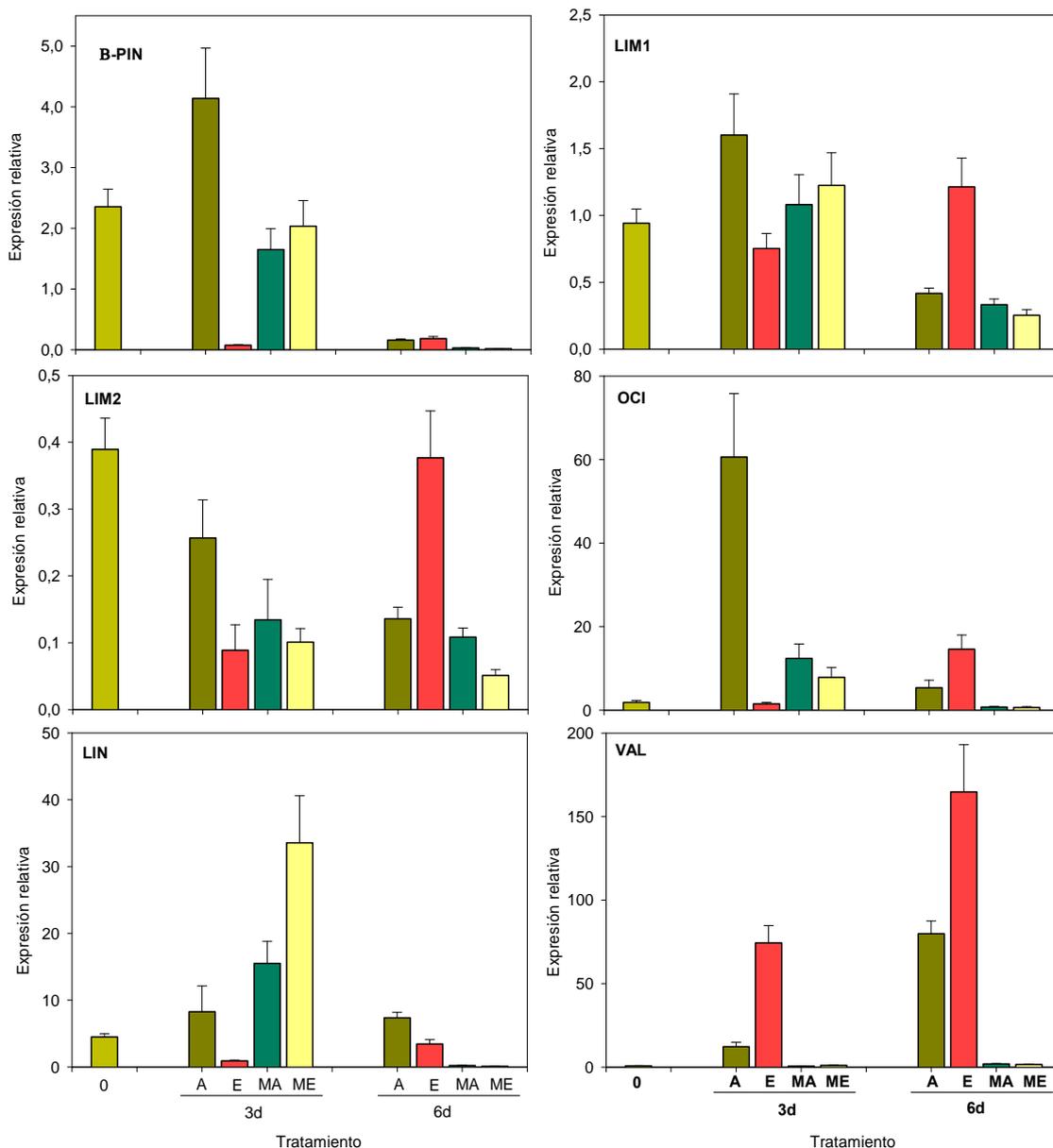


Figura 20. Efecto de la aplicación de etileno (5 ppm) y 1-MCP (1 ppm) individualmente o en combinación, en la expresión relativa de 6 genes de terpeno sintasas en el flavedo de frutos de la naranja Navelate. Los genes analizados fueron: β -pineno sintasa (β -PIN), limoneno sintasa 1 y 2 (*LIM 1* y *LIM 2*), ocimeno sintasa (*OCI*), linalol sintasa (*LIN*) y valenceno sintasa (*VAL*). Los valores obtenidos para cada gen, están normalizados frente al nivel de expresión del flavedo de frutos de Ortanique en el estadio V, al que se le asignó un valor relativo de 1, excepto para el gen *LIN* que se normalizó frente al flavedo de Clemenules tratado con etileno 6 días.

Las distintas terpeno sintasas analizadas mostraron diferentes patrones de expresión en respuesta a los diferentes tratamientos. En general, para un mismo gen el perfil de expresión en respuesta a los diferentes tratamientos fue similar en las tres variedades, lo que indica un patrón de regulación similar, a pesar de que los valores de expresión relativa para los diferentes genes fueron distintos entre variedades. Los niveles de expresión relativa de *LIM 1* fueron muy similares entre las tres variedades, mientras que *LIM 2* se expresó a más bajos niveles en

Clemenules y Navelate que en Ortanique. En general, en los frutos de las tres variedades la expresión de ambos genes descendió durante la conservación en aire, pero en mayor medida por el tratamiento con etileno a los 3 días. En Clemenules y Ortanique el efecto represor del etileno se perdió a los 6 días, para alcanzar valores superiores (**Figuras 18, 19 y 20**).

El patrón de expresión de los genes β -*PIN* y *OCI* en respuesta a los diferentes tratamientos fue similar aunque se encontraron algunas diferencias destacables. El efecto más significativo de la expresión del gen β -*PIN* en Clemenules fue la represión por etileno a los 3 días, mientras que posteriormente se redujo también por los otros tratamientos. Respecto al gen *OCI* en la mandarina, se observó una activación a los 3 días en los frutos pre-tratados con 1-MCP, que desapareció posteriormente. Es interesante mencionar que los niveles de expresión del gen β -*PIN* fueron en rangos similares en los frutos de las tres variedades, mientras que los del gen *OCI* alcanzaron niveles de expresión muy superiores en los de Clemenules y Navelate (**Figuras 18 y 20**). En Ortanique la expresión relativa de β -*PIN* y *OCI* fue máxima a los 3 días en los frutos tratados con 1-MCP+etileno, mientras que en el resto de tratamientos se mantuvo a niveles estables y similares a los iniciales (**Figura 19**). En los frutos de naranja, la máxima expresión de β -*PIN* y *OCI* se alcanzó a los 3 días en los frutos almacenados en aire, mientras que el etileno redujo su expresión entre 45 y 15 veces en el caso de la β -*PIN* y *OCI*, respectivamente. Después de 6 días, la expresión de ambos genes fue baja en todos los tratamientos (**Figura 20**).

La expresión de *LIN* se estimuló en respuesta al pre-tratamiento con 1-MCP en todas las variedades y, en general, fue menor en los frutos tratados con etileno respecto al resto de tratamientos. Es interesante mencionar que los niveles de expresión relativa de *LIN* fueron similares en Navelate y Clemenules, mientras que en Ortanique fueron más de 50 veces menores.

La sesquiterpeno sintasa *VAL* mostró un claro incremento de la expresión en respuesta al tratamiento con etileno en las tres variedades, siendo el efecto relativo mucho mayor en los frutos de Navelate, seguido de Clemenules y Ortanique. Es interesante mencionar que en los frutos de naranja incubados en aire los niveles de transcritos de la *VAL* también se incrementaron, pero no en las otras variedades y en todas ellas el pre-tratamiento con 1-MCP redujo su expresión (**Figuras 18, 19 y 20**). En cuanto a la sesquiterpeno sintasa multiproducto *TPS3* no se detectó expresión significativa en ninguna de las muestras analizadas excepto en el flavedo de Navelate al inicio del experimento (datos no mostrados)

4. Efecto de la aplicación de etileno y el inhibidor de su acción, 1-MCP sobre la biosíntesis de CVs en frutos maduros de la naranja Navelate

El objetivo de este apartado fue comprobar si el efecto del etileno en la emisión y contenido de CVs, y en la expresión de genes de terpeno sintasas puede depender del estado de maduración del fruto. Por ello, se utilizaron frutos maduros totalmente coloreados ($a/b = 0,60 \pm 0,04$) de la naranja Navelate y se sometieron a los mismos tratamientos descritos en el apartado anterior para frutos virando, y así comparar el efecto del etileno exógeno y de la inhibición de su acción por 1-MCP en ambos estadios de maduración. En la **Figura 21** se muestra el aspecto y los cambios en el color externo de los frutos maduros de la naranja Navelate, donde se comprobó que el etileno estimuló la coloración del fruto ($0,78 \pm 0,05$), mientras que el resto de tratamientos se mantuvieron relativamente constantes a lo largo del experimento.

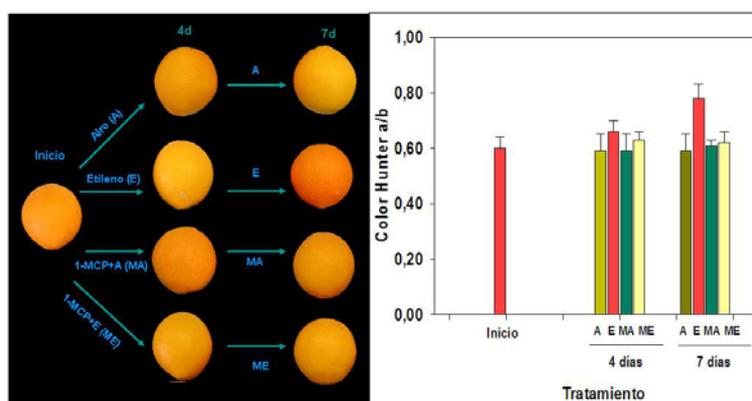


Figura 21. Aspecto y color externo de frutos maduros de la naranja Navelate sometidos a los siguientes tratamientos postcosecha: atmósfera de aire (A), etileno (E) (5 ppm), 1-MCP (1 ppm)+aire (MA) y 1-MCP (1 ppm)+etileno (5 ppm) (ME). El color de los frutos (parámetro Hunter a/b) es la media de al menos 6 frutos. Los frutos se recolectaron durante la campaña 2007/08.

4.1. Efecto de la aplicación de etileno y del inhibidor de su acción, 1-MCP, en la emisión de CVs en frutos maduros de la naranja Navelate

En la emisión de CVs en frutos maduros de la naranja Navelate se identificaron un total de 76 componentes diferentes. En todos los tratamientos, al igual que lo observado durante la maduración natural (capítulo I), los monoterpenos fueron los componentes más abundantes, mientras que los sesquiterpenos los de mayor diversidad. En los frutos tratados con etileno tuvieron especial relevancia el grupo de los ésteres alifáticos, especialmente a los 7 días del tratamiento (**Tabla 22**).

Entre los diferentes tratamientos se observaron diferencias importantes en la emisión de CVs. La mayor emisión se produjo en los frutos recién cosechados, que descendió bruscamente (70%) solo tres días después de la recolección, para aumentar a los 7 días a valores del doble. Este fuerte descenso se redujo parcialmente en los frutos pre-tratados con 1-MCP, así como en los tratados con etileno, que experimentaron un descenso más moderado (**Tabla 22**).

Tabla 22. Efecto de la aplicación de etileno (5 ppm) y 1-MCP (1 ppm) individualmente o en combinación sobre la emisión de los CVs mayoritarios en frutos maduros de la naranja Navelate. Cada valor corresponde a la media \pm DE de al menos 3 réplicas de 6 frutos cada una. Los frutos se recolectaron en la campaña 2007/08.

ng/g PF	INICIO	4d				7d			
		Aire	Etileno	MCP+Aire	MCP+Etileno	Aire	Etileno	MCP+Aire	MCP+Etileno
Monoterpenos hidrocarburos									
Sabineno	1,80 \pm 0,33	0,32 \pm 0,02	1,92 \pm 0,24	0,98 \pm 0,27	1,21 \pm 0,26	1,67 \pm 0,35	1,23 \pm 0,37	0,50 \pm 0,04	1,30 \pm 0,27
β -Careno	0,45 \pm 0,12	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
β -Mirreno	2,52 \pm 0,85	0,65 \pm 0,03	2,27 \pm 0,57	1,00 \pm 0,18	1,51 \pm 0,18	1,60 \pm 0,29	1,99 \pm 0,18	0,67 \pm 0,03	2,26 \pm 0,15
Limono	86,60 \pm 5,46	21,91 \pm 0,77	72,34 \pm 1,08	30,11 \pm 1,49	48,35 \pm 1,34	48,23 \pm 0,37	66,94 \pm 14,90	23,87 \pm 0,10	65,15 \pm 3,06
Ocimeno	0,32 \pm 0,02	0,80 \pm 0,05	4,83 \pm 0,60	3,61 \pm 0,25	1,76 \pm 0,23	1,27 \pm 0,06	0,78 \pm 0,03	0,30 \pm 0,04	0,30 \pm 0,02
Monoterpenos alcoholes									
Linalol	0,15 \pm 0,03	0,08 \pm 0,05	Tr	Tr	Tr	Tr	N/D	Tr	Tr
Sesquiterpenos cíclicos									
β -Bemeno	0,03 \pm 0,01	Tr	0,04 \pm 0,01	Tr	Tr	0,04 \pm 0,01	0,56 \pm 0,02	Tr	Tr
β -Selineno	0,64 \pm 0,17	0,17 \pm 0,02	0,22 \pm 0,05	0,16 \pm 0,01	0,21 \pm 0,01	0,26 \pm 0,04	0,21 \pm 0,01	0,25 \pm 0,01	0,27 \pm 0,01
Isocarilofeno	0,07 \pm 0,01	0,49 \pm 0,06	0,68 \pm 0,07	0,47 \pm 0,03	0,52 \pm 0,09	0,73 \pm 0,11	0,73 \pm 0,05	0,47 \pm 0,02	0,78 \pm 0,01
Trans cariofileno	7,07 \pm 2,71	3,01 \pm 0,31	2,78 \pm 0,50	2,90 \pm 0,22	3,02 \pm 0,43	4,92 \pm 0,55	0,68 \pm 0,08	3,16 \pm 0,20	3,74 \pm 0,18
α -Humuleno	0,12 \pm 0,02	0,09 \pm 0,01	0,10 \pm 0,03	0,09 \pm 0,01	0,08 \pm 0,01	0,22 \pm 0,01	0,06 \pm 0,01	0,13 \pm 0,01	0,15 \pm 0,01
Aromadendreno	N/D	Tr	0,06 \pm 0,02	0,04 \pm 0,01	0,04 \pm 0,01	0,07 \pm 0,01	0,06 \pm 0,01	N/D	0,07 \pm 0,01
α -Gurjuneno	0,34 \pm 0,11	0,12 \pm 0,02	0,14 \pm 0,02	0,10 \pm 0,01	0,12 \pm 0,01	0,15 \pm 0,01	0,14 \pm 0,01	0,12 \pm 0,01	0,52 \pm 0,03
β -Chamigreno	0,32 \pm 0,06	0,12 \pm 0,01	0,15 \pm 0,03	0,12 \pm 0,01	0,15 \pm 0,01	0,22 \pm 0,03	0,15 \pm 0,01	0,14 \pm 0,01	0,39 \pm 0,02
Valenceno	18,76 \pm 5,84	5,81 \pm 0,37	7,34 \pm 1,08	5,59 \pm 0,40	6,78 \pm 0,09	8,80 \pm 1,02	7,48 \pm 0,26	6,83 \pm 0,20	9,27 \pm 0,79
α -Panansineno	0,67 \pm 0,14	0,32 \pm 0,03	0,52 \pm 0,06	0,32 \pm 0,03	0,37 \pm 0,01	0,58 \pm 0,08	0,55 \pm 0,04	0,50 \pm 0,02	0,68 \pm 0,06
Aldehídos y alcoholes alifáticos									
Decanal	0,04 \pm 0,02	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	N/D	N/D	N/D
1-Hexanol	N/D	N/D	0,69 \pm 0,20	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
Ésteres alifáticos									
1-Hexil acetato	N/D	N/D	0,20 \pm 0,10	N/D	N/D	N/D	0,12 \pm 0,02	N/D	N/D
Butil butanoato	N/D	N/D	0,19 \pm 0,10	N/D	N/D	Tr	0,19 \pm 0,16	N/D	N/D
Hexil butanoato	0,05 \pm 0,02	Tr	6,95 \pm 1,33	0,05 \pm 0,03	Tr	Tr	1,32 \pm 0,34	0,14 \pm 0,02	Tr
Hexil crotonato	N/D	N/D	0,05 \pm 0,01	N/D	N/D	N/D	Tr	N/D	N/D
Amil hexanoato	N/D	N/D	0,06 \pm 0,01	N/D	N/D	N/D	Tr	N/D	N/D
Etil hexanoato	N/D	N/D	Tr	N/D	N/D	N/D	0,45 \pm 0,21	N/D	0,04 \pm 0,01
Butil hexanoato	0,09 \pm 0,02	Tr	10,26 \pm 0,97	0,05 \pm 0,05	Tr	Tr	1,94 \pm 1,63	N/D	Tr
Hexil hexanoato	0,76 \pm 0,12	0,29 \pm 0,13	0,04 \pm 0,01	0,61 \pm 0,45	0,29 \pm 0,04	0,35 \pm 0,22	2,98 \pm 1,00	0,82 \pm 0,14	0,43 \pm 0,02
Octil heptanoato	Tr	Tr	0,04 \pm 0,01	Tr	Tr	Tr	N/D	Tr	N/D
Metil octanoato	N/D	N/D	0,16 \pm 0,06	N/D	N/D	N/D	N/D	0,22 \pm 0,04	Tr
Etil octanoato	N/D	N/D	Tr	N/D	N/D	N/D	2,71 \pm 0,40	0,05 \pm 0,01	0,15 \pm 0,01
Butil octanoato	N/D	N/D	0,90 \pm 0,13	N/D	N/D	N/D	0,39 \pm 0,12	N/D	N/D
Hexil octanoato	0,06 \pm 0,03	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	0,26 \pm 0,02	0,08 \pm 0,01	0,05 \pm 0,01
Ésteres ramificados									
Trans 2 hexenil butanoato	N/D	N/D	0,05 \pm 0,05	N/D	N/D	N/D	Tr	N/D	N/D
Isoamil hexanoato	N/D	N/D	0,07 \pm 0,04	N/D	N/D	Tr	Tr	N/D	N/D
Hexil trans 2 hexanoato	N/D	N/D	0,08 \pm 0,03	N/D	N/D	N/D	Tr	N/D	N/D
Otros									
β -Ionona	0,04 \pm 0,01	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr
Emisión total CV	123,60 \pm 17,02	35,00 \pm 2,02	114,22 \pm 7,70	46,92 \pm 3,66	65,45 \pm 2,94	70,36 \pm 3,49	92,96 \pm 20,05	39,00 \pm 0,99	86,22 \pm 4,83

En general, el tratamiento con etileno mantuvo o estimuló ligeramente la emisión de todos los grupos de CVs respecto al resto de tratamientos. Entre los monoterpenos hidrocarbonados destacó el limoneno como el monoterpeno mayoritario (27-70% del total), con un valor de emisión inicial de 87 ng/g PF que descendió bruscamente en los frutos control y se redujo ligeramente en los frutos pre-tratados con 1-MCP. El etileno, sin embargo redujo el fuerte descenso en la emisión de limoneno. Un comportamiento comparable se detectó en la emisión de los monoterpenos sabineno y β -mirceno. El ocimeno presentó variaciones en la emisión, ya que aumentó a los cuatro días de forma destacable por el tratamiento con etileno y en menor medida por 1-MCP, para descender drásticamente a los 7 días. El linalol fue el único monoterpeno alcohol que se emitió en concentraciones detectables al inicio del experimento (0,15 ng/g PF), para descender a valores no detectables posteriormente.

Entre los sesquiterpenos más abundantes destacaron el trans cariofileno (0,7-7,1 ng/g PF), α -selineno (0,47-0,97 ng/g PF) y el valenceno. Este último sesquiterpeno fue el mayoritario (18,76 ng/g PF) y mientras que en los frutos virando se detectó una clara estimulación por etileno, en los frutos de naranja maduros se redujo en todos los tratamientos y con menores diferencias entre los mismos (**Tabla 22**).

Como se ha mencionado anteriormente, en el espacio de cabeza de frutos maduros de la naranja Navelate tratados con etileno destacó el amplio número de ésteres alifáticos, identificándose hasta un total de 13. Entre éstos destacaron el hexil hexanoato (desde 0,3 a 10,1 ng/g PF), hexil butanoato (desde trazas a 6,95 ng/g PF) y etil octanoato (desde trazas a 2,7 ng/g PF). La máxima emisión de estos ésteres alifáticos se produjo a los 4 días del tratamiento con etileno, excepto en el caso del butil hexanoato y el etil octanoato que se produjo a los 7 días. También se identificaron 3 ésteres ramificados, aunque en concentraciones inferiores a los alifáticos. En general, el pre-tratamiento de los frutos con 1-MCP evitó la emisión de la mayoría de ésteres inducida por el etileno (**Tabla 22**). Por último, mencionar la presencia de la β -ionona (desde trazas a 0,04 ng/g PF), descrita como volátil norisoprenoide procedente del catabolismo del β -caroteno u otros carotenoides con anillos β -ionona no sustituidos y, por tanto, posiblemente asociada a la activación de la degradación de determinados carotenoides en frutos maduros.

4.2. Efecto de la aplicación de etileno y del inhibidor de su acción, 1-MCP, en el contenido de CVs en el flavedo de frutos maduros de la naranja Navelate

En el flavedo de frutos maduros de la naranja Navelate se identificaron un total 76 CVs diferentes y entre los diferentes tratamientos no se observaron diferencias cuantitativas significativas en el contenido total de CV (**Tabla 23**).

Tabla 23. Efecto de la aplicación de etileno (5 ppm) y 1-MCP (1 ppm) individualmente o en combinación en el contenido de CVs mayoritarios del flavedo de frutos maduros de la naranja Navelate. Cada valor corresponde a la media \pm DE de 2 réplicas. Los frutos se recolectaron en la campaña 2007/08.

$\mu\text{g/g}$	INICIO	4d			7d				
		Aire	Etileno	MCP+Aire	MCP+Etileno	Aire	Etileno	MCP+Aire	MCP+Etileno
Monoterpenos hidrocarbonados									
Sabineno	150,93 \pm 2,23	104,79 \pm 7,36	94,67 \pm 14,10	151,81 \pm 15,13	117,01 \pm 0,31	112,90 \pm 17,07	80,62 \pm 14,90	138,07 \pm 27,24	170,22 \pm 7,37
β -Miraceno	150,17 \pm 1,90	151,76 \pm 14,49	132,04 \pm 20,36	142,90 \pm 17,71	152,60 \pm 5,06	145,80 \pm 20,05	127,88 \pm 16,43	145,95 \pm 27,25	190,21 \pm 11,48
Limoneno	5666,07 \pm 131,53	5880,03 \pm 439,44	5126,01 \pm 826,15	5388,95 \pm 680,55	5859,31 \pm 176,12	5461,91 \pm 847,10	4827,26 \pm 574,41	5419,13 \pm 826,48	6982,15 \pm 411,54
Ocimeno	12,44 \pm 0,52	8,88 \pm 0,93	6,52 \pm 1,16	13,72 \pm 1,68	10,24 \pm 0,16	8,48 \pm 1,63	6,92 \pm 1,39	9,82 \pm 3,60	13,76 \pm 1,42
α -Terpineno	5,10 \pm 0,23	4,02 \pm 0,24	3,82 \pm 0,75	2,80 \pm 0,44	4,67 \pm 0,37	6,32 \pm 0,20	Tr	2,65 \pm 0,04	8,41 \pm 0,24
Monoterpenos aldehídos y cetonas									
Citronelal	1,31 \pm 0,09	1,63 \pm 0,13	1,29 \pm 0,34	1,24 \pm 0,19	1,30 \pm 0,06	1,13 \pm 0,25	0,82 \pm 0,13	1,28 \pm 0,29	1,93 \pm 0,07
Neral	3,25 \pm 0,05	3,05 \pm 0,04	2,64 \pm 0,55	2,85 \pm 0,29	3,02 \pm 0,20	2,92 \pm 0,59	2,10 \pm 0,20	3,08 \pm 0,67	3,75 \pm 0,01
Geraniol	5,02 \pm 0,05	4,86 \pm 0,24	4,04 \pm 0,86	4,46 \pm 0,55	4,71 \pm 0,12	4,40 \pm 0,74	3,32 \pm 0,14	4,69 \pm 0,86	5,43 \pm 0,13
Monoterpenos alcoholes									
Linalol	43,24 \pm 0,91	39,04 \pm 2,02	32,82 \pm 6,24	47,71 \pm 5,45	35,23 \pm 1,29	39,92 \pm 5,44	33,48 \pm 2,75	38,83 \pm 5,90	49,03 \pm 2,69
4-Terpineol	0,27 \pm 0,04	0,35 \pm 0,01	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	0,45 \pm 0,01
L- α -Terpineol	11,36 \pm 0,08	10,49 \pm 0,02	9,22 \pm 1,68	11,02 \pm 1,43	10,93 \pm 0,45	10,52 \pm 1,45	7,76 \pm 0,52	11,36 \pm 2,59	12,62 \pm 0,69
Nerol	0,21 \pm 0,06	0,28 \pm 0,01	0,21 \pm 0,09	0,29 \pm 0,03	0,29 \pm 0,01	0,34 \pm 0,03	0,19 \pm 0,04	0,31 \pm 0,06	0,55 \pm 0,04
Geraniol	0,22 \pm 0,01	0,40 \pm 0,08	0,34 \pm 0,15	0,42 \pm 0,03	0,39 \pm 0,12	0,38 \pm 0,06	0,20 \pm 0,02	0,39 \pm 0,09	0,62 \pm 0,03
Monoterpenos ésteres									
Nerol acetato	0,38 \pm 0,01	0,82 \pm 0,03	0,49 \pm 0,05	0,35 \pm 0,07	0,77 \pm 0,05	0,50 \pm 0,01	0,57 \pm 0,03	0,40 \pm 0,10	0,99 \pm 0,05
Sesquiterpenos cíclicos									
β -Cubebeno	0,58 \pm 0,01	0,57 \pm 0,05	0,51 \pm 0,10	0,68 \pm 0,01	0,68 \pm 0,04	0,50 \pm 0,14	0,30 \pm 0,05	0,67 \pm 0,15	0,79 \pm 0,12
α -Selineno	N.D	0,43 \pm 0,11	N.D	0,23 \pm 0,01	0,31 \pm 0,04	0,36 \pm 0,06	0,37 \pm 0,01	0,33 \pm 0,03	N.D
α -Copaeno	0,59 \pm 0,01	0,84 \pm 0,11	0,63 \pm 0,13	0,92 \pm 0,12	0,81 \pm 0,04	0,74 \pm 0,19	0,41 \pm 0,05	0,77 \pm 0,17	1,21 \pm 0,06
Germacreno D	1,06 \pm 0,08	1,23 \pm 0,03	0,90 \pm 0,20	1,28 \pm 0,11	1,13 \pm 0,06	1,13 \pm 0,01	0,95 \pm 0,09	1,20 \pm 0,18	1,67 \pm 0,12
Trans cariofileno	3,10 \pm 0,31	2,60 \pm 0,09	2,29 \pm 0,37	3,21 \pm 0,41	2,56 \pm 0,15	3,08 \pm 0,38	2,44 \pm 0,25	2,76 \pm 0,63	4,75 \pm 0,16
α -Humuleno	0,22 \pm 0,01	0,19 \pm 0,04	0,19 \pm 0,05	0,25 \pm 0,03	0,18 \pm 0,06	0,34 \pm 0,11	0,14 \pm 0,02	0,24 \pm 0,12	0,53 \pm 0,12
Valenceno	5,15 \pm 0,07	3,85 \pm 0,02	2,89 \pm 0,56	4,27 \pm 0,72	4,02 \pm 0,13	4,25 \pm 0,70	3,96 \pm 0,35	3,91 \pm 1,07	8,48 \pm 0,04
α -Murole no	N.D	N.D	N.D	0,19 \pm 0,06	0,24 \pm 0,03	0,18 \pm 0,09	0,19 \pm 0,01	Tr	N.D
δ -Cadineno	2,15 \pm 0,02	1,86 \pm 0,08	1,40 \pm 0,24	2,25 \pm 0,14	1,95 \pm 0,01	1,82 \pm 0,28	1,19 \pm 0,04	2,11 \pm 0,45	2,96 \pm 0,08
β -Sesquifelandreno	N.D	0,27 \pm 0,04							
Sesquiterpenos lineales									
β -Farneseno	5,54 \pm 0,82	3,78 \pm 0,24	2,91 \pm 0,17	7,02 \pm 1,24	5,11 \pm 0,78	3,98 \pm 1,89	3,26 \pm 1,22	5,42 \pm 1,18	7,50 \pm 1,22
Aldehídos y alcoholes alifáticos									
Octanal	50,59 \pm 1,36	46,26 \pm 3,40	42,69 \pm 7,95	46,59 \pm 7,06	48,16 \pm 0,49	46,72 \pm 6,06	45,17 \pm 3,54	55,42 \pm 10,96	51,64 \pm 1,02
Nonanal	4,59 \pm 0,21	4,64 \pm 0,26	3,80 \pm 0,59	4,47 \pm 0,07	4,81 \pm 0,01	4,68 \pm 0,71	5,08 \pm 0,62	4,67 \pm 0,95	5,81 \pm 0,07
Decanal	0,53 \pm 0,01	0,76 \pm 0,10	0,57 \pm 0,12	0,84 \pm 0,11	0,74 \pm 0,03	0,67 \pm 0,17	0,37 \pm 0,04	0,69 \pm 0,15	1,09 \pm 0,05
1-Octanol	0,83 \pm 0,08	0,94 \pm 0,06	0,96 \pm 0,25	1,09 \pm 0,11	1,09 \pm 0,03	1,20 \pm 0,06	1,33 \pm 0,07	1,50 \pm 0,32	1,80 \pm 0,03
Contenido total CV	6132,16 \pm 141,04	6284,02 \pm 470,05	5479,04 \pm 884,42	5849,62 \pm 738,71	6278,78 \pm 187,00	5872,00 \pm 906,39	5160,27 \pm 617,92	5863,20 \pm 913,37	7537,36 \pm 439,53

En general, la concentración de los monoterpenos hidrocarbonados y alcoholes disminuyó en todos los tratamientos, y sólo en los frutos pre-tratados con 1-MCP y posteriormente con etileno (7 días) se observó un ligero aumento (**Tabla 23**). El limoneno fue el CV mayoritario, con una abundancia máxima comprendida entre 4,8 y 7,0 mg/g PF. Otros monoterpenos relativamente abundantes fueron el sabineno y β -mirceno, con concentraciones que oscilaron entre 94 y 190 μ g/g PF. El linalol fue el monoterpeno alcohol mayoritario con niveles comprendidos entre 33-49 μ g/g PF, observándose un ligero descenso en los frutos tratados con etileno. Además, entre los monoterpenos oxigenados destacaron el L- α -terpineol o geranial, que siguieron una tendencia similar a la del linalol.

Entre los sesquiterpenos cíclicos destacó por su abundancia el valenceno (2,9-8,5 μ g/g PF), seguido del trans cariofileno (2,3-4,7 μ g/g PF), δ -cadineno y germacreno D (0,9-2,9 μ g/g PF). En general, el contenido de los sesquiterpenos se mantuvo relativamente constante a lo largo del experimento, aunque a los 7 días se observó una tendencia a disminuir en los frutos tratados con etileno y a aumentar en los pre-tratados con 1-MCP (**Tabla 23**). El sesquiterpeno lineal β -farneseno fue el único representante de este grupo y su concentración osciló entre 2,9-7,5 μ g/gPF, siguiendo una tendencia similar a la descrita previamente para los sesquiterpenos cíclicos.

Dentro del grupo de alcoholes y aldehídos alifáticos destacaron el octanal y, en menor medida, el nonanal, con concentraciones máximas en torno a 55,8 y 5,8 μ g/g PF, respectivamente. Es importante destacar que a diferencia de lo observado en la emisión de CVs en frutos intactos (**Tabla 22**), no se detectaron ésteres de tipo alifático en el contenido en el flavedo (**Tabla 23**).

4.3. Efecto de la aplicación de etileno y del inhibidor de su acción, 1-MCP, en la expresión de genes implicados en la síntesis de CVs en frutos maduros de la naranja Navelate

Finalmente, se analizó el efecto de la aplicación de etileno y del pre-tratamiento con 1-MCP en la expresión de 7 terpeno sintasas, de forma similar a los frutos de naranja virando de color. Los genes β -PIN, LIM 1 y LIM 2 mostraron patrones de expresión muy variables y sin una clara tendencia en respuesta a los tratamientos realizados (**Figura 22**). La acumulación de los transcritos de OCI y LIN aumentó a los 4 días en todas las condiciones estudiadas respecto a los valores iniciales, aunque este incremento fue especialmente relevante en frutos pre-tratados con 1-MCP. Sin embargo, a los 7 días de tratamiento la expresión de estos dos genes disminuyó a valores no detectables o similares a los iniciales, y solo se mantuvo (LIN) o aumentó (OCI) en los frutos tratados con etileno.

La expresión relativa de *VAL* aumentó de forma importante (x4) en el flavedo de los frutos tratados etileno, mientras que en el resto de los tratamientos se mantuvo a niveles similares a los iniciales (**Figura 22**). En cuanto a la *TPS3*, no se detectó expresión en el flavedo de frutos maduros de la naranja Navelate.

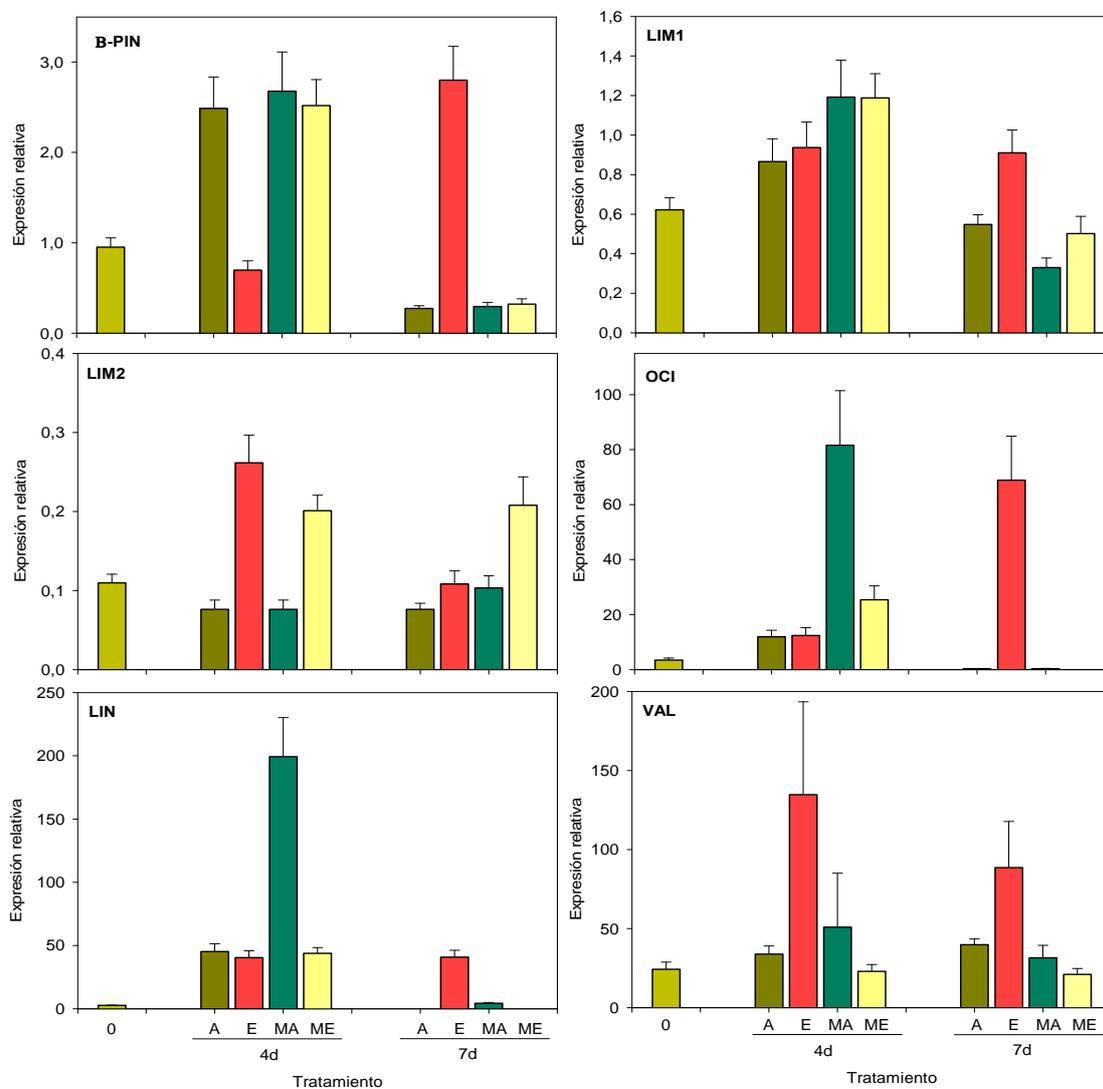


Figura 22. Efecto de la aplicación de etileno (5 ppm) y 1-MCP (1 ppm) individualmente o en combinación, en la expresión relativa de 6 genes de terpeno sintasas en el flavedo de frutos maduros de la naranja Navelate. Los genes analizados fueron: β -pineno sintasa (*β -PIN*), limoneno sintasa 1 y 2 (*LIM 1* y *LIM 2*), ocimeno sintasa (*OCI*), linalol sintasa (*LIN*) y valenceno sintasa (*VAL*). Los valores obtenidos para cada gen, están normalizados frente al nivel de expresión del flavedo de frutos de Ortanique en el estadio V al que se le asignó un valor de 1.

