

VNIVERSITAT Đ VALÈNCIA



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

## “Caracterización Bioquímica y Molecular de la Carotenogénesis en Frutos Cítricos”

Directores

Dr. Lorenzo Zacarías García

Dra. M. Jesús Rodrigo Esteve

Trabajo presentado por Berta Alquézar García  
para optar al grado de Doctor por la Universidad de Valencia





CONSEJO SUPERIOR  
DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS

INSTITUTO DE AGROQUÍMICA Y  
TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

D. Lorenzo Zacarías García, Doctor en Ciencias Biológicas e Investigador Científico, y Dña. M<sup>a</sup> Jesús Rodrigo, 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 D<sup>a</sup>. Berta Alquézar García, Ingeniero Agrónomo por la Universidad Politécnica de Valencia, ha realizado bajo su dirección el trabajo que, con el título “Caracterización Bioquímica y Molecular de la Cartotenogénesis en Frutos Cítricos”, presenta para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Burjassot, a 5 de Julio de 2007.

Dr. Lorenzo Zacarías García

Dra. M. Jesús Rodrigo Esteve



VNIVERSITATID VALÈNCIA



La Doctora D<sup>a</sup>. M. José Ocio Zapata, Profesor Titular de la Universidad de Valencia:

CERTIFICA: Que D<sup>a</sup>. Berta Alquézar García, Ingeniero Agrónomo por la Universidad Politécnica de Valencia ha realizado bajo su tutela el trabajo que, con el título “Caracterización Bioquímica y Molecular de la Cartotenogénesis en Frutos Cítricos”, presenta para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Burjassot, a 5 de Julio de 2007.

Dra. M. José Ocio Zapata



A mis padres  
y a Arturo



## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quisiera mencionar a mis directores: Lorenzo Zacarías y M. Jesús Rodrigo, porque sin ellos esta Tesis no hubiera sido posible. Por todo, por la oportunidad que me dieron, por toda su ayuda en este tiempo y por todo lo que me han enseñado. Si esto fueran `los Oscar´ diría `Esta Tesis no es sólo mía, es de todos´.

También me gustaría agradecerse a los `otros jefes´ del grupo de postcosecha: Teresa Lafuente, Luis González y Jose F. Marcos. Por que siempre que he tenido una duda han tenido la puerta abierta. Y como no, a las `técnicos´ del grupo: Lolita, Amparo, M. José y Ana I., por ser como sois, por animar las mañanas y por dejarme vuestras cositas para trabajar. Amparo, gracias por tu ayuda con las extracciones de carotenoides y por compartir los momentos `el primer café del día´. A los `becarios´, Lourdes, Ana R., Beatriz, Alberto, Mario, Santi, Aníbal y a Belén. Por compartir reactivos, horas, cafés y cigarritos después de comer. Y también a toda esa gente que ahora no está, pero que estuvo, Natalia, Bea, Yolanda, Ana V, Pepa... A todos ellos porque han hecho agradable y muchísimas veces divertida mi estancia en el IATA y, por todos sus consejos y experiencias compartidas, científicas y no tan científicas. Me llevo de aquí, además de una Tesis, buenos amigos y muy buenos recuerdos.

Y sin salir del IATA, a todo ese montón de gente que también me ha ayudado muchísimo: los del almacén, los de informática (que hay que ver todas las cosas raras que me han pasado en estos años), los de seguridad (por recibirnos a cualquier hora con un hola y una sonrisa), los de mantenimiento y la gente de administración. Y a toda esa gente del Instituto que me ha enseñado, prestado material y/o aparatos, dado conversación y consejos y ayudado a pasar muchos ratos...También a Eugenio Grau y a Ana, secuenciais como Dios, gracias por tener siempre un huequito urgente para mis niñas.

Quisiera agradecer al Dr. Luis Navarro el posibilitarme la recolección de material vegetal del Banco de Germoplasma del I.V.I.A. y, al Dr. Jose Luis Navarro el haberme cedido algunos de los árboles de su finca de Liria para la realización de experimentos y la recolección de frutos. También al Dr. Misawa, del Instituto de Biotecnología Marina de Iwate (Japón) por la cesión del plásmido pACCRT-EIB. Sin ellos, esta Tesis, tampoco hubiera sido posible. Y por último a Chema Colmenero y a Javi Brumós del I.V.I.A. por cederme RNA de raíces.

Y más allá de la Tesis, a mis amigos. A todos, por la paciencia, por los ánimos, por los ratos, por las risas...Zulema, Isa, Eva, Noe, Jaume, Pok, Susana (felicidades por Carmen!), Javi, Carlos, Vanessa, Celia, Estela... Graccie mille!

A mi familia, por estar siempre ahí. Por ayudarme, por apoyarme, por animarme, por aguantarme, por ser como sois. Papa, Mama: lo conseguí, aquí está: `La Tesis´. A mis sobrinos, por ser capaces siempre siempre siempre de alegrarme el día.

Y, por supuesto, Arturo. Ya lo sabes, y se que lo sabes. Pero que conste en acta...

# ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	1
<hr/>	
1. Carotenoides: conceptos generales	1
1.1. Estructura y clasificación	1
1.2. Propiedades físicas	1
2. Importancia de los carotenoides	3
2.1. Funciones biológicas	3
2.2. Importancia nutricional	4
2.3. Aplicaciones industriales	5
3. Carotenoides en frutos y vegetales	6
4. Biosíntesis de carotenoides en plantas superiores	12
4.1. Síntesis de precursores	14
4.2. Síntesis de carotenos	15
a) Formación de fitoeno a partir de IPP y DMAPP	15
b) Reacciones de desaturación	17
c) Reacciones de ciclación	19
4.3. Síntesis de xantofilas	20
4.4. Síntesis de apocarotenoides	22
5. Regulación de la síntesis y acumulación de carotenoides en frutos	22
5.1. Almacenamiento de carotenoides en frutos	23
5.2. Regulación transcripcional de la carotenogénesis en frutos	24
5.3. Otros factores que afectan la carotenogénesis en frutos	28
5.4. Catabolismo de carotenoides	31
6. Frutos cítricos	31
6.1. Origen	31
6.2. Desarrollo y maduración de los frutos cítricos	32
6.3. Carotenoides en los frutos cítricos	33
a) Pomelos ( <i>Citrus paradisi</i> )	35
b) Naranjas ( <i>Citrus sinensis</i> )	37
c) Mandarinas e híbridos de mandarina	38
6.4. Regulación de la biosíntesis de carotenoides en frutos cítricos	43
OBJETIVOS	45
<hr/>	

<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>49</b>
<hr/>	
1. Material vegetal	51
1.1. Frutos cítricos	51
a) Naranjas ( <i>Citrus sinensis</i> , L. Osbeck)	51
b) Pomelos ( <i>Citrus paradisi</i> , Macf.)	51
c) Mandarinas e híbridos de mandarinas	51
1.2. Toma de muestra de material vegetal	52
a) Frutos	52
b) Hojas, tallos, raíces y pétalos.	53
2. Estimación del índice de color	53
3. Cepas bacterianas, plásmidos y medios de cultivo	53
3.1. Cepas bacterianas	53
3.2. Plásmidos	54
3.3. Medios de cultivo	54
4. Reacciones de ligación	55
4.1. Ligación de productos de PCR	55
4.2. Ligación de productos de digestión	55
5. Transformación de <i>E. coli</i>	56
5.1. Electroporación	56
5.2. Quimioporación con CaCl <sub>2</sub>	57
6. Extracción y purificación de ácidos nucleicos	57
6.1. Aislamiento y purificación de DNA plasmídico de <i>E. coli</i>	57
6.2. Extracción de DNA genómico	58
a) Para análisis Southern	58
b) Para análisis de SNPs (‘single nucleotide polymorphism’)	58
6.3. Extracción y purificación de RNA total	59
7. Análisis Northern	59
8. Análisis Southern	60
9. Marcaje de las sondas	60
10. Hibridaciones, lavados y exposiciones	63
11. Síntesis de cDNA	63
12. Reacciones de amplificación de DNA (PCR)	64
13. Aislamiento de genes que codifican licopeno ciclasas (LCYs) en cítricos	64
13.1. Aislamiento y clonación de cDNAs correspondientes a $\beta$ -LCYs	64

13.2. Aislamiento y clonación de cDNAs correspondientes a $\epsilon$ -LCY	66
a) Obtención de un clon parcial de $\epsilon$ -LCY	66
b) Amplificación del extremo 5' de $\epsilon$ -LCY mediante RACE 5'	67
c) Amplificación y clonación del cDNA que contiene la región codificante correspondiente a $\epsilon$ -LCY	69
14. Aislamiento del promotor de <i>Cs<math>\beta</math>-LCY2</i>	69
15. Determinación de actividad licopeno ciclasa	70
16. Extracción y cuantificación de pigmentos	71
16.1. Extracción y cuantificación de clorofilas y carotenoides totales de material vegetal.	71
16.2. Extracción de carotenoides de cultivos bacterianos	72
17. Identificación y cuantificación de carotenoides mediante HPLC-PDA	73
18. Secuenciación de DNA y análisis de secuencias	74
19. Programas informáticos	75
<b>RESULTADOS</b>	<b>77</b>
<hr/>	
<b>CAPÍTULO I `AISLAMIENTO, EXPRESIÓN Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LICOPENO CICLASAS (LCYs) DE FRUTOS CÍTRICOS´</b>	<b>79</b>
<hr/>	
1. Aislamiento y caracterización funcional de genes $\beta$ -licopeno ciclasa ( $\beta$ -LCYs) de frutos de naranja `Navel´ ( <i>C. sinensis</i> )	80
1.1. Aislamiento de cDNAs correspondientes a $\beta$ -LCYs de naranja `Navel´ y análisis de las secuencias	80
1.2. Estudio de la expresión de los genes <i>Cs<math>\beta</math>-LCY1</i> y <i>Cs<math>\beta</math>-LCY2</i> en el flavedo y la pulpa de la naranja `Navel´, durante el desarrollo y la maduración de los frutos, y en otros tejidos	85
1.3. Análisis Southern de <i>Cs<math>\beta</math>-LCY1</i> y <i>Cs<math>\beta</math>-LCY2</i>	87
1.4. Caracterización funcional de $\beta$ -LCY1 y $\beta$ -LCY2 de naranja `Navel´	88
2. Aislamiento y caracterización funcional de una $\epsilon$ -licopeno ciclasa ( $\epsilon$ -LCY) de naranja `Navel´	90
2.1. Aislamiento del cDNA correspondiente al gen $\epsilon$ -LCY de naranja `Navel´ y análisis de su secuencia	90

2.2. Caracterización funcional de $\epsilon$ -LCY de naranja `Navel´	94
3. Aislamiento y caracterización funcional de genes $\beta$ -LCYs de la naranja `Cara Cara´ y de los pomelos Marsh y `Star Ruby´	95
3.1. Aislamiento de cDNAs correspondientes a $\beta$ -LCY1 y caracterización funcional de los mismos	96
3.2. Aislamiento y caracterización funcional de cDNAs correspondientes a $\beta$ -LCY2	97
4. Análisis de la secuencia del gen $\beta$ -LCY2 de naranja ( <i>Citrus sinensis</i> ) y pomelo ( <i>Citrus paradisi</i> )	100
4.1. Análisis de los transcritos de $\beta$ -LCY2 en <i>Citrus sinensis</i> ( $\beta$ -LCY2a) y <i>Citrus paradisi</i> ( $\beta$ -LCY2b)	101
4.2. Estudio `in silico´ de la expresión de $\beta$ -LCY2 en diferentes tejidos y especies de frutos cítricos	103
4.3. Estudio de la región promotora del gen $\beta$ -LCY2	106
<b>CAPÍTULO II `CARACTERIZACIÓN DE LA BIOSÍNTESIS Y ACUMULACIÓN DE CAROTENOIDES EN DISTINTAS ESPECIES Y VARIEDADES DE FRUTOS CÍTRICOS´</b>	<b>109</b>
<hr/>	
1. Caracterización de la biosíntesis y acumulación de carotenoides durante la maduración de frutos de la naranja ( <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck) `Navel´ y del mutante `Cara Cara´	109
1.1. Evolución del tamaño, del color y del contenido de clorofilas y carotenoides en el flavedo y la pulpa de frutos de las naranjas `Navel´ y `Cara Cara´ durante el desarrollo y la maduración	109
1.2. Composición de carotenoides en el flavedo y la pulpa de frutos de las naranjas `Navel´ y `Cara Cara´ durante el desarrollo y maduración	115
1.3. Contenido de clorofilas y carotenoides en hojas de los naranjos `Navel´ y `Cara Cara´	119
1.4. Análisis de la expresión de los genes de la biosíntesis de carotenoides en el flavedo y la pulpa de frutos de la naranja `Navel´ y del mutante `Cara Cara´ durante el desarrollo y la maduración	120

1.5. Comparación de los niveles de expresión de genes de la biosíntesis de IPP plastídico y de carotenoides en el flavedo y la pulpa de frutos de la naranja `Navel´ y el mutante `Cara Cara´	123
2. Estudio comparativo de la acumulación de carotenoides y de la expresión de genes de su biosíntesis durante el desarrollo y la maduración de frutos de pomelo ( <i>Citrus paradisi</i> Macf.) blanco `Marsh´ y el mutante pigmentado `Star Ruby´	127
2.1. Evolución del tamaño, del color y del contenido de clorofilas y carotenoides del flavedo y la pulpa de frutos de los pomelos `Marsh´ y `Star Ruby´ durante el desarrollo y la maduración	128
2.2. Composición de carotenoides en el flavedo y la pulpa de frutos de los pomelos `Marsh´ y `Star Ruby´ durante el desarrollo y la maduración	133
2.3. Contenido de clorofilas y carotenoides en hojas de los pomelos `Marsh´ y `Star Ruby´	136
2.4. Análisis de la expresión de genes de la biosíntesis de carotenoides en el flavedo y la pulpa de frutos de los pomelos `Marsh´ y `Star Ruby´ durante el desarrollo y la maduración	138
2.5. Influencia de la luz en la coloración del flavedo de frutos de pomelo `Star Ruby´	142
a) Influencia de la localización del fruto en el árbol y del recubrimiento sobre la coloración externa del pomelo `Star Ruby´	143
b) Efecto de la posición de los frutos de `Star Ruby´ en el árbol y de su recubrimiento en la evolución de la composición de carotenoides del flavedo	144
c) Efecto de la posición de los frutos de `Star Ruby´ en el árbol y de su recubrimiento sobre la expresión de genes de la biosíntesis de carotenoides en el flavedo	146
3. Caracterización de la biosíntesis y acumulación de carotenoides durante la maduración de tres variedades de mandarina	149
3.1. Evolución del color y del contenido de clorofilas y carotenoides en el flavedo y la pulpa de frutos de la mandarina	

`Clemenules´ y de los híbridos `Fortune´ y `Nova´ durante el desarrollo y la maduración	149
3.2. Composición de carotenoides en el flavedo y la pulpa de frutos de la mandarina `Clemenules´ y de los híbridos `Fortune´ y `Nova´ durante el desarrollo y la maduración	153
3.3. Análisis de la expresión de genes de la biosíntesis de carotenoides en el flavedo y la pulpa de frutos de la mandarina `Clemenules´ y de los híbridos `Fortune´ y `Nova´ durante el desarrollo y la maduración	156
a) Análisis de la expresión de genes de la ruta MEP	158
b) Análisis de la expresión de genes implicados en la biosíntesis de carotenos lineales	160
c) Análisis de la expresión de genes implicados en la ciclación del licopeno	162
d) Análisis de la expresión de genes implicados en la biosíntesis de xantofilas	164
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>167</b>
<hr/>	
1. Aislamiento y caracterización funcional de genes correspondientes a licopeno ciclasas de <i>Citrus sinensis</i>	169
2. Relación entre las licopeno ciclasas y la acumulación de licopeno y $\beta,\beta$ -xantofilas en frutos cítricos.	177
3. Origen de $\beta$ - <i>LCY2</i> en frutos cítricos	182
4. Caracterización bioquímica y molecular de la biosíntesis y acumulación de carotenoides en los frutos de la naranja `Cara Cara´	183
5. Caracterización bioquímica y molecular de la biosíntesis y acumulación de carotenoides en frutos de dos variedades de pomelo con distinta pigmentación.	187
5.1. Biosíntesis de carotenoides en frutos del pomelo blanco `Marsh´	187
5.2. Biosíntesis de carotenoides en frutos del pomelo rojo `Star Ruby´	191

6. Caracterización de la biosíntesis y acumulación de carotenoides en frutos de variedades de mandarina e híbridos con distinto grado de pigmentación.	196
7. Bases bioquímicas y moleculares de las diferencias de coloración entre frutos de naranjas y mandarinas	200
a) Bases bioquímicas	200
b) Bases moleculares	201
8. Regulación de la biosíntesis y acumulación de carotenoides en frutos de especies de cítricos con distinto grado de pigmentación	203
a) Genes de la biosíntesis de IPP plastídico en frutos cítricos	203
b) Genes estructurales de la ruta de biosíntesis de carotenoides	206
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>213</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>219</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>247</b>
Anexo I	249
Anexo II	253
Anexo III	255



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Ejemplo de tipos estructurales de carotenoides _____	2
Figura 2: Esquema general de la biosíntesis de carotenoides en plantas _____	13
Figura 3: Esquema general de la biosíntesis de isoprenoides en plantas _____	15
Figura 4: Esquema general de la biosíntesis de fitoeno en plantas _____	17
Figura 5: Esquema general de la biosíntesis de licopeno a partir de fitoeno ____	18
Figura 6: Esquema general de la ciclación del licopeno _____	19
Figura 7: Esquema general de biosíntesis de xantofilas_____	21
Figura 8: Esquema ilustrativo de los complejos multienzimáticos implicados en la biosíntesis de carotenoides. _____	29
Figura 9: Posibles relaciones filogenéticas entre las distintas especies de frutos cítricos _____	32
Figura 10: Esquema general de la estrategia RACE 5' usada para aislar el extremo 5' del gen <i>Csε-LCY</i> _____	67
Figura 11: Posición y secuencia de los cebadores específicos, diseñados sobre un clon parcial de cDNA de <i>Csε-LCY</i> , utilizados para la amplificación del extremo 5' de <i>Csε-LCY</i> . _____	68
Figura 12: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de <i>Csβ-LCY1</i> y <i>Csβ-LCY2</i> _____	82
Figura 13: Predicción de la estructura secundaria de <i>Csβ-LCY1</i> y <i>Csβ-LCY2</i> realizada por el programa PSIPRED _____	83
Figura 14: Árbol filogenético de distintas proteínas β-LCY, NSY y CCS de plantas, generado mediante el método de Neighbor-Joining incluido en el programa DNAMAN y el test de bootstrap (1000 repeticiones) _____	84
Figura 15: Patrón de expresión de <i>Csβ-LCY1</i> y <i>Csβ-LCY2</i> en el flavedo y la pulpa de la naranja 'Navel' ( <i>C. sinensis</i> L. Osbeck) durante el desarrollo y la maduración del fruto _____	85
Figura 16: Expresión de los genes <i>Csβ-LCY1</i> y <i>Csβ-LCY2</i> en distintos tejidos de <i>C. sinensis</i> _____	86
Figura 17: Análisis Southern de DNA genómico de <i>C. sinensis</i> _____	87
Figura 18: Coloración de colonias de <i>E.coli</i> cepa XB-pACC expresando distintos plásmidos _____	88
Figura 19: Cromatogramas MaxPlot de los extractos de carotenoides presentes en cultivos de la cepa de <i>E.coli</i> XB-pACC portadora de los plásmidos pGem-TΦ (A), pGem-lcy1 (B) y pGem-lcy2 (C) _____	90

- Figura 20: Obtención del cDNA de longitud completa correspondiente a *Csε-LCY* \_\_\_\_\_ 91
- Figura 21: Secuencia codificante completa de *Csε-LCY* y su correspondiente secuencia de aminoácidos \_\_\_\_\_ 93
- Figura 22: Cromatogramas MaxPlot de los extractos de carotenoides presentes en cultivos de la cepa de *E.coli* XB-pACC expresando pGem-TΦ (A) y pGem-elcy (B) \_\_\_\_\_ 95
- Figura 23: Esquema indicativo de los cambios de aminoácido identificados entre las secuencias de β-LCY2a (*C. sinensis*) y β-LCY2b (*C.paradisi*) \_\_\_\_\_ 99
- Figura 24: Secuencia de un fragmento (nucleótidos 179 a 215) del gen β-LCY2 de *Citrus sinensis* v. 'Navel' en el que se localizan 5 SNPs \_\_\_\_\_ 101
- Figura 25: Secuencias parciales correspondientes a la amplificación de cDNAs del gen β-LCY2 de pomelos 'Marsh' y 'Star Ruby' y de naranja 'Navel' \_\_\_\_\_ 102
- Figura 26: Aspecto interno y externo de frutos de las naranjas 'Navel' (N) y 'Cara Cara' (CC) en los 10 estadios de desarrollo y maduración recolectados en este estudio \_\_\_\_\_ 110
- Figura 27: Evolución del diámetro del fruto (○), del color de la pulpa (■) y del flavedo (●) de frutos de la naranja 'Navel' (A) y del mutante 'Cara Cara' (D). Evolución del contenido de clorofilas (○) y carotenoides (●) en el flavedo y la pulpa de la naranja 'Navel' (B y C, respectivamente) y del mutante 'Cara Cara' (E y F, respectivamente) durante el desarrollo y la maduración de frutos \_\_\_\_\_ 113
- Figura 28: Composición y contenido de carotenoides del flavedo de frutos de las naranjas 'Navel' y 'Cara Cara', recolectados en la campaña 2003-2004, en cuatro estadios de maduración: VI, Verde-Inmaduro; VM, Verde-Maduro; V, Virando y TC, Totalmente Coloreado \_\_\_\_\_ 116
- Figura 29: Composición y contenido de carotenoides en la pulpa de frutos de las naranjas 'Navel' y 'Cara Cara', recolectados en la campaña 2003-2004, en cuatro estadios de maduración: VI, Verde-Inmaduro; VM, Verde-Maduro; V, Virando y TC, Totalmente Coloreado \_\_\_\_\_ 118
- Figura 30: A, Contenido de clorofilas y carotenoides de hojas adultas de los naranjos 'Navel' y 'Cara Cara' (*C. sinensis* L. Osb.). B, Composición y contenido de carotenoides en hojas de ambas variedades \_\_\_\_\_ 120
- Figura 31: Evolución de los niveles de mRNAs correspondientes a genes implicados en la biosíntesis de carotenoides en el flavedo (A) y la pulpa (B) de

- frutos de las naranjas `Navel´ y `Cara Cara´ durante el desarrollo y maduración del fruto \_\_\_\_\_ 121
- Figura 32: Evolución de los niveles de mRNAs correspondientes a genes implicados en la ruta MEP de biosíntesis de IPP plastídico en el flavedo (F) y la pulpa (P) de frutos de naranjas `Navel´ (●) y `Cara Cara´ (△) en cuatro estadios representativos del proceso de desarrollo y maduración del fruto: VI, VM, V y TC \_\_\_\_\_ 124
- Figura 33: Evolución de los niveles de mRNAs correspondientes a los genes implicados en la biosíntesis de carotenoides en el flavedo (F) y la pulpa (P) de frutos de naranjas `Navel´ (●) y `Cara Cara´ (△) en cuatro estadios representativos del proceso de desarrollo y maduración del fruto: VI, VM, V y TC \_\_\_\_\_ 126
- Figura 34: Aspecto interno y externo de frutos de los pomelos `Star Ruby´ (SR) y `Marsh´ (M) en los 8 estadios del desarrollo y la maduración del fruto recolectados en este estudio \_\_\_\_\_ 128
- Figura 35: Evolución del diámetro del fruto (○), del color de la pulpa (■) y del flavedo (●) de frutos del pomelo `Star Ruby´ (A) y del pomelo `Marsh´ (D). Evolución del contenido de clorofilas (○) y carotenoides (●) en el flavedo y la pulpa del pomelo `Star Ruby´ (B y C, respectivamente) y del pomelo `Marsh´ (E y F, respectivamente) durante el desarrollo y la maduración de frutos \_ 130
- Figura 36: Composición y contenido de carotenoides en el flavedo de frutos de los pomelos `Marsh´ y `Star Ruby´, recolectados en la campaña 2003-2004, en cuatro estadios de maduración: VI, Verde-Inmaduro; VM, Verde-Maduro; V, Virando y TC, Totalmente Coloreado \_\_\_\_\_ 134
- Figura 37: Composición y contenido de carotenoides en la pulpa de frutos de los pomelos `Marsh´ y `Star Ruby´, recolectados en la campaña 2003-2004, en cuatro estadios de maduración: VI, Verde-Inmaduro; VM, Verde-maduro; V, Virando; TC, Totalmente Coloreado \_\_\_\_\_ 136
- Figura 38: A, Contenido de clorofilas y carotenoides de hojas adultas de los pomelos `Marsh´ y `Star Ruby´ (*C.paradisi* Mac.). B, Composición y contenido de carotenoides en hojas de ambas variedades \_\_\_\_\_ 137
- Figura 39: Evolución de los niveles de los mRNAs correspondientes a genes implicados en la ruta MEP de biosíntesis de IPP plastídico en el flavedo (F) y la pulpa (P) de frutos de los pomelos (*C.paradisi*) `Marsh´ (■) y `Star Ruby´ (△) y de naranja `Navel´ (*C. sinensis*) (●) en cuatro estadios representativos del proceso de desarrollo y maduración del fruto: VI, VM, V y TC \_\_\_\_\_ 139

- Figura 40: Evolución de los niveles de mRNAs correspondientes a los genes implicados en la biosíntesis de carotenoides en el flavedo (F) y la pulpa (P) de frutos de los pomelos (*C. paradisi*) `Marsh´ (■) y `Star Ruby´ (△) y de naranja `Navel´ (*C. sinensis*) (●) en cuatro estadios representativos del proceso de desarrollo y maduración del fruto: VI, VM, V y TC. \_\_\_\_\_ 140
- Figura 41: Frutos de pomelo `Star Ruby´ en los que se aprecia claramente la diferente coloración de aquellas zonas sombreadas, bien por estar cubiertas por las hojas (A), bien por contacto con otros frutos (B). \_\_\_\_\_ 142
- Figura 42: A, Efecto de la posición de los frutos del pomelo `Star Ruby´ en el árbol y de su recubrimiento en la evolución del color. Los círculos corresponden a frutos internos no cubiertos (○) y recubiertos (●). Los cuadrados corresponden a frutos externos no cubiertos (□) y recubiertos (■). B, Fotografía representativa de la coloración final alcanzada por cada uno de los lotes de frutos. \_\_\_\_\_ 143
- Figura 43: Color (*a/b*), contenido de clorofilas y de carotenoides (A) y, composición de carotenoides del flavedo de frutos del pomelo `Star Ruby´ localizados en el exterior y en el interior del árbol en los meses de septiembre (S), octubre (O), noviembre (N) y diciembre (D) (B). \_\_\_\_\_ 145
- Figura 44: Acumulación de mRNAs correspondientes a genes implicados en la biosíntesis de carotenoides en el flavedo de frutos del pomelo `Star Ruby´, localizados en el exterior (●) y en el interior (○) del árbol, en los meses de septiembre (S), octubre (O), noviembre (N) y diciembre (D). \_\_\_\_\_ 147
- Figura 45: Aspecto interno y externo de frutos de las mandarinas `Fortune´ (FRT), `Nova´ y `Clemenules´ (CMN) en los distintos estadios del desarrollo y la maduración recolectados en este estudio. \_\_\_\_\_ 150
- Figura 46: Evolución del color del flavedo (●) y de la pulpa (○) (A, D, G) y, del contenido de clorofilas (○) y carotenoides (●) (B, C, E, F, H, I) durante el desarrollo y la maduración de frutos de las mandarinas `Clemenules´ (A, B, C), `Nova´ (D, E, F) y `Fortune´ (G, H, I). \_\_\_\_\_ 151
- Figura 47: Evolución de la composición y del contenido de carotenoides del flavedo de frutos de las mandarinas `Clemenules´ (CMN), `Nova´ y `Fortune´ (FRT) durante el desarrollo y la maduración. \_\_\_\_\_ 155
- Figura 48: Evolución de la composición y del contenido de carotenoides en la pulpa de frutos de las mandarinas `Clemenules´ (CMN), `Nova´ y `Fortune´ (FRT) durante el desarrollo y la maduración. \_\_\_\_\_ 157

- Figura 49: A, Evolución de la acumulación de mRNAs correspondientes a tres genes de la ruta MEP (*DXS*, *HDS* y *HDR*) en el flavedo y la pulpa de frutos de las mandarinas `Clemenules` (●), `Nova` (■) y `Fortune` (▲) durante el desarrollo y la maduración del fruto. B, Evolución del valor correspondiente a la intensidad de la señal de hibridación \_\_\_\_\_ 159
- Figura 50: A, Evolución de la acumulación de mRNAs correspondientes a genes implicados en la síntesis de carotenos lineales (*PSY*, *PDS*, *ZDS* y *PTOX*) en el flavedo y la pulpa de frutos de las mandarinas `Clemenules` (●), `Nova` (■) y `Fortune` (▲) durante el desarrollo y la maduración del fruto. B, Evolución del valor correspondiente a la intensidad de la señal de hibridación \_\_\_\_\_ 161
- Figura 51: A, Evolución de la acumulación de mRNAs correspondientes a genes implicados en la ciclación de licopeno (*β-LCY1*, *β-LCY2* y *ε-LCY*) en el flavedo y la pulpa de frutos de las mandarinas `Clemenules` (●), `Nova` (■) y `Fortune` (▲) durante el desarrollo y la maduración del fruto. B, Evolución del valor correspondiente a la intensidad de la señal de hibridación \_\_\_\_\_ 163
- Figura 52: A, Evolución de la acumulación de mRNAs correspondientes a genes implicados en la síntesis de xantofilas (*β-CHX*, *ε-CHX* y *ZEP*) en el flavedo y la pulpa de frutos de las mandarinas `Clemenules` (●), `Nova` (■) y `Fortune` (▲) durante el desarrollo y la maduración del fruto. B, Evolución del valor correspondiente a la intensidad de la señal de hibridación \_\_\_\_\_ 165
- Figura 53: Esquema de la ruta de biosíntesis de carotenoides en las distintas especies y variedades de cítricos estudiadas \_\_\_\_\_ 211



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Contenido y principales carotenoides en vegetales de hoja verde _____	7
Tabla 2: Contenido y principales carotenoides en frutos maduros de diferentes especies _____	8
Tabla 3: Contenido y principales carotenoides en la piel y la pulpa de frutos de caqui y plátano _____	11
Tabla 4: Relación de mutantes de tomate afectados en genes carotenogénicos. Se indican las características fenotípicas del fruto, su composición de carotenoides y el gen afectado _____	26
Tabla 5: Contenido y principales carotenoides en frutos cítricos maduros _____	39
Tabla 6: Combinaciones de cebadores utilizados en la amplificación por PCR de los fragmentos utilizados como sondas _____	62
Tabla 7: Cebadores utilizados para la amplificación de $\beta$ -LCYs de frutos cítricos _____	65
Tabla 8: Material vegetal utilizado para la obtención de cDNAs de los genes $\beta$ -LCY1 y $\beta$ -LCY2 _____	66
Tabla 9: Gradiente de elución utilizado para la separación de carotenoides mediante HPLC _____	73
Tabla 10: Límite de detección y ecuaciones de las rectas obtenidas para la cuantificación de distintos carotenoides _____	75
Tabla 11: Actividad $\beta$ -licopeno ciclasa de la proteína codificada por los genes $\beta$ -LCY1 aislados de naranja 'Cara Cara', pomelo 'Marsh' y pomelo 'Star Ruby' _____	97
Tabla 12: Cambios en las secuencias de nucleótidos y en las correspondientes secuencias de aminoácidos de los genes $\beta$ -LCY2 aislados de naranjas ( $\beta$ -LCY2a) y pomelos ( $\beta$ -LCY2b) _____	98
Tabla 13: Distribución de clones de cDNA correspondientes a los alelos $\beta$ -LCY2a y $\beta$ -LCY2b obtenidos a partir de pulpa virando de naranja 'Navel', pomelo 'Marsh' y pomelo 'Star Ruby' _____	103
Tabla 14: Genotecas de las bases de datos CFGP y HarvEST: Citrus en las que se encontraron ESTs correspondientes a $\beta$ -LCY2 _____	105
Tabla 15: Posibles elementos reguladores <i>cis</i> localizados en la secuencia del promotor de <i>Cs</i> $\beta$ -LCY2 _____	107
Tabla 16: Color del flavedo ( <i>a/b</i> ) y contenido de clorofilas y de carotenoides en el flavedo y la pulpa de frutos de naranja ( <i>C. sinensis</i> L. Osbeck) 'Navel' y	

‘Cara Cara’ (CC) recolectados en la campaña 2004-2005, en cuatro estadios fisiológicos: VI, fruto verde-inmaduro; VM, fruto verde-maduro; V, fruto virando; TC, fruto totalmente coloreado \_\_\_\_\_ 114

Tabla 17: Color del flavedo ( $a/b$ ) y contenido de clorofilas y de carotenoides en el flavedo y la pulpa de frutos de pomelo (*C. paradisi* Mac.) ‘Marsh’ y ‘Star Ruby’ (SR) recolectados en la campaña 2004-2005 en cuatro estadios fisiológicos: VI, fruto verde-inmaduro; VM, fruto verde-maduro; V, fruto virando; TC, fruto totalmente coloreado. \_\_\_\_\_ 133

Tabla 18: Comparación del índice de color ( $a/b$ ) y del contenido de  $\beta$ -criptoxantina y  $\beta$ -citraurina en el flavedo de frutos totalmente coloreados de la mandarina ‘Clemenules’ y de los híbridos ‘Nova’ y ‘Fortune’. \_\_\_\_\_ 198

Tabla 19: Relación de los niveles de expresión correspondientes a los genes *PSY* y  *$\beta$ -CHX* en el flavedo de frutos totalmente coloreados de naranja ‘Navel’ y de las mandarinas ‘Clemenules’, ‘Nova’ y ‘Fortune’. \_\_\_\_\_ 202

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

- ABA: Ácido abcísico.
- $\beta$ -CHX:  $\beta$ -Caroteno hidroxilasa.
- $\beta$ -LCY:  $\beta$ -Licopeno ciclasa.
- BrEt: Bromuro de etidio.
- CCD: Dioxigenasa de corte de carotenoides.
- CPTA: Hidrocloruro de 2-(4-tioclorofenil) trietilamina.
- CRTISO: Caroteno isomerasa.
- DMAPP: Dimetil-alil pirofosfato.
- DNA: Ácido desoxirribonucleico.
- DTT: Ditioneitol.
- DXP: 1-deoxi-D-xilulosa-5 fosfato
- DXS: 1-deoxi-D-xilulosa-5 fosfato sintasa
- $\epsilon$ -CHX:  $\epsilon$ -Caroteno hidroxilasa.
- $\epsilon$ -LCY:  $\epsilon$ -Licopeno ciclasa.
- EST: Secuencia de un gen que se expresa en un determinado tejido (del inglés Expressed Sequences Tag).
- HDR: Hidroximetil butenil difosfato reductasa
- HDS: Hidroximetil butenil difosfato sintasa.
- HMBPP: Hidroximetil butenil difosfato.
- HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución.
- IPP: Isopentil pirofosfato.
- MEP: Metil-eritritol-pirofosfato.
- MPTA: Hidrocloruro de 2-(4-metilfenoxi) trietilamina.
- Nº Acc.: Número de acceso a la base de datos correspondiente.
- NCBI: National Center for Biotechnological Information
- NCED: 9-*cis*-epoxicarotenoide dioxigenasa.
- NSY: Neoxantina sintasa.
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.
- PDA: Detector de fotodiodos.
- PDS: Fitoeno desaturasa.
- PF: Peso fresco.
- PTOX: Oxidasa terminal de plastidos.
- PSY: Fitoeno sintasa.
- RNA: Ácido ribonucleico.

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

SNPs: Variaciones puntuales en nucleótidos (del inglés, Single Nucleotide Polymorphism)

TC: Totalmente coloreado.

V: Virando.

VI: Verde-inmaduro.

VM: Verde-maduro.

X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indotil- $\beta$ -D-galactopiranosido.

ZDS:  $\zeta$ -Caroteno desaturasa.

ZEP: Zeaxantina epoxidasa.









## INTRODUCCIÓN

### 1. Carotenoides: conceptos generales

Los carotenoides son pigmentos caracterizados por primera vez como derivados isoprenoides en 1907 (Gross 1987). Los carotenoides adquieren su nombre del pigmento más representativo del grupo, el  $\beta$ -caroteno, que fue descubierto en zanahorias (*Daucus carota*) por Wackenroder en 1831. Los carotenoides se encuentran en mayor concentración y variedad en los vegetales, aunque también se acumulan en algunas bacterias, algas y hongos, así como en algunos animales, si bien éstos no pueden sintetizarlos (Britton 1998).

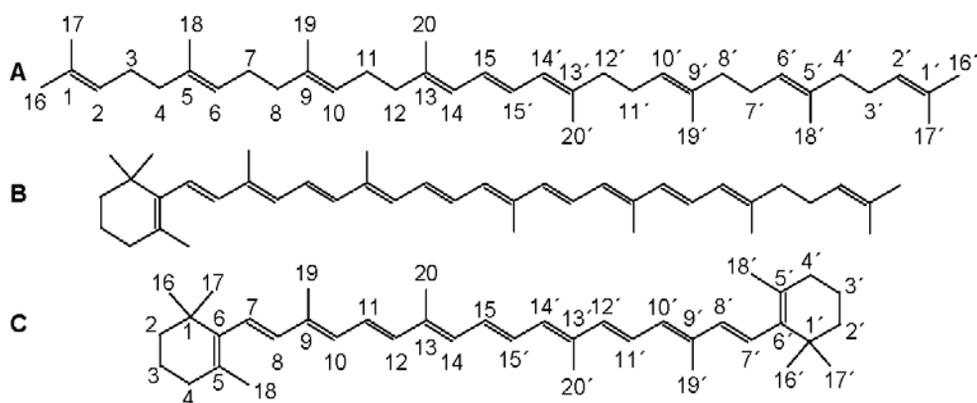
#### 1.1. Estructura y clasificación

La estructura básica de los carotenoides es un tetraterpeno simétrico y lineal, de 40 átomos de carbono, formado a partir de ocho unidades de isopreno. Este esqueleto básico puede modificarse por hidrogenación, deshidrogenación, ciclación, migración del doble enlace, acortamiento o extensión de la cadena, reordenamiento, isomerización, oxidación o por combinaciones de estos procesos, dando como resultado una gran diversidad de estructuras. Los carotenoides hidrocarbonados se denominan carotenos y aquellos que contienen oxígeno se denominan xantofilas. Los grupos oxigenados más comunes son los hidroxi- y epoxi- (epóxidos 5,6- ó 5,8-). También se han identificado carotenoides con grupos aldehído, ceto, carboxi, carbometoxi y metoxi (Gross 1987; Britton 1998; Fraser y Bramley 2004).

Los carotenoides, ya sean carotenos o xantofilas, pueden ser acíclicos, monocíclicos o bicíclicos (Figura 1). La ciclación ocurre en uno o ambos extremos de la molécula formando anillos  $\beta$ - o anillos  $\epsilon$ - (Gross 1987; Britton 1998; Fraser y Bramley 2004).

#### 1.2. Propiedades físicas

El rasgo característico de los carotenoides es su cadena poliénica, que es un sistema extenso de dobles enlaces conjugados, que consiste en alternar enlaces carbono-carbono simples y dobles. Esta cadena actúa como cromóforo y es la responsable de la capacidad de estos pigmentos de absorber luz en el visible y, en consecuencia, de su color. La longitud de onda a la que absorben los carotenoides aumenta con el número de dobles enlaces conjugados. Así, el licopeno, que es el caroteno más insaturado, es rojo. La ciclación también



**Figura 1:** Ejemplo de tipos estructurales de carotenoides. A: Estructura de caroteno lineal, correspondiente al fitoeno. B: Estructura de caroteno monocíclico, correspondiente al  $\gamma$ -caroteno. C: Estructura de caroteno bicíclico, correspondiente al  $\beta$ -caroteno. Se indica en las estructuras del fitoeno (A) y el  $\beta$ -caroteno (C) el sistema de numeración de carbonos empleado en la nomenclatura de los carotenoides.

influye en el grado de coloración y, por tanto, el  $\beta$ -caroteno y el  $\gamma$ -caroteno, aunque tienen el mismo número de dobles enlaces conjugados que el licopeno, son de color naranja y rojo-naranja, respectivamente. Debido a la existencia de estos dobles enlaces conjugados, todos los carotenoides presentan el fenómeno de isomerización *cis-trans*. En general, la forma predominante en la naturaleza son los isómeros *trans*, aunque para ciertos carotenoides, como el fitoeno, los isómeros *cis* son los más abundantes. Además, aproximadamente la mitad de los carotenoides naturales poseen al menos un carbono asimétrico y, consecuentemente, dan lugar a isómeros ópticos entre los distintos compuestos (Britton 1995).

Los carotenoides se consideran lípidos y, como tales, son solubles en otros lípidos y solventes orgánicos como acetona, etanol, metanol, éter etílico y cloroformo. Los carotenos se solubilizan en solventes apolares como éter de petróleo y hexano, mientras que las xantofilas se disuelven mejor en solventes polares como etanol y metanol (Gross 1987).

La polaridad de los carotenoides está directamente relacionada con su estructura química: en los carotenos, la polaridad aumenta con el número de dobles enlaces conjugados. En los carotenos cíclicos, el anillo  $\beta$ - es más polar que el  $\epsilon$ -. En las xantofilas, la polaridad de los grupos funcionales aumenta desde el grupo menos polar monoepoxi al más polar hidroxilo (Gross 1987).

Tanto en plantas como en animales, los carotenoides se encuentran como cristales o sólidos amorfos, en solución en medios lipídicos, en dispersión coloidal o en combinación con proteínas en fase acuosa (Fraser y Bramley 2004).

## 2. Importancia de los carotenoides

### 2.1. Funciones biológicas

Los carotenoides no son sólo otro grupo de pigmentos naturales, sino que son compuestos con propiedades funcionales importantes.

Además de ser los responsables de la coloración de muchas flores y frutos (Goodwin 1980), regulan las propiedades físicas de las membranas celulares vegetales, de forma similar a como lo hace el colesterol en las membranas animales (revisado en Gruszecki y Strzalka 2005).

Los carotenoides presentes en los complejos antena fotosintéticos captan energía en sus longitudes de onda características, gracias a sus sistemas de dobles enlaces conjugados, y la transfieren a las clorofilas, ampliando así el espectro de luz que un organismo puede utilizar para la fotosíntesis. En concreto, en el complejo antena LHCII se ha descrito la existencia de sitios de unión a cuatro carotenoides, tres de los cuales (dos moléculas de luteína y una de neoxantina) participan en la captación y transferencia de energía. El cuarto carotenoide es un pigmento del ciclo de las xantofilas (zeaxantina, anteraxantina o violaxantina), que juega un papel decisivo en la disipación de la energía excedente (fotoprotección) y en la detoxificación de las formas reactivas del oxígeno que se forman durante la fotosíntesis (Merchant y Sawaya 2005). El ciclo de las xantofilas es un proceso flexible, que responde no sólo a las condiciones lumínicas sino también a otros factores ambientales como las temperaturas extremas, el déficit hídrico o la disponibilidad de nutrientes (Demmig Adams *et al.* 1996). El  $\beta$ -caroteno actúa como cofactor en el fotosistema II, mediando la transferencia electrónica del citocromo  $b_{559}$  y de la clorofila  $Chl_{ZD2}$  al centro de reacción  $P680^+$  (Merchant y Sawaya 2005).

Otra función derivada del sistema de dobles enlaces conjugados característico de su cromóforo es la capacidad de los carotenoides para desactivar radicales libres altamente agresivos para el organismo y que se originan como subproductos del metabolismo celular. El comportamiento antioxidante *in vivo* de los carotenoides depende, además de su estructura, de la concentración y localización celular y tisular de los mismos.

Los carotenoides también son precursores de diversos compuestos volátiles importantes para el aroma de flores y frutos (Bouvier *et al.* 2003b; Lewinsohn *et al.* 2005a). Distintas variedades de tomate y sandía (Lewinsohn *et al.* 2005a) y melón (Ibdah *et al.* 2006), caracterizadas por importantes diferencias en su perfil cualitativo de carotenoides, presentan además marcadas diferencias en los terpenos volátiles que poseen, existiendo una correlación entre el perfil de carotenoides específico de cada variedad y el perfil de terpenos volátiles que presentan. Así, aunque existe una marcada diferencia entre los aromas de tomate, melón y sandía, en los tres casos se detecta  $\beta$ -ionona en aquellas variedades que acumulan  $\beta$ -caroteno (Lewinsohn *et al.* 2005a; Ibdah *et al.* 2006), y citral en aquellos frutos que contienen altas concentraciones de licopeno o de sus precursores tetraterpenos (Lewinsohn *et al.* 2005a), mientras que en aquellas variedades que carecen de carotenoides, como el mutante *yellow flesh (r)* de tomate, las variedades amarillas de sandía o las variedades de melón de pulpa verde pálida no presentan apocarotenoides (producto de rotura de carotenoides) volátiles (Ibdah *et al.* 2006). Adicionalmente, existen cada vez más evidencias de la importancia de algunos apocarotenoides como señalizadores regulando distintos aspectos del desarrollo de las plantas, como la dominancia apical y la ramificación (Schwartz *et al.* 2004). Un producto importante de la rotura oxidativa de  $C_{40}$ -*cis*-epoxi-carotenoides es el ácido abscísico (ABA). Esta hormona vegetal juega un papel fundamental en la regulación de las respuestas de las plantas a diferentes situaciones de estrés, en especial la deficiencia hídrica, y en muchos procesos del desarrollo, como la maduración, latencia y germinación de las semillas, el crecimiento vegetativo y la senescencia (Zeevaart y Creelman 1988).

Los carotenoides están también implicados en la pigmentación de invertebrados, peces y pájaros. En estos últimos se ha demostrado la relación entre la pigmentación por carotenoides y su atractivo sexual (Blount *et al.* 2003; Lewinsohn *et al.* 2005a). Sin embargo, los animales no son capaces de sintetizar *per se* los carotenoides, por lo que deben obtenerlos de la dieta (Fraser y Bramley 2004).

## 2.2. Importancia nutricional

La primera función que se atribuyó a los carotenoides en animales fue como precursores de la vitamina A. El requerimiento mínimo para que una molécula tenga actividad provitamina A es un anillo  $\beta$ - no sustituido con una

cadena poliénica de once carbonos. Por tanto, si nos basamos en consideraciones estructurales, de los más de 700 carotenoides conocidos actualmente, aproximadamente 50 de ellos tendrían actividad provitamina A. La dieta proporciona vitamina A de dos formas, como vitamina A preformada (retinil éster, retinol, retinal, 3-dehidroretinol y ácido retinoico) a partir de alimentos de origen animal, o como carotenoides, que se pueden transformar biológicamente en vitamina A (provitaminas A), generalmente a partir de alimentos de origen vegetal. La provitamina A tiene la ventaja de convertirse en vitamina A sólo cuando el cuerpo lo requiere; evitando así la toxicidad potencial de una sobredosis de vitamina (van den Berg *et al.* 2000; Melendez Martinez *et al.* 2004; Fraser y Bramley 2004).

Derivada de su actividad provitamina A, los carotenoides desempeñan en el organismo de los animales una función importante en la prevención de la degeneración macular de la retina, la disminución del riesgo de formación de cataratas y la formación y proliferación de epitelios (Snodderly 1995; van den Berg *et al.* 2000; Melendez Martinez *et al.* 2004; Fraser y Bramley 2004). Además, algunos carotenoides, como zeaxantina y luteína forman parte del sistema ocular de los mamíferos.

Los carotenoides también se han relacionado con un aumento del sistema inmune y una disminución del riesgo de padecer enfermedades degenerativas tales como cánceres y enfermedades cardiovasculares. Estos efectos biológicos se han atribuido a una propiedad antioxidante de los carotenoides a través de la desactivación de los radicales libres y la captura del oxígeno singlete (van den Berg *et al.* 2000; Melendez Martinez *et al.* 2004; Fraser y Bramley 2004). Además, la longitud de onda a la que absorben algunos carotenoides les proporciona capacidad protectora frente a la radiación UV (Melendez Martinez *et al.* 2004; Fraser y Bramley 2004).

### 2.3. Aplicaciones industriales

Debido a las propiedades beneficiosas de los carotenoides en la salud humana, éstos se utilizan en la formulación de suplementos vitamínicos y en la elaboración de productos funcionales. Además, son ingredientes de productos cosméticos como maquillaje ó bronceadores. Los carotenoides son cada vez más usados como colorantes en tecnología alimentaria, debido fundamentalmente al incremento de las presiones sociales contra los colorantes artificiales. Su uso como aditivos alimentarios en la Unión Europea se rige según la directiva

94/36/CEE. Los carotenos (E-160) son empleados en la industria alimentaria para colorear productos lácteos y cárnicos, productos derivados de huevo, conservas de pescado y vegetales, mermeladas, bebidas refrescantes y helados. Las xantofilas (E-161) tienen poca importancia como aditivos alimentarios directos para el hombre, pero son muy importantes como aditivos en el alimento suministrado a las truchas o salmones criados en piscifactorías, y también en el suministrado a las gallinas.

### 3. Carotenoides en frutos y vegetales

Hasta la fecha se han descrito casi 750 carotenoides naturales (Britton 1998) y se estima que en la naturaleza se producen anualmente más de 100 millones de toneladas de estos compuestos. La mayor parte de dicha producción se encuentra en forma de fucoxantina (en diversas algas) y de luteína (principal carotenoide de las hojas verdes) (Delgado Vargas *et al.* 2000). En los tejidos verdes de las plantas, la composición de carotenoides es la típica de los cloroplastos de las plantas superiores, siendo generalmente luteína,  $\beta$ -caroteno, violaxantina y neoxantina, en este orden, los mayoritarios. En pequeñas cantidades se encuentran zeaxantina,  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina y anteraxantina. A modo de ejemplo en la Tabla 1 se indican los principales carotenoides en algunos vegetales de hoja verde.

En los frutos la distribución de carotenoides es muy compleja y heterogénea (Gross 1987). En la Tabla 2 se indican los rangos de concentración de carotenoides totales, así como los principales carotenoides acumulados en algunos frutos de importancia económica. El perfil de carotenoides es característico de cada especie, variando desde perfiles muy simples, como el de las sandías, que presentan dos carotenoides en pulpa de frutos maduros, hasta el de cítricos o pimientos, en cuya pulpa se encuentran más de 50 carotenoides distintos (Gross 1987). La composición de carotenoides de los frutos que presentan coloración verde, como algunas variedades de kiwi, melón o pimiento, es muy similar a la observada en hojas verdes.

El contenido total en carotenoides también difiere de una especie a otra, así mientras que en uva madura la concentración oscila alrededor de 1  $\mu\text{g/g}$  PF, en algunas variedades de pimiento se superan los 1000  $\mu\text{g/g}$  PF (ver Tabla 2). El contenido y composición de carotenoides varía también entre variedades de una misma especie (Tabla 2). En el caso del melón el contenido de carotenoides de la pulpa de variedades naranjas es hasta 50 veces superior al de

Tabla 1: Contenido y principales carotenoides en vegetales de hoja verde (Fraser y Bramley 2004; Niizu y Rodríguez Amaya 2005; Kopsell y Kopsell 2006).

Cultivo	µg /g PF	Principales carotenoides
Brócoli	2533	64% Luteína; 36% β-caroteno
Col de bruselas	1163	52% Luteína; 47% β-caroteno
Col verde	139	57% Luteína; 42% β-caroteno
Espinaca	9890	60% Luteína; 45% β-caroteno
Guisante	2091	78% Luteína; 22% β-caroteno
Haba	767	66% Luteína; 34% β-caroteno
Judía	940	52% Luteína; 47% β-caroteno
Lechuga	201	55% Luteína; 45% β-caroteno
Rúcola	126	44% Luteína; 22% β-caroteno

las variedades blancas y verdes y, además, cada una de ellas presenta un perfil de carotenoides característico. Estas variaciones del perfil de carotenoides se correlacionan además con la coloración final de cada tejido. Por ejemplo, en los kiwis verdes, su coloración se debe a un alto contenido de clorofilas, mientras que en el resto de variedades de kiwi su coloración final se encuentra determinada por los carotenoides más abundantes. Así, cuando predominan los carotenoides amarillos (luteína, neoxantina, violaxantina) ésta es la coloración final del tejido, mientras que si el carotenoide más abundante es el β-caroteno el tejido adquiere coloración naranja (McGhie 2002). La coloración roja en la pulpa de los kiwis se debe a la presencia de antocianos (Montefiori 2005).

En el caso del tomate y las variedades rojas de papaya y sandía su coloración final se explica por la abundancia de licopeno (Gross 1987; Ronen *et al.* 2000; Lewinsohn *et al.* 2005b; Wall 2006). Sin embargo, en las variedades rojas de pimiento esta coloración se debe a la presencia de capsantina y capsorrubina, carotenoides rojos específicos del género *Capsicum* (Gross 1987; Hornero Mendez *et al.* 2002).

Tabla 2: Contenido y principales carotenoides en frutos maduros de diferentes especies.

Cultivo	Color	µg/g PF	Principales carotenoides	Referencia
Aguacate		12.0	25% luteína	(Gross 1987)
Albaricoque		6.8-35.0	60-70% β-caroteno	(Sass Kiss <i>et al.</i> 2005; Dragovic Uzelac <i>et al.</i> 2007)
Carambolo		22.0	34% β-criptoflavina; 25% ζ-caroteno	(Gross <i>et al.</i> 1983)
Ciruela		7.5-24.4	16-34% β-caroteno; 10-24% luteína; 0-32% violaxantina	(Gross 1987)
Guayaba		56.6-62.1	76-86% licopeno; 6-17% β-caroteno	(Gross 1987)
Higo		8.5	40% violaxantina; 28% luteína	(Gross 1987)
Kiwi	Verde	3.9-5.9	27-46% luteína; 19-28% β-caroteno; 14-20% neoxantina	(McGhie 2002; Montefiori 2005)
	Amarillo	1.3-50.0	27-59% luteína; 8-30% neoxantina; 8-18% violaxantina	(McGhie 2002; Montefiori 2005)
	Naranja	210.0	89% β-caroteno	(McGhie 2002)
	Rojo	252.0	96% β-caroteno	(McGhie 2002)
Mango		9.0-125.0	48-84% β-caroteno	(Gross 1987; Pott <i>et al.</i> 2003)
Melocotón		4.7	35% violaxantina; 14% β-criptoxantina	(Gross 1987)

Cultivo	Color	µg/g PF	Principales carotenoides	Referencia
Melón	Blanco	0.0-6.3	Apocarotenoides derivados de β-caroteno	(Ibdah <i>et al.</i> 2006)
	Verde	0.0-10.0	28% luteína; 22% violaxantina; 20% β-caroteno	(Gross 1987; Ibdah <i>et al.</i> 2006)
	Naranja	19.6-51.3	95% β-caroteno; 5% luteína	(Ibdah <i>et al.</i> 2006)
Papaya	Amarilla	7.9-16.1	52-64% β-criptoxantina; 18-29% β-caroteno	(Gross 1987; Wall 2006)
	Roja	18.2-51.3	70-74% licopeno; 15-18% β-criptoxantina	(Wall 2006)
Pimiento	Verde	18.0-22.7	42-61% luteína; 22-25% violaxantina; 14-18% β-caroteno	(Gross 1987; Niizu y Rodríguez Amaya 2005)
	Amarillo	12.0-49.3	33-41% violaxantina	(Gross 1987; Bianchini y Penteadó 1998)
	Naranja	80.0	44% violaxantina; 10% capsantina	(Gross 1987)
	Rojo	135.3-1269.7	1-32% violaxantina; 14-60% capsantina	(Gross 1987; Hornero Mendez <i>et al.</i> 2002)
Oliva		1.0-1.7	50-73% luteína; 13-23% β-caroteno	(Niizu y Rodríguez Amaya 2005; Criado <i>et al.</i> 2007)
Tomate		25.0-170.0	65-90% licopeno; 1-25% fitoeno; 5-10% β-caroteno	(Gross 1987, Cookson <i>et al.</i> 2003; Lois <i>et al.</i> 2000)

Cultivo	Color	µg/g PF	Principales carotenoides	Referencia
Sandía	Amarillo	Trazas	-	(Lewinsohn <i>et al.</i> 2005b)
	Naranja	10.0-34.0	44% prolicopeno; 25% Fitoeno; 25% ζ-caroteno	(Gross 1987; Lewinsohn <i>et al.</i> 2005b)
	Rojo	25.0-48.5	95% licopeno; 5% β-caroteno	(Gross 1987; Lewinsohn <i>et al.</i> 2005b)
Uva		0.9-1.8	42-53% luteína; 42-51% β-caroteno	(Oliveira <i>et al.</i> 2004)

En general, la biosíntesis de carotenoides en frutos ocurre en mayor medida en la piel que en la pulpa, acumulándose por tanto una mayor cantidad de estos pigmentos en la piel (Gross 1987). Por ejemplo, en los frutos de caqui y de plátano, la concentración de carotenoides de la piel es, respectivamente, hasta 9 y 6 veces superior a la existente en el endocarpo (Tabla 3). Además, ambos tejidos presentan una composición cualitativa distinta, tal y como se ha descrito en otros frutos carotenogénicos (Gross 1987).

El contenido de carotenoides de los frutos varía durante el desarrollo y la maduración de los mismos (Gross 1987). Existen tres patrones típicos de variación del contenido de carotenoides durante la maduración de los frutos (Gross 1987). En los frutos que acumulan altos contenidos de carotenoides, por ejemplo el tomate, la acumulación de estos pigmentos aumenta durante el desarrollo y la maduración del fruto, presentando un mínimo transitorio durante la transformación de cloroplastos en cromoplastos. En otros frutos, como el carambolo, la acumulación de carotenoides se produce de forma continuada desde estadios iniciales del desarrollo. Por último, en frutos que acumulan otro tipo de pigmentos durante la maduración, como las olivas y las cerezas, o en frutos con un bajo contenido de carotenoides, como las uvas, el contenido total de carotenoides disminuye durante el desarrollo y la maduración (Roca y Mínguez Mosquera 2003). En los frutos cítricos se encuentran ejemplos de los tres patrones de acumulación de carotenoides: en pomelos y limones el contenido

total de carotenoides disminuye de forma continuada; en la pulpa de mandarinas y naranjas el contenido de carotenoides aumenta de forma continuada, mientras que en el flavedo de mandarinas y naranjas el contenido de carotenoides experimenta un descenso transitorio al final del desarrollo del fruto, seguido de un aumento masivo en la acumulación de estos pigmentos (Gross y Timberg 1983).

Tabla 3: Contenido y principales carotenoides en la piel y la pulpa de frutos de caqui y plátano.

Fruto	$\mu\text{g/g}$ PF	Principales carotenoides	Referencia
<b>Caqui</b>			
Piel	491	48% $\beta$ -criptoxantina; 8% licopeno	(Gross 1987)
Pulpa	53-68	40-48% $\beta$ -criptoxantina; 10-16% zeaxantina	(Gross 1987; Daood <i>et al.</i> 1992)
<b>Plátano</b>			
Piel	6	30-42% luteína	(Gross 1987; Subagio <i>et al.</i> 1996)
Pulpa	1-5	29-35% $\alpha$ -caroteno; 21-30% $\beta$ -caroteno	(Gross 1987; Wall 2006)

Además, en aquellos frutos en los que la coloración varía de verde a otro color, durante la maduración se produce un cambio de la composición de carotenoides (Gross 1987). En general, la composición de carotenoides de los frutos verdes-inmaduros es muy similar a la de las hojas. Paralelamente a la degradación de las clorofilas, que se produce durante la desverdización de los frutos, la concentración de los carotenoides característicos de tejido verde disminuye y se inicia la acumulación de nuevos carotenoides, como la violaxantina en manzana y en cítricos, la capsantina y la capsorrubina en pimiento y el licopeno en tomate (Gross 1987).

Por último, el contenido y la composición de carotenoides de los frutos pueden modificarse por factores exógenos como la luminosidad, la temperatura o las prácticas de cultivo (Gross 1987). En el caso de las manzanas se ha descrito

un mayor contenido de carotenoides y una distribución cualitativa de carotenoides distinta en aquellas zonas del fruto expuestas a la radiación solar, en comparación con aquellas que permanecen sombreadas (Solovchenko *et al.* 2006). En albaricoque y uva, la localización geográfica de las plantaciones influye en el contenido final de carotenoides de los frutos (Oliveira *et al.* 2004; Dragovic Uzelac *et al.* 2007). La coloración de los frutos cítricos, determinada por su contenido y composición de carotenoides, se encuentra influenciada por la temperatura, la iluminación, la fertilización, el riego y el pie de cultivo (revisado en Casas y Mallent 1988a; 1988b). Por ejemplo, el cambio de coloración de los frutos cítricos se induce cuando la temperatura ambiental es inferior a 12 °C y, la rapidez con la que el fruto alcanza su coloración final depende del tiempo que el árbol permanece por debajo de esta temperatura, así como de la severidad de los descensos de temperatura (Casas y Mallent 1988b). Esta serie de factores explica las diferencias del contenido y la composición de carotenoides que algunos autores encuentran en frutos de una misma variedad (Tabla 2, Tabla 3 y Tabla 5).

#### 4. Biosíntesis de carotenoides en plantas superiores

Todos los isoprenoides derivan de la unidad fundamental de 5 átomos de carbono, isopentil difosfato (IPP), y de su isómero dimetilalil difosfato (DMAPP), que son sintetizados en plantas superiores a través de dos rutas independientes y compartimentalizadas. La ruta del ácido mevalónico (MVA), de la que derivan los isoprenoides mitocondriales y citosólicos (ubiquinona, esteroides, citoquininas y brasinosteroides) tiene lugar en el citosol y/o en el retículo endoplasmático. La biosíntesis de IPP plastídico y sus derivados isoprenoides (carotenoides, monoterpénos, la cadena lateral de las clorofilas, plastoquinona y tocoferoles, y las hormonas giberelinas y ácido abscísico) transcurre mediante una ruta independiente de MVA, descrita por vez primera por Rohmer *et al.* (1993), de la que se han identificado todos los genes implicados, tanto en plantas como en bacterias, aunque la contribución de cada enzima al control del flujo metabólico en esta ruta, así como su participación en el contenido final de IPP y DMAPP disponibles para la síntesis de isoprenoides, aún no ha sido caracterizada en detalle. Diversos estudios indican que existe intercambio de metabolitos entre ambas rutas, aunque el tráfico de estos parece ocurrir preferencialmente del plastidio al citosol, y únicamente en determinadas condiciones ambientales (Rodríguez Concepción y Boronat 2002).

La biosíntesis de carotenoides en las plantas superiores es diferente a la operativa en microorganismos y ha sido objeto de estudio en los últimos años (Cunningham y Gantt 1998; Sandmann 2001; Hirschberg 2001; Cunningham 2002; Sandmann 2002; Romer y Fraser 2005). En la Figura 2 se representa un esquema general de la ruta de biosíntesis de carotenoides en plantas, donde se indican las enzimas responsables de cada etapa.

El primer paso específico de la ruta de carotenoides, mediado por la fitoeno sintasa (PSY), consiste en la condensación de dos moléculas de geranylgeranyl pirofosfato (GGPP) para dar lugar al fitoeno. Cuatro desaturaciones

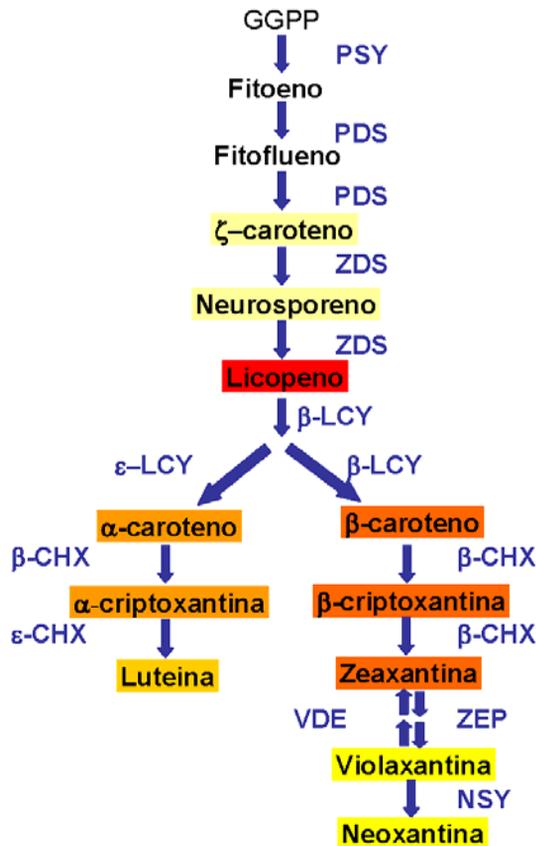


Figura 2: Esquema general de la biosíntesis de carotenoides en plantas. En azul se indican las enzimas que catalizan cada reacción: GGPP (geranylgeranyl pirofosfato), PSY (fitoeno sintasa), PDS (fitoeno desaturasa), ZDS (ζ-caroteno desaturasa), β-LCY (β-licopeno ciclasa), ε-LCY (ε-licopeno ciclasa), β-CHX (β-caroteno hidroxilasa), ε-CHX (ε-caroteno hidroxilasa), ZEP (zeaxantina epoxidasa), VDE (violaxantina de-epoxidasa), NSY (neoxantina sintasa).

sucesivas de este compuesto, catalizadas por las enzimas fitoeno desaturasa (PDS) y  $\zeta$ -caroteno desaturasa (ZDS), dan lugar al licopeno, cuya molécula es modificada por acción de las  $\varepsilon$ - y/o  $\beta$ -ciclasas ( $\varepsilon$ -LCY,  $\beta$ -LCY) formándose  $\alpha$ - o  $\beta$ -caroteno, respectivamente. Oxidaciones secuenciales de estas dos moléculas, realizadas por  $\varepsilon$ - y/o  $\beta$ -caroteno hidroxilasas ( $\varepsilon$ -CHX,  $\beta$ -CHX) y zeaxantina epoxidasa (ZEP) dan lugar a la formación de xantofilas (carotenoides oxigenados). Todas las enzimas implicadas en la biosíntesis de carotenoides en plantas superiores están codificadas por genes nucleares y poseen en el extremo amino-terminal un péptido señal de localización en plastidios, donde tienen lugar las reacciones de biosíntesis de carotenoides (Sandmann 1994).

Recientemente se han realizado diferentes revisiones bibliográficas sobre la biosíntesis de carotenoides en las que se detallan los últimos conocimientos adquiridos sobre los genes y enzimas implicados en esta ruta (Fraser y Bramley 2004; Bouvier *et al.* 2005; Howitt y Pogson 2006; DellaPenna y Pogson 2006; Sandmann *et al.* 2006). A continuación se describen, brevemente, las reacciones, los genes y las enzimas, implicados en la biosíntesis de carotenoides.

#### 4.1. Síntesis de precursores

La primera reacción de la ruta de Rohmer consiste en la producción, a partir de D-gliceraldehído-3-fosfato (G3P) e (hidroximetil) tiamina derivada de piruvato, de 1-deoxi-D-xilulosa-5 fosfato (DXP), mediante condensación catalizada por la DXP sintasa (DXS) (Figura 3). En el siguiente paso de la ruta plastídica de biosíntesis de isoprenoides, la enzima DXP reductoisomerasa (DXR) sintetiza 2-C-metil-eritritol-4-fosfato (MEP) mediante reordenación intramolecular y reducción de DXP. Dado que este último compuesto es el precursor de las vitaminas B<sub>1</sub> (tiamina) y B<sub>6</sub> (piridoxol), se considera el MEP como el primer compuesto específico de la ruta, y se ha consensuado su uso para dar nombre a la misma (Rodríguez Concepción y Boronat 2002; Liu *et al.* 2005).

En las siguientes reacciones las enzimas CMS (2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato citidil transferasa), CMK (4-(histidina-5'-difosfo)-2-C-metil-D-eritritol kinasa) y MCS (2-C-metil-eritritol 2,4-ciclodifosfato sintasa) median la formación secuencial de 4-difosfocetidil-2-C-metil-eritritol (CDP-ME), CDP-ME 2-fosfato y 2-C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato (ME-cPP), respectivamente. La reducción de este último compuesto, catalizada por la enzima hidroximetil butenil difosfato (HMBPP) sintasa (HDS) produce HMBPP, que es finalmente convertido en una

mezcla de IPP y DMAPP (5:1), por acción de la enzima HMBPP reductasa (HDR) (Rodríguez Concepción y Boronat 2002; Liu *et al.* 2005). En plantas superiores, excepto DXS, el resto de enzimas de la ruta MEP parecen estar codificadas por genes nucleares únicos. En todas las proteínas de la ruta MEP se predice un dominio amino-terminal que podría actuar como señal de importación a plastidos, siendo la forma madura de las proteínas de plantas superiores muy similares a las homólogas bacterianas, excepto HDS, que contiene un dominio específico de plantas (Querol *et al.* 2002).

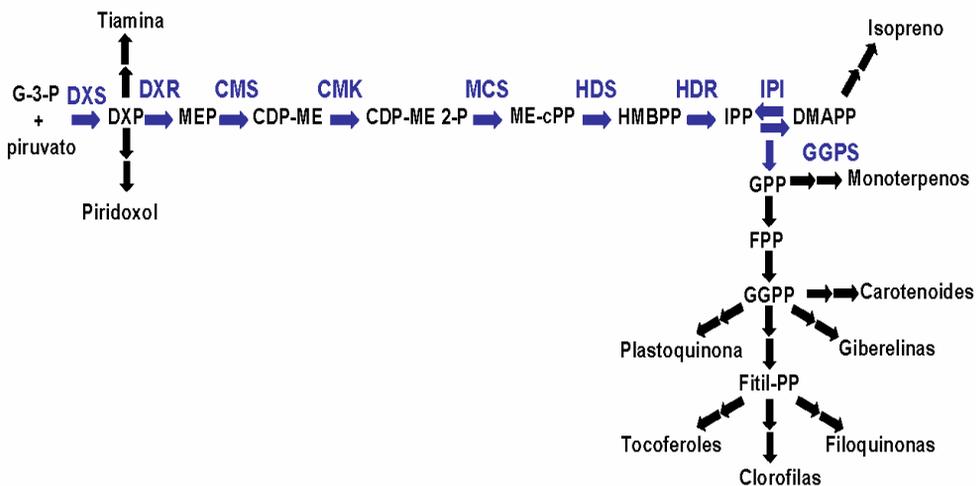


Figura 3: Esquema general de la biosíntesis de isoprenoides en plantas, adaptado de Botella Pavia y Rodríguez Concepción (2006). En azul se indican las enzimas que catalizan cada reacción: DXS (1-deoxi-D-xilulosa-5 fosfato sintasa), DXR (1-deoxi-D-xilulosa-5 fosfato reductoisomerasa), CMS (2-C-metil-D-eitritol-4-fosfato citidil transferasa), CMK (4-(histidina-5'-difosfo)-2-C-metil-D-eritritol kinasa), MCS (2-C-metil-eritritol 2,4-ciclodifosfato sintasa), HDS (hidroximetil butenil difosfato sintasa), HDR (hidroximetil butenil difosfato reductasa), IPI (isopentil pirofosfato isomerasa), GGPS (geranilgeranil pirofosfato sintasa).