5. Efecto de la aplicación de etileno y del inhibidor de su acción, 1-MCP, en la expresión de un gen de una alcohol aciltransferasa en el flavedo de frutos cítricos

La emisión de ésteres alifáticos aumenta de forma muy importante en respuesta al tratamiento con etileno en frutos de la naranja Navelate y, en menor medida, en frutos del híbrido Ortanique (**Tablas 17 y 18**). Con el objetivo de profundizar en el estudio de la regulación de la biosíntesis de ésteres alifáticos en frutos cítricos se realizó una búsqueda de genes homólogos a alcohol aciltransferasas (AATs) de otros frutos (melón, manzana y fresa) que se han descrito como claves en la biosíntesis de ésteres alifáticos o ramificados en frutos (Aharoni et al., 2000; Flores et al., 2002; Schaffer et al., 2007) en bases de datos públicas de secuencias de EST de cítricos (HarvEST, CFGP) y de proyectos de secuenciación del genoma de naranja y mandarina (Phytozome). Esta búsqueda permitió identificar tres genes de cítricos (aCL1541contig1, aCL233Contig2 y CB292557) con un porcentaje de identidad de secuencia a nivel de proteína entre 40% y 51% con AATs de melón, manzana y fresa. Un análisis preliminar de la expresión de estos genes y distribución de los ESTs correspondientes en las bases de datos de cítricos mostró que aCL1541contig1, aCL233Contig2 se expresaban mayoritariamente en tejido verde (hojas o piel de frutos inmaduros), mientras que la expresión de CB292557 estaba enriquecida en genotecas de tejidos de frutos de naranja, por tanto para este trabajo se seleccionó el gen CB292557, denominado en esta Tesis como *CsAAT*, para posteriores estudios. En base a la secuencia de *CsAAT* se diseñaron cebadores para analizar su expresión mediante RT-qPCR en el flavedo de los frutos de las tres variedades sometidos a diferentes tratamientos postcosecha que afectan a la emisión de ésteres, y en el caso de la naranja Navelate también se comparó el efecto de los tratamientos en el flavedo de frutos virando y maduros.

La expresión de *CsAAT* en los frutos virando recién recolectados fue muy superior en los de Ortanique que en los de las otras dos variedades (**Figura 23**). El tratamiento con etileno produjo una estimulación de la *CsAAT* de forma muy diferente en cada variedad. Así, en el flavedo de frutos de Navelate virando se incrementó alrededor de 300 veces respecto a los valores iniciales y se mantuvo constante hasta el día 6. En frutos de Ortanique aumentó cerca de 2 y 6 veces a los 3 y 6 días, respectivamente. Sin embargo, en el flavedo de Clemenules solo se estimuló después de 6 días, y los valores que alcanzó fueron menores que los iniciales de los frutos de naranja.

Es interesante el hecho de que la menor estimulación de la expresión del gene *CsAAT* que se observa en los frutos de las tres variedades tratados con etileno, también se manifiesta en los frutos incubados en aire. Así, apenas se modificó la expresión en el flavedo de los frutos de Clemenules, la inducción en los de Ortanique fue relativamente importante a los 6 días, pero en los de Navelate fue muy superior y aumentó con el tiempo de incubación. En general, el pre-

tratamiento de los frutos con el 1-MCP contrarrestó eficientemente los cambios en la expresión de la *CsAAT* que se indujeron tanto en etileno como en aire.

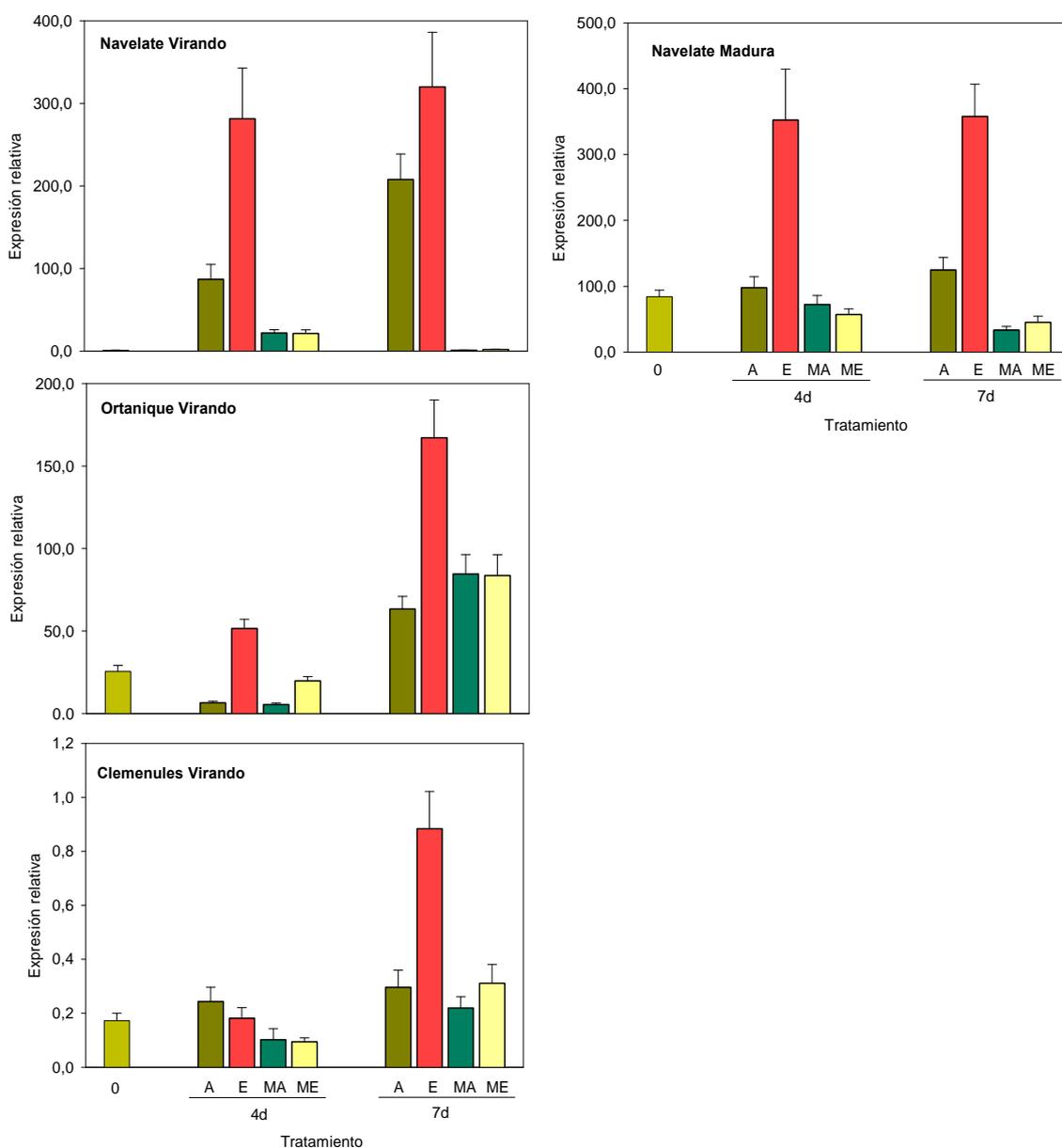


Figura 23. Efecto de la aplicación de etileno (5 ppm) y 1-MCP (1 ppm) individualmente o en combinación, en la expresión relativa de una alcohol aciltransferasa de cítricos (*CsAAT*) en el flavedo de frutos virando de Clemenules, Ortanique y Navelate, y de frutos maduros de Navelate. Los valores obtenidos están normalizados frente al nivel de expresión del flavedo de frutos virando de Navelate al inicio del experimento al que se le asignó un valor de 1. A: Aire; E: Etileno; MA: MCP+Aire; ME: MCP+Etileno.

La comparación de la expresión de *CsAAT* por los distintos tratamientos en frutos de naranja en distinto estadios de maduración reveló que el efecto más destacable se produjo en los recién recolectados y en los almacenados en aire (**Figura 23**). En el momento de la cosecha, la expresión del gen *CsAAT* en el flavedo de los frutos maduros fue cerca de 80 veces superior a la

de los frutos virando, de forma consistente con la emisión de ésteres alifáticos que se detectó en estos mismos frutos (**Tabla 22**). Mientras que en estos frutos la expresión solo se incrementó ligeramente durante la incubación en aire, en los frutos virando se produjo una importante y progresiva inducción. El tratamiento con etileno, sin embargo, produjo una estimulación de la expresión del gen *CsAAT* similar en los frutos en los dos estadios de maduración. Finalmente, el pre-tratamiento con 1-MCP evitó en todos los casos los cambios de expresión que se produjeron en los frutos incubados en aire o etileno (**Figura 23**).

El objetivo que se ha planteado en este capítulo ha sido estudiar el efecto del etileno sobre la emisión de CVs en frutos de la mandarina Clementines (*Citrus clementina*), el híbrido Ortanique (*Citrus reticulata* x *Citrus sinensis*) y la naranja Navelate (*Citrus sinensis*, L.Osbeck). Para ello, los frutos se trataron tanto con etileno, para comprobar el efecto directo de la hormona, como con el inhibidor de su acción, 1-MCP, para comprobar el efecto en la emisión natural de los frutos.

La aplicación de etileno a los frutos virando promovió el cambio de color del flavedo, mientras que el inhibidor de su acción retrasó el proceso, similar a los resultados descritos por otros autores (Stewart y Wheaton, 1972; Purvis y Barmore, 1981; Porat et al., 1999; Rodrigo y Zacarias, 2007). Además, estos tratamientos provocaron importantes diferencias en el perfil de emisión de los distintos CVs respecto a los que se producen durante la maduración natural. En general, los resultados muestran que el tratamiento con 1-MCP provocó el efecto contrario al tratamiento con etileno, sobre todo en cuanto a la emisión de CVs lo que sugiere que dicha emisión puede estar mediada por el etileno, a pesar de los bajos niveles que se producen durante la maduración de los frutos cítricos (Golding et al., 1999; Lurie et al., 2002; Herrera, 2007a). Los cambios más destacados inducidos por el etileno en la emisión de CVs fue la estimulación de ésteres alifáticos, como hexil hexanoato, hexil acetato y hexil butanoato, entre otros, tanto en frutos del híbrido Ortanique como en la naranja Navelate. Durante la maduración natural sólo se identificó hexil hexanoato en frutos maduros (estado TC) de naranja (**Tabla 8**) y su concentración fue 15 veces inferior a la determinada en frutos desverdizados con etileno (**Tablas 18**). Este efecto del etileno es específico sobre la emisión de CVs, ya que en ningún caso se identificaron ésteres en el contenido de las glándulas del flavedo de estos frutos. En el híbrido la presencia de ésteres alifáticos fue menor, tanto en número como en abundancia respecto a la naranja, donde se llegaron a cuantificar niveles de estos compuestos hasta 9 veces superiores (**Tablas 17 y 18**). Estos resultados están de acuerdo con estudios previos en otras variedades de cítricos, como el híbrido Fortune, donde se comprobó que el tratamiento con etileno fue capaz de estimular la emisión de ésteres alifáticos de forma proporcional a la concentración de la hormona aplicada (Herrera, 2007a; Herrera et al., 2007b).

En los frutos de las tres variedades estudiadas el pre-tratamiento con el inhibidor de la acción del etileno, 1-MCP, no estimuló la emisión de ésteres, que fue similar a la de los frutos mantenidos en aire, lo que indica que la emisión de estos compuestos se estimula específicamente por etileno y que solamente en los frutos de naranja se produce de forma natural la emisión de ésteres. Numerosas investigaciones han estudiado el efecto del 1-MCP sobre la ruta de biosíntesis de ésteres, demostrándose el papel clave del etileno regulando la

biosíntesis de estos compuestos, especialmente en frutos de maduración climatérica (Fan et al., 2000; Flores et al., 2002; Lurie et al., 2002; Defilippi et al., en 2005a; Balbotín et al., 2007). En una línea transgénica de melón Cantaloupe en la que se inhibió la síntesis de etileno mediante la introducción del gen antisentido de la ACC oxidasa (*ACO*), enzima clave en la síntesis de etileno, se ha comprobado que la incubación de discos de pulpa con diferentes precursores afectó principalmente la reducción de ácidos grasos a aldehídos y, por tanto, parece ser la etapa de la ruta biosintética de ésteres dependiente de la acción del etileno. Además, en ese estudio se observó que los frutos transgénicos tratados con etileno y los frutos controles no transformados emitían los ésteres hexil y butil acetato, y el alcohol butanol, pero no los frutos transgénicos sin tratar, lo que indica la dependencia del etileno de este paso específico (Flores et al., 2002). En frutos de manzana en los que se ha inhibido la producción de etileno mediante la manipulación de la *ACO*, los estudios de Defilippi et al. (2005b) demostraron que aunque la concentración de la mayoría de los CVs estaba sustancialmente reducida, el efecto más claro era sobre los ésteres y alcoholes. Este efecto se revertía por la aplicación de etileno durante 8 días, alcanzando valores similares a los obtenidos en frutos no transformados. Del mismo modo, el tratamiento con 1-MCP en manzanas control indujo cambios en el perfil de CVs similares a los observados de las manzanas transgénicas ACC antisentido, reduciendo la acumulación de ésteres y sin grandes cambios en los aldehídos. En papaya, Balbotín et al. (2007) identificaron que los CVs principales son ésteres y alcoholes, y que el tratamiento con 1-MCP reducía de forma importante gran cantidad de ésteres, lo que indica su dependencia del etileno. En manzana Anna, donde los CVs mayoritarios del aroma son aldehídos, alcoholes y ésteres, la aplicación de 1-MCP redujo un 70% la emisión de dichos CVs (Lurie et al., 2002). Del mismo modo, estudios en albaricoques y melón han detectado una clara reducción de los ésteres y alcoholes por el tratamiento con 1-MCP (Fan et al., 2000, Flores et al., 2002). La interpretación de este conjunto de resultados en frutos climatéricos es que el etileno estimula o induce la actividad alcohol deshidrogenasa y alcohol aciltransferasa, pero no la aldehído deshidrogenasa, además de otros elementos de la ruta biosintética de ésteres (Schaffer et al., 2007; Granell y Rambla., 2013) y, por ello, en la gran mayoría de frutos de maduración climatérica se produce esa importante estimulación de la emisión de ésteres durante la maduración. Los resultados de esta Tesis indican que en los frutos cítricos, a pesar de su maduración no-climatérica, tienen la capacidad de estimular la síntesis de ésteres específicos por el etileno, lo que indica que comparten con frutos climatéricos parte de los procesos característicos de la maduración, pero que han perdido la capacidad de activarlos de forma natural. En este sentido, es interesante destacar que los frutos de naranja son los únicos de los estudiados en esta Tesis en los que se pudo detectar emisión de ésteres durante la maduración, que parece estar mediada por el etileno endógeno, ya que el tratamiento con 1-MCP la redujo (**Tabla 18**). Este resultado sugiere que la acción del etileno podría tener un papel importante durante la maduración natural de los frutos de naranja

y, posiblemente, estos frutos pudieran ser más sensibles o tener un umbral de respuesta más bajo a la acción de esta hormona durante la maduración que otros frutos cítricos como la mandarina o los híbridos.

Por otro lado, el análisis de la emisión de CVs en frutos de naranja en distinto estadio de maduración reveló que la emisión de ésteres alifáticos es altamente dependiente del estadio de maduración del fruto. Así, en los frutos virando de color sólo se detectó emisión de estos compuestos después de 6 días de exposición al etileno y emisiones traza en los frutos incubados en aire. Sin embargo, en frutos maduros (coloreados) fue relevante la emisión natural de ésteres en el momento de la cosecha, lo que indica que en los frutos de naranja la maduración natural conlleva la emisión de ésteres alifáticos, posiblemente en relación con un aumento en la sensibilidad a la acción del etileno. Estos resultados están de acuerdo con la mayor expresión del gen *CsAAT*, que codifica una enzima con homología a una alcohol aciltransferasa de fresa (Aharoni et al., 2000), en el flavedo de los frutos maduros. Sin embargo, durante la incubación en aire sólo se produjo aumento en la expresión de la *CsAAT* en los frutos virando, que alcanzaron valores muy superiores a los de los frutos maduros. El efecto estimulador del etileno en la emisión de ésteres y en la expresión del gen *CsAAT* fue diferente en función del estadio de maduración del fruto, ya que mientras en los frutos maduros se produjo un claro aumento en la emisión de estos CVs a los 3 días del tratamiento, en los virando no, a pesar de que la expresión de *CsAAT* se estimuló de forma similar en los dos casos (**Tabla 18 y 22, y Figura 23**). Una posible explicación a este proceso puede tener en cuenta que en los frutos maduros en el momento de la cosecha ya emitían algunos ésteres alifáticos y la posterior exposición al etileno estimularía un proceso ya iniciado. En los frutos virando, sin embargo, debería activarse *de novo* todo el proceso que implicaría la inducción de actividades enzimáticas clave en la síntesis de ésteres y síntesis de sus precursores (alcoholes, ácidos grasos, etc.) por lo que sería un proceso más lento, siendo necesarios 6 días de exposición a la hormona para alcanzar niveles de ésteres alifáticos similares a los de los frutos maduros (**Tabla 18 y 22, y Figura 23**).

Además de la emisión de ésteres, el tratamiento con etileno o 1-MCP también afectó de forma destacada a otros CVs importantes del aroma de los frutos cítricos. En particular, destaca el efecto sobre la emisión del monoterpeno linalol, que se redujo durante el tratamiento con etileno mientras que el tratamiento con 1-MCP la incrementó o mantuvo en niveles similares a los iniciales, en todas las especies estudiadas (**Tabla 16, 17 y 18**). En frutos del híbrido Fortune también se observaron resultados similares (Herrera, 2007a), lo que refuerza la idea que se la síntesis de linalol parece inhibirse por la acción del etileno.

En cuanto a los sesquiterpenos, los resultados de este trabajo muestran que estos CVs presentan una inducción por el tratamiento con etileno, especialmente la emisión de valenceno, que fue uno de los CVs que experimentó un mayor aumento por la aplicación de la hormona (**Tabla 16 a 21**). Estos resultados, de nuevo, coinciden con los descritos por otros autores en

distintas variedades de cítricos, como la mandarina híbrida Fortune y la naranja Valencia late (*Citrus sinensis*), donde también se ha observado una clara estimulación de la acumulación de valenceno en el flavedo en respuesta a la aplicación de etileno exógeno (Sharon-Asa et al., 2003; Herrera, 2007a). Es interesante destacar que en este estudio el efecto de la aplicación de etileno se produjo sobre todo en la emisión de valenceno y no sobre su contenido (**Tabla 16 a 21**), ya que el contenido de este sesquiterpeno fue variable en los frutos de las tres especies estudiadas, e incluso en la mandarina Clemenules y en frutos virando de la naranja Navelate no se detectó en nuestras condiciones experimentales (**Tablas 19, 20 y 21**). En los frutos del híbrido Ortanique se detectó la presencia de valenceno en los extractos de flavedo, pero sus variaciones por los distintos tratamientos no siguieron una tendencia que permita asociarlo a efectos específicos de la acción del etileno (**Tabla 20**).

A comparar la emisión de valenceno entre los frutos virando y maduros de la naranja Navelate, se pudo apreciar la fuerte influencia del estadio de maduración del fruto. Así, en los frutos virando recién recolectados la tasa de emisión de valenceno fue unas 10 veces menor que en los maduros, pero los efectos del etileno y del 1-MCP fueron mucho más acusados, estimulando e inhibiendo, respectivamente, la emisión de valenceno (**Tablas 18 y 22**). Después de 3 y 6 días de exposición al etileno, la emisión de valenceno en los frutos virando se incrementó 5 y 14 veces respecto a los valores iniciales, respectivamente, y unas tres veces respecto a la de los frutos tratados en aire (**Tabla 18**). Por el contrario, en los frutos maduros la exposición al etileno produjo el efecto opuesto y la emisión de valenceno se redujo más de la mitad respecto a los valores iniciales y con mínimas diferencias respecto a los frutos en aire (**Tabla 22**). Por otro lado, es interesante destacar que en los frutos virando pre-tratados con 1-MCP e incubados en aire se redujo sustancialmente (2,5 veces) la emisión de valenceno respecto a los frutos no pre-tratados, lo que indica que la emisión de este CV durante la maduración natural, al menos después de la cosecha, es parcialmente dependiente del etileno. Este conjunto de resultados demuestran que, en primer lugar, el etileno es capaz de estimular la emisión de valenceno cuando se está iniciando, de forma similar a lo que se ha comentado anteriormente para los ésteres alifáticos, posiblemente cuando el proceso está activándose, mientras que cuando la emisión ya ha llegado a altos niveles no se consigue mantener esa estimulación e incluso no requiere la presencia de etileno. Además, la emisión de valenceno que se produce en los frutos de naranja parece deberse a la acción del etileno, ya que se redujo de forma muy efectiva por el 1-MCP. Estos resultados coinciden con los obtenidos previamente en frutos de la mandarina híbrida Fortune donde el tratamiento con etileno también modificó de forma distinta la emisión de valenceno en función del estadio de maduración del fruto (Herrera, 2007a) y sugieren que los frutos virando son más sensibles al etileno que los maduros. Este efecto del etileno estimulando ciertos procesos de la maduración en frutos virando de forma más acusada que en frutos maduros no parece ser exclusivo o restringirse a la emisión de valenceno

o de ésteres, ya que otros procesos como la coloración de la piel y la acumulación de carotenoides también experimentan un comportamiento similar (Rodrigo y Zacarías, 2007). Estas evidencias sugieren que el etileno puede estimular procesos que se están iniciando y que en fases posteriores cuando ya se ha alcanzado una alta tasa o un nivel umbral la aplicación de la hormona ya no produce efectos adicionales. Este fenómeno podría reflejar que el etileno tendría en los frutos cítricos un efecto estimulador sobre estos procesos de la maduración y que una vez iniciados tendría un papel más secundario.

La aplicación de etileno a frutos cítricos provoca cambios sustanciales en la expresión génica, especialmente en la piel donde se ha descrito que la hormona modifica la expresión de cerca de 1500 genes en frutos de mandarina Satsuma después de 3 días de tratamiento (Fujji et al., 2007). Entre los genes que aumentaron su expresión se encuentra una terpeno sintasa, que se indujo progresivamente durante el tiempo de exposición a etileno, pero no se ofrecen más detalles de la actividad terpeno sintasa de este gen (Fujji et al., 2007). Mayuoni et al. (2011a) compararon cambios fisiológicos y de calidad en la pulpa de mandarinas Michal tratadas con etileno y concluyeron que la hormona no parece modificar ni regular parámetros relacionados con la maduración interna, entre los que mencionan el aroma. De forma similar, Nishikawa et al. (2002) no observaron diferencias en el contenido de CVs en extractos de piel de naranja tratada o no con etileno. Sin embargo, el análisis de los cambios en el transcriptoma en la pulpa de mandarinas Michal tratadas con etileno reveló que la hormona induce una serie de cambios importantes en la expresión de genes de diferentes rutas metabólicas, como la de fenilpropanoides, carbohidratos, etc. (Mayuoni et al., 2011b), lo que sugiere que el etileno modifica la expresión génica en la pulpa de los frutos y puede tener un papel o afectar a procesos que tienen lugar en ese tejido. Sin embargo, estos estudios no aportaron evidencias de efectos directos en la expresión de genes implicados en la síntesis de CVs.

El análisis de la expresión de 7 genes implicados en la síntesis de terpenos volátiles en los frutos de las tres variedades reveló diferencias importantes para cada gen y, además, en algunos casos el patrón de respuesta a los tratamientos fue diferente en cada variedad. En general, no se observó un efecto claro del etileno o del 1-MCP sobre la expresión de los dos genes de limoneno sintasas (*LIM 1* y *LIM 2*). Mientras que *LIM 1* se expresó a niveles similares en las tres variedades, *LIM 2* mostró mayor expresión en Ortanique que en Navelate o Clemenules (**Figuras 18, 19 y 20**). Los niveles de transcritos de los dos genes y en las tres variedades descendieron después de la cosecha y aparentemente sin un efecto significativo de regulación por etileno, por lo que cabe atribuirlo más probablemente a un efecto sobre los frutos cosechados. En el caso de la β -*PIN* tampoco se observaron efectos consistentes en las tres variedades y en respuesta a los diferentes tratamientos. En general, el patrón de expresión en la mandarina Clemenules y la naranja Navelate fue similar, y diferente al del híbrido Ortanique. Aunque el etileno aceleró el descenso a los 3 días, posteriormente también se detectó una

importante reducción en todos los casos. Este comportamiento junto con el del híbrido, que fue diferente al de las otras variedades, permite concluir que este gen no parece estar regulado por etileno. De forma similar, el gen *OCI* tampoco mostró un comportamiento consistente entre variedades y a pesar de que en algunos casos se estimuló por 1-MCP a los 3 días, los efectos desaparecieron posteriormente y el efecto del etileno exógeno no fue consistente, por lo que tampoco puede asociarse a una regulación mediada por la hormona.

El gen *LIN*, a diferencia de los genes anteriores, presentó un patrón de expresión que indica que puede estar regulado negativamente por el etileno. En las tres variedades los niveles de transcritos se detectaron en los frutos tratados con 1-MCP e incubados en aire o en etileno, y la aplicación exógena de la hormona redujo el nivel de expresión en Clemenules y Navelate. Todo ello indica que este gen puede estar reprimido por la acción del etileno en los frutos cítricos. Además, este comportamiento es consistente con los datos de emisión en frutos intactos, ya que los mayores valores se detectaron en los frutos de Clemenules y Navelate tratados con 1-MCP (**Tablas 16, 17 y 18**). Es interesante también el hecho de que la expresión de *LIN* fue mucho mayor en estos frutos, mientras que en los de Ortanique que los valores de expresión relativa fueron muy inferiores (Fig. 7-9), y tampoco se detectó emisión de linalol en los frutos intactos. Todo ello indica una buena correlación entre los niveles de expresión de *LIN* y la emisión de linalol, que parece reprimirse por el etileno.

La estimulación de la *VAL* por etileno se ha descrito anteriormente en frutos de la naranja Valencia (*Citrus sinensis*) y que su expresión aumenta progresivamente con la maduración del fruto (Sharon-Asa et al., 2003). Los resultados de esta Tesis muestran claramente que la expresión de la *VAL* aumenta durante la vida postcosecha de los frutos de las tres variedades estudiadas y que se estimula notablemente por etileno. El hecho de que en los frutos pretratados con 1-MCP se reduzca notablemente la acumulación del mRNA que se produce en los frutos control indica que la expresión del gen de forma natural parece deberse a la acción del etileno. Es interesante el comportamiento de los frutos del híbrido, ya que los niveles de transcritos fueron menores que en las otras dos variedades (**Figuras 18, 19 y 20**), pero la emisión de valenceno fue sensiblemente superior a la de los frutos de la naranja Navelate (**Tablas 17 y 18**). A pesar de estas diferencias entre variedades que pueden ser de base genética y el carácter híbrido de la mandarina Ortanique, los resultados muestran una clara correlación entre los cambios en la expresión del gen y la emisión de valenceno en los frutos de las tres variedades analizadas. Los resultados en la naranja Navelate confirman esta situación, donde la elevada expresión que se produce en los frutos tratados 3 días con etileno (**Figura 20**) va acompañada de la mayor emisión de valenceno, con valores superiores a 20 ng/g PF (**Tabla 18**).

En cuanto a las AATs, enzimas implicadas en el último paso en la síntesis de ésteres, es interesante mencionar que en diferentes frutos climatéricos se ha demostrado el papel clave del etileno en la regulación de diferentes miembros de esta familia de genes. En melón transgénico

Cantaloupe en el que se suprimió la síntesis de etileno endógeno, se observó una reducción considerable de la expresión de dos AAT (*Cm-AAT1* y *Cm-AAT2*) y se redujo considerablemente la emisión de ésteres, de forma similar a lo que ocurría en los frutos controles tratados con 1-MCP, mostrando así una clara regulación por etileno (Yahyaoui et al., 2002). Defilippi et al. (2005) estudiaron la implicación del etileno en la síntesis de ésteres en frutos de manzana en los que se había inhibido la producción etileno mediante el gen antisentido *ACO*. Estos trabajos mostraron una reducción en la emisión de ésteres asociada a una disminución en la actividad AAT, dependiente de etileno, mientras que la regulación de los genes correspondientes a las actividades ADH y LOX eran independientes de la hormona (Defilippi et al., 2005a, 2005b).

Dado que la actividad AAT parece ser clave en la regulación de la síntesis de ésteres en diversos frutos climatéricos y no climatéricos (Aharoni et al., 2000; Flores et al., 2002; Schaffer et al., 2007), en esta Tesis se llevó a cabo una búsqueda de genes de cítricos homólogos a AATs implicadas en la síntesis de ésteres en frutos y se identificaron diferentes genes con homología a AATs de melón, manzana y fresa, y tras realizar análisis de expresión preliminares, se seleccionó uno de ellos, *CsAAT*, para proseguir con el estudio. El gen *CsAAT*, que se identifica y se describe por primera vez en este trabajo, presentó una homología del 40% con una AAT de fresa (Aharoni et al., 2000), y mostró un patrón de expresión que se correlacionó con los datos de emisión de ésteres en los frutos intactos de las tres variedades. En los frutos de mandarina no se detectó emisión de ésteres en ninguna de las condiciones ensayadas y los niveles de transcritos de la *CsAAT* se mantuvieron a niveles mucho más bajos que en los frutos de naranja o el híbrido (**Tablas 16, 17 y 18, y Figura 23**). Además, el incremento en la expresión de *CsAAT* por etileno sólo se detectó a los 6 días de tratamiento y no estuvo acompañada de niveles detectables de ésteres. Estas evidencias indican la incapacidad de los frutos de mandarina de emitir ésteres alifáticos que podría estar estrechamente relacionada con la reducida expresión del gen *CsAAT* en estos frutos. La disponibilidad del genoma completo de la mandarina Clementina podría facilitar el estudio de la secuencia de este gen y analizar las posibles diferencias en la secuencia codificante o en otros elementos reguladores que explicasen las diferencias en producción de ésteres entre la mandarina y otras especies de frutos cítricos. En los frutos de la naranja Navelate y del híbrido Ortanique se observó un patrón de expresión de *CsAAT* que indica una clara regulación por etileno, con una fuerte estimulación por la exposición a la hormona y niveles más reducidos en los frutos pre-tratados con 1-MCP. Estos resultados corroboran los obtenidos por Herrera (2007a) en los frutos de la mandarina híbrido Fortune y refuerzan la conclusión de que los frutos cítricos tienen capacidad para estimular la actividad AAT, de forma similar a los frutos climatéricos, pero a diferencia de éstos la capacidad se pierde al eliminar el etileno exógeno. La comparación de la emisión de ésteres y expresión de *CsAAT* mostró que la mayor emisión de ésteres alifáticos se produce en los frutos

de naranja respecto a los del híbrido y ésta fue paralela a la mayor expresión del gen *CsAAT* e inducción por etileno. Parece por tanto, que los frutos de naranja son los que poseen mayor capacidad de emisión de ésteres alifáticos y que los híbridos, tanto Fortune como Ortanique, han podido heredar esta característica, mientras que en los frutos de mandarina esta actividad está sensiblemente reducida.

Finalmente, el análisis de la emisión de ésteres y de la expresión del gen *CsAAT* en frutos de naranja en dos estadios de maduración indica que, a pesar de que la regulación y estimulación por etileno se mantiene en un estadio de maduración más avanzado (frutos maduros o coloreados), una vez alcanzado un determinado nivel de emisión de ésteres no sigue incrementándose aunque la expresión de *CsAAT* sea elevada (**Tabla 18 y 22, Figura 23**). Esto podría ser debido a una disminución en la concentración o disponibilidad de los precursores que dan lugar a los ésteres (alcoholes y /o ácidos grasos correspondientes). En particular, la emisión del alcohol hexanol, precursor de los ésteres más abundantes en el aroma de las naranjas tratadas con etileno, disminuyó de forma notable a los 7 días de tratamiento con etileno en las naranjas maduras, mientras que en frutos virando la máxima emisión de hexanol y ésteres alifáticos tuvo lugar a los 6 días de tratamiento con la hormona (**Tablas 18 y 22**).

CAPITULO III

**CARACTERIZACIÓN DE LA EMISIÓN,
ACUMULACIÓN Y BIOSÍNTESIS DE CVs EN
FRUTOS DE LA MANDARINA *DEG*, UN
MUTANTE DE CLEMENTINA CON
NÚMERO REDUCIDO DE GLÁNDULAS DE
ACEITE**

RESULTADOS

El mutante *deg* (*decreased number of oil glands*), también denominado 'liso', es un mutante de la mandarina Clementina de la colección del Centro de Genómica del IVIA, generado mediante mutagénesis física con rayos gamma a yemas de Clementina. Este mutante se caracteriza por presentar una drástica reducción en el número de glándulas de aceite en el flavedo, lo que le confiere un aspecto liso a la piel del fruto (**Figura 24**) (Carrera et al., 2007). En esta Tesis se propuso como objetivo estudiar si la reducción en el número de glándulas de aceite afectaba la emisión, contenido y biosíntesis de CVs en los frutos de este mutante en comparación con los de la mandarina Clementina, tanto a lo largo de la maduración como en respuesta a diferentes condiciones postcosecha.

Para llevar a cabo este trabajo se recolectaron frutos del mutante *deg* en diferentes estadios de maduración de las parcelas experimentales del Centro de Genómica del IVIA (Moncada, Valencia). Como controles se utilizaron frutos de mandarina Clementina de árboles localizados en la misma parcela que los del mutante y, por tanto, sometidos a las mismas prácticas de cultivo y condiciones ambientales.



Figura 24. Corte transversal de frutos maduros (estadio TC, izquierda) y verdes inmaduros (estadio VI, derecha) de la mandarina Clementina (control) y del mutante *deg*, en los que se puede apreciar el menor número de glándulas y el grosor del flavedo de los frutos del mutante.

Dado que la característica fenotípica distintiva del mutante *deg* es su reducido número de glándulas de aceite en el flavedo (**Figura 6**), se llevó a cabo un recuento de las mismas en frutos virando. En los frutos del mutante se contabilizaron 7 ± 2 glándulas/cm², frente a 40 ± 2 en los de la mandarina Clementina, lo que demuestra que en los frutos utilizados en el presente estudio se ha mantenido la característica afectada de la mutación.

1. Caracterización de la emisión, acumulación y biosíntesis de CVs en frutos del mutante *deg* durante la maduración natural

1.1 Evolución del color e IM de frutos del mutante *deg* durante la maduración

Para establecer los estadios de maduración fisiológicamente equivalentes entre ambos genotipos, se utilizaron los parámetros de color e IM de los frutos. Los frutos se recolectaron

entre los meses de agosto a noviembre y se seleccionaron los siguientes estadios de maduración: Verde Inmaduro (VI), Verde Maduro (VM), Virando (V) y Totalmente Coloreado (TC) (**Figura 25**).

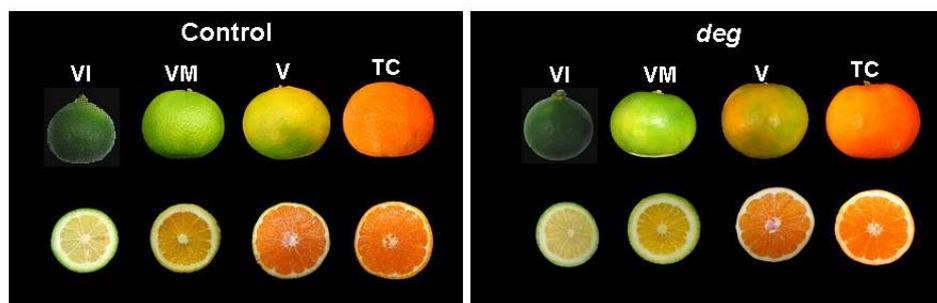


Figura 25. Aspecto interno y externo de frutos de la mandarina Clementina (control) y del mutante *deg* en los distintos estadios de desarrollo y maduración utilizados en esta Tesis. Los estadios seleccionados fueron: Verde Inmaduro (VI), Verde Maduro (VM), Virando (V) y Totalmente Coloreado (TC). Las fechas de recolección de los frutos, junto con otros parámetros de calidad se indican en la Tabla 24.

La evolución del color externo e interno de los frutos del mutante fue similar a la de los frutos control, aunque externamente mostraron cierto retraso en la desverdización natural (**Tabla 24; Figura 25**). La evolución del IM a lo largo de la maduración también fue muy similar en ambos genotipos, aunque el IM fue ligeramente superior en el mutante en los estadios V y TC (**Tabla 24**).

Tabla 24. Índice de color (Hunter *a/b*) y de madurez (IM) de frutos de la mandarina Clementina (control) y del mutante *deg* en diferentes estadios de maduración: Verde Inmaduro (VI), Verde Maduro (VM), Virando (V) y Totalmente Coloreado (TC). El color de los frutos corresponde a la media de al menos 6 frutos. El IM corresponde a la media de 3 grupos de 10 frutos. Los frutos se recolectaron durante la campaña 2010/11. n.a: no analizado.

Fecha	Color (Hunter <i>a/b</i>)		IM
	Flavado	Pulpa	
Control			
VI Ago.	-0,88 ± 0,01	n.a	n.a
VM 26 Oct.	-0,61 ± 0,04	0,13 ± 0,01	8,42 ± 0,01
V 8 Nov.	-0,15 ± 0,04	0,30 ± 0,01	9,63 ± 0,01
TC 30 Nov.	0,66 ± 0,04	0,18 ± 0,01	12,45 ± 0,02
<i>deg</i>			
VI Ago.	-0,94 ± 0,01	n.a ± n.a	n.a ± n.a
VM 26 Oct.	-0,64 ± 0,04	0,19 ± 0,01	8,97 ± 0,02
V 8 Nov.	-0,26 ± 0,04	0,24 ± 0,01	10,75 ± 0,01
TC 30 Nov.	0,64 ± 0,04	0,21 ± 0,02	13,07 ± 0,01

1.2 Emisión de CVs en frutos del mutante *deg* durante la maduración

El mutante *deg*, a pesar de tener un número muy inferior de glándulas de aceite, presentó una variación de CVs en el espacio de cabeza similar a la de los frutos de la mandarina

Clementina; 53 y 58, respectivamente, pero la abundancia de los mismos fue entre 2 y 3 veces superior (**Figura 26**).

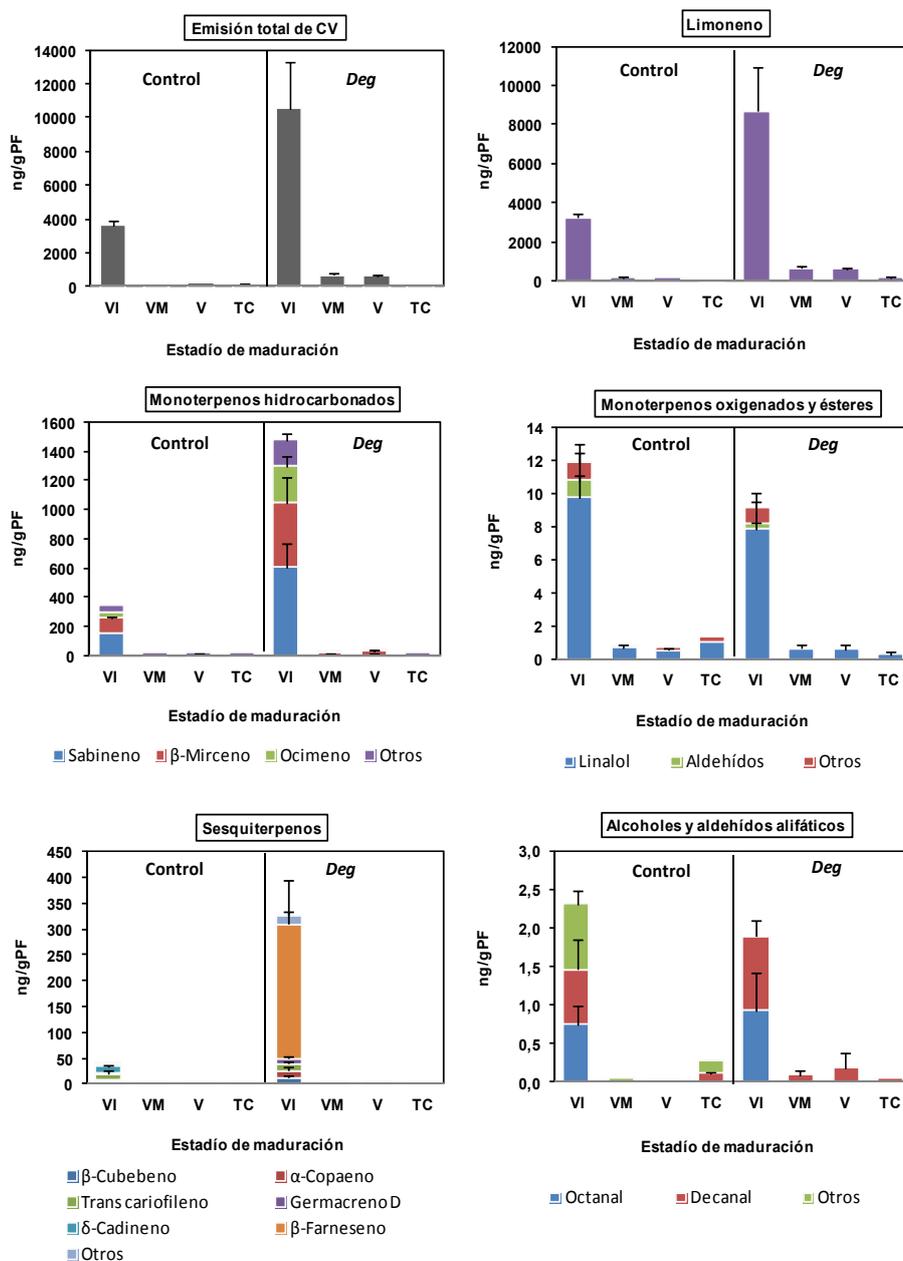


Figura 26. Perfil de emisión de los CVs mayoritarios de frutos de la mandarina Clementina (control) y del mutante *deg* durante la maduración. Dentro de cada panel la barra etiquetada como ‘Otros’ representa CVs minoritarios de cada categoría. La barra ‘otros’ del panel de monoterpenos hidrocarbonados incluye a : 3-careno, α -felandreno, α -pineno, 2- β -pineno, p-cimeno, ρ -terpineno y α -terpinoleno; en el panel de monoterpenos oxigenados y ésteres incluye a: 4-terpineol, L- α -terpineol, α -terpeneol acetato, geraniol acetato; en el panel de sesquiterpenos incluye a: α -cubebeno, ciclosativen, ρ -elemeno, β -elemeno, α -selineno, patchuleno, zingibereno, isocariofileno, aromadendreno, germacreno B, biciclogermacreno, δ -cadineno, δ -guayeno, α -muroleno, α -bergamoteno, epibiciclosesquifelandreno y β -sesquifelandreno; en el panel de alcoholes y aldehídos alifáticos incluye al nonanal y 2-octanol.

Los cambios en la emisión de los CVs mayoritarios en frutos del mutante y de la mandarina control a lo largo de la maduración se muestran en la **Figura 26**. En ambos genotipos los frutos VI fueron los que presentaron una mayor emisión de CVs, que se redujo de forma considerable en los frutos VM y se mantuvo en niveles muy bajos en los estadios V y TC (**Figura 26**). En cuanto a los CVs individuales destacaron los monoterpenos hidrocarbonados por su abundancia y diversidad, donde el limoneno fue el mayoritario, con concentraciones máximas de 3229 y 8681 ng/g PF en frutos VI control y mutante, respectivamente. Otros monoterpenos hidrocarbonados relevantes fueron el sabineno, β -mirceno y ocimeno, todos ellos con una emisión entre 4 y 6 veces superior en frutos del mutante en el estadio VI respecto a frutos control (**Figura 26**). También destacó en los frutos del mutante *deg* la mayor emisión de otros monoterpenos hidrocarbonados como el α -felandreno, γ -terpineno y α -terpinoleno (datos no mostrados).

Es interesante mencionar que la emisión de los CVs del grupo de monoterpenos oxigenados y ésteres fue similar en ambos genotipos y, en general, siguieron una evolución comparable al resto de CVs, con máxima emisión en los frutos VI para descender posteriormente (**Figura 26**). Dentro de este grupo el CV más abundante fue el linalol, mientras que los monoterpenos de tipo aldehído y éster (representados en la **Figura 26** en el panel de monoterpenos oxigenados y ésteres en la categoría de ‘Aldehídos, cetonas y ésteres’) fueron específicos del estadio VI, destacando el citronelal y el geranial entre los aldehídos y el terpenol y geraniol acetato entre los ésteres (específicos del mutante *deg*) (**Figura 26**).

En el grupo de los sesquiterpenos destaca la elevada emisión del β -farneseno en el mutante, que fue 65 veces superior a la de los frutos control y más abundante en frutos VI (**Figura 26**). En cuanto a los sesquiterpenos cíclicos, el δ -cadineno (10,7 ng/g PF) fue el mayoritario en los frutos control, mientras que en el mutante *deg* lo fue el α -copaeno (14,5 ng/g PF). Otros sesquiterpenos cíclicos de importancia fueron el trans cariofileno y el β -cubebeno, y no se detectó valenceno en ninguna de las muestras analizadas (**Figura 26**).

Los alcoholes y aldehídos alifáticos contribuyeron de forma minoritaria a la concentración total de CVs y se emitieron principalmente en el estadio VI. Destacaron el decanal y el octanol, cuya concentración fue similar en ambos genotipos, mientras que el 2-octanol y el nonanal (representados en la **Figura 26** en el panel de alcoholes y aldehídos alifáticos en la categoría de ‘otros’) fueron específicos de frutos control.

1.3 Contenido de CVs en el flavedo de frutos *deg* durante la maduración

En todos los estadios de maduración analizados la concentración de CVs en el flavedo de frutos del mutante *deg* fue entre 4 y 6 veces inferior a la de los frutos control (**Figura 27**). En el flavedo de los frutos de Clementina, el número de CVs identificados fue ligeramente superior respecto al mutante; 47 y 36, respectivamente.

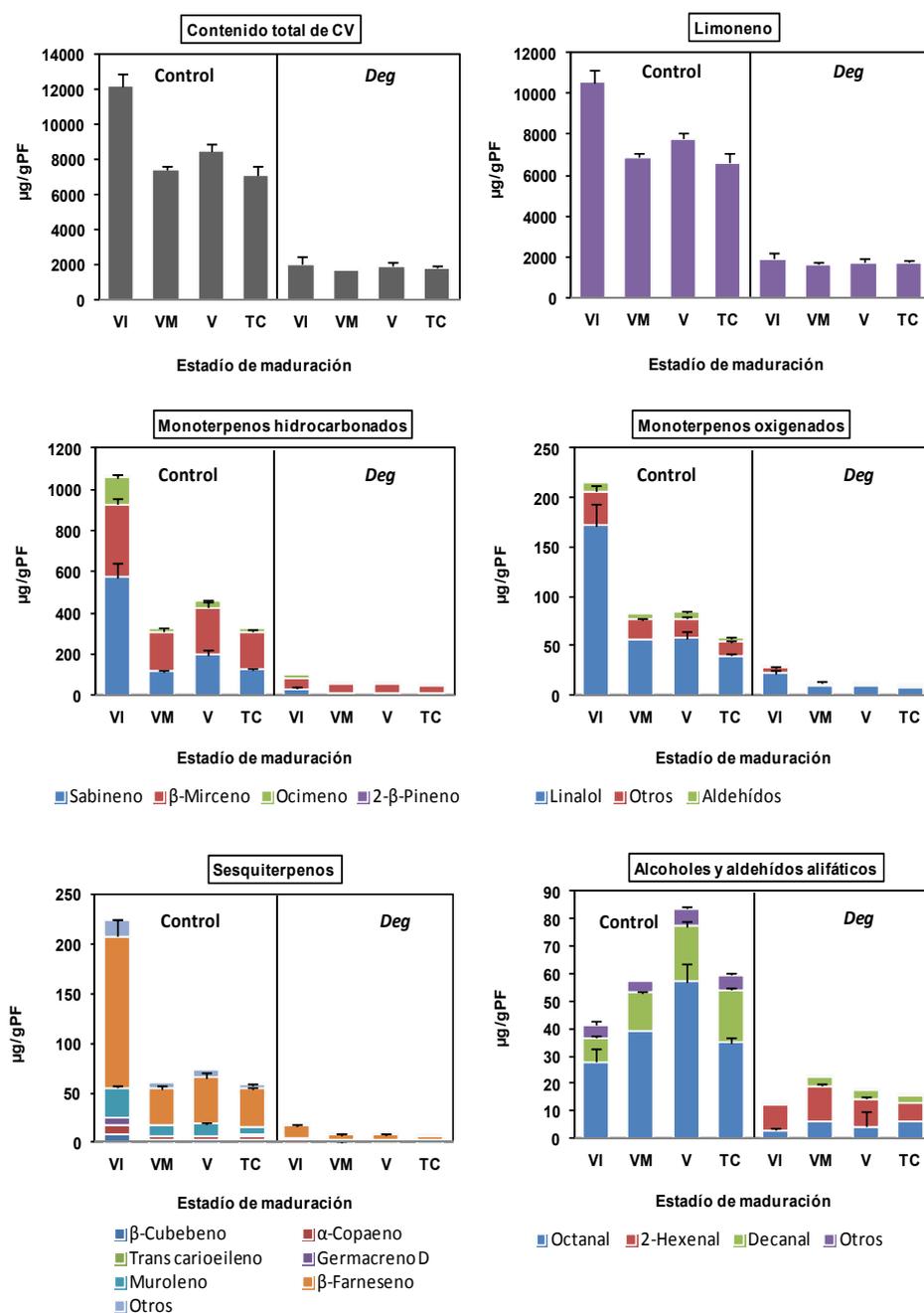


Figura 27. CVs mayoritarios en el flavedo de frutos de la mandarina Clementina (control) y del mutante *deg* durante la maduración. En el apartado ‘otros’ se incluyen CV presentes en menor concentración. En el panel monoterpenos oxigenados la categoría ‘Otros’ incluye a: 4-terpineol, L- α -terpineol, nerol, geraniol e isogeraniol; en el panel de sesquiterpenos ‘Otros’ incluye a: δ -elemeno, α -humuleno, aromadendreno, β -sesquifelandreno; en el panel de alcoholes y aldehídos alifáticos la categoría ‘Otros’ incluye a: nonanal, cis-3-hexanol y dodecanal.

El patrón de evolución de los diferentes grupos de CVs terpenoides (mono-, sesquiterpenos y sus derivados) a lo largo de la maduración fue similar entre ambos genotipos,

siendo, en general, la concentración de los CVs superior en el estadio VI respecto al resto de estadios de maduración. Los CVs del grupo de alcoholes y aldehídos alifáticos presentaron una tendencia diferente, ya que mostraron un aumento transitorio con un máximo en el estadio V en los frutos control y en el VM en los frutos del mutante (**Figura 27**).

El limoneno fue el CV mayoritario en el flavedo de ambos genotipos, con proporciones próximas al 90% del contenido total de CVs, aunque en los frutos del mutante la concentración fue entre 4 y 6 veces inferior a la de los frutos control. El resto de monoterpenos hidrocarbonados también mostró una mayor concentración en los frutos de Clementina, destacando por su abundancia el sabineno cuya concentración en el flavedo fue entre 9 y 23 veces superior en Clementina.

La concentración de linalol, monoterpeno alcohol mayoritario, se redujo durante la maduración y en los frutos control fue entre 5 y 8 veces superior que en los frutos *deg*, observándose las mayores diferencias en el estadio VI. Además, destacaron otros monoterpenos oxigenados como el L- α -terpineol por su abundancia, el 4-terpineol por ser específico de tejido inmaduro de los frutos control, y el nerol, que se identificó únicamente en el estadio VI de ambos genotipos. Entre los monoterpenos aldehídos y cetonas destacó el citronelal, cuya concentración fue entre 4 y 8 veces inferior en frutos del mutante.

La concentración de sesquiterpenos totales, al igual que los monoterpenos, se redujo durante la maduración. El sesquiterpeno más abundante en el flavedo de ambos genotipos fue el β -farneseno con un contenido máximo en el estadio VI, y niveles bajos y relativamente constantes en el resto de estadios de maduración. La concentración de β -farneseno en el flavedo de frutos control fue entre 7 y 12 veces mayor que en el mutante. Entre los sesquiterpenos cíclicos destacó, por su abundancia, el muroleno cuyo contenido máximo se alcanzó en el estadio VI (29,8 y 3,1 $\mu\text{g/gPF}$ en frutos control y *deg*, respectivamente). El germacreno D fue específico de frutos control, mientras que el cariofileno, de los frutos del mutante y no mostró variaciones a lo largo de la maduración. No se identificó valenceno en ninguna de las muestras analizadas.

La concentración de alcoholes y aldehídos alifáticos, al igual que el resto de CVs, fue superior en el flavedo de los frutos control, siendo los estadios de maduración intermedios (VM y V) los más ricos en dichos compuestos. Dentro de este grupo el aldehído octanal fue el más abundante en el flavedo de los frutos control, seguido del decanal, mientras que el 2-hexenal fue específico de los frutos *deg* y el más abundante de este grupo (**Figura 27**).

1.4 Composición de CVs en la pulpa de frutos del mutante deg durante la maduración

La abundancia de CVs totales en la pulpa de los frutos *deg* fue entre 5 y 3 veces inferior, dependiendo del estadio de maduración, respecto a los frutos control. Por otro lado, la

contribución relativa de cada CV (porcentaje respecto al total) y su evolución durante la maduración fue similar en ambos genotipos (**Figura 28**).

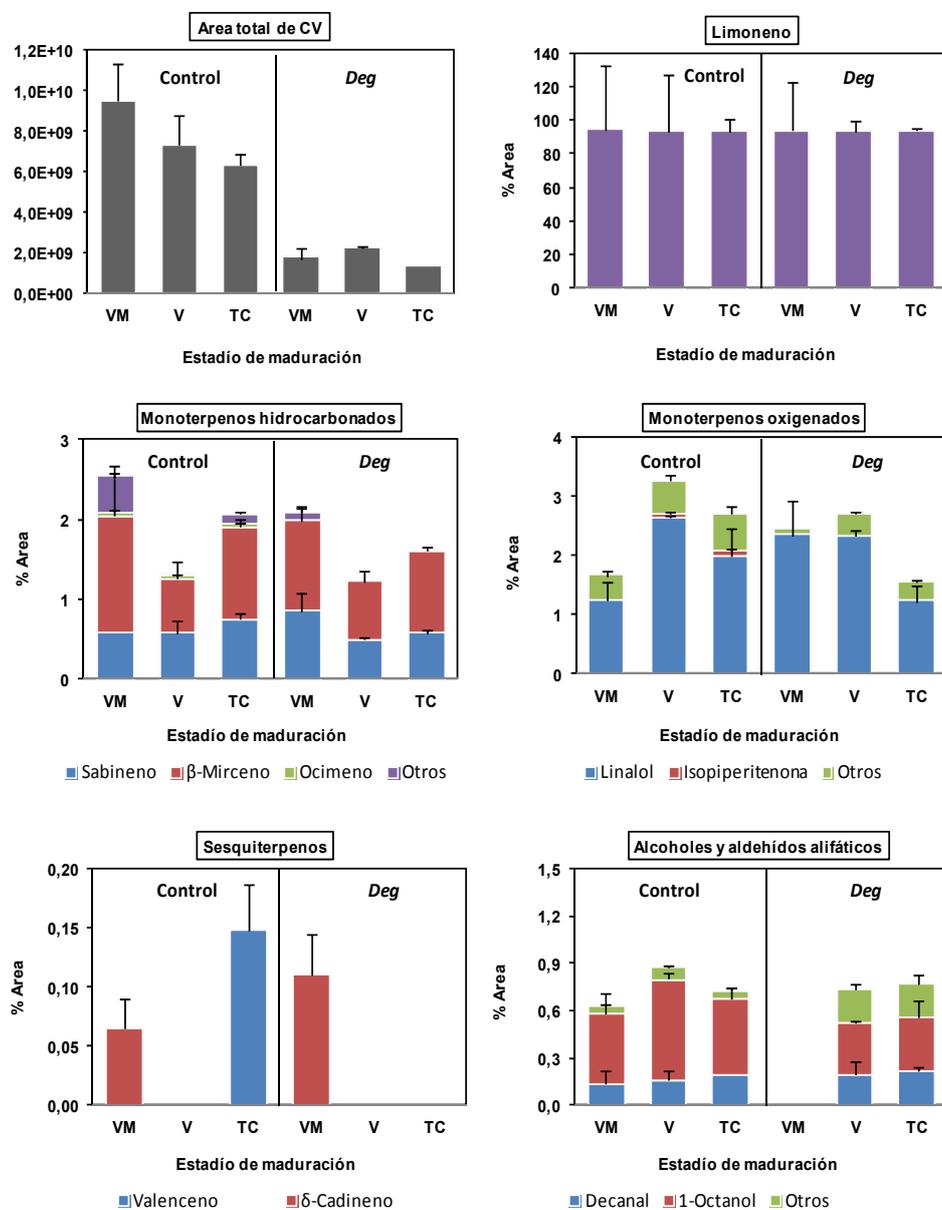


Figura 28. Abundancia de CVs totales y porcentaje de CVs mayoritarios en la pulpa de frutos de la mandarina Clementina (control) y del mutante *deg* durante la maduración. En el apartado ‘Otros’ se incluyen CVs presentes en menor concentración. En el panel monoterpenos hidrogenados la categoría ‘Otros’ incluye a: α -pineno, 2- β -pineno; en el panel de monoterpenos oxigenados la categoría ‘Otros’ incluye a: 4-terpineol, L- α -terpineol, β -citronelol, geraniol; en el panel de alcoholes y aldehídos alifáticos ‘Otros’ incluye a: nonanal y cis-3-hexanol.

El limoneno fue el CV mayoritario, representando aproximadamente un 94% del total de CVs en ambos genotipos. Otros monoterpenos relevantes fueron el sabineno (menor al 1%) y β -mirceno (entre el 1 y 2 %), que se mantuvieron en proporciones relativamente constantes a lo

largo de la maduración en ambos genotipos (**Figura 28**). El ocimeno sólo se detectó en la pulpa de los frutos control aunque en proporciones muy bajas.

En el grupo de los monoterpenos oxigenados el mayoritario fue el linalol, cuyo porcentaje se mantuvo entre el 1 y 3 % del total de CVs. Además, destacó la isopiperitenona y el 4-terpineol únicamente en los frutos control, que se incluyen en la categoría de ‘otros’ (**Figura 28**).

En ambos genotipos los sesquiterpenos representaron un porcentaje muy bajo del total de CVs en la pulpa (entre el 0,05 y 0,15%) identificándose exclusivamente δ -cadineno y el valenceno. El δ -cadineno sólo se detectó en los frutos VM de los dos genotipos, mientras que el valenceno únicamente se detectó en la pulpa de frutos control TC (**Figura 28**).

Por último, dentro del grupo de alcoholes y aldehídos alifáticos destacaron por su abundancia el 1-octanol y el decanal, con porcentajes comprendidos entre 0,15 y 0,6% en ambos genotipos, excepto en la pulpa de frutos VM del mutante en la que no se identificó ningún CV de este grupo (**Figura 28**). Otros CVs minoritarios de este grupo fueron el nonanal y el cis-3-hexen-1-ol.

*1.5 Análisis de la expresión de genes de la biosíntesis de CVs en el flavedo y la pulpa de frutos del mutante *deg* durante la maduración*

Con el objetivo de estudiar si las diferencias observadas en el contenido y composición de CV en el flavedo y pulpa de los frutos del mutante *deg* respecto a los frutos control están asociadas a cambios en la expresión de genes de biosíntesis de CVs, se analizó la expresión de diversas TPSs mediante RT-qPCR.

La **Figura 29** muestra la expresión relativa de 7 genes de TPSs en el flavedo de frutos de la mandarina Clementina y *deg* a lo largo de la maduración. En general, se observó que la expresión relativa y las variaciones en el patrón de expresión de las monoterpeno sintasas (β -*PIN*, *LIM 1 y 2*, *LIN* y *OCI*) fueron diferentes en ambos genotipos. Así, la expresión de las monoterpeno sintasas β -*PIN*, y *LIM1 y 2* fue siempre superior en el flavedo de frutos control, alcanzando un nivel máximo en los frutos VM y disminuyendo posteriormente. En el flavedo de los frutos *deg* la expresión se mantuvo baja y relativamente constante durante la maduración. Por el contrario, los niveles de transcritos de los genes *LIN* y *OCI* fueron mayores en los frutos verdes (VI y VM) y siempre superiores en el flavedo del mutante *deg*. La expresión del gen *VAL* se incrementó progresivamente a partir del estadio VM y fue siempre superior en el flavedo de los frutos control. En cuanto a la sesquiterpeno multiproducto *TPS3* no se detectó expresión de este gen en ninguna de las muestras analizadas.

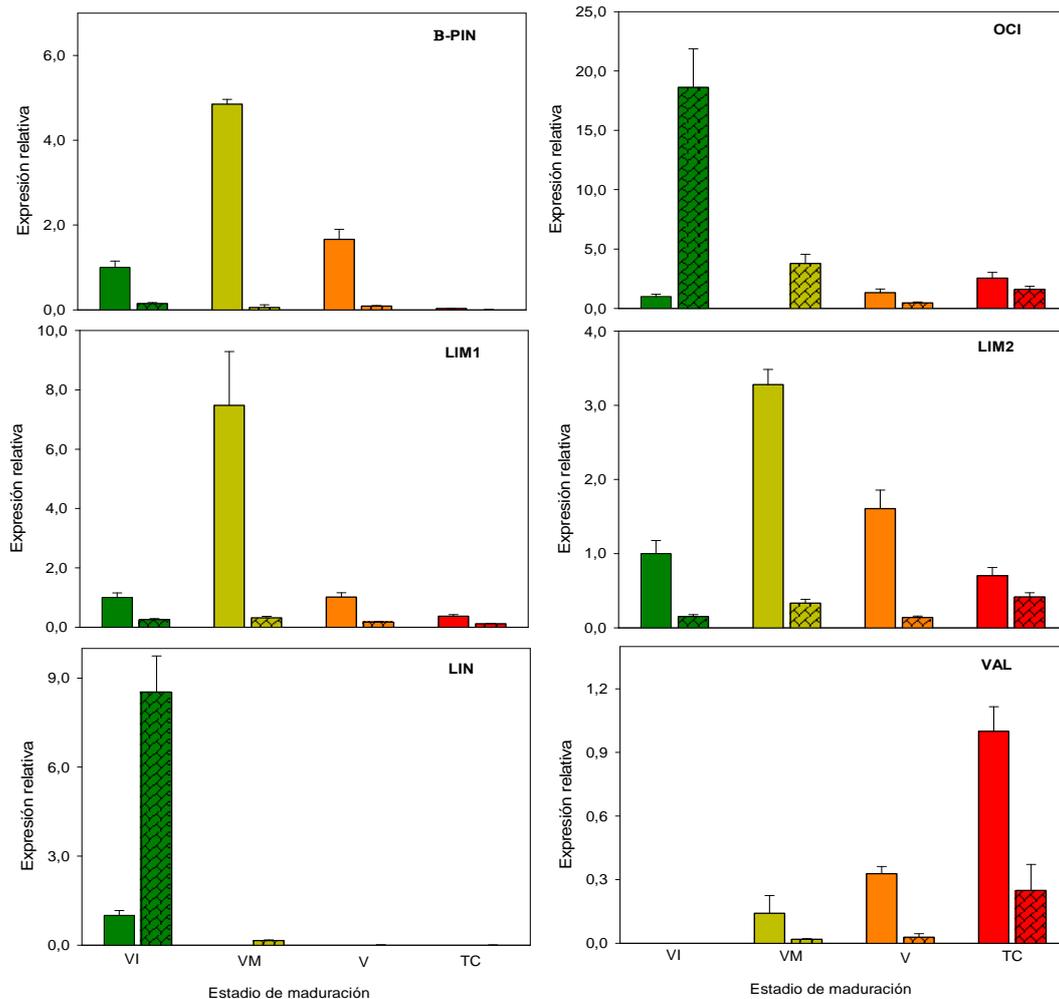


Figura 29. Expresión relativa de 6 terpeno sintasas en el flavedo de frutos de la mandarina Clementina (control) y del mutante *deg* durante la maduración natural. Las terpeno sintasas analizadas fueron: β -pineno sintasa (β -PIN), ocimeno sintasa (OCI), limoneno sintasa 1 y 2 (LIM 1 y LIM 2), linalol sintasa (LIN) y valenceno sintasa (VAL). Los valores de expresión obtenidos para cada gen están normalizados frente al nivel de expresión del flavedo de frutos control en el estadio VI, al que se le asignó un valor relativo de 1, excepto la VAL que está normalizada frente al flavedo de frutos control en el estadio TC. Las barras lisas corresponden a los frutos control y las rayadas corresponden a los frutos del mutante.

En general, los niveles de expresión de todas las TPSs en la pulpa, excepto la VAL, fueron inferiores a los del flavedo. Además, todas las TPSs mostraron una menor expresión en la pulpa de los frutos *deg* respecto a los frutos control (**Figura 30**). En la pulpa de ambos genotipos la expresión de β -PIN, LIM 1 y 2, y VAL aumentó con la maduración del fruto, alcanzándose, en general, la máxima expresión en frutos TC. Por otro lado, la expresión de LIN y OCI fue muy diferente y sólo se detectó expresión en la pulpa de frutos control TC.

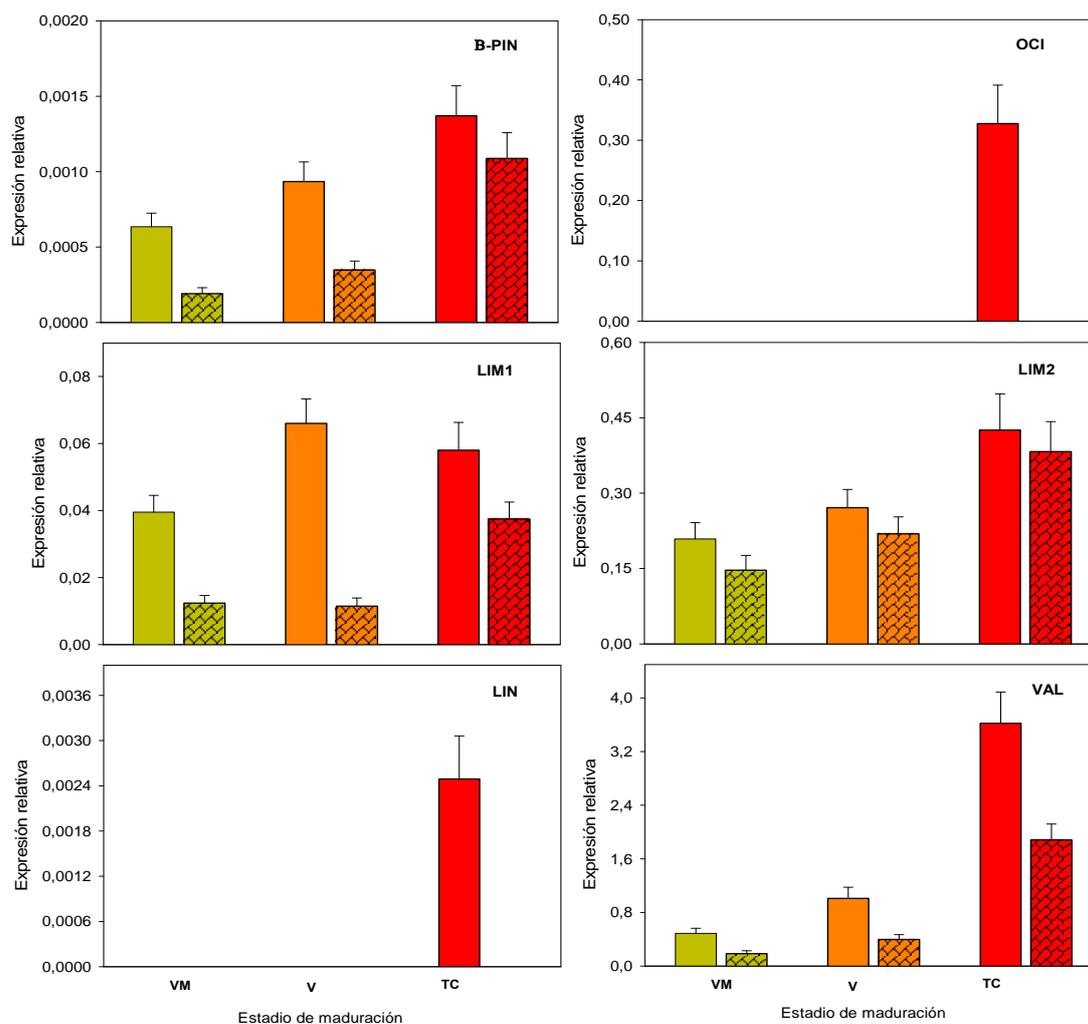


Figura 30. Expresión relativa de 6 terpeno sintasas en la pulpa de frutos de la mandarina Clementina (control) y del mutante *deg* durante la maduración natural. Las terpeno sintasas analizadas fueron: β -pineno sintasa (*β -PIN*), ocimeno sintasa (*OCI*), limoneno sintasa 1 y 2 (*LIM 1* y *LIM 2*), linalol sintasa (*LIN*) y valenceno sintasa (*VAL*). Los valores de expresión obtenidos para cada gen están normalizados frente al nivel de expresión del flavedo de frutos control en el estadio VI, al que se le asignó un valor relativo de 1, excepto la *VAL* que está normalizada frente al flavedo de frutos control en el estadio TC. Las barras lisas corresponden a los frutos control y las rayadas corresponden a los frutos del mutante.

2. Efecto del tratamiento de desverdización con etileno sobre la emisión, acumulación y biosíntesis de CVs en frutos del mutante *deg*

En el capítulo anterior de esta Tesis Doctoral y en trabajos previos (Norman y Craft, 1968; Porat et al., 1999; Nishikawa et al., 2002; Sharon-Asa et al., 2003; Herrera, 2007a; Mayouni et al., 2011) se ha observado que el tratamiento postcosecha con etileno puede afectar de forma importante a la composición y emisión de CVs en frutos cítricos. Por tanto, en este apartado se planteó estudiar el efecto del etileno sobre los CV en frutos del mutante *deg* en comparación con los de su línea parental.