## 4.2. Síntesis de carotenos

### a) Formación de fitoeno a partir de IPP y DMAPP

La condensación de una molécula de IPP ( $C_5$ ) con una molécula de DMAPP ( $C_5$ ), da lugar al intermediario geranil pirofosfato (GPP,  $C_{10}$ ) que se condensa con una molécula adicional de IPP, formando farnesil pirofosfato (FPP,  $C_{15}$ ). Este compuesto junto con otra molécula adicional de IPP produce geranilgeranil

pirofosfato (GGPP, C<sub>20</sub>), precursor común de carotenoides, clorofilas y giberelinas (Figura 3 y Figura 4). Esta serie de reacciones de condensación ocurren mediante ataque de un ion carbonilo al doble enlace C-3,4 de la molécula de IPP, con la consiguiente pérdida del fosfato inorgánico. Cada una de estas reacciones está mediada por la acción de una misma enzima, denominada GGPP sintasa (GGPS). En *Arabidopsis* se han identificado 12 genes que podrían codificar enzimas con actividad GGPS, 5 de ellas con posible localización plastídica (Okada *et al.* 2000; Lange y Ghassemian 2003). Dado que el paso catalizado por este tipo de enzimas es una ramificación de la ruta de biosíntesis de isoprenoides, podría suponerse que alguna de las proteínas GGPS identificadas fuera una isoforma específica de la síntesis de carotenoides (Botella Pavía y Rodríguez Concepción 2006).

El primer paso específico de la ruta de carotenoides consiste en la condensación de dos moléculas de GGPP para dar lugar al fitoeno (Figura 4). Esta reacción, catalizada por la fitoeno sintasa (PSY) ocurre en dos etapas. La primera etapa consiste en la condensación de dos moléculas de GGPP, previa eliminación de un grupo difosfato de una de ellas, dando lugar al prefitoeno. A continuación, el prefitoeno sufre un reordenamiento molecular que conlleva la eliminación de un grupo difosfato y neutralización de un carbocatión (Bouvier *et al.* 2005). El producto mayoritario de las PSY de plantas es 15-*cis*-fitoeno (Goodwin 1983). La correcta actividad enzimática de PSY requiere asociación a membrana (Schledz *et al.* 1996). Los genes que codifican PSY han sido clonados de diversas plantas. En *Arabidopsis thaliana* parece estar codificada por un único gen, mientras que en tomate (*Solanum lycopersicon*) y tabaco (*Nicotiana plumbgliflora*) existen dos genes que codifican PSY funcionales (Fraser *et al.* 1999; Fraser y Bramley 2004). En el caso del tomate, la isoforma PSY-1 es la responsable de la síntesis de fitoeno en tejido cromoplástico, mientras que PSY-2 lo es en tejido cloroplástico (Fraser *et al.* 1999). Pese a que los genes que codifican ambas isoformas de PSY son 91% idénticos, la disfunción de PSY-1 no es compensada eficazmente por PSY-2 (Fraser *et al.* 1999).

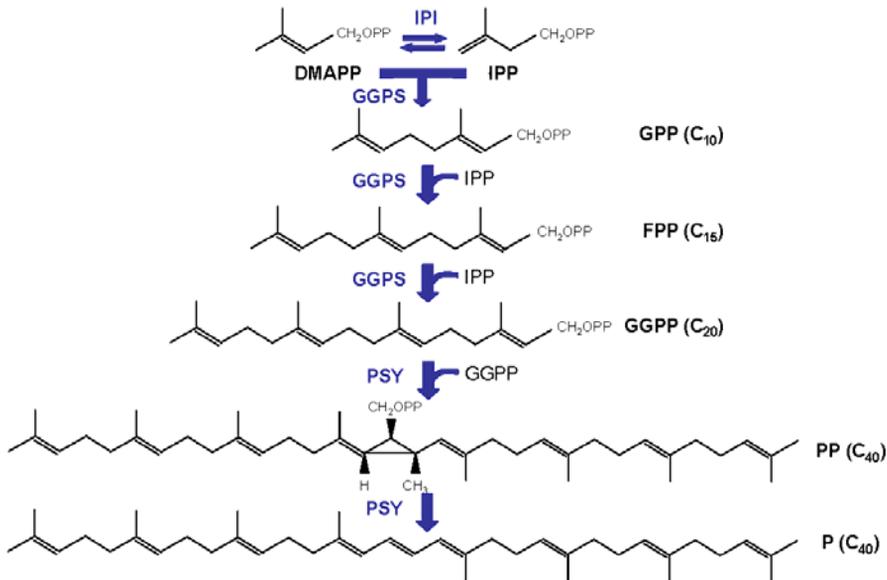


Figura 4: Esquema general de la biosíntesis de fitoeno en plantas superiores, adaptado de Fraser y Bramley (2004). En azul se indican las enzimas que catalizan cada reacción, GGPS (geranilgeranil pirofosfato) y PSY (fitoeno sintasa) y, en negro los compuestos, DMAPP (dimetil-alil-pirofosfato), IPP (isopentil pirofosfato), GPP (geranil pirofosfato), FPP (farnesil pirofosfato), GGPP (geranilgeranil pirofosfato), PP (prefitoeno), P (fitoeno).

#### b) Reacciones de desaturación

En plantas superiores la síntesis de licopeno a partir de 15-*cis*-fitoeno conlleva cuatro desaturaciones sucesivas catalizadas por dos enzimas, PDS y ZDS (Figura 5).

Cada una de estas enzimas introduce dos dobles enlaces simétricos en ambos extremos de la molécula sustrato. La introducción secuencial de dobles enlaces en los carbonos 11 y 11' de la molécula de fitoeno está catalizada por la PDS. Esta desaturación de la molécula viene acompañada de isomerización *cis* de los enlaces 9 y 9' produciéndose fitoflueno (15,9'-*dicis*-fitoflueno) y  $\zeta$ -caroteno (9,15,9'-*tricus*- $\zeta$ -caroteno). A continuación el doble enlace 15-*cis* es isomerizado a la forma *trans*, originándose 9,9'-*dicis*- $\zeta$ -caroteno. La forma en que esta isomerización (enzimática o no) tiene lugar aún no ha sido del todo resuelta. En el siguiente paso la enzima ZDS introduce dobles enlaces en forma *cis* en los carbonos 7 y 7', formándose neurosporeno (7,9,9'-*tricus*-neurosporeno) y finalmente prolicopeno (7,9,7',9'-*tetracus*-licopeno) (Breitenbach y Sandmann 2005). Por último, el prolicopeno es isomerizado a forma *trans* por acción de la

caroteno isomerasa (CRTISO) (Isaacson *et al.* 2002). Los genes que codifican PDS y ZDS han sido identificados en diversas plantas superiores. Las secuencias codificantes de PDS y ZDS son 33-35% similares y todas ellas poseen un dominio de unión a dinucleótido (FAD/NADP) en el extremo amino-terminal (Fraser y Bramley 2004). La correcta funcionalidad enzimática de PDS requiere asociación a membrana (al Babili *et al.* 1996).

La eliminación de dos átomos de hidrogeno en cada reacción de desaturación requiere el acoplamiento de estas reacciones a una cadena de transporte electrónico que utiliza oxígeno como aceptor final de electrones. Algunos componentes de esta cadena de transporte electrónico, como la ubiquinona y una oxidasa terminal de plastidos (PTOX), han sido identificados a partir de la caracterización de mutantes de *Arabidopsis (immutans)* y tomate (*ghost*) (Carol y Kuntz 2001; Barr *et al.* 2004).

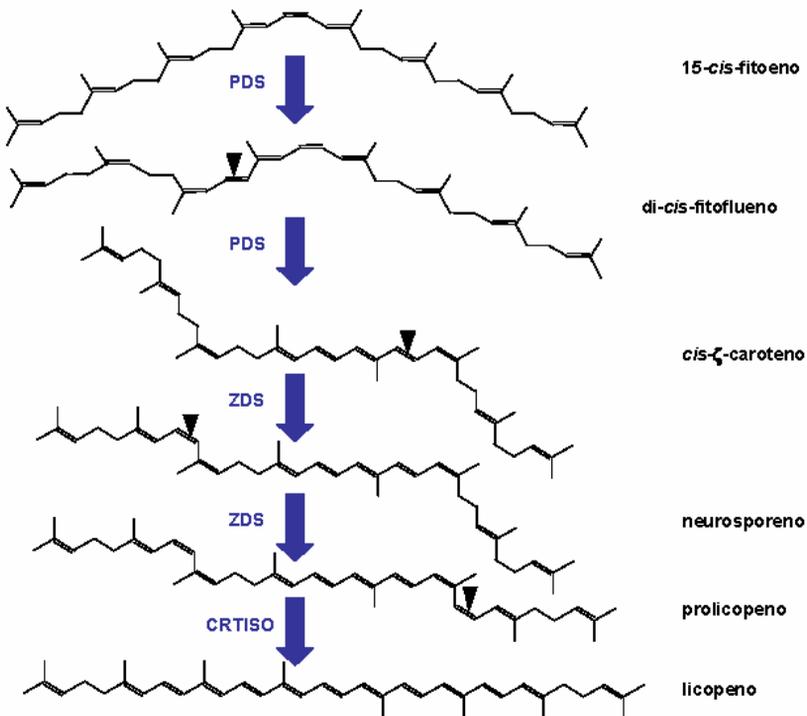


Figura 5: Esquema general de la biosíntesis de licopeno a partir de fitoeno, adaptado de Breitenbach y Sandman (2005). En azul se indican las enzimas que catalizan cada reacción: PDS (fitoeno desaturasa), ZDS ( $\zeta$ -caroteno desaturasa), CRTISO (caroteno isomerasa).

### c) Reacciones de ciclación

La ruta de biosíntesis de carotenoides en plantas superiores se bifurca en la ciclación del licopeno, dependiendo del tipo de ciclación que sufran los extremos de ésta molécula (Figura 6). Pueden producirse dos tipos de anillos,  $\epsilon$ - ó  $\beta$ -, que únicamente difieren en la posición de un doble enlace en el anillo ciclohexano. El tipo de anillo producido depende de la enzima 'licopeno ciclasa' (LCY) que actúa sobre el extremo de la molécula. En plantas superiores se han identificado dos tipos de LCYs:  $\beta$ -LCY, que cataliza la formación de anillos  $\beta$ -, y  $\epsilon$ -LCY que introduce anillos  $\epsilon$ -. La enzima  $\beta$ -LCY puede actuar secuencialmente sobre ambos extremos de la molécula de licopeno dando lugar al  $\beta$ -caroteno, produciéndose  $\gamma$ -caroteno como intermediario. Sin embargo,  $\epsilon$ -LCY únicamente puede introducir un anillo en uno de los dos extremos de la molécula de licopeno, originándose  $\delta$ -caroteno. La actuación de  $\beta$ -LCY sobre el extremo lineal del  $\delta$ -caroteno da lugar al  $\alpha$ -caroteno (Hirschberg 2001; Fraser y Bramley 2004; Bouvier *et al.* 2005). Únicamente en algunas especies de lechuga (*Lactuca sativa*) se ha descrito la existencia de una  $\epsilon$ -LCY capaz de introducir dos anillos  $\epsilon$ - en ambos extremos de la molécula de licopeno, generándose lactucaxantina (Cunningham y Gantt 2001).

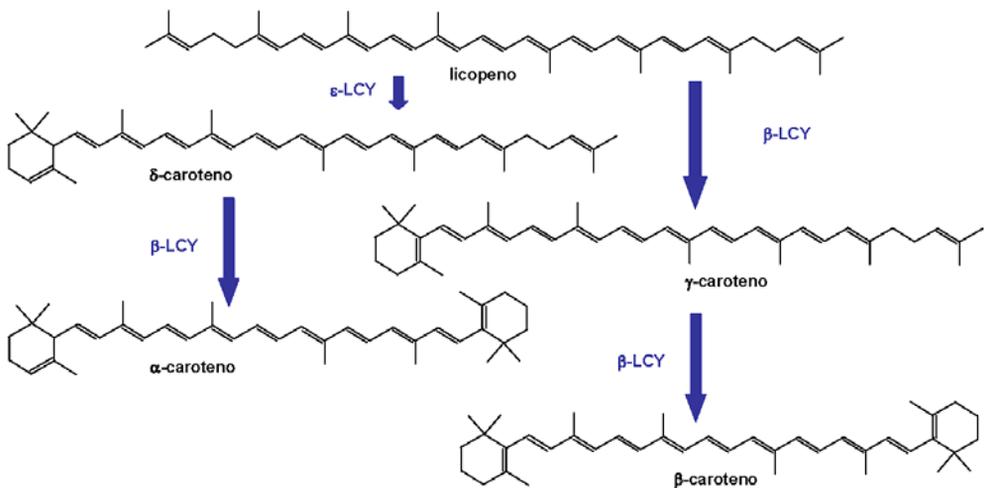


Figura 6: Esquema general de la ciclación del licopeno, adaptado de Fraser y Bramley (2004). En azul se indican las enzimas que catalizan cada reacción:  $\beta$ -LCY ( $\beta$ -licopeno ciclasa),  $\epsilon$ -LCY ( $\epsilon$ -licopeno ciclasa).

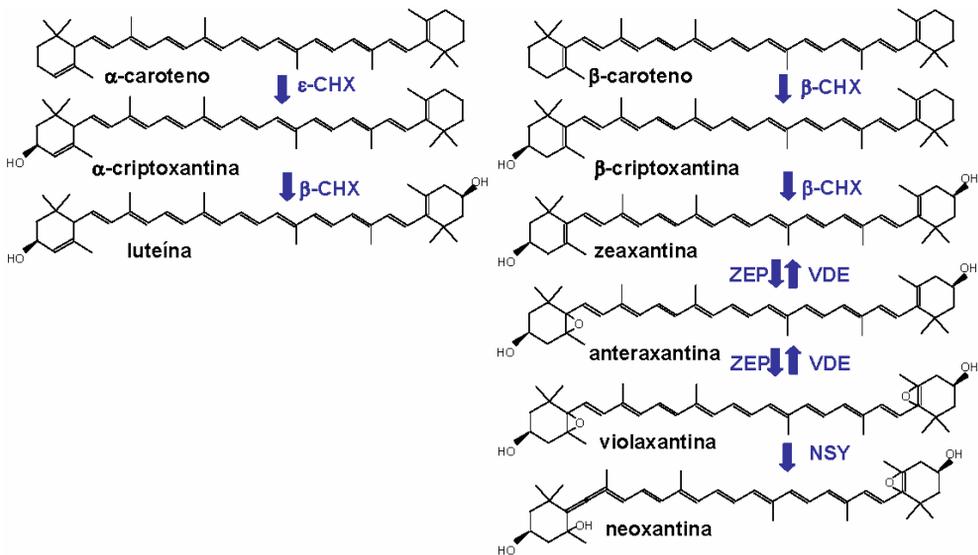
Genes que codifican  $\beta$ -LCYs han sido identificados en tomate (N° Acc. X86452), zanahoria (N° Acc. DQ192190), tabaco (N° Acc. F13561), diversas especies de cítricos (N° Acc. AF240787, AY166796, AY217103, AF152246) y pimienta (N° Acc. X86221), entre otras plantas superiores, presentando todas ellas un porcentaje de identidad a nivel de aminoácidos de, al menos, el 78%. Las proteínas maduras poseen un sitio de unión a dinucleótido (FAD/NADH) que parece estar implicado en su activación alostérica (Hornero Mendez y Britton 2002) y dos motivos conservados característicos de este tipo de enzimas (Hugueney *et al.* 1995). En tomate se ha descrito la existencia de una segunda  $\beta$ -LCY ( $\beta$ -LCY2) específica de tejido cromoplástico, que es 53% idéntica a nivel de aminoácidos a la  $\beta$ -LCY canónica (Ronen *et al.* 2000). Es interesante mencionar que  $\beta$ -LCY2 muestra mayor identidad de secuencia con la capsantina-capsorubina sintasa (CCS) de pimienta, una enzima bifuncional que cataliza la formación de capsantina y capsorubina (carotenoides específicos de pimienta) a partir de anteraxantina y violaxantina, respectivamente, y que además posee actividad  $\beta$ -LCY (Hugueney *et al.* 1995).

#### 4.3. Síntesis de xantofilas

Las xantofilas son carotenoides oxigenados que en los frutos se encuentran habitualmente esterificados con ácidos grasos (Gross 1987).

El  $\alpha$ - y el  $\beta$ -caroteno son modificados, mediante oxidación enzimática, produciéndose xantofilas. La hidroxilación secuencial en los C-3 y 3' de los anillos del  $\alpha$ - y el  $\beta$ -caroteno resulta en la formación de luteína y zeaxantina, vía  $\alpha$ - y  $\beta$ -criptoxantina, respectivamente (Figura 7). La hidroxilación de los anillos  $\beta$ - es catalizada por acción de la enzima  $\beta$ -caroteno hidroxilasa ( $\beta$ -CHX), mientras que sobre los anillos  $\epsilon$ - actúa  $\epsilon$ -CHX. Los tipos, el origen y las funciones de CHXs de plantas han sido revisados recientemente (Tian y DellaPenna 2004; Inoue 2004). En *Arabidopsis* (Tian y DellaPenna 2001), pimienta (Bouvier *et al.* 1998) y tomate (Hirschberg 2001) se han identificado dos genes que codifican  $\beta$ -CHX y, en *Arabidopsis* existen indicios de la presencia de una tercera  $\beta$ -CHX (Tian *et al.* 2003). En tomate, una de las isoformas  $\beta$ -CHX se expresa en tejido verde, mientras que la otra parece ser específica de tejidos cromoplásticos (Hirschberg 2001; Galpaz *et al.* 2006). Las enzimas  $\beta$ -CHX son monoxigenasas dependientes de ferrodixina, caracterizadas por una serie de residuos histidina, indispensables para su actividad catalítica, y con posible localización transmembrana. La enzima

$\epsilon$ -CHX es una monooxigenasa dependiente de citocromo P-450 que hasta la fecha únicamente ha sido caracterizada en *Arabidopsis* (Tian *et al.* 2004).



**Figura 7:** Esquema general de biosíntesis de xantofilas, adaptado de Fraser y Bramley (2004). En azul se indican las enzimas que catalizan cada reacción:  $\beta$ -CHX ( $\beta$ -caroteno hidroxilasa),  $\epsilon$ -CHX ( $\epsilon$ -caroteno hidroxilasa), ZEP (zeaxantina epoxidasa), VDE (violaxantina de-epoxidasa), NSY (neoxantina sintasa).

La luteína es el producto final de la rama  $\beta, \epsilon$ - de la ruta de biosíntesis de carotenoides, mientras que las xantofilas de la rama  $\beta, \beta$ - sufren modificaciones adicionales (Figura 7). La introducción secuencial, catalizada por zeaxantina epoxidasa (ZEP), de grupos epoxi en posiciones C-5,6 y C-5',6' de la zeaxantina da lugar a la formación de anteraxantina y violaxantina. Esta secuencia de reacciones es reversible, y la violaxantina puede ser reconvertida a zeaxantina mediante de-epoxidación catalizada por VDE (violaxantina de-epoxidasa) (Figura 7). Este conjunto de reacciones reversibles se engloba bajo el nombre de 'ciclo de las xantofilas' (Gross 1987; Demmig Adams *et al.* 1996). Genes que codifican ZEP y VDE han sido identificados en distintos vegetales (Fraser y Bramley 2004; Bouvier *et al.* 2005). Tanto ZEP como VDE son una clase de proteínas con estructura de barril- $\beta$  que interacciona con pequeñas moléculas hidrofóbicas. La actividad enzimática ZEP es dependiente de FAD y ferrodixina, mientras que VDE requiere ascorbato para su actividad.

La enzima neoxantina sintasa (NSY) cataliza la conversión de violaxantina a neoxantina, la última xantofila de la rama  $\beta,\beta$ - de la ruta de biosíntesis de carotenoides (Figura 7). Se han clonado genes que codifican enzimas con reducida actividad NSY *in vitro* de tomate (Bouvier *et al.* 2000), patata (al Babili *et al.* 2000) y *Arabidopsis* (North *et al.* 2007).

#### 4.4. Síntesis de apocarotenoides

El mecanismo bioquímico que conduce a la producción de apocarotenoides es el corte oxidativo de una molécula carotenoides. La naturaleza de estas reacciones aún no ha sido elucidada para cada caso particular, sin embargo, cada vez más evidencias sugieren que están catalizadas por una familia de proteínas denominadas genéricamente 'dioxigenasas de corte de carotenoides' (CCDs) (Giuliano *et al.* 2003; Camara y Bouvier 2004; Lewinsohn *et al.* 2005a). Este tipo de enzimas parecen tener alta especificidad en cuanto al punto de corte en el carotenoides. En *Arabidopsis*, azafrán, tomate, uva y melón se han caracterizado CCDs específicas del enlace 9-10 (Schwartz *et al.* 2001; Bouvier *et al.* 2003a; Simkin *et al.* 2004a; Mathieu *et al.* 2005; Ibdah *et al.* 2006). También en azafrán se ha caracterizado una CCDs con punto de corte específico en los enlaces 7-8 y 7'-8' que utiliza zeaxantina como sustrato (Bouvier *et al.* 2003a). Una CCD que cataliza el corte del licopeno en las posiciones 5-6 y 5'-6' se ha aislado de *Bixa orellana* (Bouvier *et al.* 2003a).

La subfamilia de CCDs que cataliza el corte, en el doble enlace 11-12, de  $C_{40}$ -9-*cis*-epoxycarotenoides se denomina NCEDs (del inglés nine-cis-epoxycarotenoid dioxygenases). En plantas superiores las NCEDs catalizan la rotura de 9'-*cis*-neoxantina y/o 9'-*cis*-violaxantina, produciendo xantoxina, compuesto  $C_{15}$  precursor directo del ABA. Estudios de sobreexpresión y mutantes defectivos de NCEDs en tabaco, tomate, guisante y *Arabidopsis* han puesto de manifiesto la naturaleza limitante de la reacción catalizada por estas enzimas en la biosíntesis de ABA (revisado en Taylor *et al.* 2005).

#### 5. Regulación de la síntesis y acumulación de carotenoides en frutos

En frutos, los carotenoides pueden acumularse en distintos tipos de plastidios, siendo los más característicos los cloroplastos y los cromoplastos. Los cloroplastos son abundantes durante los estadios inmaduros de los frutos, transformándose durante la maduración del fruto en cromoplastos. Durante esta transformación las membranas tilacoidales se desintegran, las clorofilas y la

mayor parte de los componentes de los complejos fotosintéticos desaparecen, y se produce una acumulación masiva de carotenoides en los cromoplastos. En los plastidios el contenido de carotenoides puede regularse a cuatro niveles: (1) mediante la formación de estructuras capaces de almacenar/estabilizar los carotenoides, (2) mediante regulación de la transcripción de los genes implicados en la biosíntesis de carotenoides, (3) mediante regulación postranscripcional de las enzimas implicadas en la biosíntesis de carotenoides y, (4) mediante el catabolismo de carotenoides (Fraser y Bramley 2004; Howitt y Pogson 2006).

### 5.1. Almacenamiento de carotenoides en frutos

En los cloroplastos prácticamente todos los carotenoides se encuentran asociados a proteínas unidas a las clorofilas, formando parte de los complejos de captación y disipación de la energía lumínica, mientras que en los cromoplastos se encuentran inmersos en estructuras lipoproteicas específicas (Vishnevetsky *et al.* 1999). Estas estructuras lipoproteicas pueden clasificarse como globulares, cristalinas, membranosas, fibrilares o tubulares, y la formación de una u otra depende de la composición de carotenoides (Vishnevetsky *et al.* 1999). Por ejemplo, el tratamiento de tejidos cromoplastogénicos con inhibidores de la síntesis de carotenoides, como la norfluorazona y el CPTA, produce acumulación de carotenos lineales en estructuras globulares y, evita la formación de estructuras fibrilares que acumulan, fundamentalmente, xantofilas esterificadas (Vishnevetsky *et al.* 1999). La acumulación de carotenoides también parece estar relacionada con la expresión de genes que influyen en la composición lipoproteica de los cromoplastos. De hecho, durante la diferenciación de los cromoplastos, el patrón de expresión de genes que codifican proteínas asociadas al almacenamiento de carotenoides es muy similar al de algunos genes de la ruta de biosíntesis de carotenoides, como *CCS* y *GGPS* en pimiento y *PSY* en tomate (Vishnevetsky *et al.* 1999). El mutante *or* de coliflor es un claro ejemplo de la influencia de las estructuras de almacenamiento de carotenoides en el contenido total de estos pigmentos. Las inflorescencias de este mutante presentan coloración anaranjada, debido a la aparición en la membrana plastídica de láminas que acumulan  $\beta$ -caroteno, mientras que el color de las inflorescencias del parental es blanco debido a la práctica ausencia de carotenoides (Li *et al.* 2001). Sin embargo, entre ambos genotipos, no existen diferencias en el nivel de expresión de los genes carotenogénicos (Li *et al.* 2006).

La esterificación de los grupos hidroxilo con ácidos grasos, via acetyl-CoA, es una forma habitual de almacenamiento de carotenoides en frutos (Gross 1987; Britton 1998). Esta reacción, que no afecta las propiedades del cromóforo, aumenta el grado de hidrofobicidad de las xantofilas, favoreciendo su integración en estructuras ricas en lípidos. El grado de esterificación de las xantofilas aumenta progresivamente durante la maduración de los frutos (Gross 1987). Durante el desarrollo de los frutos de pimiento las xantofilas se acumulan en forma no esterificada, iniciándose la esterificación de las mismas con la maduración del fruto, de forma que en fruto maduro todas las xantofilas se encuentran parcial o totalmente esterificadas (Hornero Mendez y Mínguez Mosquera 2000). En naranjas y mandarinas, el contenido de xantofilas esterificadas también aumenta durante la maduración, llegando a constituir el 60% y el 86% de las xantofilas totales del flavedo y de la pulpa, respectivamente (Eilati *et al.* 1972; Gross 1987). Sin embargo, en limón, caracterizado por su bajo contenido de carotenoides, únicamente el 5% de las xantofilas se encuentran esterificadas (Yokoyama y Vanderco 1967). Durante la maduración de los frutos de manzana los carotenoides sintetizados son inmediatamente esterificados con ácidos grasos (Knee 1988). Dado que los ácidos grasos suelen encontrarse formando parte de compuestos más complejos puede que la síntesis y disponibilidad de ácidos grasos libres determine el grado de esterificación y acumulación de xantofilas (Stalberg *et al.* 2003). Asimismo, la abundancia y actividad de enzimas implicadas en las reacciones de esterificación podrían también influir en la acumulación de xantofilas (Stalberg *et al.* 2003).

## 5.2. Regulación transcripcional de la carotenogénesis en frutos

Pese a que la ruta de biosíntesis de carotenoides está bien establecida a nivel bioquímico la regulación enzimática es mucho menos clara. Existen cada vez más evidencias que sugieren que su regulación tiene lugar, fundamentalmente, a nivel transcripcional. La caracterización de la regulación *in vivo* de la carotenogénesis y la clonación de los principales genes de la biosíntesis se ha realizado, fundamentalmente, en plantas modelo como *Arabidopsis thaliana*, maíz, tomate y pimiento, ya que ofrecen importantes ventajas genéticas y de disponibilidad de mutaciones que facilitan estos estudios, siendo además el tomate y el pimiento cultivos de importancia económica.

El tomate es el fruto en el que se ha realizado un mayor número de estudios sobre la composición de carotenoides y la regulación de la ruta

biosintética de estos compuestos. La mayoría de los genes implicados en la biosíntesis de carotenoides se han aislado y su patrón de expresión ha sido analizado durante el desarrollo y la maduración del fruto. A partir del estadio verde-maduro se incrementa el nivel de acumulación de los mRNAs de *PSY-1* y *PDS*, que alcanza su máximo en frutos virando de color y disminuye ligeramente en frutos maduros (Giuliano *et al.* 1993; Pecker *et al.* 1996). El nivel de expresión de *PSY-1* parece determinar el contenido de carotenoides totales del fruto (Giuliano *et al.* 1993). La acumulación de transcritos correspondientes a los genes *ZDS*, *PTOX*, *CRTISO* y  $\beta$ -*CHX* también aumenta durante la maduración (Isaacson *et al.* 2002; Barr *et al.* 2004; Giovannoni 2004). La acumulación de transcritos correspondientes a  $\beta$ -*LCY* y  $\epsilon$ -*LCY* es máxima en frutos verdes inmaduros y disminuye durante el desarrollo y la maduración, siendo indetectables en frutos maduros (Pecker *et al.* 1996; Ronen *et al.* 1999; Ronen *et al.* 2000), mientras que la expresión de  $\beta$ -*LCY2* se induce de forma transitoria en el estadio virando (Ronen *et al.* 2000). Así pues, los cambios del contenido y composición de carotenoides que tienen lugar durante el desarrollo y la maduración pueden explicarse por el aumento de la expresión de los genes implicados en la biosíntesis de licopeno (*PSY-1*, *PDS*, *ZDS*, *CRTISO*) y la disminución de la expresión de aquellos implicados en la ciclación de este compuesto ( $\beta$ -*LCY* y  $\epsilon$ -*LCY*). Esta reducción de la expresión de los genes que codifican LCYs, encargados de la ciclación del licopeno, es la responsable de la acumulación de licopeno en tomate (Giuliano *et al.* 1993; Fraser *et al.* 1994; Pecker *et al.* 1996; Bramley 2002). Por tanto, estos datos apuntan al control transcripcional de los genes de biosíntesis de carotenoides como el principal mecanismo de regulación del contenido y composición de carotenoides en frutos de tomate. Esta hipótesis se apoya también en los resultados obtenidos con diversos mutantes y plantas transgénicas. En los mutantes *Beta* y *Delta* de tomate, el aumento del nivel de expresión de los genes  $\beta$ -*LCY2* y  $\epsilon$ -*LCY* conduce a una disminución del contenido de licopeno y a un aumento del contenido de  $\beta$ - y  $\delta$ -caroteno, respectivamente (Tabla 4). Adicionalmente, la sobreexpresión de  $\beta$ -*LCY* en plantas transgénicas de tomate también aumenta el contenido de  $\beta$ -caroteno de los frutos (Rosati *et al.* 2000; D'Ambrosio *et al.* 2004). Por otro lado, el carácter limitante de la reacción catalizada por PSY se corrobora por la alteración del contenido total de carotenoides que se ha conseguido mediante modificación de los niveles de expresión de genes *PSY* en plantas transgénicas de tomate. La sobreexpresión de una *PSY* bacteriana produce el aumento del

contenido total de carotenoides de los frutos de tomate (Fraser *et al.* 2002), mientras que la transformación con una construcción antisentido de *PSY-1* mimetiza el fenotipo del mutante *yellow flesh* (Fraser *et al.* 1999), que carece de carotenoides en los frutos maduros debido a una disfunción de *PSY-1* (Tabla 4) (Lois *et al.* 2000).

Tabla 4: Relación de mutantes de tomate afectados en genes carotenogénicos. Se indican las características fenotípicas del fruto, su composición de carotenoides y el gen afectado.

Mutante	Gen afectado	Alteración	Color del fruto	Principales carotenoides acumulados	Referencia
<i>Yellow flesh</i>	<i>PSY-1</i>	No funcional	Amarillo	Ausencia de carotenoides	(Fraser <i>et al.</i> 1999)
<i>Ghost</i>	<i>PTOX</i>	No funcional	Naranja	83% fitoeno; 11% fitoflueno	(Barr <i>et al.</i> 2004; Fu <i>et al.</i> 2005)
<i>Tangerine</i>	<i>CRTISO</i>	No funcional	Naranja	60% $\zeta$ -caroteno; 20% fitoeno; 20% proliscopeno	(Isaacson <i>et al.</i> 2002)
<i>Beta</i>	$\beta$ - <i>LCY2</i>	Aumento de expresión	Naranja	50% licopeno; 46% $\beta$ -caroteno	(Ronen <i>et al.</i> 2000)
<i>Old gold</i>	$\beta$ - <i>LCY2</i>	No funcional	Rojo intenso	99% licopeno	(Ronen <i>et al.</i> 2000)
<i>Delta</i>	$\varepsilon$ - <i>LCY</i>	Aumento de expresión	Naranja	65% $\delta$ -caroteno; 25% licopeno	(Ronen <i>et al.</i> 1999)

Recientemente, también se les ha asignado a las enzimas de la ruta MEP un papel importante en la regulación del flujo de biosíntesis de carotenoides. Durante el desarrollo y la maduración de los frutos de tomate los genes *DXS* y *HDR* aumentan su nivel de expresión paralelamente al aumento del contenido de carotenoides (Lois *et al.* 2000; Botella Pavía *et al.* 2004), mientras que *DXR* y *HDS*

muestran un patrón de expresión constitutivo (Rodríguez Concepción *et al.* 2001; Rodríguez Concepción *et al.* 2003). Dado que el contenido total de carotenoides del fruto se incrementa por sobreexpresión del gen *DXS* utilizando un promotor específico de fruto (Enfissi *et al.* 2005), y por el tratamiento de frutos con DXP, mimetizando un aumento específico de la actividad *DXS* (Lois *et al.* 2000), la enzima *DXS* se ha señalado como el primer punto clave en la regulación de la biosíntesis de precursores de carotenoides. Cuando la concentración de DXP no es restrictiva la reacción catalizada por HDR adquiere naturaleza limitante para la síntesis de IPP plastídico (Botella Pavía *et al.* 2004).

En los frutos de pimiento también se ha caracterizado en detalle la regulación de la biosíntesis de carotenoides a nivel molecular. Durante el desarrollo y la maduración de los frutos de las variedades rojas de pimiento, la expresión de los genes *DXS* (Bouvier 1998), *GGPS*, *PSY* y *PDS* (Kuntz *et al.* 1992; Hugueney *et al.* 1992; Romer *et al.* 1993; Bouvier *et al.* 1994) se incrementa, desde estadios tempranos del desarrollo para el caso de *DXS* y, a partir del momento del viraje de color del fruto el resto de genes, conduciendo a un aumento del contenido total de carotenoides del fruto. El inicio del cambio de color del fruto viene, además, acompañado por un aumento de la expresión de los genes *CCS*,  *$\beta$ -CHX* y *ZEP* (Bouvier *et al.* 1994; Bouvier *et al.* 1996; Bouvier *et al.* 1998) que codifican enzimas que conducen a la acumulación de violaxantina y capsantina, principales carotenoides en las variedades rojas de pimiento (Tabla 2). El redireccionamiento del flujo de la ruta de biosíntesis de carotenoides de la rama  $\beta, \epsilon$ - hacia la rama  $\beta, \beta$ - que tiene lugar durante la maduración de los frutos rojos de pimiento se atribuye mayoritariamente a la actividad de la enzima *CCS*, capaz de ciclar el licopeno a  $\beta$ -caroteno, dado que  *$\beta$ -LCY* presenta un nivel de expresión constitutivo durante todo el proceso (Hugueney *et al.* 1995). Algunas variedades naranjas de pimiento presentan exactamente los mismos carotenoides que las variedades rojas, aunque en menor cantidad (Tabla 2). El origen de estas diferencias radica en la presencia, en las variedades naranjas, de un alelo del gen *PSY* con un procesamiento defectuoso que resulta en transcritos aberrantes, provocando una disminución del contenido de fitoeno disponible para las subsiguientes reacciones (Huh *et al.* 2001). La coloración amarilla o naranja de algunas variedades de pimiento (Tabla 2) se debe a la ausencia en el genoma de las mismas del gen *CCS* (Hugueney *et al.* 1995; Lefebvre *et al.* 1998), de forma que no se sintetizan capsantina ni capsorrubina, responsables de la coloración roja en pimiento (Bouvier *et al.* 1994; Lefebvre *et al.* 1998).

### 5.3. Otros factores que afectan la carotenogénesis en frutos

Un punto clave de la regulación de la biosíntesis de derivados isoprenoides parece ser el mecanismo que controla la partición de precursores en las distintas ramas de esta ruta (carotenoides, giberelinas y clorofilas). La formación de complejos multienzimáticos, que conllevan un control del flujo metabólico hacia las distintas ramas, ha sido propuesta por distintos autores basándose en la existencia de familias multigénicas y en evidencias de la existencia de agregados enzimáticos en tomate, pimiento y narciso. En la ruta de biosíntesis de carotenoides se ha propuesto la existencia de dos complejos multienzimáticos (Figura 8). Un primer complejo enzimático, aislado de cromoplastos de tomate y pimiento, estaría formado por las enzimas IPI, GGPS y PSY (Maudinas *et al.* 1977; Dogbo y Camara 1987; Camara 1993) y mediaría la síntesis de fitoeno a partir de IPP. El segundo complejo enzimático, que canalizaría la formación de  $\alpha$ - y  $\beta$ -caroteno a partir del fitoeno, estaría incluido en la membrana tilacoidal e incluiría dos unidades de cada una de las enzimas implicadas en las reacciones de desaturación del fitoeno (PDS, ZDS), una unidad de CRTISO y dos unidades de las enzimas implicadas en la ciclación del licopeno (LCYs) (Cunningham 2002; Fraser y Bramley 2004). En estos complejos multienzimáticos posiblemente también estén asociadas otras enzimas y/o cofactores que regulen la actividad catalítica o, que permitan la interacción entre las subunidades enzimáticas (Cunningham y Gantt 1998). La existencia de agregados multienzimáticos que median la formación de  $\alpha$ - y  $\beta$ -caroteno a partir del fitoeno se ha demostrado en hongos carotenogénicos del género *Phycomyces* (De la Guardia *et al.* 1971; Candau *et al.* 1991). Adicionalmente, el direccionamiento del flujo a través de la rama  $\beta,\beta$ - o  $\beta,\varepsilon$ - de la ruta de biosíntesis de carotenoides parece estar determinado por las cantidades relativas, las actividades enzimáticas y/o la especificidad de sustrato de las enzimas  $\beta$ - y  $\varepsilon$ -LCY (Cunningham *et al.* 1996; Bramley 2002).

En los cromoplastos, las proteínas PSY y PDS pueden encontrarse en forma inactiva, solubilizadas en el estroma, o en forma activa unidas a membrana. Este hecho sugiere que el control del equilibrio entre las fracciones de proteína libre/unida a membrana es un mecanismo post-transcripcional capaz de regular la actividad de estas enzimas (Schledz *et al.* 1996; al Babili *et al.* 1996; Bonk *et al.* 1997; Welsch *et al.* 2000). En el caso de PDS parece que dicho mecanismo se encuentra asociado al estado redox de quinonas unidas a la membrana (Bonk *et al.* 1997; Breitenbach *et al.* 2001).

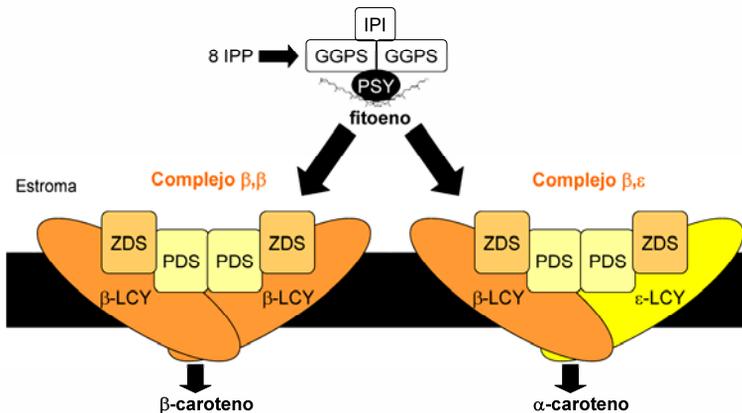


Figura 8: Esquema ilustrativo de los complejos multienzimáticos implicados en la biosíntesis de carotenoides, según Cunningham y Gantt (1998).

La luz afecta al contenido y composición de carotenoides, especialmente de las xantofilas implicadas en el 'ciclo de las xantofilas' (Demmig Adams *et al.* 1996). El mayor contenido de carotenoides, respecto al genotipo silvestre, de los mutantes *hp* de tomate, caracterizados por una elevada fotorespuesta, revelan el efecto de componentes de la ruta de transducción de señales lumínicas en la regulación de la formación de carotenoides (Cookson *et al.* 2003). Esta teoría se apoya además por el estudio de plantas transgénicas de tomate con elevada expresión de los criptocromos, que también tienen aumentado el contenido de carotenoides (Liu *et al.* 2004; Giliberto *et al.* 2005). Adicionalmente, la acumulación de mRNAs correspondientes a las proteínas DXS y PSY, así como la actividad catalítica de las mismas aumenta en determinadas condiciones lumínicas. Aunque el mecanismo que conduce a dicho aumento de actividad no ha sido determinado todavía, parece deberse a modificaciones post-traduccionales, como fosforilación de las proteínas (Schofield y Paliyath 2005). En tejidos fotosintéticos todos los genes de la ruta MEP están claramente regulados por la luz (Hsieh y Goodman 2005).

En el mutante *cnr* de tomate, que carece de la acumulación característica de carotenoides que se produce durante la maduración de estos frutos, no se detecta expresión de *PSY-1* (Fraser *et al.* 2001). Adicionalmente, los niveles de GGPP plastídico se encuentran disminuidos respecto al genotipo silvestre, sin embargo, el contenido de tocoferoles, también sintetizados a partir de este compuesto, no aparece afectado (Fraser *et al.* 2001). Recientemente se ha descrito que el gen *cnr* pertenece a una familia de factores de transcripción, y

que la mutación ha originado un patrón de metilación alterado en la secuencia promotora de este gen, que conduce a una muy reducida expresión del mismo. Pese a que la función exacta del factor *cnr* aún no ha sido determinada su papel en la regulación de la carotenogénesis parece evidente (Manning *et al.* 2006).

La ruta de biosíntesis de carotenoides también parece estar regulada por inhibición por producto final (‘feed-back’). En tejidos vegetativos la inhibición de la ciclación del licopeno produce aumento de la expresión de los genes *PSY* y *PDS* (Giuliano *et al.* 1993; Corona *et al.* 1996). En frutos, el tratamiento con inhibidores de la biosíntesis de carotenoides produce un aumento del contenido de carotenoides en los tejidos tratados respecto a los no tratados. La inhibición de actividad licopeno ciclasa mediante tratamiento con CPTA y MPTA produce un aumento del contenido de carotenoides tanto en frutos cítricos como en tomate (Yokoyama *et al.* 1972; Poling *et al.* 1976; Hayman *et al.* 1977; Chang *et al.* 1977; Poling *et al.* 1980). Este aumento del contenido de carotenoides es dependiente de la transcripción, procesamiento y traducción de mRNAs (Benedict *et al.* 1985) y, podría deberse a la ausencia de  $\beta$ -caroteno, que conduciría a un aumento de la actividad de enzimas tempranas de la ruta. Este mismo mecanismo se ha propuesto para explicar el mayor contenido de carotenoides, comparado con el genotipo silvestre, del mutante *old gold* de tomate que tiene menor actividad licopeno ciclasa (Tabla 4). En flores de narciso tratadas con CPTA (al Babili *et al.* 1999) y en frutos transgénicos de tomate con elevado contenido de licopeno (Romer *et al.* 2000) también se ha descrito un incremento de los niveles de expresión de  $\beta$ -*LCY*. Por otro lado, la expresión heteróloga en tomate de *crtI* de *Erwinia uredevora* (que codifica una proteína con actividad PDS, ZDS y CRTISO) produce un aumento de la expresión del gen  $\beta$ -*LCY* endógeno, triplicando los niveles de  $\beta$ -caroteno del fruto, y reduce el nivel de expresión de *PSY-1*, disminuyendo el contenido total de carotenoides (Romer *et al.* 2000). Adicionalmente, las aminas secundarias, que parecen inhibir la actividad CRTISO induciendo la acumulación de prolicopeno, también producen un aumento de la síntesis de carotenoides (Poling *et al.* 1980). Los genes de la ruta MEP también parecen estar sujetos a regulación por sustrato. Durante la maduración de los frutos de tomate no se detectan variaciones en los niveles de DXR (Rodríguez Concepción *et al.* 2001), aunque el tratamiento de frutos verde-maduro con fosmidomicina (que inhibe específicamente la actividad DXR) previene la acumulación de carotenoides e induce la expresión de *DXS* y de *PSY-1* (Lois *et al.* 2000; Rodríguez Concepción y Boronat 2002).

## 5.4. Catabolismo de carotenoides

Genes que codifican CCDs han sido recientemente caracterizados en frutos de tomate (Simkin *et al.* 2004a), uva (Mathieu *et al.* 2005), melón (Ibdah *et al.* 2006) y algunos cítricos (Kato *et al.* 2006; Agustí *et al.* 2007). Los genes *CCD1* de tomate, melón y cítricos se inducen durante la maduración de los frutos y están implicados en la formación de apocarotenoides volátiles importantes para el aroma, como la  $\beta$ -ionona (Simkin *et al.* 2004a; Mathieu *et al.* 2005; Ibdah *et al.* 2006; Kato *et al.* 2006). Las enzimas CCD1 catabolizan varios carotenoides, tanto cíclicos como lineales, sin embargo, parece que su actuación no determina el nivel final de carotenoides acumulados en un tejido (Simkin *et al.* 2004a; Kato *et al.* 2006). En crisantemo se ha identificado un gen, *CCD4a*, cuyos niveles de expresión correlacionan inversamente con el contenido de carotenoides de los pétalos (Ohmiya *et al.* 2006). La expresión de *CCD4a* en los pétalos conduce a la degradación de los carotenoides sintetizados, presentando el tejido color blanco debido a la práctica ausencia de carotenoides. La delección de *CCD4a* del genoma de crisantemo, o la supresión de la expresión de este gen mediante RNAi, conduce a la acumulación de carotenoides, presentando los pétalos color amarillo. En frutos cítricos se han identificado dos genes ortólogos de *CCD4*, sin embargo, se desconoce la función de la proteína que codifican (Agustí *et al.* 2007).

## 6. Frutos cítricos

### 6.1. Origen

Los cítricos se originaron probablemente en las regiones tropicales y subtropicales de Asia y el archipiélago malayo. Pertenecen al orden Geraniales, familia Rutáceas. La clasificación taxonómica de este grupo es muy compleja debido a que han sido cultivados desde hace miles de años, presentan compatibilidad sexual entre la mayoría de las especies, y los distintos géneros tienen un alto nivel de poliembrionía y una alta tasa de mutación somática. Además, pueden reproducirse apomícticamente. El origen y la evolución de los frutos cítricos han sido ampliamente estudiados en base a criterios taxonómicos (Barret y Rhodes 1976), y más recientemente mediante el uso de marcadores moleculares (Herrero *et al.* 1996). Todos los autores coinciden en la existencia de tres especies 'originales': *Citrus medica* L.(cidros), *Citrus reticulata* Blanco (mandarinas) y *Citrus grandis* Osbeck (pumelos). Una serie de hibridaciones

sexuales originó el resto de especies conocidas (Figura 9) (revisado en Moore 2001).

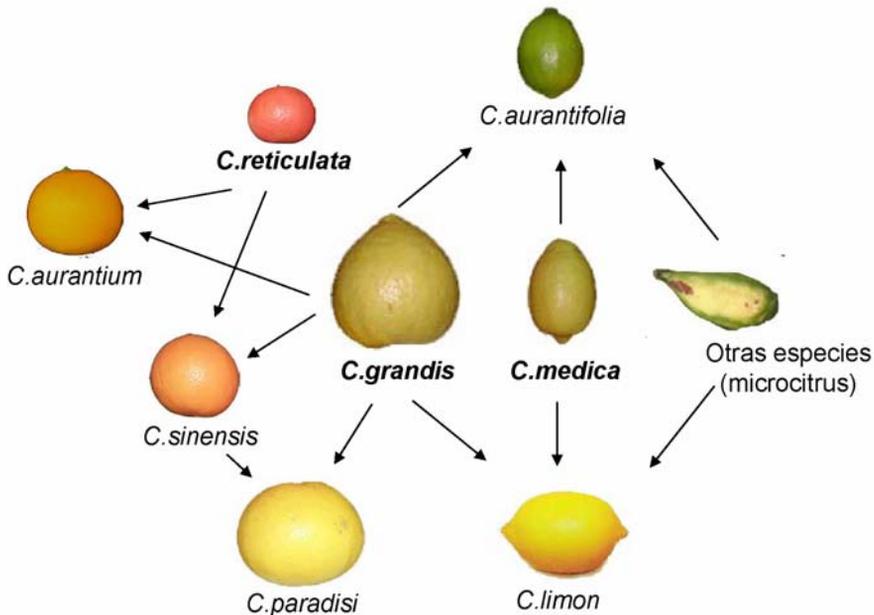


Figura 9: Posibles relaciones filogenéticas entre las distintas especies de frutos cítricos (adaptada de Moore, 2001). Se destacan en negrita las que se consideran especies verdaderas: mandarina (*C. reticulata*), pomelo (*C. grandis*) y cidro (*C. medica*).

Probablemente las naranjas dulces (*Citrus sinensis* L.Osbeck) derivan de hibridaciones sexuales entre pumelos y mandarinas, mientras que los pomelos (*Citrus paradisi* Macf) surgieron del retrocruce entre naranja dulce y pomelo (Moore 2001; Corazza Nunes *et al.* 2002). La selección de mutaciones gemarias espontáneas, frecuentes en los cítricos, ha derivado en la existencia de un gran número de cultivares que muestran un amplio rango de características agronómicas, morfológicas y organolépticas, incluyendo la coloración. En mandarinas y naranjas el color varía del amarillo naranja al naranja rojizo, en los limones la coloración es amarilla y en los pomelos es amarilla, rosada o rojiza (Saunt 2000).

## 6.2. Desarrollo y maduración de los frutos cítricos

Los frutos cítricos son un tipo de bayas modificadas denominadas hesperidios, formadas por la pulpa, que está constituida por vesículas agrupadas en lóbulos que rodean al eje central del fruto, y por una corteza. La corteza a su

vez está formada por dos tejidos, el exocarpo, tejido compacto y coloreado denominado flavedo, y la parte más interna, el mesocarpo o albedo, de color blanco y grosor variable dependiendo de la variedad (Agustí 2000).

El crecimiento de los frutos cítricos durante su desarrollo y maduración evoluciona siguiendo una curva sigmoideal, caracterizada por la existencia de tres fases bien diferenciadas. La Fase I abarca desde la antesis hasta el final de la caída fisiológica de los frutos, y se caracteriza por un rápido crecimiento del fruto provocado por la división celular, con el consiguiente aumento del número de células de todos sus tejidos en desarrollo, excepto el eje central. El aumento en el tamaño del fruto es debido, principalmente, al crecimiento de la corteza. Durante este periodo tiene lugar la iniciación y crecimiento de las vesículas de zumo a partir del endocarpo. En la Fase II, denominada 'de alargamiento celular', que se prolonga desde el final de la caída fisiológica hasta el inicio del cambio de color de los frutos, el crecimiento del fruto se debe mayoritariamente a la acumulación de zumo en las vesículas. La Fase III, denominada 'de maduración', se caracteriza por una reducida tasa de crecimiento mientras el fruto se mantiene en el árbol y comprende todos los cambios fisiológicos asociados a la maduración (aparición de la coloración típica de cada variedad, acumulación de azúcares y otros sólidos solubles y reducción de la acidez) (Bain 1958; Agustí 2000).

### 6.3. Carotenoides en los frutos cítricos

El color de la corteza y del zumo de los frutos cítricos son atributos de calidad de gran importancia y constituyen factores decisivos en la adquisición de los mismos por los consumidores. En la comercialización de los frutos para su consumo en fresco generalmente se relaciona el color externo con su calidad interna, aunque el color de la corteza es independiente del grado de madurez del endocarpo. En los frutos cítricos la coloración varía del amarillo de los limones y pomelos al naranja intenso de algunas variedades de mandarina, y al rojo de algunos pomelos y pumelos. La coloración de los frutos cítricos ha sido ampliamente estudiada, determinándose que se debe fundamentalmente a los carotenoides, cuya distribución cambia cualitativa y cuantitativamente entre las diferentes especies y variedades, e incluso entre tejidos de un mismo fruto (Tabla 5). Los frutos cítricos son los frutos en los que se han descrito una mayor variedad de carotenoides, hasta 115 si consideramos los isómeros (Stewart y Wheaton 1973; Gross 1987).

Salvo en el pomelo 'Star Ruby' y en el pumelo 'Chuzhou red', en los que Xu *et al.* (2006) cuantificaron un contenido similar de carotenoides en el flavedo (parte externa coloreada de la piel) y la pulpa ( $\approx 57$  y  $\approx 5$   $\mu\text{g/g}$  PF, respectivamente, Tabla 5), el resto de cítricos estudiados presentan un mayor contenido de carotenoides en el flavedo. En las mandarinas, entre el 75% y el 93% de los carotenoides del fruto se localizan en el flavedo, mientras que en naranjas este porcentaje disminuye al 66%-86% (Tabla 5). El contenido de carotenoides de la pulpa de las variedades blancas de pomelo ('Marsh') y pumelo ('Goliat' y 'Yuhuan'), de los cidros, limas y limones es, en general, muy inferior al existente en la pulpa de las naranjas y las mandarinas, hasta más de 1300 veces si comparamos el pumelo 'Yuhuan' y el híbrido de mandarina 'Hansen' (Tabla 5). En el pumelo 'Chuzhou red', que presenta coloración blanca en el flavedo y roja en la pulpa, la diferencia de la composición de carotenoides entre ambos tejidos es importante. En el flavedo se acumulan fundamentalmente carotenoides incoloros (hasta un 56%) mientras que en la pulpa se acumula predominantemente licopeno (51%) (Tabla 5). La diferente composición de carotenoides del flavedo y la pulpa también se aprecia claramente en las mandarinas 'Dancy' y 'Satsuma' y en el híbrido 'Murcott' (Tabla 5). Las diferencias varietales más importantes en la composición de carotenoides se encuentran en los pomelos y los pumelos, donde las variedades blancas presentan una composición de carotenoides muy distinta a la de las rojas (Tabla 5). En estas últimas predominan licopeno y  $\beta$ -caroteno, carotenoides normalmente ausentes en las variedades blancas.

En los cítricos se encuentran apocarotenoides  $C_{30}$ , algunos de ellos específicos de este género, como por ejemplo la  $\beta$ -citaurina (3-hidroxi- $\beta$ -apo-8'-carotenal), de un intenso color rojizo-anaranjado, aislada e identificada por vez primera en 1937, el  $\beta$ -apo-8'-carotenal, determinado por primera vez en 1960, el  $\beta$ -citaurineno (8'-apo- $\beta$ -caroteno-3-ol) y el  $\beta$ -citaurul (8'-apo- $\beta$ -caroteno-3,8'-ol) (Stewart y Wheaton 1973; Gross 1987). También son específicos de este género algunos apocarotenoides como  $\beta$ -apo-2'-carotenal y  $\beta$ -apo-10'-carotenal, determinados originalmente en piel de mandarina. En el flavedo de naranjas 'Washington Navel' se ha descrito la presencia de hidroxi- $\beta$ -apo-10'-carotenal y  $\beta$ -apo-14'-carotenal. Apo-10'-violaxantal y apo-12'-violaxantal se han encontrado en la corteza de naranjas 'Valencia' y mandarinas, respectivamente.

La diversidad de coloraciones en los frutos cítricos es consecuencia de las complejas mezclas que se pueden formar con los carotenoides normalmente

presentes en estos frutos, así como de la concentración de estos. Las diferencias de color son también debidas a una distinta disposición de los plastidios, que contienen los carotenoides, en los tejidos del fruto. Pese a que son numerosos los estudios sobre el contenido y la composición de carotenoides de diversos frutos cítricos maduros (Tabla 5), los estudios relativos a la variación de estos compuestos durante el desarrollo y la maduración de los frutos son escasos y conciernen únicamente a pomelo blanco `Marsh´ (Banet *et al.* 1981), pomelo `Goliath´ (Gross y Timberg 1983), limón `Lisbon´ (Kato *et al.* 2004), las naranjas `Navel´, `Navelina´, `Valencia´ y `Shamouti´ (Eilati *et al.* 1975; Pascual *et al.* 1993; Kato *et al.* 2004; Rodrigo *et al.* 2004) y las mandarinas `Michal´ y `Satsuma´ (Sonnen 1977; Farin *et al.* 1983; Kato *et al.* 2004). Recientemente, Matsumoto *et al.* (2007) han caracterizado la evolución de la composición de carotenoides del flavedo y la pulpa de 39 variedades de frutos cítricos y las han clasificado en función de su perfil de carotenoides. Según los carotenoides del flavedo estos autores establecen 5 grupos de variedades: con bajo contenido total de carotenoides; ricas en fitoeno; ricas en violaxantina; ricas en violaxantina y  $\beta$ -criptoxantina; y ricas en violaxantina,  $\beta$ -criptoxantina y fitoeno. Según los carotenoides de la pulpa se clasifican las variedades en cuatro grupos, idénticos a los establecidos en flavedo salvo el grupo de variedades `ricas en fitoeno´, que no se detecta en la pulpa. En general, las variedades analizadas pertenecieron al mismo grupo de clasificación en el flavedo y la pulpa, es decir, presentaron patrones de acumulación de carotenoides similares en ambos tejidos (Matsumoto *et al.* 2007). A continuación se resumen de estos trabajos los aspectos más revelantes en relación con las tres especies de cítricos estudiadas en esta Tesis Doctoral.

#### a) Pomelos (*Citrus paradisi*)

Las variedades de pomelo son altamente poliembriónicas, y todas ellas se originaron a partir de clones nucleares, debiéndose la variabilidad intravarietal existente a mutaciones naturales (Corazza Nunes *et al.* 2002). Existen tres grupos varietales de pomelo con importancia económica: 1.- frutos con semilla y con pulpa de color amarillo pálido (`Duncan´, `Walters´, `MacCarty´, `Imperial´ y `Walters´), 2.-frutos con pulpa de color amarillo pálido, pero sin semilla (`Marsh´), y 3.-frutos de pulpa pigmentada, con o sin semilla (`Thompson´, `Redblush´ y `Star Ruby´). La variedad más cultivada en todo el mundo es el pomelo blanco `Marsh´, a partir del cual, mediante mutaciones espontáneas e

inducidas mediante diversos agentes mutágenos se han originado los cultivares de pigmentación rosada y rojiza. Los estudios relativos a la coloración y el perfil de carotenoides en pomelos son escasos y, en general, se refieren a frutos maduros, sin el estudio de la evolución a lo largo del proceso de desarrollo y maduración del fruto. Durante la maduración del pomelo blanco `Marsh` el contenido de carotenoides totales del flavedo disminuye, desapareciendo aquellos carotenoides coloreados y acumulándose fitoeno y fitoflueno, que llegan a constituir en conjunto el 50% de los carotenoides totales de este tejido (Yokoyama y White 1967; Banet *et al.* 1981). En la pulpa del pomelo blanco `Marsh` el contenido de carotenoides aumenta ligeramente durante la maduración, predominando fitoeno y fitoflueno pero acumulándose también carotenoides coloreados (Banet *et al.* 1981). Estudios recientes (Xu *et al.* 2006) indican que, además de carotenos incoloros, tanto en el flavedo como en la pulpa de pomelo `Marsh` se acumulan predominantemente xantofilas.

Los pomelos (*C. paradisi*) son los frutos cítricos con un mayor número de variedades (más de 10) que acumulan licopeno (Xu *et al.* 2006). Los pomelos que acumulan licopeno pueden mostrar coloración de rosada a rojo intenso, en la piel, la pulpa o en ambos tejidos. Los trabajos relativos al perfil de carotenoides en los pomelos pigmentados son escasos, aunque más abundantes que los relativos a los pomelos blancos, refiriéndose gran parte de ellos a la composición de carotenoides en la pulpa o en el zumo de frutos maduros (Khan y Mackinney 1953; Ting y Deszyck 1958; Gross 1987; Rouseff *et al.* 1992; Lee 2000; Xu *et al.* 2006). En la pulpa de los pomelos rosados y rojizos los pigmentos más abundantes son los carotenos (74%-94% del total), variando las proporciones de fitoeno, fitoflueno, licopeno y  $\beta$ -caroteno entre las diferentes variedades (Tabla 5), aunque la existencia de pequeñas cantidades de xantofilas se ha descrito en algunas variedades (Gross 1987; Xu *et al.* 2006). La coloración de la pulpa de los cultivares rosados y rojizos de pomelos se debe fundamentalmente a la presencia de licopeno y/o  $\beta$ -caroteno, habiéndose relacionado la intensidad de la coloración de la pulpa con el contenido de licopeno (Ting y Deszyck 1958). El perfil de carotenoides en el flavedo únicamente ha sido investigado en dos cultivares de pomelo rojo: `Ruby Red` (Curl y Bailey 1957; Gross 1987; Xu *et al.* 2006) y `Star Ruby` (Xu *et al.* 2006). Al igual que en la pulpa, en el flavedo de frutos maduros de pomelo rojo predominan los carotenos (64%-95% del total), siendo mayoritarios aquellos incoloros.

## b) Naranjas (*Citrus sinensis*)

La evolución, cuantitativa y cualitativa, durante el proceso de desarrollo y maduración del fruto, de los carotenoides del flavedo de las naranjas ha sido estudiada en cuatro variedades: `Navel`, `Navelina`, `Shamouti` y `Valencia`. El flavedo de las naranjas se mantiene verde durante el período de crecimiento del fruto, iniciándose su cambio de color una vez el fruto alcanza su tamaño final. Paralelamente al aumento de tamaño del fruto el contenido en clorofilas disminuye. La evolución del contenido de carotenoides tiene dos fases: primero, sufre una disminución durante el periodo de crecimiento del fruto, seguida tras el viraje de color del flavedo, de un breve y ligero aumento. Seguidamente se inicia una acumulación masiva de estos pigmentos, alcanzándose la concentración máxima en frutos maduros (Eilati *et al.* 1975; Pascual *et al.* 1993; Kato *et al.* 2004; Rodrigo *et al.* 2004). La composición en carotenoides también varía a lo largo de la maduración del fruto; mientras éste es verde los carotenoides mayoritarios son característicos de tejido cloroplástico (luteína, *trans*-violaxantina,  $\beta$ -caroteno). Durante la maduración del fruto la concentración de carotenoides cloroplásticos disminuye y se produce una acumulación masiva de  $\beta,\beta$ -xantofilas, siendo la 9-*cis*-violaxantina el carotenoide mayoritario en el flavedo de los frutos maduros (Kato *et al.* 2004; Rodrigo *et al.* 2004). En la pulpa de las naranjas `Valencia` y `Navelina` el contenido de carotenoides aumenta durante la maduración, alcanzándose la máxima concentración de carotenoides en el estadio maduro (Pascual *et al.* 1993; Kato *et al.* 2004). En todo momento el contenido de carotenoides de la pulpa es inferior al del flavedo. En la pulpa de naranja `Valencia` se acumulan predominantemente  $\beta,\beta$ -xantofilas, siendo nuevamente la violaxantina el carotenoide mayoritario en estados finales de la maduración (Kato *et al.* 2004).

En el caso de las naranjas (*C. sinensis*) únicamente se han descrito dos cultivares cuya pulpa presenta coloración rojiza debida a la acumulación de licopeno. En 1961 Monselise y Halevy identificaron licopeno en naranja `Sarah`, un mutante de naranja `Shamouti`. La naranja `Cara Cara`, originaria de Venezuela, es una mutación gemaria de `Washington Navel`, de la que se diferencia claramente por la coloración roja de su pulpa, debida a la acumulación de licopeno (Lee 2001; Xu *et al.* 2006). En 1988 la variedad `Cara Cara` fue introducida en el `California Citrus Clonal Protection Program` para su limpieza y evaluación y fue liberada para la propagación en viveros en 1991, convirtiéndose en la primera naranja `Navel` pigmentada disponible para la

citricultura comercial. La pulpa de frutos maduros de `Cara Cara´ acumula, además de licopeno, importantes cantidades de fitoeno, fitoflueno y  $\beta$ -caroteno (Lee 2001; Xu *et al.* 2006). Tanto el licopeno como el  $\beta$ -caroteno proporcionan importantes beneficios para la salud (Fraser y Bramley 2004), por lo que las propiedades nutritivas y funcionales de la naranja `Cara Cara´ se han mejorado respecto a la variedad parental.

### c) Mandarinas e híbridos de mandarina

Las mandarinas son los frutos cítricos que presentan las tonalidades naranjas-rojizas más intensas. Esta mayor coloración se debe, principalmente, a la acumulación de  $\beta$ -criptoxantina, una xantofila de coloración naranja intenso abundante tanto en el flavedo como en la pulpa de las mandarinas (Gross 1987; Kato *et al.* 2004).

Hasta la fecha la evolución del contenido y la composición de carotenoides durante la maduración del fruto únicamente había sido estudiada en la mandarina `Satsuma´ y en el híbrido `Michal´. En la mandarina `Satsuma´ el contenido de carotenoides del flavedo aumenta de forma continuada durante el desarrollo y la maduración del fruto (Kato *et al.* 2004), mientras que en el híbrido `Michal´ se produce un descenso transitorio en el momento del viraje del color (Farin *et al.* 1983). En la pulpa de ambas mandarinas el contenido de carotenoides aumenta de forma continuada durante el desarrollo y la maduración del fruto, siendo el contenido de carotenoides en este tejido inferior al existente en el flavedo (Farin *et al.* 1983; Kato *et al.* 2004). La evolución del perfil de carotenoides en las mandarinas es muy similar al descrito para las naranjas. Durante los estadios verdes del flavedo se acumulan carotenoides cloroplásticos, cuya concentración disminuye durante la desverdización del fruto, iniciándose paralelamente la acumulación de  $\beta,\beta$ -xantofilas. En la pulpa de ambas mandarinas se acumulan fundamentalmente  $\beta,\beta$ -xantofilas durante el desarrollo y la maduración. Tanto en el flavedo como en la pulpa de los frutos maduros de la mandarina `Michal´ la violaxantina es uno de los carotenoides más abundantes (Farin *et al.* 1983). La mandarina `Michal´ acumula además importantes cantidades de  $\beta$ -citraurina y  $\beta$ -criptoxantina en el flavedo y la pulpa, respectivamente (Farin *et al.* 1983). Además de la violaxantina, en el flavedo de la mandarina `Satsuma´ son carotenoides mayoritarios el fitoeno y la  $\beta$ -criptoxantina, mientras que en la pulpa el contenido de  $\beta$ -criptoxantina es muy superior al de violaxantina (Kato *et al.* 2004).

Tabla 5: Contenido y principales carotenoides en frutos cítricos maduros.

Cultivo (Especie) Variedad		$\mu\text{g/g}$ PF	Principales carotenoides	Referencia
Citron ( <i>C. medica</i> )				
Diamante	Pulpa	$0.17 \pm 0.02$	68% $\beta$ -caroteno; 32% $\beta$ -criptoxantina	(Fanciullino <i>et al.</i> 2006)
Etrog	Pulpa	$0.22 \pm 0.19$	59% $\beta$ -caroteno; 41% $\beta$ -criptoxantina	(Fanciullino <i>et al.</i> 2006)
Lima ( <i>C. aurantifolia</i> )				
Mejicana	Pulpa	$0.34 \pm 0.04$	68% $\beta$ -caroteno; 14% $\alpha$ -caroteno	(Fanciullino <i>et al.</i> 2006)
Rangpur	Pulpa	$8.40 \pm 0.15$	47% $\beta$ -criptoxantina; 10% $\beta$ -caroteno	(Fanciullino <i>et al.</i> 2006)
Palestina	Pulpa	$0.28 \pm 0.01$	100% $\beta$ -criptoxantina	(Fanciullino <i>et al.</i> 2006)
Limón ( <i>C. limon</i> )				
	Piel	1.40	18% fitoflueno; 17% $\zeta$ -caroteno	(Gross 1987)
Eureka	Pulpa	0.60	30% $\beta$ -criptoxantina; 22% fitoflueno	(Gross 1987)
Eureka Fr.	Pulpa	$0.29 \pm 0.02$	56% $\beta$ -criptoxantina; 43% $\zeta$ -caroteno	(Fanciullino <i>et al.</i> 2006)
Lisbon	Piel	90.00	86% fitoeno	(Kato <i>et al.</i> 2004)
	Pulpa	trazas		(Kato <i>et al.</i> 2004)
Meyer	Pulpa	$1.26 \pm 0.06$	68% $\beta$ -criptoxantina; 15% $\beta$ -caroteno	(Fanciullino <i>et al.</i> 2006)
Volkamer	Pulpa	$6.51 \pm 0.18$	38% $\beta$ -criptoxantina; 15% violaxantina	(Fanciullino <i>et al.</i> 2006)

Cultivo (Especie) Variedad		µg/g PF	Principales carotenoides	Referencia
Mandarina ( <i>C. reticulata</i> )				
Clementina	Piel	74.60	32% β-citraurina; 16% β-citraurino	(Gross 1987)
	Pulpa	24.96 ± 1.16	36% β-criptoxantina; 35% violaxantina	(Fanciullino <i>et al.</i> 2006)
Dancy	Piel	295.00	51% violaxantina; 8% β-citraurina	(Gross 1987)
	Pulpa	18.50	32% anteraxantina; 23% β-criptoxantina	(Stewart 1977)
Satsuma	Piel	250.00-300.00	44% fitoeno; 19% β-criptoxantina; 19% violaxantina	(Ikoma <i>et al.</i> 2001; Kato <i>et al.</i> 2004)
	Pulpa	21.00-34.00	55% β-criptoxantina; 13% zeaxantina	(Ikoma <i>et al.</i> 2001; Kato <i>et al.</i> 2004; Fanciullino <i>et al.</i> 2006)
Híbridos de mandarina				
Hansen	Pulpa	39.39 ± 5.37	29% β-criptoxantina; 19% zeaxantina	(Fanciullino <i>et al.</i> 2006)
Michal	Piel	174.10	26% β-citraurino; 30% violaxantina	(Farin <i>et al.</i> 1983)
	Pulpa	13.70	41% β-criptoxantina; 9% zeaxantina	(Farin <i>et al.</i> 1983)
Murcott	Pulpa	44.90	33% β-criptoxantina; 24% anteraxantina; 22% violaxantina	(Stewart 1977)
Orlando	Pulpa	12.10	47% anteraxantina; 20% β-criptoxantina	(Stewart 1977)
Robinson	Pulpa	20.27	35% violaxantina; 28% β-criptoxantina	(Stewart 1977)

Cultivo (Especie) Variedad		µg/g PF	Principales carotenoides	Referencia
Naranja ( <i>C. sinensis</i> )				
Bonanza	Piel	43.30	31% auroxantina; 23% β-citraurina	(Xu <i>et al.</i> 2006)
	Pulpa	6.66	33% violaxantina; 12% β-criptoxantina	(Xu <i>et al.</i> 2006)
Cara Cara	Piel	62.30	36% fitoeno; 21% auroxantina	(Xu <i>et al.</i> 2006)
	Pulpa	24.00-38.00	34-40% fitoeno; 8-14% violaxantina; 5-16% licopeno	(Fanciullino <i>et al.</i> 2006; Xu <i>et al.</i> 2006)
Hamlin	Pulpa	4.00-10.00	36-57% violaxantina; 8-13% β-criptoxantina	(Stewart 1977; Dhuique Mayer <i>et al.</i> 2005)
Maltaise	Pulpa	11.04	53% violaxantina; 16% β-criptoxantina	(Dhuique Mayer <i>et al.</i> 2005)
Navel	Piel	60.00-75.00	26-52% violaxantina, 12% fitoeno	(Curl y Bayley 1961; Malachi <i>et al.</i> 1974; Gross 1987)
	Pulpa	4.00-23.00	48% violaxantina, 11% anteraxantina	(Curl y Bayley 1961; Gross <i>et al.</i> 1972)
Navelate	Piel	59.00	80% violaxantina	(Rodrigo <i>et al.</i> 2004)
Navelina	Piel	94.20	31% violaxantina; 18% fitoeno	(Pascual <i>et al.</i> 1993)
	Pulpa	16.90		(Pascual <i>et al.</i> 1993)
Pera	Pulpa	13.39	34% violaxantina; 27% β-criptoxantina	(Dhuique Mayer <i>et al.</i> 2005)
Pinneapple	Pulpa	8.06	36% violaxantina; 40% anteraxantina	(Stewart 1977)
Salustiana	Pulpa	8.62	55% violaxantina; 17% β-criptoxantina	(Dhuique Mayer <i>et al.</i> 2005)

Cultivo (Especie) Variedad		µg/g PF	Principales carotenoides	Referencia
Sanguinelli	Pulpa	18.00-36.70	36-38% violaxantina; 11-21% β-criptoxantina	(Dhuique Mayer <i>et al.</i> 2005; Fanciullino <i>et al.</i> 2006)
Shamouti	Pulpa	5.99-27.77	38-47% violaxantina; 10-22% β-criptoxantina	(Gross <i>et al.</i> 1972; Dhuique Mayer <i>et al.</i> 2005; Fanciullino <i>et al.</i> 2006)
Valencia	Piel	90.00-120.00	44-55% violaxantina	(Gross 1987; Kato <i>et al.</i> 2004)
	Pulpa	6.00-19.00	2-65% violaxantina; 4-15% β-criptoxantina; 6-40% anteraxantina	(Gross <i>et al.</i> 1972; Stewart 1977; Gross 1987; Kato <i>et al.</i> 2004 ; Dhuique Mayer <i>et al.</i> 2005)
Pomelo ( <i>C.paradisi</i> )				
	Piel	0.94-1.50	30-50% fitoeno; 5-24% fitoflueno; 5-16% violaxantina	(Yokoyama y White 1967; Xu <i>et al.</i> 2006)
Marsh	Pulpa	trazas-2.00	17-63% fitoeno; 0-15% fitoflueno; 0-18% zeaxantina	(Banet <i>et al.</i> 1981; Fanciullino <i>et al.</i> 2006; Xu <i>et al.</i> 2006)
Ray Ruby	Pulpa	9.38 ± 3.44	73% licopeno; 12% β-caroteno	(Fanciullino <i>et al.</i> 2006)
Ruby Red	Piel	7.46	40% fitoeno; 24% violaxantina	(Xu <i>et al.</i> 2006)
	Pulpa	1.11	43% β-caroteno; 22% fitoeno	(Xu <i>et al.</i> 2006)
Star Ruby	Piel	62.30	47% fitoeno; 19% licopeno	(Xu <i>et al.</i> 2006)
	Pulpa	17.00-53.00	48-57% licopeno; 13-16% β-caroteno; 20% fitoeno	(Fanciullino <i>et al.</i> 2006; Xu <i>et al.</i> 2006)

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

#### 6.4. Regulación de la biosíntesis de carotenoides en frutos cítricos

Los trabajos relativos a la regulación de la biosíntesis de carotenoides en cítricos son muy escasos, se han abordado recientemente y, se refieren únicamente a las naranjas `Navel´ y `Valencia´, a la mandarina `Satsuma´ y al limón `Lisbon´ (Ikoma *et al.* 2001; Kita *et al.* 2001; Kato *et al.* 2004; Rodrigo *et al.* 2004). En el flavedo de mandarinas y naranjas el cambio de coloración, de verde a naranja, que tiene lugar durante la maduración del fruto responde a un aumento del contenido de carotenoides y a una variación de los carotenoides

acumulados, disminuyendo la concentración de carotenoides característicos de tejido cloroplástico ( $\beta,\epsilon$ -carotenoides) y aumentando la concentración de  $\beta,\beta$ -xantofilas, principalmente la de violaxantina. El incremento del contenido de carotenoides parece ser el resultado de un aumento de la transcripción de los genes *PSY* y *PDS*, cuyos niveles de expresión correlacionan con el contenido de carotenoides en cítricos (Kato *et al.* 2004; Rodrigo *et al.* 2004). Además, la acumulación de mRNAs correspondientes a *ZDS* y *PTOX* también se incrementa, contribuyendo a aumentar la síntesis de carotenoides lineales y el flujo hacia esta ruta (Kato *et al.* 2004; Rodrigo *et al.* 2004). El cambio del perfil cualitativo de carotenoides que ocurre durante la maduración se explica por una disminución de la expresión del gen  $\epsilon$ -*LCY* (implicado en la biosíntesis de  $\beta,\epsilon$ -carotenoides) y aumento de la expresión del gen  $\beta$ -*CHX*, desviándose el flujo de la ruta de biosíntesis de carotenoides hacia la acumulación de  $\beta,\beta$ -xantofilas (Kato *et al.* 2004; Rodrigo *et al.* 2004). En el flavedo de la mandarina 'Satsuma' el nivel de expresión de  $\beta$ -*LCY* también aumenta durante la maduración del fruto, mientras que en las naranjas 'Valencia' y 'Navel' es constitutivo (Kato *et al.* 2004). En la pulpa de mandarinas y naranjas, donde el contenido de carotenoides aumenta de forma continuada durante la maduración del fruto, el patrón de expresión génica es, en general, muy similar al observado en flavedo, aunque su nivel de expresión es mucho menor, lo que explicaría la menor acumulación de carotenoides en este tejido (Kato *et al.* 2004). La ausencia de  $\beta,\epsilon$ -carotenoides en la pulpa de mandarina 'Satsuma' y naranja 'Valencia' se explica por la nula o baja expresión del gen  $\epsilon$ -*LCY* en este tejido de (Kato *et al.* 2004). Adicionalmente, existen evidencias que sugieren que el balance entre la expresión de los genes *PSY*, *PDS*, *ZDS* y  $\beta$ -*LCY* y el responsable de la hidroxilación del  $\beta$ -caroteno ( $\beta$ -*CHX*) puede originar la mayor o menor acumulación de  $\beta$ -criptoxantina que se observa en las distintas variedades de frutos cítricos (Kato *et al.* 2004). La acumulación de fitoeno en el flavedo del limón correlaciona con los bajos niveles de expresión de *PDS* (Kato *et al.* 2004).





## OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo ha sido la Caracterización, fisiológica y molecular, de la biosíntesis y acumulación de carotenoides durante la maduración de frutos cítricos de variedades con distinto grado de pigmentación. Este objetivo general se ha desarrollado en los siguientes objetivos específicos:

1.- Aislamiento y caracterización molecular y funcional de licopeno ciclasas de frutos cítricos.

2.- Análisis de la evolución del contenido y la composición de carotenoides y de la expresión de genes implicados en la biosíntesis de carotenoides en frutos cítricos que acumulan licopeno.

Para llevar a cabo este objetivo se seleccionaron dos mutantes que acumulan licopeno: la naranja `Cara Cara´ y el pomelo `Star Ruby´.

3.- Análisis de la evolución del contenido y la composición de carotenoides y de la expresión de genes implicados en la biosíntesis de carotenoides en frutos cítricos de variedades con distinto grado de pigmentación.

Para llevar a cabo este objetivo se seleccionaron cítricos de diferentes especies cuyos frutos presentan distinto grado de pigmentación, y que, por lo tanto, pueden tener diferencias importantes en la biosíntesis y acumulación de carotenoides. Los frutos seleccionados fueron mandarina (`Clemenules´) e híbridos de mandarina (`Fortune´ y `Nova´), que muestran alta pigmentación en la piel y la pulpa, naranja (`Navel´) de pigmentación media, y pomelo (`Marsh´), que se caracteriza por su baja coloración.







## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Material vegetal

#### 1.1. Frutos cítricos

Para llevar a cabo las distintas experiencias de esta Tesis Doctoral se han seleccionado mandarinas, naranjas y pomelos, que se caracterizan por un alto, medio y bajo contenido de carotenoides, respectivamente. Además, dentro de cada especie se han seleccionado variedades con diferencias significativas en el contenido y composición de carotenoides en el flavedo y la pulpa:

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

´Washington Navel´: Variedad de origen incierto, se cree que procede de Brasil a partir de una mutación gemaria de una de las variedades ´Selecta´ (Agustí 2000). Produce frutos de tamaño medio a grande, ligeramente ovalados, de corteza gruesa, un poco rugosa y relativamente fácil de pelar. En condiciones climáticas mediterráneas posee un color naranja medio.

´Cara Cara´: Originaria de Venezuela, es una mutación espontánea de la naranja ´Washington Navel´. Fruto muy similar al de la variedad de la que procede, aunque la coloración de su pulpa es roja (Saunt 2000; Lee 2001).

##### b) Pomelos (*Citrus paradisi*, Macf.)

´Marsh´: Pomelo blanco procedente de Florida (EE.UU.) (Agustí 2000). Produce frutos de tamaño grande, de corteza amarilla, muy fina y brillante. Su pulpa, también amarilla, es muy jugosa y sin apenas semillas.

´Star Ruby´: Pomelo rojo originado por radiación en 1959 a partir de semillas de pomelo blanco (Agustí 2000). Fruto de tamaño similar al de ´Marsh´, con áreas de color rojo, y pulpa roja intensa y sin semillas.

##### c) Mandarinas e híbridos de mandarinas

´Clemenules´: (*C. clementina*) Procedente de mutación espontánea de la Clementina ´Fina´ originada en Nules, Castellón (España), en 1953. Corteza algo rugosa, fácil de pelar, elevado contenido en zumo y sin semillas. Excelente calidad organoléptica. Es una variedad de media temporada, recolectándose entre los meses de noviembre y enero.

Fortune: Híbrido de mandarina ´Clementina´ (*C. clementina* Hort. x *C. reticulata*) obtenido por Furr (1964) en Indio, California (EE.UU.) (Agustí 2000).

Fruto de tamaño pequeño, de color naranja intenso y corteza fina y adherida. Pueden encontrarse algunas semillas. Su recolección se inicia en febrero.

‘Nova’: Es un híbrido de mandarina Clementina (*C. clementina* Hort.) x Tangelo ‘Orlando’ (*Citrus reticulata* x *Citrus paradisi* Macf.) obtenido en Orlando, Florida (EE.UU.), en 1942 (Agustí 2000). Fruto de tamaño superior al de ‘Clemenules’, aplanado, de color naranja intenso, y con una corteza fina, compacta, y fuertemente adherida. En ocasiones presenta semillas. Su recolección se inicia en diciembre.

## 1.2. Toma de muestra de material vegetal

### a) Frutos

Con el fin de tener una buena representación del desarrollo y la maduración del fruto, de cada una de las especies y variedades descritas en el apartado 1.1, se cosecharon frutos a partir del mes de junio, en estadio verde-inmaduro, a intervalos de 3-4 semanas hasta el momento del cambio de color, a partir del cual se recolectaron frutos a intervalos más cortos de tiempo hasta la fecha de maduración comercial de cada una de las variedades.

En cada fecha de muestreo se cosecharon al menos 10 frutos. Para cada variedad se utilizaron un mínimo de 3 árboles, efectuándose la recolección al azar, alrededor de todo el árbol.

En todos los casos, los frutos se recolectaron de árboles adultos, injertados sobre patrón citrange ‘Troyer’, en plena producción y con unas condiciones de cultivo adecuadas. Las naranjas y los pomelos se recolectaron del banco de germoplasma del IVIA (Moncada, Valencia), mientras que las mandarinas y los pomelos ‘Star Ruby’ utilizados para el estudio de la influencia de la luz en la coloración se recolectaron de una parcela comercial localizada en Llíria (Valencia).

Todas las muestras se recolectaron durante la campaña 2003-2004. En el caso de las variedades de naranja y pomelo se realizó una réplica biológica durante la campaña 2004-2005.

El flavedo y la pulpa de los frutos recolectados se separaron con un bisturí, se congelaron inmediatamente en N<sub>2</sub> líquido, se homogeneizaron utilizando un molinillo sin que se descongelaran las muestras y se almacenaron a -80 °C para su posterior análisis.

## b) Hojas, tallos, raíces y pétalos.

Hojas adultas de *C. sinensis* v. 'Navel' y v. 'Cara Cara' y de *C. paradisi* v. 'Marsh' y v. 'Star Ruby' fueron separadas del árbol e inmediatamente congeladas en N<sub>2</sub> líquido. Posteriormente, sin que se descongelaran, las muestras fueron homogeneizadas en mortero de porcelana y almacenadas a -80 °C para su posterior análisis.

Del genotipo *C. sinensis* v. 'Navel' se muestrearon además hojas jóvenes, tallos, raíces y pétalos de flores en dos estadios de desarrollo (preantesis y postantesis). Los tejidos fueron recogidos e inmediatamente congelados en N<sub>2</sub> líquido y posteriormente procesados de la misma forma que las hojas adultas.

## 2. Estimación del índice de color

El color del flavedo y de la pulpa se determinó usando un colorímetro Minolta CR-330 y midiendo las coordenadas Hunter 'a' y 'b'. La coordenada denominada 'a' (croma) representa los cambios en el color desde verde (valores negativos) a rojo (valores positivos), y la coordenada denominada 'b' (tono) representa los cambios en el color desde azul (valores negativos) a amarillo (valores positivos). El color se expresó como la relación de las coordenadas Hunter *a* y *b*, donde valores negativos corresponden a coloración verde, próximos a cero a amarillo, y positivos a naranja (Stewart y Wheaton 1972). En el caso del flavedo se realizaron medidas en tres zonas de la región ecuatorial de cada fruto. En el caso de la pulpa los frutos se seccionaron transversalmente y se realizaron tres medidas sobre la misma mitad de cada fruto.

## 3. Cepas bacterianas, plásmidos y medios de cultivo

Se han utilizado las cepas de *Escherichia coli* y vectores cuyas principales características y utilidades se describen a continuación:

### 3.1. Cepas bacterianas

XL1-blue (Stratagene). *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, *lac*, F' *proAB*, *lac<sup>+</sup>*  $\Delta$ M15, *Tn10* (tet<sup>r</sup>). Cepa bacteriana con resistencia a tetraciclina. Presenta la mutación  $\Delta$ M15 del gen *lacZ* que permite la  $\alpha$ -complementación con el extremo amino-terminal de la  $\beta$ -galactosidasa.

DH5 $\alpha$  (Hanahan 1983). *supE44* -*lacU169* $\Delta$  (*phi-80 lacZ*- $\Delta$ -M15) *hsdR17* *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1* *relA1*. Cepa bacteriana que se caracteriza por una alta frecuencia de transformación de plásmidos. Presenta la mutación  $\Delta$ M15 del gen

*lacZ* que permite la  $\alpha$ -complementación con el extremo amino-terminal del gen *lacZ*.

### 3.2. Plásmidos

pBluescript SK (+/-) (Stratagene). Fagémido de 2.95 kb que deriva de pUC19, utilizado en este trabajo como vector de clonación. La región ColE1 es el origen de replicación en ausencia del fago auxiliar. Confiere resistencia a ampicilina y permite identificación por color de recombinantes dado que expresa el extremo amino-terminal del gen *lacZ*.

pGem-T Easy (Promega). Plásmido de 3.01 kb linearizado con *EcoRV*, utilizado en este trabajo para la clonación de productos de PCR. Presenta una timidina protuberante en los extremos 3' que mejora la eficacia de ligación, ya que evita la recircularización del vector, y proporciona un extremo compatible para productos de PCR generados por algunas polimerasas termoestables que añaden una adenina a los extremos 3' de los fragmentos amplificados. Confiere resistencia a ampicilina a los recombinantes y permite su selección por color. El sitio de clonación múltiple posee a ambos lados dianas para las enzimas de restricción *EcoRI*, *BstZI* y *NotI*, lo que permite liberar el inserto mediante una digestión simple.

pCR® 2.1 (Invitrogen). Plásmido de 3.90 kb diseñado para clonar directamente productos de PCR, por el mismo procedimiento de la timidina protuberante que el pGem-T. Contiene el fragmento del gen *lacZ* de  $\alpha$ -complementación para selección de transformantes por color, y confiere resistencia a ampicilina y a kanamicina.

pACCRT-EIB (Misawa y Shimada 1998). Plásmido de 7.89 kb resultante de la inserción, en el sitio *EcoRV* del vector pACYC184, de un fragmento de 3.75 kb conteniendo los genes *crtE* (GGPP sintasa), *crtB* (fitoeno sintasa) y *crtI* (fitoeno desaturasa) de *Erwinia uredovora*. Los enzimas codificados por estos genes dotan a *E. coli* de la capacidad de producir licopeno a partir de su contenido endógeno de isopentil pirofosfato. Confiere resistencia a cloranfenicol y coloración rojiza a los transformantes.

Este plásmido fue amablemente cedido por el Prof. Misawa (Instituto de Biotecnología Marina de Iwate, Japón) para la realización de este trabajo.

### 3.3. Medios de cultivo

Para el crecimiento bacteriano se utilizaron los siguientes medios:

LB (Luria-Bertani): bacto triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%.

LB- agarosa: de igual composición a LB más 1.5% de agarosa.

SOC: bacto triptona 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 10mM, KCl 2.5mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM, MgSO<sub>4</sub> 10mM, glucosa 20mM.

Los medios de cultivo bacteriano se esterilizaron mediante autoclavado a 121 °C y 1 atm durante 20 min.

En el caso de ser necesario los medios de cultivo se suplementaron con los siguientes antibióticos: ampicilina (100 µg/mL, para selección y/o mantenimiento de colonias/cultivos portadoras de los plásmido pGem-T ó pCR<sup>®</sup>2.1), tetraciclina (20 µg/mL, para siembras en triple estría de la cepa XL1-Blue), cloranfenicol (50 µg/mL, para selección y/o mantenimiento de colonias/cultivos portadoras del plásmido pACCRT-EIB).

#### 4. Reacciones de ligación

Se llevaron a cabo para unir moléculas de DNA a un vector de clonación.

##### 4.1. Ligación de productos de PCR

Las reacciones de ligación en los plásmidos pGem-T y pCR<sup>®</sup>2.1 se llevaron a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante utilizando productos de PCR previamente purificados con el *kit* 'High Pure PCR Product Purification Kit' (Roche Applied Sciences). La cantidad de inserto se calculó en función de su tamaño y de la relación molar deseada (generalmente 3:1 inserto:plásmido, recomendada por ambas casas comerciales). La mezcla de reacción se preparó en frío en un tubo de 0.5 mL y su composición fue 1 µL de tampón de reacción 10X (suministrado por las casas comerciales), 1 µL de T4-DNA ligasa (Fermentas, 5U/µL), 0.5-1 µL de vector de ligación (50 ng/µL), X µL de inserto y agua hasta un volumen final de 10 µL. La reacción se incubó durante la noche a 4 °C (pGem-T) ó 14 °C (pCR<sup>®</sup>2.1).

##### 4.2. Ligación de productos de digestión

Tanto el plásmido (pBluescript SK) como el DNA a insertar se digirieron con la/las enzimas de restricción adecuados y se purificaron en gel de agarosa con el *kit* 'High Pure PCR Product Purification Kit' (Roche Applied Sciences). Las condiciones utilizadas para cada enzima de restricción fueron las recomendadas por las distintas casas comerciales. En general las reacciones se llevaron a cabo utilizando 100 ng de plásmido, una cantidad equimolar del DNA a ligar, 1 µL de

tampón de ligación (Tris-HCl 200 mM pH 7.6, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, DTT 50 mM), 1 µL de T4-DNA ligasa (Fermentas, 5U/µL) y agua hasta un volumen final de 10 µL. La reacción se incubó a 16 °C durante la noche.

## 5. Transformación de *E.coli*

### 5.1. Electroporación

A partir de un glicerinado de la cepa de *E.coli* DH5α se sembró mediante triple estría una placa con medio LB-agar y se incubó a 37 °C durante la noche. Una colonia aislada procedente de la placa se inoculó en 20 mL de medio LB y se cultivó durante la noche a 37 °C en agitación. Al día siguiente 5 mL del preinoculo se añadió a un matraz de 1 L que contenía 500 mL de medio LB y se incubó a 37 °C en agitación hasta que alcanzó una absorbancia entre 0.5 y 0.6 a 600 nm. A partir de este punto todas las manipulaciones se realizaron en frío. Las células se centrifugaron 10 min a 1100 g, se descartó el sobrenadante y las células se lavaron 2 veces con 400 mL de agua a 4 °C, centrifugando cada vez 10 min a 1100 g. A continuación se resuspendieron en 10 mL de glicerol 10% (a 4 °C) y se centrifugaron 10 min a 1100 g. Finalmente las células se resuspendieron en 1 mL de glicerol 10% (a 4 °C) y se distribuyeron en alícuotas de 40 µL en tubos Eppendorf estériles, que se congelaron inmediatamente en N<sub>2</sub> líquido y se almacenaron a -80 °C hasta el momento de su transformación.

A una alícuota de 40 µL de células electrocompetentes descongelada en hielo se añadió el vector transformante (2 µL de la ligación ó entre 50 y 100 ng de DNA plasmídico purificado, en un volumen máximo de 10 µL). Esta mezcla se introdujo en cubetas de 2 mm de separación de electrodos (BioRad) preenfriadas en hielo, y se introdujeron en un aparato 'Gene Pulser<sup>TM</sup>' (BioRad). Las condiciones de electroporación utilizadas fueron 125 µF de conductancia, 200 Ω de resistencia y un voltaje de 2.5 V. Tras el pulso eléctrico se añadió inmediatamente a la cubeta 1 mL de medio SOC a temperatura ambiente, se resuspendieron las células transformadas y se transfirieron a un tubo Eppendorf estéril, donde se incubaron a 37 °C con agitación durante 1 h. Finalmente, las células se sembraron en placas Petri con medio LB-agar conteniendo X-Gal (1µL/mL de una solución de 20 mg/mL en formamida) suplementado con los antibióticos adecuados.

## 5.2. Quimioporación con CaCl<sub>2</sub>

A partir de un glicerinado de la cepa de *E. coli* a transformar se sembró en triple estría en medio LB agar y se dejó incubar a 37 °C durante la noche. Al día siguiente 5 mL de LB se inocularon con una colonia aislada y se incubaron a 37 °C con agitación durante la noche. Al día siguiente un matraz con 50 mL de medio LB se inoculó con 2 mL del precultivo, dejándose a 37 °C en agitación durante 3 h aproximadamente, hasta alcanzar una absorbancia de 0.5-0.6 a 600 nm. Las células se centrifugaron durante 5 min a 3600 g a 4 °C y el sedimento se resuspendió con 1 mL de CaCl<sub>2</sub> 0.1M frío (4 °C). Tras centrifugar de nuevo en las mismas condiciones el sedimento se resuspendió en 7 mL de CaCl<sub>2</sub> 0.1M a 4 °C y se incubó 20 min en hielo. Finalmente las células se centrifugaron durante 5 min a 3600 g a 4 °C y se resuspendieron en 1.8 mL de CaCl<sub>2</sub> 0.08 M y glicerina 15%. Las células se alicuotaron en cantidades de 200 µL en tubos Eppendorf estériles y se almacenaron a -80 °C.

La transformación se llevó a cabo diluyendo en 100 µL de CaCl<sub>2</sub> 0.1M frío (4 °C) la mezcla de la ligación (10 µL) o el plásmido recombinante (100 ng en un volumen máximo de 10 µL), y añadiendo esta mezcla a 200 µL de las células competentes obtenidas e incubando la mezcla durante 1 h en hielo. Después se dio un choque de calor a 42 °C durante 2 min, se añadieron 500 µL de medio LB, y se incubó durante 1 h a 37 °C en agitación. Finalmente las células se sembraron en placas Petri con medio LB-agar, X-Gal (1µL/mL de una solución de 20 mg/mL en formamida) y los antibióticos adecuados.

## 6. Extracción y purificación de ácidos nucleicos

### 6.1. Aislamiento y purificación de DNA plasmídico de *E.coli*

La purificación de DNA plasmídico se realizó a partir de 3 mL de cultivo bacteriano con el kit 'Gen Elute™ Plasmid Miniprep Kit' (Sigma). Se inocularon 5 mL de LB suplementado con antibiótico con una colonia aislada y se incubaron a 37 °C con agitación (200 rpm) durante la noche. Al día siguiente se recuperaron las células centrifugando el cultivo 1 min a 11388 g. Después de eliminar el medio de cultivo se siguió el protocolo descrito por el fabricante hasta la obtención del DNA plasmídico, recuperándose el plásmido con 50 µL de agua bidestilada (MilliQ) estéril.

## 6.2. Extracción de DNA genómico

### a) Para análisis Southern

Para la extracción de DNA genómico de hojas jóvenes se homogenizó el tejido en N<sub>2</sub> líquido, y se procedió según el método descrito por Dellaporta *et al.* (1983), con ligeras modificaciones. El tejido homogenizado (1 g) se transfirió a un tubo conteniendo 15 mL de tampón de extracción (Tris 100 mM pH 8.0, EDTA 50 mM pH 8.0, NaCl 500 mM). A continuación se añadieron 0.5 mL de SDS 20%, se agitó y se incubó 10 min a 65 °C. Tras la incubación se añadieron 5 mL de KAC 5M, se agitó y se incubó en hielo durante 20 min. Tras centrifugar el extracto a 17000 g durante 20 min el sobrenadante se filtró, a través de una capa de Miracloth, a un nuevo tubo de 50 mL donde el DNA se precipitó con 0.8 V de isopropanol e incubación a -20 °C durante al menos 20 min. Seguidamente, se centrifugó 20 min a 10000 g y se eliminó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 0.7 mL de TE (Tris 50 mM pH 8.0, EDTA 10 mM pH 8.0) sin agitar, manteniéndolo en hielo durante 30 min. Una vez disuelto se transfirió a un Eppendorf y se centrifugó 10 min a 12000 g. El sobrenadante se recuperó en un nuevo tubo Eppendorf al que se añadieron 75 µL de NaAc 3 M y 500 µL de isopropanol. Tras incubar en hielo durante 30 min la muestra se centrifugó 1 min a 12000 g. El precipitado se lavó con etanol 80% y tras 10 min de centrifugación a 10000 g fue resuspendido en 30 µL de agua bidestilada estéril. A continuación, se extrajo dos veces con 1 V fenol: cloroformo, y se centrifugó 1 min a 12000 g, recuperándose la fase superior acuosa. Posteriormente, se añadieron 2.5 V de etanol y 0.1 V de NaAc 3 M y se incubó en hielo durante 30 min. Tras centrifugar a 12000 g 10 min el precipitado se dejó secar y finalmente se resuspendió en 100-500 µL de agua bidestilada estéril. La cantidad de DNA genómico obtenido se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm.

### b) Para análisis de SNPs (‘single nucleotide polymorphism’)

Tejido de hojas (200 mg) previamente homogenizado en N<sub>2</sub> líquido se transfirió a un tubo Eppendorf conteniendo 400 µL de tampón de extracción (Tris-HCl 200 mM pH 7.5; NaCl 250 mM; EDTA 25 mM pH 8.0; SDS 0.5%). El extracto se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con agitación y posteriormente se centrifugó a 11400 g durante 1 min. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf y se añadieron 400 µL de fenol:cloroformo:isoamilico (25:24:1). Después de centrifugar 10 min a 3100 g se recuperó la fase superior y se añadieron 400 µL de cloroformo:isoamilico (24:1).

Se centrifugó nuevamente 10 min a 3100 g y el DNA se precipitó añadiendo al sobrenadante 0.1 V de NaAc pH 5.2 y 2 V de isopropanol, mezclando suavemente por inversión. Se centrifugó durante 10 min a 11400 g y el DNA precipitado se lavó con etanol 70% y etanol absoluto. Finalmente, el DNA se resuspendió en 50  $\mu$ L de agua bidestilada estéril. Para determinar la concentración del DNA se midió su absorbancia a 260 nm.

### 6.3. Extracción y purificación de RNA total

En un tubo de 50 mL, 2 g de tejido previamente congelado y homogeneizado en  $N_2$  se mezcló con 5 V (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%,  $\beta$ -mercaptoetanol 1%) y 2.5 V de fenol equilibrado a pH 8.0 con Tris-HCl (USB). Tras incubar durante 15 min a 65 °C, se dejó enfriar en hielo y se añadieron 2.5 V de cloroformo:isoamilico (24:1). Los restos vegetales se eliminaron por centrifugación a 4000 g durante 20 min y el sobrenadante se reextrajo con 1 V de fenol:cloroformo:isoamilico (25:24:1). Tras centrifugar 20 min a 4000 g se recuperó la fase superior y se precipitaron los ácidos nucleicos con 1.5 V de etanol absoluto frío. Inmediatamente se centrifugó 20 min a 26900 g, y se lavó el precipitado con 5 mL de etanol 70%. El sedimento se resuspendió en 7.5 mL de TESa (Tris-HCl 10 mM pH 8.0;  $Na_2$ EDTA 5 mM; Sarkosyl 0.1%) calentando a 65 °C durante 15 min, y se añadieron 7.5 mL de agua bidestilada estéril y 5 mL de CLi 12 M. Después de incubar durante la noche a 4 °C se centrifugó a 26900 g durante 1 h. El RNA precipitado se lavó con 1.5 mL de etanol 70% frío y se resuspendió en 1 mL de AcNa 3M (pH 6.0). Tras centrifugar a 11400 g durante 5 min se realizó un lavado con etanol 70% frío. El RNA total se resuspendió en agua bidestilada estéril y su concentración y calidad fueron determinados midiendo su absorbancia a 230, 260, 280 y 320 nm.

### 7. Análisis Northern

Cada muestra de RNA total (8-12  $\mu$ g) se llevó a un volumen de 10  $\mu$ L con agua bidestilada estéril y se le añadieron 25  $\mu$ L de una mezcla que contenía 16.43  $\mu$ L de formamida desionizada, 5.26  $\mu$ L de formaldehído 37%, 3.29  $\mu$ L de MOPS 10X y 0.032  $\mu$ L de BrEt (10 mg/mL). La mezcla se incubó 10 min a 65 °C y tras enfriarla 5 min en hielo se añadieron 3.5  $\mu$ L de tampón de carga (glicerol 50%, EDTA 1mM, azul de bromofenol 0.25%, xilene cianol FF 0.25%). Las muestras se cargaron en gel desnaturizante de agarosa 1.5% conteniendo formaldehído

6.7% y tampón MOPS 1X pH 7.0 (MOPS 100mM, NaAc 40mM, EDTA 5mM) y se desarrolló la electroforesis en tampón MOPS 1X a 70-80V.

Tras la electrofóresis el RNA fue transferido por capilaridad a membranas de Nylon Hybond-N<sup>+</sup> (Amersham International, UK) empleando tampón 20xSSC (NaCl 3M, citrato sódico 300 mM pH 7.0) según el método de transferencia Northern descrito por Sambrook *et al.* (1989). Los RNAs se fijaron covalentemente a la membrana mediante irradiación UV  $12 \cdot 10^4 \mu\text{J}/\text{cm}^2$  en un Crosslinker UVC 500 (Hoefer Inc.).

## 8. Análisis Southern

Una alícuota de DNA genómico (10  $\mu\text{g}$ ) de naranja 'Navelate' (*Citrus sinensis*) se incubó con distintas enzimas de restricción (*HindIII*, *KpnI* y *EcoRI*; Boehringer-Roche) en las condiciones adecuadas para conseguir digestiones completas de DNA. Las muestras se sometieron posteriormente a separación electroforética en geles de agarosa al 2%. El DNA se visualizó mediante tinción con BrEt. Finalizada la electroforésis se incubó el gel en una solución HCl 0.2M con agitación durante 15 min a temperatura ambiente para favorecer la fragmentación de moléculas de DNA de alto peso molecular. A continuación se realizó una incubación de 30 min en una solución NaCl 1.5 M, Tris-HCl 0.5M pH 7.4. Finalmente, se lavó en una solución 20X SSC unos minutos. La transferencia a membrana de nylon Hybond-N<sup>+</sup> (Amersham International, UK) y la fijación del DNA a la membrana se realizó de forma idéntica a lo descrito para el análisis Northern (apartado 7).

## 9. Marcaje de las sondas

Como moldes para las reacciones de marcaje se utilizaron cDNAs de *C. sinensis*, parciales o de longitud completa, aislados previamente en el laboratorio (Rodrigo *et al.* 2004) correspondientes a los genes *PSY* (Nº Acc. AY204550), *PDS* (Nº Acc. AJ319761), *ZDS* (Nº Acc. AJ319762), *PTOX* (Nº Acc. AY533825),  $\beta$ -*LCY* (Nº Acc. AY533826),  $\epsilon$ -*LCY* (Nº Acc. AY533827),  $\beta$ -*CHX* (Nº Acc. AY533828) y *ZEP* (Nº Acc. AY533829).

En la base de datos del NCBI se identificó un EST de *C. sinensis* (Nº Acc. CF504139) con elevada homología (77% de identidad a nivel de aminoácidos) con el gen  $\epsilon$ -*CHX* de *Arabidopsis thaliana* (*LUT1*). En base a la secuencia nucleotídica de CF504139 se diseñaron cebadores específicos (MJ89 y MJ90; ver Tabla 6), y

mediante RT-PCR se amplificó un fragmento de 221 nct a partir de cDNA de flavedo de frutos verde-inmaduro de naranja `Navel´.

Como molde para la reacción de marcaje correspondiente a la sonda de *DXS* se utilizó un EST de *C. sinensis* disponible en nuestro grupo de trabajo, 77% idéntico a nivel de aminoácidos a *DXS* de *Catharanthus roseus* (Nº Acc. AJ011840) (Gonzalez-Candelas *et al.* resultados no publicados). Como molde para la reacción de marcaje correspondiente a la sonda *HDS* se usó un fragmento de 191 nct de la secuencia nucleotídica de CX293560, obtenida a partir de una genoteca de *Citrus clementina*, 94% de idéntica a nivel de aminoácidos a GcpE de *Lycopersicon esculentum* (Nº Acc. AAO15447). Como molde para la reacción de marcaje correspondiente al gen *HDR* se empleó un clon de *Citrus clementina* de 463 nct (Nº Acc. CX298449) 84% idéntico a nivel de aminoácidos al gen *HDR* de *Arabidopsis thaliana* (Nº Acc. AAW82381).

A partir de los distintos cDNAs mencionados anteriormente, clonados en pBluescript o pGem-T, se realizó una primera amplificación por PCR utilizando como molde 10 ng de DNA plasmídico, y el par de cebadores específico de cada gen indicado en la Tabla 6. Las condiciones de PCR fueron 94 °C durante 3 min, seguido de 35 ciclos 94 /55 /72 °C durante 30 /30 /90 s, respectivamente, y 72 °C durante 10 min. Los fragmentos de DNA amplificados se purificaron con el *kit* `High Pure PCR Product Purification Kit´ (Roche Applied Sciences) y se determinó su concentración espectrofotométricamente.

Las sondas se marcaron con  $\alpha(^{32}\text{P})\text{-dATP}$  (10  $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$ ) mediante amplificación lineal del DNA utilizando el *kit* `Strip-EZ™ PCR´ (Ambion). Para la síntesis de las sondas se utilizaron 200 ng de DNA purificado y el cebador antisentido, de modo que el DNA amplificado es complementario al mRNA de cada uno de los genes. Las condiciones de PCR fueron 94 °C durante 3 min, seguido de 35 ciclos 94 /55 /72 °C durante 30 /30 /90 s, respectivamente, y 72 °C durante 10 min.

El isótopo no incorporado se eliminó utilizando columnas `MicroSpin™ S-300 HR´ (Amersham-Pharmacia Biotech). La radiactividad incorporada a la sonda se determinó con un contador de centelleo líquido 1409 Rackbeta (LKB Wallac).

Tabla 6: Combinaciones de cebadores utilizados en la amplificación por PCR de los fragmentos utilizados como sondas. Todas las secuencias nucleotídicas se indican en orientación 5' → 3'. Las secuencias subrayadas corresponden a sitios de restricción introducidos en los cebadores con el fin de clonarlos. W, A/T; Y, C/T; S, G/C; R, A/G; K, T/G. S, sentido; AS, reverso.

Gen amplificado	Cebador			Longitud amplicón (nct)
	Nombre	Secuencia	Orientación	
<i>DXS</i>	1R	TCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGT	S	246
	2R	AGCGTGGTTCGCGGCCGAGGT	AS	
<i>HDS</i>	1R	TCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGT	S	191
	2R	AGCGTGGTTCGCGGCCGAGGT	AS	
<i>HDR</i>	M13F	CGTTGTAAAACGACGGCCAG	AS	463
	M13R	CACACAGGAAACAGCTATGAC	S	
<i>PSY</i>	MJ9PS	GGACAGATGAGCTCGTTGATGG	S	330
	MJ10PS	GCTGCATTGTAGACGCTCTCTG	AS	
<i>PDS</i>	PDSF1	<u>GTGGATCCGGTTTGAYMGRAAACTGAA</u>	S	418
	PDSR1	<u>CTAAGCTTGRCCTTCCATNGAAGC</u>	AS	
<i>ZDS</i>	ZDSF1	<u>CAGAAGCTTCTCTGTTTGCG</u>	S	766
	ZDSR1	<u>ATTGGATCCATACTNTCNATGTAATC</u>	AS	
<i>PTOX</i>	MJ21	GCTCTAGARASCTTTGGYTGGTGGAG	S	200
	MJ22	CGGAATTCMGARAARTGRTATGCCATTCT	AS	
<i>ε-LCY</i>	MJ33	GCGAATTCGCAGCATCAGGGAAGCTA	S	400
	MJ34	CATCTAGACAGCACCATATGCGAGG	AS	
<i>ε-CHX</i>	MJ89	CGGCACCAAGTATGCTAAAGG	S	221
	MJ90	CAGCAGTTCCATTTAGAGGG	AS	
<i>β-LCY1</i>	MJ29	<u>GCTCTAAGACAAGTTTCAGAGGCG</u>	S	517
	MJ30	<u>CCGAATTCTTGTTTCAGATGCG</u>	AS	
<i>β-LCY2</i>	MJ35	ACTCTAGACCTATTTCCATTAGGCCGC	S	250
	MJ36	GCCTCGAGCCTTGACACTATGACGCG	AS	
<i>β-CHX</i>	MJ25	<u>TGGAATTCTTGGGCACGATGGGCTC</u>	S	414
	MJ26	<u>TCTCTAGACTGATCTCCTTCTCC</u>	AS	
<i>ZEP</i>	MJ15	CAAGGTGGATGCATGGCCATWGAGG	S	272
	MJ16	CCACCAACTCTCCWGGATGGG	AS	

## 10. Hibridaciones, lavados y exposiciones

Las membranas se prehibridaron durante al menos 2 h a 65 °C en tampón Church (SDS 0.1 %, Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0.7 M y EDTA 2.5 mM). Una vez finalizada la prehibridación se añadieron entre 8 y 10 mL de `ULTRAhyb hybridisation buffer` (Ambion) y se prehibridaron un mínimo de 30 min a 42 °C. A continuación se añadieron 2•10<sup>6</sup> cpm mL<sup>-1</sup> de sonda marcada y las membranas se incubaron a 42 °C durante 16 h. Tras la hibridación, los filtros se lavaron dos veces con 2 X SSC y 0.1% SDS pH 7.0 durante 10 minutos a 42 °C, una vez con 0.1 X SSC y 0.1% SDS pH 7 durante 10 min a 42 °C y, una vez con 0.1 X SSC y 0.1% SDS pH 7.0 durante 15 min a 47 °C.

Las membranas se expusieron, durante períodos de tiempo variables, en pantallas `BAS MP 2040 Imaging Plate` (Fuji Photo Film Co., LTD). Tras la exposición las pantallas se densitometraron con un sistema de adquisición de imágenes FLA 3000 V1.12 (Fuji Photo Film Co., LTD) y la intensidad de las señales de hibridación se cuantificó con el programa Image Gauge V4.0. (Science Lab 98, Fuji Photo Film Co., LTD).

Con el fin de normalizar los resultados las membranas se hibridaron con un fragmento del gen 26S rRNA de *Citrus sinensis* (Nº Acc. AJ969115) previamente disponible en el laboratorio (Ballester *et al.* 2006). En cada una de las hibridaciones se cuantificó la intensidad de la señal de hibridación en cada una de las carreras, y dicho valor se normalizó respecto al de la hibridación correspondiente al gen 26S rRNA.

Las sondas se eliminaron de las membranas siguiendo el procedimiento y con los reactivos incluidos en el *kit* de marcaje `Strip-EZ<sup>TM</sup> PCR` (Ambion).

## 11. Síntesis de cDNA

La síntesis de cDNAs se realizó a partir de 1µg de RNA total extraído según se indica en el apartado 6.3 de este capítulo. Con el fin de evitar la presencia de DNA genómico el RNA total se trató previamente con DNasa I libre de RNasa (Boehringer Mannheim). Al RNA total (1-5 µg en un volumen de 11 µL de agua bidestilada estéril) se le añadió 1µL (500 ng/µL) de oligo(dT)<sub>18</sub> (Invitrogen), se calentó 5 min a 65 °C y se enfrió rápidamente en hielo. A continuación se añadieron 4 µL de `5X First Strand Buffer` (Tris-HCl 250 mM pH 8.3; KCl 375 mM; MgCl<sub>2</sub> 15mM), 1µL de DTT (solución acuosa 200 mM) y 1 µL de dNTPs 10 mM. La mezcla se incubó 2 min a 42 °C, se añadieron 200 unidades de SuperScript<sup>TM</sup> II RT

(Invitrogen) y se incubó 50 min a 42 °C. La reacción se inactivó calentando 15 min a 70 °C.

## 12. Reacciones de amplificación de DNA (PCR)

Las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) se realizaron en un volumen final de 25 ó 50  $\mu\text{L}$ , y la composición de la mezcla fue: 1X tampón de reacción  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  160 mM; Tris-HCl 670 mM pH 8.8; Tween-20 0.1%],  $\text{MgCl}_2$  1.5 mM, dNTPs 0.1 mM, cebador sentido 0.1  $\mu\text{M}$ , cebador antisentido 0.1  $\mu\text{M}$  y *EcoTaq* DNA polimerasa 0.04 U/ $\mu\text{L}$  (Ecogen, 5 U/ $\mu\text{L}$ ).

Las condiciones de PCR fueron, en general, 94 °C durante 3 min, seguido de 35 ciclos 94 /56 /72 °C durante 30 /60 /90 s, respectivamente, y 72 °C durante 10 min. Habitualmente se llevaron a cabo utilizando termocicladores Techne (modelos FPR0G05D y FGENFLPD).

En el caso de ser necesaria la purificación del producto de la reacción de amplificación se utilizó el *kit* 'High Pure PCR Product Purification Kit' (Roche Applied Sciences), siguiendo las instrucciones del fabricante.

## 13. Aislamiento de genes que codifican licopeno ciclasas (LCYs) en cítricos

### 13.1. Aislamiento y clonación de cDNAs correspondientes a $\beta$ -LCYs

Para la amplificación de los cDNAs que contienen las regiones codificantes correspondientes a las enzimas  $\beta$ -licopeno ciclasas ( $\beta$ -LCYs) se diseñaron cebadores en los extremos 5' y 3' de cada gen, conteniendo, en el caso del cebador sentido el codón de inicio, y en el cebador antisentido el codón de parada. Además, en el caso del cebador sentido, se introdujo el número de nucleótidos adecuado para que, al clonar el fragmento en el vector pGem-T, el codón de inicio del gen estuviera en pauta de lectura con el del gen *lacZ* del plásmido pGem-T (Promega).

Los cebadores para la amplificación de  $\beta$ -*LCY1* (MJ56 y MJ57; Tabla 7) y  $\beta$ -*LCY2* (MJ69 y MJ66; Tabla 7) se diseñaron sobre secuencias de DNA genómico de *Citrus sinensis* anotadas en la base de datos del NCBI como  $\beta$ -licopeno ciclasa (Nº Acc. AY094582) y capsantina-capsorrubina sintasa (Nº Acc. AF169241), respectivamente.

Las reacciones de amplificación de los cDNAs se realizaron según el procedimiento descrito en el apartado 12. Las condiciones de la reacción fueron: 94 °C durante 3 min, seguido de 35 ciclos de 94 /58 /72 °C durante 30 /30 /90 s, respectivamente, y 72 °C durante 10 min. Se realizaron un mínimo de dos

amplificaciones independientes a partir de cada cDNA. Los productos purificados de estas reacciones se ligaron en el vector pGem-T (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante y las construcciones resultantes se utilizaron para transformar *E.coli* (cepa XL1-Blue) (apartado 5.1). La presencia y orientación del inserto se comprobó mediante amplificación por PCR de DNA plasmídico utilizando como cebadores M13F (específico de pGem-T) y el cebador sentido específico de cada una de las secuencias. Posteriormente, la identidad y orientación del inserto se verificó mediante secuenciación (apartado 18). Los plásmidos recombinantes portadores de los cDNAs que contienen las secuencias codificantes de  $\beta$ -*LCY1* y  $\beta$ -*LCY2* se denominaron pGem-lcy1 y pGem-lcy2, respectivamente.

Tabla 7: Cebadores utilizados para la amplificación de  $\beta$ -*LCYs* de frutos cítricos. Se subrayan los codones de inicio (ATG) y de parada (TTA, TCA). Las secuencias nucleotídicas se indican en orientación 5' → 3'.

Gen amplificado	Cebador		
	Nombre	Secuencia	Orientación
$\beta$ - <i>LCY1</i>	MJ56	GCTCTAGCCTTGTAGGAAAGCC <u>ATGG</u>	S
	MJ57	GCGAATTCGGTGCACCT <u>TAATCTGTATC</u>	AS
$\beta$ - <i>LCY2</i>	MJ69	GC <u>ATGG</u> CAACTCTTCTTAGCCCG	S
	MJ66	GCCTCGAGATCTT <u>CAAATGGTTTCAAG</u>	AS

Para cada una de las especies y variedades de cítricos en las que se tenía interés en estudiar las  $\beta$ -*LCYs* se sintetizaron, según el procedimiento descrito en el apartado 11, un mínimo de dos cDNAs independientes a partir de distintas muestras de RNA total. Las especies y variedades, así como los tejidos y el estadio de maduración de los frutos utilizados para la síntesis de los distintos cDNAs se indican en la Tabla 8.

Tabla 8: Material vegetal utilizado para la obtención de cDNAs de los genes  $\beta$ -*LCY1* y  $\beta$ -*LCY2*.

Especie	Variedad	Estadio fruto	Tejido	Gen amplificado
<i>C. sinensis</i>	Navel	Inmaduro	Flavedo $a/b +0.24$	<i>Cs<math>\beta</math>LCY1</i>
		Maduro	Pulpa $a/b -0.23$	<i>Cs<math>\beta</math>LCY1</i> y <i>Cs<math>\beta</math>LCY2</i>
		Maduro	Flavedo $a/b +0.54$	<i>Cs<math>\beta</math>LCY2</i>
	Cara Cara	Maduro	Flavedo $a/b +0.51$	<i>Cs<math>\beta</math>LCY1</i> y <i>Cs<math>\beta</math>LCY2</i>
		Maduro	Pulpa $a/b -0.02$	<i>Cs<math>\beta</math>LCY1</i> y <i>Cs<math>\beta</math>LCY2</i>
	<i>C. paradisi</i>	Marsh	Maduro	Flavedo $a/b -0.19$
Maduro			Pulpa $a/b -0.40$	<i>Cp<math>\beta</math>LCY1</i> y <i>Cp<math>\beta</math>LCY2</i>
Star Ruby		Maduro	Flavedo $a/b -0.19$	<i>Cp<math>\beta</math>LCY1</i> y <i>Cp<math>\beta</math>LCY2</i>
		Maduro	Pulpa $a/b -0.02$	<i>Cp<math>\beta</math>LCY1</i> y <i>Cp<math>\beta</math>LCY2</i>

### 13.2. Aislamiento y clonación de cDNAs correspondientes a $\epsilon$ -*LCY*

#### a) Obtención de un clon parcial de $\epsilon$ -*LCY*

Para la amplificación del cDNA de  $\epsilon$ -licopeno ciclasa ( $\epsilon$ -*LCY*) de *C. sinensis* se diseñó una pareja de cebadores específicos a partir de una secuencia nucleotídica de  $\epsilon$ -*LCY* de *C. paradisi* anotada en la base de datos (AF486650). El cebador sentido MJ58 (5'-AATGGACATGTTTATACTACCGCC-3') se diseñó en el extremo 5', y el cebador antisentido MJ70 (5'-CTATAAAGTCAGGTATGTTCTTACC-3') se diseñó en el extremo 3' conteniendo el codón de parada. La reacción de amplificación por PCR se realizó como se describe en el apartado 12 utilizando como molde 1  $\mu$ L de cDNA sintetizado, como se ha descrito anteriormente (apartado 11), a partir del flavedo de naranja 'Navel' ( $a/b -0.78 \pm 0.01$ ). Una dilución 1:10 del producto de PCR purificado se utilizó como molde en una segunda amplificación, en idénticas condiciones que la primera. El producto de la reacción se purificó, se clonó en el vector pGem-T, y se usó para transformar la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$ . La identidad del fragmento clonado se verificó mediante secuenciación.

### b) Amplificación del extremo 5' de $\varepsilon$ -LCY mediante RACE 5'

Para la amplificación del extremo 5' de  $Cs\varepsilon$ -LCY se utilizó la técnica RACE (amplificación rápida de extremos) empleando el *kit* comercial 5'/3' RACE *Kit* (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este sistema permite la amplificación de los extremos 5' y 3' de un cDNA si se dispone de un fragmento del mismo de secuencia conocida. Básicamente consiste en la síntesis de cDNA y adición a sus extremos de una secuencia conocida (adaptador), obteniéndose así fragmentos de cDNAs de extremos conocidos. La amplificación de los extremos se realiza utilizando cebadores específicos del fragmento de interés y un cebador de secuencia complementaria al adaptador (Figura 10).

Los cebadores específicos necesarios para llevar a cabo la amplificación del extremo 5' del gen se diseñaron sobre la secuencia del clon parcial obtenido anteriormente. La secuencia y posición de los mencionados cebadores se indica en la Figura 11.

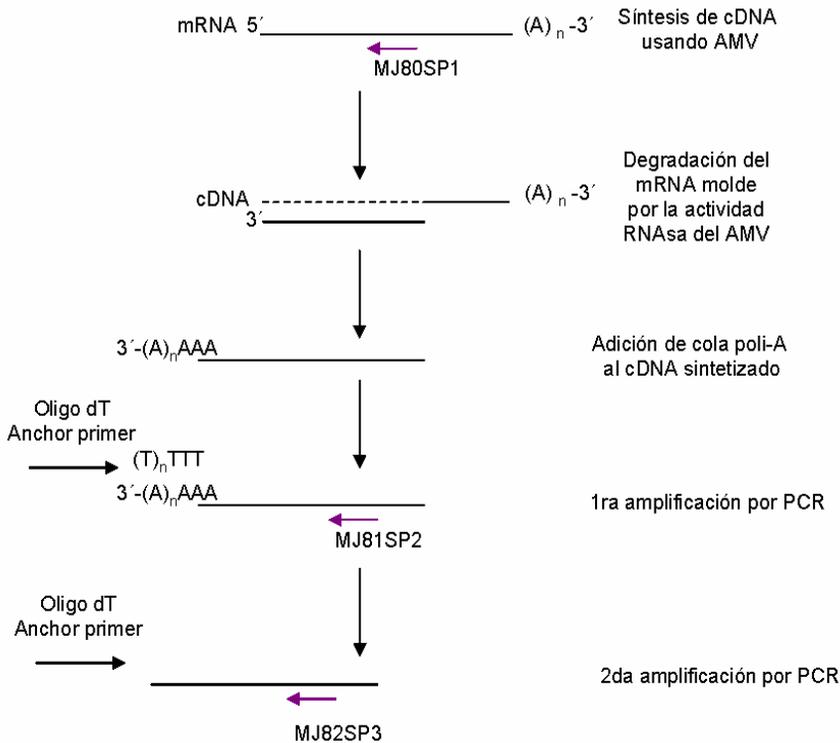


Figura 10: Esquema general de la estrategia RACE 5' usada para aislar el extremo 5' del gen  $Cs\varepsilon$ -LCY. Los cebadores específicos diseñados en el fragmento de secuencia conocida de  $Cs\varepsilon$ -LCY se indican con flechas moradas.

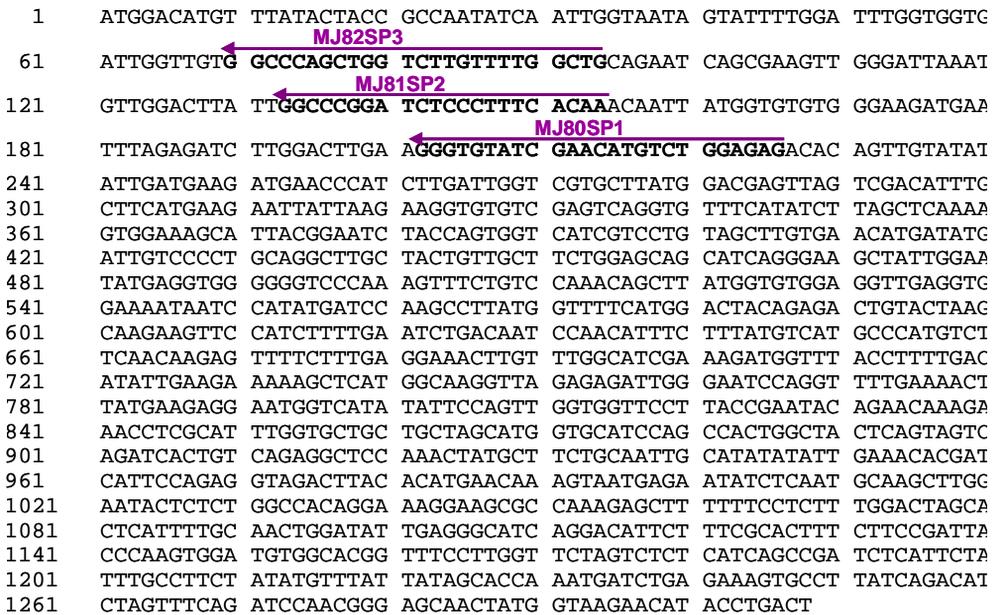


Figura 11: Posición y secuencia de los cebadores específicos, diseñados sobre un clon parcial de cDNA de *Csε-LCY*, utilizados para la amplificación del extremo 5' de *Csε-LCY*.

En este sistema se usó la transcriptasa reversa (RT) AMV (Avian Myeloblastosis Virus). Para la síntesis de cDNA se utilizó un cebador específico de *Csε-LCY* (MJ80SP1) y 10 µg de RNA total de flavedo de 'Navel' ( $a/b = -0.78 \pm 0.01$ ) previamente tratado con DNasa libre de RNasa (Boehringer). El cDNA obtenido se purificó utilizando el *kit* 'High Pure PCR Product Purification Kit' (Roche Applied Sciences), siguiendo las instrucciones del fabricante. Con el fin de añadir una secuencia conocida al extremo 3' del cDNA purificado, éste se incubó en presencia de dATP con una transferasa terminal que añadió una cola homopolimérica en dicho extremo (dA-cDNA). Usando como molde 5 µL de dA-cDNA y los cebadores 'oligo dT-Anchor primer' (complementario a la cola poli-A añadida) y SP2MJ81 se realizó una amplificación por PCR en un volumen final de 50 µL según se describe en el apartado 12 de este capítulo. En este caso las condiciones utilizadas fueron 94 °C durante 2 min, seguido de 10 ciclos 94/58/72 °C durante 15/30/40 s, respectivamente, seguido de 25 ciclos 94/58/72 °C durante 15/30/40 s, incrementándose el tiempo de extensión 20 s en cada ciclo. Por último, la reacción permaneció a 72 °C durante 7 min. El producto de la reacción fue purificado utilizando el *kit* 'High Pure PCR Product Purification Kit' (Roche Applied Sciences), y una dilución 1:10 del DNA resultante se empleó como

molde para una segunda reacción de amplificación por PCR. En esta segunda PCR, realizada en idénticas condiciones a las de la primera PCR, los cebadores utilizados fueron `oligo dT-Anchor primer´ y MJ82SP3. El producto de la reacción fue purificado, clonado en el vector pGem-T y utilizado para transformar *E.coli* XL1-Blue.

c) Amplificación y clonación del cDNA que contiene la región codificante correspondiente a  $\epsilon$ -LCY

Sobre la secuencia nucleotídica del fragmento obtenido del RACE 5´-*Cs $\epsilon$ -LCY* se diseñó un cebador específico incluyendo el codón de inicio (MJ92, 5´-AAATGGAATACTACTGTCTTGGAGCTC-3´) con el número de nucleótidos adecuado para que, al clonar el fragmento en el vector pGem-T, el codón de inicio del gen estuviera en pauta de lectura con el del gen *lacZ* del plásmido pGem-T (Promega).

Los cebadores específicos MJ92 y MJ70 (ver apartado 13.2.a) se utilizaron para amplificar un fragmento de DNA de 1705 nct que corresponde a la secuencia codificante de *Cs $\epsilon$ -LCY*. Se realizaron dos reacciones independientes de PCR utilizando como molde cDNA sintetizado a partir de RNA total de flavedo verde de naranja `Navel´ ( $a/b = -0.78 \pm 0.01$ ). Las condiciones de PCR fueron las descritas en el apartado 12 de este capítulo. El producto purificado de cada reacción fue ligado en el vector pGem-T (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizado para transformar *E.coli* (cepa XL1-Blue) (apartado 5.1). De cada transformación se seleccionaron dos colonias positivas, en las que la presencia y orientación del inserto se comprobó mediante amplificación por PCR de DNA plasmídico utilizando como cebadores M13F (específico de pGem-T) y el cebador sentido MJ92. La identidad y la orientación de los insertos fueron verificados posteriormente mediante secuenciación del DNA plasmídico (apartado 18). Los plásmidos portadores del cDNA de longitud completa correspondientes a *Cs $\epsilon$ -LCY* se denominaron pGem-elcy.

#### 14. Aislamiento del promotor de *Cs $\beta$ -LCY2*

Con el fin de amplificar un fragmento del promotor del gen  *$\beta$ -LCY2* se utilizaron el cebador sentido MJ77 (5´-CAGGAAAGTTCGAGAAAGC-3´), diseñado sobre el clon genómico de *CsCCS* (Nº Acc. AF169241), y el cebador reverso MJ36 (Tabla 6), localizados a -1152 y 323 nucleótidos del codón de inicio de la pauta de lectura, respectivamente. Las condiciones de PCR utilizadas fueron las descritas en el apartado 6.4 de este Capítulo. Las reacciones de amplificación se

llevaron a cabo en un volumen final de 50  $\mu$ L, utilizando como molde  $\approx$ 100 ng de DNA genómico extraído de hojas de naranja 'Navel', de pomelo 'Marsh' y de pomelo 'Star Ruby', según se describe en el apartado 5.2.2 de este Capítulo. A partir de DNA genómico de cada uno de los genotipos se realizaron dos reacciones independientes de amplificación. Los productos de amplificación se purificaron utilizando el *kit* 'High Pure PCR Product Purification Kit' (Roche Applied Sciences), siguiendo las instrucciones del fabricante, se clonaron en el vector pGem-T (Promega) y se utilizaron para transformar *E.coli*. El DNA plasmídico de dos colonias de cada transformación se purificó, obteniéndose un total de 12 clones, cuya identidad se confirmó mediante secuenciación.

### 15. Determinación de actividad licopeno ciclasa

Para analizar la actividad licopeno ciclasa de las proteínas  $\beta$ -LCY1,  $\beta$ -LCY2 y  $\varepsilon$ -LCY se realizaron 'ensayos de complementación de color'. Este tipo de ensayos, utilizados con éxito en otros trabajos (Cunningham *et al.* 1993; Hugueney *et al.* 1995; Pecker *et al.* 1996), se basa en las diferencias de coloración entre los distintos carotenoides, así el licopeno (sustrato de las LCYs) es rojo mientras que el  $\beta$ -caroteno (producto de la  $\beta$ -LCY) es naranja y el  $\delta$ -caroteno (producto de la  $\varepsilon$ -LCY) es amarillo. Para llevar a cabo estos ensayos se transformó la cepa XL1-Blue de *E. coli* con el plásmido pACCRT-EIB (ver apartado 3.2; Misawa y Shimada 1998), generando una cepa productora de licopeno a la que denominamos XB-pACC. Los cultivos en placa de esta cepa se realizaron en medio LB suplementado con cloranfenicol (50  $\mu$ g/mL) y ampicilina (100  $\mu$ g/mL) y se incubaron en oscuridad 48 h a 30 °C. Las colonias de la cepa de *E. coli* XB-pACC presentaron, tras la incubación, coloración rojiza debido a la acumulación de licopeno. La expresión de genes que codifiquen proteínas funcionales capaces de ciclar el licopeno en esta cepa generará un cambio de coloración de las colonias.

Los plásmidos pGem-lcy1, pGem-lcy2 y pGem-elcy, portadores de los cDNAs de longitud completa correspondientes a los genes  $\beta$ -LCY1,  $\beta$ -LCY2 y  $\varepsilon$ -LCY, respectivamente, se utilizaron para transformar la cepa de *E. coli* productora de licopeno (XB-pACC). Como control negativo se generó un plásmido (pGem-T $\Phi$ ) portador de una secuencia de 272 nct que no codifica ninguna proteína, que también se utilizó para transformar XB-pACC. El producto de la transformación se sembró en medio LB-agarosa suplementado con cloranfenicol (50  $\mu$ g/mL) y se incubó en oscuridad 48 h a 30 °C. Transcurrido el período de

incubación la coloración de las colonias transformantes indicó la presencia/ausencia (naranja o amarillo/ rojo) de actividad ciclasa sobre la molécula de licopeno, permitiendo un rápido escrutinio visual de las colonias portadoras de genes que codifiquen proteínas funcionales.

## 16. Extracción y cuantificación de pigmentos

### 16.1. Extracción y cuantificación de clorofilas y carotenoides totales de material vegetal.

La extracción y cuantificación de clorofilas y carotenoides se llevó a cabo, a partir de 0.5 g de flavedo, 1.5 g de pulpa ó 0.25 g de hojas, siguiendo el método descrito por Rodrigo *et al.* (2003 y 2004). 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), homogeneizándose la mezcla en vórtex durante 1 min y en agitación magnética a 4 °C durante 5 min. Seguidamente se añadieron 1.5 mL de Tris-HCl (50 mM, pH 7.5) y NaCl 1M, volviendo a agitar a 4 °C durante 5 min y añadiendo a continuación 3 mL de cloroformo. Tras homogeneizar en el vórtex se agitó a 4 °C durante 5 min, dejando reposar después las muestras 5 min en hielo. Posteriormente, se centrifugó a 4000 g durante 5 min a 4 °C y se recuperó la fase inferior en un matraz de fondo redondo. Se añadieron de nuevo 3 mL de cloroformo y se repitió el proceso de extracción hasta que la fase inferior fue incolora. El combinado de las fases orgánicas recuperadas se evaporó a 40 °C en evaporador rotatorio (Buchi) hasta la sequedad total. El residuo seco se resuspendió en 200 µL de acetona (pureza HPLC) y se añadieron 2.8 mL de Solución A (éter de petróleo: éter etílico, 9:1, v/v). La concentración de clorofila a y b se determinó midiendo la absorbancia de este extracto a 644 y 662 nm y aplicando las fórmulas de Smith y Benítez (1955):

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

$$\text{Clorofila b} = 16.370 \cdot A_{644} - 3.140 \cdot A_{662}$$

Las muestras se secaron completamente a 40 °C en evaporador rotatorio y se saponificaron mediante adición de 1.8 mL de metanol (pureza HPLC, Carlo Erba) y 200 µL de KOH al 60%, manteniendo la muestra durante la noche a temperatura ambiente y en atmósfera de nitrógeno. Los carotenoides se recuperaron mediante lavados sucesivos con 2 mL de agua bidestilada, 2 mL de

Solución A, 1 mL de cloroformo, y dos últimos lavados con 2 mL de Solución A. Tras mezclar las fases la muestra se dejó reposar durante 5 min a temperatura ambiente, y se recuperó la fase etérea pasándola a un tubo de 15 mL con tapón de rosca. Se añadieron de nuevo 2 mL de Solución A y se repitió el proceso hasta que la fase superior resultó incolora. El conjunto de las fases etéreas se llevaron a un volumen conocido en un matraz y la concentración de carotenoides se determinó midiendo la absorbancia entre 270 y 600 nm en un espectrofotómetro y registrando la absorbancia a 450 nm y a todos los máximos del espectro. La concentración de carotenoides se calculó aplicando la fórmula de Davies (1976) y expresando el resultado como  $\mu\text{g}$  de  $\beta$ -caroteno por g de PF de tejido:

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

donde: E, absorbancia a 450 nm; y, mL de disolución;  $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ , 2500 (coeficiente de extinción del  $\beta$ -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  $\text{N}_2$ . Con el fin de precipitar los esteroides, los extractos secos se resuspendieron en 1 mL de acetona, se transfirieron a un tubo Eppendorf, y se incubaron durante la noche a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ . Tras centrifugar a 11400 g durante 15 min a  $4\text{ }^\circ\text{C}$  el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf y se secó en corriente de  $\text{N}_2$ . Las muestras se almacenaron a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  en oscuridad y atmósfera de  $\text{N}_2$  hasta el momento de su análisis.

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

## 16.2. Extracción de carotenoides de cultivos bacterianos

Las colonias aisladas de *E. coli* XB-pACC cotransformadas con los plásmidos pGem-lcy1, pGem-lcy2, pGem-elcy o pGem-T $\Phi$  (ver Material y Métodos, apartado 15) se sembraron en triple estría en medio LB-agar suplementado con ampicilina ( $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ ) y cloranfenicol ( $50\text{ }\mu\text{g/mL}$ ) y se incubaron a  $30\text{ }^\circ\text{C}$  en oscuridad durante 48 h. Dos colonias aisladas de cada siembra fueron inoculadas en 2 mL de LB suplementado con ampicilina y

cloranfenicol (LBA<sub>100</sub>CM<sub>50</sub>) e incubadas durante 12 h a 37 °C con agitación (200 rpm). Diez µL de este precultivo se utilizaron para inocular 20 mL de LBA<sub>100</sub>CM<sub>50</sub> que se incubaron a 30 °C en oscuridad y con agitación (200 rpm) durante 48 h. Una alícuota de 15 mL de este cultivo se centrifugó 5 min a 4000 g y el sedimento bacteriano se lavó dos veces con agua bidestilada. A continuación, el sedimento se resuspendió en 1 mL de acetona, se homogenizó con el vortex durante 30 s y se centrifugó a 13000 g durante 2 min. El sobrenadante se recuperó en un Eppendorf, se secó en corriente de N<sub>2</sub> y se almacenó a -20 °C hasta el momento de su análisis por HPLC.

### 17. 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 detector de fotodiodos (HPLC-PDA). La cromatografía se llevó a cabo en un sistema de cromatografía líquida Waters, equipado con una bomba 600E y un detector de fotodiodos modelo 996, utilizando una precolumna C<sub>30</sub> (20mm x 4.0 mm, 5 µm) y una columna C<sub>30</sub> (250 mm x 4,6 mm , 5 µm) (YMC Europa GMBH). Los datos se adquirieron y procesaron con el paquete informático Empower (Waters). La separación de los carotenoides se realizó utilizando el gradiente ternario de elución de metanol (MeOH), agua y metil *tert*-butil éter (MTBE) que se detalla en la Tabla 9.

Tabla 9: Gradiente de elución utilizado para la separación de carotenoides mediante HPLC. Los cambios de gradiente se realizaron de forma lineal.

Tiempo (min)	0	12	20	30	50	70	75
MTBE	5	5	14	25	50	75	5
H <sub>2</sub> O	5	0	0	0	0	0	5
MeOH	90	95	86	75	50	25	90

El detector de fotodiodos se programó para registrar las absorbancias cada 1 nm desde 250 nm hasta 540 nm a lo largo de toda la elución. 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. Las muestras a analizar se prepararon mediante disolución del extracto seco de

carotenoides obtenido anteriormente (apartado 16) en un volumen variable de cloroformo:metanol:acetona (pureza HPLC, Carlo Erba) en una proporción 3:2:1. El volumen de muestra inyectada fue de 20  $\mu\text{L}$ , el flujo de inyección en la columna fue de 1 mL  $\text{min}^{-1}$  y la temperatura de la columna se fijó a 25 °C.

Los carotenoides se identificaron por comparación del espectro y del tiempo de retención con los estándares disponibles o con los datos de espectros y tiempos de retención obtenidos en condiciones cromatográficas similares disponibles en la literatura (Rouseff *et al.* 1996; Melendez Martinez *et al.* 2003; Rodrigo *et al.* 2003; Rodrigo *et al.* 2004). En los cromatogramas MaxPlot los picos cromatográficos correspondientes a cada carotenoide se integraron en su longitud de onda máxima y su contenido se calculó utilizando diferentes curvas de calibrado. Se prepararon curvas de calibrado para la luteína (Sigma), el  $\beta$ -caroteno (Sigma), la  $\beta$ -criptoxantina (Extrasynthese), el  $\beta$ -apo-8'-carotenal (Hoffman-LaRoche), el fitoeno y el fitoflueno (ambos purificados previamente en nuestro laboratorio como se describe en Pascual *et al.* 1993), la zeaxantina (Extrasynthese) y el licopeno (Sigma). La cuantificación de *trans*- y *9-cis*-violaxantina y de neoxantina se llevó a cabo utilizando la curva de calibrado de la luteína, ya que presentan un coeficiente de absorción muy similar (Britton 1998; Rodrigo *et al.* 2006). De la misma forma se usó la curva de calibrado de  $\beta$ -caroteno para cuantificar  $\alpha$ -caroteno, la curva de calibrado de la zeaxantina para cuantificar la anteraxantina y la curva de  $\beta$ -apo-8'-carotenal para cuantificar el apocarotenoide  $\text{C}_{30}$   $\beta$ -citraurina. En la Tabla 10 se indican las ecuaciones de las rectas de calibrado obtenidas para cada compuesto y el límite de detección en el sistema cromatográfico utilizado.

## 18. Secuenciación de DNA y análisis de secuencias

La secuenciación de DNA se llevó a cabo en el Servicio de Secuenciación del IBMCP (Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, UPV-CSIC) utilizando un secuenciador automático modelo ABI PRISM 377 (Perkin-Elmer, Applied Biosystem).

La homología de las secuencias se obtuvo comparando las secuencias frente a distintas bases de datos no redundantes (ver apartado 19) utilizando el paquete informático Blast (Altschul *et al.* 1990).

Tabla 10: Límite de detección y ecuaciones de las rectas obtenidas para la cuantificación de distintos carotenoides.

Carotenoide	Límite de detección	Recta de calibrado	
Fitoeno	20 ng	$\mu\text{g} = 3.73158 \cdot 10^{-7} \text{ Area}$	$r^2 = 0.9944$
Fitoflueno	8 ng	$\mu\text{g} = 1.79116 \cdot 10^{-7} \text{ Area}$	$r^2 = 0.9944$
Licopeno	5 ng	$\mu\text{g} = 8.99645 \cdot 10^{-8} \text{ Area}$	$r^2 = 0.9963$
$\beta$ -caroteno	9 ng	$\mu\text{g} = 8.34097 \cdot 10^{-8} \text{ Area}$	$r^2 = 0.9922$
$\beta$ -criptoxantina	11 ng	$\mu\text{g} = 1.21613 \cdot 10^{-7} \text{ Area}$	$r^2 = 0.9866$
$\beta$ -apo-8'-carotenal	32 ng	$\mu\text{g} = 3.24695 \cdot 10^{-8} \text{ Area}$	$r^2 = 0.9370$
Luteína	7 ng	$\mu\text{g} = 8.24810 \cdot 10^{-8} \text{ Area}$	$r^2 = 0.9900$
Zeaxantina	10 ng	$\mu\text{g} = 1.13798 \cdot 10^{-7} \text{ Area}$	$r^2 = 0.9811$

## 19. Programas informáticos

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

- Adobe Photoshop: Procesado de imágenes.
- HP Desk Scan: Digitalización de imágenes.
- Chromas: Análisis del cromatograma de las secuencias (Technelysium Pty. Ltd).
- DNAMAN: Análisis de secuencias (Lynnon Biosoft).
- Empower (Waters): Programa para la adquisición y el tratamiento de datos cromatográficos.
- Fuji Photo Film Co.: Lectura de placas de imágenes Bas MP 2040 Imaging Plate.
- Image Gauge V4.0. (Science Lab 98, Fuji Photo Film Co., LTD): Cuantificación de la intensidad de las señales de hibridación.
- Microsoft Excel: Cálculos matemáticos.
- StatGraphics: Análisis estadístico de datos.
- Sigma Plot: Elaboración de gráficos.
- Microsoft Word: Procesado de textos.
- Reference Manager: Manejo de bases bibliográficas.

- Microsoft Power Point: Realización de figuras e imágenes.
- Tree View: Visualización de árboles filogenéticos.

También se utilizaron las aplicaciones *on line*:

-ChloroP 1.1 Prediction Server: Predicción de secuencias de localización en cloroplasto y punto de corte. <http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/> (Emanuelsson *et al.* 1999).

-PSORT: Reconocimiento de proteínas de cloroplastos. <http://psort.hgc.jp/> (Nakai y Horton 1999).

-PSIpred: Predicción del perfil de hidrofobicidad y de la estructura secundaria de secuencias proteicas. <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/> (Jones 1999).

-ProDom: Reconocimiento de motivos en secuencias proteicas. <http://prodom.prabi.fr/prodom/current/html/home.php> (Bru *et al.* 2005).