El tratamiento con etileno se realizó en frutos virando, tanto en los controles como en *deg*, promovió el cambio de color, alcanzándose valores de *a/b* en torno a 0,7 a los 6 días, mientras que en los frutos incubados en aire no se produjeron cambios importantes respecto a los valores iniciales. En la **Figura 31** se muestra el aspecto y el color externo de los frutos de Clementina y del mutante *deg* sometidos a los distintos tratamientos.

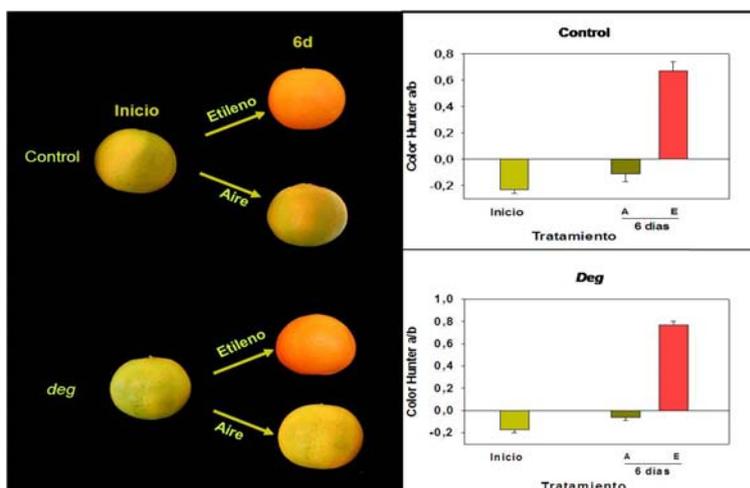


Figura 31. Aspecto externo e índice color (Hunter *a/b*) de los frutos de mandarina Clementina (control) y del mutante *deg* durante el tratamiento de desverdización con etileno. Los frutos se incubaron durante 6 días en una atmósfera de aire (A) o de etileno (E) ($5 \mu\text{l l}^{-1}$) ppm). El color es la media de al menos 6 frutos.

2.1 Efecto del tratamiento con etileno sobre la emisión de CVs en frutos del mutante *deg*

Al inicio del tratamiento los frutos recién recolectados del mutante *deg* presentaron una emisión total de CVs aproximadamente el doble que los frutos control (**Tabla 25**). A los 6 días de tratamiento, la emisión de CVs disminuyó a niveles similares en ambos genotipos, pero de forma más acusada en los tratados con aire que con etileno. En general, los cambios en la emisión de CVs en respuesta a los diferentes tratamientos fueron similares en ambos genotipos (**Tabla 25**). El limoneno fue el CV mayoritario en los frutos recién cosechados (93-94%) y su emisión disminuyó drásticamente a los 6 días, especialmente en los frutos almacenados en aire (**Tabla 25**). El resto de monoterpenos hidrocarbonados siguió una tendencia similar, excepto el ocimeno que en los frutos en aire presentó una concentración mayor que en los tratados con etileno. La emisión del monoterpeno alcohol linalol también disminuyó durante los distintos tratamientos tanto en frutos control como en *deg*.

Tabla 25. Efecto del tratamiento postcosecha con etileno (5 ppm) en la emisión (ng/g PF) de CVs mayoritarios en frutos de la mandarina Clementina (control) y el mutante *deg*. Cada valor corresponde a la media \pm DE de al menos 3 réplicas de 6 frutos cada una. N.D: no detectado. Tr: trazas.

ng/g PF	INICIO		6d AIRE		6d ETILENO	
	CONTROL	DEG	CONTROL	DEG	CONTROL	DEG
Monoterpenos hidrocarbonados						
α -Pinoeno	0,75 \pm 0,12	1,73 \pm 0,43	0,20 \pm 0,04	0,21 \pm 0,03	0,49 \pm 0,29	0,25 \pm 0,15
2- β -Pinoeno	N.D	0,17 \pm 0,03	N.D	N.D	N.D	0,16 \pm 0,01
Sabineno	0,43 \pm 0,15	2,69 \pm 0,51	N.D	N.D	0,40 \pm 0,06	N.D
3-Careno	N.D	0,14 \pm 0,02	N.D	N.D	N.D	N.D
β -Miraceno	2,43 \pm 0,09	5,98 \pm 2,04	N.D	N.D	1,92 \pm 0,37	0,64 \pm 0,07
Limoneno	172,00 \pm 44,67	324,29 \pm 64,72	1,21 \pm 0,56	2,24 \pm 0,14	4,70 \pm 0,04	6,66 \pm 1,41
Ocimeno	6,49 \pm 0,08	2,56 \pm 0,02	1,16 \pm 0,51	3,14 \pm 2,39	0,19 \pm 0,01	1,84 \pm 0,01
Monoterpenos alcoholes						
Linolol	0,10 \pm 0,03	0,55 \pm 0,10	N.D	0,10 \pm 0,01	N.D	N.D
Monoterpenos aldehídos y cetonas						
β -Ciclocitral	N.D	N.D	N.D	N.D	0,20 \pm 0,02	0,82 \pm 0,12
Sesquiterpenos cíclicos						
β -Cubebeno	0,10 \pm 0,04	0,12 \pm 0,03	N.D	N.D	Tr	N.D
δ -Selineno	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	0,08 \pm 0,01
β -Selineno	N.D	N.D	N.D	N.D	0,18 \pm 0,01	0,17 \pm 0,04
α -Copaeno	0,13 \pm 0,03	0,16 \pm 0,04	N.D	N.D	0,04 \pm 0,01	N.D
Trans cariofileno	1,21 \pm 0,89	0,93 \pm 0,47	1,68 \pm 0,16	1,35 \pm 0,12	9,01 \pm 0,29	6,25 \pm 0,21
α -Humuleno	0,04 \pm 0,01	0,04 \pm 0,01	Tr	0,04 \pm 0,01	0,43 \pm 0,02	0,29 \pm 0,02
Aromadendreno	N.D	N.D	N.D	N.D	0,20 \pm 0,02	0,20 \pm 0,02
α -Gurjuneno	N.D	N.D	N.D	N.D	0,32 \pm 0,01	0,26 \pm 0,01
Germacreno D	0,08 \pm 0,03	0,10 \pm 0,01	N.D	N.D	N.D	N.D
Biciclogermacreno	0,04 \pm 0,01	0,08 \pm 0,01	N.D	N.D	N.D	N.D
Valenceno	N.D	N.D	0,18 \pm 0,04	0,11 \pm 0,09	11,63 \pm 0,10	10,12 \pm 0,51
δ -Cadineno	0,16 \pm 0,04	0,21 \pm 0,01	N.D	N.D	N.D	N.D
Sesquiterpenos lineales						
β -Farneseno	N.D	0,65 \pm 0,05	N.D	N.D	N.D	N.D
α -Farneseno	N.D	N.D	0,33 \pm 0,08	0,28 \pm 0,01	10,28 \pm 0,72	9,67 \pm 0,05
Aldehídos alifáticos						
Nonanal	N.D	0,16 \pm 0,01	N.D	0,17 \pm 0,03	N.D	N.D
Decanal	N.D	0,10 \pm 0,02	0,10 \pm 0,01	N.D	N.D	N.D
Esteres alifáticos						
Hexil acetato	N.D	N.D	N.D	N.D	Tr	Tr
Emisión total de CV	184,71 \pm 46,32	342,24 \pm 68,66	4,88 \pm 1,41	7,63 \pm 0,45	40,32 \pm 2,02	40,48 \pm 4,98

La emisión de la mayoría de los sesquiterpenos se estimuló en ambos genotipos por el tratamiento con etileno, mientras que en aire se mantuvieron o descendieron respecto a los valores iniciales. Es de destacar que, a los 6 días del tratamiento con etileno la emisión mayoritaria en el espacio de cabeza fue de trans cariofileno, α -farneseno y valenceno, y en proporciones similares en los frutos control y del mutante. En particular, la emisión de valenceno en los frutos tratados con etileno alcanzó concentraciones 64 y 92 veces superiores en los frutos control y *deg*, respectivamente, respecto a los frutos correspondientes en aire. Es interesante mencionar que en ambos genotipos sólo se detectó emisión del norisoprenoide β -ciclocitral y del éster hexil acetato en los frutos tratados con etileno (**Tabla 25**).

2.2 Efecto del tratamiento con etileno sobre el contenido de CVs en el flavedo de frutos del mutante *deg*

El análisis de los CVs en el flavedo reveló que el contenido total de CVs en frutos control fue entre 4 y 7 veces superior al mutante, y no se observaron grandes cambios en respuesta a los tratamientos (**Tabla 26**).

Los distintos tratamientos postcosecha no tuvieron efectos importantes sobre la concentración de monoterpenos, exceptuando el limoneno (**Tabla 26**). Este monoterpeno mayoritario (94-95 % de los CVs totales) no varió respecto a los valores iniciales en los controles, pero en el flavedo de los frutos *deg* incubados en aire disminuyó un 50% y un 20% en los tratados con etileno. Otros monoterpenos relevantes como el sabineno, β -mirceno y linalol no cambiaron de forma importante respecto a las iniciales en respuesta a los diferentes tratamientos, aunque sus concentraciones fueron entre 4-10 veces inferiores en el flavedo de frutos del mutante (**Tabla 26**).

Los tratamientos postcosecha tampoco afectaron de forma importante a las concentraciones de los sesquiterpenos, y sólo se observó una ligera disminución en los frutos *deg* tratados durante 6 días en aire. Es interesante mencionar que el β -sesquifelandreno, aunque en concentraciones muy bajas, se identificó únicamente en frutos *deg*. De forma similar los aldehídos y alcoholes alifáticos se mantuvieron prácticamente inalterados por los distintos tratamientos en los dos genotipos. Sin embargo, el aldehído 2-hexenal sólo se identificó en frutos *deg* y no se detectó en ninguna de las muestras de frutos control (**Tabla 26**).

Tabla 26. Efecto del tratamiento postcosecha con etileno (5 ppm) en la concentración ($\mu\text{g/g PF}$) de los CVs mayoritarios en el flaveado de frutos de la mandarina Clementina (control) y el mutante *deg*. Cada valor corresponde a la media \pm DE de 2 réplicas. N.D.: no detectado.

$\mu\text{g/g}$	INICO		6d AIRE		6d ETILENO	
	CONTROL	DEG	CONTROL	DEG	CONTROL	DEG
Monoterpenos hidrocarbonados						
Sabineno	51,18 \pm 10,51	10,05 \pm 0,40	54,18 \pm 9,63	9,13 \pm 0,93	38,64 \pm 2,13	13,15 \pm 1,22
β -Miraceno	283,74 \pm 34,53	56,09 \pm 2,99	270,56 \pm 35,99	30,39 \pm 4,85	309,60 \pm 7,92	40,01 \pm 0,95
Limoneno	9245,46 \pm 354,77	2206,18 \pm 59,97	8854,13 \pm 390,28	1251,23 \pm 139,96	9033,06 \pm 438,15	1797,15 \pm 37,35
Ocimeno	8,82 \pm 1,27	3,62 \pm 0,06	6,78 \pm 1,99	2,36 \pm 0,03	6,21 \pm 0,61	4,79 \pm 0,11
α -Terpinoleno	2,77 \pm 1,09	N.D.	2,15 \pm 0,36	N.D.	3,34 \pm 0,27	0,73 \pm 0,07
Monoterpenos alcoholes						
Linalol	40,87 \pm 1,35	9,29 \pm 0,01	42,07 \pm 4,56	6,25 \pm 0,90	48,20 \pm 1,94	9,30 \pm 0,17
L- α -Terpineol	12,74 \pm 1,86	2,51 \pm 0,42	11,61 \pm 2,16	1,13 \pm 0,12	17,12 \pm 0,76	2,72 \pm 0,02
β -Citronelol	1,32 \pm 0,43	N.D.	0,91 \pm 0,04	N.D.	1,29 \pm 0,08	N.D.
Isogeraniol	0,35 \pm 0,06	N.D.	N.D.	N.D.	0,36 \pm 0,10	N.D.
Geraniol	0,44 \pm 0,07	N.D.	N.D.	N.D.	3,44 \pm 0,09	N.D.
Monoterpenos aldehidos y cetonas						
Citronelal	4,50 \pm 0,52	0,45 \pm 0,09	3,60 \pm 0,66	0,37 \pm 0,04	5,56 \pm 0,47	0,38 \pm 0,11
Neral	1,39 \pm 0,30	0,08 \pm 0,00	0,61 \pm 0,15	0,06 \pm 0,01	1,47 \pm 0,06	0,14 \pm 0,02
Geraniol	2,28 \pm 0,35	0,58 \pm 0,08	1,86 \pm 0,45	0,63 \pm 0,12	2,40 \pm 0,15	0,83 \pm 0,09
Sesquiterpenos cíclicos						
β -Cubebeno	3,24 \pm 0,60	0,37 \pm 0,03	2,75 \pm 0,43	0,21 \pm 0,02	3,64 \pm 0,02	0,33 \pm 0,02
α -Copaeno	5,02 \pm 1,19	0,58 \pm 0,02	4,11 \pm 0,14	0,35 \pm 0,03	5,47 \pm 0,07	0,54 \pm 0,02
Trans cariofileno	1,48 \pm 0,28	N.D.	1,48 \pm 0,38	N.D.	1,05 \pm 0,06	N.D.
α -Humuleno	0,75 \pm 0,24	N.D.	0,47 \pm 0,12	N.D.	0,78 \pm 0,04	N.D.
Geracreno D	2,75 \pm 0,21	0,28 \pm 0,08	2,21 \pm 0,10	N.D.	2,97 \pm 0,36	N.D.
Biclogermacreno	1,08 \pm 0,03	N.D.	1,16 \pm 0,09	N.D.	1,43 \pm 0,21	N.D.
δ -Cadineno	4,21 \pm 0,75	0,59 \pm 0,03	4,00 \pm 0,42	0,39 \pm 0,05	4,84 \pm 0,01	0,63 \pm 0,02
Muroleno	9,96 \pm 2,17	1,32 \pm 0,01	8,08 \pm 1,07	0,77 \pm 0,13	11,00 \pm 0,13	1,35 \pm 0,10
β -Sesquifelandreno	N.D.	0,20 \pm 0,02	N.D.	N.D.	N.D.	0,20 \pm 0,01
Aldehidos y alcoholes alifáticos						
2-Hexenal	N.D.	9,58 \pm 0,75	N.D.	6,88 \pm 1,78	N.D.	N.D.
Octanal	79,11 \pm 13,03	9,51 \pm 0,20	77,63 \pm 8,86	7,16 \pm 1,31	77,26 \pm 3,19	8,05 \pm 0,21
Nonanal	2,29 \pm 0,10	N.D.	1,75 \pm 0,12	N.D.	1,78 \pm 0,10	0,26 \pm 0,04
Decanal	21,81 \pm 3,49	3,73 \pm 0,04	21,54 \pm 2,72	2,30 \pm 0,37	23,36 \pm 0,89	3,05 \pm 0,14
Dodecanal	3,70 \pm 0,45	0,55 \pm 0,12	3,94 \pm 0,46	0,33 \pm 0,01	5,64 \pm 0,16	0,71 \pm 0,02
1-Octanol	2,25 \pm 0,26	0,55 \pm 0,10	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Contenido total CV	9797,43 \pm 430,83	2318,01 \pm 65,77	9381,54 \pm 461,38	1321,00 \pm 151,02	9612,93 \pm 458,23	1885,89 \pm 40,74

2.3 Efecto del tratamiento con etileno sobre la expresión de genes de la biosíntesis de CVs en frutos del mutante *deg*

Se estudió igualmente el efecto del etileno en la expresión de 7 genes de la biosíntesis de terpenos en el flavedo de frutos *deg* y de la mandarina Clementina. La expresión de los genes *LIM 1*, *LIM 2* y β -*PIN* fue siempre superior en los frutos control que en el mutante. En los frutos control el tratamiento con etileno redujo la expresión de β -*PIN* y *LIM 2*, pero no de *LIM 1*. Sin embargo, y dado que la expresión de estos genes en los frutos recién recolectados del mutante era muy baja, apenas experimentaron cambios importantes por los tratamientos (**Figura 32**).

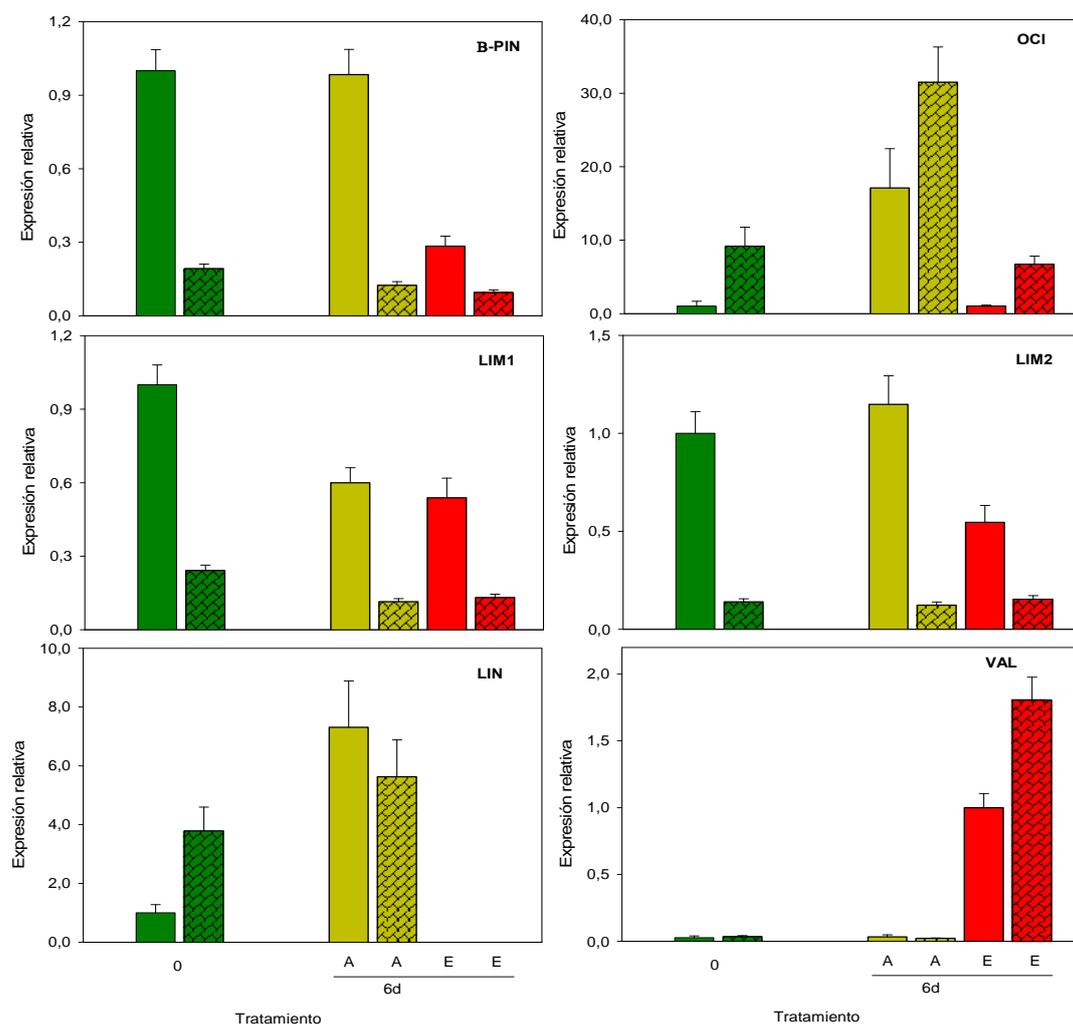


Figura 32. Efecto de la aplicación de etileno (5 ppm) en la expresión relativa de 6 terpeno sintetas en el flavedo de frutos de la mandarina Clementina (control) y del mutante *deg*. Las terpeno sintetas analizadas fueron: β -pineno sintasa (β -*PIN*), ocimeno sintasa (*OCI*), limoneno sintasa 1 y 2 (*LIM 1* y *LIM 2*), linalol sintasa (*LIN*) y valenceno sintasa (*VAL*). Los valores de expresión obtenidos para cada gen están normalizados frente al nivel de expresión en el flavedo de frutos de Clementina control al inicio del experimento, al que se le asignó un valor relativo de 1, excepto la *VAL* que está normalizada frente al flavedo de frutos control tratados con etileno 6 días. Las barras lisas corresponden a los frutos control y las rayadas a los del mutante. A: Aire, E: Etileno.

Los genes de las monoterpene sintasas *OCI* y *LIN* tuvieron una mayor expresión en los frutos del mutante recién recolectados que en los controles, en ambos casos, experimentaron un aumento en aire y una inhibición por etileno. Finalmente, la expresión de la sesquiterpene sintasa *VAL* fue prácticamente indetectable al inicio del experimento y se estimuló por etileno alrededor de 35 y 80 veces en los frutos control y mutantes, respectivamente (**Figura 32**).

3. Estudio de la susceptibilidad de los frutos del mutante *deg* a la infección por el hongo *Penicillium digitatum* y cambios asociados en la emisión de CVs

Recientemente se ha descrito que frutos de naranja transgénicos en los que se ha suprimido la expresión de un gen de la limoneno sintasa tienen una concentración de limoneno en el flavedo aproximadamente 100 veces menor y son más resistentes al ataque por bacterias, insectos y también a la infección por el hongo *Penicillium digitatum*, que es el principal patógeno de frutos cítricos durante la postcosecha (Rodríguez et al., 2011 y 2014). Por otro lado, se ha observado que los aceites esenciales del flavedo pueden ser una alternativa natural al uso de fungicidas químicos (Droby et al., 2008; Kouassi et al., 2010). Estos datos sugieren que los CVs de las glándulas de aceite pueden jugar un papel importante en la infección por *P. digitatum* o en la progresión de la misma y, por tanto, el mutante *deg* puede ser un excelente sistema experimental para estudiar este proceso.

*3.1 Incidencia y progreso de la infección por *P. digitatum* en frutos del mutante *deg**

La incidencia de la infección en frutos del mutante *deg* varió en función de la zona de inoculación del hongo. Así, cuando la infección se realizaba en las glándulas de aceite el porcentaje de heridas infectadas era similar en los frutos del mutante y del control (tratamientos D y F). Cuando la inoculación se realizaba en la zona 'no glándula' la infección fue menor en el mutante (tratamiento B) (**Figura 33**). Las diferencias en el porcentaje de infección entre las zonas de inoculación sólo fue significativa a los 5 dpi; 60% de las heridas infectadas en zona 'no glándula' del mutante frente a un 80% en frutos control o *deg* inoculados en 'glándula'. Es interesante destacar que al final del experimento (6 dpi) el porcentaje de heridas infectadas en frutos *deg* inoculados en 'no glándula' fue del 80%, mientras que en frutos control y *deg* inoculados en 'glándula' fue del 100 y 93%, respectivamente (**Figura 33**).

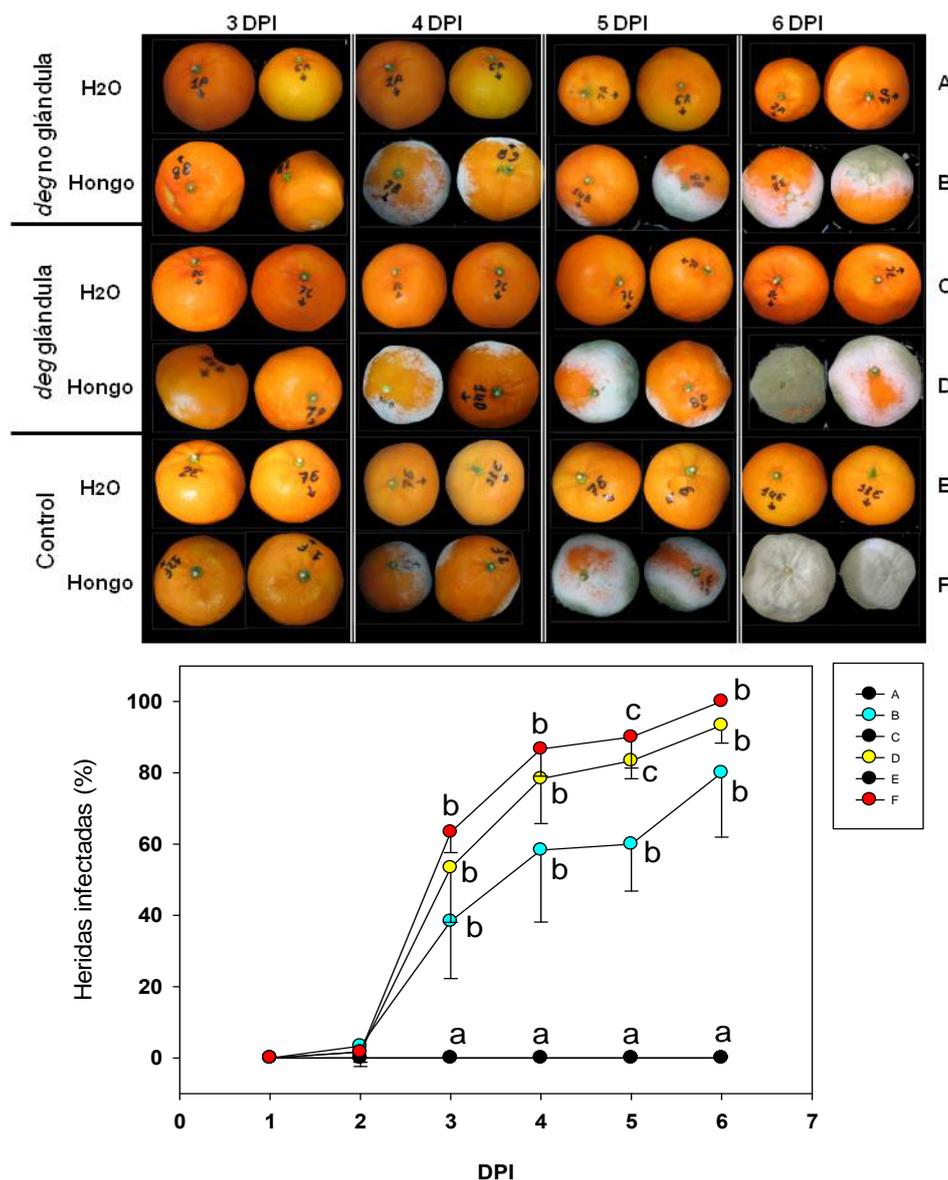


Figura 33. Progreso de la infección y porcentaje de heridas infectadas en frutos de la mandarina Clementina (control) y del mutante *deg* inoculados con *P. digitatum* (10^4 conidios/mL). A: Frutos *deg* con herida en zona ‘no glándula’ inoculados con agua; B: Frutos *deg* con herida en ‘no glándula’ inoculados con hongo; C: Frutos *deg* con herida en ‘glándula’ inoculados con agua; D: Frutos *deg* con herida en ‘glándula’ inoculados con hongo; E: Frutos control inoculados con agua; F: Frutos control inoculados con hongo. En cada tratamiento se inocularon 15 frutos (4 heridas por fruto), excepto en A y C que se inocularon 10 frutos (4 heridas por fruto). Los resultados son la media del porcentaje de heridas infectadas \pm DE para cada tratamiento y día post inoculación (DPI). Para cada día, letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$) en el porcentaje de heridas infectadas (test de Tukey).

Adicionalmente, durante el experimento también se determinó el progreso del diámetro de la infección (**Figura 34**). La evolución de este parámetro no mostró diferencias significativas entre los diferentes tratamientos, observándose que las heridas inoculadas con hongo seguían una evolución de la infección similar, independientemente del genotipo o de la zona de inoculación.

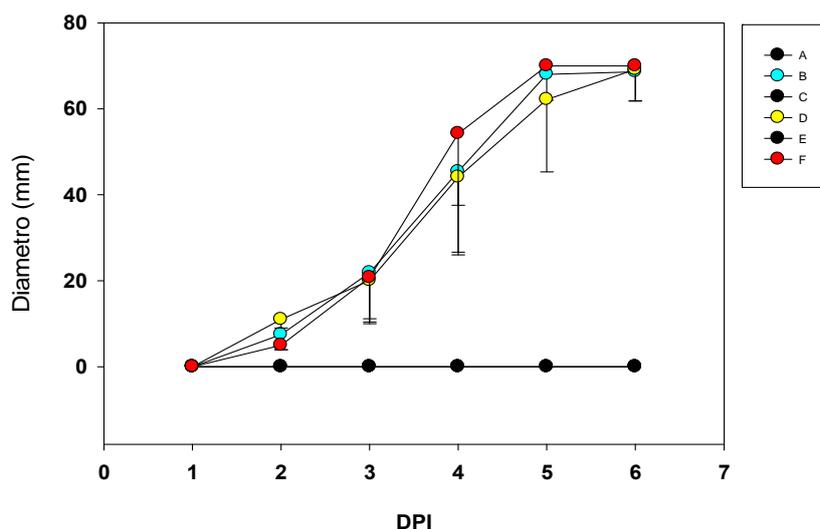


Figura 34. Progreso del diámetro del halo de infección en frutos de la mandarina Clementina (control) y del mutante *deg* inoculados con *P. digitatum* (10^4 conidios/mL). La descripción de cada tratamiento y el número de frutos utilizados se indica en la figura 33. Los resultados se representan como valores medios del diámetro de infección \pm DE para cada tratamiento y día. DPI: Días post inoculación.

3.2 Efecto de la infección con *P. digitatum* en la emisión de CVs en frutos del mutante *deg*

El análisis de la emisión de CVs en frutos de la mandarina Clementina y del mutante *deg* sometidos a los diferentes tratamientos de inoculación se realizó a los 3 dpi. Los frutos de ambas mandarinas inoculados con agua presentaron una emisión de CVs similar, que fue entre 90 y 350 veces inferior a la de los correspondientes frutos inoculados con *P. digitatum* (**Tabla 27**). Una observación importante en cuanto al perfil de CVs es que, la emisión de α -farneseno, alcoholes, aldehídos y, ésteres alifáticos y ramificados fue exclusiva de los frutos inoculados con hongo, tanto control como *deg*.

En el mutante *deg* la zona de inoculación e infección no tuvo un efecto importante en la composición cualitativa y cuantitativa de la mayoría de CVs emitidos, aunque la emisión de algunos monoterpenos, como el limoneno, fue sensiblemente mayor cuando la inoculación se realizó en las glándulas (**Tabla 27**). En general, los frutos de la mandarina Clementina inoculados con hongo presentaron una emisión muy superior de monoterpenos, 1-octanol y decanol, respecto a los frutos del mutante, mientras que la emisión de sesquiterpenos o ésteres (alifáticos o ramificados) fue similar (**Tabla 27**).

Tabla 27. Efecto de la inoculación con *P. digitatum* en la emisión (ng/g PF) de los CVs mayoritarios en frutos de la mandarina Clementina (control) y del mutante *deg*. La emisión de los CV se evaluó a los 3 DPI en los frutos sometidos a los siguientes tratamientos: A, mutante *deg* con herida en ‘no glándula’ (NG) inoculado con agua; B, mutante *deg* con herida en ‘no glándula’ (NG) inoculado con hongo (*P. digitatum*); C, mutante *deg* con herida en ‘glándula’ (G) inoculado con agua; D, mutante *deg* con herida en ‘glándula’ (G) inoculado con hongo; E, frutos control con herida inoculados con agua; F, frutos control con herida inoculados con hongo. Cada valor corresponde a la media \pm DE de al menos 2 réplicas de 6 frutos cada una.. N.D: no detectado

ng/g	3DPI					
	Deg NG Agua	Deg NG Hongo	Deg G Agua	Deg G Hongo	Control Agua	Control Hongo
A	B	C	D	E	F	
Monoterpenos hidrocarbonados						
α -Pineneno	N.D	1,09 \pm 0,03	N.D	2,84 \pm 0,58	N.D	65,93 \pm 32,32
Sabieneno	N.D	0,65 \pm 0,25	0,32 \pm 0,12	1,40 \pm 0,17	0,37 \pm 0,13	101,98 \pm 9,25
3-Careno	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	44,43 \pm 5,21
β -Mirreno	N.D	10,23 \pm 2,79	0,26 \pm 0,13	16,86 \pm 0,21	0,46 \pm 0,15	207,15 \pm 98,37
Limoneno	2,48 \pm 0,11	166,42 \pm 39,71	5,73 \pm 2,57	304,68 \pm 89,68	2,72 \pm 0,10	3664,67 \pm 1263,81
Ocimeno	3,60 \pm 3,05	853,97 \pm 141,27	7,41 \pm 3,53	978,28 \pm 102,53	11,76 \pm 2,74	1625,17 \pm 427,51
Monoterpenos alcoholes						
Linanol	N.D	6,68 \pm 2,61	0,15 \pm 0,01	9,62 \pm 1,67	0,13 \pm 0,04	77,38 \pm 3,38
4-Terpineol	N.D	0,36 \pm 0,16	N.D	0,55 \pm 0,01	N.D	8,00 \pm 0,18
L- α -Terpineol	N.D	1,75 \pm 0,81	N.D	3,90 \pm 2,12	N.D	46,91 \pm 5,21
Sesquiterpenos cíclicos						
Trans cariofileno	1,98 \pm 0,07	3,70 \pm 0,36	1,28 \pm 0,36	4,94 \pm 0,34	1,12 \pm 0,03	5,43 \pm 0,24
α -Humuleno	0,06 \pm 0,02	N.D	0,04 \pm 0,01	N.D	Tr	N.D
Valenceno	0,58 \pm 0,15	1,13 \pm 0,01	0,43 \pm 0,18	1,94 \pm 0,10	0,53 \pm 0,21	2,41 \pm 0,05
Sesquiterpenos lineales						
α -Farneseno	N.D	17,86 \pm 8,36	N.D	30,38 \pm 8,19	N.D	42,21 \pm 8,83
Alcoholes y aldehídos alifáticos						
1-Octanol	N.D	4,74 \pm 0,04	N.D	5,88 \pm 2,64	N.D	97,98 \pm 8,47
Hexanol	N.D	1,52 \pm 0,40	N.D	N.D	N.D	2,15 \pm 0,12
1-decanol	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	2,81 \pm 0,35
Ésteres alifáticos						
Etil caproato	N.D	0,19 \pm 0,03	N.D	0,21 \pm 0,07	N.D	N.D
Hexenol butanoato	N.D	0,18 \pm 0,03	N.D	0,36 \pm 0,03	N.D	0,25 \pm 0,01
Hexenil isobutanoato	N.D	0,47 \pm 0,06	N.D	N.D	N.D	0,63 \pm 0,11
Hexil butanoato	N.D	0,57 \pm 0,01	N.D	0,58 \pm 0,04	N.D	0,89 \pm 0,07
Hexil hexanoato	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	0,36 \pm 0,06
Hexil benzoato	N.D	0,61 \pm 0,32	N.D	0,36 \pm 0,01	N.D	0,90 \pm 0,30
Ésteres ramificados						
Cis-3-hexenol formato	N.D	0,18 \pm 0,01	N.D	0,12 \pm 0,05	N.D	0,27 \pm 0,05
Hexyl-2-metil butanoato	N.D	0,38 \pm 0,09	N.D	0,32 \pm 0,03	N.D	0,41 \pm 0,08
Trans-3-hexenol butanoato	N.D	1,12 \pm 0,10	N.D	0,95 \pm 0,17	N.D	1,51 \pm 0,08
Trans-2-hexenil butirato	N.D	0,26 \pm 0,08	N.D	0,18 \pm 0,01	N.D	0,18 \pm 0,05
3-Hexenil butirato	N.D	1,59 \pm 0,12	N.D	1,70 \pm 0,33	N.D	3,77 \pm 0,27
Cis-3-hexenil metil butanoato	N.D	1,16 \pm 0,25	N.D	0,91 \pm 0,15	N.D	1,57 \pm 0,29
Cis- β -hexenil caproato	N.D	0,99 \pm 0,10	N.D	1,04 \pm 0,11	N.D	1,54 \pm 0,09
Cis-3-hexenil benzoato	N.D	0,84 \pm 0,44	N.D	0,45 \pm 0,06	N.D	1,17 \pm 0,34
Emisión total de CV	9,19 \pm 3,55	1109,91 \pm 202,89	15,81 \pm 6,95	1395,50 \pm 215,08	17,26 \pm 3,43	6067,78 \pm 1870,51

Las glándulas de aceite del flavedo son las estructuras celulares en las que se acumulan los aceites esenciales en los frutos cítricos (Turner et al., 1998; Lucker et al., 2002; Voo et al., 2012) y, en particular, las células epiteliales que recubren estas cavidades son las que sintetizan y secretan los CVs de los aceites esenciales (Voo et al., 2012). Estas estructuras se forman en estadios muy tempranos del desarrollo del fruto y se van llenando progresivamente durante el desarrollo y maduración, aumentando de forma considerable el volumen de aceite esencial que contienen (Knight et al., 2001; Voo et al., 2012). En este capítulo se ha abordado el estudio de un mutante de mandarina, denominado *deg* (*decreased oil glands*), que se generó mediante mutagénesis con rayos gamma a yemas de la mandarina Clementina de Nules, que se caracteriza por tener un número muy reducido de glándulas de aceite en el flavedo (Carrera et al., 2007). Así pues, se ha caracterizado el contenido de CVs en el flavedo de los frutos y cómo el reducido número de glándulas puede afectar a los cambios en la composición, emisión y contenido de CVs durante la maduración del fruto. Por otro lado, la disponibilidad de este mutante también ha permitido estudiar el papel de las glándulas de aceite del flavedo, y de su contenido en CVs, en dos situaciones de interés en la conservación postcosecha de los frutos: la respuesta a la desverdización por etileno y la infección por el hongo *Penicillium digitatum*, principal patógeno postcosecha de frutos cítricos.

La característica fenotípica más relevante del mutante *deg* es la importante reducción en el número de glándulas de aceite (Carrera et al., 2007). En este trabajo se ha observado que el número total de glándulas de aceite de este mutante no varía durante el periodo de maduración del fruto en concordancia con lo descrito para otros frutos cítricos (Voo et al., 2012; Rodríguez et al., 2014) y se mantiene la proporción relativa de 1:5 en el número de glándulas por fruto entre el mutante y el parental (Carrera et al., 2007). Es interesante destacar que en el mutante *deg* otros parámetros del desarrollo del fruto como el tamaño, peso, coloración interna y externa, o el índice de madurez no parecen estar alterados de forma significativa, aunque se ha descrito que presenta un menor espesor del flavedo a lo largo de todo el periodo de desarrollo y maduración (Carrera et al., 2007), como se ilustra en la **Figura 24**, lo que podría tener una importante repercusión favoreciendo la liberación de volátiles de las glándulas de aceite, ya que estas estructuras están integradas en este tejido. Sin embargo, el menor espesor del flavedo en el mutante *deg* podría ser una consecuencia de la reducción del número de glándulas, que haría que las capas celulares del flavedo tuvieran menor espesor.

La comparación del perfil de CVs entre el mutante *deg* y los frutos control de Clementina a lo largo de la maduración del fruto mostró que las diferencias entre ambos genotipos eran principalmente de tipo cuantitativo y no cualitativo (**Figuras 26, 27 y 28**). En ambos genotipos

la mayor emisión y contenido de CVs (**Figura 26 y 27**) se identificó en el estadio más inmaduro analizado (Verde Inmaduro), coincidiendo con trabajos previos donde se describe que la mayor biosíntesis y acumulación de CV en frutos cítricos se produce en etapas finales del desarrollo del fruto y previas a la maduración (Rouseff y Leahy, 1995; Voo et al., 2012). En general, la emisión de CVs en plantas es un proceso regulado por el programa de desarrollo y en diferentes especies se ha descrito que la emisión de determinados CVs en órganos o tejidos como flores, frutos u hojas es máxima cuando aún no han culminado su desarrollo (hojas jóvenes o flores antes de estar receptivas para ser polinizadas) manteniendo o disminuyendo los niveles de emisión en estadios posteriores a medida que avanza el desarrollo (Duradeva et al., 2013).

Uno de los resultados más relevantes obtenidos en este capítulo fue que, en general, en todos los estadios de maduración la concentración de CVs en el flavedo de frutos *deg* fue muy inferior a la de los frutos control (**Figura 27**). Este resultado era esperable, ya que los frutos del mutante tienen un menor número de glándulas de aceite que los frutos control y, por tanto, su capacidad de síntesis y acumulación de CVs debe estar reducida. Sin embargo, y en contraste con estos resultados, el análisis de los CVs acumulados en el espacio de cabeza correspondientes a los CVs que se emiten, mostró que los frutos *deg* emiten una mayor concentración de monoterpenos y sesquiterpenos, siendo este hecho especialmente remarcable en los frutos inmaduros (**Figura 26**). Esta aparente contradicción entre la menor concentración de CVs en el flavedo y la mayor emisión de los mismos en frutos *deg* en comparación con los frutos control, sugiere que la emisión de los CVs en frutos cítricos no tiene lugar por un simple mecanismo de difusión y que no está regulada sólo por la diferencia de volatilidad y la concentración de los CVs, sino que también deben de estar implicados procesos activos de emisión, como ha sido previamente propuesto en otras plantas (Altenburguer y Matile, 1990; Gershenzon et al., 2000; Flamini y Cioni, 2010). Además, el menor número de glándulas de aceite en el mutante *deg* podría generar un desequilibrio entre el contenido y emisión de CVs, y una alteración en la regulación de estos procesos que conllevaría a una mayor emisión.

En este sentido, también es interesante resaltar la observación de que los frutos del mutante *deg* tienen un menor espesor del flavedo (Carrera et al., 2007; **Figura 24**), tejido en el que están embebidas las glándulas de aceite. Por tanto, un menor número de capas de células de la epidermis podría facilitar la difusión/liberación de los CVs desde las glándulas al espacio de cabeza, especialmente en el estadio Verde Inmaduro que es el periodo del desarrollo del fruto donde está teniendo lugar la síntesis y acumulación activa de CVs (Voo et al., 2012). Por otra parte, es significativo que la reducción en el contenido de los principales CVs terpenos en el flavedo de *deg* respecto a su línea parental sea en una proporción muy similar a la del número de glándulas de aceite (1:5) (**Figura 27**), lo que sugieren que estas estructuras en el mutante no tienen alterada su capacidad de sintetizar y acumular CVs, y que la mutación sólo afectaría al número de glándulas y al espesor del flavedo.

Como se ha mencionado anteriormente, las principales diferencias entre el perfil de CVs de los frutos control y del mutante fueron de tipo cuantitativo y no cualitativo. Sin embargo, hay que destacar la emisión o presencia en frutos *deg* de dos CVs: β -farneseno, exclusivamente en los frutos VI del mutante (**Figura 26**), y el aldehído 2-hexenal que sólo se detectó en el flavedo de *deg* (**Figura 27**). Estos dos CVs se han asociado en diferentes plantas y tejidos vegetales a situaciones de estrés biótico o abiótico. La emisión de β -farneseno se ha descrito como una respuesta de defensa directa o indirecta de muchas plantas frente al ataque de herbívoros (Crock et al., 1997; Schnee et al., 2002; Kännaste et al., 2008), mientras que la producción de 2-hexenal, un derivado de la oxidación de ácidos grasos vía lipoxigenasa (Kant et al., 2009), parece tener un importante papel induciendo todo un conjunto de respuestas de defensa frente a diversos estreses (revisado en Scala et al., 2013). Por otra parte, y a nivel molecular, también se ha observado una elevada expresión de las monoterpeno sintasas *OCI* y *LIN* en el flavedo de frutos VI del mutante (**Figura 29**) y una mayor emisión de ocimeno en los frutos *deg*. La emisión de ocimeno y/o linalol se ha asociado específicamente a la respuesta de las plantas frente a estrés biótico y/o abiótico (Arimura et al., 2004; van Schie et al., 2007; Huang et al., 2010). Por tanto, en su conjunto estos resultados podrían indicar una activación constitutiva de señales de estrés en frutos *deg*. En este sentido se podría sugerir que los frutos cítricos pueden tener mecanismos de adaptación a través de la regulación de la emisión de compuestos volátiles, ya que estos pueden tener funciones relevantes de interacción con el medio ambiente o frente a estreses. Así, puede ser atractivo especular que el menor contenido de CVs en el mutante provocaría la estimulación de la emisión de los mismos, como una respuesta adaptativa para compensar la menor concentración de CVs.

En la pulpa de los frutos cítricos la acumulación de aceites esenciales tiene lugar en unas estructuras denominadas 'depósitos de aceite' o 'glándulas de aceite' que se localizan en el centro de las vesículas de zumo (Davis, 1932) y que están rodeadas por células con una elevada actividad metabólica y secretora (Burns et al., 1992). A pesar de la relevancia de los CVs en la calidad organoléptica de los frutos cítricos y sus productos derivados (Perez-Cacho y Rouseff, 2008), existen muy pocos estudios sobre la estructura y formación de los depósitos de aceite donde se acumulan los CVs en las vesículas de zumo (Burns et al., 1992). Dado que el mutante *deg* fue seleccionado por presentar una disminución del número de glándulas de aceite en la piel del fruto, en esta Tesis se planteó estudiar si esta alteración también afectaría a la síntesis y acumulación de CVs en la pulpa del fruto. En todos los estadios de maduración analizados el contenido total de CVs en la pulpa de *deg* fue entre 4 y 5 veces inferior al de los frutos control, mientras que las proporciones relativas de cada CV individual fueron similares en ambos genotipos (**Figura 28**). Estos resultados sugieren que el mutante *deg* posee, de modo similar a lo que ocurre en el flavedo, una reducción en el número de estructuras (depósitos o glándulas de aceite) que acumulan CVs en las vesículas de zumo. Se ha propuesto que la formación de los

primordios de las vesículas de zumo en frutos cítricos tiene lugar a partir de células epidérmicas y subepidérmicas de la cara adaxial de la pared del carpelo, y que la formación y ultraestructura de las células que conforman la glándula de aceite en las vesículas es muy similar a la de las glándulas de aceite del flavedo o las hojas (Thomson et al., 1976; Burns et al., 1992;). Así pues, y dado el origen común de las estructuras celulares que almacenan y sintetizan los CVs tanto en el flavedo como en las vesículas de zumo, los resultados indican que la alteración del mutante *deg* podría afectar posiblemente a un proceso general inicial que desencadena o controla la formación y el número de las estructuras especializadas que contienen los CVs en ambos tipos de tejidos del fruto.

La regulación de la acumulación y emisión de CVs en diferentes tejidos vegetales reside en gran medida en el control transcripcional de los genes implicados en su biosíntesis (Dudareva et al., 2004; Muhlemann et al., 2012, Duradeva et al., 2013). Estudios preliminares en el mutante *deg* mostraron que diversos genes de las rutas MEP y MEV, precursores de los CVs terpenos en los plastidios y citosol, respectivamente, se expresan con menor intensidad en el flavedo del mutante en comparación con frutos control (Carrera et al., 2007; y comunicación personal), sugiriendo un aporte reducido de precursores a la síntesis de terpenos en *deg*. El análisis de la expresión de diferentes TPS en el flavedo y la pulpa de frutos *deg* a lo largo de la maduración mostró que la mayoría de los genes se expresan a niveles reducidos en los tejidos del mutante en comparación con los frutos control, acorde con la menor concentración de CVs terpenos (**Figuras 29 y 30**). Sin embargo, la mayor emisión de CVs en frutos *deg*, especialmente en frutos inmaduros, no se correlaciona con la menor expresión relativa de las TPSs, indicando de nuevo la existencia de mecanismos específicos, independientes de la biosíntesis, que regulen la emisión de CVs desde las glándulas de aceite al espacio de cabeza, y que en el caso del mutante *deg* estarían alterados.

El tratamiento exógeno con etileno a frutos cítricos durante la postcosecha afecta a la emisión y contenido de CVs, en general, disminuyendo determinados monoterpenos y aumentando los sesquiterpenos y ésteres alifáticos (Ortuño et al., 1993; Sharon-Asa et al., 2003; Herrera, 2007a; Herrera et al., 2007b; Capítulo II de esta Tesis). Dado que el mutante *deg* tiene un número reducido de glándulas de aceite en el flavedo y presenta alteraciones tanto en el perfil de emisión como en el contenido de CVs, en este capítulo se propuso evaluar el efecto del tratamiento exógeno con etileno sobre la emisión y contenido de CVs en frutos *deg*, que se complementó con el análisis de la expresión de diversas TPS. El tratamiento postcosecha con etileno a frutos virando (desverdización) promovió cambios similares en el perfil de emisión de CVs en los frutos *deg* y control (**Tablas 25**), y concordantes con los descritos en el capítulo II de esta Tesis. La emisión de los monoterpenos disminuyó, tanto en los frutos mantenidos en aire como los tratados con etileno, mientras que el contenido de estos CVs y la expresión de las monoterpenos sintetasas β -PIN, LIM 1 y LIM 2 (**Tabla 25 y 26 y Figura 32**) no experimentaron

variaciones importantes durante el tratamiento, siendo su expresión mayor en frutos control y asociada a un mayor contenido de monoterpenos en estos frutos. Sin embargo, la expresión relativa de los genes *LIN* y *OCI* fue mayor en *deg*, y no se correspondió con los cambios observados en ocimeno y linalol (**Tabla 25 y 26 y Figura 32**). En cuanto a los sesquiterpenos, la tendencia general fue a aumentar su emisión en respuesta al etileno (**Tabla 25**) y, en particular, el aumento en valenceno estuvo asociado al incremento en la expresión de la *VAL* (**Figura 32**). En conjunto, estos resultados indican que los frutos *deg*, a pesar del número reducido de glándulas, responden al tratamiento exógeno con etileno de forma similar a los frutos control, y no parecen tener alterada la respuesta a la hormona.

En la última década se han realizado importantes avances en la caracterización del papel de los CVs como moléculas señalizadoras de defensa directa o indirecta de las plantas frente al ataque de depredadores herbívoros o patógenos microbianos (Dudareva et al., 2006; Unsicker et al., 2009; Huang et al., 2012; Duradeva et al., 2013). En particular en frutos cítricos, estudios realizados en naranjas transgénicas (*Citrus sinensis*) con una reducción de aproximadamente 100 veces en el contenido de limoneno en el flavedo respecto a frutos control, se ha demostrado que son más resistentes al ataque de insectos (*Ceratitidis capitata*) y de patógenos microbianos (*P. digitatum* o *Xantomonas citri*) (Rodríguez et al. 2011) y muestran una activación constitutiva de respuestas de defensa (Rodríguez et al., 2014). Por otro lado, también se ha descrito el efecto estimulador de determinados monoterpenos (limoneno, α - y β -pineno, fundamentalmente) o de los CVs que emiten discos de flavedo o frutos heridos sobre la germinación de esporas y la elongación del tubo germinativo de *P. digitatum*, principal patógeno postcosecha de cítricos (French et al, 1978; Droby et al., 2008; Rodríguez et al., 2011). Sin embargo, otros terpenos oxigenados como el citral o nerol parecen tener un efecto antifúngico o inhibitorio en ensayos de germinación *in vitro* de *P. digitatum* (Rodov et al, 1995; Rodríguez et al., 2011). En su conjunto, la información de la que se dispone actualmente sugiere que los monoterpenos, principalmente el limoneno, que se emiten y/o contienen las glándulas de aceite del flavedo podrían tener un papel fundamental en el reconocimiento y progresión de la infección por *P. digitatum* (Droby et al., 2008; Rodríguez et al., 2011). En este sentido, el mutante *deg* con un número reducido de glándulas de aceite y un menor contenido de CVs en el flavedo, es un excelente sistema experimental para abordar el estudio del papel de las glándulas y de los CVs que contienen o emiten, en la incidencia y progresión de la infección por *P. digitatum*. Para ello, se realizaron experimentos de inoculación de esporas del hongo de forma controlada en frutos *deg* en una zona libre de glándulas de aceite o en glándula de aceite (**Figura 33**), mientras que en los frutos control la herida e inoculación se realizó necesariamente en una glándula debido a la elevada densidad de las mismas en el flavedo. El porcentaje de heridas infectadas en frutos *deg* inoculados en zona de no glándula fue ligeramente más bajo que en frutos control y frutos *deg* inoculados en zona de glándula, aunque esta diferencia sólo

fue estadísticamente significativa a los 5 dpi (**Figura 33**) y la progresión del halo de infección fue similar en ambos genotipos (**Figura 34**). Estos resultados indicarían que si bien el éxito de la infección (como porcentaje de heridas infectadas) parece ser menor cuando se inocula fuera de la glándula, el avance de la misma no parece estar relacionado con la presencia de las glándulas. Estos resultados están de acuerdo con los descritos previamente en frutos de limón donde el porcentaje de heridas infectadas se redujo cuando la inoculación de esporas de *Penicillium* se realizó fuera de las glándulas (Rodov et al., 1995). Por lo tanto, los resultados en su conjunto sugieren que la ligera reducción del número de heridas infectadas en los frutos *deg* inoculados en zona de no glándula estaría directamente relacionada con la menor exposición de las esporas del hongo a los CVs de las glándulas de aceite y, en particular, el limoneno como volátil mayoritario podría jugar un papel crucial en la interacción patógeno-fruto, como ya se ha propuesto utilizando como sistema experimental naranjas transgénicas con bajo contenido en limoneno (Rodríguez et al., 2011).

La infección con *P. digitatum* afectó de forma muy importante a los CVs: la emisión de CVs totales aumentó aproximadamente 100 veces en frutos *deg* y 300 veces en frutos control (**Tabla 27**). En general, la emisión de todos los CVs aumentó en respuesta a la infección, pero destacaron por su mayor concentración los monoterpenos limoneno, ocimeno y linalol (**Tabla 27**), y por su emisión exclusiva en frutos infectados los ésteres y alcoholes alifáticos, ésteres ramificados y el sesquiterpeno lineal α -farneseno (**Tabla 27**). Una observación importante es que la emisión de los CVs en los frutos *deg* infectados en la ‘glándula’ fue similar a la de los inoculados en zona de ‘no glándula’, y los niveles fueron aproximadamente 5 veces inferiores a los de los frutos control (**Tabla 27**). La mayor emisión de CVs totales en frutos control, en concreto los monoterpenos como volátiles mayoritarios, podría deberse a una mera liberación de los mismos desde las glándulas de aceite debido a su destrucción conforme avanza la infección del hongo en el flavedo. Sin embargo, no todos los CVs mostraron el mismo comportamiento diferencial de emisión, si bien los monoterpenos se emitieron entre 2 y 50 veces más en frutos control, los sesquiterpenos y los ésteres alifáticos y ramificados se emitieron en niveles similares en ambos genotipos (**Tabla 27**). Estos resultados podrían indicar que los procesos que desencadenan la emisión de los diferentes CVs son distintos. En el caso de los sesquiterpenos, alcoholes y ésteres que se emiten de forma exclusiva en respuesta a la infección, su síntesis y emisión podría estar estrechamente relacionada con el incremento en la producción de etileno que tiene lugar en frutos cítricos tras la infección con *Penicillium* (Marcos et al., 2005). En el Capítulo II de esta Tesis y en trabajos previos (Herrera et al., 2007b) se ha descrito que la aplicación exógena de etileno estimula de forma significativa la emisión de sesquiterpenos, en particular la de valenceno y α -farneseno, y la de ésteres alifáticos. Además, tal y como se ha discutido en el capítulo II de esta Tesis, en diversos frutos climatéricos se ha podido establecer una clara correlación entre el aumento de la producción de etileno durante la etapa climática

de maduración del fruto y la síntesis de alcoholes y ésteres alifáticos o ramificados característicos del aroma del fruto maduro (Flores et al., 2002; Yahyaoui et al., 2002; Defilippi et al., 2005a; Defilippi et al., 2005b). Diversos estudios también han correlacionado la síntesis de α -farneseno con la producción de etileno en diferentes frutos (Pechous et al., 2005; Gapper et al., 2006) y, como se ha descrito en el capítulo II, la desverdización con etileno aumentó la emisión de este sesquiterpeno lineal tanto en la mandarina *Clemenules* como en la naranja *Navelate* (**Tablas 16 y 18**). Por tanto, parece probable que la emisión de estos CVs en los frutos *deg* y control sea en respuesta a las cantidades masivas de etileno endógeno que se produce durante la infección, bien por los tejidos del propio fruto y/o el hongo (Achilea et al., 1985; Marcos et al., 2005).

CAPITULO IV

**CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS
NORISOPRENOIDES EN FRUTOS
CÍTRICOS CON DISTINTA PIGMENTACIÓN**

1. Composición de carotenoides en el flavedo y la pulpa de frutos de variedades de naranja (*Citrus sinensis*) y pomelo (*Citrus paradisi*) con distinta pigmentación

Con el fin de estudiar la posible relación entre el contenido y composición de carotenoides y la presencia de compuestos norisoprenoides, se seleccionaron frutos maduros de las siguientes variedades o mutantes de naranja (*Citrus sinensis*): Navel Frost, Cara Cara, Navelate y Pinalate, y de pomelo (*Citrus paradisi*): Star Ruby, Flame y Marsh. Estas variedades se seleccionaron por sus marcadas diferencias en la pigmentación externa y/o interna del fruto (**Figura 35**), que se corresponden con importantes diferencias en el contenido y composición de carotenoides totales e individuales, lo que permitiría asociar el origen biosintético de determinados norisoprenoides a carotenoides específicos.

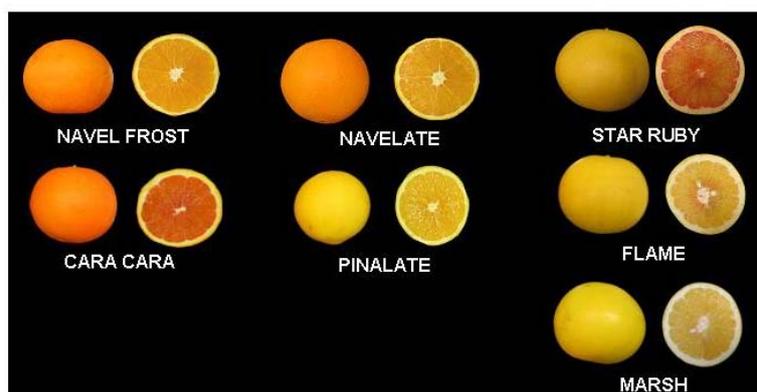


Figura 35. Aspecto externo e interno de los frutos maduros de naranjas (*Citrus sinensis*) de las variedades Cara Cara, Navel Frost, Pinalate y Navelate, y los pomelos (*Citrus paradisi*) de las variedades Star Ruby, Flame y Marsh utilizados en este estudio. Las características de color de los frutos se detallan en la Tabla 28.

1.1 Color del flavedo y la pulpa en frutos de las diferentes variedades de naranja y pomelo

Los índices de color correspondientes a los frutos maduros utilizados en el estudio se muestran en **Tabla 28**.

Tabla 28. Índice de color (Hunter *a/b*) del flavedo y la pulpa de frutos maduros de las variedades de naranjas (*Citrus sinensis*) Navel Frost y su mutante Cara Cara, y Navelate y su mutante Pinalate, y de las variedades de pomelo (*Citrus paradisi*) Star Ruby, Flame y Marsh. El color de los frutos es la media \pm DE de 3 determinaciones por fruto, en al menos 6 frutos.

Color (Hunter <i>a/b</i>)	Flavedo	Pulpa
Naranjas		
Navel Frost	0,79 \pm 0,03	0,02 \pm 0,01
Cara Cara	0,78 \pm 0,02	0,54 \pm 0,03
Navelate	0,68 \pm 0,03	0,03 \pm 0,01
Pinalate	0,16 \pm 0,03	-0,11 \pm 0,01
Pomelos		
Star Ruby	0,21 \pm 0,05	0,54 \pm 0,03
Flame	0,08 \pm 0,02	0,29 \pm 0,03
Marsh	0,07 \pm 0,02	-0,24 \pm 0,01

El flavedo de los frutos maduros de las variedades parentales de naranja, Navel Frost y Navelate, presentaron una coloración externa con un índice *a/b* de $0,79 \pm 0,03$ y $0,68 \pm 0,03$, respectivamente, que corresponden a tonalidades anaranjadas. El mutante Cara Cara, presentó una coloración externa similar a la de su parental Navel, mientras que el mutante Pinalate tenía un índice de color entre 4 y 5 veces inferior al de la naranja parental Navelate, correspondiente a una tonalidad amarilla. El flavedo del pomelo Star Ruby tenía un índice de color ($0,21 \pm 0,05$) mayor al de las variedades Flame ($0,08 \pm 0,02$) y Marsh ($0,07 \pm 0,02$), en relación con la ligera tonalidad rojiza, frente al amarillo intenso de estas dos últimas variedades.

En la pulpa las diferencias en los índices de color entre variedades fueron más marcadas que en el flavedo. Mientras que las líneas parentales de naranja, Navel Frost y Navelate, presentaron un índice de color cercano a 0, en los mutantes Cara Cara y Pinalate alcanzaron valores de $0,54 \pm 0,03$ y $-0,11 \pm 0,01$, respectivamente, en proporción con la coloración roja y amarilla de sus pulpas. En pomelos se observó que, mientras que Marsh tenía una coloración blanca ($-0,24 \pm 0,01$) en Flame alcanzó un valor intermedio ($0,29 \pm 0,03$) por su coloración rosácea y la pulpa de Star Ruby presentó una coloración rojiza más intensa ($0,54 \pm 0,03$).

1.2 Composición de carotenoides en el flavedo de frutos de las diferentes variedades de naranja y pomelo

El flavedo de los frutos de la naranja Navel Frost presentó un contenido total de carotenoides de 153 ± 38 $\mu\text{g/g}$ PF, siendo la violaxantina el carotenoide más abundante (65%), seguido del fitoeno (12%) (Tabla 29). En el mutante Cara Cara la concentración de carotenoides totales fue un 17% superior, pero mientras la violaxantina sigue siendo el carotenoide mayoritario (57% del total) el contenido de fitoeno fue más del doble que en el parental. Es interesante destacar que el contenido del apocarotenoide β -citraurina en el flavedo

del mutante Cara Cara fue aproximadamente el doble que en su línea parental. El contenido en carotenoides totales y las proporciones de los diferentes carotenoides en el flavedo de Navelate fue similar al de la naranja Navel. En el mutante de color amarillo Pinalate la concentración de carotenoides totales en el flavedo fue más del doble que en el parental, destacando la elevada concentración de fitoeno, fitoflueno y ζ -caroteno que fueron 10, 5 y 40 veces mayores respectivamente. Por el contrario, el contenido en β,β -xantofilas fue inferior en el mutante, en particular la violaxantina que cuantificó aproximadamente la mitad que en Navelate (**Tabla 29**).

El contenido de carotenoides totales en el flavedo de los frutos de pomelo fue mucho más bajo que en las naranjas, siendo el de Star Ruby 3 veces mayor que en Flame y Marsh. El flavedo de Star Ruby fue especialmente rico en carotenoides lineales como fitoeno (70%), fitoflueno (9,7%) y licopeno (4%) y violaxantina (9,4%). En Flame destacó también la proporción de fitoeno (65%) y violaxantina (27%), mientras que en Marsh, a pesar de tener un contenido de carotenoides totales similar a Flame, las proporciones de los carotenoides individuales eran muy distintas, con un mayor contenido en violaxantina (50%) y menor de fitoeno (33%) (**Tabla 30**).

1.3 Composición de carotenoides en la pulpa de frutos de las diferentes variedades de naranja y pomelo

En la pulpa de los frutos de naranja Navel Frost y Navelate los contenidos en carotenoides fueron bajos y similares, donde la violaxantina cuantificaba alrededor del 50%. En la pulpa del mutante Cara Cara destacó el elevado contenido de fitoeno (66%) y la presencia de licopeno (14%), lo que le proporciona el característico color rojo de la pulpa, y una menor concentración de xantofilas. Es importante mencionar que no se identificó licopeno en ninguna de las otras variedades de naranja estudiadas. La pulpa del mutante Pinalate tenía un alto contenido en carotenoides, similar al de Cara Cara pero en una proporción muy diferente, destacando la elevada concentración de carotenoides lineales: fitoeno (57%), fitoflueno (19%) y ζ -caroteno (19%), y la baja concentración de xantofilas (menor del 5%) (**Tabla 29**).

El mayor contenido de carotenoides totales en la pulpa de los frutos de pomelo se encontró en Star Ruby, destacando el licopeno (49%) como carotenoide mayoritario y el fitoeno (26,7%). En la pulpa de Flame y Marsh la concentración de carotenoides totales fue entre 9 y 13 veces inferior, respectivamente, a la de Star Ruby. El carotenoide más abundante en Flame fue el β -caroteno (45%) mientras que en Marsh fue el fitoeno (34%) (**Tabla 30**).

Tabla 29. Contenido de carotenoides ($\mu\text{g/g}$ PF) en el flaveado y la pulpa de frutos maduros de las variedades de naranjas (*Citrus sinensis*) Navel Frost y su mutante Cara Cara, y Navelate y su mutante Pinalate. Los datos son la media \pm DE de tres análisis independientes. (1) Traza: Carotenoides en concentraciones $< 0,05 \mu\text{g/gPF}$. (2) No identificado.

Carotenoides	Flaveado				Pulpa			
	Navel Frost	Cara Cara	Navelate	Pinalate	Navel Frost	Cara Cara	Navelate	Pinalate
Fitoeno	18,43 \pm 5,11	42,82 \pm 2,21	23,23 \pm 3,63	263,74 \pm 13,6	1,11 \pm 1,13	40,47 \pm 1,10	1,97 \pm 1,57	36,61 \pm 0,07
Fitoflueno	2,51 \pm 0,26 (2)	1,73 \pm 0,24 (2)	6,38 \pm 0,06	29,49 \pm 0,74	0,19 \pm 0,09 (2)	6,07 \pm 0,93 (2)	0,25 \pm 0,04	12,33 \pm 0,04
ζ -Caroteno	(2)	(2)	1,28 \pm 0,29 (2)	42,23 \pm 4,58 (2)	(2)	8,50 \pm 1,79	0,27 \pm 0,22 (2)	12,42 \pm 0,13 (2)
β -Caroteno	(2)	(2)	(2)	(2)	(1)	0,38 \pm 0,12 (2)	0,13 \pm 0,03 (1)	(2)
α -Caroteno	(2)	(2)	(2)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)
β -Criptoxantina	2,55 \pm 0,39	2,02 \pm 0,32	1,88 \pm 0,08	(2)	0,56 \pm 0,09	0,34 \pm 0,07	0,72 \pm 0,04	(2)
Zeaxantina	1,99 \pm 0,38 (2)	1,92 \pm 0,08 (2)	(2)	(2)	0,21 \pm 0,04	0,11 \pm 0,05	0,22 \pm 0,02	(2)
Anteraxantina	(2)	(2)	(2)	(2)	1,43 \pm 0,26	0,90 \pm 0,23	2,25 \pm 0,03	0,37 \pm 0,02
Violaxantina	99,64 \pm 26,20 (2)	102,24 \pm 9,95 (2)	99,84 \pm 5,29 (2)	46,87 \pm 2,64 (2)	5,32 \pm 0,70	3,04 \pm 0,47	8,71 \pm 0,33	2,46 \pm 0,03 (1)
Luteína	(2)	(2)	(2)	(2)	0,35 \pm 0,06 (2)	0,13 \pm 0,09 (2)	0,32 \pm 0,02 (2)	(2)
β -Citaurina	2,76 \pm 0,10	4,15 \pm 0,43	1,78 \pm 0,67	(2)	(2)	(2)	(2)	(2)
Total carotenoides	153\pm38	180\pm15	176\pm14	390\pm24	10\pm2	61\pm5	17\pm2	64\pm1

Tabla 30. Contenido de carotenoides ($\mu\text{g/g PF}$) en el flaveado y la pulpa de frutos maduros de las variedades de pomelo (*Citrus paradisi*) Star Ruby, Flame y Marsh. Los datos son la media \pm DE de tres análisis independientes. (1) Traza: Carotenoides en concentraciones $< 0,05 \mu\text{g/gPF}$. (2) No identificado.

Carotenoides	Flaveado			Pulpa		
	Star Ruby	Flame	Marsh	Star Ruby	Flame	Marsh
Fitoeno	21,10 \pm 0,36	6,29 \pm 2,37	3,30 \pm 0,40	1,23 \pm 0,26	0,08 \pm 0,01	0,12 \pm 0,03
Fitofuleno	2,91 \pm 0,12	0,36 \pm 0,10	0,42 \pm 0,02	0,33 \pm 0,01	(1)	(2)
ζ -Caroteno	0,31 \pm 0,05	(2)	(2)	(1)	(1)	0,06 \pm 0,01
Licopeno	1,16 \pm 0,14	(1)	(1)	1,83 \pm 0,34	(1)	(2)
β -Caroteno	0,71 \pm 0,09	(2)	(2)	1,04 \pm 0,15	0,23 \pm 0,01	(1)
α -Caroteno	(2)	(2)	(2)	(2)	(1)	(2)
β -Criptoxantina	(2)	0,08 \pm 0,01	0,09 \pm 0,01	(2)	(1)	(1)
Zeaxantina	0,07 \pm 0,00	(1)	(2)	(1)	(1)	(1)
Anteraxantina	(2)	0,13 \pm 0,01	(2)	(1)	(1)	(1)
Violaxantina	2,83 \pm 0,02	2,60 \pm 0,25	4,98 \pm 0,07	(1)	(1)	0,07 \pm 0,01
Luteína	0,13 \pm 0,01	(1)	(1)	(2)	(1)	(1)
β -Citaurina	(2)	0,07 \pm 0,01	0,20 \pm 0,01	(2)	(2)	(2)
Total carotenoides	30\pm1	9,6\pm2,8	10\pm1	4,6\pm1	0,51\pm0,05	0,35\pm0,05

2. Identificación de compuestos norisoprenoides en el flavedo y la pulpa de frutos de variedades de naranja (*Citrus sinensis*) y pomelo (*Citrus paradisi*) y con distinta pigmentación

Mediante HS-SPME GC-MS se identificaron un total de 123 CVs, de los que 13 correspondieron a compuestos norisoprenoides o derivados de éstos, que fueron los siguientes: 6-metil-5-hepten-2-ona, β -ciclocitral, neral, nerol, nerol acetato, geranial, geraniol, geranil acetona, geraniol acetato, β -citronelol, citronelal, β -ionona y dihidro- β -ionona (**Tabla 31**).

Tabla 31. Principales compuestos norisoprenoides identificados en el flavedo y la pulpa de frutos de naranja (*Citrus sinensis*) de las variedades Navel Frost, Cara Cara, Navelate y Pinalate, y de pomelo (*Citrus paradisi*) de las variedades Star Ruby, Flame y Marsh. Los compuestos identificados están ordenados por orden creciente del LRI. a.; Índice de retención lineal en una columna capilar Stabilwax (Restek, Bellefonte, PA) (60m x 0,25mm d.i x 0,50 μ m).

N°	Compuestos	LRI ^(a)	Naranja	Pomelo
1	6-metil-5-hepten-2-ona	1363	✓	✓
2	Citronelal	1507	✓	✓
3	β -Ciclocitral	1668	✓	✓
4	Neral	1725	✓	✓
5	Nerol acetato	1749	✓	✓
6	Geranial	1771	✓	✓
7	Geraniol acetato	1778	✓	✓
8	β -Citronelol	1780	✓	✓
9	Nerol	1823	✓	✓
10	Dihidro- β -ionona	1867	✓	
11	Geraniol	1867	✓	✓
12	Geranil acetona	1885	✓	✓
13	β -Ionona	1992	✓	✓

En general, no se observaron diferencias significativas en el contenido total de CVs, determinado como el área total de CVs identificados, para cada tejido entre los frutos de las diferentes variedades de naranjas y pomelos (datos no mostrados).