-TMHMM: Predicción de hélices transmembrana en proteínas. <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>

-ClustalW: Realización de alineamientos. <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/> (Thompson *et al.* 1994).

-PLACE: Búsqueda de elementos *cis* reguladores en secuencias nucleotídicas. <http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/index.html> (Higo *et al.* 1999).

-del NCBI (Nacional Center for Biotechnology Information):

-Búsqueda de secuencias publicadas en su base de datos. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

-Programas de comparación de secuencias con aquellas depositadas en la base de datos. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> (Altschul *et al.* 1990).

-CFGP (Citrus Functional Genomic Project): Búsqueda de secuencias publicadas en su base de datos. <http://bioinfo.ibmcp.upv.es/genomics/cfgpDB/>

-HavEST:Citrus: Búsqueda de secuencias publicadas en su base de datos. <http://harvest.ucr.edu/>





## CAPÍTULO I ` AISLAMIENTO, EXPRESIÓN Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LICOPENO CICLASAS (LCYs) DE FRUTOS CÍTRICOS `

La ciclación del licopeno es un paso clave en la síntesis y regulación de la composición de carotenoides en plantas (Cunningham 2002; Bouvier *et al.* 2005). En el momento de iniciarse este trabajo se habían descrito en cítricos dos genes que codifican proteínas implicadas en la ciclación del licopeno:  $\epsilon$ -LCY y  $\beta$ -LCY (Kato *et al.* 2004; Rodrigo *et al.* 2004). La enzima  $\beta$ -LCY cataliza la introducción de anillos  $\beta$ -, mientras que  $\epsilon$ -LCY cataliza la introducción de un anillo  $\epsilon$ - en la molécula de licopeno. La enzima  $\epsilon$ -LCY únicamente puede actuar sobre uno de los extremos de la molécula de licopeno, generando  $\delta$ -caroteno, mientras que  $\beta$ -LCY puede actuar sobre los dos extremos de la molécula de licopeno o sobre el extremo lineal del  $\delta$ -caroteno, produciendo  $\beta$ - y  $\alpha$ -caroteno, respectivamente. En otros frutos existen dos genes que codifican  $\beta$ -LCYs funcionales:  $\beta$ -LCY y *B* en tomate y  $\beta$ -LCY y *CCS* en pimiento (Hugueney *et al.* 1995; Bouvier *et al.* 1997; Ronen *et al.* 2000). Tanto en tomate como en pimiento uno de los genes  $\beta$ -LCY se expresa en gran variedad de tejidos ( $\beta$ -LCY), mientras que el otro (*B* y *CCS*) presenta una expresión específica de tejido cromoplástico (Deruere *et al.* 1994; Hugueney *et al.* 1995; Ronen *et al.* 2000). Anteriormente en nuestro laboratorio se había identificado en *C. sinensis* un gen  $\beta$ -LCY cuya expresión es constitutiva durante el desarrollo y la maduración de los frutos y que también se expresa en hojas (Rodrigo *et al.* 2004). Sin embargo, hasta la fecha, no se había identificado en frutos cítricos ningún gen  $\beta$ -LCY cuya expresión fuera específica de tejido cromoplástico.

Mediante búsqueda de homologías con el gen *B* de tomate en las bases de datos del NCBI, se identificó una secuencia de *C. sinensis* con elevada similitud, anotada como `capsantina-capsorubina sintasa` (*CsCCS*, N° Acc. AAF18389). Dado que la capsantina y la capsorubina son carotenoides específicos de pimiento, y que no se han identificado en frutos cítricos, parece improbable que en frutos cítricos este gen codifique una capsantina-capsorubina sintasa. Adicionalmente, el gen *CCS* de pimiento, cuya expresión es específica de tejido cromoplástico codifica una proteína con actividad bifuncional, tanto *CCS* como  $\beta$ -LCY (Hugueney *et al.* 1995). Colectivamente, estos datos sugerían que el gen de *C. sinensis* anotado en la base de datos como *CCS* podría codificar una segunda  $\beta$ -LCY ( $\beta$ -LCY2) en frutos cítricos. El estudio de esta hipótesis constituyó parte del trabajo experimental que se describe en esta sección.

## 1. Aislamiento y caracterización funcional de genes $\beta$ -licopeno ciclasa ( $\beta$ -*LCYs*) de frutos de naranja 'Navel' (*C. sinensis*)

### 1.1. Aislamiento de cDNAs correspondientes a $\beta$ -*LCYs* de naranja 'Navel' y análisis de las secuencias

Para aislar y clonar cDNAs que contienen las regiones codificantes completas de los genes  $\beta$ -*LCY1* y  $\beta$ -*LCY2* de frutos de naranja 'Navel' se empleó la técnica de RT-PCR. Se diseñaron cebadores en los extremos 5' y 3' (Tabla 7) sobre las regiones codificantes de secuencias de DNA genómico de *Citrus sinensis* anotadas en la base de datos del NCBI (ver Material y Métodos apartado 13.1). La amplificación del gen  $\beta$ -*LCY1* se realizó a partir de material vegetal procedente tanto de frutos inmaduros como de frutos maduros, dado que este gen muestra el mismo nivel de expresión independientemente del estadio de desarrollo y maduración del fruto (Rodrigo *et al.* 2004). En el caso de  $\beta$ -*LCY2* la amplificación se realizó a partir de frutos maduros, ya que los genes con los que presenta mayor homología, *CCS* de pimiento y  $\beta$ -*LCY2* de tomate, se expresan exclusivamente en tejido cromoplástico. Como molde para las reacciones de amplificación se utilizaron, para cada gen, dos cDNAs sintetizados a partir de RNA total de distintos tejidos: flavedo y pulpa (Tabla 8). Los dos amplificados independientes obtenidos para cada gen fueron clonados en el vector pGem-T y utilizados para transformar *E. coli*. De cada transformación se seleccionaron dos colonias positivas y la identidad de sus insertos se confirmó mediante secuenciación. Los cuatro plásmidos recombinantes portadores de los cDNAs que contienen la región codificante correspondiente a  $\beta$ -*LCY1* se denominaron pGem-lcy1, y aquellos cuatro portadores de los cDNAs que contienen la región codificante correspondiente a  $\beta$ -*LCY2* se designaron como pGem-lcy2.

Los cuatro clones correspondientes a  $\beta$ -*LCY1* (pGem-lcy1) presentaron una pauta de lectura abierta de 1512 nct que codifica un polipéptido de 504 aminoácidos con una masa molecular de 56.33 kDa. En el caso de  $\beta$ -*LCY2*, los 4 clones independientes (pGem-lcy2) presentaron una pauta de lectura abierta de 1509 nct que codifica una proteína de 503 aminoácidos con una masa molecular de 56.59 kDa.

Las secuencias proteicas de Cs $\beta$ -LCY1 y Cs $\beta$ -LCY2 presentaron un porcentaje de identidad y homología entre ellas del 52.85% y 55.00%, respectivamente, localizándose la mayor parte de la variabilidad en el extremo amino-terminal (Figura 12). En esta región, el programa ChloroP v1.1 (Emanuelsson *et al.* 1999) predijo para ambas proteínas la existencia de un péptido señal de importación a plastidios, con un sitio de corte entre Lisina-86 y Glicina-87 en el caso de Cs $\beta$ -LCY1, y entre Arginina-85 y Tirosina-86 en el caso de Cs $\beta$ -LCY2 (Figura 12). Localizado en este extremo amino-terminal se identificó un dominio, marcado en la Figura 12 como 'región conservada en  $\beta$ -LCYs', que se encuentra conservado en todas las  $\beta$ -LCY de plantas y que parece determinante para la asociación de estas proteínas a membrana (Hugueney *et al.* 1995). En las dos Cs $\beta$ -LCYs se identificó un sitio de unión a NADH/NADPH (marcado en la Figura 12 como 'sitio de unión a dinucleótido'). Este motivo, definido por una estructura secundaria característica (lámina  $\beta$  / hélice  $\alpha$  / lámina  $\beta$ , ver Figura 13) y presente en todas las  $\beta$ -LCY de plantas, se encuentra total y parcialmente conservado en Cs $\beta$ -LCY1 y Cs $\beta$ -LCY2, respectivamente. En esta región, el grado de identidad entre Cs $\beta$ -LCY2, CaCCS y Le $\beta$ -LCY2 (codificada por el gen *B*) es muy elevado (81.8%-95.5%, Anexo I).

La similitud entre Cs $\beta$ -LCY1 y Cs $\beta$ -LCY2 en motivos característicos de LCYs de plantas (Hugueney *et al.* 1995; Cunningham *et al.* 1996) es muy elevada (Figura 12). En la búsqueda en bases de datos de la secuencia proteica anotada en la Figura 12 como 'motivo  $\beta$ -ciclase' únicamente se encontraron homologías significativas con  $\beta$ -LCYs de plantas. Los dominios identificados por Bouvier *et al.* (1997) como esenciales para la actividad catalítica de las  $\beta$ -LCY (subrayados en naranja en la Figura 12) se encuentran totalmente conservados en Cs $\beta$ -LCY1 y Cs $\beta$ -LCY2.

El perfil de hidrofobicidad (datos no mostrados) y la estructura secundaria inferida de Cs $\beta$ -LCY1 y Cs $\beta$ -LCY2 fueron prácticamente idénticos (Figura 13). En la estructura secundaria de ambas proteínas se aprecia la estructura lámina  $\beta$  /hélice  $\alpha$  /lámina  $\beta$  que daría lugar al dominio de unión a dinucleótido (NADP/NADPH), así como tres hélices, localizadas en el extremo carboxi-terminal, con una posible localización transmembrana (Hugueney *et al.* 1995; Cunningham *et al.* 1996).

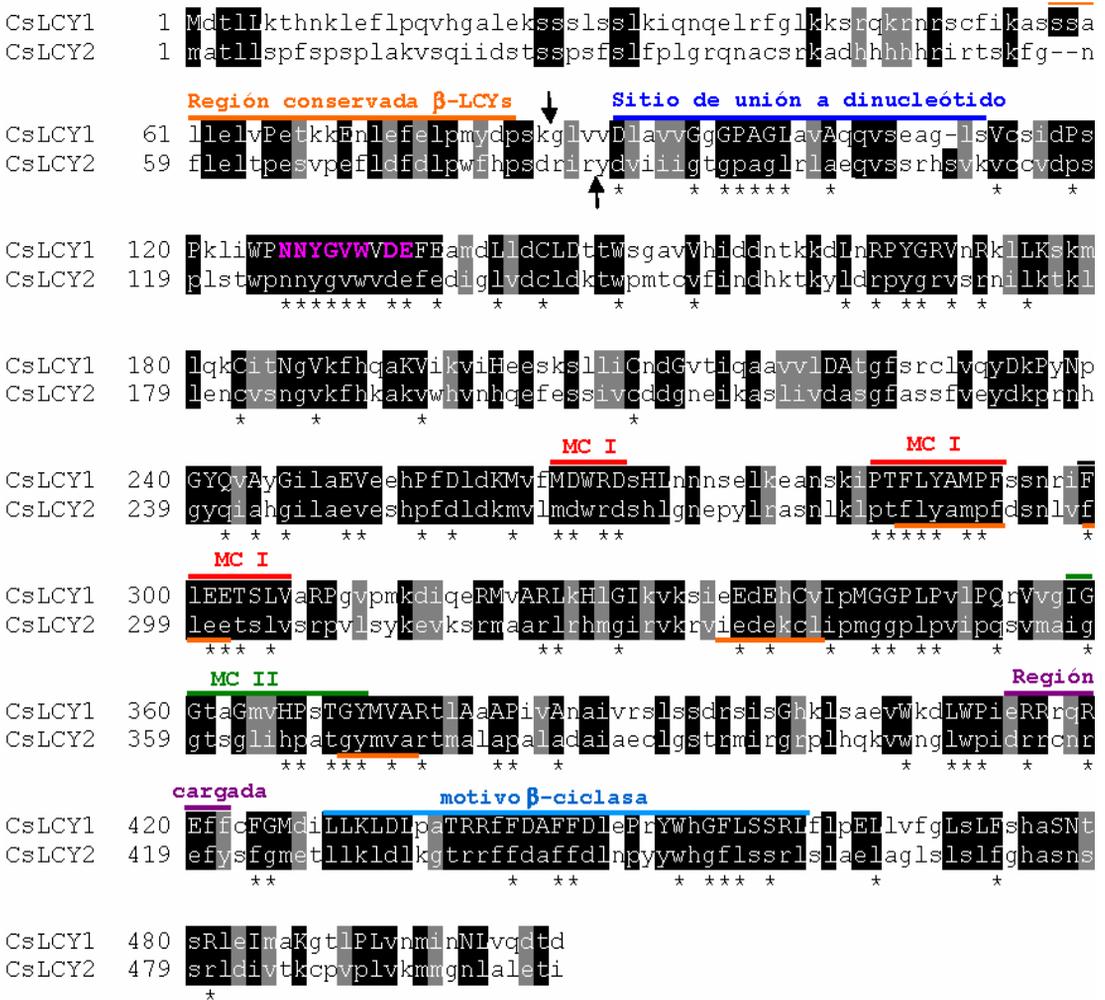


Figura 12: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de Csβ-LCY1 y Csβ-LCY2. Se indica con una flecha el punto de corte más probable del péptido señal para la importación a plastidios. Los aminoácidos con fondo negro corresponden a residuos conservados en las dos secuencias, en fondo gris se representan los aminoácidos equivalentes. Aquellos aminoácidos conservados en todas las secuencias de β-LCYs de plantas anotadas hasta el momento en las bases de datos (incluyendo Leβ-LCY2 y CaCCS) se representan con una letra mayúscula en la secuencia proteica de Csβ-LCY1. Las distintas regiones de interés, descritas como características de LCYs vegetales, se señalan en la secuencia de Csβ-LCY1 como MC I, MC II y 'región cargada' (Hugueney *et al.* 1995; Cunningham *et al.* 1996), 'sitio de unión a dinucleótido' y 'motivo β-ciclasa'. Los asteriscos indican aquellos residuos conservados en todas las β- y ε-LCYs de plantas. Se destacan en naranja dominios señalados como esenciales para la actividad catalítica β-LCY, según Bouvier *et al.* (1997). Los aminoácidos en rosa corresponden a un motivo específico de LCYs.

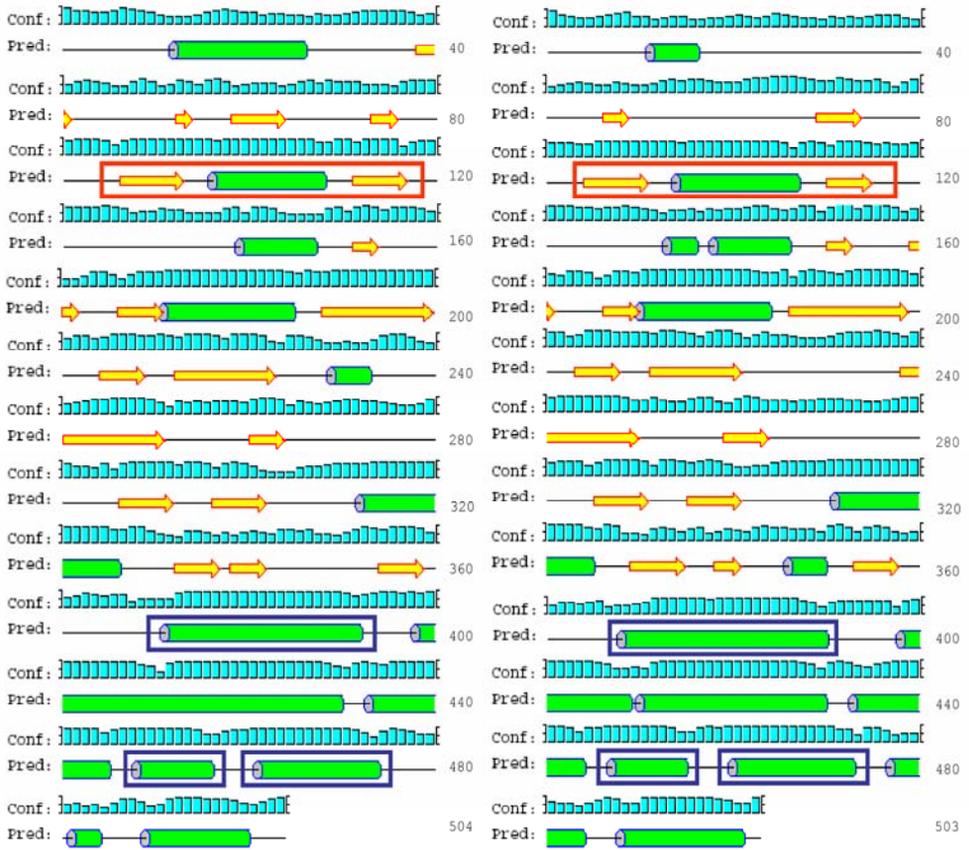


Figura 13: Predicción de la estructura secundaria de Csβ-LCY1 y Csβ-LCY2 realizada por el programa PSIPRED (Jones 1999). Conf: Nivel de confianza de la predicción; Pred: Estructura secundaria inferida. Los números a la derecha indican las posiciones de los aminoácidos. Las líneas negras representan estructura de bobina, los cilindros verdes las hélices  $\alpha$  y, las flechas las láminas  $\beta$ . Se encuadra en rojo la estructura lámina  $\beta$  / hélice  $\alpha$  / lámina  $\beta$  característica del `bolsillo' de unión a NADP/NADPH. En cuadrados azules se enmarcan hélices  $\alpha$  con posible localización transmembrana (Hugueney *et al.* 1995; Cunningham *et al.* 1996).

La relación de Csβ-LCY1 y Csβ-LCY2 con otras 14 β-LCYs de plantas se investigó mediante la generación de un árbol filogenético (Figura 14). Dado que el mecanismo de acción de las β-LCYs es muy similar al de CCS (Bouvier *et al.* 1997) y NSY (Bouvier *et al.* 2000), y considerando que estudios previos sugieren un origen común de los genes que codifican estas enzimas (al Babili *et al.* 2000; Krubasik y Sandmann 2000), se incluyeron en el análisis filogenético las secuencias correspondientes a una NSY de tomate y otra de patata y CCS de pimiento.

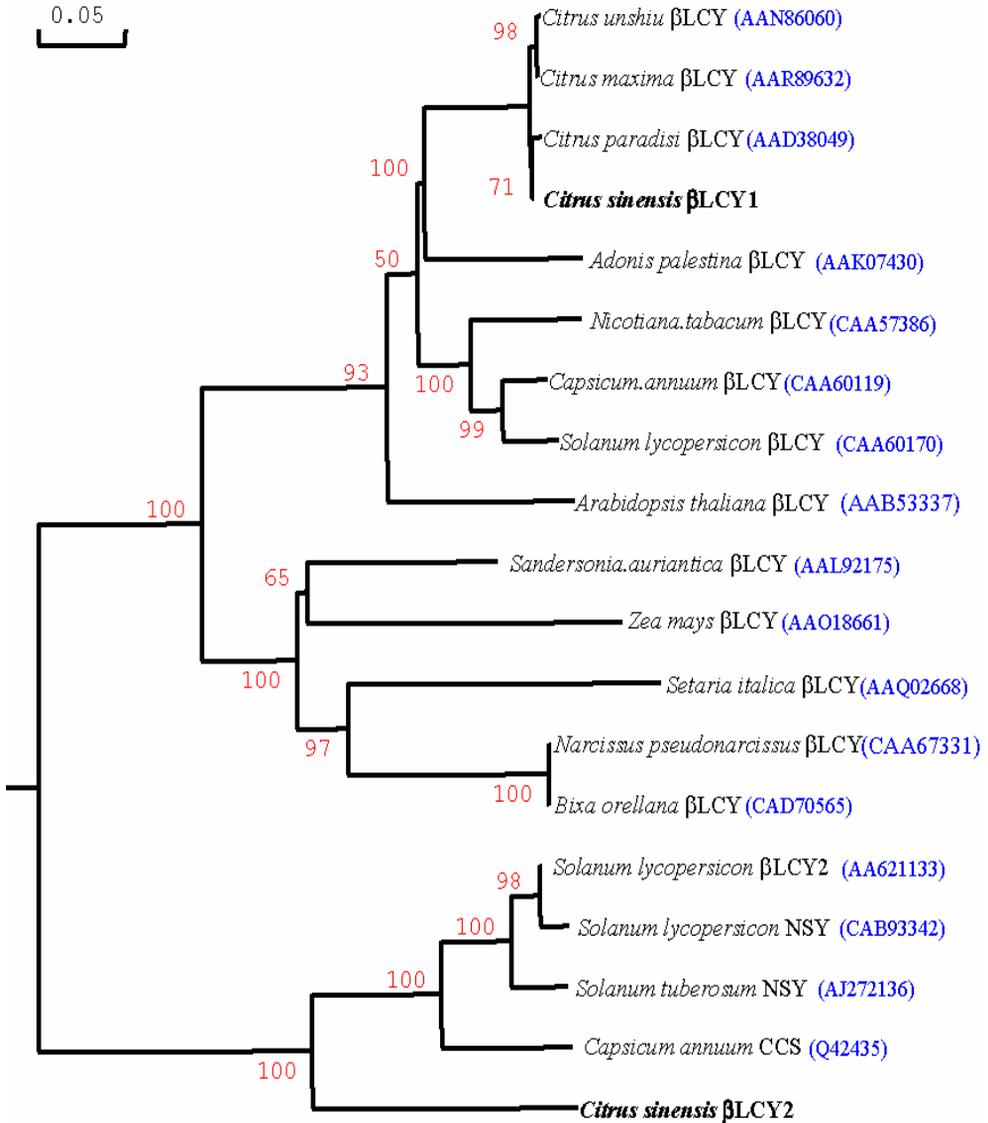


Figura 14: Árbol filogenético de distintas proteínas β-LCY, NSY y CCS de plantas, generado mediante el método de Neighbor-Joining incluido en el programa DNAMAN y el test de bootstrap (1000 repeticiones). Los números en los nodos de las ramas indican el porcentaje del valor de bootstrap. Se especifican entre paréntesis los números de acceso en la base de datos del NCBI. En negrita se resaltan las secuencias proteicas correspondientes a los cDNAs de Csβ-LCY1 y Csβ-LCY2 aislados en este trabajo.

El árbol filogenético mostró la existencia de dos grupos claramente diferenciados (Figura 14). Un primer grupo, en el que se engloba  $Cs\beta$ -LCY1, está formado por todas aquellas proteínas que codifican  $\beta$ -LCYs en plantas superiores, presentando todas ellas un porcentaje de identidad de 78%-87% (86%-93% de similitud), y localizándose la mayor parte de la variabilidad en los 40-80 primeros aminoácidos del extremo amino-terminal (Anexo I). El segundo grupo está formado por  $Cs\beta$ -LCY2, una  $\beta$ -LCY de tomate cuya expresión es específica de tejido cromoplástico (Sl $\beta$ -LCY2), NSY de tomate y patata (SINSY, StNSY) y CCS de pimiento (CaCCS), siendo el porcentaje de identidad entre todas ellas del 69%-75% (80%-86% similitud).

1.2. Estudio de la expresión de los genes  $Cs\beta$ -LCY1 y  $Cs\beta$ -LCY2 en el flavedo y la pulpa de la naranja `Navel`, durante el desarrollo y la maduración de los frutos, y en otros tejidos

El patrón de expresión de los genes  $Cs\beta$ -LCY1 y  $Cs\beta$ -LCY2 en el flavedo y la pulpa de naranja `Navel` se estudió durante el desarrollo y la maduración de los frutos (Figura 15). Como sonda para el gen  $Cs\beta$ -LCY1 se empleó un clon parcial previamente disponible en el laboratorio (Rodrigo *et al.* 2004) (ver apartado 9 del Capítulo Material y Métodos). Dicho clon corresponde a un fragmento de 517 nct localizado en el extremo 5' de la región codificante de  $Cs\beta$ -LCY1, y presentó un porcentaje de identidad del 64% con  $Cs\beta$ -LCY2. Como

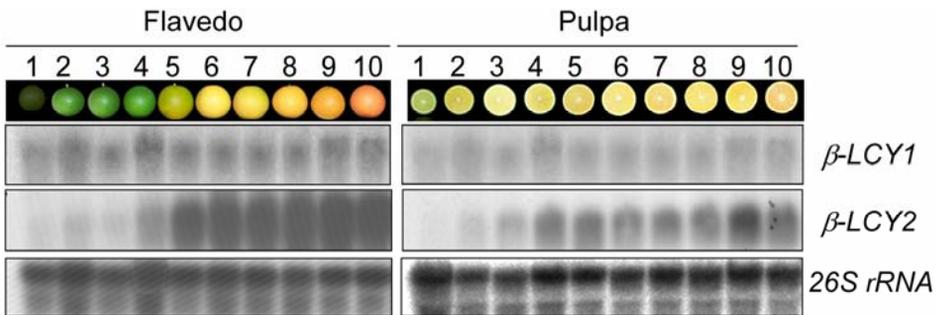


Figura 15: Patrón de expresión de  $Cs\beta$ -LCY1 y  $Cs\beta$ -LCY2 en el flavedo y la pulpa de la naranja `Navel` (*C. sinensis* L. Osbeck) durante el desarrollo y la maduración del fruto. Se utilizaron para cada carrera 8  $\mu$ g de RNA total de frutos recolectados en diferentes fechas: 1, 2 y 3 corresponden a frutos en estadio verde-inmaduro, recolectados a mediados del mes de junio, a mediados de julio y a principios de septiembre, respectivamente; 4, fruto en estadio verde-maduro, recolectado a principios de octubre; 5, fruto virando, recolectado la primera semana de noviembre; 6, 7 y 8, frutos cambiando de color recolectados la segunda, tercera y cuarta semana de noviembre; 9, fruto coloreado de la primera semana de diciembre; 10, fruto totalmente coloreado de finales de diciembre. En la parte inferior se muestra la hibridación con la sonda 26S rRNA.

sonda para el gen *Csβ-LCY2* se utilizó un fragmento de 250 nct en una zona de baja homología con *Csβ-LCY1* (46.6%).

Durante el desarrollo y la maduración de la naranja 'Navel' el gen *Csβ-LCY1* presentó en el flavedo un nivel de expresión bajo y constitutivo, en concordancia con resultados previos descritos en nuestro laboratorio (Rodrigo *et al.* 2004). En la pulpa, el patrón de expresión fue idéntico al observado en el flavedo, pero la acumulación de transcritos fue todavía menor (Figura 15).

En el caso del gen *Csβ-LCY2* apenas se detectó señal de hibridación en el flavedo durante los estadios verde-inmaduro del fruto (estadios 1 a 3). En el flavedo de frutos verde-maduro (estadio 4), inmediatamente antes de que se produjeran los primeros síntomas de desverdización, se detectó una señal débil. En el estadio 5, el nivel de expresión aumentó bruscamente y permaneció elevado durante el resto de la maduración (Figura 15). En la pulpa, donde la acumulación de transcritos aumentó de forma considerable y progresiva durante el desarrollo y la maduración del fruto, el nivel de expresión de *Csβ-LCY2* fue menor que en el flavedo.

Para analizar la especificidad de la expresión de *Csβ-LCY1* y *Csβ-LCY2* se estudiaron también sus niveles de expresión en otros tejidos, como hojas, tallos, raíces y flores (Figura 16). La señal de hibridación correspondiente al gen *Csβ-LCY1* se detectó en hojas jóvenes y adultas, así como en los pétalos de flores en pre- y postantesis y, en menor medida, en tallos y raíces. En cuanto al gen *Csβ-LCY2*, no se detectó acumulación de transcritos en hojas, tallos, ni raíces. Sin embargo, se detectó expresión en los pétalos. Estos resultados indican que *Csβ-LCY1* se expresa en todos los tejidos analizados, mientras que *Csβ-LCY2* muestra una expresión específica de tejido cromoplástico.

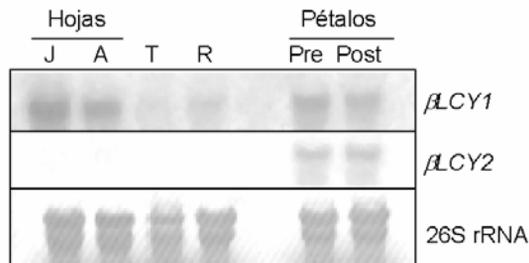


Figura 16: Expresión de los genes *Csβ-LCY1* y *Csβ-LCY2* en distintos tejidos de *C. sinensis*. Hojas jóvenes (J) y adultas (A), tallos (T), raíces (R) y pétalos de flores en pre- y postantesis. Se utilizaron para cada carrera 10 µg de RNA total. En la parte inferior se muestra la hibridación de la membrana con la sonda 26S rRNA.

Los tiempos de exposición de las membranas hibridadas con la sonda de *Csβ-LCY1* fueron entre 9 (Figura 15) y 4 (Figura 16) veces superiores a los tiempos de exposición de los filtros hibridados con la sonda *Csβ-LCY2*. Dado que el tamaño y la actividad específica de las sondas son similares estos resultados sugieren un mayor nivel de expresión del gen  $\beta$ -*LCY2* respecto de  $\beta$ -*LCY1*.

### 1.3. Análisis Southern de *Csβ-LCY1* y *Csβ-LCY2*

Para evaluar el número de copias de *Csβ-LCY1* y *Csβ-LCY2* en el genoma de *C. sinensis* se realizó un análisis Southern en condiciones de hibridación de alta restrictividad (ver Material y Métodos, apartado 8). La hibridación correspondiente a *Csβ-LCY1* mostró bandas únicas en las tres digestiones de genómico, sugiriendo que este gen se encuentra en copia única en el genoma de *C. sinensis*. La hibridación correspondiente a *Csβ-LCY2* mostró una banda única en la digestión con *SacI*, y dos bandas en las correspondientes a *EcoRI* y *HindIII*. La sonda de *Csβ-LCY2* posee un sitio de corte para *EcoRI*, lo que explicaría que en la carrera cargada con DNA digerido con este enzima hibriden dos fragmentos, observándose dos bandas (Figura 17). Los resultados correspondientes a las digestiones con *SacI* y *EcoRI* sugieren que  $\beta$ -*LCY2* se encuentra en copia única en el genoma de *C. sinensis*. Sin embargo, en la digestión *HindIII* se observan dos bandas, de muy diferente intensidad, que podrían indicar la existencia de más de una copia de este gen en el genoma de *C. sinensis*.

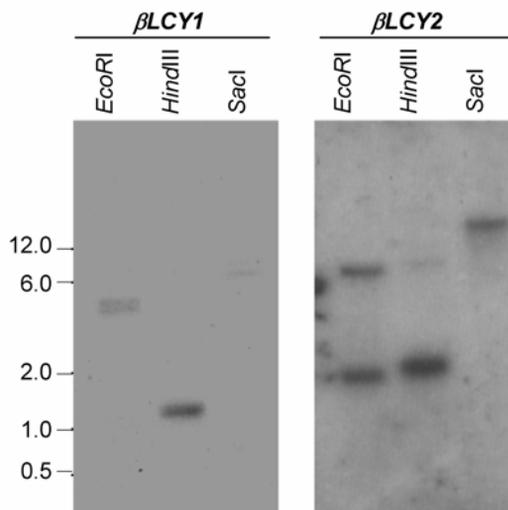


Figura 17: Análisis Southern de DNA genómico de *C. sinensis*. En cada carrera se cargaron 10  $\mu$ g de DNA digerido con *EcoRI*, *HindIII* y *SacI*. La membrana se hibridó con las sondas correspondientes a *Csβ-LCY1* y *Csβ-LCY2*.

#### 1.4. Caracterización funcional de $\beta$ -LCY1 y $\beta$ -LCY2 de naranja `Navel`

Con objeto de conocer si los genes *Cs $\beta$ -LCY1* y *Cs $\beta$ -LCY2* aislados codifican enzimas con actividad licopeno ciclasa se realizaron ensayos de expresión heteróloga en *E. coli* (ver Material y Métodos, apartado 15). Para llevar a cabo estos ensayos se generó una cepa de *E. coli* productora de licopeno, a la que denominamos XB-pACC. La expresión, en esta cepa, de genes que codifiquen proteínas capaces de ciclar el licopeno generará un cambio de coloración de las colonias. En este trabajo, los plásmidos pGem-lcy1 y pGem-lcy2 (apartado 1.1 de este capítulo), portadores de las regiones codificantes correspondientes a los genes *Cs $\beta$ -LCY1* y *Cs $\beta$ -LCY2*, respectivamente, se utilizaron para transformar la cepa de *E. coli* productora de licopeno. Como control negativo se utilizó un plásmido (pGem-T $\Phi$ ) portador de una secuencia de 272 nct que no codifica ninguna proteína.

La transformación de la cepa de *E. coli* XB-pACC con pGem-T $\Phi$  no produjo cambio de coloración en las colonias transformadas, que presentaron coloración rosada debido a la acumulación de licopeno (Figura 18A). La cepa XB-pACC transformada con el plásmido pGem-lcy1 presentó colonias de coloración amarillo-anaranjada (Figura 18B), y cuando la transformación se realizó con pGem-lcy2 se generaron colonias de color naranja intenso (Figura 18C). El cambio de color de las colonias de *E. coli* XB-pACC portadoras de los plásmidos pGem-lcy1 o pGem-lcy2 indicó conversión de licopeno a otros carotenoides.

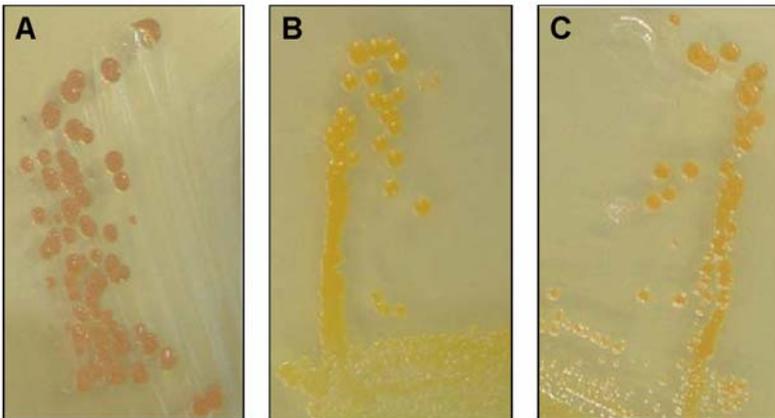


Figura 18: Coloración de colonias de *E. coli* cepa XB-pACC expresando distintos plásmidos. A, pGem-T $\Phi$ ; B, pGem-lcy1; C, pGem-lcy2.

La identificación de los carotenoides que se acumulan en las cepas de *E. coli* XB-pACC transformadas con los plásmidos pGem-TΦ, pGem-lcy1 y pGem-lcy2 se realizó mediante HPLC-PDA. Para ello se prepararon cultivos bacterianos líquidos de los que se extrajeron los carotenoides según la metodología detallada en el apartado 9.2 del capítulo Material y Métodos.

El análisis de los carotenoides presentes en los cultivos de *E. coli* XB-pACC con el plásmido pGem-TΦ mostró la existencia de un único carotenoide, cuyo espectro de absorción y tiempo de retención coincidieron con los del estándar del licopeno (pico 1, Figura 19A). En el caso de los cultivos XB-pACC portadores del plásmido pGem-lcy1, el análisis de la composición de carotenoides reveló la existencia de un carotenoide único, cuyo espectro de absorción y tiempo de retención coincidieron con los del estándar del β-caroteno (pico 2, Figura 19B). El cromatograma correspondiente a los cultivos bacterianos XB-pACC portadores del plásmido pGem-lcy2 indicó la presencia de dos carotenoides, correspondientes, por orden de elución, al β-caroteno y al licopeno (Figura 19C).

Los resultados indican que tanto Csβ-LCY1 como Csβ-LCY2 actúan sobre el licopeno, ciclando ambos extremos de la molécula en anillos β- y dando lugar al β-caroteno. Es interesante destacar que en ninguno de los cultivos analizados se detectó la presencia de γ-caroteno, que resultaría de la β-ciclación de un único extremo de la molécula de licopeno.

La capacidad β-ciclasa de Csβ-LCY1 y Csβ-LCY2 se evaluó como el porcentaje de conversión de licopeno a β-caroteno, realizándose en las mismas condiciones experimentales un mínimo de 8 ensayos independientes para cada β-LCY ensayada. Los porcentajes medios de conversión fueron  $95.45 \pm 1.20$  para Csβ-LCY1, y  $38.33 \pm 11.40$  para Csβ-LCY2. Estos resultados indican que la eficacia de la conversión de licopeno a β-caroteno es diferente para cada uno de los genes analizados.

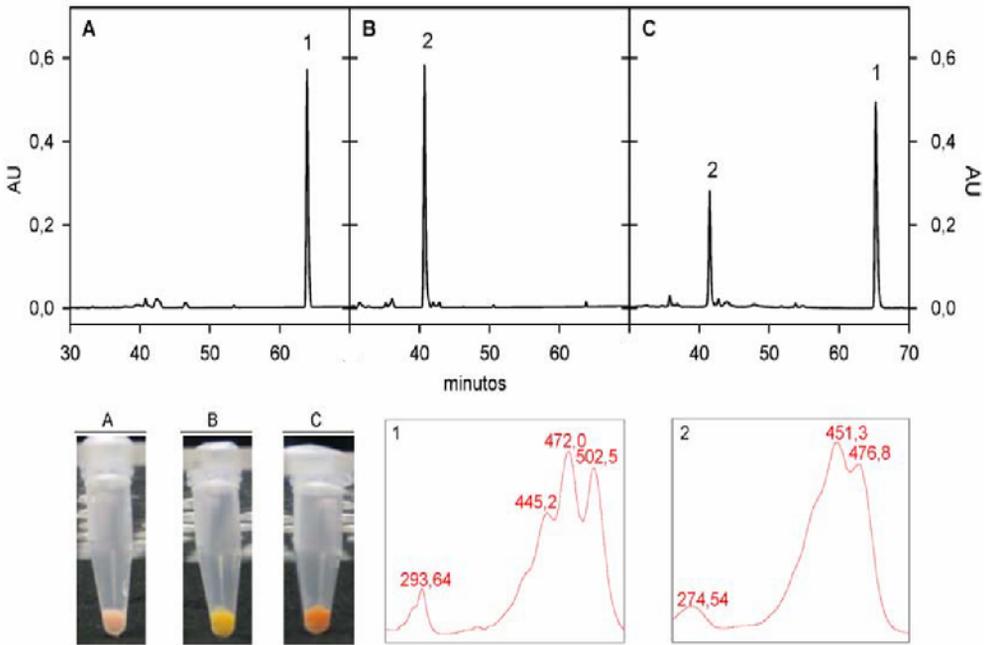


Figura 19: Cromatogramas MaxPlot de los extractos de carotenoides presentes en cultivos de la cepa de *E.coli* XB-pACC portadora de los plásmidos pGem-TΦ (A), pGem-lcy1 (B) y pGem-lcy2 (C). En la parte inferior se muestran fotografías representativas de la coloración de los cultivos bacterianos utilizados en cada ensayo. Se muestran, igualmente, los espectros con las longitudes de onda de los máximos de absorción de los picos marcados en la Figura como 1 y 2, correspondientes al licopeno y el  $\beta$ -caroteno, respectivamente.

## 2. Aislamiento y caracterización funcional de una $\epsilon$ -licopeno ciclasa ( $\epsilon$ -LCY) de naranja `Navel`

### 2.1. Aislamiento del cDNA correspondiente al gen $\epsilon$ -LCY de naranja `Navel` y análisis de su secuencia

Con objeto de obtener un cDNA de la secuencia codificante de  $Cs\epsilon$ -LCY se realizó una búsqueda en la base de datos del NCBI, localizándose una secuencia de *Citrus paradisi* anotada como un clon de longitud completa de  $\epsilon$ -LCY (Nº Acc. AF486650). A partir de dicha secuencia se diseñaron cebadores específicos en los extremos 5' y 3' que se utilizaron para amplificar la correspondiente secuencia a partir de cDNA de flavedo de frutos en estadio verde-inmaduro de la naranja `Navel` (ver Material y Métodos, apartado 13.2.a). La separación electroforética de los productos de PCR mostró la amplificación de una banda única del tamaño

esperado (aproximadamente 1300 nct, Figura 20A). Este fragmento fue reamplificado (Figura 20A), purificado, clonado en el vector pGem-T, y su identidad confirmada mediante secuenciación.

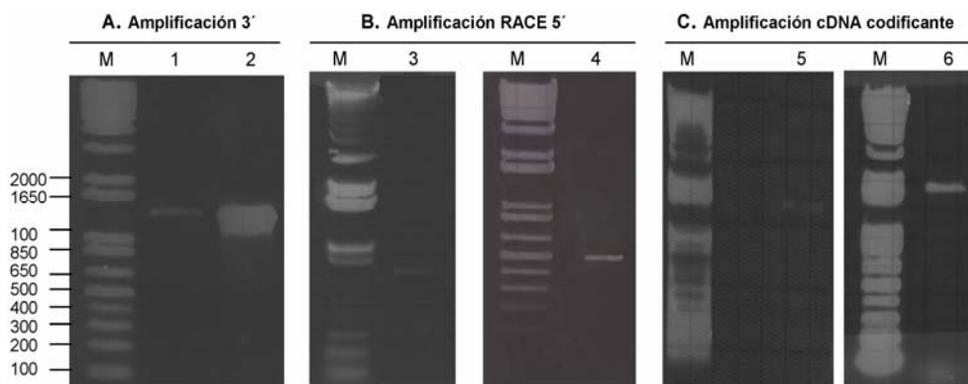


Figura 20: Obtención del cDNA de longitud completa correspondiente a *Csε-LCY*. A: Obtención de un fragmento de 1300 nct correspondiente al extremo 3' del gen. 1. Amplificación del cDNA de flavedo verde-inmaduro de frutos de la naranja 'Navel' con los cebadores MJ58 y MJ70. 2. Reamplificación, con los cebadores MJ58 y MJ70, de una dilución 1:10 del producto de la primera amplificación. B: Amplificación mediante RACE 5' del extremo 5' del gen. 3. Obtención, con los cebadores 'oligo dT anchor primer' y SP2MJ81 de un fragmento de 700 nct del extremo 5' del gen. 4. Reamplificación, con los cebadores 'oligo dT anchor primer' y SP3MJ82 de una dilución 1:10 del producto de la primera amplificación (carrera 3), obteniéndose un fragmento de 500 nct correspondiente al extremo 5' del gen. C: 5. Amplificación del cDNA correspondiente a la región codificante completa de *Csε-LCY* mediante amplificación con los cebadores MJ92 y MJ70. 6. Reamplificación con los cebadores MJ92 y MJ70 de una dilución 1:10 del producto amplificado en la carrera 5. M: Marcador de peso molecular '1Kb Plus DNA ladder'.

La comparación de la secuencia nucleotídica de *Csε-LCY*, 99.5% idéntica a la de *Citrus paradisi* (AF486650), con las de otras  $\epsilon$ -*LCY*s de plantas disponibles en las bases de datos mostró una elevada homología de secuencia, y puso de manifiesto que se trataba de una secuencia parcial del gen *Csε-LCY*, ya que faltaba en el extremo 5' una región altamente conservada en todas las  $\epsilon$ -*LCY*s de plantas.

Para obtener el extremo 5' del gen *Csε-LCY* se empleó la técnica 5'-RACE, utilizando el *kit* comercial 5'/3'RACE *kit* (Roche). El fundamento de esta técnica y el detalle de las distintas reacciones llevadas a cabo para el aislamiento del extremo 5' del gen se explican en el apartado 13.2.b del Capítulo de Material y Métodos de esta memoria.

Brevemente, se diseñaron los cebadores específicos MJ80SP1, MJ81SP2 y MJ82SP3 a partir del extremo 5' de la secuencia del clon parcial obtenido anteriormente. A partir de RNA total de flavedo de frutos verdes de 'Navel', donde *Csε-LCY* muestra su mayor nivel de expresión (Rodrigo *et al.* 2004), se sintetizó cDNA utilizando el cebador específico MJ80SP1. A continuación se realizó una primera amplificación del cDNA utilizando los cebadores 'oligo dT anchor primer' (suministrado con el *kit*) y MJ81SP2, obteniéndose un fragmento de aproximadamente 750 nct (Figura 20B). Una dilución 1:10 del producto de esta amplificación se utilizó como molde en una segunda reacción de PCR con los cebadores 'oligo dT anchor primer' y MJ82SP3, obteniéndose un fragmento de aproximadamente 700 nct (Figura 20B).

El fragmento de DNA de 700 nct resultante de la amplificación del extremo 5' de *Csε-LCY* fue purificado, clonado en el vector pGem-T y secuenciado. El extremo 3' de dicha secuencia coincidió con el extremo 5' del clon parcial aislado previamente, indicando que el extremo 5' aislado mediante la técnica 5'-RACE efectivamente constituye parte del gen *Csε-LCY*. La secuencia correspondiente al extremo 5' de *Csε-LCY* presentó una región no codificante de 324 nct, y una pauta de lectura abierta, desde la primera metionina, de 371 nct.

A partir de las secuencias de los clones parciales de *Csε-LCY* obtenidos previamente se diseñaron cebadores específicos para amplificar la secuencia codificante completa de *Csε-LCY* de naranja 'Navel' (ver Material y Métodos, apartado 13.2.c). Los resultados de esta amplificación se muestran en la Figura 20C. El fragmento de DNA obtenido fue reamplificado, purificado, ligado en el vector pGem-T (pGem-elcy) y utilizado para transformar *E.coli*. Se seleccionaron dos colonias transformadas con pGem-elcy, que poseían un inserto del tamaño adecuado, para extraer el DNA plasmídico y secuenciar el inserto. La secuencia nucleotídica de ambos clones fue idéntica. La secuencia codificante completa y su correspondiente secuencia de aminoácidos se muestran en la Figura 21. *Csε-LCY* codifica una proteína de 529 aminoácidos con un peso molecular de 58.92 kDa.

La secuencia proteica de *Csε-LCY* mostró un porcentaje de identidad entre el 66.30% y el 73.98% con el resto de  $\epsilon$ -*LCY* de plantas, localizándose la mayor parte de la variabilidad en el extremo amino-terminal (Anexo II). Sin considerar este extremo, la identidad a nivel de aminoácidos entre todas las  $\epsilon$ -*LCY* vegetales analizadas fue próxima al 85%. Al igual que en el caso de las  $\beta$ -*LCYs*, el programa ChloroP predijo la localización de  $\epsilon$ -*LCY* en el cloroplasto,



El extremo carboxi-terminal de las  $\epsilon$ -LCYs es indispensable para su actividad catalítica (Cunningham y Gantt 2001). En esta región se localizan 6 aminoácidos (marcados en negrita en la Figura 21) que determinan el número de anillos  $\epsilon$ - que son introducidos en la molécula de licopeno. En concreto, la secuencia ALILQL, que fue la identificada en *Cs $\epsilon$ -LCY*, determina actividad  $\epsilon$ -monoclasa, mientras que la secuencia SHIVLM determina actividad  $\epsilon$ -biclasa (Cunningham y Gantt 2001). Por tanto, la  $\epsilon$ -LCY aislada de naranja 'Navel' sería capaz de ciclar un único extremo de la molécula de licopeno.

En la estructura secundaria de *Cs $\epsilon$ -LCY* se predice la existencia de varias hélices  $\alpha$  (recuadradas en azul en la Figura 21) y además, una de ellas (recuadrada en rojo en la Figura 21) posee localización transmembrana, según el paquete informático TMHMM.

La secuencia de *Cs $\epsilon$ -LCY* presentó unos porcentajes de identidad/homología del 30.04%/32.40% y 28.47%/32.20% con las de *Cs $\beta$ -LCY1* y *Cs $\beta$ -LCY2*, respectivamente.

## 2.2. Caracterización funcional de $\epsilon$ -LCY de naranja 'Navel'

Con objeto de caracterizar funcionalmente la  $\epsilon$ -LCY aislada de naranja 'Navel' se realizaron ensayos de expresión heteróloga en la cepa de *E.coli* productora de licopeno XB-pACC. La transformación de *E.coli* XB-pACC con pGem-elcy resultó en un cambio de la coloración de las colonias, de rojo a naranja pálido, indicando la conversión del licopeno en otro compuesto (Figura 22).

El análisis de los extractos de carotenoides de los cultivos XB-pACC pGem-elcy indicó la presencia de dos carotenoides, cuyos espectros y tiempos de retención coincidieron con los del  $\delta$ -caroteno y los del licopeno, confirmando la capacidad de *Cs $\epsilon$ -LCY* de ciclar un extremo de la molécula de licopeno (Figura 22B). En ninguno de los extractos de carotenoides de XB-pACC pGem-elcy se detectó  $\epsilon$ -caroteno, resultante de la  $\epsilon$ -ciclación de los dos extremos de la molécula de licopeno, confirmándose la actividad  $\epsilon$ -monoclasa de *Cs $\epsilon$ -LCY*.

La actividad funcional de *Cs $\epsilon$ -LCY* se evaluó como el porcentaje de conversión de licopeno a  $\delta$ -caroteno. La actividad se evaluó en 8 ensayos independientes, y el porcentaje medio resultó del  $56.46 \pm 5.96$ .

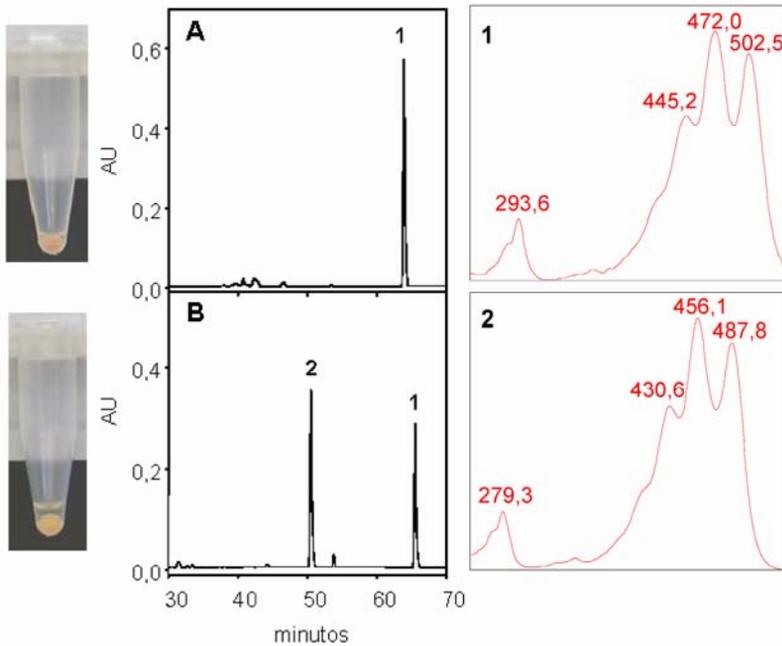


Figura 22: Cromatogramas MaxPlot de los extractos de carotenoides presentes en cultivos de la cepa de *E. coli* XB-pACC expresando pGem-TΦ (A) y pGem-elcy (B). A la izquierda de cada cromatograma se muestran fotografías representativas de la coloración de los cultivos bacterianos utilizados en cada ensayo. A la derecha de los cromatogramas se muestran los espectros con las longitudes de onda de los máximos de absorción de los picos marcados en la Figura como 1 y 2, correspondientes al licopeno y el  $\delta$ -caroteno, respectivamente.

### 3. Aislamiento y caracterización funcional de genes $\beta$ -LCYs de la naranja `Cara Cara´ y de los pomelos `Marsh´ y `Star Ruby´

Con objeto de investigar si posibles alteraciones en la secuencia de los genes  $\beta$ -LCYs o de las correspondientes proteínas, pueden ser las responsables de la anormal acumulación de licopeno en algunos frutos cítricos, se seleccionaron una naranja y un pomelo en los que previamente se había descrito la acumulación de este carotenoide. La naranja `Cara Cara´ es un mutante de naranja `Navel´ que acumula licopeno en la pulpa (Lee 2001; Alquézar *et al.* 2005; Xu *et al.* 2006). Entre las variedades de pomelo rojo disponibles se seleccionó el pomelo `Star Ruby´, que acumula licopeno tanto en el flavedo como en la pulpa y que se ha sido descrito como una de las variedades con mayor coloración rojiza (Rouseff *et al.* 1992). Además, se seleccionó una variedad de pomelo blanco (`Marsh´) originada, al igual que el pomelo rojo `Star Ruby´, a

partir de pomelo `Duncan` (Gmitter 1993), y que sirvió de control para todos los análisis.

### 3.1. Aislamiento de cDNAs correspondientes a $\beta$ -*LCY1* y caracterización funcional de los mismos

Para aislar y clonar la región codificante correspondiente al gen  $\beta$ -*LCY1* de frutos de naranja `Cara Cara`, pomelo `Marsh` y pomelo `Star Ruby`, se empleó la técnica de RT-PCR. Para ello, se extrajo RNA total del flavedo y la pulpa de frutos maduros de cada variedad y se utilizó la misma metodología que para el aislamiento de *Cs* $\beta$ -*LCY1* de naranja `Navel` (ver Material y Métodos, apartado 13.1). Brevemente, para cada uno de los genotipos, se sintetizaron a partir de cada tejido dos cDNAs independientes (Tabla 8), y tras la amplificación por PCR, se procedió a la clonación de los mismos en el plásmido pGem-T, generándose cuatro plásmidos pGem-lcy1 independientes que se utilizaron para transformar *E.coli*. Posteriormente, se seleccionaron dos colonias de cada transformación para su secuenciación. El análisis de las ocho secuencias de cada genotipo reveló la existencia de una pauta de lectura abierta de 1512 nct, que codifica un polipéptido de 504 aminoácidos, con una masa molecular de 56.33 kDa. La secuencia de aminoácidos de los 24 clones fue idéntica y presentó una identidad del 100% con la secuencia de  $\beta$ -*LCY1* de naranja `Navel`.

La actividad licopeno ciclasa de las proteínas  $\beta$ -*LCY1* codificadas por los cDNAs clonados se confirmó mediante expresión heteróloga en la cepa de *E. coli* XB-pACC y, posterior análisis mediante HPLC-PDA de los carotenoides presentes en los cultivos. La transformación de la cepa de *E. coli* XB-pACC, productora de licopeno, con los plásmidos pGem-lcy1, que contienen las regiones codificantes de los genes  $\beta$ -*LCY1* clonados a partir de naranja `Cara Cara`, pomelo `Marsh` y pomelo `Star Ruby`, produjo, en todos los casos, al igual que en el caso de  $\beta$ -*LCY1* de naranja `Navel`, colonias de coloración amarilla, indicativo de conversión de licopeno en otro compuesto (ver apartado 15 del Capítulo Material y Métodos). En todos los ensayos realizados se confirmó, mediante análisis HPLC-PDA de los carotenoides presentes en los cultivos bacterianos, la conversión de licopeno a  $\beta$ -caroteno. La actividad  $\beta$ -*LCY*, evaluada como porcentaje de conversión de licopeno a  $\beta$ -caroteno presentó valores entre el 83.95% y el 91.60% (Tabla 11), y no se detectó  $\gamma$ -caroteno en ninguno de los análisis.

Tabla 11: Actividad  $\beta$ -licopeno ciclasa de la proteína codificada por los genes  $\beta$ -*LCY1* aislados de naranja 'Cara Cara', pomelo 'Marsh' y pomelo 'Star Ruby'. La actividad se estimó, mediante ensayos de expresión en *E.coli* XB-pACC, como el porcentaje medio de conversión de licopeno a  $\beta$ -caroteno. n, indica el número de ensayos independientes realizados.

Genotipo	n	Actividad $\beta$ -licopeno ciclasa (%)
Cara Cara	7	91.60 $\pm$ 3.30
Marsh	7	85.00 $\pm$ 15.00
Star Ruby	9	83.95 $\pm$ 10.42

### 3.2. Aislamiento y caracterización funcional de cDNAs correspondientes a $\beta$ -*LCY2*

El aislamiento de cDNAs que contienen la región codificante correspondiente al gen  $\beta$ -*LCY2* de la naranja 'Cara Cara', el pomelo 'Marsh' y el pomelo 'Star Ruby' se realizó a partir del mismo material vegetal utilizado para el aislamiento del gen  $\beta$ -*LCY1* (Tabla 8), y siguiendo el mismo protocolo utilizado para clonar  $\beta$ -*LCY2* de naranja 'Navel'. Los cDNAs obtenidos se clonaron en el vector pGem-T (pGem-lcy2) y se utilizaron para transformar *E.coli*. Por cada genotipo se seleccionaron para su posterior análisis ocho clones independientes.

Las secuencias nucleotídicas de los ocho clones de  $\beta$ -*LCY2* de naranja 'Cara Cara' presentaron un 100% de identidad con las secuencias de naranja 'Navel'. La expresión heteróloga de los clones pGem-lcy2 de 'Cara Cara' en la cepa de *E.coli* XB-pACC produjo colonias anaranjadas, y el porcentaje medio de conversión de licopeno a  $\beta$ -caroteno fue del 38.00  $\pm$  14.33, muy similar al obtenido en los ensayos de  $\beta$ -*LCY2* de naranja 'Navel' (apartado 1.4 de este Capítulo).

Las secuencias de nucleótidos correspondientes al gen  $\beta$ -*LCY2* de los pomelos 'Marsh' y 'Star Ruby' presentaron un 100% de identidad entre ellas y un 98.01% de identidad con las secuencias de  $\beta$ -*LCY2* de las naranjas 'Navel' y 'Cara Cara'. El análisis detallado de las secuencias permitió identificar 27 cambios de nucleótidos (SNPs) entre la secuencia de  $\beta$ -*LCY2* aislada de naranjas ( $\beta$ -*LCY2a*) y la secuencia de  $\beta$ -*LCY2* aislada de pomelos ( $\beta$ -*LCY2b*), de los cuales 16 dan lugar a un cambio de aminoácido (Tabla 12).

Tabla 12: Cambios en las secuencias de nucleótidos y en las correspondientes secuencias de aminoácidos de los genes  $\beta$ -LCY2 aislados de naranjas ( $\beta$ -LCY2a) y pomelos ( $\beta$ -LCY2b). Se numeran del 1 al 27 los cambios en nucleótidos puntuales (SNP) encontrados entre las dos secuencias, indicándose en cada uno de ellos el número de nucleótido (n° nct) y el número del aminoácido (n° aa) de la secuencia de  $\beta$ -LCY2.

<u><math>\beta</math>-LCY2a / <math>\beta</math>-LCY b</u>					<u><math>\beta</math>-LCY2a / <math>\beta</math>-LCY b</u>				
SNP	n°nct	n°aa	nct	aa	SNP	n°nct	n°aa	nct	aa
1	79	26	C/A	P/H	15	776	258	C/T	D
2	89	29	C/G	S	16	953	317	C/A	S/R
3	202	67	T/A	V/E	17	1055	351	A/G	P
4	217	72	A/T	D/V	18	1070	356	T/C	A
5	287	95	A/T	P	19	1077	359	G/A	G/S
6	327	109	A/G	S/G	20	1092	364	A/G	I/V
7	330	110	G/A	V/I	21	1101	367	G/T	A/S
8	420	140	G/A	V/I	22	1124	374	A/G	R
9	553	184	C/T	S/L	23	1145	381	C/G	A
10	560	186	A/C	G	24	1166	388	A/G	E
11	565	188	A/G	K/R	25	1347	449	T/C	Y/H
12	590	196	C/T	H	26	1445	481	G/T	L/F
13	635	211	G/A	G	27	1467	489	G/C	V/L
14	695	231	G/C	E/D					

De los 16 cambios de aminoácido identificados entre las secuencias de  $\beta$ -LCY2a y  $\beta$ -LCY2b, 6 de ellos, correspondientes a las posiciones 110, 140, 188, 231, 364 y 489, son conservativos según la matriz Blosum45 de similitud de aminoácidos (Henikoff y Henikoff 1992). Los aminoácidos 26, 67 y 72 se encuentran localizados en el péptido señal de importación a plastidios. El aminoácido en la posición 26 es bastante variable en  $\beta$ -LCYs vegetales. Sin embargo, en las posiciones 67 y 72 la variabilidad entre  $\beta$ -LCYs es muy reducida, ya que se encuentran en una región conservada en  $\beta$ -LCYs (Figura 23).

Los aminoácidos 109 y 110 se localizan en un motivo de unión a dinucleótido (Figura 23). La Glicina-109 de la secuencia de  $\beta$ -LCY2b (aislada de

*C.paradisi*) se encuentra totalmente conservada en todas las  $\epsilon$ - y  $\beta$ -LCYs, mientras que la Isoleucina-110 de  $\beta$ -LCY2b se encuentra conservada en StNSY, Le $\beta$ -LCY2 y CaCCS (Anexo I).

Entre los cambios de aminoácidos observados entre  $\beta$ -LCY2a/ $\beta$ -LCY2b cabe destacar la sustitución de Glicina por Serina en la posición 359, ya que el residuo de Glicina se encuentra totalmente conservado en todas las  $\beta$ -LCY vegetales, incluidas Le $\beta$ -LCY2 y CaCCS (Anexo I) y además forma parte de un motivo característico de ciclasas (MCII, Figura 23). El resto de cambios de aminoácidos se encuentran en posiciones poco conservadas.

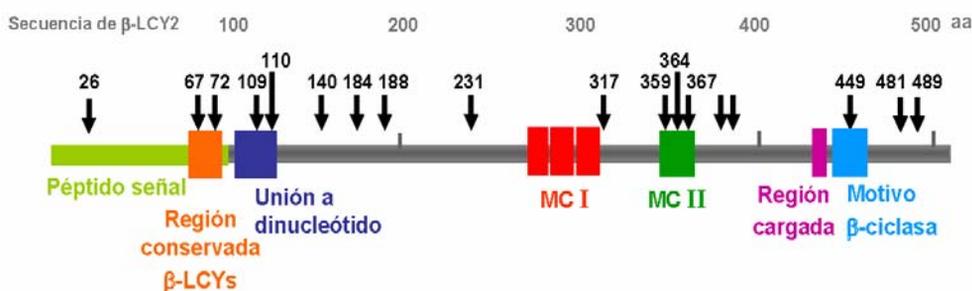


Figura 23: Esquema de los cambios de aminoácido identificados entre las secuencias de  $\beta$ -LCY2a (*C. sinensis*) y  $\beta$ -LCY2b (*C.paradisi*) (Tabla 12). Los cambios de aminoácido se marcan con una flecha negra. Se representan los motivos previamente descritos en la Figura 12.

Los 8 clones independientes pGem-lcy2 obtenidos para cada variedad de pomelo se expresaron en la cepa de *E.coli* XB-pACC. Tras dos días de incubación a 30 °C todas las colonias transformantes presentaron coloración rosada. El análisis de los carotenoides presentes en estos cultivos bacterianos reveló, en todos ellos, la existencia de un carotenoide mayoritario, cuyo espectro y tiempo de retención fueron coincidentes con los del licopeno y, en algunos casos, un segundo carotenoide, muy minoritario o ausente, cuyo espectro y tiempo de retención correspondieron con los del  $\beta$ -caroteno. No se detectó  $\gamma$ -caroteno en ninguno de estos análisis. El porcentaje medio de conversión de licopeno en  $\beta$ -caroteno de las proteínas  $\beta$ -LCY2 de ambas variedades de pomelo fue del  $4.2 \pm 3.6$ . Por tanto, el gen  $\beta$ -LCY2 de *C.paradisi* ( $\beta$ -LCY2b) codifica una proteína que, en los ensayos funcionales realizados, carece de actividad  $\beta$ -LCY o ésta es muy reducida.

#### 4. Análisis de la secuencia del gen $\beta$ -LCY2 de naranja (*Citrus sinensis*) y pomelo (*Citrus paradisi*)

Los resultados previos indican la existencia en cítricos de dos genes que codifican  $\beta$ -LCYs:  $\beta$ -LCY1 y  $\beta$ -LCY2. Del gen  $\beta$ -LCY2 se han identificado dos secuencias,  $\beta$ -LCY2a y  $\beta$ -LCY2b, correspondientes a naranja (*C. sinensis*) y pomelo (*C. paradisi*), respectivamente. Pese a la elevada identidad existente entre  $\beta$ -LCY2a y  $\beta$ -LCY2b (96.02% a nivel de aminoácidos),  $\beta$ -LCY2a posee actividad ciclasa mientras que  $\beta$ -LCY2b la tiene reducida cerca de un 90%. El hecho de que  $\beta$ -LCY2a se haya aislado a partir de *C. sinensis* y que  $\beta$ -LCY2b se haya aislado a partir de *C. paradisi* sugiere que, en cítricos pueden existir al menos dos alelos distintos para el gen  $\beta$ -LCY2.

Con el fin de aislar las secuencias genómicas correspondientes a  $\beta$ -LCY2a y  $\beta$ -LCY2b, DNA genómico de naranja 'Navel' y de pomelos 'Marsh' y 'Star Ruby' fue amplificado utilizando los cebadores MJ69 y MJ66, que amplifican la región codificante completa de  $\beta$ -LCY2. La longitud de los productos de PCR fue de aproximadamente 1500 nct, similar a la de los clones correspondientes a  $\beta$ -LCY2 amplificados a partir de cDNAs, indicando la ausencia de intrones en el gen  $\beta$ -LCY2 de cítricos. Los productos de PCR fueron purificados y directamente secuenciados. Para llevar a cabo la secuenciación se diseñaron un par cebadores (MJ67 5'-CTCATCGCGTCATAGTGCAAGG-3'; MJ68 5'-AGCTCGCAAGTAAGGCTCATTCCC-3') que amplifican una región de aproximadamente 450 nct, en la que se encuentran 8 SNPs previamente identificados (SNPs del 8 a 15, Tabla 12). Las secuencias genómicas de  $\beta$ -LCY2, tanto de *C. sinensis* como de *C. paradisi*, mostraron indeterminaciones en la secuenciación en las posiciones de los SNPs. El análisis de los correspondientes cromatogramas reveló que, en todos los casos, las indeterminaciones en la lectura se debieron a la existencia de dos nucleótidos en una misma posición. Además, los nucleótidos identificados en cada una de estas posiciones coincidieron con los establecidos para cada SNP (Tabla 12). En la Figura 24 se muestra, a modo de ejemplo, un fragmento de la región secuenciada correspondiente a un producto de PCR del gen  $\beta$ -LCY2 de *C. sinensis* v. 'Navel', en el que se aprecia claramente la existencia de dobles picos en aquellas posiciones en las que previamente se habían identificado SNPs.

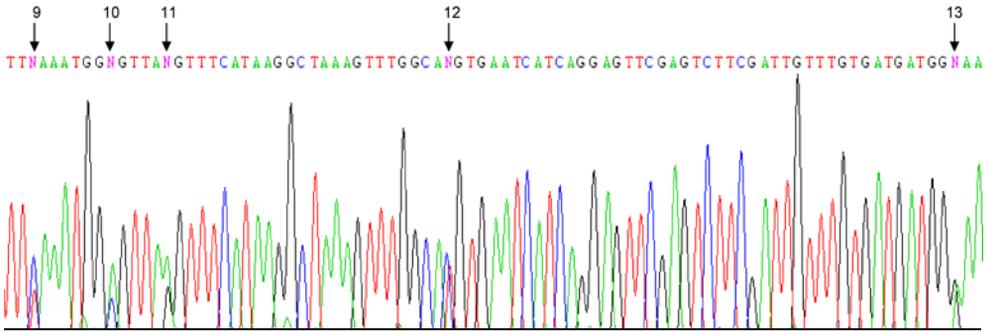


Figura 24: Secuencia de un fragmento (nucleótidos 179 a 215) del gen  $\beta$ -*LCY2* de *Citrus sinensis* v. 'Navel' en el que se localizan 5 SNPs. En la parte superior del cromatograma aparece la secuencia de nucleótidos correspondiente. Los nucleótidos señalados con una N en el cromatograma reflejan el error de lectura ante la existencia de dos picos. Los números indican el n° de SNP asociado a cada posición, según la nomenclatura de la Tabla 12.

La existencia de dobles picos en las secuencias de los amplificadores de DNA genómico de  $\beta$ -*LCY2* de *C. sinensis* y *C. paradisi* indica que en ambas especies existen los dos alelos del gen ( $\beta$ -*LCY2a* y  $\beta$ -*LCY2b*).

#### 4.1. Análisis de los transcritos de $\beta$ -*LCY2* en *Citrus sinensis* ( $\beta$ -*LCY2a*) y *Citrus paradisi* ( $\beta$ -*LCY2b*)

Los resultados anteriores parecen indicar que tanto en el genoma de las naranjas (*C. sinensis*) como en el de los pomelos (*C. paradisi*) están presentes los dos alelos del gen  $\beta$ -*LCY2*. Sin embargo, todos los cDNAs correspondientes a este gen aislados hasta el momento a partir de naranjas (apartados 1.1 y 3.2) correspondieron a  $\beta$ -*LCY2a*, mientras que todos los cDNAs clonados a partir de pomelos correspondieron a  $\beta$ -*LCY2b* (apartado 3.2). Este hecho podría explicarse bien, por el bajo número de clones obtenido a partir de cada genotipo, bien porque en cada una de las especies analizadas se estuviera transcribiendo mayoritariamente un único alelo del gen.

Con el fin de determinar que alelos del gen  $\beta$ -*LCY2* se estaban transcribiendo en naranja 'Navel', pomelo 'Marsh' y pomelo 'Star Ruby', RNA total de cada uno de estos tres genotipos fue retrotranscrito, amplificado y secuenciado. Como material de partida se seleccionó pulpa de frutos virando, que es el estadio en el que empieza a detectarse la acumulación de mRNAs correspondientes a este gen. Brevemente, cDNA de pulpa de frutos virando de naranja 'Navel', pomelo 'Marsh' y pomelo 'Star Ruby', se usó como molde en reacciones de PCR utilizando los cebadores MJ69 y MJ66, que amplifican la región

codificante completa de  $\beta$ -*LCY2*, y los productos de la reacción se purificaron y secuenciaron directamente utilizando los cebadores MJ67 y MJ68, que amplifican una región del gen en la que se localizan 8 SNPs (SNPs del 8 a 15, Tabla 12).

Tanto en la naranja `Navel` como en los pomelos `Marsh` y `Star Ruby`, los cromatogramas resultantes de la secuenciación de los fragmentos amplificados mostraron la existencia de picos dobles en aquellas posiciones nucleotídicas en las que previamente se habían determinado la existencia de SNPs, indicando que, en los tres genotipos se están transcribiendo los dos alelos del gen. En la Figura 25 se muestra, a modo de ejemplo, un fragmento de la región secuenciada, en la que se aprecia claramente la existencia de dobles picos en las tres variedades analizadas.

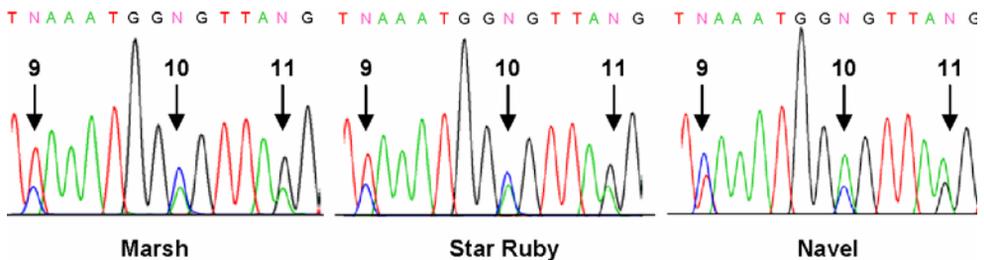


Figura 25: Secuencias parciales correspondientes a la amplificación de cDNAs del gen  $\beta$ -*LCY2* de pomelos `Marsh` y `Star Ruby` y de naranja `Navel`. En la parte superior del cromatograma aparece la secuencia de nucleótidos correspondiente. Los nucleótidos señalados con una N en el cromatograma reflejan el error de lectura ante la existencia de dos picos. Los números indican el n° de SNP asociado a cada posición, según la nomenclatura de la Tabla 12.

Es interesante destacar que en las dos variedades de pomelo, en aquellas posiciones en las que existen SNPs, el nucleótido más abundante (mayor altura de pico) siempre correspondió al del alelo  $\beta$ -*LCY2b*, mientras que en naranja `Navel` el nucleótido más abundante correspondió al del alelo  $\beta$ -*LCY2a* (Figura 25). Por tanto, en pomelos `Marsh` y `Star Ruby` parece transcribirse en mayor medida  $\beta$ -*LCY2b* que  $\beta$ -*LCY2a*, mientras que en naranja `Navel` los transcritos de  $\beta$ -*LCY2a* serían más abundantes que los de  $\beta$ -*LCY2b*.

Para confirmar este resultado se sintetizó, para cada uno de los genotipos, a partir de RNA total de pulpa de frutos virando, un nuevo cDNA, que se utilizó como molde para la amplificación de cDNAs conteniendo la región codificante correspondiente al gen  $\beta$ -*LCY2*. Los productos de amplificación fueron purificados, ligados en el vector pGem-T y utilizados para transformar *E.coli*. De

cada transformación se seleccionaron entre 9 y 12 colonias independientes para la secuenciación del inserto clonado. Más del 70% de los clones aislados a partir de pomelos, tanto `Marsh` como `Star Ruby`, correspondieron al alelo  $\beta$ -LCY2b (Tabla 13), confirmándose la mayor transcripción de este alelo en *C. paradisi*. En el caso de naranja `Navel` 10 de los 15 clones secuenciados correspondieron a Cs $\beta$ -LCY2a, confirmándose una mayor transcripción del alelo  $\beta$ -LCY2a en el tejido seleccionado (Tabla 13).

Tabla 13: Distribución de clones de cDNA correspondientes a los alelos  $\beta$ -LCY2a y  $\beta$ -LCY2b obtenidos a partir de pulpa virando de naranja `Navel`, pomelo `Marsh` y pomelo `Star Ruby`. `n` indica el nº total de clones secuenciados.

Genotipo	n	$\beta$ -LCY2a	$\beta$ -LCY2b
Navel	15	10	5
Marsh	9	2	7
Star Ruby	12	3	9

#### 4.2. Estudio `in silico` de la expresión de $\beta$ -LCY2 en diferentes tejidos y especies de frutos cítricos

Una forma de estimar la acumulación de un mRNA en un tejido/órgano es a partir de la frecuencia relativa con la que se aíslan ESTs o clones del mismo en una genoteca no sesgada obtenida a partir de dicho órgano o tejido (expresión digital o `in silico`).

En la base de datos `HarvEST: Citrus` (<http://harvest.ucr.edu/>) se encuentran anotados más de 130000 ESTs, procedentes de 78 genotecas generadas a partir de 11 especies de cítricos distintas y 19 tejidos diferentes. De las 78 genotecas, 43 son de tejidos reproductivos (ovarios, flores, frutos), 24 de tejidos vegetativos (tallos, brotes, hojas, plántulas...), 8 de raíces y 3 de semillas. En la base de datos del `Citrus Functional Genomic Project` (CFGP, <http://bioinfo.ibmcp.upv.es/genomics/cfgpDB/>) se encuentran anotados 85695 ESTs de alta calidad, procedentes de 53 genotecas, generadas a partir de material vegetal de 8 especies de cítricos distintas. De las 53 genotecas, 21 son de tejidos reproductivos (ovarios, flores, frutos), 19 de tejidos vegetativos

(tallos, brotes, hojas, plántulas...), 10 de raíces y 3 de una mezcla compleja de tejidos.

La búsqueda de secuencias homólogas al gen  $\beta$ -*LCY2* en las bases de datos CFGP y HarvEST: Citrus, mediante el algoritmo de búsqueda BLASTn, identificó ESTs correspondientes a este gen en las 12 genotecas detalladas en la Tabla 14, generadas todas ellas a partir de tejidos reproductivos. Se detectaron también algunos ESTs correspondientes a  $\beta$ -*LCY2* que no se han incluido en el estudio, ya que no se especificaba el origen y los tejidos a partir de los que se realizaron las genotecas.

Es interesante destacar que, coincidiendo con los resultados anteriores (Figura 16), no se detectó ningún EST en genotecas de raíces o de tejidos vegetativos. Tampoco se detectó ningún EST correspondiente a  $\beta$ -*LCY2* en genotecas generadas a partir de semillas. El 90.47% de los ESTs correspondientes a  $\beta$ -*LCY2* se identificaron en tejidos del fruto, fundamentalmente en flavedo y, el único tejido verde en el que se encontraron ESTs correspondientes a  $\beta$ -*LCY2* fue el de la genoteca OF1 (Tabla 14).

Los 14 ESTs correspondientes a  $\beta$ -*LCY2* localizados en la base de datos HarvEST: Citrus se agrupan en 4 contigs, denominados 5147, 5190, 5892 y 5893. Los dos primeros mostraron una identidad a nivel de nucleótidos del 100% con  $\beta$ -*LCY2b*, correspondiendo el contig 5147 al extremo 5' del gen y el contig 5190 al extremo 3' del gen. Los contigs 5892 y 5893 presentaron una identidad a nivel de nucleótidos del 100% con el extremo 5' y 3' de  $\beta$ -*LCY2a*, respectivamente. Los 7 ESTs correspondientes a  $\beta$ -*LCY2* localizados en la base de datos CFGP se agrupan en 2 contigs, denominados acl611Contig1 y acl611Contig2, correspondientes a una zona central de 658 nct de la secuencia de  $\beta$ -*LCY2a*, y a la región codificante completa de  $\beta$ -*LCY2b*, respectivamente.

En aquellas genotecas generadas a partir de material vegetal de *C. paradisi* únicamente se detectaron 2 ESTs, pertenecientes a los contigs 5147 y 5190, correspondientes ambos al alelo *b* de  $\beta$ -*LCY2*. En las genotecas generadas a partir de material vegetal de *C. sinensis* se detectaron 11 ESTs, 6 de ellos correspondientes a  $\beta$ -*LCY2a* y 5 de ellos correspondientes a  $\beta$ -*LCY2b*. En las genotecas de *C. reticulata* se detectó 1 único EST, perteneciente al contig 5893, correspondiente al extremo 3' de  $\beta$ -*LCY2a*. En las genotecas de *C. clementina* se detectaron 7 ESTs, 5 de ellos correspondientes a  $\beta$ -*LCY2a* y 2 de ellos correspondientes a  $\beta$ -*LCY2b*.

Tabla 14: Genotecas de las bases de datos CFGP y HarVEST: Citrus en las que se encontraron ESTs correspondientes a  $\beta$ -LCY2. Se indica el número de ESTs correspondientes a cada uno de los alelos de  $\beta$ -LCY2 que se encontraron en cada una de las genotecas.

Nombre genoteca	Base de datos	Especie	Descripción de la genoteca	n° de ESTs	
				$\beta$ -LCY2a	$\beta$ -LCY2b
Flavedo 6	HarVEST	<i>C. paradisi</i>	Flavedo de frutos maduros tratados con agua caliente.	0	1
Flavedo 5	HarVEST	<i>C. paradisi</i>	Flavedo de frutos maduros acondicionados a alta temperatura.	0	1
UCRCR01	HarVEST	<i>C. reticulata</i>	Albedo de frutos virando.	1	0
UCRCS04	HarVEST	<i>C. sinensis</i>	Brotes florales en diferentes estadios de desarrollo.	2	0
UCRCS05	HarVEST	<i>C. sinensis</i>	Pulpa de frutos maduros almacenados en frío.	0	1
UCDCS01	HarVEST	<i>C. sinensis</i>	Flavedo de frutos maduros.	1	0
UCRCS11	HarVEST	<i>C. sinensis</i>	Flavedo y albedo de frutos de diferentes estadios de desarrollo.	3	1
UCRCS01	HarVEST	<i>C. sinensis</i>	Flavedo y albedo de frutos maduros acondicionados al frío.	0	3
PostHarvP1	CFGP	<i>C. clementina</i>	Flavedo y albedo de frutos maduros infectados con <i>Penicillium</i>	2	0
TF	CFGP	<i>C. clementina</i>	Flavedo y pulpa	0	2
FlavFr1	CFGP	<i>C. clementina</i>	Flavedo de frutos maduros almacenados en frío.	2	0
OF1	CFGP	<i>C. clementina</i>	Ovarios senescentes y frutos de 5 semanas tratados con GA3	1	0

### 4.3. Estudio de la región promotora del gen $\beta$ -*LCY2*

Con objeto de identificar posibles elementos reguladores de la expresión del gen  $\beta$ -*LCY2*, se obtuvieron, a partir de material vegetal de *C. sinensis* y *C. paradisi*, según se describe en el apartado 14 del Capítulo de Material y Métodos, 12 clones de DNA genómico correspondientes a una región del promotor del gen  $\beta$ -*LCY2*. La identidad de cada uno de los clones se confirmó mediante secuenciación.

Los clones aislados presentaron una longitud de 1460 nct, 1154 de los cuales correspondieron a la región promotora del gen  $\beta$ -*LCY2*. El fragmento amplificado también contenía los primeros 306 nct de la región codificante de  $\beta$ -*LCY2*, que incluye cinco SNPs previamente identificados (SNPs del 1 a 5, Tabla 12). Seis de las secuencias aisladas presentaron, en la zona codificante del gen, los 5 nucleótidos correspondientes al alelo  $\beta$ -*LCY2a*, mientras que las otras seis secuencias clonadas presentaron en la zona codificante los 5 cambios nucleotídicos correspondientes al alelo  $\beta$ -*LCY2b*. Las secuencias promotoras de los alelos  $\beta$ -*LCY2a* y  $\beta$ -*LCY2b* difirieron únicamente en 20 nct, presentando una identidad de secuencia del 96% (ver Anexo III).

Con el objetivo de identificar posibles elementos reguladores *cis*, las secuencias del promotor de los alelos  $\beta$ -*LCY2a* y  $\beta$ -*LCY2b* se analizaron utilizando la base de datos PLACE (Higo *et al.* 1999). Se identificaron diversos motivos en la secuencia analizada del promotor de  $\beta$ -*LCY2a* y  $\beta$ -*LCY2b* (Tabla 15). Entre las posiciones -957 y -939 se identificó en tandem la secuencia ATCTA, previamente descrita en el promotor de distintos genes implicados en la biosíntesis de carotenoides (*AtDXS*, *AtPSY*, *LePDS*, *ZmPDS*), y que parece tener un papel decisivo en la interacción con algún factor de transcripción que asegura una fuerte actividad génica basal, independiente de factores exógenos (Welsch *et al.* 2002). Además, se identificaron 3 motivos posiblemente implicados en la respuesta a etileno (Rawat *et al.* 2005) y un motivo descrito como de respuesta a auxinas (Ulmasov *et al.* 1995). Se identificó además una región de 6 nucleótidos (TGTGACA) muy similar a un motivo identificado en el gen *cucumis*in de melón que dirige la expresión del mismo específicamente al fruto (Yamagata *et al.* 2002).

De los 20 cambios nucleotídicos existentes entre las secuencias promotoras de los alelos  $\beta$ -*LCY2a* y  $\beta$ -*LCY2b*, únicamente uno estaba localizado en motivos previamente identificados. El alelo  $\beta$ -*LCY2a* presentó en el motivo de

respuesta a etileno -752 la secuencia atAcaaac, donde se indica en mayúsculas el cambio de nucleótido respecto a la secuencia promotora de  $\beta$ -*LCY2b* (Tabla 15).

Tabla 15: Posibles elementos reguladores *cis* localizados en la secuencia del promotor de *Cs $\beta$ -LCY2*.

Motivo	Posición	Secuencia en $\beta$ - <i>LCY2b</i>
ATCTA en tandem	-958	ATCTATCATCAACATCTA
Respuesta a etileno	-858	ATTTCAA
	-752	ATTCAAAC
	-181	AATTCAAA
Especificidad de fruto	-715	TGTGACA
Respuesta a auxinas	-206	CACGCAAT



## CAPÍTULO II `CARACTERIZACIÓN DE LA BIOSÍNTESIS Y ACUMULACIÓN DE CAROTENOIDES EN DISTINTAS ESPECIES Y VARIEDADES DE FRUTOS CÍTRICOS`

### 1. Caracterización de la biosíntesis y acumulación de carotenoides durante la maduración de frutos de la naranja (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) `Navel` y del mutante `Cara Cara`

La naranja `Cara Cara`, originaria de Venezuela, es una mutación gemaria de la variedad `Washington Navel`. El fruto de esta mutación es muy similar al de su variedad parental, excepto en la coloración roja de su pulpa. A diferencia de las naranjas sanguinas que presentan coloración rojiza en la pulpa y la piel debido a la presencia de antocianos, la coloración característica de la pulpa de `Cara Cara` se debe a la presencia de licopeno (Lee 2001), un carotenoide lineal ausente en los frutos de naranjas y mandarinas. La pulpa de los frutos maduros de `Cara Cara` acumula, además, importantes cantidades de otros carotenos lineales (fitoeno y fitoflueno) y  $\beta$ -caroteno (Lee 2001; Xu *et al.* 2006). Con el objeto de estudiar los mecanismos responsables que conducen a la peculiar composición de carotenoides en la pulpa de la naranja `Cara Cara` se abordó la caracterización, tanto fisiológica como molecular, de la biosíntesis y acumulación de carotenoides en los frutos de la naranja `Navel` y del mutante `Cara Cara` a lo largo del proceso de desarrollo y maduración.

Para llevar a cabo estos objetivos se recolectaron frutos de la naranja `Navel` y del mutante `Cara Cara` desde un estadio verde-inmaduro (junio) a intervalos de 4 semanas hasta que el fruto alcanzó el estadio verde-maduro y, a intervalos de tiempo más próximos, desde que comenzó el cambio de color hasta que el fruto alcanzó su coloración final, sumando un total de diez fechas de muestreo (Figura 26).

#### 1.1. Evolución del tamaño, del color y del contenido de clorofilas y carotenoides en el flavedo y la pulpa de frutos de las naranjas `Navel` y `Cara Cara` durante el desarrollo y la maduración

La evolución del desarrollo y la maduración de los frutos de `Cara Cara` y `Navel` se estudió durante dos campañas consecutivas (2003-2004 y 2004-2005). En la Figura 27 (A y D) se observa que el crecimiento de los frutos del mutante, medido como el diámetro del fruto, siguió la misma evolución que aquellos de la variedad `Navel`. Ambas variedades presentaron frutos de un diámetro medio de 3.30 cm en el mes de junio (estadio 1) y un patrón de

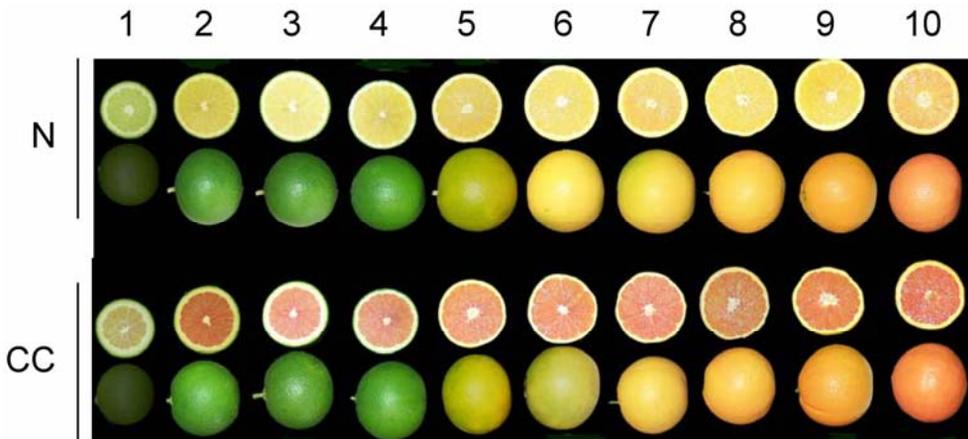


Figura 26: Aspecto interno y externo de frutos de las naranjas `Navel´ (N) y `Cara Cara´ (CC) en los 10 estadios de desarrollo y maduración recolectados en este estudio. Los frutos corresponden a la campaña 2003-2004.

crecimiento continuo hasta el mes de octubre (estadio 4), momento en el que los frutos alcanzaron su tamaño máximo, próximo a los 7 cm de diámetro.

Mediante la determinación del índice  $a/b$  se estudió la evolución del color del flavedo y de la pulpa durante el desarrollo y la maduración de las naranjas `Navel´ y `Cara Cara´ (Figura 27). Dicha evolución, en el caso del flavedo, se ajustó bien a una curva sigmoide con el punto de inflexión próximo a cero. Al igual que en la variedad parental, el flavedo de `Cara Cara´ mostró coloración verde intensa ( $a/b \approx -0.63$ ) durante todo el período de crecimiento del fruto, desde junio hasta principios de octubre. A partir de este momento, en ambas variedades se produjo un rápido aumento del cociente  $a/b$  que presentó valores en torno a  $-0.25$  a principios de noviembre, en torno a cero a mediados de mes (correspondiente a fruto virando) y positivos a finales del mismo mes ( $+0.35 \pm 0.11$  y  $+0.29 \pm 0.08$  en `Navel´ y `Cara Cara´, respectivamente). A partir de finales de noviembre, el índice  $a/b$  del flavedo aumentó progresivamente y de forma paralela en ambas variedades, alcanzando, a finales de diciembre, un valor de  $+0.83 \pm 0.09$  en el caso del mutante y de  $+0.74 \pm 0.07$  en el caso de `Navel´, ambos correspondientes a la típica coloración naranja del flavedo.

Las curvas de la evolución del color interno ( $a/b$ ) a la largo de la maduración de las dos variedades de naranja estudiadas mostraron un patrón similar, aunque el índice de color correspondiente a la pulpa de la naranja `Cara Cara´ fue superior al de su parental (Figura 27). La diferencia cuantitativa del índice  $a/b$  entre la pulpa de ambas variedades se debió fundamentalmente a

valores superiores de la coordenada  $a$  [que indica la variación del color del verde (-) al rojo (+)] en `Cara Cara`. La coloración de la pulpa mostró diferencias importantes entre las dos variedades desde estadios tempranos y durante todo el proceso de desarrollo y maduración del fruto (Figura 26). En frutos totalmente inmaduros del mes de junio (estadio 1) la pulpa de la naranja `Navel` presentó coloración verdosa, mientras que la de la naranja `Cara Cara` mostró tonalidades anaranjadas. En el mes de julio (estadio 2) las diferencias de coloración entre las pulpas de los dos genotipos fueron importantes, siendo la del mutante de color rojo intenso y la de su parental amarillo-anaranjada. Conforme el fruto se desarrolló, la intensidad del color rojo de la pulpa de `Cara Cara` disminuyó ligeramente (estadio 3), manteniéndose prácticamente invariable a lo largo de la maduración (estadios 4 a 7). Entre finales de noviembre y principios de diciembre (estadios 8 y 9) aparecieron en la pulpa del mutante reflejos anaranjados. En frutos maduros (estadio 10) la pulpa de `Cara Cara` volvió a mostrar una tonalidad roja carente de matices naranjas. La pulpa de la naranja `Navel` presentó coloración amarilla hasta principios de octubre (estadio 4) y viró a naranja en el estadio 5, correspondiente a finales del mismo mes, coincidiendo con el momento del viraje de color del flavedo. Conforme el fruto de `Navel` maduró la pulpa adquirió un tono cada vez más anaranjado, sin apreciarse en ella matices rojizos en ninguno de los estadios analizados.

El contenido de clorofilas totales del flavedo y la pulpa de las naranjas `Navel` y `Cara Cara` se determinó en frutos recolectados en los 10 estadios de maduración indicados anteriormente (Figura 27B y E). En el flavedo de frutos verdes inmaduros del mes de junio (estadio 1) el contenido de clorofilas fue elevado, presentando la variedad parental una mayor cantidad de estos pigmentos ( $197.07 \pm 5.81$  y  $153.96 \pm 1.41$   $\mu\text{g/g}$  PF, en `Navel` y `Cara Cara`, respectivamente). Durante el incremento de tamaño del fruto (estadios 1 a 4) el contenido de clorofilas aumentó en ambas variedades, y alcanzó valores máximos de  $256.79 \pm 14.99$  y  $192.22 \pm 0.79$   $\mu\text{g/g}$  PF, en `Navel` y `Cara Cara`, respectivamente. Durante octubre, coincidiendo con el inicio del cambio de color del fruto, se produjo un rápido descenso del contenido de clorofilas, que disminuyó hasta valores próximos a los 40  $\mu\text{g/g}$  PF a principios de noviembre en ambas variedades. Durante la maduración del fruto, la concentración de clorofilas se redujo hasta valores inferiores a 5  $\mu\text{g/g}$  PF en el flavedo de ambas variedades. En la pulpa de ambas variedades de naranja el contenido de clorofilas fue muy escaso, presentando su máximo en frutos de mediados de junio

(<5 µg/g PF, estadio 1). El contenido de clorofilas de la pulpa disminuyó durante el período de crecimiento del fruto, detectándose a principios de octubre (estadio 4) aproximadamente 0.75 µg/g PF. Durante la maduración del fruto y en frutos maduros, la concentración de clorofilas en la pulpa de ambas variedades fue inferior 0.50 µg/g PF.

La evolución del contenido de carotenoides totales del flavedo, determinado como equivalentes de β-caroteno, durante el desarrollo y maduración del fruto no mostró diferencias entre `Navel´ y `Cara Cara´ (Figura 27B y E). Desde junio (estadio 1) hasta que el flavedo alcanzó el punto de viraje (noviembre, estadio 6) el contenido de carotenoides totales del flavedo fue bajo y relativamente invariable (20-35 µg/g PF) en ambas variedades. A partir de este momento se inició una rápida acumulación de carotenoides que continuó durante el resto de la maduración, alcanzándose en la piel de los frutos maduros concentraciones en torno a 120 µg/g PF en `Navel´, y ligeramente superiores a 108 µg/g PF en `Cara Cara´. En la pulpa de las naranjas `Navel´ y `Cara Cara´ el contenido de carotenoides fue inferior al determinado en el flavedo en todos los estadios analizados. Además, la concentración de estos pigmentos fue mayor en la pulpa de la variedad mutante durante todo el período de desarrollo y maduración del fruto (Figura 27C y F). El patrón de acumulación de carotenoides en este tejido fue marcadamente diferente entre ambas variedades. En la pulpa de la naranja `Navel´ el contenido de carotenoides permaneció bajo e invariable hasta principios del mes de noviembre (0.90-1.15 µg/g PF). Posteriormente, la concentración de carotenoides aumentó rápidamente a  $6.50 \pm 0.14$  µg/g PF y siguió incrementándose, aunque más lentamente, hasta el mes de diciembre ( $\approx 10$  µg/g PF), disminuyendo ligeramente durante la última fase de la maduración. En el caso del mutante, la acumulación de carotenoides en la pulpa ocurrió desde las fases iniciales del desarrollo del fruto, presentando los frutos de `Cara Cara´ de mediados de julio (estadio 2) un contenido de carotenoides seis veces superior al de `Navel´ ( $2.90 \pm 0.57$  y  $0.45 \pm 0.10$  µg /g PF en `Cara Cara´ y `Navel´, respectivamente). El contenido de carotenoides aumentó durante el mes de agosto y permaneció relativamente invariable durante septiembre, produciéndose a continuación una nueva acumulación y alcanzando a mediados de noviembre (estadio 6) una concentración ligeramente superior a la máxima de `Navel´. A finales de noviembre (estadio 7) la concentración de carotenoides disminuyó ligeramente, aumentando posteriormente durante el resto del proceso de maduración. En la pulpa de frutos maduros (estadio 10) el contenido de

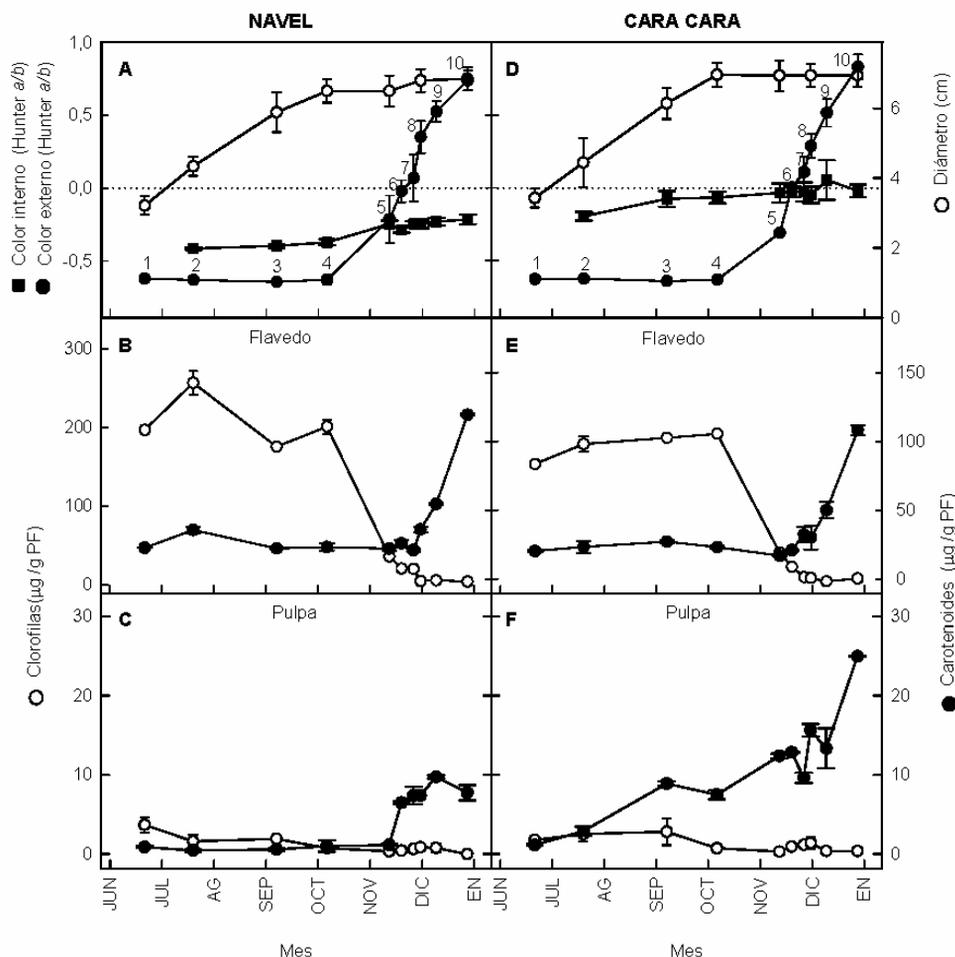


Figura 27: Evolución del diámetro del fruto (○), del color de la pulpa (■) y del flavedo (●) de frutos de la naranja `Navel` (A) y del mutante `Cara Cara` (D). Evolución del contenido de clorofilas (○) y carotenoides (●) en el flavedo y la pulpa de la naranja `Navel` (B y C, respectivamente) y del mutante `Cara Cara` (E y F, respectivamente) durante el desarrollo y la maduración de los frutos. La numeración 1-10 corresponde a los distintos estadios de desarrollo y maduración presentados en la Figura 26, correspondientes a la campaña 2003-2004.

carotenoides del mutante fue tres veces superior al del parental ( $25.00 \pm 0.10$  y  $7.75 \pm 0.95$   $\mu\text{g/g PF}$  en `Cara Cara` y `Navel`, respectivamente).

Con el fin de confirmar los resultados anteriores se recolectaron, en una segunda campaña (2004-2005), frutos de las naranjas `Navel` y `Cara Cara` en cuatro estadios fisiológicos representativos del proceso de desarrollo y maduración del fruto: fruto verde-inmaduro (VI; equivalente al estadio 2 en la curva de color de la Figura 27), fruto verde-maduro (VM; estadio 4), fruto virando (V; estadio 6) y fruto maduro totalmente coloreado (TC; estadio 10). El

índice de color del flavedo y el contenido de clorofilas y carotenoides del flavedo y la pulpa de estos frutos se resumen en la Tabla 16.

Tabla 16: Color del flavedo ( $a/b$ ) y contenido de clorofilas y de carotenoides en el flavedo y la pulpa de frutos de naranja (*C. sinensis* L. Osbeck) 'Navel' y 'Cara Cara' (CC) recolectados en la campaña 2004-2005, en cuatro estadios fisiológicos: VI, fruto verde-inmaduro; VM, fruto verde-maduro; V, fruto virando; TC, fruto totalmente coloreado. Se indica la fecha de recolección de cada uno de los lotes de frutos.

Fecha de recolección	Estado	Variedad	Flavedo			Pulpa	
			Color $a/b$	( $\mu\text{g/g PF}$ )		( $\mu\text{g/g PF}$ )	
				Clorofilas	Carotenoides	Clorofilas	Carotenoides
30-VII-04	VI	Navel	-0.82±0.03	200.10±25.42	30.82±1.15	0.50±0.20	0.50±0.14
		CC	-0.82±0.02	181.65±29.06	25.85±0.64	1.30±0.60	3.05±0.64
8-X-04	VM	Navel	-0.75±0.01	166.07±14.93	23.65±0.35	0.60±0.25	1.60±0.71
		CC	-0.76±0.01	184.95±0.21	25.55±1.63	0.73±0.30	9.40±1.56
16-XI-04	V	Navel	+0.09±0.11	13.05±0.57	23.70±0.28	0.42±0.17	4.55±0.70
		CC	+0.02±0.16	17.97±0.16	24.80±0.71	1.01±0.17	10.75±0.33
27-XII-04	TC	Navel	+0.74±0.07	4.07±3.00	117.25±0.75	0.00±0.00	5.75±0.95
		CC	+0.83±0.09	8.20±3.12	105.20±3.40	0.05±0.02	18.00±0.10

De acuerdo con los resultados anteriores (Figura 27A y D) la evolución de la coloración del flavedo no mostró diferencias entre 'Navel' y 'Cara Cara' (Tabla 16) y, ambas variedades alcanzaron un  $a/b$  próximo a 0 a mediados de noviembre y una coloración similar en frutos TC. La evolución del contenido de clorofilas y carotenoides en el flavedo y la pulpa de las naranjas 'Navel' y 'Cara Cara' en la campaña 2004-2005 (Tabla 16) fue muy similar a de la campaña anterior (Figura 27B y E). En ambas variedades, durante los estadios verdes, el contenido total en carotenoides en el flavedo fue bajo y relativamente invariable (20-30  $\mu\text{g/g PF}$ ), coincidiendo el inicio del cambio de color del flavedo con la

desaparición de las clorofilas (estadio V), y el aumento del índice  $a/b$  con la acumulación de carotenoides. El flavedo de los frutos TC de esta segunda campaña presentaron un contenido de carotenoides muy parecido al de los frutos TC de la campaña anterior, siendo la concentración de estos pigmentos ligeramente superior en la variedad parental (Figura 27 y Tabla 16). En la pulpa de ambas variedades el contenido de clorofilas fue muy bajo ( $<1.50 \mu\text{g/g PF}$ ), disminuyendo su concentración a lo largo del desarrollo y maduración del fruto, y no detectándose al final del proceso (Tabla 16). La acumulación de carotenoides en la pulpa fue, de acuerdo con resultados previos (Figura 27C y F), distinta entre `Navel´ y `Cara Cara´. La pulpa de la variedad parental presentó, durante los estadios verdes del fruto, un contenido de carotenoides bajo y relativamente constante, incrementándose a partir del estadio V y alcanzando su máximo en frutos TC (Tabla 16). En la pulpa de `Cara Cara´ la acumulación de carotenoides se produjo desde el estadio VI, presentando en los cuatro estadios analizados mayores concentraciones de carotenoides que en `Navel´ (Tabla 16).

### 1.2. Composición de carotenoides en el flavedo y la pulpa de frutos de las naranjas `Navel´ y `Cara Cara´ durante el desarrollo y maduración

La composición de carotenoides del flavedo y la pulpa de las naranjas `Navel´ y `Cara Cara´ a lo largo del desarrollo y maduración de los frutos se investigó mediante HPLC-PDA. Se seleccionaron frutos recolectados en 4 fechas de la campaña 2003-2004, que corresponden a los estadios fisiológicos: fruto verde-inmaduro (VI; correspondiente al estadio 2 en la curva de color de la Figura 27), fruto verde-maduro (VM; estadio 4), fruto virando (V; estadio 6) y fruto maduro totalmente coloreado (TC; estadio 10).

En frutos verdes, tanto VI como VM, el flavedo de `Cara Cara´ presentó un perfil de carotenoides característico de tejido cloroplástico, similar al observado en la variedad parental (Figura 28). En ambas variedades las xantofilas luteína ( $>30\%$  del total) y *trans*-violaxantina ( $>20\%$  del total) fueron los carotenoides mayoritarios y, en menor proporción, aparecieron neoxantina y  $\alpha$ - y  $\beta$ -caroteno. Sin embargo, el contenido de carotenos, tanto lineales como bicíclicos, del flavedo de `Cara Cara´ fue superior al de `Navel´. Por ejemplo, el contenido de fitoeno del mutante fue 14 y 4 veces superior al de su parental en el estadio VI y VM, respectivamente. Además, se detectó licopeno, ausente en `Navel´. Por otro lado, el contenido de xantofilas (principalmente luteína y

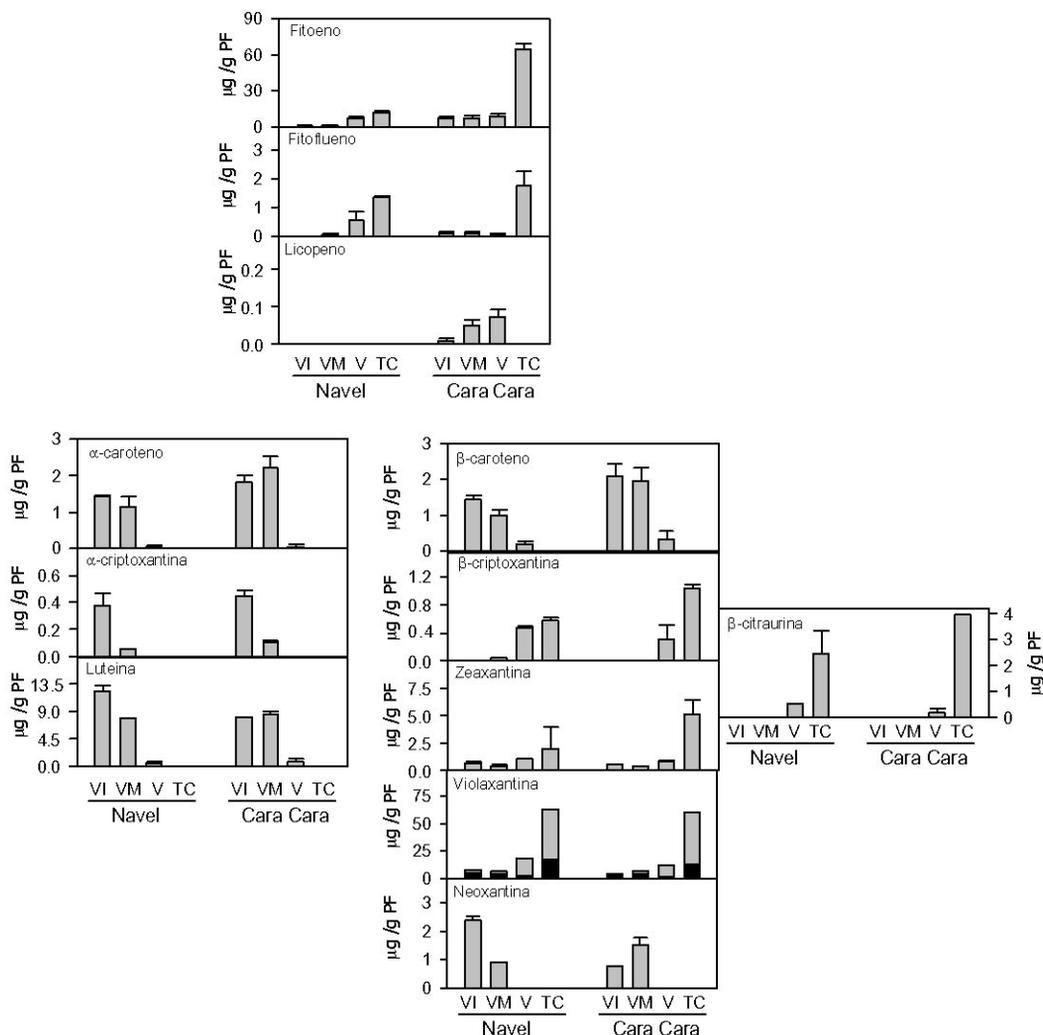


Figura 28: Composición y contenido de carotenoides del flavedo de frutos de las naranjas 'Navel' y 'Cara Cara', recolectados en la campaña 2003-2004, en cuatro estadios de maduración: VI, Verde-Inmaduro; VM, Verde-Maduro; V, Virando y TC, Totalmente Coloreado. Cuando se detectan dos isómeros del mismo carotenoide, la forma *trans* se representa en negro y la forma *cis* en gris. Los valores son la media  $\pm$  DE de al menos tres análisis independientes.

neoxantina) fue casi un 50% inferior en el flavedo de fruto verde-inmaduro (VI) del genotipo mutante. En el flavedo de frutos virando (V) de 'Navel' y 'Cara Cara' la composición cualitativa de carotenoides cambió respecto a la de los estadios anteriores (Figura 28). En ambas variedades, el contenido total de  $\beta, \epsilon$ -carotenoides disminuyó, no detectándose  $\alpha$ -criptoxantina, apareciendo  $\alpha$ -

caroteno en cantidades traza y el contenido de luteína se redujo drásticamente. El contenido de *trans*-violaxantina,  $\beta$ -caroteno y neoxantina también descendió, mientras que la concentración de otras  $\beta,\beta$ -xantofilas se incrementó respecto al estadio anterior. En ambas variedades, *cis*-violaxantina y fitoeno fueron los carotenoides mayoritarios. No obstante, algunos compuestos fueron menos abundantes en `Cara Cara´ que en `Navel´, como es el caso de la violaxantina (*cis* y *trans*, con reducciones del 36% y del 28%, respectivamente). En el flavedo del mutante se detectaron trazas de licopeno, ausentes en la variedad parental. En los frutos maduros totalmente coloreados (TC) de `Cara Cara´ el perfil de carotenoides del flavedo fue similar al del flavedo de frutos maduros TC de la variedad `Navel´ (Figura 28). En las dos variedades la violaxantina (*cis* y *trans*) y el fitoeno fueron los carotenoides más abundantes, sin embargo la concentración de este último fue 5 veces superior en `Cara Cara´ que en `Navel´.

La composición cualitativa y cuantitativa de carotenoides de la pulpa de `Cara Cara´ fue distinta a la de su parental en todos los estadios analizados (Figura 29). En los frutos VI de la variedad `Navel´ prácticamente no se detectaron carotenoides y durante la maduración se acumularon casi exclusivamente  $\beta,\beta$ -xantofilas, siendo *cis*-violaxantina el carotenoide mayoritario en todos los estadios. En la pulpa de frutos VI de `Cara Cara´ se detectaron  $11.80 \pm 1.83 \mu\text{g/g}$  PF de carotenoides, todos ellos lineales. Durante el desarrollo y la maduración del fruto de `Cara Cara´ se acumularon predominantemente carotenos lineales (más del 94% del total de carotenoides en todos los estadios analizados), siendo el fitoeno el carotenoide más abundante y alcanzando en la pulpa de frutos TC una concentración 150 veces mayor a la existente en la pulpa de frutos TC de `Navel´. Además, en la pulpa de `Cara Cara´ se detectaron fitoflueno y licopeno (hasta  $5.21 \pm 1.15$  y  $8.29 \pm 0.01 \mu\text{g/g}$  PF en pulpa TC, respectivamente) y pequeñas cantidades de  $\beta$ -caroteno ( $<0.50 \mu\text{g/g}$  PF), ausentes en la pulpa del parental. Por otro lado, la acumulación de  $\beta,\beta$ -xantofilas en pulpa de `Cara Cara´ se produjo más tardíamente que en la variedad parental, aunque la concentración de estos carotenoides fue similar en ambas variedades al final de la maduración (TC).

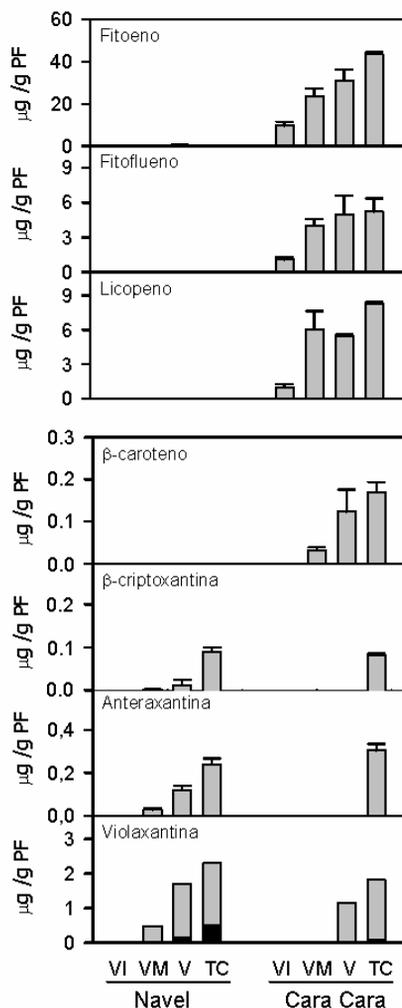


Figura 29: Composición y contenido de carotenoides en la pulpa de frutos de las naranjas 'Navel' y 'Cara Cara', recolectados en la campaña 2003-2004, en cuatro estadios de maduración: VI, Verde-Inmaduro; VM, Verde-Maduro; V, Virando y TC, Totalmente Coloreado. Cuando se detectan dos isómeros del mismo carotenoides, la forma *trans* se representa en negro y la forma *cis* en gris. Los valores son la media  $\pm$  DE de al menos tres análisis independientes.

Es interesante destacar que, la suma de las concentraciones de los carotenoides individuales presentes en la pulpa de frutos de 'Cara Cara' fue mucho mayor que el contenido de carotenoides totales determinado como equivalentes de  $\beta$ -caroteno (Figura 27). Esta diferencia cuantitativa se explica por la existencia de grandes cantidades (>80% del total, en todos los estadios) de fitoeno y fitoflueno, ya que son carotenoides cuyos espectros de absorción presentan longitudes de onda máximas a 285 y 375 nm, respectivamente, y que

por tanto, no se cuantifican al determinar el contenido de carotenoides totales como equivalentes de  $\beta$ -caroteno. Considerando las importantes cantidades de fitoeno y fitoflueno detectadas en los tejidos del mutante, el contenido total de carotenoides volvió a determinarse, en aquellas muestras analizadas por HPLC-PDA, como la suma de los carotenoides individuales. Con este criterio, el contenido total de carotenoides del flavedo de frutos coloreados de `Cara Cara´ fue de  $139.11 \pm 11.76 \mu\text{g/gPF}$ , un 70% superior al existente en los frutos de `Navel´ en el mismo estadio, y la pulpa de `Cara Cara´ presentó, dependiendo del estadio de desarrollo y maduración, un contenido que osciló entre  $11.80 \pm 1.83$  y  $59.33 \pm 0.37 \mu\text{g/g PF}$ , y que fue entre 20 y 168 veces superior al correspondiente de la naranja `Navel´.

Los resultados de la composición de carotenoides, determinada por HPLC-PDA, de los tejidos de flavedo y de pulpa de las naranjas `Navel´ y `Cara Cara´ recolectadas durante la campaña 2004-2005 (Tabla 16) fueron muy similares (datos no mostrados) a los obtenidos la campaña anterior y descritos anteriormente (Figura 28 y Figura 29).

### 1.3. Contenido de clorofilas y carotenoides en hojas de los naranjos `Navel´ y `Cara Cara´

Con objeto de determinar si la mutación de `Cara Cara´ es específica de fruto o si afecta a otros tejidos con biosíntesis activa de carotenoides, se estudió el contenido y la composición de carotenoides en hojas adultas del mutante y de su parental. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 30.

En las hojas adultas de ambas variedades el contenido total de clorofilas fue más de 3 veces superior al de carotenoides (Figura 30). El perfil de carotenoides de las hojas de `Cara Cara´ y de `Navel´ fue el característico de tejido cloroplástico, siendo los carotenoides mayoritarios luteína ( $\approx 46.02\%$ ), zeaxantina ( $\approx 13.73\%$ ) y  $\beta$ -caroteno ( $\approx 11.50\%$ ). Cuantitativamente, se detectaron ligeras diferencias entre ambas variedades, cuantificándose un mayor contenido de carotenoides en las hojas del mutante. Adicionalmente, en hojas de `Cara Cara´ se cuantificaron  $14.34 \pm 0.58 \mu\text{g/g PF}$  de fitoeno, ausente en la variedad parental.

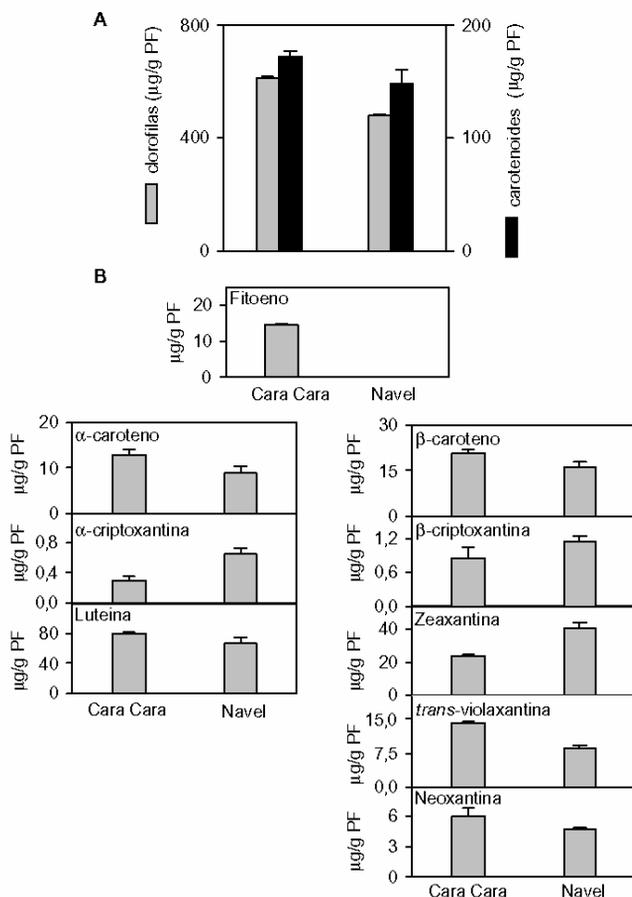


Figura 30: A, Contenido de clorofilas y carotenoides de hojas adultas de los naranjos `Navel´ y `Cara Cara´ (*C. sinensis* L. Osb.). B, Composición y contenido de carotenoides en hojas de ambas variedades. Los valores son la media  $\pm$  DE de al menos tres medidas independientes.

#### 1.4. Análisis de la expresión de los genes de la biosíntesis de carotenoides en el flavedo y la pulpa de frutos de la naranja `Navel´ y del mutante `Cara Cara´ durante el desarrollo y la maduración

Con el fin de determinar si las diferencias en el contenido y composición de carotenoides observadas entre los tejidos de las naranjas `Cara Cara´ y `Navel´ se debían a una expresión diferencial de los genes implicados en la biosíntesis de carotenoides, se realizó un análisis Northern utilizando RNA total extraído del flavedo y la pulpa de frutos de cada uno de los 10 estadios indicados en la Figura 27. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 31.

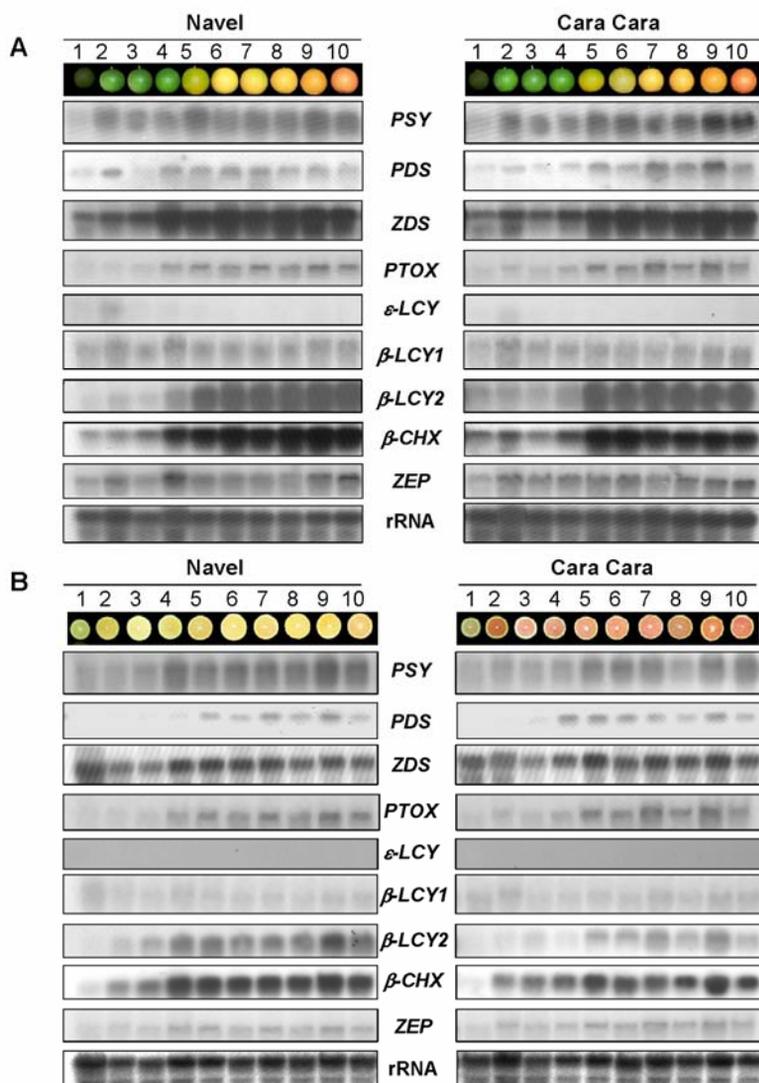


Figura 31: Evolución de los niveles de mRNAs correspondientes a genes implicados en la biosíntesis de carotenoides en el flavedo (A) y la pulpa (B) de frutos de las naranjas 'Navel' y 'Cara Cara' durante el desarrollo y maduración del fruto. Las distintas muestras analizadas corresponden a los 10 estadios fisiológicos indicados en la Figura 27. En la parte inferior se muestra la tinción con azul de metileno del RNA ribosómico. Se utilizaron para cada carrera 8  $\mu$ g de RNA total procedente de frutos recién cosechados.

En el flavedo de 'Cara Cara', al igual que en el de la naranja 'Navel', la acumulación de los transcritos de los genes estudiados durante el desarrollo y la maduración del fruto se produjo de acuerdo a tres patrones de expresión (Figura 31A). Un primer grupo de genes (*PSY*, *ZDS*, *PTOX*,  $\beta$ -*LCY2* y  $\beta$ -*CHX*) mostró un

aumento en su nivel de expresión durante el desarrollo y la maduración del fruto. La acumulación de transcritos fue baja (*PSY*, *ZDS*,  $\beta$ -*CHX*) o prácticamente indetectable (*PTOX*,  $\beta$ -*LCY2*) hasta el mes de septiembre (estadio 3). Cuando el fruto alcanzó el estadio verde-maduro (estadio 4), justo antes de que se inicie el cambio de color del flavedo, aumentó la acumulación de sus mRNAs, manteniéndose al mismo nivel (*ZDS*, *PTOX*) o aumentando durante el cambio de color (*PSY*, *ZDS*,  $\beta$ -*CHX*), alcanzando su máximo nivel de expresión a principios de Diciembre (estadio 9) y disminuyendo ligeramente su expresión cuando el fruto alcanzó la completa coloración. Los genes  $\beta$ -*LCY1* y *ZEP* también mostraron aumento de su expresión, aunque muy ligera. El gen *PDS* mostró un segundo patrón de expresión (Figura 31). El transcrito se acumuló de forma moderada en el estadio verde-inmaduro (estadio 2), y disminuyó transitoriamente durante el estadio verde-maduro (estadio 4), acumulándose de nuevo durante la maduración del fruto. El tercer patrón de expresión lo presentó  $\epsilon$ -*LCY*. Su nivel de expresión fue máximo durante los estadios verdes del flavedo y, a partir del estadio verde-maduro la señal correspondiente a sus transcritos fue prácticamente indetectable (Figura 31A).

Durante el desarrollo y maduración del fruto el nivel de expresión de todos los genes estudiados fue menor en la pulpa que en el flavedo (Figura 31B). El patrón de expresión de los genes estudiados fue muy similar en las pulpas de 'Navel' y 'Cara Cara'. Los genes *ZDS* y  $\beta$ -*LCY1* presentaron en este tejido un patrón de expresión constitutivo, mientras que el resto de genes mostraron niveles de expresión bajos (*PSY*, *ZDS*, *PTOX*,  $\beta$ -*LCY2*,  $\beta$ -*CHX* y *ZEP*) o indetectables (*PDS*) durante los estadios verde-inmaduro (estadio 1 a 3) y que aumentaron a partir del estadio verde-maduro (estadio 4). Los transcritos del gen  $\epsilon$ -*LCY* fueron indetectables en todo momento.

Basándonos en los tiempos de exposición de las membranas se puede distinguir la existencia de distintos niveles de expresión: fuerte (de 1 a 3 h de exposición), en el caso de *PSY*, *ZDS*,  $\beta$ -*LCY2* y  $\beta$ -*CHX*; media (alrededor de 1 día de exposición), correspondiente a los genes *PTOX*,  $\epsilon$ -*LCY* y  $\beta$ -*LCY1*; y baja (más de 2 días de exposición), presentada por *PDS*,  $\epsilon$ -*CHX* y *ZEP*.

### 1.5. Comparación de los niveles de expresión de genes de la biosíntesis de IPP plastídico y de carotenoides en el flavedo y la pulpa de frutos de la naranja `Navel´ y el mutante `Cara Cara´

Con el objetivo de confirmar los resultados previos (campaña 2003-2004, Figura 31) y de cuantificar las posibles diferencias en la expresión de los genes implicados en la biosíntesis de carotenoides entre el flavedo y la pulpa de `Navel´ y `Cara Cara´, se preparó una nueva membrana en la que se incluyeron muestras de flavedo y pulpa correspondientes a frutos VI, VM, V y TC de ambas variedades recolectados en la campaña 2004-2005 (Tabla 16). Estas membranas se hibridaron con las sondas disponibles correspondientes a genes de la ruta MEP (*DXS*, *HDS* y *HDR*), que participan en la biosíntesis de precursores necesarios para la síntesis de carotenoides. Las señales de hibridación fueron cuantificadas y normalizadas, asignándose, para cada una de las sondas, un valor de 100 a la señal obtenida en el flavedo TC de la variedad `Navel´. La representación gráfica de estos resultados se muestra en la Figura 32.

Los genes *DXS*, *HDS* y *HDR* mostraron un patrón de expresión muy similar en ambas variedades, pero cuantitativamente diferente (Figura 32). Los genes *DXS* y *HDR* mostraron un aumento transitorio en el nivel de expresión en el estadio VM, y un posterior descenso en frutos virando (V), manteniéndose el nivel de acumulación de los mRNAs relativamente invariable hasta el final de la maduración. La acumulación de los transcritos correspondientes a *HDS* se incrementó durante el cambio de color del flavedo, y alcanzó su máximo en el estadio TC. Es interesante destacar que al inicio de la maduración (estadios VI y VM) el nivel de expresión de los genes *DXS*, *HDS* y *HDR* fue mayor en el flavedo de la variedad mutante que en el de `Navel´, mientras que en estadios más avanzados del proceso (V y TC) no se apreciaron diferencias importantes entre las dos variedades.

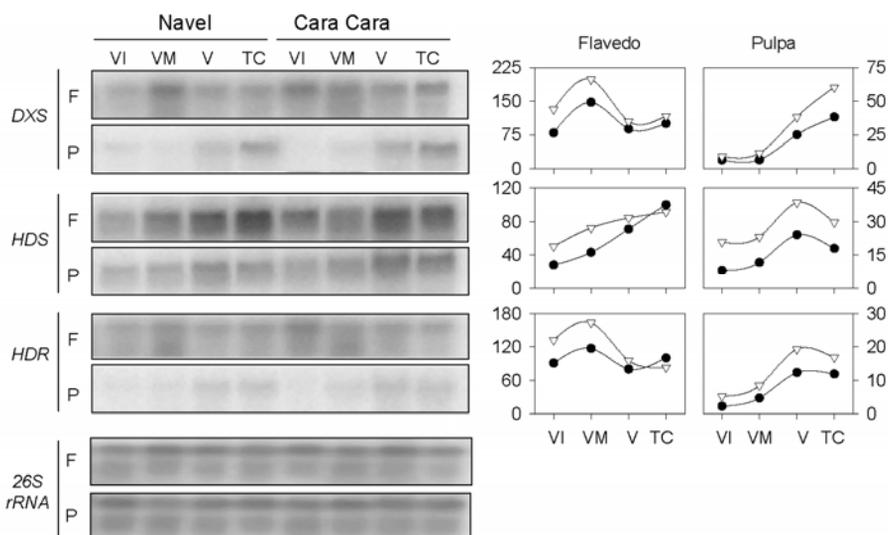


Figura 32: Evolución de los niveles de mRNAs correspondientes a genes implicados en la ruta MEP de biosíntesis de IPP plastídico en el flavedo (F) y la pulpa (P) de frutos de naranjas 'Navel' (●) y 'Cara Cara' (△) en cuatro estadios representativos del proceso de desarrollo y maduración del fruto: VI, VM, V y TC. Se utilizaron para cada carrera 12 µg de RNA total procedente de frutos recién cosechados. El valor correspondiente a la intensidad de la señal de hibridación para cada uno de los genes analizados fue cuantificado y normalizado respecto al de la sonda 26S rRNA de *Citrus sinensis*. En el eje de ordenadas se indican los valores de intensidad relativa.

La acumulación de transcritos correspondientes a estos genes en la pulpa fue distinta a la del flavedo (Figura 29). En la pulpa, el nivel de expresión de *DXS*, *HDS* y *HDR* fue bajo y relativamente invariable durante los estadios verdes (VI y VM), incrementándose la acumulación de los transcritos a partir del estadio VM y alcanzando sus máximos niveles de expresión en fruto V (*HDS* y *HDR*) o TC (*DXS*). El nivel de expresión de *DXS* fue el mismo en ambas variedades durante los estadios verdes del fruto y, superior en la variedad 'Cara Cara' en frutos V y TC. Los transcritos de *HDS* y *HDR* fueron más abundantes en la pulpa de la variedad mutante en los cuatro estadios analizados y es interesante destacar que en la pulpa VI de 'Cara Cara', en la que ya se detecta licopeno (Figura 29), la expresión de *HDS* fue 2.6 veces superior a la de 'Navel' (Figura 32). En resumen, durante toda la maduración del fruto la acumulación de los transcritos correspondientes a los tres genes de la ruta MEP fue significativamente más alta en la pulpa de los frutos de 'Cara Cara' que en la de 'Navel' (Figura 32).

Utilizando las mismas membranas se estudió también la expresión de los genes de la biosíntesis de carotenoides (Figura 33). De acuerdo con resultados

anteriores (apartado 1.4), los genes de la biosíntesis de carotenoides analizados mostraron un patrón de expresión similar en el flavedo de ambas variedades. En el flavedo de `Cara Cara` se detectaron, en los cuatro estadios analizados, niveles de expresión de *ZDS* y  *$\beta$ -LCY1* ligeramente superiores a los de `Navel`, mientras que en el flavedo de frutos TC el nivel de expresión de *PSY* y *PDS* fue mayor en la variedad `Navel` que en el mutante.

En las dos variedades de naranja la acumulación de transcritos de todos los genes estudiados fue mayor en el flavedo que en la pulpa (Figura 33). En general, la acumulación de transcritos de todos los genes analizados fue superior en la pulpa de `Cara Cara` que en la de `Navel`. En los frutos TC se detectaron, para casi todos los genes analizados, las mayores diferencias en el nivel de expresión entre las dos variedades. La acumulación de mRNAs correspondientes a *PSY* y *ZEP* fue alrededor del 67% superior en el mutante y un 40% y 80% superior en el caso de *PDS* y *PTOX*, respectivamente. El nivel de expresión de *ZDS*,  *$\epsilon$ -LCY*,  *$\beta$ -CHX* y  *$\epsilon$ -CHX* fue, en el estadio TC, alrededor del 50% mayor en el mutante que en `Navel`. En la pulpa de naranja `Navel`,  *$\beta$ -LCY1* presentó una expresión baja y constitutiva, mientras que en la pulpa de `Cara Cara` la expresión de  *$\beta$ -LCY1* aumentó durante la maduración, alcanzando su máximo en frutos TC, siendo el nivel de este transcrito, en este estadio, tres veces más abundantes en `Cara Cara` que en `Navel`.

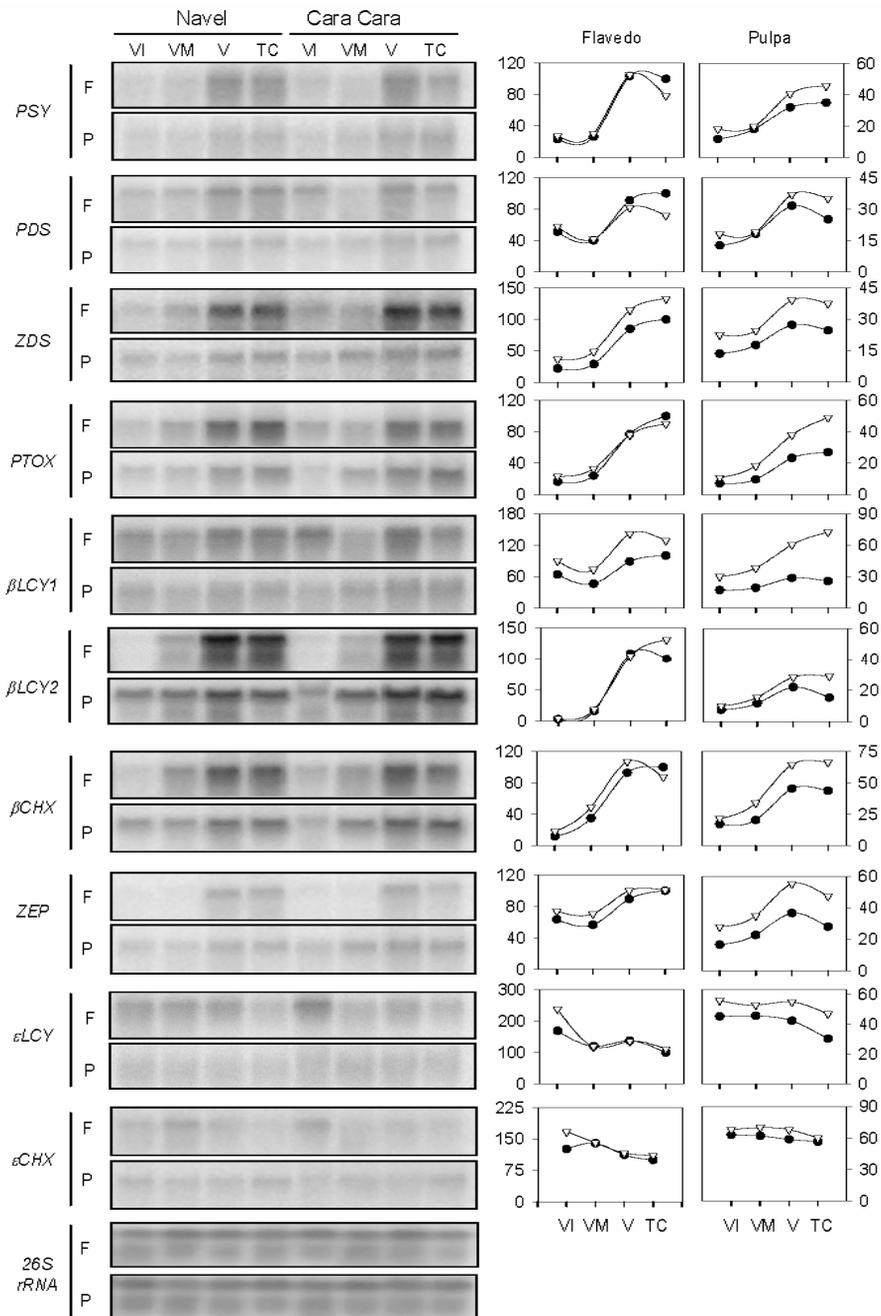


Figura 33: Evolución de los niveles de mRNAs correspondientes a los genes implicados en la biosíntesis de carotenoides en el flavedo (F) y la pulpa (P) de frutos de naranjas 'Navel' (●) y 'Cara Cara' (△) en cuatro estadios representativos del proceso de desarrollo y maduración del fruto: VI, VM, V y TC. Se utilizaron para cada carrera 12 µg de RNA total procedente de frutos recién cosechados. El valor correspondiente a la intensidad de la señal de hibridación para cada uno de los genes analizados fue cuantificado y normalizado respecto al de la sonda 26S rRNA de *Citrus sinensis*. En el eje de ordenadas se indican los valores de intensidad relativa.

## 2. Estudio comparativo de la acumulación de carotenoides y de la expresión de genes de su biosíntesis durante el desarrollo y la maduración de frutos de pomelo (*Citrus paradisi* Macf.) blanco `Marsh´ y el mutante pigmentado `Star Ruby´

La mayor parte de los trabajos de investigación realizados sobre carotenoides en pomelo se refieren a frutos maduros (Khan y Mackinney 1953; Gross 1987; Rouseff *et al.* 1992; Lee 2000; Xu *et al.* 2006). Únicamente existe un trabajo en el que se estudia la evolución del contenido y composición de carotenoides a lo largo del proceso de desarrollo y maduración del fruto de pomelo `Marsh´ y se refiere a la pulpa (Banet *et al.* 1981), mientras que la composición de carotenoides del flavedo de frutos inmaduros solo ha sido estudiada por Yokohama y White (1967). Los trabajos referentes a la evolución de la coloración y de la composición de carotenoides de diversas variedades de pomelos rosas y rojos son más abundantes, pero se limitan a la pulpa, y o bien se refieren al contenido en licopeno y/o  $\beta$ -caroteno, o dan escalas visuales comparativas de color (Lime *et al.* 1954; Ting y Deszyck 1958; Stein *et al.* 1986). Un estudio detallado de la evolución del color y del contenido y composición de carotenoides en variedades de pomelo de distinta pigmentación aún no se ha realizado. Para llevar a cabo este estudio se seleccionaron dos cultivares de pomelo con distinto grado de pigmentación: el pomelo blanco `Marsh´ y el pomelo rojo `Star Ruby´, que destaca como uno de los cultivares con mayor coloración (Rouseff *et al.* 1992). Adicionalmente, considerando que la evolución del perfil de carotenoides durante el desarrollo y la maduración de los frutos cítricos parece estar determinada fundamentalmente por la regulación, a nivel transcripcional, de la expresión de los genes de biosíntesis (Kato *et al.* 2004; Rodrigo *et al.* 2004), se planteó como objetivo intentar correlacionar los cambios en la expresión de los genes de biosíntesis de carotenoides con la evolución del contenido y composición de carotenoides en las dos variedades de pomelo, con el fin de establecer las posibles bases moleculares que determinan las diferentes coloraciones de los frutos de pomelo.

## 2.1. Evolución del tamaño, del color y del contenido de clorofilas y carotenoides del flavedo y la pulpa de frutos de los pomelos `Marsh´ y `Star Ruby´ durante el desarrollo y la maduración

Con el fin de caracterizar los parámetros relacionados con la coloración del fruto se recolectaron frutos en 8 estadios de desarrollo y maduración diferentes, desde junio hasta diciembre (2003), comprendiendo frutos inmaduros y todo el proceso de coloración de los frutos (Figura 34).

Las curvas de crecimiento de los frutos, determinadas como la evolución del diámetro del fruto, de los pomelos `Marsh´ y `Star Ruby´ fueron prácticamente idénticas (Figura 35A y D). A finales del mes de junio los frutos de ambas variedades presentaron un diámetro medio ligeramente inferior a 4 cm, y experimentaron un crecimiento continuo hasta el mes de octubre, momento en el que alcanzaron su tamaño final, en torno a los 8 cm de diámetro.



Figura 34: Aspecto interno y externo de frutos de los pomelos `Star Ruby´ (SR) y `Marsh´ (M) en los 8 estadios del desarrollo y la maduración del fruto recolectados en este estudio. Los frutos corresponden a la campaña 2003-2004.

La evolución del color del flavedo durante el desarrollo y maduración del fruto fue muy similar en el pomelo blanco y el pomelo rojo. Desde junio hasta el mes de octubre (estadios 1 a 4) el flavedo de ambas variedades presentó coloración verde (Figura 34), con un  $a/b$  inferior a  $-0.50$  (Figura 35A y D). A partir de este momento se inició, en ambas variedades, el viraje de color del flavedo, alcanzándose los valores máximos de  $a/b$  al final del mes de diciembre.

La coloración del flavedo de `Marsh` alcanzó un  $a/b$  máximo próximo a cero (Figura 35A), correspondiente a una tonalidad amarilla (Figura 34). El flavedo de `Star Ruby` presentó tonalidades amarillas con sombras rosadas en los frutos coloreados (Figura 34) y en consecuencia, un  $a/b$  ligeramente superior al de su parental, con un valor máximo de  $+0.14 \pm 0.02$  (Figura 35B). La evolución del color de la pulpa durante el desarrollo y la maduración de los frutos de los pomelos `Marsh` y `Star Ruby` se ha representado en la Figura 35A y D. El índice  $a/b$  correspondiente a la pulpa del pomelo `Marsh` no presentó variaciones importantes, con valores en torno a  $-0.30$  durante todo el período de tiempo estudiado (Figura 35D). La pulpa del pomelo `Star Ruby` presentó hasta el mes de julio la misma coloración que la variedad de pulpa blanca. En los frutos recolectados en septiembre el índice  $a/b$  de la pulpa fue cercano a cero, disminuyó en los frutos recolectados en el mes de octubre y aumentó de nuevo en noviembre, alcanzando un valor de  $+0.01 \pm 0.09$ , que se mantuvo prácticamente constante durante el resto de la maduración (Figura 35A). Visualmente, las diferencias de coloración entre la pulpa de ambas variedades fueron mayores de lo que refleja el índice  $a/b$  (Figura 34). Mientras que la pulpa del pomelo `Marsh` presentó coloración amarillenta desde septiembre hasta diciembre, la pulpa del pomelo `Star Ruby` lució un tono rojo intenso, con matices anaranjados a principios de octubre (estadio 4) y al final de la maduración (estadios 7 y 8).