2.1 Composición de norisoprenoides en el flavedo de frutos de diferentes variedades de naranja y pomelo

En el flavedo de los frutos de naranja el porcentaje de norisoprenoides (% área respecto al total de CVs) fue, en general, superior en los mutantes que en los respectivos parentales (**Figura 36**). El flavedo de la variedad Cara Cara fue la que presentó mayor proporción de norisoprenoides, destacando la presencia de β -ciclocitral (0,10%), que no se identificó en ninguna otra muestra de flavedo y un mayor porcentaje de citronelal (0,40%). Además, Cara Cara presentó una menor proporción de geraniol acetato, y Navel Frost fue la única variedad en la que no se identificó 6-metil-5-hepten-2-ona. El flavedo de Navelate mostró un perfil de norisoprenoides similar al de Navel Frost, mientras que el mutante Pinalate presentó una mayor

abundancia de norisoprenoides, destacando un elevado porcentaje relativo en geranil acetona (0,31%), geraniol (0,72%) y geraniol acetato (0,26%) (**Figura 36**).

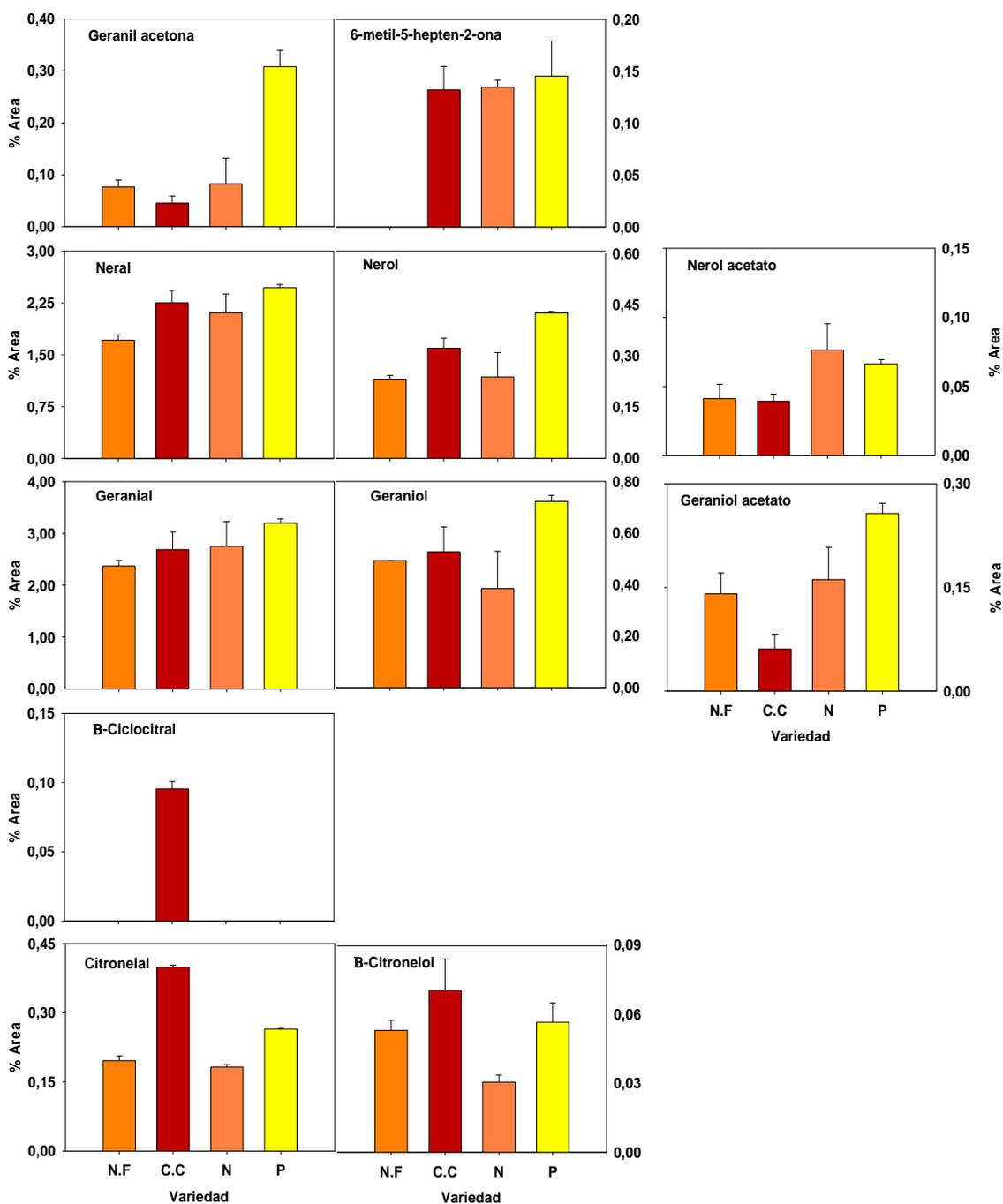


Figura 36. Niveles relativos de los norisoprenoides identificados en la piel de frutos de naranjas (*Citrus sinensis*) de las variedades Cara Cara (C.C), Navel Frost (N.F), Pinalate (P) y Navelate (N). Los datos se expresan como porcentaje del total de compuestos volátiles identificados y son la media \pm DE de al menos 3 análisis independientes.

El flavedo de la variedad Star Ruby fue el que presentó mayor abundancia relativa de norisoprenoides en pomelos. Aunque, en general, las diferencias entre las diferentes variedades no fueron muy acusadas, destacó el mayor porcentaje de nerol acetato en Star Ruby, la ausencia de 6-metil-5-hepten-2-ona en Flame y la menor abundancia de nerol y geraniol acetato en Marsh (Figura 37).

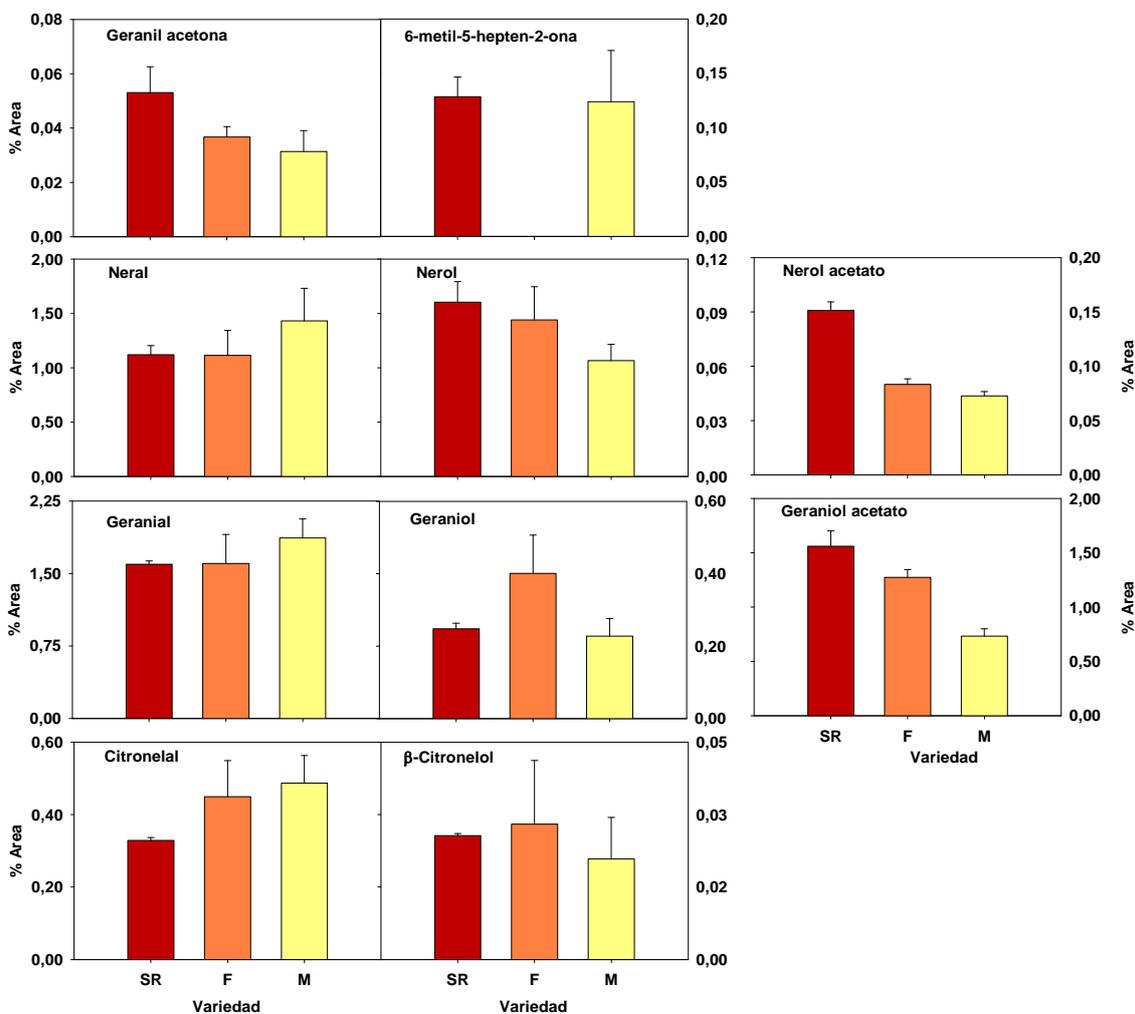


Figura 37. Niveles relativos de los norisoprenoides identificados en la flavedo de frutos de pomelo (*Citrus paradisi*) de las variedades Star Ruby (S.R), Flame (F) y Marsh (M). Los datos se expresan como porcentaje del total de compuestos volátiles identificados y son la media \pm DE de al menos 3 análisis independientes.

2.2 Composición de norisoprenoides en la pulpa de frutos de diferentes variedades de naranja y pomelo

En la pulpa se observaron diferencias importantes en la abundancia relativa de los diferentes norisoprenoides entre los frutos de las distintas variedades de naranja y pomelo seleccionadas (Figuras 38 y 39). En las naranjas los mayores porcentajes de norisoprenoides se detectaron en la pulpa de los frutos de Cara Cara y Pinalate (Figura 38). En particular, en

Pinalate y Cara Cara se identificó geraniol y, además, presentaron una mayor abundancia en geranil acetona y en 6-metil-5-hepten-2-ona, respecto a sus respectivos parentales. Además, en Cara Cara se encontraron una mayor proporción de neral, nerol, geranial, β -ionona, β -ciclocitral y β -citronelol (**Figura 38**).

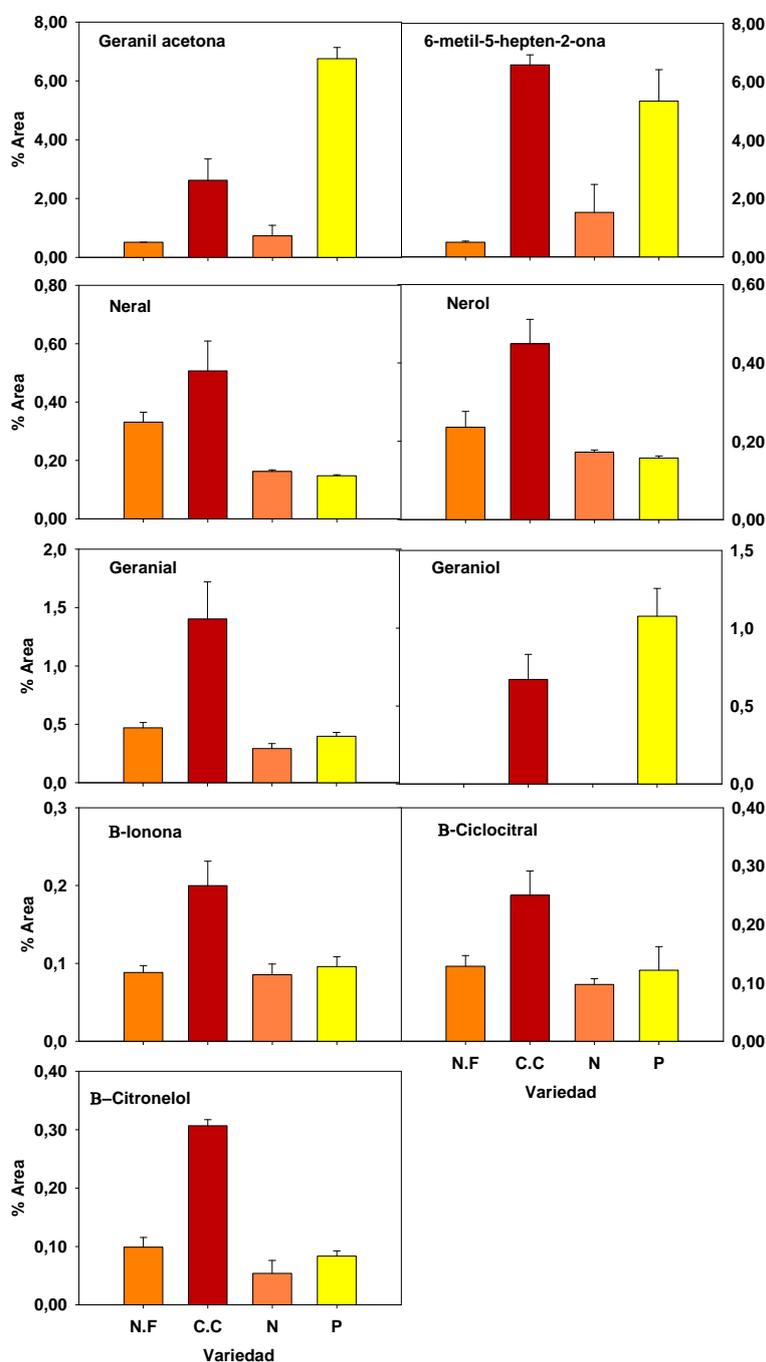


Figura 38. Niveles relativos de los norisoprenoides identificados en la pulpa de frutos de naranja (*Citrus sinensis*) de las variedades Cara cara (C.C), Navel frost (N.F), Pinalate (P) y Navelate (N). Los datos se expresan como porcentaje del total de compuestos volátiles identificados y son la media \pm DE de al menos 3 análisis independientes.

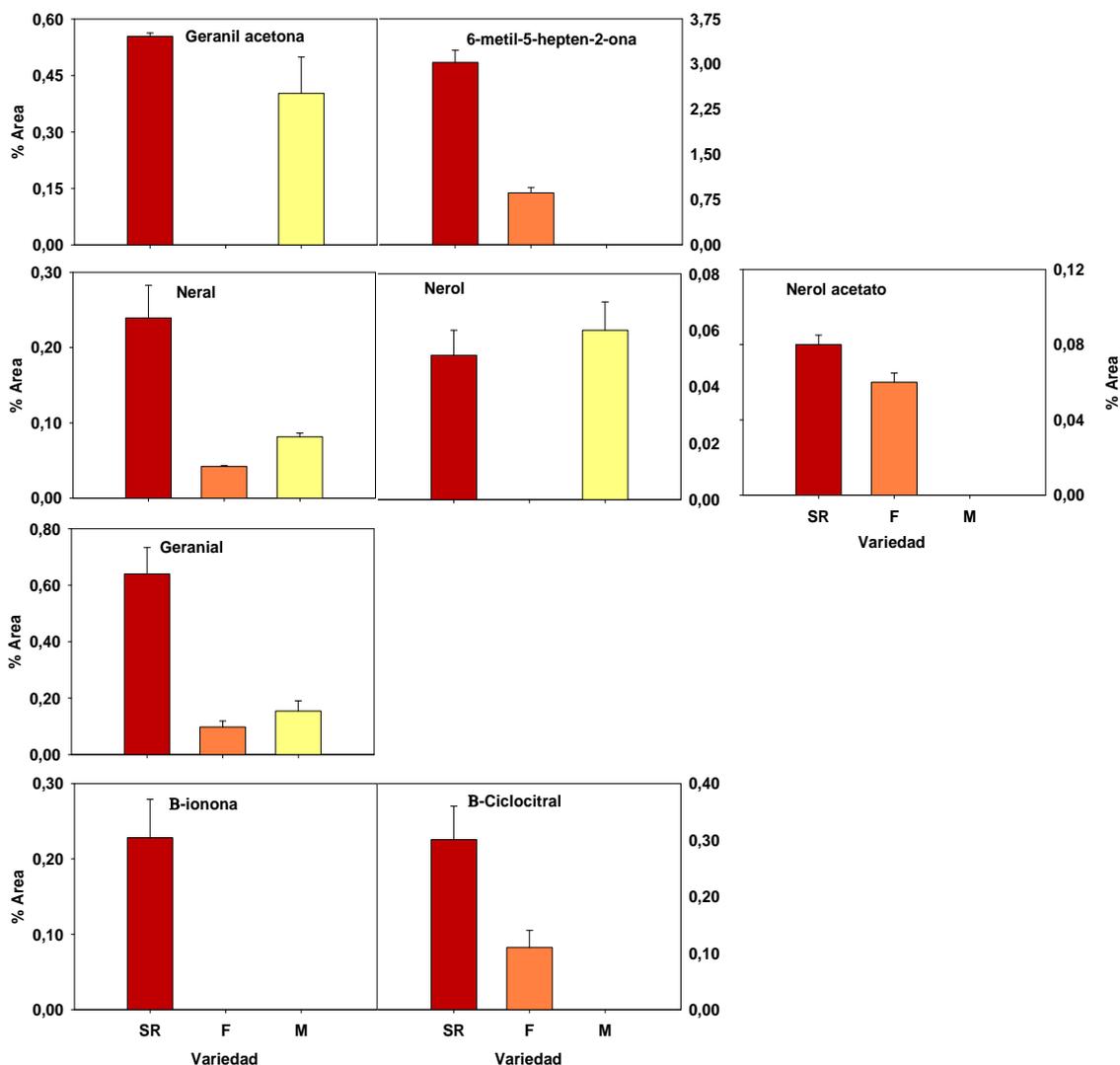


Figura 39. Niveles relativos de los norisoprenoides identificados en la pulpa de frutos de pomelo (*Citrus paradisi*) de las variedades Star Ruby (S.R), Flame (F) y Marsh (M). Los datos se expresan como porcentaje del total de compuestos volátiles identificados y son la media \pm DE de al menos 3 análisis independientes.

La pulpa de Star Ruby fue la que mostró una mayor abundancia de compuestos norisoprenoides entre los pomelos, destacando el neral (entre 5 y 3 veces superior a Flame y Marsh, respectivamente), y geranial (entre 6 y 4 veces superior a Flame y Marsh, respectivamente). Los norisoprenoides, β -ciclocitral, 6-metil-5-hepten-2-ona y nerol acetato sólo se identificaron en la pulpa de los pomelos Star Ruby y Flame, y siempre en mayores concentraciones en el primero. Es interesante destacar que sólo se detectó β -ionona en la pulpa de los frutos de Star Ruby. En la pulpa del pomelo Marsh, con la excepción de geranil acetona y nerol donde los porcentajes fueron similares a los de Star Ruby, la proporción del resto de norisoprenoides fue siempre muy inferior o prácticamente ausentes respecto a las otras dos variedades (**Figura 39**).

Los compuestos norisoprenoides se pueden generar a partir de los carotenoides por una degradación no enzimática (inespecífica) como enzimática, mediante acción de las CCD/CCO (dioxigenasas/oxigenasas de corte de carotenoides) (Simkin et al. 2004, Alquézar et al., 2008, Walter et al., 2010, Brandi et al., 2011; Rodrigo et al., 2013). Estos compuestos se caracterizan por tener una elevada intensidad aromática, ya que presentan un bajo umbral de percepción olfativa (Winterhalter y Rouseff, 2002). Aunque la concentración de los norisoprenoides es, en general, muy baja, en numerosos frutos como el tomate, melocotón, membrillo, sandía, uva, manzana, lichi o mango se ha observado que tienen un papel relevante en el aroma de los mismos (Schneider et al. 2001; Simkin et al., 2004; Britton et al., 2008; Klee, 2010; Vogel et al., 2010). Dado que los precursores de los norisoprenoides volátiles son los carotenoides, existen diferentes trabajos que han abordado el estudio de la posible relación biosintética entre el contenido de carotenoides y de norisoprenoides. En uva (*Vitis vinifera*), por ejemplo, se ha observado una buena correlación entre la concentración de carotenoides durante la maduración del fruto y la de norisoprenoides en el vino (Crupi et al., 2010). En frutos del mutante de tomate *tangerine*, que acumula gran cantidad de carotenos lineales, se ha observado una menor emisión de los norisoprenoides cíclicos β -ciclocitral y β -ionona, mientras que la emisión de los lineales como el geranil acetona y 6-metil-5-hepten-2-ona fue muy elevada (Vogel et al., 2010). Por otra parte, estudios realizados en mutantes de tomate y sandía con distinto contenido y composición de carotenoides mostraron que en los frutos ricos en licopeno los norisoprenoides mayoritarios fueron geranial, neral, 6-metil-5-hepten-2-ona, 2,6-dimetilhept-5-1-al, 3-epoxi-geranial, (*E,E*)-pseudoionona, geranil acetona y farnesil acetona, mientras que en los frutos ricos en β -caroteno los norisoprenoides principales eran la β -ionona y el β -ciclocitral (Lewinshon et al., 2005; Vogel et al., 2010). En cítricos, sin embargo, a pesar de ser frutos ricos en carotenoides y de la gran diversidad en el perfil de carotenoides entre frutos de diferentes especies y variedades, existen muy pocos estudios que hayan abordado la caracterización de norisoprenoides y su posible relación biosintética con la composición de carotenoides (Mahattanatawee, et al., 2005). Por tanto, el objetivo planteado en este capítulo ha sido caracterizar el perfil de compuestos norisoprenoides volátiles (C9-C13) y su posible correlación con la composición de carotenoides en frutos de diferentes variedades de naranja (*Citrus sinensis*) y de pomelo (*Citrus paradisi*) con distinta pigmentación en la piel y en la pulpa.

El perfil de norisoprenoides y la composición de carotenoides se determinaron tanto en el flavedo como en la pulpa, ya que ambos tejidos muestran importantes diferencias en la pigmentación entre las especies y variedades seleccionadas, e incluso las diferencias en la pigmentación fueron más acusadas en la pulpa (**Figura 35**). Las naranjas Navel, Navelate y el

mutante Cara Cara (**Tabla 28 y Figura 35**) se caracterizaron por presentar una coloración externa naranja-intensa en el fruto maduro (Alquézar et al., 2008), mientras que los frutos de Pinalate, mutante espontáneo de Navelate, mostraron una coloración externa amarilla (Rodrigo et al., 2003). En los frutos de pomelos, el flavedo de la variedad Star Ruby fue el que presentó mayor índice de color (**Tabla 28**), seguido de Flame y Marsh (Banet et al., 1981, Gross 1987; Xu et al., 2006; Alquézar, 2008). En cuanto a la coloración interna, las variedades de naranja parentales (Navel y Navelate) tenían una pulpa del color naranja característica, mientras que los mutantes Cara Cara y Pinalate mostraron una coloración interna de color rojo intenso (Alquézar, 2008, Alquézar et al., 2008) y amarillo (Rodrigo et al., 2003), respectivamente (**Tabla 28 y Figura 35**). En los pomelos destacó la coloración rojiza de la pulpa de Star Ruby frente a la rosada de Flame y la amarilla de Marsh (Alquézar, 2008).

El flavedo de los frutos cítricos se ha descrito como una de las fuentes más ricas y complejas de carotenoides en plantas (Stewart y Leuenberger, 1976; Oberholster et al., 2001, Rodrigo et al., 2013), mientras que la pulpa de los mismos presenta generalmente un contenido de carotenoides sensiblemente inferior (Gross, 1987, Xu et al., 2006). Los frutos de los mutantes Pinalate y Cara Cara mostraron un contenido de carotenoides totales superior al de sus parentales, tanto en el flavedo como en la pulpa (**Tabla 29**). En cuanto a la composición de carotenoides individuales, la violaxantina, seguida del fitoeno, fueron los carotenoides más abundantes en el flavedo de las variedades parentales Navel Frost y Navelate (Rodrigo et al., 2003, Rodrigo et al., 2004; Alquézar, 2008), mientras que en el flavedo de Cara Cara se observaron algunas diferencias cuantitativas respecto a su parental Navel. Una de las más destacables fue la mayor acumulación de fitoeno en Cara Cara (**Tabla 29**), en concordancia con trabajos previos (Alquézar et al., 2008). En el flavedo de frutos maduros de Pinalate se detectaron altas concentraciones de carotenoides lineales y muy baja de 9-cis-violaxantina. Estos resultados son muy concordantes con un estudio previo en el que se caracterizaron los cambios en la composición de carotenoides en el flavedo de Pinalate a lo largo de la maduración y se concluye que la mutación en Pinalate se puede deber a un bloqueo de la ruta de biosíntesis de carotenoides a nivel del ζ -caroteno (Rodrigo et al., 2003). Respecto a los frutos de las variedades de pomelo seleccionadas, Star Ruby presentó un contenido de carotenoides en el flavedo y la pulpa superior al resto de pomelos (**Tabla 30**) (Rouseff et al., 1992; Alquézar et al., 2008). El flavedo de Star Ruby fue especialmente rico en carotenoides de tipo lineal (fitoeno, fitoflueno y licopeno) mientras que en Flame y Marsh destacaron la violaxantina y fitoeno, principalmente.

En cuanto a la pulpa, es relevante destacar que en Cara Cara se detectó la presencia de β -caroteno y un elevado contenido de fitoeno y licopeno (80 % del total de carotenoides), siendo la presencia de este último exclusiva de este mutante y lo que le proporciona su característico color rojo, mientras que su parental Navel fue especialmente rico en xantofilas (**Tabla 29**)

(Alquézar et al., 2008). La pulpa del mutante Pinalate, al igual que el flavedo, mostró concentraciones inusualmente elevadas de los carotenos lineales fitoeno, fitoflueno y ζ -caroteno, y una reducción muy importante en xantofilas respecto a su línea parental (**Tabla 29**) (Rodrigo et al., 2003). La pulpa de los frutos del pomelo Star Ruby presentó aproximadamente 10 veces más carotenoides que Flame y Marsh, destacando el licopeno, mientras que en Flame el carotenoide más abundante fue el β -caroteno y en Marsh el fitoeno (**Tabla 30**) (Gross 1987; Rouseff et al., 1992; Xu et al., 2006; Alquézar et al., 2013). Estudios llevados a cabo en pulpa de pomelos rojos muestran que Star Ruby es una de las variedades de pomelo rojo con mayor acumulación de licopeno y β -caroteno, llegando a alcanzar respecto a otras variedades de pomelos rojos una concentración de licopeno incluso 10 veces superior y entre 3 y 5 veces mayor de carotenos (Rouseff, 1992).

Con el objetivo de conocer si la composición de carotenoides determina o condiciona el perfil de compuestos norisoprenoides volátiles en los frutos cítricos y la posible relación biosintética entre los mismos, tal como se ha descrito en otros frutos carotenogénicos como el tomate, la sandía, o el melocotón (Simkin et al., 2004, Lewinshon et al., 2005, Vogel et al., 2010, Brandi et al., 2011), se analizaron los compuestos norisoprenoides en el flavedo y la pulpa de los frutos de las variedades y mutaciones de naranjas y pomelos seleccionados que, como se ha descrito anteriormente, tenían un perfil de carotenoides distintivo.

En trabajos previos realizados en zumo de naranja de la variedad Valencia se ha detectado la presencia de α -ionona, β -ionona, β -ciclocitral y β -damascenona como los principales compuestos norisoprenoides volátiles derivados de carotenoides (Mahattanatawee, et al., 2005). Sin embargo, no existen estudios que relacionen el contenido en carotenoides con la presencia de estos norisoprenoides. En esta Tesis Doctoral se han identificado los siguientes compuestos norisoprenoides volátiles en el flavedo y la pulpa de las diferentes variedades/especies de cítricos estudiadas: neral, nerol, nerol acetato, geranial, geraniol, geraniol acetato, citronelal, geranil acetona, β -ciclocitral, β -citronelol, β -ionona, dihidro- β -ionona, 6-metil-5-hepten-2-ona (**Tabla 31**). En general, en las variedades de naranjas el porcentaje de norisoprenoides en el flavedo y en la pulpa fue superior en los frutos de los mutantes, que presentan coloraciones distintivas respecto a los parentales, mientras que entre los pomelos la mayor abundancia de norisoprenoides correspondió a la variedad Star Ruby, que también manifiesta una coloración roja distintiva más intensa (**Figuras 36 a 39**). Por tanto, en los frutos de naranjas y pomelos con mayor concentración de carotenoides totales se corresponde con una mayor proporción de norisoprenoides, tal y como se ha descrito en otros frutos carotenogénicos (Kanasawud y Coruzet, 1990; Baldermann et al. 2005; Lewinson et al. 2005; Britton et al., 2008; Liu et al., 2012). En particular, en el flavedo de la naranja Cara Cara destacó el β -ciclocitral, que se detectó de forma exclusiva en este mutante, y también un mayor porcentaje de citronelal (**Figura 36**). Estudios realizados en frutos de tomate con diferente composición de carotenoides

mostraron que mutantes con altos niveles de β -caroteno (genotipo *High Beta*) acumulaban los norisoprenoides β -ionona y β -ciclocitral (Lewinsohn et al., 2005; Vogel et al., 2010). Por tanto, la presencia de β -ciclocitral podría estar relacionada con el mayor contenido de β -caroteno en la pulpa de Cara Cara. Por otra parte, el flavedo de Pinalate, presentó una mayor abundancia de geraniol y su derivado geraniol acetato, y sobre todo de geranil acetona (**Figura 36**), que se correlaciona con la mayor concentración de carotenos lineales, en especial de fitoeno, en este mutante (**Tabla 29**). En el flavedo de los pomelos también se observaron correlaciones interesantes entre el contenido de carotenoides y la presencia o abundancia de determinados norisoprenoides. Por ejemplo, la β -ionona, que se observó únicamente en el flavedo de Star Ruby, podría deberse a la fragmentación del β -caroteno (**Figura 37**). Por tanto, parece probable que la concentración o acumulación específica de determinados carotenoides como el β -caroteno, fitoflueno, fitoeno, ζ -caroteno y licopeno en el flavedo de los pomelos también afecta a la abundancia de ciertos norisoprenoides como la β -ionona, 6-metil-5-hepten-2-ona, nerol o geraniol acetato.

Aunque se han identificado algunos cambios importantes en el perfil o abundancia de determinados norisoprenoides volátiles en el flavedo de los frutos que parecen correlacionarse con la composición de carotenoides, las mayores diferencias entre las variedades seleccionadas se observaron en la pulpa. Así pues, tanto la pulpa de Pinalate como la de Cara Cara, ambas con altas concentraciones de carotenoides lineales, presentaron una mayor proporción de geranil acetona y 6-metil-5-hepten-2-ona, respecto a sus parentales (**Figura 38 y Tabla 29**). En frutos de tomate se ha descrito que los norisoprenoides geranil acetona y 6-metil-5-hepten-2-ona pueden derivar de la fragmentación de los carotenos lineales fitoeno, fitoflueno y ζ -caroteno (Lewinshon, 2005) (**Figura 5**). Los resultados obtenidos del perfil de norisoprenoides en frutos cítricos sugieren que, al igual que en tomate, los precursores de la geranil acetona y 6-metil-5-hepten-2-ona podrían ser también los carotenoides lineales, ya que tanto la pulpa de Pinalate como la de Cara Cara son especialmente ricas en este tipo de carotenoides. Además, la pulpa de Cara Cara mostró niveles más elevados de neral, nerol, geranial, y β -citronelol, que son posibles productos de licopeno, y este caroteno es muy abundante y entre las naranjas se encuentra exclusivamente en la pulpa de este mutante (**Figura 38 y Tablas 29**). En la pulpa de los pomelos, los norisoprenoides, β -ciclocitral y 6-metil-5-hepten-2-ona fueron exclusivos de los pomelos coloreados, Star Ruby y Flame, mientras que la β -ionona sólo se detectó en Star Ruby (**Figura 39**). En zumo fresco de la naranja Valencia se ha sugerido que la β -ionona podía formarse a partir de β -caroteno y β -criptoxantina, mediante la rotura oxidativa de la doble cadena entre los carbonos 9-10 y 9'-10', respectivamente (Mahattanatawee, et al., 2005). Por tanto, la mayor concentración de β -caroteno en la pulpa de Cara Cara y Star Ruby podría explicar los niveles más elevados de β -ionona en estos frutos. Además, los frutos de Star Ruby, al igual que los de Cara Cara, presentaron mayor abundancia de los norisoprenoides geranial y

neral, lo que parece ser debido a la presencia de licopeno. En frutos de tomate y sandía se ha descrito al licopeno como precursor de citral (geranial y neral), ya que existe una clara asociación entre la concentración de este carotenoide y los niveles de citral (Lewinshon, et al. 2005; Gao, et al., 2008). Por tanto, los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que en la pulpa de los frutos cítricos el licopeno también puede ser el precursor del citral.

La pulpa del pomelo blanco Marsh se caracterizó por una reducida abundancia en norisoprenoides, probablemente debido al bajo contenido en carotenoides en esta variedad (**Tabla 30**; Alquézar et al., 2013). En frutos de melocotón se ha observado que la menor coloración y contenido en carotenoides en una variedad de pulpa blanca respecto a la variedad parental de color amarillo-naranja, es debido a una mayor expresión y/o actividad de una enzima CCD que fragmenta carotenoides y genera mayor número y concentración de norisoprenoides (Brandi et al., 2011). Sin embargo, en el pomelo blanco Marsh el menor contenido en carotenoides no parece estar determinado por una mayor capacidad de fragmentación de carotenoides, ya que la abundancia de norisoprenoides también es muy baja (**Figura 39**). En los cítricos se han caracterizado bioquímicamente tres enzimas de la familia de las CCDs (Kato et al., 2006; Rodrigo et al., 2013) y sólo dos de ellas, CCD1 y CCD4, están implicadas en la generación de los norisoprenoides volátiles en frutos. Sin embargo, estas enzimas no parecen ser las responsables del bajo contenido en carotenoides coloreados en determinados frutos cítricos, como el pomelo blanco o limón (Kato et al., 2006; Rodrigo, comunicación personal). Por tanto, la reducida concentración de norisoprenoides volátiles en los frutos del pomelo blanco parece ser más probablemente una consecuencia del bajo contenido de carotenoides en esta variedad, es decir una menor disponibilidad de sustratos para la formación de estos CVs.