La evolución del contenido de clorofilas y carotenoides durante el desarrollo y la maduración de los frutos de los pomelos `Marsh` y `Star Ruby` se muestra en la Figura 35(B-F). En el flavedo de los frutos verde-inmaduro del mes de junio de ambas variedades el contenido de clorofilas fue elevado, siendo el contenido del flavedo de `Marsh` un 80% mayor que el de `Star Ruby` (Figura 35B y E). En las dos variedades la concentración de clorofilas del flavedo disminuyó durante el desarrollo y la maduración del fruto. En la piel del pomelo blanco el contenido de clorofilas disminuyó de forma continua desde junio ( $306.97 \pm 1.85 \mu\text{g/g PF}$ ) hasta noviembre (estadio 5,  $13.92 \pm 3.22 \mu\text{g/g PF}$ ) y siguió disminuyendo, aunque a menor velocidad, durante el resto de la maduración, alcanzándose en el último estadio recolectado (estadio 8) una concentración de  $7.19 \pm 0.05 \mu\text{g/g PF}$  (Figura 35E). En el flavedo de `Star Ruby` la degradación de clorofilas no comenzó hasta el mes de julio, manteniéndose hasta ese momento la concentración de estos pigmentos prácticamente constante ( $172.84 \pm 5.12$  y  $181.37 \pm 21.74 \mu\text{g/g PF}$  en los estadios 1 y 2,

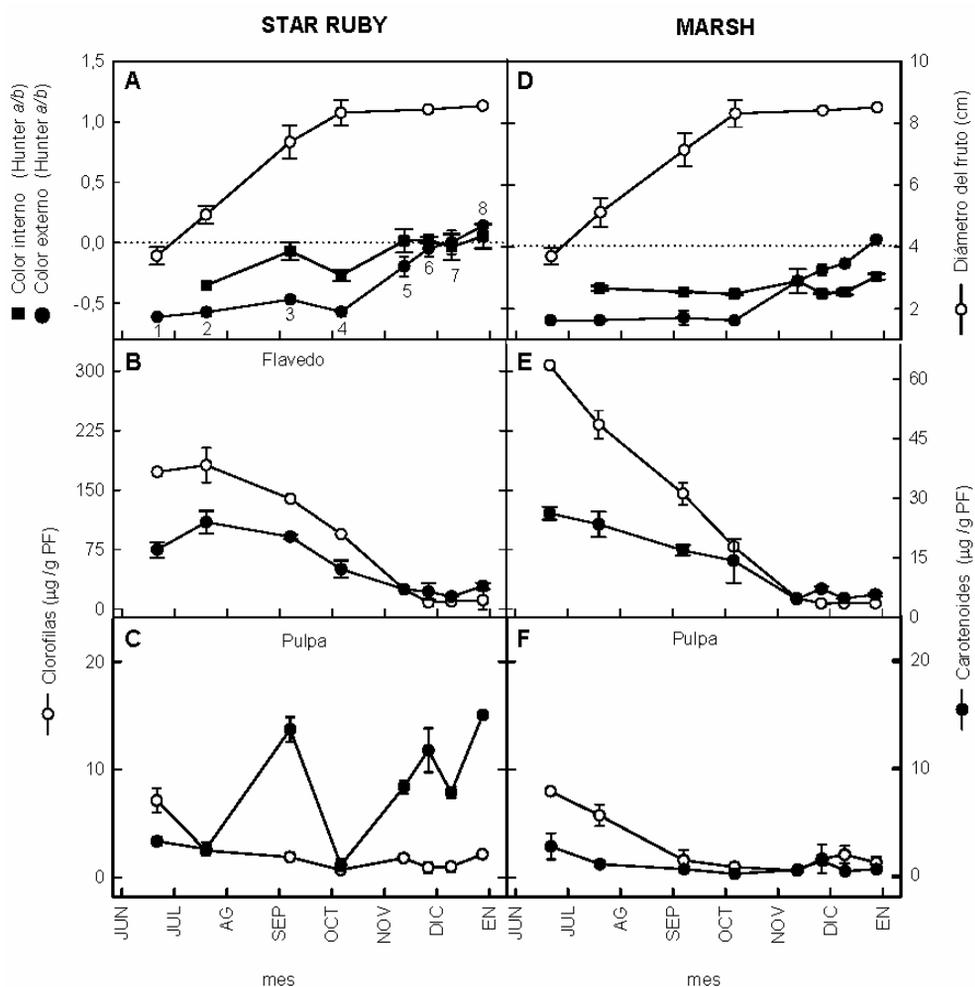


Figura 35: Evolución del diámetro del fruto (○), del color de la pulpa (■) y del flavado (●) de frutos del pomelo `Star Ruby` (A) y del pomelo `Marsh` (D). Evolución del contenido de clorofilas (○) y carotenoides (●) en el flavado y la pulpa del pomelo `Star Ruby` (B y C, respectivamente) y del pomelo `Marsh` (E y F, respectivamente) durante el desarrollo y la maduración de frutos. La numeración 1-8 corresponde a los distintos estadios de desarrollo y maduración presentados en la Figura 34, correspondientes a la campaña 2003-2004.

respectivamente). La disminución del contenido de clorofilas se produjo más lentamente que en el pomelo blanco, presentando el flavado de `Star Ruby` de frutos de principios de noviembre (estadio 5) una concentración de  $24.78 \pm 1.76$  µg/g PF. Posteriormente, siguió disminuyendo hasta alcanzar en el último estadio recolectado (estadio 8) una concentración de clorofilas próxima a cero (Figura 35B). En la pulpa de ambas variedades el contenido de clorofilas fue muy inferior al del flavado, presentando sus valores máximos en frutos inmaduros del mes de junio ( $7.13 \pm 1.11$  y  $7.99 \pm 0.01$  µg/g PF en `Star Ruby` y `Marsh`,

respectivamente) (Figura 35C y F). Durante el periodo de crecimiento del fruto (estadios 1 a 4) la concentración de clorofilas disminuyó en la pulpa de ambas variedades, detectándose a principios de octubre (estadio 4) alrededor de 0.80  $\mu\text{g/g}$  PF. Esta concentración se mantuvo baja ( $<2$   $\mu\text{g/g}$  PF) y relativamente invariable durante el resto de la maduración.

La concentración de carotenoides totales del flavedo de ambas variedades, determinada como equivalentes de  $\beta$ -caroteno, disminuyó durante el desarrollo y la maduración del fruto (Figura 35B y E). En el flavedo del pomelo blanco esta disminución fue continuada desde junio (estadio 1) hasta principios de noviembre (estadio 5), pasando de  $26.15 \pm 1.62$  a  $4.50 \pm 0.01$   $\mu\text{g/g}$  PF en este periodo de tiempo (Figura 35E). Durante el mes de noviembre la concentración de carotenoides de este tejido se incrementó a  $7.10 \pm 0.70$   $\mu\text{g/g}$  PF (estadio 6) disminuyendo nuevamente a principios de diciembre (estadio 7,  $4.75 \pm 0.07$   $\mu\text{g/g}$  PF) y manteniéndose constante durante el resto de la maduración (estadio 8,  $5.65 \pm 0.35$   $\mu\text{g/g}$  PF). El flavedo del pomelo 'Star Ruby' experimentó, durante el primer mes, un ligero aumento de la concentración de carotenoides ( $16.95 \pm 1.90$  y  $23.89 \pm 2.86$   $\mu\text{g/g}$  PF en los estadios 1 y 2, respectivamente), que se redujo de forma continuada a partir de este momento presentando, a principios de diciembre (estadio 7), una concentración de carotenoides de aproximadamente 5  $\mu\text{g/g}$  PF, que se mantuvo relativamente constante hasta el final de la maduración (Figura 35B). La evolución del contenido de carotenoides fue muy distinta entre las pulpas de ambas variedades (Figura 35C y F). La pulpa de 'Marsh' presentó una concentración de carotenoides baja y prácticamente constante (entre 0.55 y 1.50  $\mu\text{g/g}$  PF) durante el desarrollo y la maduración del fruto (Figura 35F). Durante los meses de junio y julio la pulpa del pomelo rojo presentó un contenido de carotenoides constante, alrededor de dos veces superior al existente en la pulpa de pomelos 'Marsh' del mismo estadio de desarrollo (Figura 35C y F). En el mes de septiembre, el contenido de carotenoides de la pulpa de 'Star Ruby' se incrementó, alcanzándose una concentración de carotenoides de  $13.60 \pm 1.13$   $\mu\text{g/g}$  PF, 22 veces superior a la existente en la pulpa de pomelos 'Marsh' del mismo estadio de desarrollo (Figura 35C y F). A continuación, el contenido de carotenoides disminuyó bruscamente a  $1.00 \pm 0.56$   $\mu\text{g/g}$  PF (estadio 4) y nuevamente aumentó progresivamente durante el mes siguiente (estadios 5 y 6), alcanzándose a finales de noviembre una concentración próxima a los 10  $\mu\text{g/g}$  PF, dos veces superior a la existente en el flavedo de esta variedad. Tras una ligera disminución transitoria del contenido de

carotenoides en el estadio 7, en la última fecha de recolección el contenido de carotenoides de la pulpa del pomelo rojo (estadio 8,  $14.90 \pm 0.01 \mu\text{g/g PF}$ ) fue casi 2 veces superior a la existente en el flavedo de los mismos frutos y, casi 25 veces superior que la existente en la pulpa de frutos del pomelo 'Marsh' del mismo estadio de maduración.

Con el objetivo de confirmar los resultados anteriores se recolectaron, durante una segunda campaña (2004-2005) frutos de los pomelos 'Marsh' y 'Star Ruby' en 4 estadios fenológicos representativos del proceso de desarrollo y maduración de los frutos: VI, verde-inmaduro; VM, verde-maduro; V, virando y TC, totalmente coloreado, equivalentes a los estadios 2, 4, 5 y 8 de la Figura 35. Al igual que en la campaña 2003-2004 (Figura 35), el flavedo de los frutos recolectados durante esta campaña (2004-2005) presentó coloración verde hasta octubre ( $a/b < 0.5$ ), el viraje del color se produjo a mediados de noviembre y, a finales de diciembre la coloración del flavedo del pomelo 'Star Ruby' fue superior a la del pomelo 'Marsh' (Tabla 17).

Al igual que en la campaña anterior (Figura 35) en el flavedo de ambas variedades de pomelo se produjo, durante el desarrollo y la maduración del fruto, una disminución del contenido de clorofilas y de carotenoides (Tabla 17). En la pulpa de los pomelos 'Marsh' y 'Star Ruby' la concentración de clorofilas fue baja ( $< 5 \mu\text{g/g PF}$ ) y se redujo paulatinamente durante el desarrollo y la maduración de los frutos, alcanzando en el estadio TC valores próximos a 0 (Tabla 17). El contenido de carotenoides de la pulpa del pomelo blanco fue inferior a  $1 \mu\text{g/g PF}$  en los estadios VI, VM y V, incrementándose ligeramente en el estadio TC (Tabla 17). La pulpa del pomelo 'Star Ruby' presentó, en los cuatro estadios analizados, una mayor concentración de carotenoides que la del pomelo 'Marsh' (Tabla 17). El contenido de carotenoides de la pulpa del pomelo rojo experimentó un descenso transitorio en el estadio VM y un incremento durante el resto del proceso de maduración del fruto, alcanzándose en el estadio TC una concentración de carotenoides más de 2.5 veces superior a la del flavedo (Tabla 17).

Tabla 17: Color del flavedo (*a/b*) y contenido de clorofilas y de carotenoides en el flavedo y la pulpa de frutos de pomelo (*C. paradisi* Mac.) `Marsh` y `Star Ruby` (SR) recolectados en la campaña 2004-2005 en cuatro estadios fisiológicos: VI, fruto verde-inmaduro; VM, fruto verde-maduro; V, fruto virando; TC, fruto totalmente coloreado.

Fecha de recolección	Estado	Variedad	Flavedo			Pulpa	
			Color <i>a/b</i>	( $\mu\text{g/g}$ PF)		( $\mu\text{g/g}$ PF)	
				Clorofilas	Carotenoides	Clorofilas	Carotenoides
30-VII-04	VI	Marsh	-0.78±0.03	179.23±12.83	17.85±2.19	4.39±0.73	0.88±0.07
		SR	-0.51±0.10	165.00±19.14	20.35±0.21	1.87±0.22	3.75±0.07
8-X-04	VM	Marsh	-0.66±0.15	95.69±6.00	15.15±1.06	1.01±0.35	0.20±0.01
		SR	-0.31±0.19	105.45±1.34	19.05±0.64	0.82±0.13	2.03±0.85
16-XI-04	V	Marsh	-0.09±0.05	5.69±0.59	5.95±0.64	0.40±0.01	0.70±0.28
		SR	+0.12±0.07	8.69±2.41	10.10±0.14	0.80±0.20	6.25±1.91
27-XII-04	TC	Marsh	+0.06±0.15	5.21±0.03	4.23±0.82	0.36±0.11	3.60±0.14
		SR	+0.20±0.08	6.99±4.30	6.12±0.22	0.22±0.21	16.25±1.12

## 2.2. Composición de carotenoides en el flavedo y la pulpa de frutos de los pomelos `Marsh` y `Star Ruby` durante el desarrollo y la maduración

La composición de carotenoides, del flavedo y la pulpa, de los pomelos `Marsh` y `Star Ruby` a lo largo del desarrollo y maduración de los frutos se investigó mediante HPLC-PDA. Para ello se utilizaron los frutos recolectados en los cuatro estadios de maduración descritos en el apartado anterior (VI, VM, V y TC) que corresponden a los estadios 2, 4, 5 y 8, respectivamente, de la curva de color de la Figura 35.

En el flavedo verde de ambas variedades de pomelo predominaron los carotenoides característicos de tejido cloroplástico ( $\alpha$ - y  $\beta$ -caroteno, luteína, neoxantina y *trans*-violaxantina), que constituyeron alrededor del 80% y del 60%

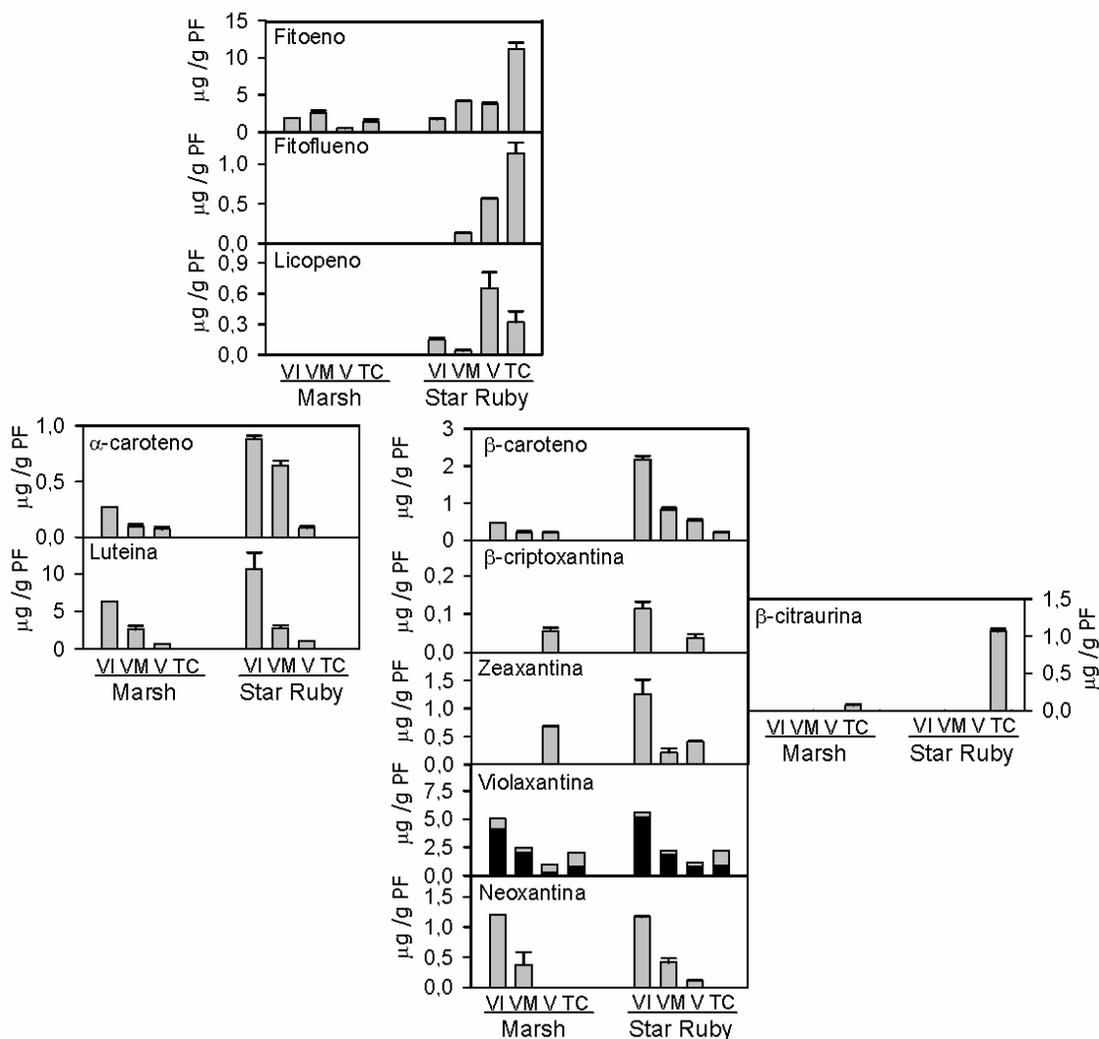


Figura 36: Composición y contenido de carotenoides en el flavedo de frutos de los pomelos ‘Marsh’ y ‘Star Ruby’, recolectados en la campaña 2003-2004, en cuatro estadios de maduración: VI, Verde-Inmaduro; VM, Verde-Maduro; V, Virando y TC, Totalmente Coloreado. Cuando se detectan dos isómeros del mismo carotenoide, la forma *trans* se representa en negro y la forma *cis* en gris. Los valores son la media ± DE de al menos tres medidas independientes.

del total de carotenoides en los estadios VI y VM, respectivamente, siendo la luteína el más abundante (Figura 36). Durante estos estadios se acumularon también carotenos lineales, llegando a suponer el  $31.60 \pm 7.59\%$  y el  $40.41 \pm 3.27\%$  de los carotenoides totales del flavedo VM de ‘Marsh’ y ‘Star Ruby’, respectivamente. Durante el cambio de color del flavedo de ‘Marsh’ la concentración de todos los carotenoides disminuyó, detectándose en el flavedo

de frutos TC únicamente violaxantina ( $\approx 60\%$  del total), fitoeno ( $\approx 40\%$  del total) y pequeñas cantidades ( $<1 \mu\text{g/g PF}$ ) de  $\beta$ -citaurina (Figura 36). Durante la maduración del pomelo 'Star Ruby' la concentración de carotenoides característicos de tejido cloroplástico disminuyó, incrementándose simultáneamente la concentración de los carotenos lineales (fitoeno, fitoflueno y licopeno), que llegaron a constituir el  $83.78 \pm 0.15\%$  del total de carotenoides en frutos TC (Figura 36). En el estadio TC los carotenoides más abundantes del flavedo de 'Star Ruby' fueron fitoeno ( $\approx 75\%$  del total) y violaxantina ( $\approx 14\%$  del total).

En la pulpa, la evolución del perfil de carotenoides fue muy distinta entre ambas variedades de pomelo (Figura 37). En la pulpa del pomelo blanco la concentración de carotenoides se redujo casi un 85% durante la maduración, siendo en todo momento inferior a  $1 \mu\text{g/g PF}$ . En la pulpa de frutos TC de pomelo blanco el fitoeno y la 9-*cis*-violaxantina fueron los carotenoides más abundantes, constituyendo alrededor del 73% y 27% del total de carotenoides, respectivamente (Figura 37). Durante el desarrollo y la maduración de los frutos de 'Star Ruby' el contenido de carotenoides de la pulpa se incrementó, acumulándose casi exclusivamente carotenos (Figura 37). En 'Star Ruby' el fitoeno fue de los carotenoides más abundantes (25%-55% del total), llegando a alcanzar concentraciones alrededor de los  $3.50 \mu\text{g/g PF}$  en el estadio TC. Entre los carotenos coloreados destaca el licopeno, cuyo contenido aumentó casi 70 veces durante el desarrollo y la maduración del fruto, detectándose en frutos TC alrededor de  $6 \mu\text{g/g PF}$  de este pigmento. Excepto en el estadio VI, el licopeno fue el carotenoide más abundante, contribuyendo al contenido total de carotenoides entre en 42% y un 53% (Figura 37).

Es interesante destacar que tanto en el flavedo como en la pulpa se detectaron diferencias en el perfil de carotenos lineales entre ambas variedades de pomelo. En todos los estadios analizados en 'Star Ruby' se detectaron fitoeno, fitoflueno y licopeno, mientras que en la variedad de pulpa blanca únicamente se detectó el primero (Figura 36 y Figura 37).

A fin de confirmar los resultados anteriores, la evolución del perfil de carotenoides de los pomelos 'Marsh' y 'Star Ruby' se analizó en frutos recolectados durante una segunda campaña (2004-2005). La concentración y composición de carotenoides en el flavedo y la pulpa de los frutos en los estadios detallados en la Tabla 17 fueron muy similares a los presentados en la Figura 36 y la Figura 37.

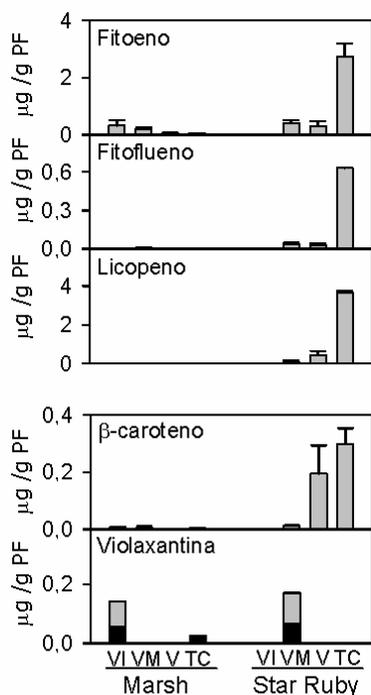


Figura 37: Composición y contenido de carotenoides en la pulpa de frutos de los pomelos 'Marsh' y 'Star Ruby', recolectados en la campaña 2003-2004, en cuatro estadios de maduración: VI, Verde-Inmaduro; VM, Verde-maduro; V, Virando; TC, Totalmente Coloreado. Cuando se detectan dos isómeros del mismo carotenoide, la forma *trans* se representa en negro y la forma *cis* en gris. Los valores son la media  $\pm$  DE de al menos tres medidas independientes.

### 2.3. Contenido de clorofilas y carotenoides en hojas de los pomelos 'Marsh' y 'Star Ruby'

Con objeto de determinar si las diferencias en el perfil de carotenoides entre ambas variedades de pomelo son exclusivas de los frutos o, si por el contrario, se extienden a otros tejidos con biosíntesis activa de carotenoides, se investigó el perfil de carotenoides de hojas adultas de los pomelos 'Marsh' y 'Star Ruby' (Figura 38).

El contenido de clorofilas y carotenoides totales de las hojas del pomelo 'Marsh' fue sensiblemente más bajo que el de 'Star Ruby' (Figura 38A). En las hojas de ambas variedades de pomelo se acumularon fundamentalmente luteína y zeaxantina, que conjuntamente constituyeron, aproximadamente, el 77% de los carotenoides totales de este tejido (Figura 38B). Además, se detectaron otros carotenoides característicos de tejido cloroplástico, como  $\alpha$ - y  $\beta$ -caroteno. El

único caroteno lineal que se detectó en las hojas de ambas variedades fue el fitoeno. El contenido total de xantofilas de las hojas de los pomelos `Marsh` y `Star Ruby` fue muy similar ( $\approx 80 \mu\text{g/g}$  PF). Sin embargo, en las hojas del pomelo Star Ruby no se detectaron  $\beta$ -criptoxantina, *trans*-violaxantina ni neoxantina, que si se detectaron en las hojas del pomelo `Marsh` (Figura 38).

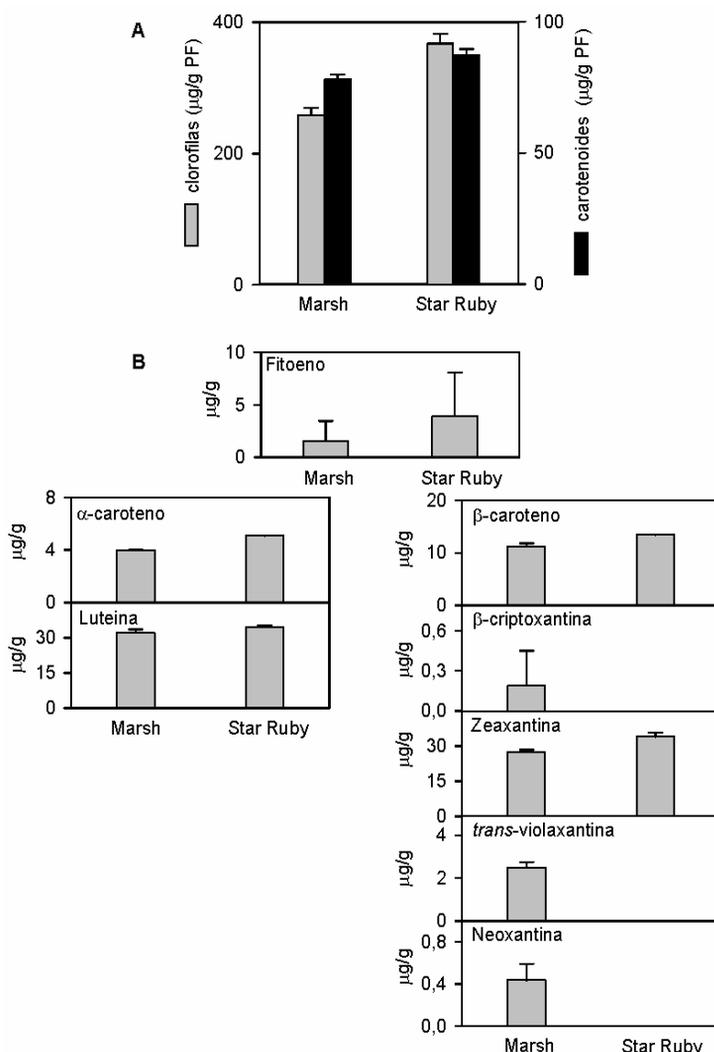


Figura 38: A, Contenido de clorofilas y carotenoides de hojas adultas de los pomelos `Marsh` y `Star Ruby` (*C. paradisi* Mac.). B, Composición y contenido de carotenoides en hojas de ambas variedades. Los valores son la media  $\pm$  DE de al menos tres medidas independientes.

#### 2.4. Análisis de la expresión de genes de la biosíntesis de carotenoides en el flavedo y la pulpa de frutos de los pomelos `Marsh´ y `Star Ruby´ durante el desarrollo y la maduración

Con el fin de determinar si las diferencias en el contenido y composición de carotenoides observadas entre los tejidos de los pomelos `Marsh´ y `Star Ruby´ pueden estar relacionadas con una expresión diferencial de los genes implicados en la biosíntesis de carotenoides, se realizó un análisis Northern utilizando RNA total extraído de flavedo y pulpa de cada uno de los cuatro estadios indicados en la Tabla 17. Además, se incluyeron en la misma membrana, muestras de flavedo y pulpa de frutos VI, VM, V y TC de naranja `Navel´ (Tabla 16), a fin de contrastar los niveles de expresión génica entre estas especies de cítricos. Las señales de hibridación fueron cuantificadas y normalizadas, asignándoseles, para cada una de las sondas, un valor de 100 a la señal obtenida en el flavedo TC de naranja `Navel´. Los resultados de las distintas hibridaciones y sus correspondientes cuantificaciones se muestran en la Figura 39 y la Figura 40.

El patrón de expresión de tres genes de la ruta MEP, *DXS*, *HDS* y *HDR*, implicados en la biosíntesis de IPP plástidico, se estudió en el flavedo y la pulpa de frutos de los pomelos `Marsh´ y `Star Ruby´ a lo largo del desarrollo y la maduración de los frutos (Figura 39). En el flavedo de los pomelos `Marsh´ y `Star Ruby´ el gen *DXS* mostró el mismo patrón de expresión previamente descrito para el flavedo de naranja `Navel´ (Figura 32), pero los niveles de expresión durante los estadios verdes del fruto (VI y VM) fueron hasta 2.42 veces superiores a los de la naranja (Figura 39). Tanto en el flavedo de `Marsh´ como en el de `Star Ruby´, la acumulación de transcritos de *HDS* aumentó durante los estadios verdes del fruto, alcanzando su máximo en el flavedo de frutos VM, y manteniéndose relativamente invariable hasta el final del proceso de maduración, en contraste con lo que ocurre en el flavedo de `Navel´, donde la expresión de *HDS* aumentó de forma continua (Figura 39). En el flavedo de `Star Ruby´ el gen *HDR* mostró el mismo patrón de expresión previamente descrito en el flavedo de la naranja `Navel´ (Figura 32), presentando su máximo nivel de expresión en frutos VM. Sin embargo, en el flavedo del pomelo `Marsh´ la acumulación de transcritos correspondientes a este gen se redujo de forma continuada durante el desarrollo y la maduración del fruto (Figura 39).

En la pulpa de los pomelos `Marsh´ y `Star Ruby´ la acumulación de los transcritos correspondientes a *DXS*, *HDS* y *HDR* fue muy inferior a la detectada en

el flavedo (Figura 39). En ambas variedades de pomelo, los tres genes MEP estudiados presentaron una expresión baja y constitutiva durante los estadios verdes del fruto, aumentando su expresión a partir del estadio VM y alcanzando, en general, los niveles máximos de expresión en la pulpa de frutos V. El nivel de expresión de *DXS*, *HDS* y *HDR* fue, en los 4 estadios analizados, muy similar en la pulpa de ambas variedades de pomelo. Es interesante destacar que, durante los estadios coloreados del fruto (V y TC), el nivel de expresión de *DXS* en la pulpa de las dos variedades de pomelo fue claramente inferior al detectado en la pulpa de la naranja `Navel´.

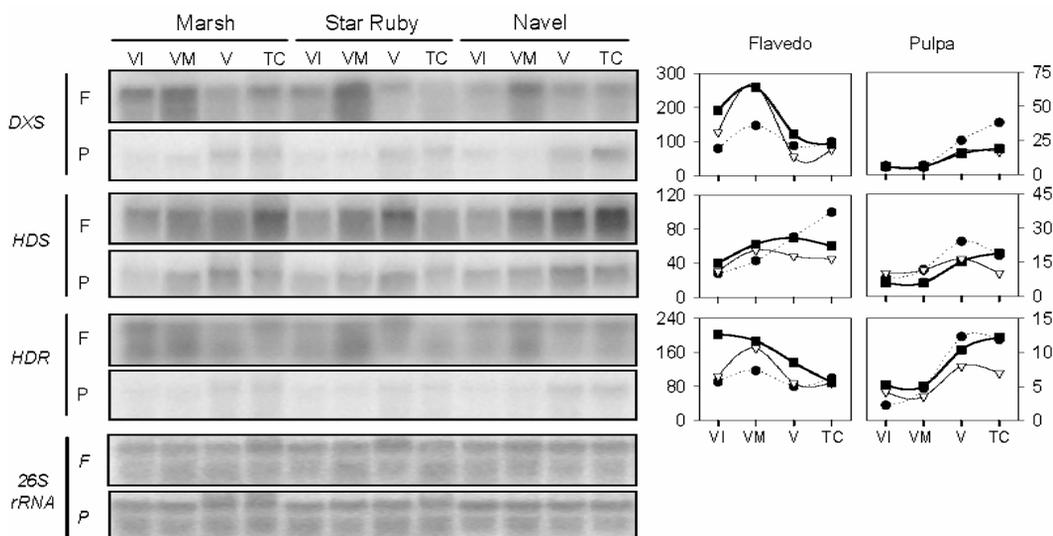


Figura 39: Evolución de los niveles de los mRNAs correspondientes a genes implicados en la ruta MEP de biosíntesis de IPP plastídico en el flavedo (F) y la pulpa (P) de frutos de los pomelos (*C. paradisi*) `Marsh´ (■) y `Star Ruby´ (△) y de naranja `Navel´ (*C. sinensis*) (●) en cuatro estadios representativos del proceso de desarrollo y maduración del fruto: VI, VM, V y TC. Se utilizaron para cada carrera 12 µg de RNA total procedente de frutos recién cosechados. El valor correspondiente a la intensidad de la señal de hibridación para cada uno de los genes analizados fue cuantificado y normalizado respecto al de la sonda 26S rRNA de *Citrus sinensis*. En el eje de ordenadas se indican los valores de intensidad relativa.

Los resultados correspondientes a la expresión de los genes implicados en la ruta de biosíntesis de carotenoides se muestran en la Figura 40. En el flavedo de los pomelos `Marsh´ y `Star Ruby´ se observó, durante el desarrollo y la maduración del fruto, un aumento del nivel de expresión de prácticamente todos

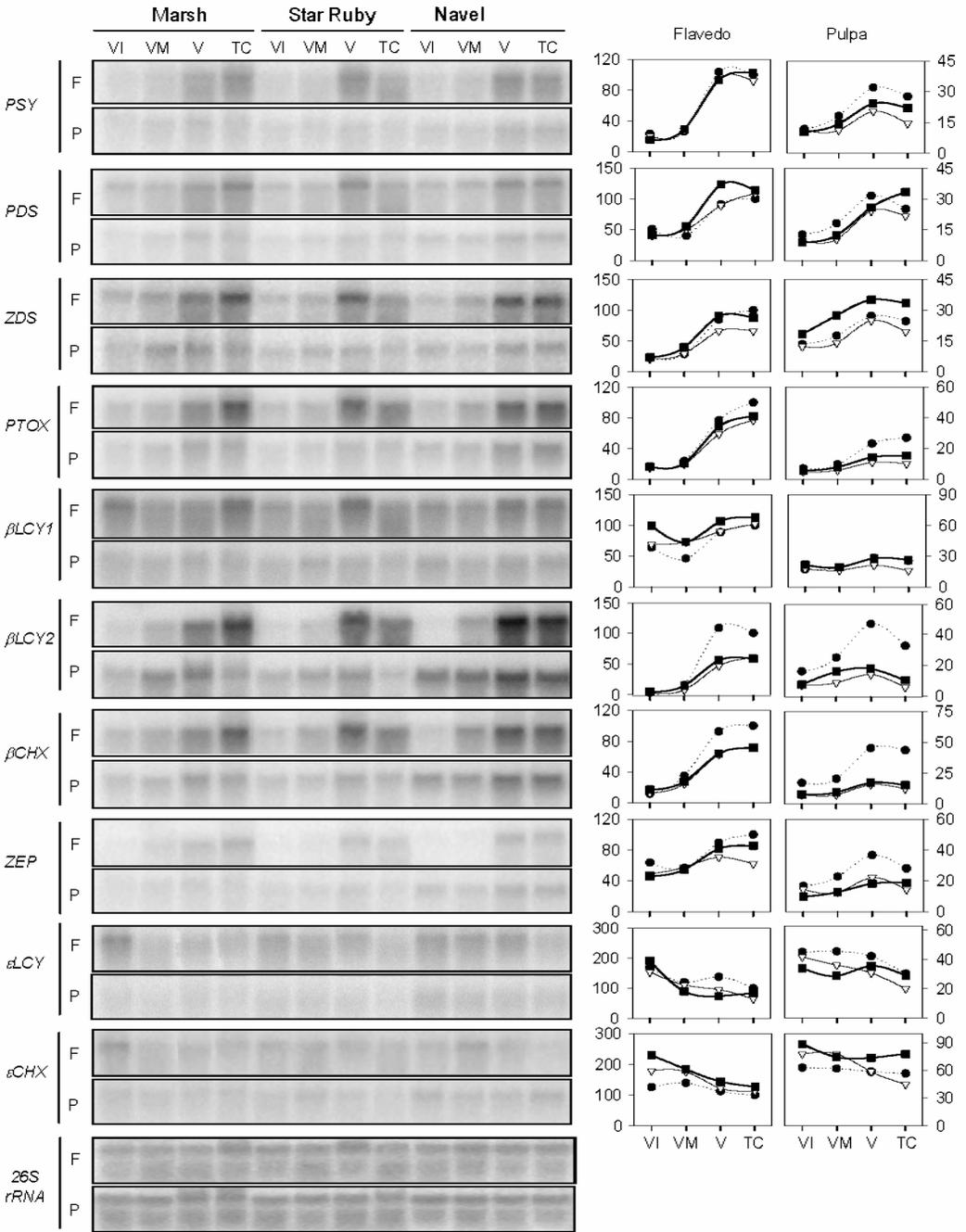


Figura 40: Evolución de los niveles de mRNAs correspondientes a los genes implicados en la biosíntesis de carotenoides en el flavedo (F) y la pulpa (P) de frutos de los pomelos (*C. paradisi*) ‘Marsh’ (■) y ‘Star Ruby’ (△) y de naranja ‘Navel’ (*C. sinensis*) (●) en cuatro estadios representativos del proceso de desarrollo y maduración del fruto: VI, VM, V y TC. Se utilizaron para cada carrera 12 μg de RNA total procedente de frutos recién cosechados. El valor correspondiente a la intensidad de la señal de hibridación para cada uno de los genes analizados fue cuantificado y normalizado respecto al de la sonda 26S rRNA de *Citrus sinensis*. En el eje de ordenadas se indican los valores de intensidad relativa.

los genes, alcanzándose los niveles máximos en el estadio TC en el caso de los genes *PTOX*,  $\beta$ -*LCY1*,  $\beta$ -*LCY2* y  $\beta$ -*CHX* o, en el estadio V y manteniéndose relativamente constantes hasta el final de la maduración en el caso de los genes *PSY*, *ZDS* y *ZEP* (Figura 40). En el caso de *PDS*, el mayor nivel de expresión se detectó en el flavedo V de pomelo 'Marsh' y en el flavedo de frutos TC de pomelo 'Star Ruby'. La acumulación de los mRNAs correspondientes a  $\epsilon$ -*LCY* y  $\epsilon$ -*CHX* fue, en ambas variedades de pomelo, máxima en el estadio VI y disminuyó durante el desarrollo y la maduración de los frutos. En general, los niveles de expresión de los genes de biosíntesis de carotenoides en el flavedo fueron muy similares entre ambas variedades de pomelo (Figura 40).

En ambas variedades de pomelo el nivel de expresión de todos los genes de biosíntesis de carotenoides estudiados fue menor en la pulpa que en el flavedo (Figura 40). En la pulpa de ambas variedades el nivel de expresión de los genes *PSY*, *PDS* y *ZDS* aumentó durante el desarrollo y la maduración del fruto, la expresión de *PTOX* aumentó ligeramente y la de  $\beta$ -*LCY2* aumentó de forma ligera y transitoria. El nivel de expresión de los genes  $\epsilon$ -*LCY* y  $\epsilon$ -*CHX* se redujo, y los genes  $\beta$ -*LCY1*,  $\beta$ -*CHX* y *ZEP* presentaron un nivel de expresión prácticamente constante. Salvo en el caso del gen *ZDS*, ambas variedades de pomelos presentaron, en general, niveles de expresión similares. Las mayores diferencias del nivel de expresión entre las dos variedades de pomelo se detectaron en la pulpa de frutos TC, siendo en este estadio los niveles de expresión de los genes *PSY* y *PDS* en la pulpa de pomelo blanco alrededor del 50% superiores a los existentes en pomelo rojo y, más del 70% superior en el caso del gen *ZDS*.

Basándonos en los tiempos de exposición de las membranas se pueden distinguir la existencia de distintos niveles de expresión: fuerte (de 1 a 12 h de exposición), en el caso de *PSY*, *ZDS*, y  $\beta$ -*CHX*; media (alrededor de 1 día de exposición), correspondiente al gen *ZEP*; baja (2 días de exposición), presentada por  $\beta$ -*LCY1* y  $\beta$ -*LCY2*; y muy baja (de 60 a 70 h de exposición), en el caso de los genes *PDS*, *PTOX*,  $\epsilon$ -*LCY* y  $\epsilon$ -*CHX*.

En general, los patrones de expresión de los genes de biosíntesis de carotenoides estudiados fueron muy similares entre las dos variedades de pomelo y la naranja (Figura 40). Sin embargo, destaca el menor aumento de la expresión de  $\beta$ -*LCY2* y  $\beta$ -*CHX* en los pomelos respecto a la naranja. Asimismo, conviene destacar los distintos niveles de expresión de algunos de estos genes entre los tejidos de *C. paradisi* ('Marsh' y 'Star Ruby') y *C. sinensis* ('Navel'). En particular, en el flavedo coloreado (V y TC) de los frutos de ambas variedades de

pomelo los niveles de expresión de  $\beta$ -*LCY2* y  $\beta$ -*CHX* fueron muy inferiores (hasta 6 y 3.5 veces, respectivamente) a los existentes en el flavedo coloreado de la naranja `Navel´ (Figura 40). En la pulpa se observaron las mayores diferencias del nivel de expresión, detectándose, en general, mayores niveles en la naranja `Navel´ que en los dos pomelos (Figura 40). En los 4 estadios analizados el nivel de expresión de  $\beta$ -*LCY2*,  $\beta$ -*CHX* y *ZEP* en la pulpa de la naranja `Navel´ fue superior a la detectada en la pulpa de ambas variedades de pomelo, cuantificándose en frutos TC hasta 5.72, 3.52 y 1.95 veces más señal en `Navel´ que en los pomelos (para el caso de los genes  $\beta$ -*LCY2*,  $\beta$ -*CHX* y *ZEP*, respectivamente).

## 2.5. Influencia de la luz en la coloración del flavedo de frutos de pomelo `Star Ruby´

La coloración externa de los frutos cítricos se encuentra influenciada, fundamentalmente, por determinantes genéticos, como la especie y la variedad, pero también por multitud de factores externos (revisado en Casas y Mallent 1988a; 1988b; 1989). En el caso del pomelo `Star Ruby´, la influencia de la luz en la coloración del fruto es patente desde estadios verdes del fruto. Las observaciones realizadas en campo indican una mayor coloración de los frutos del interior de la copa del árbol respecto de aquellos situados en el exterior, así como de aquellas zonas del fruto que, bien por contacto con otros frutos, bien por la presencia de hojas, se encuentran menos expuestas a la luz (Figura 41). Incluso, en un mismo fruto, pueden apreciarse notables diferencias de coloración entre aquella cara del fruto orientada hacia el exterior del árbol y aquella otra orientada hacia el interior.

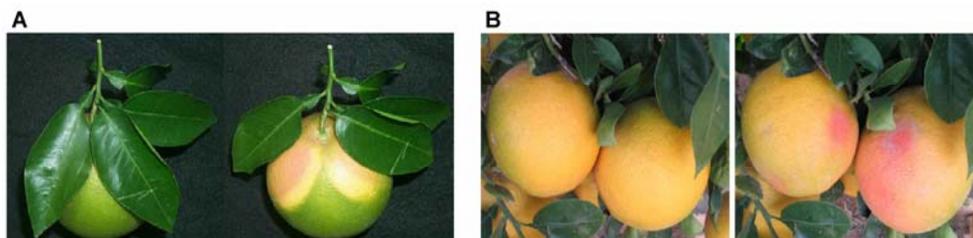


Figura 41: Frutos de pomelo `Star Ruby´ en los que se aprecia claramente la diferente coloración de aquellas zonas sombreadas, bien por estar cubiertas por las hojas (A), bien por contacto con otros frutos (B).

a) Influencia de la localización del fruto en el árbol y del recubrimiento sobre la coloración externa del pomelo `Star Ruby`

Durante la campaña 2003-2004 se estudió, desde agosto hasta diciembre, la evolución de la coloración de los frutos del pomelo `Star Ruby` en función de su localización en el exterior o en el interior de la copa del árbol. Adicionalmente, se procedió al recubrimiento con plástico negro opaco de frutos situados tanto en el interior como en el exterior de la copa. Dicho recubrimiento se realizó dejando abierta la parte inferior de la bolsa, de forma que se evitara su calentamiento y la acumulación de gases en el interior.

Al inicio del experimento los frutos internos y externos tenían una coloración similar, con un índice  $a/b$  próximo a -0.60 (Figura 42A). Hasta el mes de octubre, momento en el que los frutos alcanzaron el estadio verde-maduro, la evolución del color del flavedo fue muy similar en los frutos internos y externos. A partir del mes de octubre, se apreció una mayor velocidad de coloración de los frutos internos que de los externos. A finales de diciembre, la coloración final alcanzada por cada fruto fue claramente dependiente de su posición, presentando los frutos internos un índice  $a/b$  más alto ( $a/b +0.66 \pm 0.12$ ) que los externos ( $a/b +0.28 \pm 0.10$ ) (Figura 42A y B).

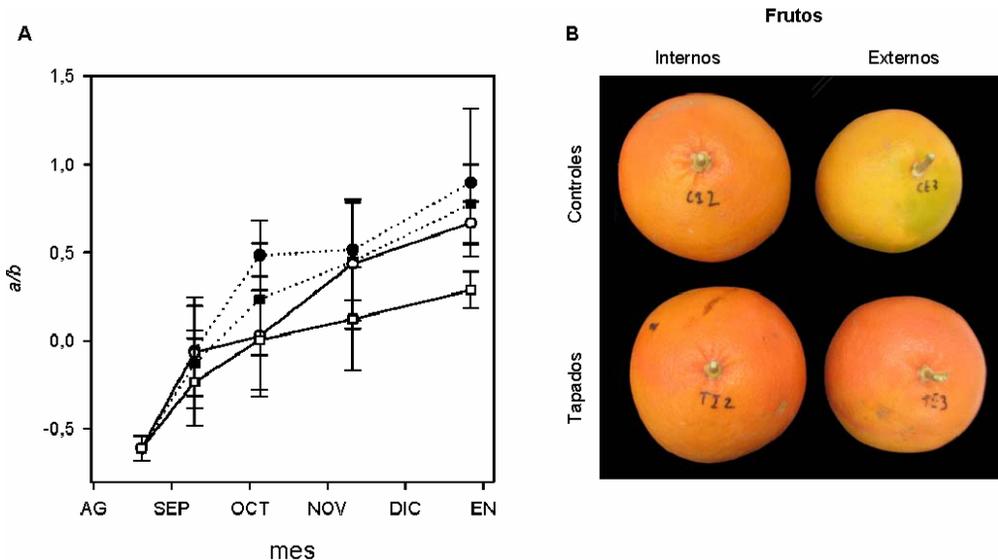


Figura 42: A, Efecto de la posición de los frutos del pomelo `Star Ruby` en el árbol y de su recubrimiento en la evolución del color. Los círculos corresponden a frutos internos no cubiertos (○) y recubiertos (●). Los cuadrados corresponden a frutos externos no cubiertos (□) y recubiertos (■). Los datos corresponden a la campaña 2003-2004. B, Fotografía representativa de la coloración final alcanzada por cada uno de los lotes de frutos.

A su vez, el oscurecimiento de los frutos externos logró modificar la evolución de la coloración del flavedo, mimetizando la observada para los frutos internos, mientras que el recubrimiento con plástico negro de frutos internos no produjo ningún efecto sobre la coloración de los mismos (Figura 42A y B).

**b) Efecto de la posición de los frutos de pomelo `Star Ruby´ en el árbol y de su recubrimiento en la evolución de la composición de carotenoides del flavedo de frutos**

Con el objetivo de determinar si la posición del fruto en el árbol influye en la composición de carotenoides del flavedo de pomelo `Star Ruby´ se recolectaron, durante la campaña 2004-2005, frutos localizados en la zona externa e interna de la copa del árbol y se analizó su perfil de carotenoides mediante HPLC-PDA durante el desarrollo y la maduración (Figura 43). Los frutos se cosecharon de una parcela comercial de Liria a partir del mes de septiembre, momento en el que se empezaron a apreciar las diferencias de coloración entre el flavedo de los frutos localizados en el interior y en el exterior de la copa del árbol. De acuerdo con los resultados correspondientes a la campaña 2003-2004 (Figura 42), los frutos localizados en el interior del árbol desverdizaron antes y presentaron una coloración superior a la de los frutos localizados en la parte externa de la copa (Figura 43A). En esta segunda campaña, el índice  $a/b$  del flavedo de los frutos internos a finales de diciembre fue ligeramente superior al de los frutos externos ( $a/b +0.39 \pm 0.10$  y  $+0.22 \pm 0.08$ , en frutos internos y externos, respectivamente).

En los 4 estadios analizados el contenido de clorofilas del flavedo fue inferior en los frutos internos que en los externos (Figura 43A). Sin embargo, el contenido de carotenoides totales del flavedo no mostró diferencias importantes entre los frutos externos e internos en ninguno de los cuatro estadios analizados (Figura 43A).

La evolución del perfil de carotenoides del flavedo de los frutos externos fue muy similar a la descrita anteriormente (Figura 36), observándose, durante el desarrollo y la maduración, una disminución del contenido de carotenoides característicos de tejido cloroplástico y un incremento del contenido de carotenoides lineales y 9-*cis*-violaxantina (Figura 43B). Sin embargo, se detectaron mayores contenidos de fitoflueno, licopeno y  $\beta$ -caroteno en el flavedo de los pomelos recolectados en la plantación de Liria (Figura 43B) que en el de los frutos cosechados en la plantación del I.V.I.A (Figura 36).

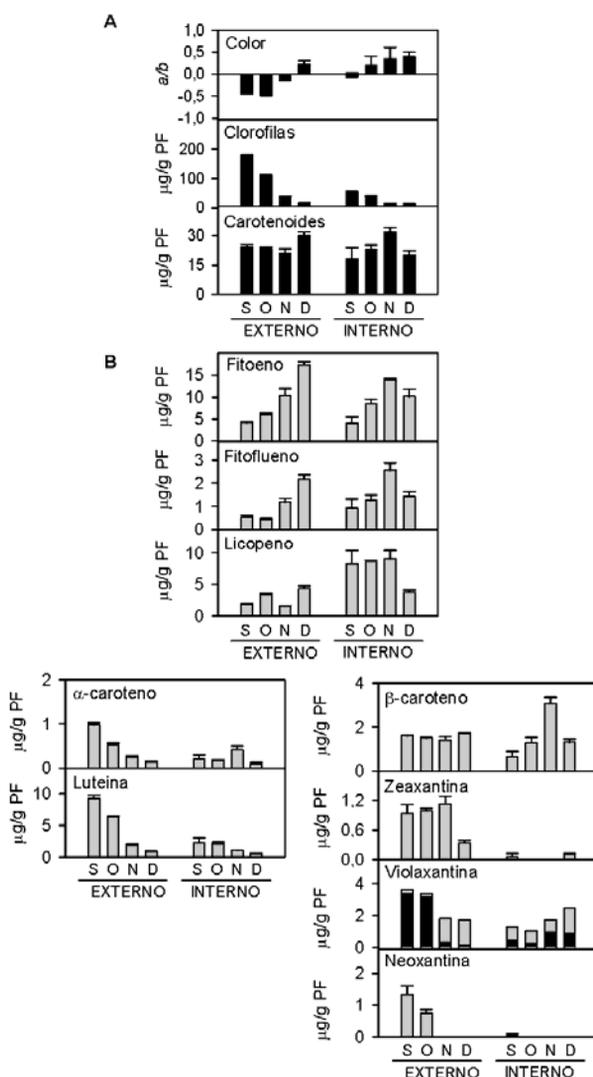


Figura 43: Color (*a/b*), contenido de clorofilas y de carotenoides (A) y, composición de carotenoides del flavedo de frutos del pomelo `Star Ruby´ localizados en el exterior y en el interior del árbol en los meses de septiembre (S), octubre (O), noviembre (N) y diciembre (D) (B). Cuando se detectan dos isómeros del mismo carotenoide, la forma *trans* se representa en negro y la *cis* en gris. Los valores son la media  $\pm$  DE de al menos seis (A) ó tres (B) medidas independientes.

Durante el desarrollo y la maduración de los frutos se detectaron diferencias, cualitativas y cuantitativas, en la composición de carotenoides del flavedo de los frutos internos y externos (Figura 43B). El flavedo de los frutos internos presentó, en general, un mayor contenido de licopeno y un menor contenido de carotenoides característicos de tejido cloroplástico ( $\alpha$ -caroteno,

luteína, zeaxantina y neoxantina) que el flavedo de los frutos externos (Figura 43B). En los frutos de diciembre las concentraciones de carotenoides coloreados fueron similares en el flavedo de los frutos internos y en el de los externos (Figura 43B).

c) Efecto de la posición de los frutos en el árbol y de su recubrimiento sobre la expresión de genes de la biosíntesis de carotenoides en el flavedo de frutos de pomelo `Star Ruby`

Con objeto de conocer si, las diferencias en la composición de carotenoides observadas entre el flavedo de frutos de pomelo `Star Ruby` localizados en la parte externa e interna de la copa, se pueden correlacionar con cambios en la expresión de los genes de la biosíntesis de carotenoides, se analizó la acumulación de los transcritos correspondientes mediante análisis Northern (Figura 44). Tanto en el flavedo de los frutos internos como en el de los externos el patrón de expresión de los genes estudiados fue muy similar al descrito anteriormente en el flavedo de pomelo `Star Ruby` durante el desarrollo y la maduración del fruto (Figura 40 y Figura 39).

De los tres genes de la ruta MEP estudiados, dos de ellos mostraron ligeras diferencias de su nivel de expresión en función de la localización del fruto en la copa del árbol. La acumulación de los transcritos correspondientes a *HDS* fue, desde octubre hasta diciembre, ligeramente superior en el flavedo de los frutos internos que en el de los externos, mientras que los niveles de expresión de *HDR* fueron ligeramente inferiores en el flavedo de los frutos internos que en el de los externos durante el mes de noviembre (Figura 44). En general, el nivel de expresión de los genes de la biosíntesis de carotenoides fue similar en el flavedo de los frutos externos e internos en los cuatro estadios analizados (Figura 44).

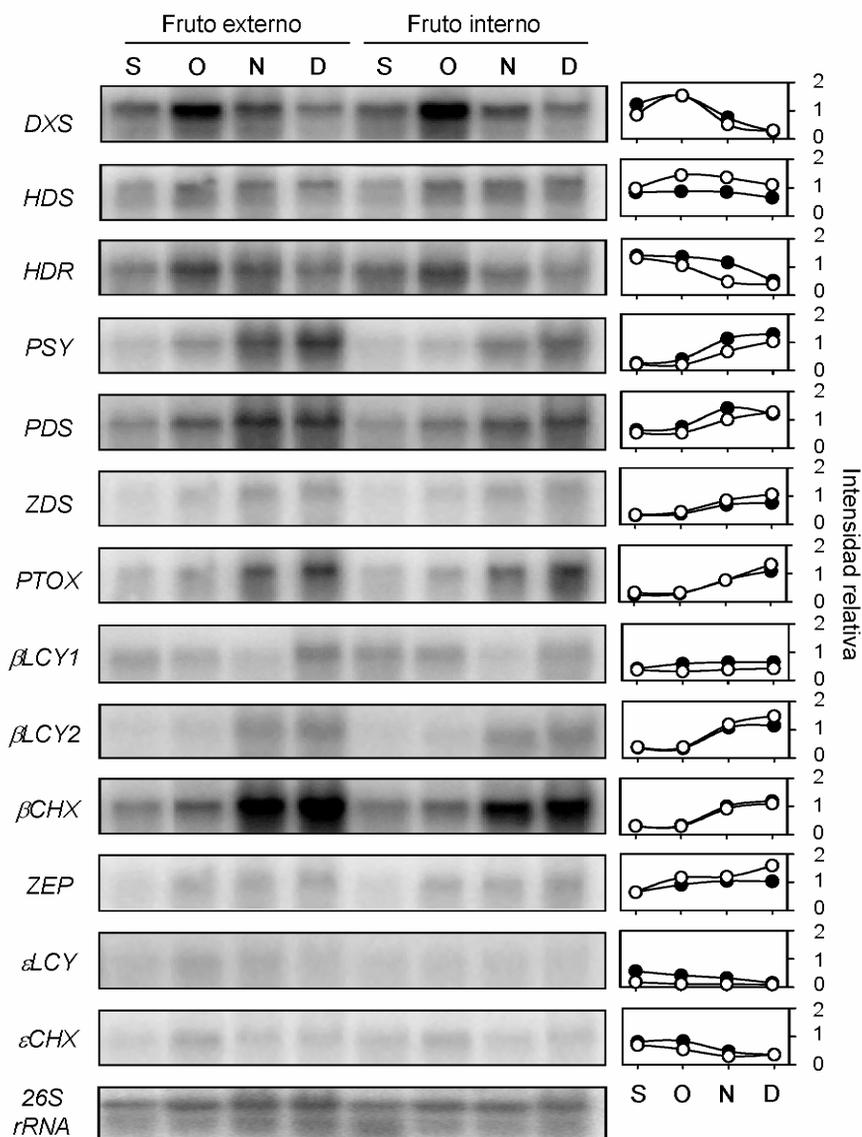


Figura 44: Acumulación de mRNAs correspondientes a genes implicados en la biosíntesis de carotenoides en el flavedo de frutos del pomelo 'Star Ruby', localizados en el exterior (●) y en el interior (○) del árbol, en los meses de septiembre (S), octubre (O), noviembre (N) y diciembre (D). Se utilizaron para cada carrera 8  $\mu$ g de RNA total procedente de frutos recién cosechados. El valor correspondiente a la intensidad de la señal de hibridación para cada uno de los genes analizados fue cuantificado y normalizado respecto al de la sonda 26S rRNA de *Citrus sinensis*. En el eje de ordenadas se indican los valores de intensidad relativa.



### 3. Caracterización de la biosíntesis y acumulación de carotenoides durante la maduración de tres variedades de mandarina

En general, las mandarinas son los frutos cítricos que presentan las tonalidades naranjas más intensas. Esta mayor coloración se debe, principalmente, a la acumulación de  $\beta$ -criptoxantina, un carotenoide de coloración naranja intenso abundante en el flavedo y la pulpa de las mandarinas (Gross 1987; Kato *et al.* 2004). En las distintas variedades de mandarinas existe una amplia gama de colores anaranjados, que va desde el amarillo-naranja de las Satsumas al naranja-rojizo de las mandarinas `Nova´. El objetivo planteado en esta parte de la Tesis fue investigar las bases bioquímicas y moleculares que determinan las diferentes coloraciones de las variedades de mandarina. Para ello se seleccionaron frutos de la mandarina `Clemenules´ y de los híbridos `Fortune´ y `Nova´, que presentan diferencias importantes tanto en la tonalidad final del fruto como en la velocidad de coloración (Casas y Mallent 1988b). En cada una de las variedades seleccionadas se estudió, durante el desarrollo y la maduración del fruto, el contenido y la composición de carotenoides, así como la expresión de los genes de biosíntesis de carotenoides, a fin de establecer una correlación entre ambos parámetros.

#### 3.1. Evolución del color y del contenido de clorofilas y carotenoides en el flavedo y la pulpa de frutos de la mandarina `Clemenules´ y de los híbridos `Fortune´ y `Nova´ durante el desarrollo y la maduración

Se recolectaron frutos de las tres variedades de mandarina desde finales de julio hasta la fecha de maduración comercial. En el caso de `Clemenules´ se recolectaron hasta finales del mes de diciembre, de forma semanal durante el mes de noviembre, sumando un total de 7 fechas de muestreo. De la mandarina `Nova´ se recolectaron frutos en 7 fechas, desde finales de julio hasta principios del mes de diciembre. De mandarina `Fortune´ se recolectaron frutos en 9 fechas de muestreo comprendidas entre los meses de julio y marzo. El aspecto externo e interno de los frutos recolectados de cada una de las variedades se muestra en la Figura 45.

La evolución de la coloración del flavedo y de la pulpa, determinada como el cociente  $a/b$ , de las tres variedades de mandarina se muestra en la Figura 46A, D y G. Hasta el mes de octubre (estadíos 1 y 2) el flavedo de las tres variedades presentó coloración verde ( $a/b \approx -0.60$ ), iniciándose la desverdización

de la mandarina `Fortune´ ligeramente retrasada en el tiempo respecto al de las mandarinas `Nova´ y `Clemenules´ (principios de noviembre y mitad de octubre, respectivamente). En `Clemenules´ el punto de viraje ( $a/b \approx -0.00$ ) se alcanzó a principios de noviembre, y en `Nova´ y `Fortune´ se alcanzó a mediados de noviembre (estadio 4). Posteriormente, el cociente  $a/b$  del flavedo de las tres mandarinas aumentó de forma continuada hasta que el fruto alcanzó la plena coloración en el último estadio recolectado (Figura 46A, D y G). El fruto maduro de la mandarina `Clemenules´ presentó una coloración menos intensa que la de los dos híbridos (Figura 45 y Figura 46). La mandarina `Nova´ fue, de las tres variedades, la que presentó una mayor coloración en el estadio maduro (Figura 45 y Figura 46).

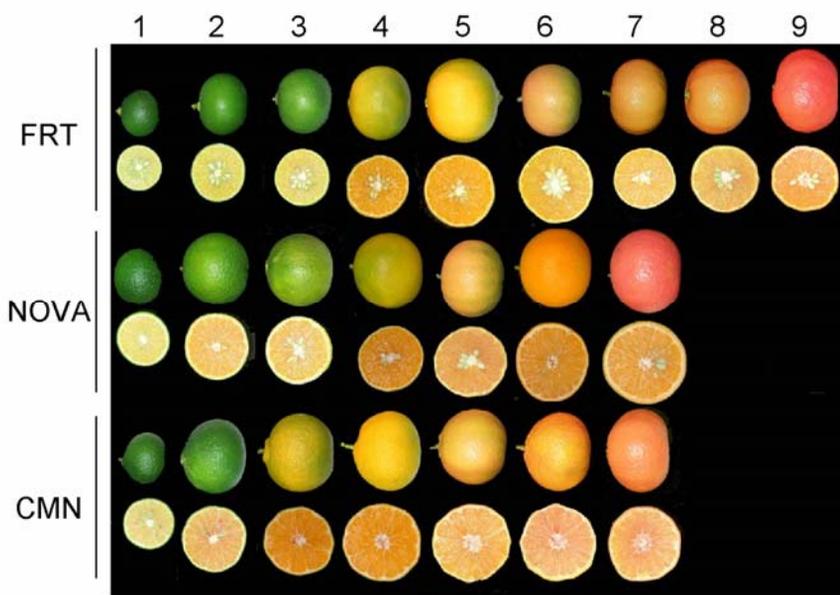


Figura 45: Aspecto interno y externo de frutos de las mandarinas `Fortune´ (FRT), `Nova´ y `Clemenules´ (CMN) en los distintos estadios del desarrollo y la maduración recolectados en este estudio.

En las tres variedades estudiadas el índice  $a/b$  de la pulpa fue, en todo momento inferior a  $+0.1$  (Figura 46A, D y G) y no reflejó fielmente los cambios de coloración que experimentaron las pulpas de las mandarinas durante el desarrollo y la maduración del fruto (Figura 45). La pulpa de la mandarina `Fortune´ presentó tonalidades verdosas a finales de julio (estadio 1) y amarillentas hasta el mes de noviembre (estadios 2 y 3) (Figura 45). A partir de noviembre (estadio 4), y coincidiendo con el viraje de color del flavedo, la pulpa

de 'Fortune' mostró tonalidades anaranjadas. En el mes de marzo (estadio 9) la pulpa de la mandarina 'Fortune' alcanzó su máxima coloración, un naranja intenso carente de matices amarillos (Figura 45). La pulpa de la mandarina 'Nova' presentó una tonalidad amarillenta en el mes de julio (estadio 1) y coloración naranja claro hasta el mes de noviembre (estadios 2 y 3) (Figura 45). Durante el resto de la maduración la pulpa de 'Nova' mostró un color naranja intenso relativamente invariable (Figura 45). La pulpa de la mandarina 'Clemenules' fue amarillenta en el mes de julio (estadio 1) y naranja en el mes de octubre (estadio 2), intensificándose su coloración durante los dos estadios siguientes y disminuyendo durante el resto de la maduración del fruto (Figura 45).

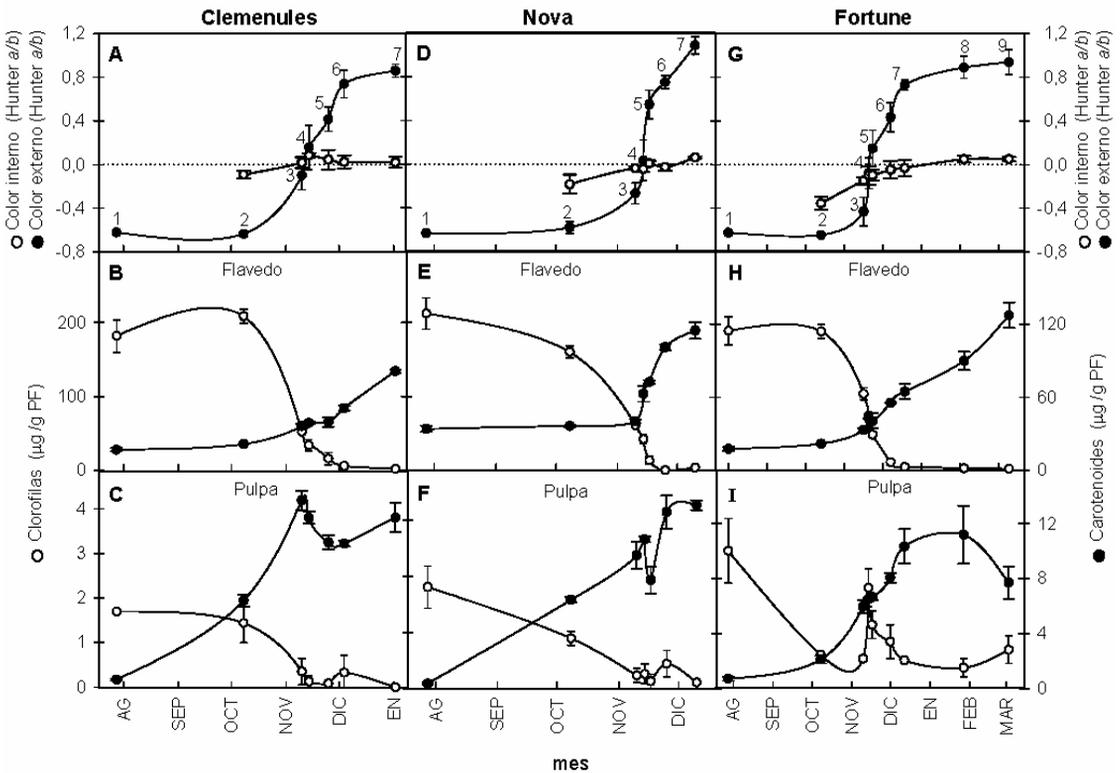


Figura 46: Evolución del color del flavedo (●) y de la pulpa (○) (A, D, G), y del contenido de clorofilas (○) y carotenoides (●) durante el desarrollo y maduración de frutos de las mandarinas 'Clemenules' (B, C), 'Nova' (E, F) y 'Fortune' (H, I). La numeración corresponde a los distintos estadios de desarrollo y maduración presentados en la Figura 45.

La evolución del contenido de clorofilas del flavedo y de la pulpa durante el desarrollo y la maduración del fruto fue muy similar en las tres variedades estudiadas (Figura 46). En el flavedo el contenido de clorofilas fue elevado (160-212  $\mu\text{g/g}$  PF) durante los estadios verdes del fruto (estadios 1 y 2) y disminuyó durante el desarrollo y la maduración. A pesar de que la degradación de clorofilas comenzó más tempranamente en `Nova` que en `Clemenules` y `Fortune`, en el estadio 6 la concentración de clorofilas en el flavedo de todas ellas fue similar. Al final de la maduración comercial no se detectaron clorofilas en el flavedo de ninguna de las mandarinas (Figura 46B, E y H). En la pulpa de las tres variedades el contenido de clorofilas fue muy bajo durante todo el período de tiempo estudiado ( $<4$   $\mu\text{g/g}$  PF) y disminuyó durante el desarrollo y la maduración del fruto hasta niveles prácticamente indetectables en frutos maduros (Figura 46C, F y I).

La concentración de carotenoides del flavedo, determinada como equivalentes de  $\beta$ -caroteno, aumentó durante el desarrollo y la maduración de los frutos de las mandarinas `Clemenules`, `Nova` y `Fortune` (Figura 46B, E y H). En mandarinas `Clemenules` y `Fortune` la mínima concentración de carotenoides se detectó en el flavedo de frutos verde-inmaduro del mes de julio ( $\approx 16$   $\mu\text{g/g}$  PF, estadio 1). Hasta mediados del mes de noviembre el contenido de carotenoides se incrementó de forma ligera y continuada, presentando el flavedo de ambas variedades en el estadio 5 una concentración similar de carotenoides ( $40.50 \pm 6.20$  y  $39.85 \pm 3.89$   $\mu\text{g/g}$  PF en `Clemenules` y `Fortune`, respectivamente). A continuación se inició un rápido aumento del contenido de carotenoides, alcanzándose la máxima concentración en el flavedo de frutos totalmente coloreados (estadios 7 y 9, en `Clemenules` y `Fortune`, respectivamente). En la fecha de maduración comercial, el contenido de carotenoides del flavedo de la mandarina `Fortune` (127.25  $\mu\text{g/g}$  PF en el estadio 9, Figura 46H) fue un 56% superior al existente en el flavedo de `Clemenules` ( $81.45 \pm 1.15$   $\mu\text{g/g}$  PF en el estadio 7, Figura 46B). En el flavedo de la mandarina `Nova` el contenido de carotenoides en frutos verde-inmaduro del mes de julio (estadio 1) fue alrededor de dos veces superior al existente en el flavedo de las mandarinas `Clemenules` y `Fortune`, y se mantuvo relativamente invariable hasta principios del mes de noviembre (estadio 3) (Figura 46E). Posteriormente, se inició una rápida acumulación de carotenoides, alcanzándose en el flavedo de frutos de `Nova` en estadio 7 una concentración de  $114.80 \pm 6.90$   $\mu\text{g/g}$  PF (Figura 46E).

La concentración de carotenoides de la pulpa de las tres variedades de mandarina fue muy inferior a la existente en el flavedo durante todo el período de tiempo estudiado (Figura 46). Aunque en la pulpa de las tres mandarinas el contenido total de carotenoides aumentó durante el desarrollo y la maduración del fruto, el patrón característico de acumulación de estos pigmentos fue ligeramente distinto en cada una de las tres variedades (Figura 46C, F y I). En la pulpa de la mandarina `Clemenules´ del mes de julio (estadio 1) el contenido de carotenoides fue muy reducido ( $0.55 \pm 0.07 \mu\text{g/g PF}$ ) y aumentó de forma continua hasta el mes de noviembre (estadio 3,  $13.60 \pm 0.71 \mu\text{g/g PF}$ ). En el estadio 6 el contenido de carotenoides disminuyó de forma transitoria y aumentó durante la fase final de maduración del fruto, alcanzándose en la pulpa de frutos totalmente coloreados (estadio 7) una concentración de  $12.35 \pm 1.05 \mu\text{g/g PF}$  (Figura 46C). En la pulpa de `Nova´ el contenido de carotenoides aumentó de forma continuada desde julio ( $0.35 \pm 0.07 \mu\text{g/g PF}$ ) hasta mediados de diciembre (estadio 7,  $13.35 \pm 0.35 \mu\text{g/g PF}$ ), experimentando un descenso transitorio a mediados del mes de noviembre (estadio 5) (Figura 46F). En la pulpa de la mandarina `Fortune´ la concentración de carotenoides aumentó de forma continua desde julio (estadio 1,  $0.70 \pm 0.14 \mu\text{g/g PF}$ ) hasta enero (estadio 8,  $11.20 \pm 2.10 \mu\text{g/g PF}$ ), y se redujo a continuación, siendo la concentración de carotenoides en el mes de marzo (estadio 9,  $7.70 \pm 1.20 \mu\text{g/g PF}$ ) un 37.65% y un 42.32% inferior a la existente en la pulpa de frutos totalmente coloreados de `Clemenules´ y `Nova´, respectivamente.

### 3.2. Composición de carotenoides en el flavedo y la pulpa de frutos de la mandarina `Clemenules´ y de los híbridos `Fortune´ y `Nova´ durante el desarrollo y la maduración

La composición de carotenoides del flavedo y la pulpa de las mandarinas `Clemenules´, `Nova´ y `Fortune´ se analizó, mediante HPLC-PDA, en cada uno de los estadios de desarrollo indicados en la Figura 46.

La evolución del perfil de carotenoides del flavedo durante el desarrollo y la maduración de los frutos de las tres variedades estudiadas fue, cualitativamente, muy similar (Figura 47). El contenido de  $\alpha$ -caroteno,  $\alpha$ -criptoxantina, luteína,  $\beta$ -caroteno y neoxantina, carotenoides abundantes en tejidos cloroplásticos, disminuyó en el flavedo de las tres mandarinas durante el desarrollo y la maduración del fruto. Paralelamente, se acumularon carotenos

incolores (fitoeno y fitoflueno),  $\beta,\beta$ -xantofilas, fundamentalmente *cis*-violaxantina, y el apocarotenoide  $\beta$ -citraurina. En general, el contenido de *trans*-violaxantina del flavedo no sufrió variaciones importantes durante el período de tiempo estudiado. En los frutos maduros de las tres variedades la violaxantina fue el carotenoide más abundante, constituyendo el 73.10%, 56.24% y 80.42% del total de carotenoides del flavedo de `Clemenules`, `Nova` y `Fortune`, respectivamente, siendo el isómero *cis* alrededor de 4 veces más abundante que el *trans*. Sin embargo, cabe resaltar algunas de las diferencias en la composición de carotenoides entre los flavedos de las tres mandarinas. El contenido de carotenos lineales del flavedo de las mandarinas `Clemenules` y `Nova` aumentó de forma continuada durante el desarrollo y la maduración del fruto, en mayor medida en la segunda variedad, que alcanzó en los frutos coloreados (estadio 7) concentraciones de fitoeno y fitoflueno 5 y 6 veces superiores, respectivamente, a las de `Clemenules` (Figura 47). El contenido de carotenos lineales del flavedo de la mandarina `Fortune` se mantuvo relativamente constante desde julio hasta febrero (estadios 1 a 8) y aumentó en el mes de marzo, presentando el flavedo de frutos maduros de `Fortune` (estadio 9) concentraciones de fitoeno y fitoflueno 3 y 4 veces superiores, respectivamente, a las existentes en el flavedo de frutos de `Clemenules` del mismo estadio de maduración (Figura 47). Desde estadios tempranos del desarrollo del fruto se detectó en el flavedo de las tres mandarinas  $\beta$ -criptoxantina, cuya concentración, a partir del momento del viraje de color del flavedo (estadio 4), fue superior en la mandarina `Nova` que en el resto (Figura 47). En el flavedo totalmente coloreado (estadio 7) de `Nova` la concentración de  $\beta$ -criptoxantina fue de  $10.30 \pm 0.32 \mu\text{g/g PF}$ , más de dos veces superior a la existente en el flavedo coloreado de las mandarinas `Clemenules` y `Fortune`. La anteraxantina presentó un perfil de acumulación característico en cada una de las variedades estudiadas (Figura 47). En las mandarinas `Clemenules` y `Fortune` únicamente se detectó anteraxantina en los estadios iniciales del desarrollo del fruto, mientras que la concentración de este pigmento aumentó en el flavedo de la mandarina `Nova` durante el desarrollo y la maduración del fruto. En frutos totalmente coloreados la concentración de  $\beta$ -citraurina del flavedo de la mandarina `Fortune` fue 2.47 y 1.77 veces superior a la existente en el flavedo de las mandarinas `Clemenules` y `Nova`, respectivamente.

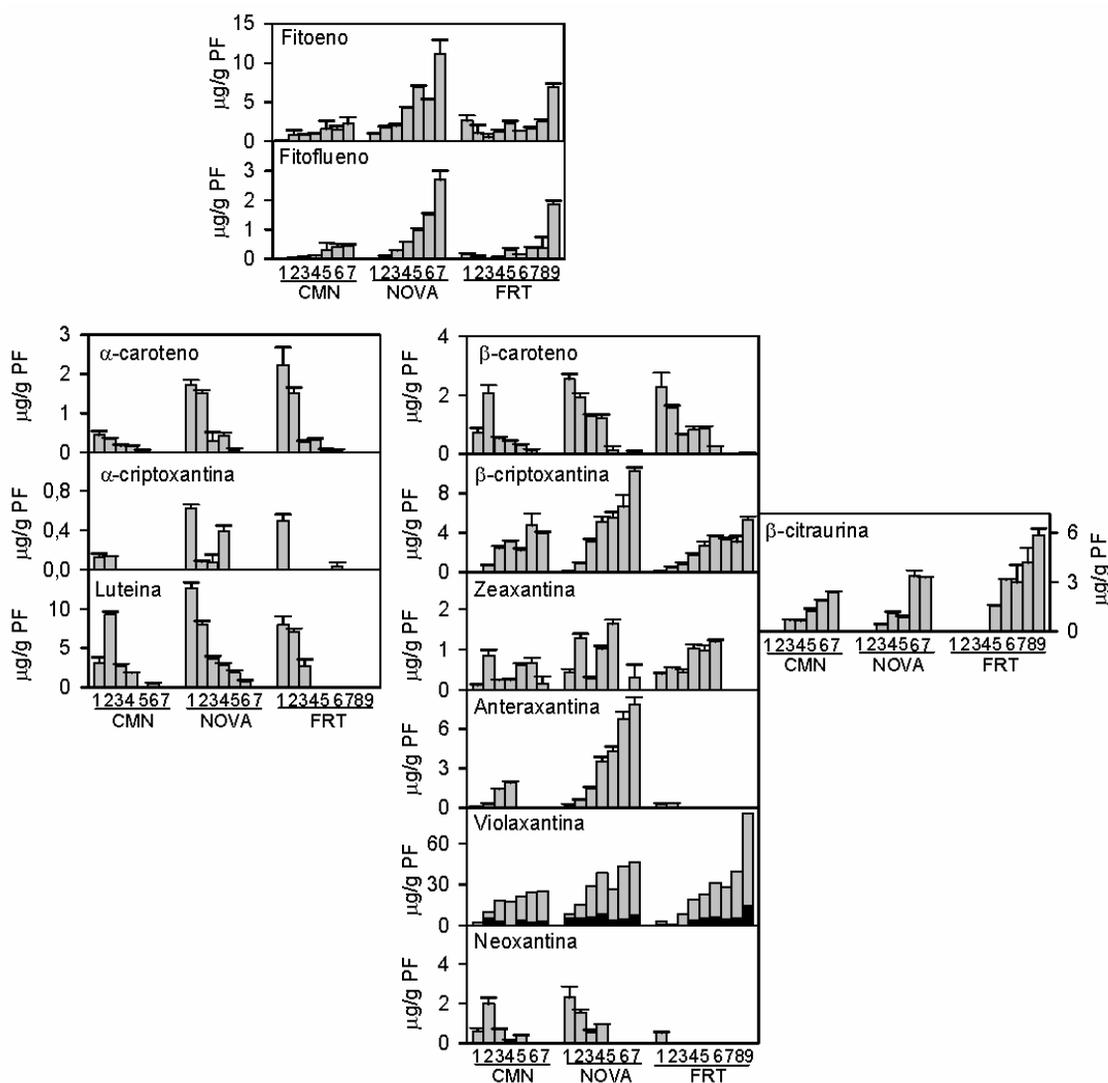


Figura 47: Evolución de la composición y del contenido de carotenoides del flavedo de frutos de las mandarinas 'Clemenules' (CMN), 'Nova' y 'Fortune' (FRT) durante el desarrollo y la maduración. Cuando se detectan dos isómeros del mismo carotenoide la forma *trans* se representa en negro y la *cis* en gris. Los valores son la media  $\pm$  DE de al menos tres medidas independientes.

En la pulpa de 'Clemenules', 'Nova' y 'Fortune' no se detectaron  $\beta, \epsilon$ -carotenoides y se observó, durante la maduración, un incremento de la concentración de carotenos y de  $\beta, \beta$ -xantofilas, siendo estas últimas los carotenoides más abundantes en todas las muestras analizadas (Figura 48). La

acumulación de carotenos en la pulpa de la mandarina `Fortune´ fue continua durante todo el desarrollo y la maduración de los frutos, alcanzándose la máxima concentración en la pulpa del estadio 9. En las pulpas de `Clemenules´ y `Nova´ la concentración de carotenos aumentó bruscamente en el estadio 3 y permaneció relativamente invariable hasta el estadio 6, disminuyendo ligera (en el caso de `Clemenules´) o bruscamente (`Nova´) en el último estadio analizado. El caroteno más abundante en las tres variedades fue el fitoeno. En la pulpa de las tres variedades de mandarina la acumulación de  $\beta,\beta$ -xantofilas se inició en el estadio verde-maduro (estadio 2). A partir de este momento y en todas las muestras analizadas las  $\beta,\beta$ -xantofilas más abundantes fueron *cis*-violaxantina y  $\beta$ -criptoxantina, que constituyen, cada una, alrededor del 30% de los carotenoides totales de la pulpa en las variedades `Clemenules´ y `Nova´. En la pulpa de la mandarina `Fortune´ el contenido de  $\beta$ -criptoxantina ( $\approx 43\%$  del total) fue ligeramente superior al de *cis*-violaxantina ( $\approx 30\%$  del total). En mandarina `Fortune´ se detectaron pequeñas cantidades de zeaxantina en todas las muestras analizadas, salvo en la correspondiente a frutos verde-inmaduro (estadio 1), mientras que en la pulpa de las mandarinas `Clemenules´ y `Nova´ este carotenoide únicamente se detectó en las fases finales de la maduración del fruto (Figura 48). El apocarotenoide  $\beta$ -citaurina no se detectó en la pulpa de la mandarina `Fortune´ en ninguno de los estadios analizados, mientras que en las pulpas de `Clemenules´ y `Nova´ se detectaron pequeñas cantidades ( $<0.1 \mu\text{g/g}$  PF) de este compuesto (Figura 48).

### 3.3. Análisis de la expresión de genes de la biosíntesis de carotenoides en el flavedo y la pulpa de frutos de la mandarina `Clemenules´ y de los híbridos `Fortune´ y `Nova´ durante el desarrollo y la maduración

Con objeto de determinar si las diferencias en el perfil de carotenoides observadas entre los tejidos de las mandarinas `Clemenules´, `Nova´ y `Fortune´ (Figura 47 y Figura 48) se deben a una expresión diferencial de los genes implicados en la biosíntesis de carotenoides, se realizó un análisis Northern utilizando RNA total de flavedo y pulpa de frutos de las tres variedades en cada uno de los estadios indicados en la Figura 46. Para poder comparar los niveles de expresión entre las tres variedades de mandarina todas las muestras se incluyeron en una única membrana que se hibridó, al igual que en los apartados

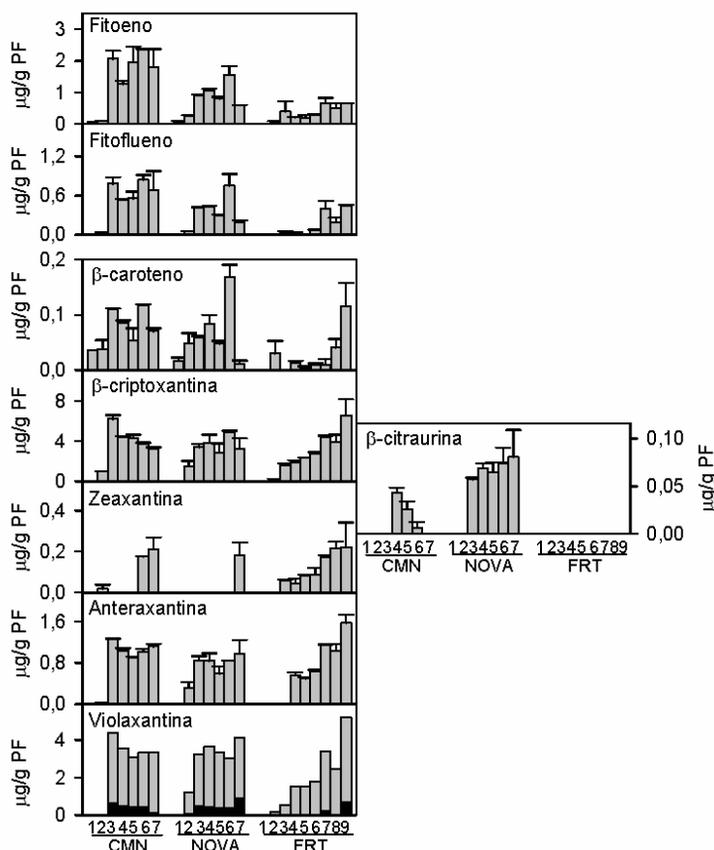


Figura 48: Evolución de la composición y del contenido de carotenoides en la pulpa de frutos de las mandarinas 'Clemenules' (CMN), 'Nova' y 'Fortune' (FRT) durante el desarrollo y la maduración. Cuando se detectan dos isómeros del mismo carotenoide de la forma *trans* se representa en negro y la *cis* en gris. Los valores son la media  $\pm$  DE de al menos tres medidas independientes.

anteriores, con las sondas correspondientes a 13 genes de la biosíntesis de carotenoides.

Se estudiaron los perfiles de expresión de genes de la ruta MEP, implicados en la biosíntesis de IPP plastídico (*DXS*, *HDS* y *HDR*), genes implicados en la biosíntesis de carotenos lineales (*PSY*, *PDS*, *ZDS* y *PTOX*), genes implicados en la ciclación del licopeno ( $\beta$ -*LCY1*,  $\beta$ -*LCY2* y  $\epsilon$ -*LCY*) y genes de la biosíntesis de xantofilas ( $\beta$ -*CHX*,  $\epsilon$ -*CHX* y *ZEP*). Basándonos en los tiempos de exposición de las membranas se pueden distinguir la existencia de distintos niveles de expresión: fuerte (de 1 a 12 h de exposición), en el caso de *PSY*, *ZDS*,  $\beta$ -*LCY2* y  $\beta$ -*CHX*; media (alrededor de 1 día de exposición), correspondiente al gen *HDR*; baja (2

días de exposición), presentada por *HDS* y  $\beta$ -*LCY1*; y muy baja (de 60 a 70 h de exposición), en el caso de los genes *DXS*, *PDS*, *PTOX*,  $\epsilon$ -*LCY*,  $\epsilon$ -*CHX* y *ZEP*.

#### a) Análisis de la expresión de genes de la ruta MEP

En el flavedo de las tres mandarinas estudiadas los patrones de expresión de los genes *DXS* y *HDS* fueron muy similares (Figura 49). El nivel de expresión de ambos genes se mantuvo relativamente constante durante los estadios verdes del fruto (estadios 1 y 2), aumentó durante el viraje de color del flavedo (que se produjo en noviembre, ver Figura 46) y disminuyó a continuación a niveles similares a los iniciales, manteniéndose relativamente invariable durante el resto de la maduración. El patrón de expresión del gen *HDR* también fue similar en los flavedos de las mandarinas 'Clemenules', 'Nova' y 'Fortune' (Figura 49). Desde finales de agosto hasta principios de noviembre el nivel de expresión de *HDR* se redujo ligeramente, incrementándose a continuación de forma transitoria y manteniéndose en niveles inferiores a los iniciales durante el resto de la maduración del fruto.

En general, el nivel de expresión de los genes *DXS*, *HDS* y *HDR* fue mayor en el flavedo que en la pulpa en las tres variedades de mandarina (Figura 49). En la pulpa de 'Nova' la expresión de los tres genes de la ruta MEP aumentó, de forma continuada desde estadios iniciales del desarrollo (*HDS* y *HDR*) o, a partir del estadio verde-maduro (*DXS*), alcanzándose los niveles máximos de expresión en frutos totalmente coloreados del mes de diciembre (estadio 7, Figura 49). En la pulpa de 'Clemenules' y 'Fortune' la acumulación del transcrito del gen *DXS* aumentó de forma continuada, desde estadios iniciales del desarrollo ('Clemenules') o a partir del estadio verde-maduro ('Fortune') y alcanzó su máximo en el mes de diciembre, manteniéndose relativamente constante (en el caso de 'Fortune') o disminuyendo (en el caso de 'Clemenules') al final de la maduración. La expresión del gen *HDS* en la pulpa de 'Fortune' fue muy similar a la descrita en 'Nova', mientras que, en la pulpa de la mandarina 'Clemenules' el nivel de expresión fue máximo en el momento del viraje de color del flavedo (estadio 4) y se redujo durante el resto de la maduración (Figura 49). El patrón de expresión del gen *HDR* en la pulpa de las mandarinas 'Clemenules', 'Nova' y 'Fortune' fue muy similar.

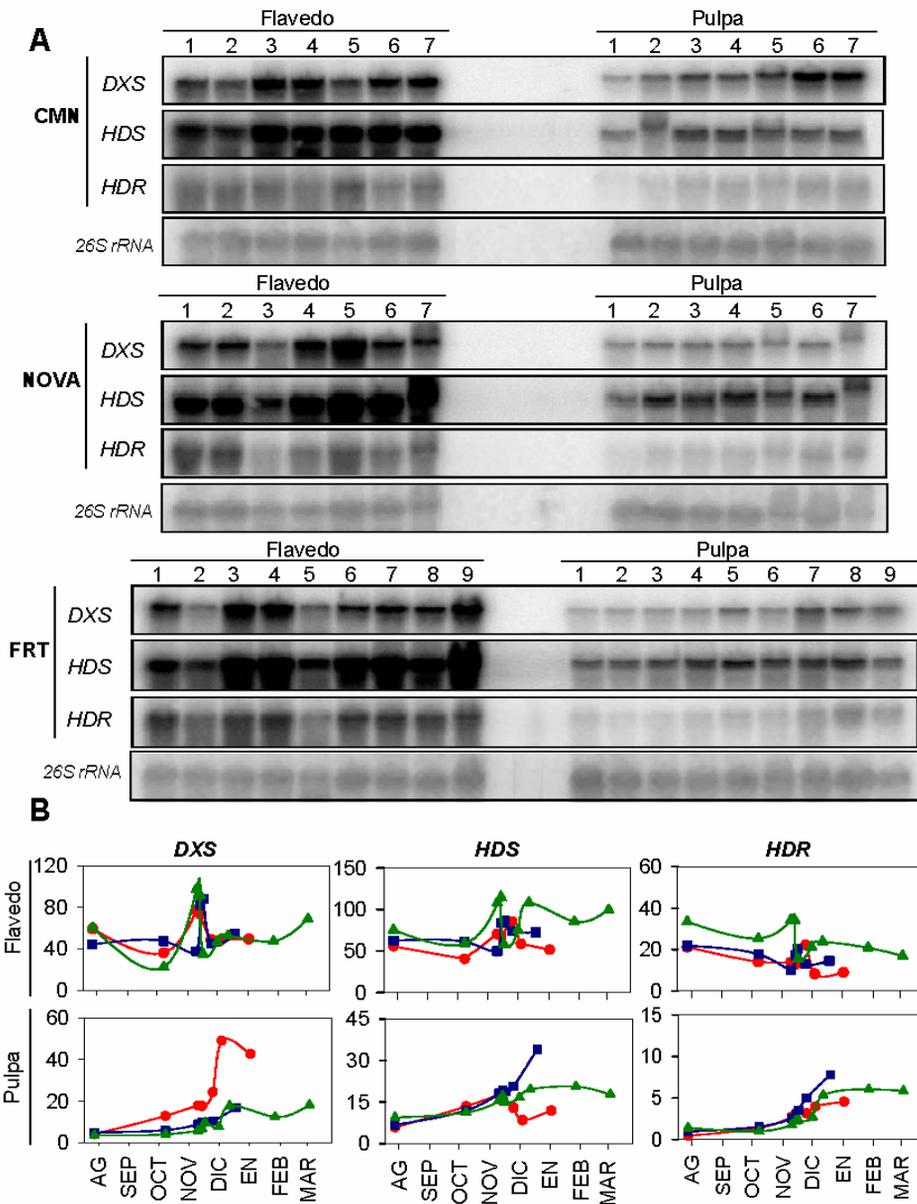


Figura 49: A, Evolución de la acumulación de mRNAs correspondientes a tres genes de la ruta MEP (*DXS*, *HDS* y *HDR*) en el flavedo y la pulpa de frutos de las mandarinas ‘Clemenules’ (●), ‘Nova’ (■) y ‘Fortune’ (▲) durante el desarrollo y la maduración del fruto. Se utilizaron para cada carrera 12 µg de RNA total procedente de frutos recién cosechados. B, Evolución del valor correspondiente a la intensidad de la señal de hibridación. Para cada uno de los genes analizados la intensidad de la señal de hibridación fue cuantificada y normalizada respecto a de la sonda 26S rRNA de *Citrus sinensis*. En el eje de ordenadas se indican los valores de intensidad relativa.

El nivel de expresión del gen *DXS* fue muy similar en la pulpa de las mandarinas 'Nova' y 'Fortune', cuantificándose en estas dos variedades hasta 6 veces menos intensidad de señal de hibridación que en la pulpa de la mandarina 'Clemenules' (Figura 49B). Los niveles de expresión de los genes *HDS* y *HDR* fueron, hasta el momento del viraje de color del flavedo (estadio 4), muy similares en la pulpa de las tres variedades de mandarina. Posteriormente, la acumulación de los correspondientes transcritos fue superior en 'Nova', 'Fortune' y, por último 'Clemenules' (Figura 49B).

#### b) Análisis de la expresión de genes implicados en la biosíntesis de carotenos lineales

En el flavedo de las tres variedades de mandarina estudiadas el nivel de expresión de los genes *PSY*, *PDS*, *ZDS* y *PTOX* fue similar, manteniéndose relativamente constante durante los estadios verdes y aumentando durante el desarrollo y la maduración de los frutos (Figura 50). En el flavedo de la mandarina 'Clemenules' el nivel de expresión de los genes investigados fue máximo antes de que el flavedo alcanzara la plena coloración (*PSY*, *ZDS*) o, en el flavedo de frutos totalmente coloreados (*PDS*, *PTOX*). En el flavedo de la mandarina 'Nova' los niveles de expresión de *PSY*, *PDS*, *ZDS* y *PTOX* alcanzaron su máximo en el flavedo de frutos coloreados de finales de noviembre (*PDS* y *ZDS*) o en el flavedo de frutos totalmente coloreados (*PSY*, *PTOX*) (Figura 50). En el flavedo de la mandarina 'Fortune' la acumulación de los transcritos correspondientes a *PSY*, *PDS*, *ZDS* y *PTOX*, sufrió un descenso transitorio en el estadio 5 y aumentó a continuación, alcanzando su máximo antes de que el fruto alcanzara la plena coloración (estadio 7) y disminuyendo posteriormente (Figura 50).

En general, el nivel de expresión de los genes *PSY*, *PDS*, *ZDS* y *PTOX*, en la pulpa de las tres mandarinas fue inferior al detectado en el flavedo (Figura 50). Sin embargo, en la pulpa de la mandarina 'Nova', la acumulación de transcritos a principios de noviembre (estadios 3 y 4) fue muy similar a la detectada en el flavedo (Figura 50). En la pulpa de frutos verde-inmaduro (estadio 1) de las tres variedades de mandarina el nivel de expresión de los genes *PSY*, *PDS*, *ZDS* y *PTOX* fue bajo y aumentó a partir del estadio verde-maduro (estadio 2) (Figura 50).

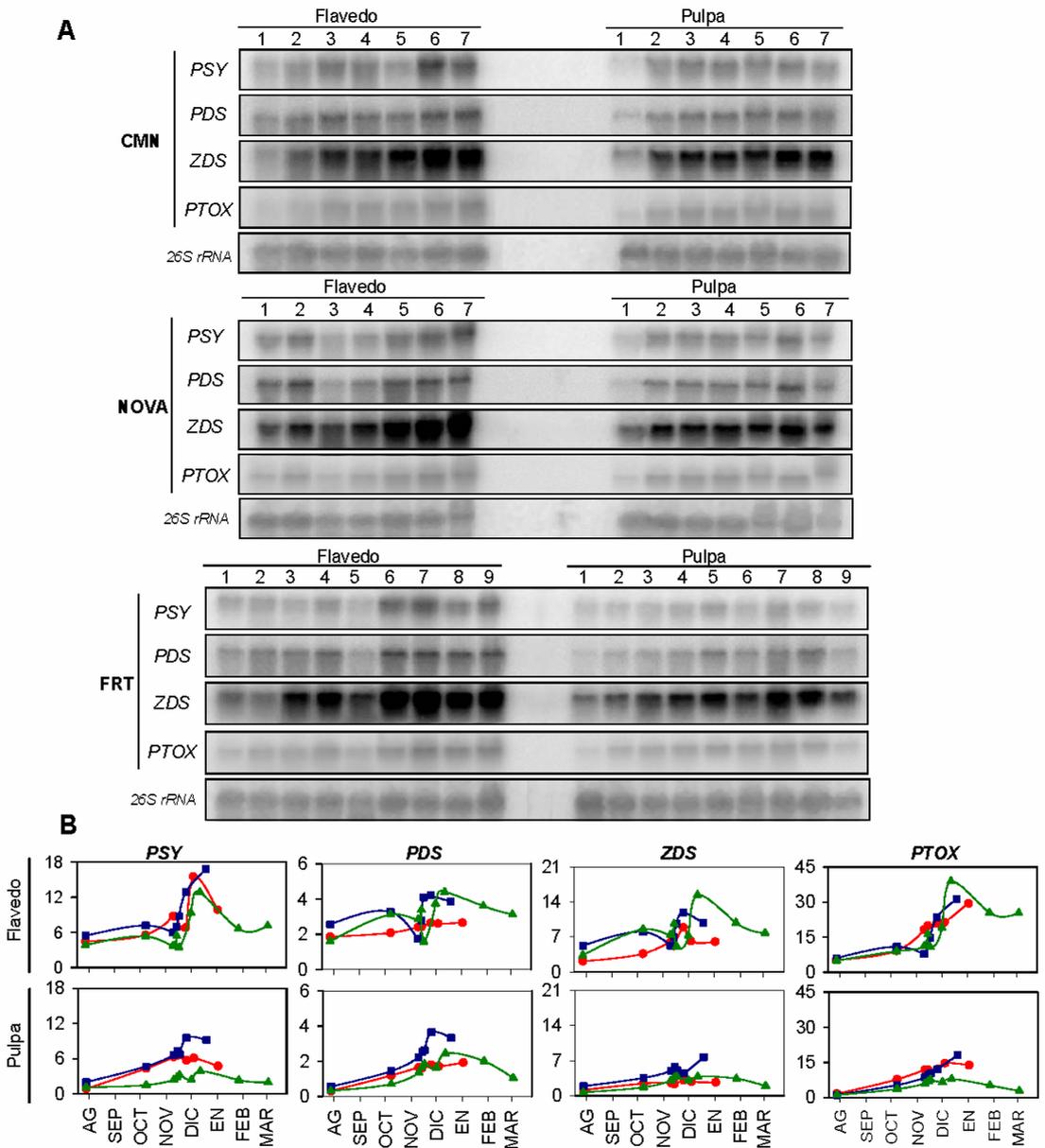


Figura 50: A, Evolución de la acumulación de mRNAs correspondientes a genes implicados en la síntesis de carotenos lineales (*PSY*, *PDS*, *ZDS* y *PTOX*) en el flavedo y la pulpa de frutos de las mandarinas `Clemenules` (●), `Nova` (■) y `Fortune` (▲) durante el desarrollo y la maduración del fruto. Se utilizaron para cada carrera 12 µg de RNA total procedente de frutos recién cosechados. B, Evolución del valor correspondiente a la intensidad de la señal de hibridación. Para cada uno de los genes analizados la intensidad de la señal de hibridación fue cuantificada y normalizada respecto al de la sonda 26S rRNA de *Citrus sinensis*. En el eje de ordenadas se indican los valores de intensidad relativa.

### c) Análisis de la expresión de genes implicados en la ciclación del licopeno

En el flavedo de las tres variedades de mandarina la expresión de  $\beta$ -*LCY1* y  $\beta$ -*LCY2* aumentó durante el desarrollo y la maduración del fruto (Figura 51). En los flavedos de 'Clemenules', 'Nova' y 'Fortune' los transcritos correspondientes a  $\beta$ -*LCY1* se detectaron desde el estadio verde-inmaduro (estadio 1) y, en general, su acumulación se mantuvo relativamente constante hasta el momento de viraje del color del flavedo (estadio 4) (Figura 51). A continuación, la acumulación de mRNAs correspondientes a  $\beta$ -*LCY1* aumentó en el flavedo de las tres variedades y alcanzó el máximo en el mes de diciembre, disminuyendo en el flavedo de las variedades 'Clemenules' y 'Fortune' durante el resto de la maduración (Figura 51). La señal de hibridación correspondiente a  $\beta$ -*LCY2* se detectó a partir del estadio verde-maduro (estadio 2) en los flavedos de 'Clemenules', 'Nova' y 'Fortune' (Figura 51) y aumentó a partir del viraje de color del flavedo (estadio 4), alcanzando su máximo en el estadio 7, correspondiente en las mandarinas 'Clemenules' y 'Nova' a frutos totalmente coloreados. En el flavedo de la mandarina 'Fortune' el nivel de expresión de  $\beta$ -*LCY2* disminuyó durante el final de la maduración (Figura 51). Destaca el alto nivel de expresión de los genes  $\beta$ -*LCY1* y  $\beta$ -*LCY2* en el flavedo de frutos totalmente coloreados de la mandarina 'Nova' (estadio 7). La acumulación del mRNA correspondiente al gen  $\epsilon$ -*LCY* en el flavedo de las tres mandarinas fue máxima en frutos verde-inmaduro (estadio 1) y disminuyó durante el desarrollo del fruto, siendo prácticamente indetectable a partir del momento del viraje de color del flavedo (estadio 4) (Figura 51).

En la pulpa de frutos verde-inmaduro (estadio 1) de las mandarinas 'Clemenules', 'Nova' y 'Fortune', los niveles de expresión de  $\beta$ -*LCY1* fueron muy bajos, aumentaron a partir del estadio verde-maduro (estadio 2) y permanecieron relativamente constantes durante el resto de la maduración (Figura 51). En el caso de  $\beta$ -*LCY2* los transcritos se detectaron en la pulpa a partir del estadio verde-maduro (estadio 2) y su acumulación aumentó durante la maduración de los frutos de 'Clemenules' y 'Nova', mientras que en la mandarina 'Fortune' se mantuvo relativamente constante. Es interesante mencionar que el nivel de expresión de  $\beta$ -*LCY2* en las pulpas de las mandarinas 'Clemenules' y 'Nova' fue, hasta el estadio 5, superior al existente en el flavedo (Figura 51). Los transcritos correspondientes a  $\epsilon$ -*LCY* fueron, en la pulpa de las tres variedades, prácticamente indetectables durante todo el proceso de desarrollo y maduración de los frutos (Figura 51).

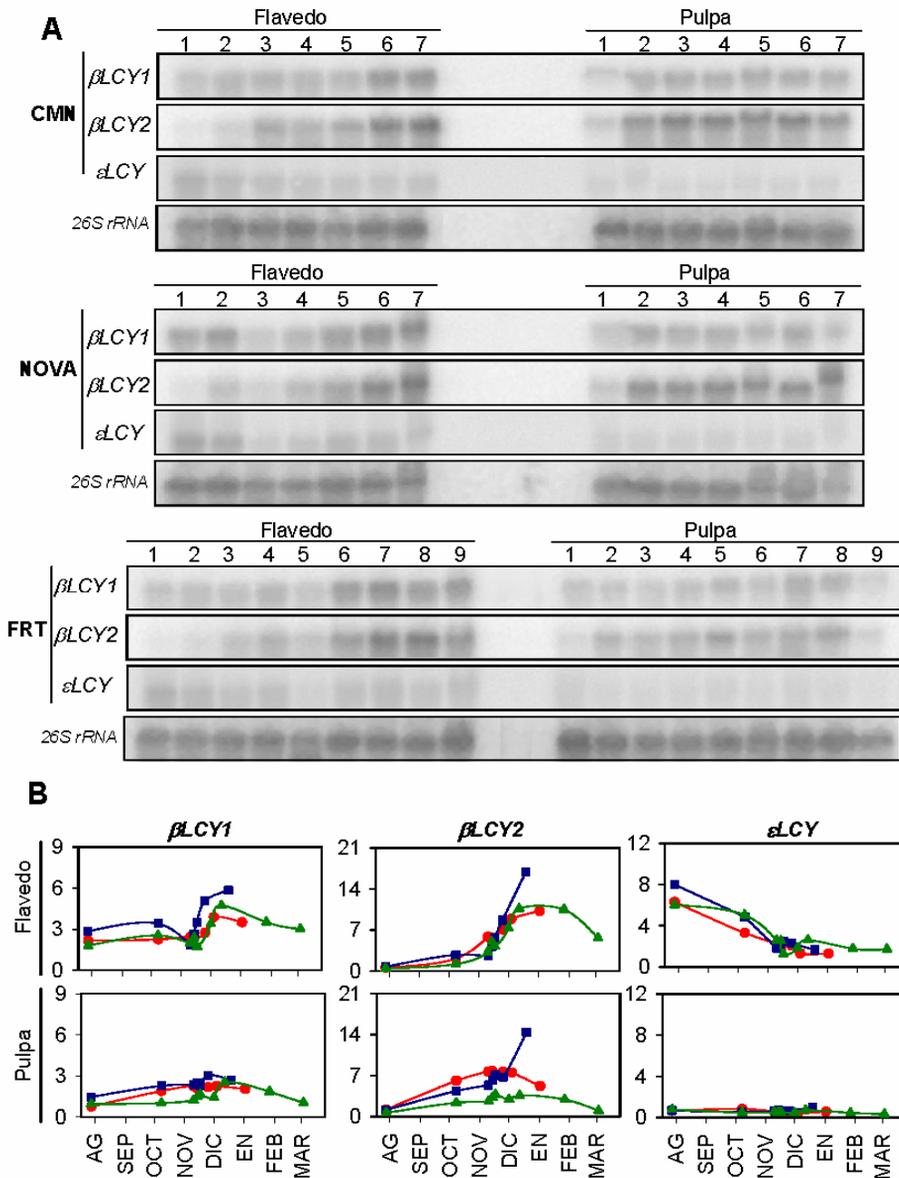


Figura 51: A, Evolución de la acumulación de mRNAs correspondientes a genes implicados en la ciclación de licopeno ( $\beta$ -LCY1,  $\beta$ -LCY2 y  $\epsilon$ -LCY) en el flavedo y la pulpa de frutos de las mandarinas 'Clemenules' (●), 'Nova' (■) y 'Fortune' (▲) durante el desarrollo y la maduración del fruto. Se utilizaron para cada carrera 12  $\mu$ g de RNA total procedente de frutos recién cosechados. B, Evolución del valor correspondiente a la intensidad de la señal de hibridación. Para cada uno de los genes analizados la intensidad de la señal de hibridación fue cuantificada y normalizada respecto al de la sonda 26S rRNA de *Citrus sinensis*. En el eje de ordenadas se indican los valores de intensidad relativa.

#### d) Análisis de la expresión de genes implicados en la biosíntesis de xantofilas

Cada uno de los genes estudiados presentó durante el desarrollo y la maduración de los frutos un patrón de expresión característico, aunque similar, en el flavedo de las tres mandarinas (Figura 52). La acumulación de los transcritos de  $\beta$ -CHX aumentó, alcanzando su máximo en el flavedo de frutos totalmente coloreados ('Nova') o antes de que el flavedo adquiriera la plena coloración ('Clemenules' y 'Fortune') (Figura 52). El nivel de expresión de  $\varepsilon$ -CHX disminuyó en el flavedo de las tres variedades a lo largo del desarrollo y la maduración de los frutos (Figura 52). A partir del estadio 2 el nivel de expresión de ZEP se mantuvo prácticamente constante en las tres variedades, con un aumento y un descenso transitorio a mediados de noviembre en los flavedos de 'Clemenules' y 'Fortune', respectivamente (Figura 52).

En la pulpa de las mandarinas 'Clemenules', 'Nova' y 'Fortune' la expresión de  $\beta$ -CHX,  $\varepsilon$ -CHX y ZEP fue menor que la detectada en el flavedo (Figura 52). El nivel de expresión de los genes  $\beta$ -CHX y ZEP aumentó durante el desarrollo y la maduración y disminuyó en los últimos estadios en la pulpa de las tres variedades estudiadas (Figura 52). El nivel de expresión de  $\varepsilon$ -CHX fue prácticamente constante durante el desarrollo y la maduración de los frutos de 'Clemenules', 'Nova' y 'Fortune'.

En resumen, los patrones de expresión de los genes MEP fueron, en general, ligeramente diferentes en el flavedo de cada una de las tres mandarinas, aunque no se detectaron diferencias importantes del nivel de expresión. Sin embargo en la pulpa, donde los genes MEP presentaron patrones similares de expresión, se detectaron diferencias importantes del nivel de expresión entre variedades. La acumulación de transcritos correspondientes a DXS en 'Clemenules' fue muy superior a la de 'Nova' y 'Fortune', mientras que el nivel de expresión de HDS y HDR fue máximo en 'Nova' (Figura 49). En cuanto a los genes de biosíntesis de carotenoides, en líneas generales, no se detectaron diferencias importantes del nivel ni del patrón de expresión entre los tejidos de 'Clemenules', 'Nova' y 'Fortune'. Durante el desarrollo y la maduración de los frutos de las tres mandarinas se observó aumento del nivel de expresión de los genes iniciales de la ruta (PSY, PDS, ZDS, PTOX; Figura 50) y de aquellos implicados en la síntesis de  $\beta$ -caroteno y  $\beta$ , $\beta$ -xantofilas ( $\beta$ -LCY1,  $\beta$ -LCY2,  $\beta$ -CHX y ZEP; Figura 51 y Figura 52), mientras que la expresión de genes específicos de la rama  $\beta$ , $\varepsilon$ - disminuyó en el flavedo y fue poco o nada detectable en la pulpa ( $\varepsilon$ -LCY y  $\varepsilon$ -CHX).

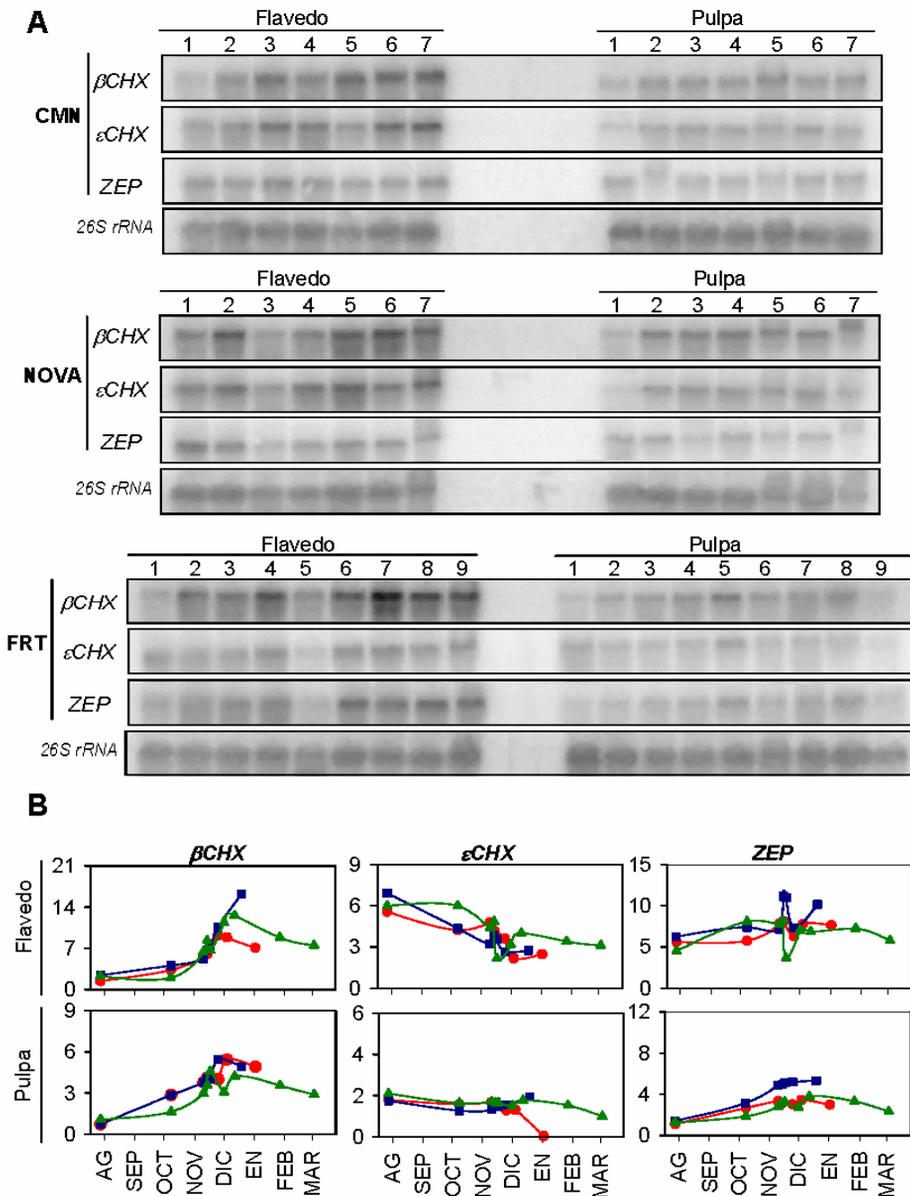


Figura 52: A, Evolución de la acumulación de mRNAs correspondientes a genes implicados en la síntesis de xantofilas ( $\beta$ -CHX,  $\epsilon$ -CHX y ZEP) en el flavedo y la pulpa de frutos de las mandarinas 'Clemenules' (●), 'Nova' (■) y 'Fortune' (▲) durante el desarrollo y la maduración del fruto. Se utilizaron para cada carrera 12  $\mu$ g de RNA total procedente de frutos recién cosechados. B, Evolución del valor correspondiente a la intensidad de la señal de hibridación. Para cada uno de los genes analizados la intensidad de la señal de hibridación fue cuantificada y normalizada respecto al de la sonda 26S rRNA de *Citrus sinensis*. En el eje de ordenadas se indican los valores de intensidad relativa.







## DISCUSIÓN

### 1. Aislamiento y caracterización funcional de genes correspondientes a licopeno ciclasas de *Citrus sinensis*

La ciclación del licopeno es un paso clave en la síntesis y en la regulación de la composición de carotenoides en plantas (Cunningham 2002; Bouvier *et al.* 2005). En función de la enzima que actúe pueden producirse dos tipos de anillos en los extremos de la molécula de licopeno. La enzima  $\beta$ -LCY cataliza la introducción de dos anillos  $\beta$ -, mientras que  $\varepsilon$ -LCY cataliza la introducción de un anillo  $\varepsilon$ -. Generalmente, la enzima  $\varepsilon$ -LCY únicamente puede actuar sobre uno de los extremos del licopeno, generando  $\delta$ -caroteno, mientras que  $\beta$ -LCY puede actuar sobre los dos extremos de la molécula o sobre el extremo lineal del  $\delta$ -caroteno, produciendo  $\beta$ - y  $\alpha$ -caroteno, respectivamente. Solamente en algunas especies de lechuga (*Lactuca sativa*) se ha descrito la existencia de una  $\varepsilon$ -LCY capaz de introducir dos anillos  $\varepsilon$ - en ambos extremos de la molécula de licopeno, generándose lactucaxantina (Cunningham y Gantt 2001).

En el momento de iniciarse esta Tesis doctoral se había descrito en cítricos la existencia de dos genes *LCYs* que se expresaban tanto en hojas como en frutos: un gen  $\varepsilon$ -*LCY*, cuya expresión se reduce durante el desarrollo y la maduración del fruto y un gen  $\beta$ -*LCY*, cuya expresión es constitutiva en frutos (Kato *et al.* 2004; Rodrigo *et al.* 2004). Sin embargo, únicamente se disponía de las secuencias parciales de estos genes y la actividad de las proteínas correspondientes no había sido comprobada. En otros frutos existen dos genes que codifican  $\beta$ -*LCYs* funcionales:  $\beta$ -*LCY* y *B* (*S1 $\beta$ -LCY2*) en tomate y  $\beta$ -*LCY* y *CCS* en pimiento (Hugueney *et al.* 1995; Bouvier *et al.* 1997; Ronen *et al.* 2000). Tanto en tomate como en pimiento uno de los genes  $\beta$ -*LCY* se expresa en tejidos cloro- y cromoplásticos ( $\beta$ -*LCY*), mientras que el otro (*B* y *CCS*) presenta una expresión específica de tejido cromoplástico (Deruere *et al.* 1994; Hugueney *et al.* 1995; Ronen *et al.* 2000). En este trabajo se han aislado las secuencias codificantes completas de tres licopeno ciclasas, dos correspondientes a  $\beta$ -*LCYs* (*Cs $\beta$ -LCY1* y *Cs $\beta$ -LCY2*) y una  $\varepsilon$ -*LCY* a partir de material vegetal de *C. sinensis* ('Navel') y, mediante ensayos de expresión heteróloga en *E.coli*, se ha comprobado la funcionalidad de las correspondientes enzimas.

La secuencia proteica de *Cs $\beta$ -LCY1* fue entre un 75% y un 90% idéntica a las de  $\beta$ -*LCYs* de otras plantas identificadas hasta la fecha (Anexo I) y presentó en el extremo amino-terminal un péptido señal de importación a plastidios

(Figura 12). Este tipo de señales de importación se encuentran en todas las enzimas implicadas en la biosíntesis de carotenoides en plantas (Fraser y Bramley 2004; Bouvier *et al.* 2005; Howitt y Pogson 2006; DellaPenna y Pogson 2006; Sandmann *et al.* 2006) y, en el caso concreto de las  $\beta$ -LCYs, suele encontrarse en los primeros 50-100 aminoácidos de la secuencia (Hugueney *et al.* 1995; Krubasik y Sandmann 2000). Estos resultados concuerdan con los primeros datos relativos a la localización subcelular de la  $\beta$ -LCY aislada de frutos cítricos, en los que se describe su importación a cloroplastos (Inoue *et al.* 2006). Esta señal de importación a plastos, que no se encuentra en  $\beta$ -LCYs de bacterias ni de cianobacterias (Hugueney *et al.* 1995), no parece esencial para la actividad catalítica  $\beta$ -LCY (Cunningham *et al.* 1996). Sin embargo, incluido en esta señal se localiza un motivo muy conservado, marcado en la Figura 12 como 'región conservada en  $\beta$ -LCYs', que se ha propuesto como determinante para la asociación de estas proteínas a la membrana (Hugueney *et al.* 1995), que es un requisito indispensable para la correcta actividad catalítica (Beyer *et al.* 1991). En la secuencia de Cs $\beta$ -LCY1 se identificó un motivo de unión a dinucleótido (Figura 12), conservado en  $\beta$ -LCYs vegetales y bacterianas. En la secuencia de Cs $\beta$ -LCY1 se identificaron también diversos motivos (CMI, CMII y región cargada, en la Figura 12) altamente conservados en  $\beta$ -LCYs de plantas y cianobacterias, y moderadamente conservados en  $\beta$ -LCYs de bacterias. Además, también se encontró un 'motivo  $\beta$ -ciclasa' altamente conservado en  $\beta$ -LCYs de plantas, incluso en aquellas cuya actividad en ensayos de expresión heteróloga es reducida, como Sl $\beta$ -LCY2 (B) y CaCCS (Anexo I). Estas regiones podrían constituir dominios implicados en la interacción enzima-sustrato y/o en la catálisis (Hugueney *et al.* 1995; Cunningham *et al.* 1996; Bouvier *et al.* 1997). Según estudios previos, las  $\beta$ -LCYs de plantas poseen hélices  $\alpha$  con localización transmembrana (Hugueney *et al.* 1995; Cunningham *et al.* 1996). Sin embargo, y de acuerdo con los resultados de Inoue *et al.* (2006), el paquete informático TMHMM no predice localización transmembrana de ninguna de las hélices  $\alpha$  del extremo carboxi-terminal de Cs $\beta$ -LCY1 (Figura 13). Esta ausencia de hélices transmembrana sugiere que la enzima Cs $\beta$ -LCY1 no se encuentra anclada a la membrana y concuerda con los datos que indican que la asociación de  $\beta$ -LCY de mandarina Satsuma a la membrana es periférica (Inoue *et al.* 2006).

La secuencia proteica de  $\varepsilon$ -LCY aislada a partir de naranja 'Navel' presentó una identidad del 66-74% con otras  $\varepsilon$ -LCYs (Anexo I) y próxima al 30% con  $\beta$ -LCYs de otras plantas. Pese a la baja identidad de secuencia existente

entre  $\beta$ - y  $\varepsilon$ -LCYs, ambos tipos de enzimas presentan residuos conservados, el 44% de ellos localizados en motivos señalados como característicos de LCYs (Figura 12). La similitud entre  $\beta$ -LCYs y  $\varepsilon$ -LCYs en los motivos de unión a dinucleótido, MCI, MCII y en la región cargada ya había sido descrita con anterioridad (Krubasik y Sandmann 2000). Destacan la serie de aminoácidos NNYGVW-DE (marcados en rosa en la Figura 12 y la Figura 21), totalmente conservada en los dos tipos de LCYs, y cuya búsqueda de homologías en bases de datos revela que únicamente está presente en  $\beta$ - y  $\varepsilon$ -LCYs, sugiriendo que puede desempeñar un papel fundamental en la determinación de la actividad ciclasa. Al igual que en el caso de las  $\beta$ -LCYs y  $\varepsilon$ -LCYs estudiadas hasta la fecha (Cunningham *et al.* 1996; Cunningham y Gantt 2001) se predice la localización de  $Cs\varepsilon$ -LCY en plastos (Figura 21), como recientemente ha sido demostrado (Inoue *et al.* 2006). De acuerdo con los resultados de Inoue *et al.* (2006), que describen una fuerte asociación de la  $\varepsilon$ -LCY de mandarina Satsuma a la membrana, en el extremo carboxi-terminal de  $Cs\varepsilon$ -LCY se predice la formación de una estructura hélice  $\alpha$  con localización transmembrana (Figura 21). Dado que la ausencia del extremo carboxi-terminal de  $\varepsilon$ -LCY conduce a una carencia de actividad (Cunningham y Gantt 2001) puede que la unión a la membrana de esta enzima sea un requisito fundamental para su fucionalidad, al igual que sucede en otras enzimas implicadas en la biosíntesis de carotenoides como PSY (Schledz *et al.* 1996; Welsch *et al.* 2000), y PDS (al Babili *et al.* 1996; Bonk *et al.* 1997). Adicionalmente, en este extremo se localiza un motivo implicado en la determinación del número de anillos  $\varepsilon$ - que son introducidos en la molécula de licopeno (Cunningham y Gantt 2001). En  $Cs\varepsilon$ -LCY se identificó el motivo que determina actividad  $\varepsilon$ -monociclasa (ALILQV, Figura 21). El motivo que determina actividad  $\varepsilon$ -biciclasa (SHIVLM) únicamente ha sido identificado en la enzima  $\varepsilon$ -LCY de lechuga, que es la única planta en la que se ha descrito la acumulación de  $\varepsilon$ -caroteno, resultante de la  $\varepsilon$ -ciclación de los dos extremos de la molécula de licopeno. Dado que las enzimas LCYs parecen encontrarse formando dímeros (Figura 8) la capacidad mono- o biciclasa de  $\varepsilon$ -LCY podría estar condicionada por su capacidad para acomplejarse consigo misma.

La actividad licopeno ciclasa de las proteínas  $\beta$ -LCY1 y  $\varepsilon$ -LCY aisladas de *C. sinensis* se evaluó mediante ensayos de expresión heteróloga en una cepa de *E. coli* productora de licopeno. La expresión de *Cs $\beta$ -LCY1* y *Cs $\varepsilon$ -LCY* en esta cepa de *E. coli* produjo un cambio en la coloración de las colonias, de rosado a amarillo y a amarillo pálido, respectivamente, indicando que ambos genes codifican

enzimas capaces de convertir el licopeno en otro carotenoide (Figura 18 y Figura 22). En el análisis de los carotenoides presentes en los cultivos bacterianos expresando *Csβ-LCY1* se detectó  $\beta$ -caroteno y no se detectó  $\gamma$ -caroteno, que resultaría de la  $\beta$ -ciclación de un único extremo del licopeno (Figura 19), indicando que *Csβ-LCY1* codifica una enzima con actividad licopeno  $\beta$ -biciclasa. Sin embargo, en los cultivos bacterianos expresando *Csε-LCY* se detectó  $\delta$ -caroteno, resultante de la introducción de un anillo  $\varepsilon$ - en un único extremo de la molécula de licopeno y no se detectó  $\varepsilon$ -caroteno, que resultaría de la  $\varepsilon$ -ciclación de los dos extremos de la molécula (Figura 22), indicando que *Csε-LCY* codifica una licopeno  $\varepsilon$ -monociclasa.

Con el fin de determinar si en frutos cítricos existe un ortólogo al gen *B* de tomate (*Slβ-LCY2*), que codifica una  $\beta$ -LCY específica de tejido cromoplástico, se realizó una búsqueda de secuencias con homología en las bases de datos, y se identificó un gen de *C. sinensis* que codifica una proteína (*Csβ-LCY2*) 53% idéntica a *Csβ-LCY1* (Figura 12). Los motivos descritos como característicos de  $\beta$ -LCYs se encuentran altamente conservados en *Csβ-LCY2* (Figura 12). Mediante ensayos de expresión heteróloga de *Csβ-LCY2* en la cepa de *E.coli* productora de licopeno, se confirmó que este gen codifica una enzima capaz de ciclar el licopeno a  $\beta$ -caroteno, aunque su actividad en estos ensayos fue casi 2.5 veces menor que la de *Csβ-LCY1* en las mismas condiciones experimentales (Figura 19). La diferencia de actividad entre *Csβ-LCY1* y *Csβ-LCY2* podría explicarse por cambios de aminoácidos en algunos de los motivos conservados en las  $\beta$ -LCYs (Figura 12). Por ejemplo, en la 'región conservada en  $\beta$ -LCYs', la conservación de la secuencia en *Csβ-LCY2* es parcial, siendo éste un motivo importante para la asociación de estas proteínas a la membrana y su correcta funcionalidad (Beyer *et al.* 1991; Huguene *et al.* 1995). Además, la conservación de este motivo también es parcial en *Slβ-LCY2* y *CaCCS* (Anexo I), que sólo son capaces de ciclar entre el 10 y el 20% del licopeno a  $\beta$ -caroteno en ensayos funcionales (Huguene *et al.* 1995; Ronen *et al.* 2000). Por otro lado, las sustituciones de aminoácidos que existen en el motivo de unión a dinucleótido en la secuencia de *Csβ-LCY2* también se encuentran altamente conservadas en *Slβ-LCY2* y *CaCCS* (Anexo I). Pese a que los citados cambios de aminoácidos no parecen alterar la estructura secundaria característica lámina  $\beta$ / hélice  $\alpha$ / lámina  $\beta$  del bolsillo de unión a NADH (Figura 13), podrían afectar a la actividad. Por último, los cambios existentes en el motivo  $\beta$ -ciclasa también podrían explicar las diferencias de actividad entre ambas  $\beta$ -LCYs si, al igual que sucede en  $\varepsilon$ -LCYs, el extremo

carboxi-terminal fuera esencial para una correcta actividad catalítica (Cunningham y Gantt 2001).

Cabe resaltar que, dado que el citoplasma de *E.coli* es bioquímicamente similar a los plastidios (Gallagher *et al.* 2003), los ensayos de expresión heteróloga en *E.coli* son un buen sistema para evaluar la actividad licopeno ciclasa de proteínas de plantas, como ya se ha comprobado con anterioridad (Cunningham *et al.* 1993; Hugueney *et al.* 1995; Cunningham *et al.* 1996; Pecker *et al.* 1996; Ronen *et al.* 1999; Ronen *et al.* 2000; Bouvier *et al.* 2000; Cunningham y Gantt 2001; Inoue *et al.* 2006). Sin embargo, en este sistema experimental las enzimas no son ensambladas, procesadas ni modificadas transcripcionalmente del mismo modo en que lo serían en las células vegetales. Adicionalmente, existen una serie de factores que influyen claramente en los ensayos funcionales en *E.coli*, como el plásmido utilizado para la expresión heteróloga, la temperatura de crecimiento de los cultivos y el tiempo de incubación (datos no mostrados), el plásmido utilizado para generar una cepa de *E.coli* productora de carotenoides e incluso la cepa de *E.coli* (Wurtzel *et al.* 1997). En el caso concreto de  $\beta$ -LCY1 y  $\epsilon$ -LCY de *C. sinensis*, nuestros ensayos indicaron eficacias de conversión de licopeno próximas al 96 y al 57%, respectivamente (Figura 19 y Figura 22), mientras que las enzimas  $\beta$ -LCY1 y  $\epsilon$ -LCY de mandarina Satsuma, que son 99 y 100% idénticas a las de *C. sinensis*, presentaron en los ensayos de expresión heteróloga realizados por Inoue *et al.* (2006) porcentajes de conversión del licopeno cercanos al 50 y al 100%, respectivamente. Las únicas diferencias entre ambos ensayos fueron la cepa de *E.coli* utilizada (XL1-Blue o DH5- $\alpha$ ) y el plásmido utilizado para dotarla de la capacidad de producir licopeno (pACCRT-EIB o pAC-LYC).

En resumen, la caracterización funcional realizada en este trabajo demuestra que los genes *Cs $\beta$ -LCY1*, *Cs $\beta$ -LCY2* y *Cs $\epsilon$ -LCY* codifican proteínas capaces de ciclar el licopeno (Figura 19 y Figura 22), aunque la eficiencia de conversión de licopeno *in vivo* de cada una de estas enzimas podría variar de la directamente cuantificada de los ensayos funcionales realizados.

Cada uno de los dos genes  $\beta$ -LCYs de naranja 'Navel' caracterizados en este estudio presentó un patrón de expresión característico durante el desarrollo y la maduración de los frutos. Mientras que el nivel de expresión de *Cs $\beta$ -LCY1* se mantuvo relativamente invariable, tanto en el flavedo como en la pulpa, la acumulación de transcritos de *Cs $\beta$ -LCY2* aumentó en ambos tejidos (Figura 15). Además, la expresión de *Cs $\beta$ -LCY2* se detectó en pétalos de flores y fue

prácticamente indetectable en el flavedo de frutos verde-inmaduro, en hojas, tallos y raíces, mientras que la expresión de *Cs $\beta$ -LCY1* se detectó en todos los tejidos analizados, incluyendo todos los estadios de desarrollo y maduración del fruto (Figura 15 y Figura 16). En otras variedades y especies de cítricos, la expresión del gen  *$\beta$ -LCY2* tampoco se detectó en el flavedo verde-inmaduro (Figura 31, Figura 40 y Figura 51). Estos resultados, que parecen indicar que la expresión del gen *Cs $\beta$ -LCY2* es específica de tejido cromoplástico, se confirman por los resultados obtenidos a partir del estudio de la expresión de  *$\beta$ -LCY2* 'in silico', utilizando las bases de datos de cítricos CFGP y HarvEST:Citrus (Tabla 14). Entre ambas bases de datos suman un total de 131 genotecas, de las que más de la mitad se generaron a partir de hojas, tallos y/o raíces de cítricos. El resto de las genotecas se generaron a partir de tejido reproductivo de frutos cítricos (ovarios, flores y frutos). En concordancia con los resultados obtenidos mediante análisis Northern, no se detectaron ESTs correspondientes a  *$\beta$ -LCY2* en ninguna genoteca generada a partir de hojas, tallos o raíces y tampoco en ninguna genoteca generada a partir de semillas. Más del 90% de los ESTs correspondientes a  *$\beta$ -LCY2* se identificaron en genotecas generadas a partir de tejidos de fruto maduro, de acuerdo con los mayores niveles de expresión de  *$\beta$ -LCY2* al final de la maduración. La única genoteca realizada a partir de tejido verde en la que se detectaron ESTs correspondientes a  *$\beta$ -LCY2* fue la preparada con mezcla de ovarios senescentes y frutos verdes tratados con GA<sub>3</sub>. Este resultado podría explicarse por la elevada producción de etileno que tiene lugar en ovarios senescentes (Gómez Cadenas *et al.* 2000; Katz *et al.* 2004) que estimularía la expresión de  *$\beta$ -LCY2*, tal y como sucede en la mayoría de los genes de la biosíntesis de carotenoides en frutos cítricos (Rodrigo y Zacarías 2006). Igualmente, muchos de los ESTs se detectaron en genotecas en las que en el tejido de partida se estaba produciendo etileno, como por ejemplo, frutos maduros almacenados en frío (Lafuente *et al.* 2003; Zacarías *et al.* 2003), infectados con *Penicillium* (Marcos *et al.* 2005) o sometidos a altas temperaturas (L. Zacarías, comunicación personal), o los pétalos durante su curvatura y la apertura de la flor (Zacarías *et al.* 1991).

La expresión específica de  *$\beta$ -LCY2* en tejido cromoplástico y su inducción por etileno concuerdan con motivos reguladores *cis* identificados en su secuencia promotora. La especificidad de expresión podría explicarse por la existencia de un motivo similar al descrito previamente en melón que dirige la expresión del gen *cucumis* al fruto (Yamagata *et al.* 2002), mientras que la inducción por

etileno se debería a la presencia de varios motivos de respuesta a etileno (Tabla 15). Adicionalmente, se localizó en la secuencia promotora de  $\beta$ -*LCY2* un motivo ATCTA en tándem, que ha sido descrito en las secuencias promotoras de los genes *DXS*, *HDR* y *PSY*, lo que sugiere un mecanismo de regulación común a todos ellos (Rodríguez Concepción 2006).

La existencia de dos genes que codifican  $\beta$ -LCYs, cada uno de ellos con un patrón de expresión característico, también ha sido descrita en otros frutos como tomate y pimiento. En tomate, el gen que codifica la  $\beta$ -LCY canónica ( $\beta$ -*LCY1*) se expresa en hojas y tejidos verdes del fruto, disminuyendo su expresión durante la maduración (Ronen *et al.* 2000; D'Ambrosio *et al.* 2004), mientras que el gen *B* (que codifica  $\beta$ -*LCY2*) se expresa de forma transitoria en frutos virando y no se detecta en hojas (Ronen *et al.* 2000). Los dos genes  $\beta$ -*LCYs* de tomate se expresan en las flores en una proporción similar (Ronen *et al.* 2000), al igual que *Cs* $\beta$ -*LCY1* y *Cs* $\beta$ -*LCY2* en pétalos del naranjo 'Navel' (Figura 16). En pimiento, el nivel de expresión del gen  $\beta$ -*LCY* es mayor en hojas que en frutos, en los que presenta un patrón de expresión constitutivo (Huguenev *et al.* 1995), mientras que el gen *CCS*, que codifica una enzima bifuncional (*CCS*/ $\beta$ -*LCY*), presenta una expresión específica de fruto y se induce durante la maduración (Bouvier *et al.* 1994). Las isoformas  $\beta$ -*LCY* específicas de tejido cromoplástico identificadas hasta la fecha en frutos, como la  $\beta$ -*LCY2* de tomate (Ronen *et al.* 2000) y la de naranja caracterizada en esta Tesis y *CCS* de pimiento (Huguenev *et al.* 1995) presentan multitud de similitudes. Los resultados obtenidos en este trabajo y por otros autores (J.X. Chaparro, Universidad de Florida, comunicación personal) parecen indicar que *Cs* $\beta$ -*LCY2* se encuentra en copia única en el genoma de los cítricos (Figura 17) y carece de intrones (apartado 4 del Capítulo I de Resultados). Los genes  $\beta$ -*LCY2* de tomate y *CCS* de pimiento también carecen de intrones y, al menos el primero, se encuentra en copia única (Deruere *et al.* 1994; Ronen *et al.* 2000). Por último, los tres genes (*Cs* $\beta$ -*LCY2*, *Sl* $\beta$ -*LCY2* y *CaCCS*) codifican proteínas que tienen, en ensayos de expresión heteróloga en *E.coli*, menor actividad que la  $\beta$ -*LCY* canónica (Huguenev *et al.* 1995; Ronen *et al.* 2000; Figura 19). Además, las tres proteínas presentaron una relación filogenética más estrecha entre ellas que con las  $\beta$ -*LCYs* canónicas correspondientes, y formaron un grupo separado (Figura 14). En el mismo grupo filogenético de *Cs* $\beta$ -*LCY2*, *Sl* $\beta$ -*LCY2* y *CaCCS* se engloban también las *NSY* de tomate y patata indicando un origen común de los genes  $\beta$ -*LCY*, *CCS* y *NSY* (al Babili *et al.* 2000; Krubasik y Sandmann 2000), que codifican enzimas con un mecanismo de reacción muy

similar (Bouvier *et al.* 1997; Bouvier *et al.* 2000; al Babili *et al.* 2000). De hecho,  $\beta$ -LCY cataliza una versión simplificada de las reacciones catalizadas por NSY y CCS, lo que sugiere que estas dos últimas enzimas se pudieron originar a partir de  $\beta$ -LCY durante la evolución de las plantas superiores para dar lugar a nuevos carotenoides oxigenados (Bouvier *et al.* 2000). Otras evidencias que indican que NSY y CCS se originaron a partir de una duplicación génica de  $\beta$ -LCY es que en las cianobacterias, los supuestos progenitores de los plastidios, no existen NSY ni CCS, pero sí  $\beta$ -LCY (Bouvier *et al.* 2000; Krubasik y Sandmann 2000).

Los resultados de esta Tesis indican que en frutos cítricos existen dos alelos del gen  $\beta$ -LCY2:  $\beta$ -LCY2a y  $\beta$ -LCY2b. La presencia de ambos alelos se ha detectado en las tres especies analizadas: *C. sinensis*, *C. paradisi* (Figura 24) y *C. clementina* (Tabla 14). Ambos alelos codifican proteínas 96% idénticas (Tabla 12) que, sin embargo, difieren en su actividad en ensayos de expresión heteróloga en *E. coli*. Mientras que  $\beta$ -LCY2a codifica una proteína capaz de ciclar el licopeno a  $\beta$ -caroteno (Figura 19), el alelo  $\beta$ -LCY2b, aislado originalmente a partir de *C. paradisi*, codifica una proteína que, en las mismas condiciones experimentales, prácticamente carece de actividad  $\beta$ -LCY (Figura 23). Como se ha mencionado anteriormente, el nivel de actividad licopeno ciclasa en estos ensayos no corresponde necesariamente con el nivel de actividad *in vivo*. Por tanto, una posibilidad sería que el alelo  $\beta$ -LCY2b codificase una proteína con actividad  $\beta$ -LCY *in vivo* y que en *E. coli* existiese algún factor que imposibilitara su actividad. Sin embargo, tanto  $\beta$ -LCY1, como  $\beta$ -LCY2a y  $\varepsilon$ -LCY codifican enzimas con actividad LCY en los ensayos de expresión heteróloga en *E. coli*. Por tanto, dado que todos los ensayos se realizaron en las mismas condiciones experimentales, lo más probable es que la ausencia de actividad de  $\beta$ -LCY2b en *E. coli* refleje la ausencia de actividad LCY de este enzima *in vivo*. La presencia de una isoforma  $\beta$ -LCY2 no funcional ha sido descrita en los mutantes *old gold* (*og*) y *old gold crimson* (*ogf*) de tomate, en los que prácticamente no se detecta  $\beta$ -caroteno. En la secuencia nucleotídica de  $\beta$ -LCY2 de los mutantes se ha producido una deleción (*og*) o una inserción (*ogf*) de uno o dos nucleótidos, respectivamente, que originan cambios en la pauta de lectura del gen y dan como resultado proteínas no funcionales (Ronen *et al.* 2000). Este no es el caso del alelo no funcional  $\beta$ -LCY2b de los cítricos, ya que codifica una secuencia peptídica del mismo tamaño que  $\beta$ -LCY2a y 96% idéntica. El alto grado de similitud existente en motivos conservados entre las secuencias proteicas de  $\beta$ -LCYs de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas e incluso entre enzimas con

reducida actividad licopeno ciclasa en ensayos de expresión heteróloga en *E. coli*, como CCS, Sl $\beta$ -LCY2 y Cs $\beta$ -LCY2a, y con enzimas  $\epsilon$ -LCY vegetales (Figura 12) sugiere que, incluso pequeñas alteraciones de la secuencia proteica pueden afectar la actividad catalítica LCY de estas enzimas. Un claro ejemplo es el descrito por Cunnigham y Gantt (2001), en el que el cambio de un único aminoácido de  $\epsilon$ -LCY determina la actividad mono o biciclasa de esta enzima e incluso la ausencia de actividad. En consecuencia, algunos de los 16 cambios de aminoácidos observados en la secuencia de  $\beta$ -LCY2b (Tabla 12) podrían ser los responsables de la ausencia de actividad  $\beta$ -LCY. De los cambios de aminoácidos identificados la mayor parte de ellos son conservativos (37.5%) o se localizan en posiciones de alta variabilidad entre las  $\beta$ -LCYs (43.7%). Sin embargo, destacan los cambios de las posiciones 67, 72 y 359, localizados en zonas altamente conservadas en  $\beta$ -LCYs (Figura 23). Los dos primeros (aa 67 y 72) se encuentran en una región del péptido señal conservada en todas las  $\beta$ -LCYs vegetales, mientras que el tercero (aa 359) se localiza en un motivo conservado incluso en algas fotosintéticas y algunas enterobacterias (CMII en Figura 12). Los cambios en las posiciones 67 (V $\rightarrow$ E) y 72 (D $\rightarrow$ V) suponen un cambio de polaridad del aminoácido, mientras que el cambio en la posición 359 de glicina a serina supone la introducción de una cadena alifática con un grupo alcohol. Por tanto, cualquiera de estos cambios podría alterar la estructura de la proteína o afectar directamente al centro activo. De hecho, el programa PSIPRED predice la formación de una estructura hélice  $\alpha$  entre los aminoácidos 55 y 61 de Cs $\beta$ -LCY2b (datos no mostrados) que no se predice en Cs $\beta$ -LCY2a (Figura 13). En frutos de tomate, además de  $\beta$ -LCY2, se ha identificado una proteína, 98% idéntica denominada SINSY (Anexo II), que carece de actividad  $\beta$ -LCY en ensayos de expresión heteróloga en *E. coli* (Bouvier *et al.* 2000). Los motivos descritos como característicos de  $\beta$ -LCYS se encuentran totalmente conservados entre las secuencias de Sl $\beta$ -LCY2 y SINSY, que únicamente difieren en cinco aminoácidos.

## 2. Estudio de las licopeno ciclasas en relación con la acumulación de licopeno y $\beta$ , $\beta$ -xantofilas en frutos cítricos.

El licopeno es un intermediario en la síntesis de carotenoides que conduce a las xantofilas, que son los carotenoides que normalmente se acumulan en mayor proporción en los frutos cítricos (Figura 2). Sin embargo, la presencia de licopeno en frutos cítricos es un fenómeno bastante inusual, lo que sugiere que la reacción de ciclación de licopeno debe ser muy eficiente y encontrarse

altamente regulada. La posibilidad más sencilla para explicar la acumulación de licopeno en determinados frutos cítricos sería una alteración en la capacidad de ciclación del licopeno, bien por mutaciones de los genes que codifican LCYs, alteraciones del patrón de expresión de los mismos y/o de la actividad de las enzimas correspondientes. Hasta la fecha, en frutos cítricos únicamente se ha descrito la acumulación de licopeno en pumelos (Gross 1987; Fanciullino *et al.* 2006; Xu *et al.* 2006), pomelos (Khan y Mackinney 1953; Ting y Deszyck 1958; Gross 1987; Rouseff *et al.* 1992; Lee 2000; Xu *et al.* 2006), dos variedades de naranja (Monselise y Halevy 1961; Lee 2001; Alquézar *et al.* 2005; Xu *et al.* 2006) y un limón (<http://www.citrusvariety.ucr.edu/citrus/lemons.html#pink>). Los escasos estudios en los que se ha analizado el contenido de licopeno en el flavedo y la pulpa de pumelos rojos (Gross 1987; Xu *et al.* 2006), pomelos rojos (Xu *et al.* 2006; Figura 36 y Figura 37) y naranjas que acumulan licopeno (Xu *et al.* 2006; Figura 28 y Figura 29) indican que las mayores concentraciones de licopeno se detectan en la pulpa. Considerando que la expresión del gen  $\epsilon$ -LCY en la pulpa de los cítricos es muy reducida o indetectable (Kato *et al.* 2004; Figura 31, Figura 40 y Figura 51) parece improbable que alteraciones de este gen, o de la enzima que codifica, puedan conducir a la acumulación de licopeno en este tejido. Por otro lado, mientras que la actividad  $\beta$ -LCY es esencial para la biosíntesis de  $\beta$ , $\beta$ - y  $\beta$ , $\epsilon$ -xantofilas, la actividad  $\epsilon$ -LCY únicamente se requiere para la biosíntesis de  $\beta$ , $\epsilon$ -xantofilas. En consecuencia, alteraciones de la actividad  $\epsilon$ -LCY conducirían a una disminución del contenido de  $\beta$ , $\epsilon$ -xantofilas, pero probablemente no a un aumento del contenido de licopeno, ya que sería rápidamente convertido en  $\beta$ -caroteno. Dicho efecto se observa en patatas transgénicas en las que la supresión de la actividad  $\epsilon$ -LCY aumenta el contenido en  $\beta$ -caroteno y  $\beta$ , $\beta$ -xantofilas (Diretto *et al.* 2006). En base a estas consideraciones, alteraciones en las enzimas  $\beta$ -LCYs podrían ser las principales responsables de la inusual acumulación de licopeno en frutos cítricos. Con el fin de estudiar esta hipótesis se aislaron y caracterizaron los genes  $\beta$ -LCYs de dos mutantes: la naranja 'Cara Cara', que acumula licopeno en la pulpa (Lee 2001; Alquézar *et al.* 2005; Xu *et al.* 2006), y el pomelo 'Star Ruby', que acumula licopeno en el flavedo y la pulpa (Xu *et al.* 2006; Figura 36 y Figura 37). Además, como control y referencia para todos los ensayos, se seleccionó una variedad de pomelo blanco ('Marsh') originada, al igual que el pomelo rojo 'Star Ruby', a partir de pomelo 'Duncan' (Gmitter 1993).