En conjunto, los resultados obtenidos en este trabajo, utilizando especies y variedades de naranja y pomelo con distintiva composición de carotenoides, sugieren una relación directa entre el contenido y composición de carotenoides y compuestos norisoprenoides volátiles, de forma similar a lo descrito en otros frutos carotenogénicos como el tomate, sandía o melocotón. Los resultados de este trabajo muestran que esta relación biosintética entre carotenoides-norisoprenoides fue especialmente evidente en la pulpa de los frutos (**Tablas 29 y 30, Figuras 38 y 39**). En el contexto de este trabajo conviene destacar que, aunque el contenido de norisoprenoides en la piel y la pulpa de las diferentes variedades estudiadas es relativamente bajo, los cambios en la composición de estos compuestos podrían tener una elevada repercusión en el aroma de los frutos, debido a su bajo umbral de percepción (Winterhalter y Rouseff, 2002; Mahattanatawee et al., 2005; Vogel et al., 2010), por lo que sería interesante ampliar estos estudios y analizar el impacto de los mismos, especialmente en la pulpa, en el aroma de los frutos y en la aceptación por el consumidor.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. El estudio comparativo de la emisión de CVs en frutos intactos, así como del contenido en el flavedo y la pulpa de frutos de la mandarina Clemenules, el híbrido Ortanique y la naranja Navelate a lo largo de la maduración muestra que los principales CVs son los monoterpenos por su abundancia y los sesquiterpenos por su diversidad, destacando el monoterpeno cíclico limoneno como el mayoritario en todas las situaciones. Se han encontrado mayores diferencias en número y cantidad de CVs en la emisión de frutos intactos que en el contenido en los tejidos de los frutos, con una mayor emisión en el híbrido Ortanique seguido de la naranja Navelate y la mandarina Clemenules.
2. En los frutos de las tres variedades la emisión de CVs desciende durante la maduración, mientras que el contenido aumenta. Se detectaron 30 CVs comunes en los frutos de las tres variedades, mientras que entre las principales diferencias destaca la emisión de ésteres alifáticos en los frutos de naranja, y la presencia de los sesquiterpenos sinensales y la ausencia de valenceno en la mandarina. El híbrido Ortanique presentó características aromáticas intermedias entre la mandarina y la naranja, y su mayor capacidad aromática parece deberse a una mayor emisión y contenido de CVs.
3. La emisión de CVs por los frutos intactos no parece estar directamente relacionada con la acumulación de éstos en las glándulas de aceite del flavedo.
4. El análisis de la expresión de 7 terpeno sintetas reveló una mayor acumulación de transcritos en la piel que en la pulpa. Con la excepción de la *VAL* y el gen *TPS3*, la expresión del resto de genes no guardó relación con el contenido de los correspondientes CVs. Sin embargo, el aumento de la expresión de *VAL* y el descenso de *TPS3* mostró un paralelismo con el incremento de valenceno y el descenso de sesquiterpenos, respectivamente.
5. El tratamiento postcosecha con etileno produjo efectos similares en la emisión de CVs en los frutos de la mandarina Clemenules, el híbrido Ortanique y la naranja Navelate. Los efectos más relevantes inducidos por la hormona fueron un descenso en la emisión de limoneno y otros monoterpenos, un aumento del ocimeno y, especialmente, del valenceno. Es de destacar la estimulación por etileno de la emisión de ésteres alifáticos en el híbrido Ortanique y la naranja Navelate. Sin embargo, el etileno no afectó de forma importante el contenido de CVs en el flavedo en ninguna de las variedades.
6. El efecto estimulador del etileno en la emisión de determinados CVs, como ésteres alifáticos y valenceno, es altamente dependiente del estadio de maduración del fruto. Además, la inhibición de la acción del etileno por 1-MCP redujo la emisión de ésteres

- alifáticos en los frutos de naranja, lo que sugiere un papel del etileno endógeno en la emisión natural de estos volátiles.
7. El efecto más significativo del etileno en la expresión de genes de terpeno sintasas fue la estimulación de la *VAL* y la inhibición de la *LIN*. Por otro lado, se ha identificado una nueva alcohol aciltransferasa (AAT) en cítricos, cuya expresión en frutos se regula positivamente por etileno y se correlaciona con la emisión de ésteres.
 8. La comparación del perfil de CVs entre el mutante *deg*, un mutante de la mandarina Clementina con reducido número de glándulas de aceite, y su línea parental reveló diferencias de tipo cuantitativo y no cualitativo. Así, mientras el contenido de CVs en el flavedo del mutante se redujo de forma proporcional al número de glándulas de aceite, la emisión total de CV en frutos *deg* fue sustancialmente superior a la de los frutos control.
 9. La emisión y presencia específica de β -farneseno y 2-hexenal, junto con un aumento en la emisión de ocimeno en frutos del mutante *deg*, sugiere una activación constitutiva de señales de estrés y defensa en los frutos del mutante. Estas respuestas estuvieron asociadas a una mayor expresión de las monoterpeno sintasas *OCI* y *LIN*.
 10. Los frutos del mutante *deg* también tienen reducido el contenido de CVs en la pulpa, lo que sugiere un efecto de la mutación en la génesis de las estructuras implicadas en las síntesis de CVs en ambos tejidos del fruto. Por otro lado, los frutos del mutante no tuvieron afectada la respuesta al etileno, pero parecen tener atenuada la infección por el hongo *Penicillium* en las áreas del flavedo libres de glándulas. En ambos genotipos, la infección por este hongo provoca un incremento considerable en la emisión de CVs, destacando la emisión específica de ésteres y alcoholes alifáticos, ésteres ramificados y el sesquiterpeno lineal α -farneseno.
 11. En el flavedo y la pulpa de frutos de naranja y pomelo con distinta pigmentación y composición en carotenoides se han identificado un total de 13 compuestos norisoprenoides volátiles (C9-C13). La abundancia de norisoprenoides fue mayor en las variedades y/o mutantes con mayor contenido en carotenoides, mostrando una relación sustrato-producto entre determinados carotenoides y norisopenoides.
 12. Los porcentajes relativos de los compuestos norisoprenoides fueron, en general, mayores en la pulpa que en el flavedo y las mayores diferencias en abundancia entre las variedades o mutantes también se observaron en este tejido. Es de destacar la mayor abundancia de geranil acetona y 6-metil-5-hepten-2-ona en la pulpa de los mutantes de naranja Pinalate y Cara Cara, ricas en carotenos lineales; y de 6-metil-5-hepten-2-ona, neral, geranial, β -ionona y β -ciclocitral en la pulpa del pomelo rojo Star Ruby, con mayor contenido de carotenoides.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbott JA.** 1999. Quality measurement of fruits and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*. 15(3): 207-225.
- Achilea O, Fuchs Y, Chalutz E, Rot I.** 1985. The contribution of host and pathogen to ethylene biosynthesis in *Penicillium digitatum*-infected citrus fruit. *Physiological Plant Pathology*. 27(1): 55-63.
- Agustí M.** 2000. Citricultura. Barcelona. Mundi Prens.
- Aharoni A, Keizer LCP, Bouwmeester HJ, Sun Z, Alvarez-Huerta M, Verhoeven HA, Blaas J, Van Houwelingen AMML, De Vos RCH, Van der Voet H, Jansen RC, Guis M, Mol J, Davis RW, Schena M, van Tunen AJ, O'Connell APO.** 2000. Identification of the SAAT gene involved in strawberry flavor biogenesis by use of DNA microarrays. *Plant Cell*. 12: 647-662.
- Aharoni A, Giri AP, Verstappen FW, Berteaux CM, Sevenier R, Sun ZK, Jongsma MA, Schwab W, Bouwmeester HJ.** 2004. Gain and loss of fruit flavor compounds produced by wild and cultivated strawberry species. *Plant Cell*. 16(11): 3110-3131.
- Aharoni A, Jongsma MA, Bouwmeester HA.** 2005. Volatile science. Metabolic engineering of terpenoids in plants. *Trends in Plant Science*. 10(12): 594-602.
- Alferez F, Zacarias L.** 2014. Influence of fruit maturity in the susceptibility of Navelina oranges to develop postharvest non-chilling peel pitting. *Food Science and Technology International*. 20(3):183-191.
- Alquézar B.** 2008. Caracterización bioquímica y molecular de la carotenogénesis en frutos cítricos. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia.
- Alquézar B, Rodrigo MJ y Zacarias L.** 2008. Regulation of carotenoids biosynthesis during fruit maturation in the red-fleshed orange mutant 'Cara Cara'. *Phytochemistry*. 69(10): 1997-2007.
- Alquézar B, Rodrigo MJ, Lado J, Zacarias L.** 2013. A comparative physiological and transcriptional study of carotenoid biosynthesis in white and red grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.) (Article in press) *Tree Genetics and Genomes*. doi: 10.1007/s11295-013-0635-7.
- Alós E, Diestefano G, Rodrigo MJ, Gentile A, Zacarias L.** 2013. Altered sensitivity to ethylene in 'Tardivo', a late-ripening mutant of Clementine mandarin. *Physiologia Plantarum*. doi:10.1111/ppl.12133.
- Altenburger R y Matilde P.** 1990. Further observations on rhythmic emission of fragrance in flowers. *Planta*. 180(2): 194-197.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ.** 1990. Basic local alignment search tool. *Journal Molecular Biology*. 215(3): 403-410.
- Anet EFLJ y Coggiola IM.** 1974. Superficial scald, a functional disorder of stored apples: Control of (E,E)-farnesene autoxidation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 25(3): 293-298.
- Arimura GI, Ozawa R, Soichi Kugimiya S, Takabayashi J, Bohlmann J.** 2004. Herbivore-induced defense response in a model legume. Two-spotted spider mites induce emission of (E)- β -Ocimene and transcript accumulation of (E)- β -ocimene synthase in *Lotus japonicas*. *Plant Physiology*. 135(4): 1976-1983.
- Arora SK, Pandita ML, Partap PS, Batra BR.** 1994. Response of long melon (*Cucumis Melo* var *utilissimus*) to foliar application of plant-growth substances. *Indian Journal of Agricultural Sciences*. 64(12): 841-844.
- Attaway JA y Oberbacher MF.** 1968. Studies on the aroma of intact Hamlin oranges. *Journal of Food Science*. 33(3): 287-289.
- Bain JM.** 1958. Morphological, anatomical and physiological changes in the developing fruit of Valencia orange, *Citrus sinensis* L. Osbeck. *Australian Journal of Botany* 6: 1-28.

- Balbotin C, Gaete-Eastman C, Vergara M, Herrera R, Moya-León MA.** 2007. Treatment with 1-MCP and the role of ethylene in aroma development of mountain papaya fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 43: 67-77.
- Baldermann S, Naim M, Fleischmann P.** 2005. Enzymatic carotenoid degradation and aroma formation in nectarines (*Prunus persica*). *Food Research International*. 38(8): 833-836.
- Baldwin EA.** 1993. Citrus fruit. biochemistry of fruit ripening. Seymour GB, Taylor JE, Tucker A (Eds). Chapman and Hall, London, pp: 107-149.
- Baldwin EA, Scott JW, Shewmaker CK, Schuch W.** 2000. Flavor trivia and tomato aroma: biochemistry and possible mechanisms for control of important aroma components. *American Society for Horticultural Science*. 35(6): 1013-1022.
- Baldwin EA.** 2002. Fruit favour, volatiles metabolism and consumer perception. En: Fruit quality and its biological basis. M. Knee (Ed.). CRC Press, Boca Raton, FL.
- Baldwin IT.** 2009. Plant volatiles. *Current Biology*. 20 (9) R392.
- Banet E, Romojaro F, Llorente S.** 1981. Evolución de pigmentos fotosintéticos en flavedo y pulpa de pomelo Marsh. *Anales de edafología y agrobiología*. 259:267.
- Barrett HC y Rhodes AM.** 1976. A numerical taxonomic study of affinity relationship in cultivated *Citrus* and its close relatives. *Systematic Botany*. 1: 105-136.
- Baumes R, Wirth J, Bureau S, Gunata Y, Razungles A.** 2002. Biogenesis of C13-norisoprenoid compounds: Experiments supportive for an apo-carotenoid pathway in grapevines. *Analytica Chimica Acta* 458(1):3-14.
- Beekwilder J, Alvarez-Huerta M, Neef E, Verstappen FWA, Bouwmeester HJ, Aharoni A.** 2004. Functional characterization of enzymes forming volatile esters from strawberry and banana. *Plant Physiology*. 135(4): 1865–1878.
- Beltrán F, Pérez-López AJ, López-Nicolás JM, Carbonell-Barrachina AA.** 2007. Effects of mandarin cultivar on quality of mandarine juice. *Food Science and Technology International*. 14(4): 307-313.
- Berger IJ, Reis MS, Targon ML, Machado MA, Freitas-Astúa J.** 2007. *In silico* prediction of gene expression patterns in *Citrus* flavedo. *Genetics and Molecular Biology*. 30(3): 752-760.
- Berzal V y Porras I.** 1989. Patrones y Variedades de Pomelo.-Consejería de Agricultura. Murcia.
- Blanc JS, Llusà J, Niinemets Ü, Noe SM, Peñuelas J.** 2011. Instantaneous and historical temperature effects on α -pinene emissions in *Pinus halepensis* and *Quercus ilex*. *Journal of Environmental Biology*. 32(1): 1-6.
- Bohlmann J y Keeling C.** 1998. Terpenoid biomaterials. *The Plant Journal*. 54:656-669.
- Bono R, Soler J, Fernández de Cordova L.** 1985. Variedades de agrios cultivadas en España. Generalidad Valenciana.
- Bourgou S, Rahali FZ, Ourghemmi I, Tounsi M.** 2012. Changes of peel essential oil composition of four tunisian citrus during fruit maturation. *The Scientific World Journal*. Article ID 528593. doi:10.1100/2012/528593.
- Brandi F, Bar E, Mourgues F, Horvath G, Turchi E, Giuliano G, Liverani A Tartarini S, Lewinshon E, Rosati C.** 2011. Study of 'Redhaven' peach and its white-fleshed mutant suggest a key role of CCD4 carotenoid dioxygenase in carotenoid and norisoprenoid volatile metabolism. *BMC Plant Biology*. 11:24. doi: 10.1186/1471-2229-11-24.
- Brat P, Rega B, Alter P, Reynes M, Brillouet JM.** 2003. Distribution of volatile compounds in the pulp, cloud, and serum of freshly squeezed orange juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51(11): 3442-3447.
- Brat P, Thi Hoang LN, Soler A, Reynes M, Billouet JM.** 2004. Physicochemical characterization of a new pineapple hybrid (FLHORAN41 Cv). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52(20): 6170-6177.
- Britton G.** 1995. Spectroscopy. En: G. Britton, S. Liaaen-Jensen y H. Pfander (Eds.) *Biosynthesis and Metabolism*. 13-62. Basel Birkhäuser Verlag.
- Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H.** 2008. Carotenoids. Vol.4: Natural Functions. Ed. Birkhäuser Verlag.

- Buettner A, Mestres M, Fischer A, Guasch J, Schieberle P.** 2003. Evaluation of the most odour-active compounds in the peel oil of clementines (*Citrus reticulata* Blanco cv. *Clementine*). *European Food Research and Technology*. 216(1): 11-14.
- Burns J, Achor D, Echeverria E.** 1992. Ultrastructural studies on the ontogeny of grapefruit juice vesicles (*Citrus paradisi* Macf. cv Star Ruby). *International Journal of Plant Sciences*. 153(1): 14-25.
- Buttery RG, Teranishi R, Ling LC, Flath RA, Stern DJ.** 1988. Quantitative studies on origins of fresh tomato aroma volatiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51(6): 7318-7325.
- Calabrese F.** 1992. The history of citrus in the Mediterranean countries and Europe. *Proceedings of the International Society of Citriculture*. 1:35-38
- Carbonell L.** 2006. Zumo de mandarina. Caracterización, proceso de elaboración y aceptación por consumidores. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia.
- Caris-Veyrat C, Schmid A, Carail M, Böhm V.** 2003. Cleavage Products of lycopene produced by in vitro oxidations: characterization and mechanisms of formation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51(25): 7318-7325.
- Carrera E, Ruiz-Rivero O, Ibañes V, Iglesias DJ, Rodrigo MJ, Zacarías L, Talón M.** 2006. Transcriptome analysis of an orange mutant with reduced fruit size and altered fragrance. VIII Reunión Biología Molecular de Plantas, Pamplona, España.
- Carrera E, Ruíz-Rivero O, Rodrito MJ, Iglesias DJ, Talón M.** 2007. Estudio de la producción de volátiles en cítricos: alteraciones en la producción de aceites esenciales y aromas en flores y frutos. *Levante Agrícola*. 3^{er} trimestre: 341-346.
- Chang MCY, Eachus RA, Trieu W, Ro DK y Keasling, JD.** 2007. Engineering *Escherichia coli* for production of functionalized terpenoids using plant P450s. *Natural Chemistry Biology*. 3:274-277.
- Chen X, Yauk YK, Nieuwenhuizen NJ, Matich AJ, Wang MY, Lopez-Perez R, Atkinson R, Beuning L.** 2010. Characterisation of an (S)-linalool synthase from kiwifruit (*Actinidia arguta*) that catalyses the first committed step in the production of floral lilac compounds. *Functional Plant Biology*. 37(3): 232-243.
- Chisholm GM, Jell JA, Cass Jr DM.** 2003. Characterization of the major odorants found in the peel oil of *Citrus reticulata* Blanco cv. *Clementine* using gas chromatography-olfactometry. *Flavor Fragrance Journal*. 18(4): 275-281.
- Cohen E, Shalom Y, Rosenberber I.** 1990. Postharvest behavior of Ortanique (Topaz) Tangor citrus fruit during long term storage at various temperatures. *Scientia Horticulturae*. 44(3-4): 235-40.
- Crock J, Wildung M, Croteau R.** 1997. Isolation and bacterial expression of a sesquiterpene synthase cDNA clone from peppermint (*Mentha x piperita*, L.) that produces the aphid alarm pheromone (*E*)- β -farnesene. Source of the Document *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94(24): 12833-12838.
- Croteau R, Kutcahn T.M y Lewis N.G.** 2000. Natural products. In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (Buchanan, B., Gruissem, W. and Jones, R., eds). Rockville, MD: *American Society of Plant Physiologists*, pp. 1250-1318.
- Cupri P, Coletta A, Antonacci D.** 2010. Analysis of carotenoids in grapes to predict norisoprenoids varietal aroma of wines from Apulia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58(17): 9647-9656.
- Darvill AG y Albersheim P.** 1984. Phytoalexins and their elicitors. A defense against microbial infection in plants. *Annual Review of Plant Physiology*. 35:245-275.
- Davis WB.** 1932. Deposits of oil in the juice sacs of citrus fruits. *American Journal of Botany*. 19: 101-105.
- Davies BH.** 1976. Carotenoids. New York: Academic Express.
- Defilippi BG, Kader AA, Dandekar AM.** 2005a. Apple aroma: alcohol acyltransferase, a rate limiting step for ester biosynthesis, is regulated by ethylene. *Plant Science*. 168(5): 1199-1210.

- Defilippi BG, Dandekar AM y Kader AA.** 2005b. Relationship of ethylene biosynthesis to volatile production, related enzymes and precursor availability in apple peel and flesh tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(8): 3133-3141.
- Defilippi BG, Manríquez D, Luengwilai K, González-Agüero M.** 2009. Chapter 1: Aroma volatiles. Biosynthesis and mechanisms of modulation during fruit ripening (Review). *Advances in Botanical Research*. 50: 1-37.
- Del Terra L, Lonzarich V, Asquini E, Navarini L, Graziosi G, Pallavicin A.** 2013. Functional characterization of three *Coffea Arabica* L. monoterpene synthases: Insights into the enzymatic machinery of coffee aroma. *Phytochemistry*. 89: 6-14.
- Dennis C.** 1983. Postharvest pathology of fruits and vegetables. London U.K.: Academic Press.
- DeOliveira RP y Radmann EB.** 2005. Genetic similarities of citrus fresh fruit market cultivars. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 27(2): 332-334.
- Devices F y Albrigo L.** 1999. Citrus. Editorial Acribia. Zaragoza, Spain.
- Dornelas MC y Mazzafera P.** 2007. A genomic approach to characterization of the Citrus terpene synthase gene family. *Genetics and Molecular Biology*. 30(3): 832-840.
- Droby S, Eick A, Macarisin D, Cohen L, Rafael G, Stange R, McColum G, Dudai N, Nasser A, Wisniewski M, Shapira R.** 2008. Role of citrus volatiles in host recognition, germination and growth of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. *Postharvest Biology and Technology*. 49(3): 386-396.
- Dudareva N, Pichersky E, Gershenzon J.** 2004. Biochemistry of plant volatiles. *Plant Physiology*. 135(4): 1893-1902.
- Dudareva N, Nagegowda DA, Orlova I, Negre F.** 2006. Plant volatiles: recent advances and future perspectives. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 25(5): 417-440.
- Dudareva N, Klempien A, Muhlemann JK, Kaplan I.** 2013. Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Phytologist*. 198(1): 16-32.
- Elston A, Lin J y Rouseff RL.** 2005. Determination of the role of valencene in orange oil as a direct contributor to aroma quality. *Journal of Flavour and Fragrance*. 20(4): 381-386.
- El-Otmani M, Ait-Oubahou A, Zacarías L.** 2011. Citrus spp: orange, mandarin, tangerine, clementine, grapefruit, pomelo, lemon and lime. *Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits*. 2(21): 437-514.
- El-Sharkawy I, Manriquez D, Flores FB, Regad F, Bouzayen M, Latche A, Pech JC.** 2005. Functional characterization of a melon alcohol acyl-transferase gene family involved in the biosynthesis of ester volatiles. Identification of the crucial role of a threonine residue for enzyme activity. *Plant Molecular Biology*. 59(2): 345-362.
- Els S, Preston C, Hertzog F, Heckel F, Richling E, Schreier P.** 2005. Aroma profiles of pineapple fruit (*Ananas comosus* [L.] Merr) and pineapple products. *Lebensm Wiss Technology*. 38(3): 263-274.
- Fan, X, Argenta L, Mattheis JP.** 2000. Inhibition of ethylene action by 1-methylcyclopropene prolongs storage life of apricots. *Postharvest Biology and Technology*. 20(2): 135-142.
- Fellman JK y Mattheis JP.** 1995. Ester biosynthesis in relation to harvest maturity and controlled-atmosphere storage of apples. Rousell, R.L.& Leahy, M.M. (Eds.), *Fruit Flavors: Biogenesis Characterization and Authentication*. ACS symposium series Fruit Flavors. 596: 149-162.
- Flamini G y Cioni PL.** 2010. Odour gradients and patterns in volatile emission of different plant parts and developing fruits of grapefruit (*Citrus paradisi* L.). *Food Chemistry*. 120(4): 984-992.
- Flores FB, El Yahyaoui F, de Billerbeck G, Romojaro F, Latche A, Bouzayen M, Pech JC, Ambid C.** 2002. Role of ethylene in the biosynthetic pathway of aliphatic ester aroma volatiles in Charentais cantaloupe melons. *Journal of Experimental Botany*. 53(367): 201-206.
- French RC, Long RK, Latterell FM, Graham CL, Smoot JJ, Shaw PE.** 1978. Effect of nonanal, citral, and citrus oils on germination of conidia of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. *Phytopathology*. 68: 877-882.

- Fuji H, Shimada T, Sugiyama A, Nishikawa F, Endo T, Nakano M, Ikoma Y, Shimizu T, Omura M.** 2007. Profiling ethylene-responsive genes in mature mandarin fruit using 22K oligoarray. *Plant science*. 173(3): 340-348.
- Gang DR.** 2005. Evolution of flavours and scents. *Annual Review Plant Biology* 56: 301-25.
- Gao H, Hongliang Z, Shao Y, Chen A, Chengwen L, Benzong Z, Yunbo L.** 2008. Lycopene accumulation affects the biosynthesis of some carotenoid-related volatiles independent of ethylene in tomato. *Journal of Integrative Plant Biology*. 50(8): 991-996.
- Gapper NE, Bai J, Whitaker BD.** 2006. Inhibition of ethylene-induced α -farnesene synthase gene PcAFS1 expression in 'd'Anjou' pears with 1-MCP reduces synthesis and oxidation of α -farnesene and delays development of superficial scald. *Postharvest Biology and Technology*. 41(3): 225-233.
- Gapper NE, McQuinn RP, Giovannoni JJ.** 2013. Molecular and genetic regulation of fruit ripening. *Plant Molecular Biology*. 82(6): 575-591.
- Gershenzon J, McConkey ME, Croteau RB.** 2000. Regulation of monoterpeno accumulation in leaves of peppermint. *Plant Physiology*. 122(1): 205-213.
- Gmitter FG.** 1995. Origin, evolution, and breeding of the grapefruit. *Plant Breeding Reviews*. 13: 345-363.
- Gomez-Ariza JL, Barrera-García T, Lorenzo F.** 2004. Determination of flavour and off-flavour compounds in orange juice by on-line coupling of a pervaporation unit to gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography*. 1047: 313-317.
- Gonda I, Bar E, Portnoy V, Lev S, Burger J, Schaffer AA, Tadmor Y, Gepstein S, Giovannoni JJ, Katzir N, Lewinsohn E.** 2010. Branched-chain and aromatic amino acid catabolism into aroma volatiles in *Cucumis melo* L. fruit. *Journal of Experimental Botany*. 61(4): 1111-1123.
- González-Candelas L, Alamar S, Sánchez-Torres P, Zacarías L, Marcos JF.** 2010. A transcriptomic approach highlights induction of secondary metabolism in citrus fruit in response to *Penicillium digitatum* infection. *BMC Plant Biology*. 10:194.
- González-Mas MC, Rambla JL, Alamar MC, Gutierrez A, Granel A.** 2011. Comparative analysis of the volatile fraction of fruit juice from different citrus species. *Plos One*. 6 (7): e22016.
- Golding JB, Shearer D, McGlasson WB, Willie SG.** 1999. Relationships between respiration, ethylene and aroma production in ripening banana. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47(4): 1646-1651.
- Granel A y Rambla JL.** 2013. Biosynthesis of volatiles compounds. En: The molecular biology and biochemistry of fruit ripening. Eds: GB. Seymour, P. Mervin, JJ. Giovannoni y GA. Turcker. Editorial: Wiley-BlackWell. pp. 135-162.
- Gross J.** 1987. Pigments in fruits. London: Academic Press.
- Hansen K y Poll L.** 1993. Conversion of L-isoleucine into 2-metilbut-2-enil esters in apples. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie*. 26: 178-180.
- Harrison SP, Morfopoulos C, Dani KGS, Prentice IC, Arneth A, Atwell BJ, Barkley MP, Leishman MR, Loreto F, Medlyn BE, Niinemets Ü, Possell M, Peñuelas J, Wright IJ.** 2013. Volatile isoprenoid emissions from plastid to planet. *New Phytologist*. 197(1): 49-57.
- Herrera A.** 2007a. Emisión de compuestos volátiles durante la postcosecha de frutos de mandarina. Tesis doctoral Universidad Autónoma de Madrid.
- Herrera A, Rodrigo MJ, Gil JV, Zacarías L.** 2007b. Ethylene stimulates emission of terpenoids and aliphatic esters in Citrus fruits. En: Advances in Plant Hormone Ethylene Research: Proceedings of the 7th International Symposium on the Plant Hormone Ethylene. Eds: A. Ramina, C. Chang, J. Giovannoni, H. Klee, P. Perata y E. Woltering. Editorial: Springer. ISBN 978-4020-6013-7. pp 257-259.
- Herrera A, Gil JV, Rodrigo MJ, Zacarías L.** 2009. Emisión de compuestos volátiles durante la conservación refrigerada de frutos de distintas variedades de mandarina. *Levante Agrícola*.

- Hopke J, Donath J, Blechert S, Boland W.** 1994. Herbivore-induced volatiles: emission of acyclic homoterpenes from leaves of *Phaseolus lunatus* and *Zea mays* can be triggered by a β -glucosidase and jasmonic acid. *FEBS letters*. 352(2): 146-150.
- Hui HY.** 2010. Handbook of fruit and vegetable flavors. Ed. WILEY.
- Huang M, Abel C, Sohrabi R, Petri J, Haupt I, Cosimano J, Gershenzon J, Tholl D.** 2010. Variation of herbivore-induced volatile terpenes among *Arabidopsis* ecotypes depends on allelic differences and subcellular targeting of two terpene synthases, TPS02 and TPS03. *Plant Physiology*. 153(3): 1293-1310.
- Huang M, Sanchez-Moreiras AM, Abel C, Sohrabi R, Lee S, Gershenzon J, Tholl D.** 2012. The major volatile organic compound emitted from *Arabidopsis thaliana* flowers, the sesquiterpene (*E*)- β -caryophyllene, is a defense against a bacterial pathogen. *New Phytologist*. 193(4): 997-1008.
- Hunter GLK, Bucek VA, Radford T.** 1974. Volatile components of canned Alphonso mango. *Journal of Food Science* 39: 900-903.
- Kanasawud P y Crouzet JC.** 1990. Mechanism of formation of volatile compounds by thermal degradation of carotenoids in aqueous medium. 1. Lycopene degradation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 38(1): 1238-1242.
- Kännaste A, Namphung Vongvanich N, Anna-Karin Borg-Karlson AK.** 2008. Infestation by a *Nalepella* species induces emissions of α - and β -farnesene, linalool and aromatic compounds in Norway spruce clones of different susceptibility to the large pine weevil. *Arthropod-Plant Interactions*. 2(1): 31-41.
- Kant MR, Bleeker PM., Wijk MV, Schuurink RC, Haring MA.** 2009. Plant volatiles in defence. *Advances in botanical research* 51(C): 613-666.
- Kato M, Matsumoto H, Ikoma Y, Okuda H, Yano M.** 2006. The role of carotenoid cleavage dioxygenases in the regulation of carotenoid profiles during maturation in citrus fruit. *Journal of Experimental Botany*. 57(10):2153-2164.
- Kato M.** 2012. Mechanism of carotenoid accumulation in citrus fruit. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*. 81(3): 219-233.
- Kavanagh JA y Wood RKS.** 1967. Role of wounds in infection of oranges by *Penicillium digitatum* Sacc. *Annals of Applied Biology*. 60(3): 375-383.
- Klee HJ.** 2010. Improving the flavour of fresh fruits: genomics, biochemistry and biotechnology. *New Phytologist*. 187(1): 44-56.
- Knight TG, Klieber A, Sedgley M.** 2001. The relationship between oil gland and fruit development in Washington Navel orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Annals of Botany (Lond)*. 88: 1039-1047.
- Kondo S, Setha S, Rudell DR, Buchman DA, Mattheis JP.** 2005. Aroma volatile biosynthesis in apples affected by 1-MCP and methyl jasmonate. *Postharvest Biology and Technology*. 36(1): 61-68.
- Kouassi KH, Bajji M, Zhiri A, Lepoivre P, Jijakli MH.** 2010. Evaluation of three essential oils as potential sources of botanical fungicides. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*. 75(4): 525-529.
- Ladaniya MS,** 2008. Citrus Fruits: Biology, technology and evaluation. *Elsevier*.
- Lara I, Ortiz A, Echeverría G, López M, Graell J.** 2008. Development of aroma-synthesising capacity throughout fruit maturation of 'Mondial Gala' apples. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 83: 253-259.
- Lara I, Belgia B, Goulao FL.** 2014. The fruit cuticle as a modulator of postharvest quality. *Postharvest Biology and Technology*. 87: 103-112.
- Lee HS.** 2001. Characterization of carotenoids in juice of red navel orange (Cara Cara). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49(5): 2563-2568.
- Lewinsohn E, Sitrit Y, Bar E, Azulay Y, Ibdah M, Meir A, Yosef E, Zamir D, Tadmor Y.** 2005. Not just colors-carotenoid degradation as a link between pigmentation and aroma in tomato and watermelon fruit. *Trends in Food Science & Technology*. 16(9): 407-415.
- Liang SJ, Wu H, Lun X, Lu DW.** 2006. Secretory cavity development and its relationship with the accumulation of essential oil in fruits of *Citrus medica* L.var. *sarcodactylis* (Noot.) swingle. *Journal of Integrative Plant Biology*. 48(5): 573-583.

- Li D, Shen J, Wu T, Xu Y, Zong X, Li D, Shu H.** 2008. Overexpression of the apple alcohol acyltransferase gene alters the profile of volatile blends in transgenic tobacco leaves. *Physiologia Plantarum*. 134(3): 394-402.
- Liu C, Zhang H, Dai Z, Liu X, Liu Y, Deng X, Chen F, Xu J.** 2012 Volatile chemical and carotenoid profiles in watermelons [*Citrullus vulgaris* (Thunb.) Schrad (Cucurbitaceae)] with different flesh colors. *Food Science and Biotechnology*. 21(2): 531-541.
- Lücker J, El Tamer MK, Schwab W, Verstappen FW, Van der Plas LH, Bouwmeester HJ, Verhoeven HA.** 2002. Monoterpene biosynthesis in lemon *Citrus limon*: cDNA isolation and functional analysis of four monoterpene synthases. *European Journal of Biochemistry*. 269(13): 3160-3171.
- Lücker J, Bowen P, Bohlman J.** 2004. *Vitis vinifera* terpenoid cyclases: Functional identification of two sesquiterpene synthase cDNAs encoding (+)-valencene synthase and germacrene D synthase and expression of mono and sesquiterpene synthases in grapevine flowers and berries. *Phytochemistry*. 65(19): 649-659.
- Lurie S, Pre-Aymard C, Ravid U, Larkov O y Fallik E.** 2002. Monoterpene biosynthesis in lemon (*Citrus limon*)-cDNA isolation and functional analysis of four monoterpene synthases. *European Journal of Biochemistry*. 269(13): 3160-3171.
- Maccarone E, Campisi S, Fallico B, Rapisarda P, Sgarlata R.** 1998. Flavor components of Italian orange juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46(6): 2293-2298.
- Maes K.** 2002. Volatiles emitted by plants: an *in vitro* approach. Faculty of Bioscience Engineering.
- Mahattanatawee K, Roussef F, Valim MF, Naim M.** 2005. Identification and aroma impact of norisoprenoids in orange juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(2): 393-397.
- Marcos JF, Gonzalez-Candelas L, Zacarias L.** 2005. Involvement of ethylene biosynthesis and perception in the susceptibility of citrus fruits to *Penicillium digitatum* infection and the accumulation of defence-related mRNAs. *Journal of Experimental Botany*. 56(418): 2183-2193.
- Maruyama T, Michiho I, Gisho H.** 2001. Molecular cloning, functional expression and characterization of (E)- β -farnesene synthase from *Citrus junos*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 24(10): 1171-1175.
- Mayuoni L, Tietel Z, Patil BS, Porat R.** 2011a. Does ethylene degreening affect internal quality of citrus fruit?. *Postharvest Biology and Technology*. 62: 50-58.
- Mayuoni L, Sharabi-Schwager, Feldmesser E, Porat R.** 2011b. Effects of ethylene degreening on the transcriptome of madarine flesh. *Postharvest Biology and Technology*. 62: 50-58.
- Medina V.** 2011. Caracterización de nuevas dioxigenasas de rotura de carotenoides de cítricos y su posible implicación en la biosynthesis de apocarotenoides. Trabajo final de carrera. Universidad Politécnica de Valencia.
- Melendez Martinez AJ, Vicari IM, Heredia FJ.** 2003. A routine high-performance liquid chromatography method for carotenoid determination in ultra frozen orange juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 4219-4224.
- Merle H, Morón M, Blázquez M.A y Boira H.** 2004. Taxonomical contribution of essential oils in mandarins cultivars. *Biochemical Systematics and Ecology*. 32(5): 491-497.
- Miyazaki T, Plotto A, Goodner K, Gmitter Jr FG.** 2011. Distribution of aroma volatile compounds in tangerine hybrids and proposed inheritance. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 91(3): 449-460.
- Miyazaki T, Plotto A, Baldwin EA, Reyes-De-Corcuera J, Gmitter Jr FG.** 2012. Aroma characterization of tangerine hybrids by gas-chromatography-olfactometry and sensory evaluation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 92(4): 727-735.
- Moshonas MG y Shaw PE.** 1997. Quantitation of volatile constituents in mandarin juice and its use for comparison with orange juices by multivariate analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45(10): 3968-3972.

- Muhlemann JK, Maeda H, Chang CY, San Miguel P, Baxter I, Cooper B, Perera MA, Nikolau BJ, Vitek O, Morgan JA.** 2012. Developmental changes in the metabolic network of snapdragon flowers. *PLoS ONE* 7: e40381.
- Nicolosi E.** 2007. Citrus genetics, breeding and biotechnology. University of Catania. Italia. Ed. I.A. Khan
- Niinemets U, Arneth A, Kuhn U, Monson RK, Peñuelas J, Staudt M.** 2010. The emission factor of volatile isoprenoids: stress, acclimation, and developmental responses. *Biogeosciences*. 7(7): 2203-2223.
- Nishikawa K, Okabayashi H, Mitiku S.B, Sawamura M.** 2002. Bitter and volatile compounds in ethylene-treated *Citrus grandis* [L.] Osbeck fruits. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*. 71(2): 292-296.
- Norman S y Craft C.** 1968. Effect of ethylene on production of volatiles by lemons. *American Society for Horticultural Science*. 3: 66-67.
- Obeland DM, Fouse DC, Aung LH, Houck LY.** 1996. Release of d-limonene from non injured and injured lemons treated with hot water and low temperature. *Journal of Agriculture Science*. 71(3): 389-394.
- Obeland DM, Margosan DA, Houck LY, Aung LH.** 1997. Essential oil and chilling injury in lemon. *Hortscience*. 32(1): 108-111.
- Obeland DM, Aung LH, Bridges DL, Mackey BE.** 2003. Volatile emission of navel oranges as predictors of freeze damage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51(11): 3367-3371.
- Oberholster R, Cowan K, Molnar P, Toth G.** 2001. Biochemical basis of color as an aesthetic quality in *Citrus sinensis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49(1): 303-307.
- Ohloff G.** 1978. Recent developments in the field of naturally occurring aroma components. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. 35: 431-527.
- Olias R, Perez AG, Sanz C.** 2002. Catalytic properties of alcohol acyl-transferase in different strawberry species and cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50(14): 4031-4036.
- Ortiz A.** 2011a. Modificaciones relacionados con el aroma y la textura en manzana, melocotón y nectarina durante la maduración y la post-cosecha. Tesis Doctoral. Universidad de Lleida.
- Ortiz A, Graell J, Lara I.** 2011b. Volatile ester-synthesising capacity throughout on-tree maturation of 'Golden Reinders' apples. *Scientia Horticulturae*. 131(1): 6-14.
- Ortuño A, Garcia-Puig D, Sabater F, Porrás I, Garcia-Lidon A, Del Río JA.** 1993. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 41 (10): 1566-1569.
- Ortuño A, Gracia-Puig D, Fuster MD, Perez ML, Sabater F, Porrás I, García A, Del Río JA.** 1995. Flavanone and nootkatone levels in different varieties of grapefruit and pummelo. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 43(1): 1-5.
- Pascual M, Mallent MD, Cuñat P.** 1993. Estudio de los carotenoides de naranja navelina. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 33(2): 179-196.
- Paré PW y Tumlinson JH.** 1999. Plant volatiles as a defense against insect herbivores. *Plant Physiology*. 121: 325-331.
- Pechous SW, Watkins CB, Whitaker BD.** 2005. Expression of α -farnesene synthase gene AFS1 in relation to levels of α -farnesene and conjugated trienols in peel tissue of scald-susceptible 'Law Rome' and scald-resistant 'Idared' apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 35(2): 125-132.
- Peñuelas J y Llusià J.** 2001. The complexity of factors driving volatile organic compound emissions by plants. *Biologia Plantarum*. 44(4): 481-87.
- Perez AG, Olias R, Luaces P, Sanz C.** 2002. Biosynthesis of strawberry aroma compounds through amino acid metabolism. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 50(14): 4037-4042.
- Perez-Lopez AJ, Saura D, Lorente J, Carbonell-Barrachina A.** 2006. Limonene, linalool, α -terpineol, and terpinen-4-ol as quality control parameters in mandarin juice processing. *European Food Research and Technology*. 222(3): 281-285.

- Pichersky E y Gang D.** 2000. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends in Plant Science*. 5(10): 439-445.
- Pichersky E, Noel JP y Dudareva N.** 2006. Biosynthesis of plant volatiles: Nature's diversity and ingenuity. *Science*. 311(5762): 808-811.
- Plaffl MW, Horgan GW, Dempfle L.** 2002. Relative expression software tool (REST[®]) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Reserach*. 30 (9): E36.
- Porat R, Weiss B, Cohen L, Daus A, Goren R, Droby S.** 1999. Effects of ethylene and 1-methylcyclopropene on the postharvest qualities of Shamouti oranges. *Postharvest Biology and Technology*. 15(2): 155-163.
- Porat R.** 2008. Degreening of citrus fruit. *Tree and Forestry Science and Biotechnology*. 2: 71-76.
- Purvis AC y Barmore CR.** 1981. Involvement of ethylene in chlorophyll degradation in peel of citrus fruits. *Plant Physiology*. 68(4): 854-856.
- Quintero A, Gonzalez CN, Sanchez F, Usubillaga A, Rojas L.** 2003. Constituents and biological activity of *Citrus aurantium amara* L. essential oil. *Acta horticultural*. 597: 115-117.
- Ritenour M, Zhang J, Wardowski WF, Brown GE.** 2003. Postharvest decay control recommendations for Florida citrus fruit. Horticultural Sciences Department circular 359-A, UF/IFAS Extension. Disponible en: <http://edis.ifas.ufl.edu/CH081>.
- Riu-Aumatell M.** 2005. Caracterización de compuestos volátiles en bebidas derivadas de frutas Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona.
- Roberts SC.** 2007. Production and engineering of terpenoids in plant cell culture. *Nature Chemical Biology*. 3(7): 387-395.
- Rodrigo MJ, Marcos JF, Alferez, F, Mallent MD, Zacarías L.** 2003. Characterization of Pinalate, a novel *Citrus sinensis* mutant with a fruit-specific alteration that results in yellow pigmentation and decreased ABA content. *Journal of Experimental botany*. 54(383): 727-738.
- Rodrigo MJ, Marcos JF, Zacarías L.** 2004. Biochemical and molecular analysis of carotenoid biosynthesis in flavedo of orange (*Citrus sinensis* L.) during fruit development and maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52(22): 6724-6731.
- Rodrigo MJ y Zacarías L.** 2007. Effect of postharvest ethylene treatment on carotenoid accumulation and the expression of carotenoid biosynthetic genes in the flavedo of orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 43(1):14-22.
- Rodrigo MJ, Alquézar B, Alós E, Medina V, Carmona L, Bruno M, Al-Babili S, Zacarías L.** 2013. A novel carotenoid cleavage activity involved in the biosynthesis of Citrus fruit-specific apocarotenoid pigments. *Journal of Experimental Botany*. 64(14): 4461-4478.
- Rodríguez A, San Andres V, Cervera M, Redondo A, B Alquézar B, Shimada T, Gadea J, Rodrigo MJ, Zacarias L, Palou L, Lopez MM, Castañera P, Peña L.** 2011. Terpene down-regulation in orange reveals the role of fruit aromas in mediating interactions with insect herbivores and pathogens. *Plant Physiology*. 156(2): 793-802
- Rodríguez A, Shimada T, Cervera M, Alquézar B, Gadea J, Gómez-Cadenas A, De Ollas CJ, Rodrigo MJ, Zacarías L, Peña L.** 2014. Terpene down-regulation triggers defense responses in transgenic orange leading to resistance against fungal pathogens. *Plant Physiology*. 164(1): 321-339.
- Rodov V, Ben Yehoshua S, Frang DG, Kim JJ, Ashkenaci R.** 1995. Performed antifungal compounds of lemon fruit: citral and its relation to disease resistance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 43(4): 1057-1061.
- Romero P, Lafuente MT, Rodrigo MJ.** 2012. The *Citrus* ABA signalosome: identification and transcriptional regulation during sweet orange fruit ripening and leaf dehydration. *Journal Experimental of Botany*. 63(13): 4931-4945.
- Rouseff R, Sadler GD, Putnam TJ, Davis JE.** 1992. Determination of β -carotene and other hydrocarbon carotenoids in red grapefruit cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 40(1): 47-51.

- Rouseff R, Gmitter F, Grosser J.** 1994. *Citrus* breeding and flavour. Understanding natural flavours. Piggot J.R. y Paterson A. (Eds). Blackey Acad. and Prof., Glasgow. pp:113-127.
- Rouseff R y Leahy M.** 1995. Fruit flavours: biogenesis, characterization and authentication. *ACS Symposium Series.* 596: 135-253.
- Rouseff R, Raley L, Hofsommer HJ.** 1996. Application of diode array detection with a C-30 reversed phase column for the separation and identification of saponified orange juice carotenoides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 44(8): 2176-2181.
- Rouseff R, Ruiz Perez-Cacho P, Jabalpurwala F.** 2009. Historical review of *Citrus* flavour research during the past 100 years. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 57(18): 8115-8124.
- Ruberto G, Renda A, Piatelli M, Rapisarda P, Starrantion A.** 1997. Essential oil of a new *Citrus* hybrid, *Citrus clementina* x *Citrus sinensis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 45(2): 467-471.
- Ruberto G.** 2002. Analysis of volatile components of *Citrus* fruit essential oils. Analysis of taste and aroma. Jackson J.F y Linskens J.F. (Eds). Springer Verlag. *Serie Molecular Methods of Plant Analysis*, Vol 21, Berlin. pp. 123-157.
- Ruiz Perez-Cacho P y Rouseff R.** 2008. Processing and storage effects on orange juice aroma: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 56(21): 9785-9796.
- Salvador A, Monterde A, Navarro P, Cuquerella J.** En: Merodio M y Escribano M.I. 2003. Maduración y post-recolección de frutas y hortalizas. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. pp. 311-316.
- Sanz C, Olias JM, Perez AG.** 1997. Aroma biochemistry of fruits and vegetables. In Tomas-Barberan FA., Robins RJ. (eds). *Phytochemistry of fruit and vegetables.* Oxford: Clarendon Press, p. 125-155.
- Saunt J.** 2000. *Citrus* varieties of the world. Sinclair.
- Sawamura M.** 2000. Volatile components of essential oils of the *Citrus* genus. *Recent Research Development in Agricultural and Food Chemistry.* 4: 131-164.
- Scala A, Allmann S, Mirabella R, Haring MA, Schuurink RC.** 2013. Review: Green leaf volatiles: A plant's multifunctional weapon against herbivores and pathogens. *International Journal of Molecular.* 14(9): 17781-1781.
- Schaffer RJ, Friel EN, Souleyre EJ, Bolitho K, Thodey K, Ledger S, Bowen JH, Ma JH, Nain B, Cohen D, Gleave AP, Crowhurst RN, Janssen BJ, Yao JL, Newcomb RD.** 2007. A genomics approach reveals that aroma production in apple is controlled by ethylene predominantly at the final step in each biosynthetic pathway. *Plant Physiology.* 144(4): 1899-1912.
- Schnee C, Köllner TG, Gershenzon J, Degenhardt J.** 2002. The maize gene terpene synthase 1 encodes a sesquiterpene synthase catalyzing the formation of (*E*)- β -farnesene, (*E*)-nerolidol, and (*E,E*)-farnesol after herbivore damage. *Plant Physiology.* 130: 2049-2060.
- Schneider R, Razungles A, Augier C, Baumes R.** 2001. Monoterpenic and norisoprenoidic glycoconjugates of *Vitis vinifera* L. cv. *Melon B.* as precursors of odorants in Muscadet wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 53(1-2):393-397.
- Schieberle P y Hofmann T.** 1997. Evaluation of the character impact odorants in fresh strawberry juice by quantitative measurements and sensory studies on model mixtures. *Journal of Agricultural Food Chemistry.* 45: 227-232.
- Scora RW.** 1975. On the history and origin of citrus. *Bulletin of the Torrey Botanical Club.* 102:369-375.
- Sharon-Asa L, Shalit M, Frydman A, Bar E, Holland D, Or E, Lavi U, Lewinsohn E, Eyal Y.** 2003. *Citrus* fruit flavor and aroma biosynthesis: Isolation, functional characterization, and developmental regulation of Cstps1, a key gene in the production of the sesquiterpene aroma compound valencene. *The Plant Journal.* 36(5): 664-674.
- Shaw PE.** 1979. Review of quantitative analyses of *Citrus* essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 27(2): 246-257.
- Shaw PE.** 1991. Fruits II. En: Volatile compounds in foods and beverages. H. Maarse (Eds), Marcel Dekker. Inc. New York.

- Shaw PE y Wilson CW.** 1981. Importance of nootkatone to the aroma of grapefruit oil and the flavour of grapefruit juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 29(3): 677-679.
- Shi JX, Goldschmidt EE, Goren R, Porat R.** 2007. Molecular, biochemical and anatomical factors governing ethanol fermentation metabolism and accumulation of off-flavors in mandarins and grapefruit. *Postharvest Biology and Technology*. 46(3): 242–251.
- Shimada T, Endo T, Fujii H, Hara M, Ueda T, Kita M, Omura M.** 2004. Molecular cloning and functional characterization of four monoterpene synthase genes from *Citrus unshiu* Marc. *Plant Science*. 166(1): 49-58.
- Shimada T, Endo T, Fujii H, Omura M.** 2005a. Isolation and characterization of a new d-limonene synthase gene with a different expression pattern in *Citrus unshiu* Marc. *Scientia Horticulturae*. 105(4): 507–512.
- Shimada T, Endo T, Fujii H, Hara M, Omura M.** 2005b. Isolation and characterization of (E)-beta-ocimene and 1,8 cineole synthases in *Citrus unshiu* Marc. *Plant Science*. 168(4): 987-995.
- Simkin A, Schwartz S, Auldrige M, Taylor M, Klee H.** 2004. The tomato CCD1 (Carotenoid Cleavage Dioxigenase 1) genes contribute to the formation of the flavour volatiles ionone, pseudoionone and geranylacetone. *Plant Journal*. 40:882-892.
- Soler J.** 1999. Reconocimiento de variedades de cítricos en campo. Generalitat Valenciana. Conselleria de Agricultura, Pesca y Alimentación.
- Stewart I y Wheaton TA.** 1972. Carotenoids in citrus: their accumulation induced by ethylene. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 20(2):448–449.
- Stewart I y Leuenberger U.** 1976. Citrus color. *Alimenta*. 15:33-36.
- Sugiura M, Ito S, Saito Y, Niwa Y, Koltunow AM, Sugimoto O, Sakai H.** 2011. Molecular cloning and characterization of a linalool synthase from Lemon Myrtle. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 75(7): 1245-1248.
- Tadeo F, Moya JL, Iglesias D, Talón M, Primo-Millo E.** 2003. Histología y citología de cítricos. Generalitat Valenciana, IVIA. Valencia.
- Tadeo F, Cerco M, Colmenero-Flores JM, Iglesias DJ, Naranjo MA, Rios G, Carrera E, Ruiz-Rivero O, Lliso I, Morillon L, Ollitrault P, Talon M.** 2008. Molecular physiology of development and quality of citrus. *Advances in Botanical Research*. 47: 147-223.
- Takita MA, Berger JI, Basílio-Palmieri1 AC, Borges KM, de Souza JM, Targon M.** 2007. Terpene production in the peel of sweet orange fruits. *Genetics and Molecular Biology*. 30(3): 841-847.
- Tarchevsky IA.** 2001. Pathogen-induced plant proteins (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*. 37: 441-455.
- Tholl D.** 2006. Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. *Current Opinion in Plant Biology*. 9(3): 297-304.
- Thomson WW, Platt-Aloia KA, Endress AG.** 1976. Ultrastructure of oil gland development in the leaf of *Citrus sinensis*. *Botanical Gazette*. 137: 330-340.
- Tieman D, Ziegler M, Schmelz E, Taylor MG, Rushing S, Jones JB, Klee HJ.** 2010. Functional analysis of a tomato salicylic acid methyl transferase and its role in synthesis of the flavor volatile methyl salicylate. *Plant Journal*. 62(1): 113-123.
- Tietel Z, Lewinsohn E, Fallik E, Porat R.** 2012. Importance of storage temperatures in maintaining flavour and quality of mandarins. *Postharvest Biology and Technology* 64(1): 175-182.
- Tomas AO, Garcia-Puig D, Sabater F, Porrás I, Garcia-Lidon A, Del Rio JA.** 1993. Influence of ethylene and ethephon on the sesquiterpene nootkatone production in *Citrus paradise*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 41: 1566–1569.
- Tscharntke T, Thiessen S, Dolch R, Boland W.** 2001. Herbivory, induced resistance and interplant signal transfer in *Alnus glutinosa*. *Biochemical Systematic and Ecology*. 29(10): 1025-1047.
- Turner GW, Berry AM, Gifford EM.** 1998. Schizogenous secretory cavities of *Citrus limon* (L.) Burm. F. and a reevaluation of the lysigenous gland concept. *International Journal of Plant Sciences*. 159(1): 75–88.

- Tuset JJ.** 1987. Podredumbres de los frutos cítricos. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Conselleria de Agricultura y Pesca de la Generalitat Valenciana.
- Unsicker SB, Kunert G, Gershenzon J.** 2009. Protective perfumes: the role of vegetative volatiles in plant defense against herbivores. *Current Opinion in Plant Biology*. 12(4): 479–485.
- Vallat A, Gu H, Dorn S.** 2005. How rainfall, relative humidity and temperature influence volatile emissions from apple trees in situ. *Phytochemistry*. 66(13): 1540–1550.
- van Schie CCN, Haring MA, Schuurink C.** 2007. Tomato linalool synthase is induced in trichomes by jasmonic acid. *Plant Molecular Biology*. 64(3): 251–263.
- Vogel JT, Tieman DM, Sims CA, Odabasi AZ, Clark DG y Klee HJ.** 2010. Carotenoid content impacts flavour acceptability in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Journal Science Food Agriculture*. 90(13): 2233–2240.
- Voo SS, Grimes HD, Lange MB.** 2012. Assessing the biosynthetic capabilities of secretory glands in citrus peel. *Plant Physiology*. 159(1): 81–94.
- Waché Y, Bosser-DeRatuld A, Lhuguenot JC, Belin JM.** 2003. Effect of cis/trans isomerism of β -carotene on the ratios of volatile compounds produced during oxidative degradation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51(7): 1984–1987.
- Walter MH, Floss DS, Strack D.** 2010. Apocarotenoids: Hormones, mycorrhizal metabolites and aroma volatiles. *Planta*. 232(1): 1–17.
- Watkins CB, Barden CL, Bramlage WJ.** 1993. Relationships among α -farnesene, conjugated trienes and ethylene production with superficial scald development in apples. *Acta Horticulturae*. 343: 155–160.
- Watkins CB.** 2002. Ethylene synthesis, mode of action, consequences and control. En: *Fruit Quality and its physiological basis*. M. Knee (eds). Sheffield Academic Press Ltd, Sheffield, pp 180–224.
- Watkins CB.** 2006. The use of 1-MCP (1-methylcyclopropene) on fruits and vegetables. *Biotechnologies Advances*. 24(4): 389–409.
- Webber HJ.** 1967. History and development of the citrus industry. In: Reuther W, Webber, HJ, Batchelor, LD (eds) *The citrus industry*, vol 1. University of California Press, Berkeley, pp 1–39.
- Weiss EA.** 1997. *Essential oils crops*. Wallingford, UK, CABI Pub.
- Winterhalter P y Rouseff R.** 2002. Carotenoid derived aroma compounds. *American Chemical Society*. 802: 1–17.
- Wyllie SG, Leach D, Nonhebel H, Lusunzi I.** 1996. Biochemical pathways for the formation of esters in ripening fruit. En: Taylor A y Mottram D (Eds). *Flavour Science, recent developments*. The Royal Society of Chemistry Cambridge.
- Wyllie SG y Fellman J.K.** 2000. Formation of volatile branched chain esters in bananas (*Musa sapientum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48:3493–3496.
- Xu CJ, Fraser PD, Wang WJ, Bramley PM.** 2006. Differences in the carotenoid content of ordinary citrus and lycopene-accumulating mutants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54(15): 5474–5481.
- Xu Q, Chen LL, Ruan X, Chen D, Zhu A, Chen C, Bertrand D, Jiao WB, Hao BH, Lyon MP, Chen J, Gao S, Xing F, Lan H, Chang JW, Ge X, Lei Y, Hu Q, Miao Y, Wang L, Xiao S, Biswas MK, Zeng W, Guo F, Cao H, Yang X, Xu XW, Cheng YJ, Xu J, Li JH, Luo OJ, Tang Z, Guo WW, Kuang Ha, Zhang HY, Roose ML, Nagara N, Deng XX, Ruan Y.** 2013. The draft genome of sweet orange (*Citrus sinensis*). *Nature Genetics*. 45(1):59–68.
- Yahyaoui FEL, Chalermchai WA, Latché A, Hackett R, Grierson D y Pech JC.** 2002. Molecular and biochemical characteristics of a gene encoding an alcohol acyl-transferase involved in the generation of aroma volatile esters during melon ripening. *European Journal Biochemistry*. 269(9): 2359–2366.
- Yamasaki Y, Kunoh H, Yamamoto H, Akimitsu K.** 2007. Biological roles of monoterpenes volatiles derived from rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush) in citrus defense. *Journal of General Plant Pathology*. 73(3): 168–179.

- Yokoyama H y White MJ.** 1967. Carotenoids in the flavedo of Marsh seedless grapefruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 15(4): 693-696.
- Zacarías L, Lafuente MT, Marcos JF, Saladie M, Dupile E.** 2003. Regulation of ethylene biosynthesis during cold storage of the chilling-sensitive Fortune mandarin fruit. *Biology and Biotechnology of the Plant Hormone Ethylene*. Vendrel M., Dlee, H., Pech, J.C y Romojaro, F. (Eds), IOS Press Amsterdam. pp: 112-117.

APLICACIONES ON LINE Y PÁGINAS WEB

<http://www.citrusvariety.ucr.edu/citrus/ortanique.html>

faostat3.fao.org

<http://www.agricultura.gva.es/documents>

CitEST Database: <http://citest.centrodecitricultura.br/>.

CFGP: <http://bioinfo.ibmcp.upv.es/genomics/cfgDB/>

Harvest: <http://harvest.ucr.edu/>

National Center for Biotechnology Information (NCBI): [http:// www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

Phytozome: www.phytozome.org

REST: <http://www.REST.de.com>

Scopus: <http://www.scopus.com>

ANEXOS

Tabla I. Rango de concentraciones utilizadas para la preparación de las curvas de calibrado y ecuaciones de las rectas obtenidas para la cuantificación de la emisión de CV. a: Rango de concentración: μg de CV depositados sobre el papel de filtro

Volátiles	Rango de concentración ^a	Ecuación recta de calibrado
<i>Pineno</i>	0,05-200	Area x 1000=1,025E+07 x ng $r^2=0,994$
<i>Limoneno</i>	0,125-500	Area x 1000=1,900E+07 x ng $r^2=0,995$
<i>Ocimeno</i>	0,05-200	Area x 1000=7,896E+06 x ng $r^2=0,993$
<i>6-metil-5-hepten-2-ona</i>	0,0025-10	Area x 1000=5,539E+06 x ng $r^2=0,998$
<i>Nonanal</i>	0,0025-10	Area x 1000=1,322E+07 x ng $r^2=0,994$
<i>Hexil butanoato</i>	0,025-100	Area x 1000=1,137E+08 x ng $r^2=0,994$
<i>Etil caprilato</i>	0,025-100	Area x 1000=5,383E+07 x ng $r^2=0,997$
<i>Citronelal</i>	0,00625-25	Area x 1000=1,210E+07 x ng $r^2=0,996$
<i>Decanal</i>	0,0025-10	Area x 1000=2,550E+07 x ng $r^2=0,996$
<i>Linalol</i>	0,0025-10	Area x 1000=3,519E+07 x ng $r^2=0,996$
<i>1-octanol</i>	0,0025-10	Area x 1000=1,026E+07 x ng $r^2=0,999$
<i>Trans cariofileno</i>	0,05-200	Area x 1000=7,072E+07 x ng $r^2=0,998$
<i>Hexil hexanoato</i>	0,025-100	Area x 1000=5,965E+07 x ng $r^2=0,999$
α -Humuleno	0,05-200	Area x 1000=7,819E+07 x ng $r^2=0,998$
<i>Citral</i>	0,0025-10	Area x 1000=8,236E+07 x ng $r^2=0,999$
<i>L-α-Terpineol</i>	0,00625-25	Area x 1000=3,849E+07 x ng $r^2=0,999$
<i>Valenceno</i>	0,05-200	Area x 1000=7,992E+07 x ng $r^2=0,999$
<i>Geraniol acetato</i>	0,0025-10	Area x 1000=9,496E+07 x ng $r^2=0,998$
β -Citronelol	0,00625-25	Area x 1000=1,623E+07 x ng $r^2=0,996$
<i>Nerol</i>	0,00625-25	Area x 1000=5,554E+07 x ng $r^2=0,985$
<i>Geranil acetona</i>	0,0025-10	Area x 1000=3,837E+07 x ng $r^2=0,997$
<i>Geraniol</i>	0,00625-25	Area x 1000=8,369E+06 x ng $r^2=0,999$
β -ionona	0,025-10	Area x 1000=6,587E+07 x ng $r^2=0,989$
<i>Farneseno</i>	0,0025-10	Area x 1000=7,255E+06 x ng $r^2=0,999$
β -Ciclocitral	0,0025-10	Area x 1000=2,935E+07 x ng $r^2=0,999$

Tabla II. Rango de concentraciones utilizadas para la preparación de curvas de calibrado y ecuaciones de las rectas obtenidas para la cuantificación del contenido de CV. a: Rango de concentración: μg CV inyectados en el CG-MS.

Volátiles	Rango de concentración^a	Ecuación recta de calibrado
<i>Pineno</i>	0,0075-0,12	Areax1000=1,353E+10 x ng $r^2=0,999$
<i>Limoneno</i>	0,01-1,6	Areax1000=2,040E+10 x ng $r^2=0,998$
<i>Ocimeno</i>	0,0075-0,12	Areax1000=9,255E+09 x ng $r^2=0,999$
<i>Cis-3-hexen-1-ol</i>	0,001-0,16	Areax1000=1,538E+10 x ng $r^2=0,999$
<i>6-metil-5-hepten-2-ona</i>	0,001-0,16	Areax1000=1,542E+10 x ng $r^2=0,999$
<i>Nonanal</i>	0,001-0,16	Areax1000=1,264E+10 x ng $r^2=0,999$
<i>Butil hexanoato</i>	0,001-0,16	Areax1000=1,730E+10 x ng $r^2=0,999$
<i>Hexil butanoato</i>	0,001-0,16	Areax1000=1,570E+10 x ng $r^2=0,999$
<i>Etil capriato</i>	0,001-0,16	Areax1000=3,106E+10 x ng $r^2=0,999$
<i>Citronelal</i>	0,0037-0,60	Areax1000=2,017E+10 x ng $r^2=0,999$
<i>Decanal</i>	0,001-0,16	Areax1000=2,764E+10 x ng $r^2=0,999$
<i>Linalol</i>	0,001-0,16	Areax1000=2,560E+10 x ng $r^2=0,999$
<i>1-Octanol</i>	0,001-0,16	Areax1000=2,213E+10 x ng $r^2=0,999$
<i>Trans cariofileno</i>	0,003-0,50	Areax1000=2,499E+10 x ng $r^2=0,999$
<i>Hexil hexanoato</i>	0,001-0,16	Areax1000=2,512E+10 x ng $r^2=0,999$
<i>β-Ciclocitral</i>	0,001-0,16	Areax1000=2,512E+10 x ng $r^2=0,999$
<i>α-Humulene</i>	0,003-0,50	Areax1000=3,021E+10 x ng $r^2=0,999$
<i>Citral</i>	0,001-0,16	Areax1000=4,327E+10 x ng $r^2=0,999$
<i>α-Terpineol</i>	0,0018-0,30	Areax1000=1,284E+10 x ng $r^2=0,999$
<i>Valenceno</i>	0,005-0,80	Areax1000=3,039E+10 x ng $r^2=0,999$
<i>Geraniol acetato</i>	0,001-0,16	Areax1000=2,038E+10 x ng $r^2=0,999$
<i>β-Citronelol</i>	0,0037-0,60	Areax1000=1,576E+10 x ng $r^2=0,999$
<i>Nerol</i>	0,0037-0,60	Areax1000=2,070E+10 x ng $r^2=0,999$
<i>Geraniol</i>	0,0037-0,60	Areax1000=1,940E+10 x ng $r^2=0,999$
<i>Geranil acetona</i>	0,001-0,16	Areax1000=2,625E+10 x ng $r^2=0,999$
<i>β-ionona</i>	0,001-0,16	Areax1000=3,787E+10 x ng $r^2=0,999$
<i>Farneseno</i>	0,001-0,16	Areax1000=2,199E+09 x ng $r^2=0,999$

Tabla III: Características espectroscópicas de los carotenoides más relevantes identificados. a: Longitud de onda máxima, b: % III/II de cada carotenoide, establecido por Britton et al. (1995), c: Identificado de forma tentativa

Carotenoide	Observado		Literatura		Referencias
	λ_{max} (nm) ^a	%III/II ^b	λ_{max} (nm) ^a	%III/II ^b	
<i>E-Violaxantina</i>	411, 437, 468	92	416, 438, 467	87	Britton, 1995
β -Citaurina	458	0	456	0	Malachi, 1974
(9Z)-Violaxantina	cis326, 410, 434, 463	95	cis326, 416, 440, 463	98	
<i>Luteoxantina</i> ^c	393, 416, 442	90	397, 419, 445	62	Lee, 2001
<i>Luteína</i>	418, 444, 472	65	421, 445, 474	60	Britton, 1995
<i>Zeaxantina</i>	430, 450, 478	35	428, 450, 478	26	Britton, 1995
<i>Anteraxantina</i> ^c	440, 467	58	422, 444, 472	55	Britton, 1995
<i>Mutatoxantina</i> ^c	424, 448	74	409, 427, 457	50	Britton, 1995
α -Criptoxantina	419, 445, 473	72	421, 445, 475	60	Britton, 1995
<i>Fitoeno</i>	283, 285, 300	10	276, 286, 297	10	Britton, 1995
<i>Fitoflueno</i>	331, 346, 364	91	331, 348, 367	90	Britton, 1995
β -Criptoxantina	423, 450, 479	30	428, 450, 478	27	Britton, 1995
β -Caroteno	426, 451, 478	31	425, 450, 477	25	Britton, 1995
α -Caroteno	cis295, 376, 397, 423	75	cis296, 374, 395, 41	71	Cunnigham, 1985
ζ -Caroteno	cis295, 376, 397, 423	75	cis296, 374, 395, 4	71	Cunnigham, 1985
<i>Licopeno</i>	445,472,502	73	444,470,502	65	Britton, 1995

Tabla IV: Ecuaciones de las rectas de calibrado utilizadas para la cuantificación de carotenoides

Carotenoide	Recta de calibrado
<i>Fitoeno</i>	$\mu\text{g}=3,73158 \cdot 10^{-7}$ Area $r^2=0,9944$
<i>Fitoflueno</i>	$\mu\text{g}=1,79116 \cdot 10^{-7}$ Area $r^2=0,9944$
<i>Licopeno</i>	$\mu\text{g}=8,99645 \cdot 10^{-8}$ Area $r^2=0,9963$
β -Caroteno	$\mu\text{g}=8,34097 \cdot 10^{-8}$ Area $r^2=0,9922$
β -Criptoxantina	$\mu\text{g}=1,21613 \cdot 10^{-7}$ Area $r^2=0,9866$
<i>Luteína</i>	$\mu\text{g}=8,24810 \cdot 10^{-8}$ Area $r^2=0,9900$
<i>Zeaxantina</i>	$\mu\text{g}=1,13798 \cdot 10^{-7}$ Area $r^2=0,9811$

Tabla V: Resultados obtenidos de las curvas de calibrado para cada uno de los genes estudiados. a: T_m: (Temperatura de "melting"): Temperatura a la cual el 50% de las bases nitrogenadas de un DNA se encuentran apareadas con las bases de la otra cadena formando parte de la doble hélice, mientras que el otro 50% de las bases está desapareado. b: T_h: Temperatura de hibridación utilizada durante la reacciones de PCR

GEN	T _m ^a	T _h ^b
<i>LIN</i>	79,0	60
<i>VAL</i>	77,0	60
<i>LIMI</i>	79,0	60
<i>LIM2</i>	75,5	60
β <i>PIN</i>	76,5	60
<i>OCI</i>	75,5	60
<i>TPS3</i>	74,0	57
<i>Cs AAT</i>	79,0	55

Tabla VI: Tiempo de retención e índice de retención (LRI o índice de retención de Kovats) de los CV identificados en frutos de Clemenules, Ortanique y Navelate durante el desarrollo y la maduración en las condiciones cromatográficas descritas en la sección de Material y Métodos. El LRI se calculó a partir del tiempo de retención (RT) de la serie homóloga de n alcanos (C11-C28) en una columna Innowax (Agilent) en los que la representación del logaritmo del RT ajustado frente al número de átomos de carbono se obtiene una gráfica lineal en la que se pueden interpolar los RT del compuesto deseado para deducir su LRI.

RT	Compuesto	LRI	RT	Compuesto	LRI
4,35	α -Pino	824	21,90	α -Humuleno	1735
6,30	Hexanal	947	22,06	Citronelol acetato	1745
7,09	Sabineno	989	22,15	β -Farneseno	1750
8,30	3-Careno	1047	22,15	ρ -Selineno	1750
8,36	Geraniol formato	1050	22,30	Neral	1759
8,58	β -Pino	1060	22,37	δ -Cadineno	1763
8,63	β -Mirceno	1063	22,52	δ -Selineno	1772
9,66	Limoneno	1109	22,57	α -Terpenol acetato	1775
10,25	ρ -Terpineno	1136	22,65	Carotol	1780
10,32	2-Hexenal	1139	22,66	L- α -Terpineol	1781
11,09	Etil caproato	1174	22,67	Dodecanal	1782
11,40	Cis Ocimeno	1188	22,70	δ -Guaieno	1783
12,07	α -Terpinoleno	1218	22,71	ρ -Gurjuneno	1784
12,57	Octanal	1242	22,71	Farnesil acetato	1784
12,96	2,6-dimetil-1,3,5,7-octatetraeno	1260	22,73	Decil acetato	1785
13,00	4,8-dimetil nonatrieno	1262	22,77	β -Chamigreno	1788
13,40	6-metil-5-hepten-2-ona	1281	22,91	Germacreno D	1796
15,00	3-Cis-hexene-1-ol	1359	23,16	Valenceno	1812
15,20	Nonanal	1369	23,17	α -Muroleno	1812
15,45	Cis epoxi ocimeno	1381	23,24	α -Selineno	1817
15,94	Timol	1406	23,32	Biciclogermacreno	1822
16,10	Hexil butanoato	1414	23,34	Trans carvol acetato	1823
16,45	Cis-Limoneno oxido	1432	23,46	Piperitenona	1831
16,75	Trans limoneno Oxido	1448	23,50	Geranial	1833
16,76	Etil Octanoato	1448	24,08	ρ -Cadineno	1870
16,79	Trans sabineno hidrato	1450	24,21	Nerol acetato	1878
16,90	6-metil-5-hepten-2-ol	1456	24,30	β -Citronelol	1884
17,19	δ -Elemeno	1471	24,50	2-Undecanol	1897
17,22	1-Heptanol	1473	24,56	Perilla aldehído	1901
17,53	β -Terpenol acetato	1489	24,70	Cis-p-ment-1-(7)-8-diene-2-ol	1910
17,59	Citronelal	1492	24,85	ρ -isogeraniol	1920
17,70	α -Copaeno	1498	25,10	Nerol	1937
18,10	Decanal	1520	25,14	Trans trans 2,4-decadienal	1939
18,36	Sativen	1534	25,26	2,4-Decadienal	1947
18,56	2-Heptenal	1544	25,30	Dendrolasin	1950
18,60	2-Nonenal	1547	25,40	Butil octanoato	1957
18,85	α -Cubebeno	1560	25,50	Isopiperitenona	1963
19,00	4-acetil-1-metilciclohexano	1569	25,95	Geranil acetona	1994
19,40	Linalol	1591	26,14	Geraniol	2007
19,45	Zingibereno	1594	26,20	Octil butirato	2011
19,59	1-Decanol	1601	26,27	Limonen-10-ol-acetato	2016
19,65	1-Octanol	1605	26,32	2-Dodecenal	2020
19,70	β -Cubebeno	1608	26,58	Trans-2,6-nonadienal	2038
19,78	Isocarofileno	1612	27,14	1-Octil acetato	2077
19,88	β -Elemeno	1618	27,70	Dodecenil acetato	2117
19,98	Hexil hexanoato	1623	27,99	Cariofileno oxido	2138
20,20	Epi bicicloesquifelandreno	1636	28,40	Perilla alcohol	2168
20,32	Trans cariofileno	1643	28,86	4-Careno	2202
20,50	4-Terpeneol	1653	28,90	Nerolidol	2205
20,56	β -Ciclocitral	1656	29,28	α -Bisabolol	2233
20,65	Linalol acetato	1662	29,57	Cedrol	2254
20,85	Carvomentenal	1673	29,66	β -Terpineol	2261
20,87	Cis-p-menta-2,8-dienol	1674	29,81	Farnesol	2272
21,02	Dihidrocarvona	1683	29,91	Elemol	2280
21,03	ρ -Elemeno	1684	30,07	Verdiflorol	2292
21,10	Butil butirato	1688	30,15	α -Cadinol	2297
21,10	β -Sesquifelandreno	1688	30,30	Juniper camfor	2308
21,20	Trans-p-menta-2,8-dienol	1694	30,31	β -Sinensal	2309
21,29	Aromadendreno	1699	30,46	Trans trans farnesal	2320
21,49	Trans- α -Bisaboleno	1711	30,60	Dihidrometil jasmonato	2331
21,57	β -Selineno	1715	30,65	α -Farneseno	2334
21,77	Trans 2 decenal	1727	31,05	α -Sinensal	2363