Los genes  $\beta$ -*LCY1* clonados a partir de las naranjas 'Navel' y 'Cara Cara', y de los pomelos 'Marsh' y 'Star Ruby' codifican proteínas de secuencia idéntica, con una capacidad de conversión de licopeno a  $\beta$ -caroteno en ensayos de expresión heteróloga en *E.coli* del  $88.14 \pm 9.11\%$  (Figura 19 y Tabla 11). Por otro lado, en los mutantes que acumulan licopeno el nivel de expresión de  $\beta$ -*LCY1* fue superior ('Cara Cara', Figura 33) o similar ('Star Ruby', Figura 40) al de la variedad parental. Por tanto, la acumulación de licopeno en la naranja 'Cara Cara' y el pomelo 'Star Ruby' no parece deberse a alteraciones de la expresión de  $\beta$ -*LCY1*, ni a una actividad defectuosa de la correspondiente proteína.

En las naranjas 'Navel' y 'Cara Cara' todos los cDNAs clonados de  $\beta$ -*LCY2* correspondieron al alelo  $\beta$ -*LCY2a*, que codifica una proteína con actividad  $\beta$ -LCY en ensayos de expresión heteróloga en *E.coli* (apartados 1.1, 1.4 y 3.2 del Capítulo I de Resultados), sugiriendo que en *C. sinensis* únicamente existe o se transcribe el alelo  $\beta$ -*LCY2a*. Adicionalmente, dado que la expresión de  $\beta$ -*LCY2* en naranja 'Cara Cara' es similar o superior a la de la variedad parental (Figura 33), podrían descartarse alteraciones de la expresión de  $\beta$ -*LCY2* como responsables de la acumulación de licopeno en 'Cara Cara'. Por otro lado, en los pomelos 'Marsh' y 'Star Ruby' todos los cDNAs de  $\beta$ -*LCY2* clonados correspondieron al alelo  $\beta$ -*LCY2b*, que codifica una proteína con muy poca o nula actividad  $\beta$ -LCY en ensayos de expresión heteróloga (apartado 3.2 del Capítulo I de Resultados), sugiriendo que en *C. paradisi* únicamente existe o se transcribe mayoritariamente el alelo  $\beta$ -*LCY2b*. El análisis de DNA genómico de *C. sinensis* y *C. paradisi* mostró que los dos alelos del gen  $\beta$ -*LCY2* se encuentran representados en el genoma de ambas especies (Figura 24). Sin embargo, al menos en la pulpa de los frutos virando, el nivel de acumulación de transcritos de cada uno de los alelos difiere entre ambas especies (Figura 25 y Tabla 13): en *C. sinensis* se transcribe mayoritariamente  $\beta$ -*LCY2a* mientras que en *C. paradisi* lo hace  $\beta$ -*LCY2b*. De acuerdo con lo anterior, en las bases de datos únicamente se detectaron ESTs de *C. paradisi* correspondientes a  $\beta$ -*LCY2b*, mientras que en *C. sinensis* se detectaron ESTs correspondientes a ambos alelos, aproximadamente en la misma proporción (Tabla 14). En *C. paradisi* la baja expresión de  $\beta$ -*LCY2* (Figura 40) unida a la transcripción mayoritaria de  $\beta$ -*LCY2b* (alelo no funcional), podría explicar la acumulación de licopeno en el pomelo 'Star Ruby', cuyo particular fenotipo y las bases moleculares del mismo se discuten más adelante (apartado 5.2 de este Capítulo). En tomate, también se ha descrito la existencia

de dos alelos para el gen homólogo  $\beta$ -*LCY2* (*B/b*), que difieren en su patrón y nivel de acumulación de transcritos (Ronen *et al.* 2000). Ambos alelos codifican proteínas con actividad  $\beta$ -*LCY* *in vitro* y 98% idénticas a nivel de aminoácidos, localizándose diferencias en las secuencias promotoras de cada uno de los alelos. En el caso del gen  $\beta$ -*LCY2* en frutos cítricos, el análisis de la región promotora también reveló una secuencia distinta asociada a cada uno de los dos alelos. Sin embargo, las secuencias promotoras de ambos alelos fueron 96% idénticas, y no se encontraron entre ellas diferencias importantes en los elementos *cis* identificados (Tabla 15).

Durante la maduración de las naranjas y las mandarinas la composición de carotenoides del flavedo cambia de  $\beta,\epsilon$ -carotenoides a  $\beta,\beta$ -carotenoides (Kato *et al.* 2004; Rodrigo *et al.* 2004; Figura 28 y Figura 47). Dado que en estas especies el patrón de expresión de  $\beta$ -*LCY1* es bajo y prácticamente constitutivo, Kato *et al.* (2004) y Rodrigo *et al.* (2004) han explicado el cambio en el perfil cualitativo de carotenoides por una disminución de la expresión del gen  $\epsilon$ -*LCY*, de forma que no se produce  $\alpha$ -ciclación y se limita el flujo a través de la rama  $\beta,\epsilon$ - de la ruta de biosíntesis de carotenoides. La importancia de los niveles de expresión de los genes *LCYs* en la determinación de la composición de carotenoides también ha sido descrita en otros frutos, como tomate y pimiento. En el fruto maduro del tomate se acumula licopeno y pequeñas cantidades de  $\beta$ -caroteno debido a que  $\beta$ -*LCY2* (*B*) se expresa de forma transitoria en el estadio virando y la expresión de los genes  $\beta$ -*LCY1* y  $\epsilon$ -*LCY* se reprime durante la maduración (Giuliano *et al.* 1993; Fraser *et al.* 1994; Pecker *et al.* 1996; Ronen *et al.* 1999; Ronen *et al.* 2000; Bramley 2002). En pimiento, donde el patrón de expresión de  $\epsilon$ -*LCY* no ha sido estudiado, el redireccionamiento del flujo de la ruta de biosíntesis de carotenoides de la rama  $\beta,\epsilon$ - hacia la rama  $\beta,\beta$ -, que tiene lugar durante la maduración, se atribuye mayoritariamente a un aumento en la actividad de la enzima CCS, capaz de ciclar el licopeno a  $\beta$ -caroteno (Hugueney *et al.* 1995).

El nuevo gen  $\beta$ -*LCY2* de frutos cítricos, caracterizado por primera vez en este trabajo, podría desempeñar un papel fundamental en el redireccionamiento del flujo de carotenoides hacia la rama  $\beta,\beta$ - de la ruta de biosíntesis que tiene lugar durante la maduración de los frutos cítricos. De hecho, el patrón de expresión de  $\beta$ -*LCY2* es coincidente en el tiempo con la acumulación masiva de  $\beta,\beta$ -xantofilas que se produce en el flavedo durante la maduración de naranjas y mandarinas (Figura 15, Figura 31, Figura 33 y Figura 51). En el flavedo, a partir

del estadio verde-maduro se produce un aumento de la expresión de  $\beta$ -*LCY2*, mientras que la acumulación de los transcritos correspondientes a  $\epsilon$ -*LCY* es cada vez menor, favoreciéndose la biosíntesis de  $\beta$ -caroteno. Los resultados de esta Tesis, de acuerdo con los presentados por Kato *et al.* (2004), indican que el gen  $\epsilon$ -*LCY* no se expresa o lo hace muy poco en la pulpa y, en consecuencia, no se detecta acumulación de  $\beta,\epsilon$ -carotenoides en este tejido. En la pulpa, la inducción de la expresión de  $\beta$ -*LCY2* es anterior que en el flavedo, en concordancia con la acumulación más temprana de  $\beta,\beta$ -xantofilas en este tejido. Estos datos indican que el nivel de expresión de  $\beta$ -*LCY2* parece regular la acumulación de  $\beta,\beta$ -xantofilas, en la pulpa y en el flavedo de los frutos cítricos.

Por otro lado, la acumulación de licopeno en el pomelo 'Star Ruby', donde el nivel de expresión de  $\beta$ -*LCY2* es más reducido que en las naranjas y se transcribe fundamentalmente el alelo que codifica una proteína no funcional ( $\beta$ -*LCY2b*), sugiere que la contribución de la actividad  $\beta$ -*LCY1* al redireccionamiento del flujo hacia la síntesis de  $\beta$ -caroteno es minoritaria. En pimiento, dado que  $\beta$ -*LCY* presenta un nivel de expresión constitutivo durante todo el proceso de maduración, también se le ha atribuido un papel menor al redireccionamiento del flujo (Huguene *et al.* 1995). Asimismo, en frutos maduros de tomate se ha sugerido que la actividad  $\beta$ -*LCY1* no contribuye a la síntesis de  $\beta$ -caroteno que se produce durante los estadios coloreados (Ronen *et al.* 2000). Por otro lado, el estudio de mutantes de tomate y pimiento remarca la importancia de la regulación transcripcional de  $\beta$ -*LCY2*. En mutantes *Beta* de tomate, en los que el gen  $\beta$ -*LCY2* (*B*) se induce durante la maduración, se acumula como carotenoide mayoritario  $\beta$ -caroteno, mientras que en los mutantes *old-gold* y *old-gold crimsom*, en los que  $\beta$ -*LCY2* codifica una proteína no funcional, no se detecta  $\beta$ -caroteno y se acumula más licopeno que en el genotipo silvestre (Ronen *et al.* 2000). Algunas variedades de pimiento presentan coloración amarilla, debido a que carecen en su genoma de *CCS* (Huguene *et al.* 1995; Lefebvre *et al.* 1998), de forma que no se sintetizan capsantina ni capsorrubina, principales responsables del color rojo de los pimientos (Bouvier *et al.* 1994; Lefebvre *et al.* 1998). Estas variedades también tienen alterado el redireccionamiento del flujo hacia la rama  $\beta,\beta$ - mediado por inducción de la expresión de *CCS*, ya que presentan un contenido de  $\beta,\beta$ -carotenoides muy reducido y una mayor concentración de  $\alpha$ -caroteno y sus derivados (Huguene *et al.* 1995; Lefebvre *et al.* 1998).

### 3. Origen de $\beta$ -*LCY2* en frutos cítricos

Además de los genes  $\beta$ -*LCYs*, en tomate existen otros genes de la biosíntesis de carotenoides con más de una isoforma, como *GGPS* (Galpaz *et al.* 2006), *PSY* (Fraser *et al.* 1999) y  $\beta$ -*CHX* (Galpaz *et al.* 2006); presentando una de las isoformas una expresión específica de tejido cromoplástico, y la otra característica de tejido vegetativo. Se ha sugerido que esta duplicación génica puede ser un mecanismo evolutivo dirigido a aumentar la acumulación de carotenoides en las flores y que, posteriormente, fue adoptado por los frutos (Ronen *et al.* 2000; Galpaz *et al.* 2006). En el caso de las solánaceas, se ha propuesto que dicha duplicación génica se produjo antes de que los géneros *Lycopersicon* y *Capsicum* se separaran y mientras que en *Lycopersicon* el gen  $\beta$ -*LCY* mantuvo su función original (gen *B*), durante la evolución del pimiento este gen adquirió una nueva función (gen *CCS*) y dio lugar a nuevos carotenoides oxigenados: capsantina y capsorrubina (Ronen *et al.* 2000). De forma análoga, podría suponerse que en los frutos cítricos el gen  $\beta$ -*LCY2* se originó a partir de una duplicación del gen  $\beta$ -*LCY1* y que esta duplicación tuvo lugar en la especie ancestral que originó el género *Citrus*. Posteriormente, esta especie divergió en lo que hoy se consideran las tres verdaderas especies de cítricos: *Citrus medica* L. (cidros), *Citrus reticulata* Blanco (mandarinas) y *Citrus grandis* Osbeck (pumelos) (Figura 9). Al igual que debió suceder en algunas especies de tomate y pimiento en las que existen alelos no funcionales de  $\beta$ -*LCY2* y *CCS* (Huguene *et al.* 1995; Ronen *et al.* 2000), una hipótesis es que en frutos cítricos el gen  $\beta$ -*LCY2a* mutase a un alelo no funcional ( $\beta$ -*LCY2b*). Hasta la fecha, de las 16 especies de cítricos existentes (Agustí 2000), únicamente se ha descrito la presencia de licopeno en *C. grandis*, *C. paradisi*, *C. sinensis* y *C. limon* (ver pagina 178 para referencias). De estas, sólo *C. grandis* se considera una especie verdadera, mientras que *C. paradisi*, *C. sinensis* y *C. limon* se originaron mediante hibridaciones sexuales en las que participó *C. grandis* (Figura 9). Ya que en las otras dos especies verdaderas de cítricos, *C. reticulata* y *C. medica*, no se ha descrito la presencia de licopeno y, que en todas aquellas variedades en las que se ha detectado este compuesto parte de la dotación génica procede del pumelo ancestral, *C. grandis* parece un buen candidato como especie en la que se originó la mutación. A favor de esta hipótesis cabe mencionar que existen especies ancestrales de pumelo blancas y rojas (Hodgson 1948).

#### 4. Caracterización bioquímica y molecular de la biosíntesis y acumulación de carotenoides en los frutos de la naranja `Cara Cara´

La naranja `Cara Cara´ es una mutación espontánea de la naranja `Navel´, que se caracteriza por la coloración roja de su pulpa. Este fenotipo se debe a la presencia de licopeno (Lee 2001; Xu *et al.* 2006), un carotenoide lineal que, además de en `Cara Cara´, únicamente ha sido descrito en otro mutante de naranja denominado `Sarah´ (Monselise y Halevy 1961). La pulpa de los frutos maduros de `Cara Cara´ acumula, además, importantes cantidades de otros carotenos lineales (fitoeno y fitoflueno) y de  $\beta$ -caroteno (Lee 2001; Xu *et al.* 2006). Tanto el licopeno como el  $\beta$ -caroteno proporcionan importantes beneficios para la salud (Fraser y Bramley 2004), por lo que la pulpa y el zumo de la naranja `Cara Cara´ pueden aportar nuevas propiedades nutritivas y funcionales. Hasta la fecha, los trabajos relacionados con la composición de carotenoides en `Cara Cara´ se han centrado en frutos maduros (Lee 2001; Xu *et al.* 2006). En esta Tesis se ha caracterizado la evolución del color y del contenido y de la composición de carotenoides, tanto en el flavedo como en la pulpa, durante el desarrollo y la maduración de los frutos de `Cara Cara´.

Externamente, los frutos de `Cara Cara´ presentaron durante el desarrollo y la maduración el mismo fenotipo que los de `Navel´, con curvas de evolución del diámetro del fruto y del índice  $a/b$  de coloración del flavedo muy similares (Figura 27A y D). La evolución del contenido de clorofilas y de carotenoides totales del flavedo también fueron muy similares entre las naranjas `Navel´ y `Cara Cara´ (Figura 27B y E). Sin embargo, la coloración de la pulpa de ambas variedades de naranjas presentó diferencias importantes desde estadios muy iniciales del desarrollo del fruto, apreciándose coloración roja en la pulpa de `Cara Cara´ desde el mes de julio (Figura 26). Además, la evolución del contenido de carotenoides totales en la pulpa fue distinta en cada una de las variedades. En `Navel´, el inicio de la acumulación de carotenoides en la pulpa y en el flavedo fue simultáneo (Figura 27B y C), mientras que en `Cara Cara´ la acumulación de carotenoides en la pulpa se produjo desde estadios iniciales del desarrollo del fruto (Figura 27E y F). Los distintos patrones de acumulación de carotenoides observados entre el flavedo y la pulpa de la naranja `Cara Cara´ indican que la biosíntesis de carotenoides ocurre de forma independiente en cada uno de estos tejidos (Kato *et al.* 2004; Xu *et al.* 2006).

Al igual que en la naranja `Navel´, durante la maduración de los frutos de `Cara Cara´, el contenido de  $\beta,\epsilon$ -carotenoides del flavedo disminuye y se

produce una acumulación de  $\beta,\beta$ -xantofilas (Figura 28 y Figura 29). Sin embargo, en los tejidos del mutante se observó un retraso en la acumulación de  $\beta,\beta$ -xantofilas, aunque la concentración de estos compuestos en los frutos totalmente coloreados del mutante fue similar a la de la variedad parental. Recientemente, Xu *et al.* (2006) han analizado la composición de carotenoides en frutos maduros de 'Cara Cara' y tampoco han encontrado reducción del contenido de  $\beta,\beta$ -xantofilas. Además, en el flavedo y la pulpa de los frutos de 'Cara Cara' se detectó acumulación de carotenos incoloros (fitoeno y fitoflueno) desde estadios tempranos de la maduración (Figura 28 y Figura 29). Estos resultados coinciden con la acumulación de carotenos incoloros en los tejidos de frutos maduros de 'Cara Cara' descrita por varios autores (Lee 2001; Xu *et al.* 2006; Tao *et al.* 2007). En la pulpa, que es donde se detectaron las mayores diferencias del contenido de carotenoides entre ambas variedades, la concentración de carotenos supuso más del 94% del total de carotenoides en 'Cara Cara', mientras que en la pulpa de 'Navel' no se detectaron carotenos (Figura 29). De acuerdo con resultados previos, el caroteno más abundante en los tejidos del mutante fue el fitoeno (Xu *et al.* 2006). Destaca la presencia en 'Cara Cara' de licopeno, en pequeñas cantidades en el flavedo y hasta 9  $\mu\text{g/g}$  PF en la pulpa, que no se detecta en los tejidos de la línea parental (Figura 28 y Figura 29).

Las diferencias de la composición de carotenoides entre los tejidos de las naranjas 'Cara Cara' y 'Navel' confirman que la mutación afecta tanto al flavedo como a la pulpa (Xu *et al.* 2006), aunque se manifiesta en mayor magnitud en esta última. Además, ponen de manifiesto que lo hace desde estadios iniciales del desarrollo del fruto. El hecho de que en las hojas del naranjo 'Cara Cara' se detecte fitoeno, ausente en las hojas de la variedad parental, indica que la mutación también puede tener un efecto en las hojas, al menos parcialmente (Figura 30).

La acumulación de licopeno en la pulpa de la naranja 'Cara Cara' podría deberse a una ausencia o disfunción de las enzimas implicadas en la ciclación del licopeno. Sin embargo, los genes que codifican  $\beta$ -LCY1 y  $\beta$ -LCY2 se han clonado a partir de frutos de 'Cara Cara' y la capacidad funcional de las correspondientes proteínas no presentó diferencias respecto a las de la variedad parental (apartado 3 del Capítulo I de Resultados). Adicionalmente, los niveles de expresión de  $\beta$ -LCY1 y  $\beta$ -LCY2 en el flavedo y la pulpa de 'Cara Cara' fueron iguales o superiores a los determinados en la naranja 'Navel', de modo que

tampoco explican la acumulación de licopeno en este mutante (Figura 33). Recientemente se ha descrito una posible carencia de actividad  $\varepsilon$ -LCY en la naranja 'Cara Cara' debido a un procesamiento alternativo del correspondiente mRNA (Tao *et al.* 2005b). No obstante, el contenido y composición de  $\beta,\varepsilon$ -carotenoides del mutante no se encuentran alterados (Figura 28), y en la pulpa, que es donde se detecta la mayor acumulación de licopeno, la expresión del gen  $\varepsilon$ -LCY, tanto en 'Navel' como en 'Cara Cara', es muy reducida o indetectable, por lo que una actividad  $\varepsilon$ -LCY defectiva parece improbable como posible causa de la acumulación de licopeno en 'Cara Cara'. Tampoco parece probable que la mutación sea debida a una isomerización defectiva del licopeno, ya que esto conduciría a la acumulación de prolicopeno y en 'Cara Cara' únicamente se detecta *trans*-licopeno (Figura 28 y Figura 29).

Considerando que en los tejidos de los frutos maduros de 'Cara Cara' se produce una acumulación de carotenos sin disminución de la concentración final de  $\beta,\beta$ -xantofilas, Xu *et al.* (2006) han sugerido que la mutación podría aumentar la actividad de PSY o de enzimas anteriores de la ruta de isoprenoides. El patrón de expresión de PSY se ha estudiado en el flavedo, la pulpa y el albedo de la naranja 'Cara Cara', y se ha comparado con el de la variedad parental 'Navel' (Tao *et al.* 2007). Mediante PCR semicuantitativa, Tao *et al.* (2007) encontraron niveles de expresión similares en el flavedo y la pulpa de ambas naranjas y un mayor nivel de expresión en el albedo de 'Cara Cara' que en el de 'Navel', pese a que en este tejido no se acumulan carotenoides. En esta Tesis se ha estudiado, además del patrón de expresión de PSY, el de otros 9 genes de la ruta de biosíntesis de carotenoides implicados en reacciones tempranas de la ruta, reacciones de ciclación y reacciones de biosíntesis de xantofilas. En general, el nivel de expresión de todos los genes fue similar en el flavedo de los frutos de ambas naranjas, y superior en la pulpa de 'Cara Cara' (Figura 31 y Figura 33). También se estudiaron tres genes de la ruta MEP (*DXS*, *HDS* y *HDR*) cuya expresión fue, en general, mayor en 'Cara Cara' que en 'Navel', tanto en el flavedo como en la pulpa (Figura 32). En conjunto, estos resultados indican que el fenotipo de este mutante podría deberse más que al bloqueo de una reacción concreta, a un incremento en el flujo de entrada en la ruta de biosíntesis de carotenoides y, como consecuencia, a una limitación de determinadas enzimas para transformar adecuadamente los mayores niveles de sustrato disponibles. El mayor nivel de expresión de los genes MEP, en particular de *HDS* en la pulpa de 'Cara Cara' desde estadios muy tempranos del desarrollo del fruto (Figura 32), podría dar

lugar a una mayor cantidad de IPP plastídico disponible para la biosíntesis de carotenoides en la naranja 'Cara Cara', que sería convertido a fitoeno por acción de PSY. La acumulación de fitoeno y licopeno que se produce en los tejidos de 'Cara Cara' (Figura 28 y Figura 29) se explicaría por la limitación de PDS y de las  $\beta$ -LCYs de catalizar la transformación de todo el sustrato disponible. En concordancia con esta hipótesis, la expresión heteróloga de *DXS* de *E.coli* en frutos de tomate produce un aumento del contenido total de carotenoides, debido fundamentalmente a un aumento del contenido de fitoeno, licopeno y  $\beta$ -caroteno (Enfissi *et al.* 2005). Es interesante destacar que, el mayor nivel de expresión de los genes de biosíntesis de carotenoides en la pulpa de 'Cara Cara' respecto de 'Navel', podría ser consecuencia de una regulación por sustrato (Figura 33). Este tipo de regulación ha sido descrita para varios genes carotenogénicos. Por ejemplo, el tratamiento de frutos de tomate con DXP, mimetizando un aumento específico de la actividad *DXS*, promueve un aumento de la expresión de *PSY-1* (Lois *et al.* 2000). Por otro lado, el tratamiento de flores de *Narcissus* con CPTA, un inhibidor de la actividad  $\beta$ -LCY que conduce a la acumulación de licopeno, aumenta la expresión de  $\beta$ -LCY (al Babili *et al.* 1999). En frutos transgénicos de tomate en los que se ha aumentado la desaturación de fitoeno a licopeno, mediante la expresión heteróloga de una desaturasa bacteriana (*crtI*), también aumenta la expresión del gen  $\beta$ -LCY (Romer *et al.* 2000). Se podría sugerir que un efecto similar podría ocurrir en los frutos de 'Cara Cara', especialmente en la pulpa, donde la expresión de  $\beta$ -LCY1 aumenta notablemente, mientras que en la variedad parental permanece a un nivel bajo y constante durante la maduración (Figura 33).

Por último, dado que  $\beta$ -CHX presentó en las naranjas 'Navel' y 'Cara Cara' el mismo patrón de expresión, pero cuantitativamente superior en el mutante (Figura 33), el retraso de la acumulación de xantofilas que se observa en los tejidos de 'Cara Cara' podría explicarse por una actividad  $\beta$ -CHX insuficiente o una deficiente importación de la proteína a los plastidios. Alternativamente, cabe mencionar que en otros frutos, como tomate (Galpaz *et al.* 2006) y pimiento (Bouvier *et al.* 1998), se ha descrito la existencia de dos genes que codifican  $\beta$ -CHX. Aunque en frutos cítricos hasta la fecha únicamente se ha descrito un gen  $\beta$ -CHX, una alteración en 'Cara Cara' de la actividad de una posible  $\beta$ -CHX2 reduciría el contenido de carotenoides  $\beta$ -hidroxilados.

## 5. Caracterización bioquímica y molecular de la biosíntesis y acumulación de carotenoides en frutos de dos variedades de pomelo con distinta pigmentación.

Los estudios relativos a la coloración y la composición de carotenoides en pomelos son escasos y, en general, se refieren a frutos maduros, sin que se haya abordado el estudio de la evolución de estos pigmentos a lo largo del proceso de desarrollo y maduración del fruto. Únicamente existen tres trabajos relativos a la evolución de la composición de carotenoides en pomelo blanco (Yokoyama y White 1967; Banet *et al.* 1981; Matsumoto *et al.* 2007). Los trabajos relativos a la composición de carotenoides en los pomelos pigmentados son más abundantes, refiriéndose la mayoría a la composición de carotenoides en la pulpa o en el zumo de frutos maduros (Khan y Mackinney 1953; Ting y Deszyck 1958; Gross 1987; Rouseff *et al.* 1992; Lee 2000; Xu *et al.* 2006; Matsumoto *et al.* 2007). La composición de carotenoides en el flavedo únicamente ha sido investigado en dos cultivares de pomelo rojo (Curl y Bailey 1957; Gross 1987; Xu *et al.* 2006; Matsumoto *et al.* 2007). En esta Tesis Doctoral se planteó llevar a cabo un estudio detallado de la evolución del color y del contenido y composición de carotenoides en los frutos de pomelo, y su relación con la expresión de los genes de biosíntesis de carotenoides. Para ello se seleccionaron dos variedades de pomelo con distinta pigmentación: un pomelo blanco y un pomelo rojo. Como pomelo blanco se eligió el pomelo 'Marsh', que mediante mutaciones espontáneas y dirigidas ha originado los cultivares de pigmentación rosada y rojiza (Moore, 2001). Como pomelo rojo se eligió 'Star Ruby', que destaca dentro de este grupo como uno de los cultivares con mayor coloración (Rouseff *et al.* 1992). Para establecer con mayor claridad las posibles bases moleculares que conducen a las diferentes coloraciones en los frutos de pomelo, se han comparado los patrones y niveles de expresión de los genes de la ruta de biosíntesis en los frutos de pomelo 'Marsh' y 'Star Ruby' con los de la naranja 'Navel'.

### 5.1. Biosíntesis de carotenoides en frutos del pomelo blanco 'Marsh'

Durante el desarrollo y la maduración del fruto de pomelo blanco 'Marsh', el color del flavedo y de la pulpa viró de verde a amarillo en paralelo con el descenso de clorofilas en ambos tejidos. Sin embargo, y a diferencia de lo que ocurre en las naranjas (Figura 27), no se produjo el característico aumento del contenido de carotenoides en los tejidos del pomelo (Figura 35). Así, aunque

en el flavedo y la pulpa de los frutos verde-inmaduros del pomelo `Marsh´ el contenido de carotenoides fue similar al de la naranja `Navel´, en los frutos totalmente coloreados fue un 92-95% menor, tanto en el flavedo como en la pulpa.

Durante los estadios verdes, la composición de carotenoides en el flavedo (Figura 36) fue similar a la descrita en naranja `Navel´ (Figura 28), acumulándose los carotenoides característicos de tejido cloroplástico. Sin embargo, en el pomelo la concentración de xantofilas fue hasta 3 veces menor que en `Navel´. A diferencia de lo que ocurre en la naranja, durante el cambio de color del flavedo del pomelo `Marsh´ no se produjo acumulación de  $\beta,\beta$ -xantofilas, sino que la concentración de estos pigmentos disminuyó, presentando los frutos totalmente coloreados 30 veces menos cantidad de estos pigmentos que la naranja `Navel´. En la pulpa del pomelo `Marsh´ únicamente se detectaron fitoeno y violaxantina, ambos en concentraciones muy reducidas ( $<1 \mu\text{g/g PF}$ ) (Figura 37). Así pues, la baja coloración del flavedo y la pulpa del pomelo blanco `Marsh´ se explica por la práctica ausencia de carotenoides coloreados.

Los resultados obtenidos de la evolución del perfil de carotenoides del pomelo `Marsh´ concuerdan con los estudios previos, donde se describe su bajo contenido de carotenoides, y donde el fitoeno es uno de los carotenoides más abundantes, tanto en el flavedo como en la pulpa (Yokoyama y White 1967; Banet *et al.* 1981; Fanciullino *et al.* 2006; Xu *et al.* 2006; Matsumoto *et al.* 2007). La presencia de niveles muy bajos de xantofilas en el flavedo y la pulpa de los frutos maduros del pomelo `Marsh´ también concuerdan con los datos bibliográficos (Banet *et al.* 1981; Xu *et al.* 2006).

Diversos autores han sugerido que en los pomelos blancos, como el `Marsh´, existe un bloqueo metabólico a nivel de la desaturación del fitoflueno, que repercute en una acumulación de carotenos incoloros y una reducida acumulación de xantofilas (Yokoyama y White 1967; Romojaro *et al.* 1979; Banet *et al.* 1981; Gross 1987). Sin embargo, los resultados presentados en esta Tesis indican que, al menos el flavedo verde (cloroplástico) del pomelo `Marsh´ posee, aunque reducida, la capacidad de sintetizar y acumular xantofilas, y aunque esta capacidad disminuye significativamente durante la maduración del fruto, en el flavedo maduro las xantofilas constituyen más del 50% de los carotenoides de este tejido (Xu *et al.* 2006; Figura 36).

Sorprendentemente, pese a la práctica ausencia de carotenoides en pomelo blanco, el patrón y nivel de expresión de los genes de biosíntesis de carotenoides estudiados fueron similares a los observados en naranja 'Navel' (Figura 40). La existencia de niveles 'normales' de expresión de los genes carotenogénicos en tejidos que no acumulan carotenoides ha sido descrito previamente en otros vegetales como coliflor (Li *et al.* 2006), flores *wf* de tomate (Galpaz *et al.* 2006), variedades de flor blanca de crisantemo (Kishimoto y Ohmiya 2006) y endospermo de arroz (Schaub *et al.* 2005). A diferencia del arroz, donde la ausencia de carotenoides se debe a la falta de expresión de *PSY* (Schaub *et al.* 2005), en el pomelo blanco el nivel de expresión de este gen es similar al de naranja 'Navel' (Figura 40). La ausencia de carotenoides en el pomelo blanco podría deberse a una baja actividad de la proteína PSY, que conllevaría un bajo flujo de metabolitos en la ruta de biosíntesis de carotenoides. Una situación similar se ha observado en el mutante *r* de tomate, cuyos frutos maduros presentan coloración amarilla. La mutación *r* de tomate afecta al gen *PSY*, que, pese a presentar el mismo patrón y nivel de expresión que en el genotipo silvestre (Lois *et al.* 2000), codifica una proteína no funcional, de forma que la primera reacción específica de la ruta de carotenoides no tiene lugar. Adicionalmente, la incapacidad de PSY del pomelo 'Marsh' para interactuar con la membrana o la incorrecta formación del complejo carotenogénico multienzimático podrían explicar una alteración en la actividad PSY (Schledz *et al.* 1996; Cunningham y Gantt 1998). Alternativamente, un bloqueo de las etapas metabólicas previas a la biosíntesis de carotenoides también daría lugar a una falta de precursores para la síntesis de estos compuestos, lo cual explicaría la práctica ausencia de carotenoides en pomelo blanco. Sin embargo, la expresión de los genes de la ruta MEP estudiados en este trabajo fue similar entre los tejidos de naranja 'Navel' y pomelo 'Marsh' (Figura 39). Además, los niveles de otros derivados isoprenoides plastídicos, como las clorofilas, no aparecen disminuidos en el pomelo 'Marsh' (Figura 35).

Otra explicación a la práctica ausencia de carotenoides en los tejidos del pomelo 'Marsh' sería la alteración de estructuras específicas de acumulación de carotenoides en los cromoplastos. Así, mientras los frutos son verdes y existen cloroplastos en sus tejidos, la composición cualitativa de carotenoides del pomelo blanco es muy parecida a la encontrada en la naranja 'Navel'. La transformación característica de cloroplastos a cromoplastos de la naranja 'Navel' podría estar, de alguna forma alterada o ser defectuosa en el pomelo

`Marsh´, no produciéndose acumulación de carotenoides. Apoya esta hipótesis el hecho de que el tratamiento de frutos de pomelo `Marsh´ con CPTA, que induce una reorganización estructural de los cromoplastos (Vishnevetsky *et al.* 1999; al Babili *et al.* 1999) produce un aumento del contenido de carotenoides (Yokoyama *et al.* 1972; Poling *et al.* 1973; Poling *et al.* 1976). Dado que el CPTA inhibe la actividad  $\beta$ -LCY, este aumento del contenido de carotenoides se debe específicamente a un incremento del contenido de carotenos lineales, fundamentalmente licopeno (Yokoyama *et al.* 1972; Poling *et al.* 1973; Poling *et al.* 1976). En los tejidos del pomelo `Marsh´ tratados con CPTA el contenido y la composición de carotenoides son prácticamente idénticos a los de naranjas `Navel´ tratadas con el mismo compuesto (Yokoyama *et al.* 1972), lo que sugiere que en estas condiciones ambos frutos poseen la misma capacidad carotenogénica. En flores de narciso se ha descrito que el aumento del contenido de carotenoides, inducido por el tratamiento con CPTA, parece responder a un aumento de la expresión de *PSY* (al Babili *et al.* 1999). Por tanto, el tratamiento del pomelo blanco con CPTA podría estimular la actividad *PSY* restableciendo la biosíntesis de carotenoides.

Por último, también sería posible que la práctica ausencia de carotenoides en frutos maduros del pomelo `Marsh´ fuera una consecuencia de la degradación enzimática de los mismos. Un fenómeno de este tipo ha sido recientemente descrito en variedades de flor blanca de crisantemo (Ohmiya *et al.* 2006). Durante el desarrollo de la flor, el contenido de carotenoides de los pétalos aumenta en las variedades amarillas, mientras que en las variedades blancas disminuye. Sin embargo, no existen diferencias en la expresión de los genes carotenogénicos entre ambos tipos de variedades (Kishimoto y Ohmiya 2006). Ohmiya *et al.* (2006) han determinado que las diferencias de acumulación de carotenoides entre ambas variedades se deben a la expresión en las variedades blancas de una dioxigenasa de corte de carotenoides (*CCD4a*). La enzima *CCD4a* cataliza el corte de carotenoides en apocarotenoides incoloros (Ohmiya *et al.* 2006). El gen *CCD4a*, que no se encuentra en el genoma de las variedades amarillas, es específico de pétalos y se induce durante el desarrollo de los mismos en las variedades blancas de crisantemo, conduciendo a la degradación de los carotenoides sintetizados.

## 5.2. Biosíntesis de carotenoides en frutos del pomelo rojo `Star Ruby`

Durante el desarrollo y la maduración del fruto del pomelo `Star Ruby` la coloración viró de verde a rosada o roja, mientras que la variedad parental `Marsh` adquirió coloración amarilla (Figura 34 y Figura 35). Al igual que en el pomelo `Marsh`, el contenido de clorofilas y carotenoides del flavedo de `Star Ruby` disminuyó durante el cambio de color. En el pomelo `Star Ruby`, el contenido de carotenoides de la pulpa aumentó, alcanzando en frutos totalmente coloreados una concentración más de dos veces superior a la existente en el flavedo, y casi 5 y 25 veces superior a la existente en la pulpa de frutos totalmente coloreados de `Navel` y `Marsh`, respectivamente.

La evolución del perfil de carotenoides del flavedo de `Star Ruby` durante el desarrollo y la maduración del fruto fue muy similar a la observada en el pomelo `Marsh` (Figura 36). Durante los estadios verdes se acumularon carotenoides característicos de tejido cloroplástico, cuya concentración disminuyó durante la maduración del fruto y no se produjo acumulación de  $\beta,\beta$ -xantofilas (Figura 36). Cabe resaltar en el pomelo `Star Ruby` la acumulación en el flavedo de hasta 15  $\mu\text{g/g}$  PF de fitoeno y la presencia de pequeñas cantidades de fitoflueno y licopeno, que no se detectan en la variedad parental. En la pulpa, cada uno de los pomelos presentó una evolución de la composición de carotenoides característica (Figura 37) y ambas fueron distintas a la determinada en la pulpa de la naranja `Navel` (Figura 27). En el pomelo `Star Ruby` se acumularon fundamentalmente carotenos lineales, siendo el licopeno el más abundante a partir del estadio verde-maduro. Estos resultados coinciden con los de otros autores en la acumulación exclusiva de carotenos en la pulpa (Fanciullino *et al.* 2006; Xu *et al.* 2006) y en proporción mayoritaria en el flavedo (Xu *et al.* 2006).

La concentración de carotenoides de los tejidos de `Star Ruby` fue mayor que la de los tejidos de `Marsh` (Figura 36 y Figura 37) y, este hecho es generalizable en todas las variedades rojas de pomelo (Tabla 5). A partir del pomelo blanco surgieron, por mutación espontánea, variedades rosadas de pomelo que acumulan  $\beta$ -caroteno y pequeñas cantidades de licopeno y, a partir de estas se originaron, también por mutación espontánea, variedades rojas de pomelo con el mismo contenido de  $\beta$ -caroteno pero con una mayor concentración de licopeno (Khan y Mackinney 1953). También se han obtenido resultados similares mediante mutación inducida. La mayor acumulación de carotenoides en las variedades rojas de pomelo respecto a las blancas sugiere que las alteraciones

existentes en los pomelos blancos, que afectan a la biosíntesis y/o acumulación de carotenoides, se han podido restaurar o restablecer en las variedades rojas de pomelo. Al menos en el caso del pomelo `Star Ruby`, la mayor acumulación de carotenoides respecto a `Marsh` no obedece a un aumento de la expresión de los genes implicados en la biosíntesis de carotenoides, dado que éstos presentaron patrones y niveles de expresión prácticamente idénticos en el flavedo y la pulpa de ambos pomelos (Figura 39 y Figura 40).

La existencia de mutaciones `de ganancia de función` que conducen a la acumulación de carotenoides en tejidos donde habitualmente no se encuentran estos pigmentos también ha sido descrita en crisantemo (Kishimoto y Ohmiya 2006), coliflor (Li *et al.* 2001) y maíz (Palaisa *et al.* 2003). En crisantemo existen variedades silvestres de flor blanca, carentes de carotenoides, y variedades de flor amarilla, que acumulan fundamentalmente luteína (Kishimoto y Ohmiya 2006). La ausencia de carotenoides en los pétalos maduros de las variedades blancas se debe a la degradación enzimática, mediada por CCD4a, de los carotenoides sintetizados (Ohmiya *et al.* 2006). El mutante espontáneo *or* de coliflor acumula  $\beta$ -caroteno y presenta coloración naranja, mientras que el genotipo silvestre es blanco debido a la ausencia de carotenoides en sus tejidos (Li *et al.* 2006). Estas diferencias de coloración no se deben a una expresión diferencial de los genes de biosíntesis de carotenoides entre ambos genotipos (Li *et al.* 2001), sino a la mutación de un gen (*or*) de función desconocida, que induce en el mutante la diferenciación de proplastos en cromoplastos (Lu *et al.* 2006). La proteína *or* se localiza en los plastidios y pertenece a una familia de proteínas que participa en el ensamblaje, asociación e importación de proteínas a orgánulos (Lu *et al.* 2006). En el caso del maíz silvestre (blanco), inserciones en la región reguladora 5' del gen *PSY-1* (específico del endospermo) son responsables de la aparición de coloración amarilla en el endospermo. Esta coloración parece deberse a un aumento de la expresión del gen *PSY-1* que conduce a la acumulación de carotenoides (Palaisa *et al.* 2003).

La peculiar composición de carotenoides en el pomelo `Star Ruby` se caracteriza por la acumulación de carotenos y la reducida o nula presencia de  $\beta$ , $\beta$ -xantofilas en flavedo y pulpa, respectivamente (Figura 36 y Figura 37). Xu *et al.* (2006) propusieron que la baja acumulación de xantofilas en los tejidos del pomelo rojo podría explicarse por una baja actividad  $\beta$ -CHX. Los resultados obtenidos en esta Tesis indican que, efectivamente, en el pomelo `Star Ruby` la expresión del gen  $\beta$ -CHX es hasta 1.5 y 3.5 veces inferior a la del flavedo y la

pulpa de naranja 'Navel', respectivamente (Figura 40). El bajo nivel de expresión de  $\beta$ -CHX explicaría también la acumulación de  $\beta$ -caroteno en el pomelo 'Star Ruby'. Por otro lado, la mayoría de los carotenos acumulados en los tejidos de 'Star Ruby' son lineales, fundamentalmente licopeno, y únicamente entre el 1 y el 20% del total de carotenoides corresponde a carotenos bicíclicos. Estos datos sugieren que en el pomelo 'Star Ruby' debe de existir un bloqueo parcial de la biosíntesis de carotenoides, a nivel de la ciclación del licopeno, que explicaría los altos niveles de acumulación de este carotenoide. A favor de esta posibilidad existen dos evidencias: (1) que el gen  $\beta$ -LCY2, que participa en la conversión del licopeno a  $\beta$ -caroteno y que se expresa abundantemente en los tejidos cromoplásticos de otras variedades de cítricos, lo hace a un nivel muy inferior en el flavedo y la pulpa del pomelo 'Star Ruby' (Figura 40) y, (2) que en el pomelo rojo 'Star Ruby' existe una mayor transcripción del alelo  $\beta$ -LCY2b que codifica una enzima con actividad  $\beta$ -LCY casi nula, pudiendo todo ello conducir a una reducida conversión del licopeno a  $\beta$ -caroteno.

La coloración final alcanzada por los frutos cítricos se encuentra influenciada, además de por determinantes genéticos, por multitud de factores exógenos a la planta, como la fertilización, la temperatura, el régimen de riego o el portainjerto, entre otros (revisado en Casas y Mallent 1988a; 1988b; 1989). La influencia de la luz sobre la coloración ha sido descrita en numerosos frutos. Una baja intensidad lumínica reduce el color en cultivares rojos de manzana (Moran y Rom 1991; Campbell y Marini 1992; Solovchenko *et al.* 2006). Lo mismo sucede en uva (Hummell y Ferree 1997), melocotón (Corelli Grapadelli y Coston 1991; Senger y Marini 2003), fresa (Saks *et al.* 1996), kiwi (Antognozzi *et al.* 1995), cereza (Patten y Proebsting 1986), pepino (Lin y Jolliffe 1996), pera (Dussie *et al.* 1997) y tomate (Raymundo *et al.* 1976; Alba *et al.* 2000; Brandt *et al.* 2006). Igualmente, las naranjas 'Valencia' (Sites y Reitz 1949) y 'Navel' (Aranda 1986; Casas y Mallent 1988a) y las mandarinas Satsuma (Iwagaki y Kudo 1977; Iwagaki 1981) y 'Hongshigan' (Tao *et al.* 2005a) situadas en el interior de la copa del árbol presentan una coloración menos intensa que las localizadas en el exterior, donde reciben mayor intensidad lumínica. Estos datos indican que la coloración final externa está estrechamente relacionada con la cantidad y la calidad de la luz que recibe el fruto y, al menos en tomate (Raymundo *et al.* 1976), melocotón (Senger y Marini 2003) y dos variedades chinas de cítricos (Uchida *et al.* 1985; Tao *et al.* 2005a), se ha comprobado que la reducción de la intensidad lumínica

que reciben los frutos, mediante embolsado o recubrimiento, reduce la coloración final de los mismos. De hecho, Iwagaki y Kudo (1977) e Iwagaki (1981) comprobaron que en frutos cítricos expuestos a iluminaciones por debajo del 40% de lo habitual la coloración de los mismos disminuye proporcionalmente al descenso de la irradiación. Sin embargo, de acuerdo con las observaciones de Conesa Martínez *et al.* (1999), los pomelos `Star Ruby´ situados en el interior de la copa del árbol alcanzaban una mayor coloración final (Figura 42 y Figura 43). También se observó una mayor coloración en aquellas zonas del fruto menos expuestas a la luz, sombreadas bien por las hojas del árbol o bien por el contacto con otros frutos, así como en la cara de los frutos externos orientada hacia el interior del árbol (Figura 41). En el caso del pomelo `Star Ruby´, los resultados de esta Tesis revelan que el fenotipo de los frutos internos se puede mimetizar evitando la exposición a la luz de los frutos externos (Figura 42). La influencia positiva de la reducción de la intensidad lumínica en la coloración también ha sido descrita en pomelos rojos `Red Blush´ madurados en oscuridad (Meredith y Young 1969).

Con el fin de establecer las posibles causas bioquímicas y moleculares del efecto de la luz en la coloración de los pomelos rojos, se estudió la evolución del contenido de clorofilas y de carotenoides en el flavedo de frutos del pomelo `Star Ruby´ localizados en la parte interna y externa del árbol (Figura 43A). Los frutos externos e internos presentaron, al igual que sucede en naranjas `Navel´ (Casas y Mallent 1988a), un contenido similar de carotenoides, sugiriendo que en los frutos cítricos la luz no influye en el contenido total de estos pigmentos. El hecho de que la luz no es esencial para la carotenogénesis es obvio, dado que ésta también ocurre en el interior de los frutos. Además, se ha observado que en distintas variedades de tomate y cítricos madurados en oscuridad se acumulan carotenoides (Raymundo *et al.* 1976; Tao *et al.* 2005a; Figura 43). Sin embargo, mientras que en las naranjas `Navel´ localizadas en el interior del árbol se observa un retraso en la degradación de clorofilas respecto de los frutos externos (Casas y Mallent 1988a), los frutos de `Star Ruby´ localizados en el interior del árbol desverdizaron antes que los externos (Figura 42 y Figura 43A). Dado que el flavedo de los frutos externos e internos del pomelo `Star Ruby´ presentaron, en los cuatro estadios analizados, un contenido similar de carotenoides totales, las diferencias de coloración entre ambos deben atribuirse al menor contenido de clorofilas del flavedo de los frutos internos, que posibilita que el color de los carotenoides se visualice. Es importante destacar que el carotenoide coloreado

más abundante en el flavedo de los frutos internos es el licopeno, que aporta coloración roja (Figura 43B). Durante la maduración del fruto, tanto en el flavedo de los frutos internos como en el de los externos, disminuyó el contenido de carotenoides característicos de tejido cloroplástico y aumentó el contenido de carotenoides lineales, siendo al final de la maduración la composición de carotenoides en el flavedo de ambos tipos de frutos muy similar (Figura 43B). Destaca, sin embargo, el menor contenido de carotenoides cloroplásticos del flavedo de los frutos internos, asociado probablemente al menor contenido de clorofilas de estos frutos. De hecho, estos carotenoides forman parte, junto con las clorofilas, de los complejos antena de captación de energía lumínica (Merchant y Sawaya 2005) y su concentración suele disminuir paralelamente a la de las clorofilas durante la desverdización de los frutos. Por otro lado, en el flavedo de los frutos internos se detectó, durante los meses de septiembre, octubre y noviembre, un contenido de licopeno entre 4.5 y 6 veces superior al de los frutos externos y un menor contenido de  $\beta,\beta$ -xantofilas en todos los estadios analizados (Figura 43B). En los frutos sombreados del pomelo 'Red Blush' también se ha descrito un mayor contenido de licopeno y un menor contenido de  $\beta$ -caroteno (Meredith y Young 1969). En frutos silvestres de tomate y en mutantes *Beta* procedentes de plantas crecidas en oscuridad, la proporción de  $\beta$ -caroteno en los frutos disminuye, y en frutos *apricot*, que normalmente acumulan  $\beta$ -caroteno y cuya mutación aún no ha sido identificada, se induce la acumulación de licopeno (Raymundo *et al.* 1976). Estos datos sugieren que la luz influye directamente en la eficacia de conversión de licopeno a  $\beta$ -caroteno. Sin embargo, en 'Star Ruby' la expresión de los genes de biosíntesis de carotenoides estudiados, incluidos  $\beta$ -*LCY1* y  $\beta$ -*LCY2*, fueron idénticos en el flavedo de los frutos internos y externos (Figura 44). Una posible explicación a la reducida actividad  $\beta$ -*LCY* en oscuridad podría encontrarse en la necesidad de asociación a la membrana de estas enzimas para su correcta actividad catalítica (Beyer *et al.* 1991). La luz influye en el tipo de membranas que se desarrollan en los plastidios, de forma que su ausencia puede repercutir en el tipo de estructuras membranosas presentes. Por ejemplo, en el caso de *PSY* se ha descrito que su asociación a membrana requiere la degradación de los cuerpos prolamelares y la formación de membranas tilacoidales, ambos procesos inducidos por la luz (Welsch *et al.* 2000). Alternativamente, puede que la luz actúe favoreciendo la asociación de  $\beta$ -*LCY* a las membranas y, que su ausencia conlleve que la enzima permanezca en forma inactiva solubilizada en el estroma (Inoue *et al.* 2006).

Cabe destacar que en tejidos vegetativos la luz promueve un aumento de la expresión de los genes MEP (Mandel *et al.* 1996; Botella Pavía *et al.* 2004; Rodríguez Concepción 2006) y de los genes de biosíntesis de carotenoides (von Lintig *et al.* 1997; Welsch *et al.* 2000; Simkin *et al.* 2003a; Simkin *et al.* 2003b). En frutos se ha propuesto que la luz R (roja) induce la síntesis de carotenoides, mientras que la luz RL (roja lejana) la inhibe, sugiriendo una respuesta mediada por fitocromo (Gross 1987; Alba *et al.* 2000). De hecho, mutantes y plantas transgénicas de tomate afectadas en genes implicados en la ruta de transducción de señales lumínicas presentan frutos con un contenido de carotenoides alterado (Mustilli *et al.* 1999; Alba *et al.* 2000; Cookson *et al.* 2003; Liu *et al.* 2004; Giliberto *et al.* 2005; Davuluri *et al.* 2005). Pese a que la manipulación de la percepción de la luz es una forma eficiente de modificar el color de los frutos, los estudios relativos a la influencia de la luz sobre la expresión de los genes de la biosíntesis de carotenoides son todavía escasos. En este trabajo no se han encontrado diferencias en la expresión de los genes MEP, ni de los genes de biosíntesis de carotenoides entre los frutos iluminados/sombreados (Figura 44) indicando que, al menos en pomelo 'Star Ruby', la luz no parece modificar los niveles expresión. También en frutos de tomate se ha descrito que los niveles de expresión de *DXS* y *PSY* no se modifican por luz (Cookson *et al.* 2003; Schofield y Paliyath 2005).

#### 6. Caracterización de la biosíntesis y acumulación de carotenoides en frutos de variedades de mandarina e híbridos con distinto grado de pigmentación.

Con el objetivo de investigar las bases bioquímicas y moleculares que determinan las diferentes coloraciones de las variedades de mandarina, se seleccionaron frutos de la mandarina 'Clemenules' y de los híbridos 'Fortune' y 'Nova', que presentan diferencias importantes tanto en la tonalidad final del fruto como en la velocidad de coloración (Casas y Mallent 1988b) y, se estudió durante el desarrollo y la maduración de los frutos, la evolución del color y del contenido y composición de carotenoides, así como la expresión de los genes de biosíntesis de carotenoides, tanto en el flavedo como en la pulpa. El flavedo de cada una de las variedades estudiadas presentó una velocidad de coloración y una coloración final distinta. Los frutos del híbrido 'Nova' fueron en los que antes se produjo la desverdización y los que alcanzaron una coloración del flavedo más intensa. Los frutos totalmente coloreados de 'Clemenules' fueron

los que presentaron menor coloración, tanto en el flavedo como en la pulpa (Figura 45 y Figura 46).

La evolución de la composición de carotenoides durante el desarrollo y la maduración de los frutos fue muy similar en las tres variedades. Durante los estadios verdes del flavedo las tres variedades acumularon mayoritariamente  $\beta,\epsilon$ -carotenoides, cuya concentración disminuyó progresivamente. Paralelamente, se inició una acumulación masiva de  $\beta,\beta$ -xantofilas, que constituyeron entre el 82 y el 92% del total de carotenoides del flavedo de los frutos totalmente coloreados (Figura 47). Destaca en el flavedo de `Nova´ la acumulación de anteraxantina, un carotenoide que no se acumula en el flavedo de `Clemenules´ ni en el de `Fortune´. En la pulpa de ninguna de las tres variedades se detectaron  $\beta,\epsilon$ -carotenoides y, al igual que en el flavedo, la concentración de  $\beta,\beta$ -xantofilas aumentó durante la maduración, constituyendo en el estadio totalmente coloreado entre el 76 y el 91% de los carotenoides totales (Figura 48). Estos cambios cuantitativos y cualitativos en el perfil de carotenoides coinciden con los descritos previamente en otras variedades o especies de mandarina (Sonnen 1977; Farin *et al.* 1983; Kato *et al.* 2004; Alós *et al.* 2006).

El menor contenido total de carotenoides en el flavedo de los frutos totalmente coloreados de `Clemenules´ coincidió con su menor coloración (Figura 46). Sin embargo, pese a la distinta coloración del flavedo totalmente coloreado de `Nova´ y `Fortune´, su contenido de carotenoides fue similar, indicando que la coloración final de un tejido no depende únicamente del contenido total de carotenoides. Este hecho es más evidente en la pulpa, donde cada una de las variedades presentó un patrón de acumulación característico (Figura 46). Por ejemplo, la pulpa de frutos totalmente coloreados de `Fortune´ presentó casi un 38% menos de carotenoides que la de `Clemenules´, pese a su mayor coloración. La comparación de la coloración y del contenido total de carotenoides en otras variedades de mandarina e híbridos también indica que no siempre existe una correlación directa entre el contenido total de carotenoides en un tejido y su coloración final. Por ejemplo, Farin *et al.* (1983) determinaron que la mayor coloración del zumo del híbrido `Michal´ respecto al de su variedad parental `Dancy´ podía responder a un ligero incremento del contenido de carotenoides en el híbrido. Sin embargo, el flavedo de `Michal´ presentó una coloración rojiza más intensa que la variedad `Dancy´, pese a que acumuló un 41% menos de carotenoides (Farin *et al.* 1983). Oberholster *et al.* (2001) sugirieron que, en el flavedo de los frutos cítricos, el contenido total de

carotenoides coloreados de un tejido determina la intensidad de su coloración, mientras que el ratio del contenido de 9-*cis*-violaxantina/ $\beta$ -citraurina (de color amarillo y naranja-rojizo, respectivamente) determina la tonalidad del mismo. Otros autores destacan el contenido de  $\beta$ -criptoxantina como un factor determinante de la intensidad de la coloración naranja (Gross 1987; Goodner *et al.* 2001). En las variedades de mandarina estudiadas, la coloración final de cada tejido parece estar determinada por los contenidos de  $\beta$ -criptoxantina y  $\beta$ -citraurina, más que por el ratio de carotenoides amarillos/naranjas. De hecho, la intensidad de color naranja del flavedo coincide con el nivel de acumulación de estos carotenoides (Tabla 18). En la pulpa, la concentración de estos compuestos también determina la tonalidad final. La presencia de pequeñas cantidades de  $\beta$ -citraurina en la pulpa de `Nova´ hacen que ésta adquiera una tonalidad final más parecida a la de `Fortune´ (que acumula el doble de  $\beta$ -criptoxantina) que a la de `Clemenules´. Esta clara influencia de la concentración de  $\beta$ -citraurina en la intensidad de la coloración final en los frutos cítricos ya ha sido observada con anterioridad (Stewart y Wheaton 1973; Farin *et al.* 1983).

Tabla 18: Comparación del índice de color (*a/b*) y del contenido de  $\beta$ -criptoxantina y  $\beta$ -citraurina en el flavedo de frutos totalmente coloreados de la mandarina `Clemenules´ y de los híbridos `Nova´ y `Fortune´.

	<i>a/b</i>	$\mu\text{g/g PF}$		
		$\beta$ -criptoxantina	$\beta$ -citraurina	$\beta$ -criptoxantina + $\beta$ -citraurina
Nova	1.08 $\pm$ 0.08	10.30 $\pm$ 0.32	3.28 $\pm$ 0.01	13.59 $\pm$ 0.34
Fortune	0.94 $\pm$ 0.11	5.34 $\pm$ 0.30	5.84 $\pm$ 0.42	11.18 $\pm$ 0.11
Clemenules	0.86 $\pm$ 0.06	3.94 $\pm$ 0.14	2.36 $\pm$ 0.04	5.14 $\pm$ 1.05

Los factores externos que pueden influir en la coloración y en la composición de carotenoides de los frutos cítricos son muy numerosos (revisado en Casas y Mallent 1988a; 1988b; 1989). En este estudio los frutos fueron recolectados el mismo año y de la misma parcela y por lo tanto, estuvieron en todo momento expuestos a las mismas condiciones ambientales, por lo que las diferencias de coloración entre los frutos de las variedades deben ser atribuidas exclusivamente a factores genéticos. Las variaciones de la composición de carotenoides entre los frutos de las tres variedades se compararon con la

acumulación de transcritos correspondientes a genes implicados en la biosíntesis de IPP plastídico (Figura 49) y de carotenos lineales (Figura 50), en la ciclación del licopeno (Figura 51) y en la biosíntesis de xantofilas (Figura 52). De forma resumida se puede generalizar que no se encontraron diferencias importantes en los niveles de expresión de los genes estudiados que expliquen las diferencias en la acumulación de carotenoides entre los frutos de las tres variedades. Pese a que los genes de biosíntesis de carotenoides analizados cubren la práctica totalidad de la ruta, otros genes, hasta el momento no estudiados, podrían explicar las diferencias observadas entre las tres variedades. Por ejemplo, diferencias del nivel de expresión del gen que codifica VDE, que cataliza la formación secuencial de zeaxantina a partir de violaxantina via anteraxantina, podrían explicar la acumulación de anteraxantina en el flavedo de `Nova´ y/o de zeaxantina en la pulpa de `Fortune´, así como las diferencias del contenido de violaxantina entre el flavedo de las tres mandarinas.

La  $\beta$ -citraurina es un apocarotenoide  $C_{30}$  específico del género *Citrus* cuyo origen biosintético se desconoce, aunque se han sugerido la zeaxantina o la  $\beta$ -criptoxantina como posibles precursores (Yokoyama y White 1966; Farin *et al.* 1983; Rodrigo y Zacarías 2006). Además de  $\beta$ -citraurina, las mandarinas acumulan otros apocarotenoides como  $\beta$ -apo-8'-carotenal,  $\beta$ -citraurino,  $\beta$ -citraurolo,  $\beta$ -apo-2'-carotenal y  $\beta$ -apo-10'-carotenal (Gross *et al.* 1972; Gross 1987). Los apocarotenoides son productos de la rotura de carotenoides y, algunos de ellos, como la  $\beta$ -ionona, son compuestos volátiles que influyen en el aroma de los frutos (Camara y Bouvier 2004; Simkin *et al.* 2004a; Simkin *et al.* 2004b; Lewinsohn *et al.* 2005a). La rotura de carotenoides está catalizada por una familia de enzimas denominadas genéricamente CCDs (Giuliano *et al.* 2003; Camara y Bouvier 2004; Lewinsohn *et al.* 2005a). Diferencias en la expresión de los genes *CCDs*, que codifican las enzimas de corte de carotenoides, podrían modificar el nivel de acumulación tanto de sus sustratos como de sus productos. A partir de frutos de mandarina se han clonado tres genes que codifican CCDs: *CitCCD1* (Kato *et al.* 2006) y *CcCCD4a* y *CcCCD4b* (Agustí *et al.* 2007). El nivel de expresión de *CitCCD1* aumenta durante la maduración de los frutos, y la enzima que codifica actúa de forma inespecífica sobre varios carotenoides, generando apocarotenoides  $C_{14}$  y  $C_{13}$  (Kato *et al.* 2006). Sin embargo, dado que *CitCCD1* no presenta diferencias de expresión entre el limón `Lisbon´, la naranja `Valencia´ y la mandarina Satsuma, Kato *et al.* (2006) descartan la posible influencia de este gen en la composición de carotenoides. Adicionalmente, tanto *CitCCD1*

(Kato *et al.* 2006) como CcCCD4b (Agustí *et al.* 2007) carecen de péptido señal de importación a los plastidios, donde tiene lugar la biosíntesis y acumulación de carotenoides, por lo que parece improbable que participen en la biosíntesis de apocarotenoides cromoplásticos.

## 7. Bases bioquímicas y moleculares de las diferencias de coloración entre frutos de naranjas y mandarinas

### a) Bases bioquímicas

Los frutos de las naranjas y las mandarinas presentan un amplio rango de coloraciones anaranjadas. La coloración del flavedo de las mandarinas varía desde el amarillo anaranjado de la Satsuma al rojo intenso de `Nova` (Casas y Mallent 1988b). En el caso de las naranjas, la coloración del flavedo varía desde el naranja pálido de la variedad `Valencia` al naranja intenso de la variedad `Navelina`, e incluso se han caracterizado mutantes que presentan coloración amarilla (Rodrigo *et al.* 2003). La coloración de la pulpa de naranjas y mandarinas también presenta un amplio rango de coloraciones, desde el naranja pálido al naranja rojizo. Salvo en el caso de las naranjas sanguinas, cuya coloración rojiza en la pulpa se debe a la presencia de antocianos (Lee 2002), la coloración de los frutos cítricos se encuentra determinada por el contenido y la composición de carotenoides (Gross *et al.* 1972; Stewart y Wheaton 1973; Stewart y Leuenberger 1976; Farin *et al.* 1983; Gross 1987; Casas y Mallent 1988b; Oberholster *et al.* 2001; Lee 2001; Rodrigo *et al.* 2003; Kato *et al.* 2004; Rodrigo *et al.* 2004; Xu *et al.* 2006; Rodrigo y Zacarías 2006; Matsumoto *et al.* 2007). Por ejemplo, en el caso de las naranjas `Valencia` y `Washington Navel`, que presentan en la pulpa el mismo perfil cualitativo de carotenoides, la coloración más intensa del zumo de la primera variedad se explica, además de por su mayor contenido de carotenoides, porque posee un ratio de carotenoides naranjas/carotenoides amarillos mayor que `Navel`.

Durante todo el proceso de desarrollo y maduración de los frutos, la composición cualitativa de la mezcla de carotenoides en el flavedo y la pulpa de mandarinas y naranjas es muy semejante (Gross 1987; Kato *et al.* 2004; Matsumoto *et al.* 2007; Figura 28, Figura 29, Figura 47 y Figura 48). Sin embargo, de forma general, el flavedo y la pulpa de las mandarinas presentan una coloración más intensa que los de las naranjas. Esta mayor coloración se debe, principalmente, a la acumulación de  $\beta$ -criptoxantina, un carotenoide abundante en el flavedo y la pulpa de las mandarinas (Stewart 1977; Goodner *et*

*al.* 2001; Kato *et al.* 2004; Dhuique Mayer *et al.* 2005; Melendez Martinez *et al.* 2005; Fanciullino *et al.* 2006). En la pulpa de los frutos maduros de la mandarina `Clemenules´ y de los híbridos `Nova´ y `Fortune´, se ha cuantificado entre 32 y 66 veces más  $\beta$ -criptoxantina que en la pulpa de los frutos maduros de las naranjas `Navel´ y `Cara Cara´ (Figura 29 y Figura 48). Estos resultados, que explican la coloración más intensa de la pulpa de las mandarinas estudiadas, concuerdan con los datos bibliográficos, en los que en función de las variedades comparadas el ratio de  $\beta$ -criptoxantina mandarina/naranja oscila entre 1.5 y 60 (Stewart 1977; Kato *et al.* 2004; Fanciullino *et al.* 2006). Además de un mayor contenido de  $\beta$ -criptoxantina, en la pulpa de las mandarinas se suele acumular más  $\beta$ -caroteno que en la de las naranjas (Fanciullino *et al.* 2006; Figura 29 y Figura 48). La diferencia cuantitativa del contenido de violaxantina, principal carotenoide de las naranjas maduras (Stewart y Leuenberger 1976; Gross 1987; Rodrigo *et al.* 2004), entre la pulpa de las naranjas y las mandarinas depende de las variedades concretas comparadas. En esta Tesis se determinó que, en el estadio maduro, la pulpa de la naranja `Navel´ acumula alrededor de dos veces menos violaxantina que la de la mandarina `Clemenules´ y la de los híbridos `Nova´ y `Fortune´ (Figura 29 y Figura 48). También en el flavedo se encontraron diferencias cuantitativas en el contenido de algunos carotenoides. El contenido de  $\beta$ -criptoxantina del flavedo de `Clemenules´, `Nova´ y `Fortune´ fue entre 5 y 13 veces mayor que el de las naranjas `Navel´ y `Cara Cara´ (Figura 28 y Figura 47). Kato *et al.* (2004) también encontraron un mayor contenido de  $\beta$ -criptoxantina en el flavedo de la mandarina Satsuma que en el de la naranja `Valencia´. El contenido de violaxantina del flavedo de `Fortune´ y Satsuma fue similar al determinado en el de las naranjas `Navel´ y `Valencia´ (Kato *et al.* 2004; Figura 28 y Figura 47) mientras que en el flavedo de `Clemenules´ y `Nova´, la concentración de este carotenoide fue menor que en naranja `Navel´ (Figura 28 y Figura 47).

#### b) Bases moleculares

Resultados recientes sugieren que el balance entre la expresión de los genes tempranos de la ruta de biosíntesis de carotenoides (*PSY*, *PDS*, *ZDS*,  $\beta$ -*LCY*) y el responsable de la hidroxilación del  $\beta$ -caroteno ( $\beta$ -*CHX*) puede originar la mayor o menor acumulación de  $\beta$ -criptoxantina que se observa en las diferentes especies de cítricos (Kato *et al.* 2004). Así, en la mandarina Satsuma (*C. unshiu* Marc.) se detecta una mayor expresión de los genes tempranos de la ruta y una menor expresión del gen  $\beta$ -*CHX* que en naranja `Valencia´ (*C. sinensis* L. Osb.),

resultando en una mayor acumulación de  $\beta$ -criptoxantina en la mandarina (Kato *et al.* 2004). La aplicación de este análisis a los resultados de este trabajo permite obtener conclusiones similares. En las tres mandarinas estudiadas se apreció una menor acumulación de los transcritos correspondientes a  $\beta$ -CHX que en la naranja 'Navel', tanto en el flavedo como en la pulpa (Figura 33 y Figura 52). El nivel de expresión de *PSY* en naranja 'Navel' fue muy inferior al de  $\beta$ -CHX, siendo la relación de las señales de hibridación *PSY*/ $\beta$ -CHX de 0.13-0.40, tanto en el flavedo como en la pulpa (Figura 33). En las mandarinas 'Clemenules' y 'Nova', el nivel de expresión de *PSY* fue superior al de  $\beta$ -CHX en todas las muestras analizadas, mientras que en la mandarina 'Fortune' la expresión de *PSY* fue, en algunos estadios, ligeramente inferior a la de  $\beta$ -CHX (Figura 50 y Figura 52). En general, la relación de la intensidad de las señales de hibridación *PSY*/ $\beta$ -CHX en las mandarinas presentó valores entre 0.75 y 2.26. Como ejemplo se indica, en la Tabla 19, la relación entre la expresión de *PSY* y  $\beta$ -CHX en el flavedo totalmente coloreado de la naranja 'Navel' y de las tres variedades de mandarina.

Tabla 19: Relación de los niveles de expresión correspondientes a los genes *PSY* y  $\beta$ -CHX en el flavedo de frutos totalmente coloreados de naranja 'Navel' y de las mandarinas 'Clemenules', 'Nova' y 'Fortune'.

	Navel	Clemenules	Nova	Fortune
Flavedo	0.21	1.40	1.04	0.95
Pulpa	0.13	0.96	1.81	0.68

Destaca también el mayor nivel de expresión del gen *ZDS* en las muestras de mandarinas respecto a las de naranja 'Navel' (Figura 33 y Figura 50). Los genes *PDS*, *PTOX*,  $\beta$ -*LCY1* y  $\beta$ -*LCY2*, anteriores a  $\beta$ -CHX en la ruta de biosíntesis de carotenoides, presentaron, tanto en naranjas como en mandarinas, menores niveles de expresión que  $\beta$ -CHX.

En conjunto, de acuerdo con la hipótesis de Xu *et al.* (2004), en mandarinas existe una mayor expresión de los genes tempranos de la ruta, concretamente de *PSY* y *ZDS*, que del gen  $\beta$ -CHX, lo que puede originar la

síntesis de una mayor cantidad de  $\beta$ -caroteno de la que la enzima  $\beta$ -CHX puede transformar a zeaxantina via  $\beta$ -criptoxantina (Figura 2). De hecho, en los tejidos de mandarina se observa una mayor acumulación de  $\beta$ -caroteno que en los de las naranjas (Fanciullino *et al.* 2006; Figura 29 y Figura 48). Estos resultados indicarían que en las naranjas estaría más compensado el balance entre la expresión de los genes anteriores al  $\beta$ -caroteno y los posteriores, y posiblemente se acumularían menos precursores susceptibles de ser transformados a  $\beta$ -criptoxantina. En los frutos de mandarina, parece claro que el equilibrio entre los genes anteriores y posteriores al  $\beta$ -caroteno está desajustado respecto a las naranjas, de forma que se acumula más sustrato ( $\beta$ -caroteno) disponible para la síntesis de  $\beta$ -criptoxantina. Esto sugiere la existencia un ajuste muy fino y equilibrado entre la expresión de los diferentes genes (y las actividades enzimáticas correspondientes) de la biosíntesis de carotenoides, y que pequeños desajustes o alteraciones pueden dar lugar a la acumulación preferencial de algún carotenoide específico de la ruta. Por otro lado, Xu *et al.* (2004) explican la acumulación de  $\beta$ -criptoxantina en las mandarinas en base a una supuesta mayor afinidad de la  $\beta$ -CHX por el  $\beta$ -caroteno que por la  $\beta$ -criptoxantina. Estas diferencias de afinidad conducirían a que, ante un exceso de sustrato, la enzima  $\beta$ -CHX catalizaría preferencialmente la hidroxilación de un anillo del  $\beta$ -caroteno, generando  $\beta$ -criptoxantina, en lugar de una segunda hidroxilación sobre la  $\beta$ -criptoxantina para dar lugar a la zeaxantina. Esta hipótesis se sustenta en ensayos funcionales llevados a cabo con una  $\beta$ -CHX de *Arabidopsis* a la que se ha deletado una parte del extremo amino-terminal (Sun *et al.* 1996). Esta  $\beta$ -CHX truncada cataliza la formación preferencial de  $\beta$ -criptoxantina a partir de  $\beta$ -caroteno, mientras que la  $\beta$ -CHX no modificada genera como producto mayoritario zeaxantina. La  $\beta$ -CHX de los cítricos puede comportarse de forma similar a lo observado en *Arabidopsis*, aunque no existen evidencias directas de esta hipótesis.

## 8. Regulación de la biosíntesis y acumulación de carotenoides en frutos de especies de cítricos con distinto grado de pigmentación

### a) Genes de la biosíntesis de IPP plastídico en frutos cítricos

La biosíntesis de carotenoides ocurre fundamentalmente a partir del IPP plastídico generado mediante la ruta MEP (Figura 3). De esta ruta se han identificado todos los genes implicados, aunque la contribución de cada enzima al control del flujo metabólico, así como su participación en el contenido final de

IPP y DMAPP disponibles para la síntesis de isoprenoides aún no ha sido caracterizada en detalle. La enzima DXS es la única de la ruta MEP cuya funcionalidad ha resultado ser limitante para la síntesis de isoprenoides en todos los organismos analizados, incluyendo *Arabidopsis* (Estevez *et al.* 2001), tomate (Lois *et al.* 2000) y bacterias (Harker y Bramley 1999; Matthews y Wurtzel 2000). Plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* en las que se ha aumentado o disminuido el nivel de DXS muestran un aumento o descenso del contenido de isoprenoides plastídicos, respectivamente, incluyendo los carotenoides, aunque no se observa una correlación directa entre los niveles de variación de DXS y los de derivados isoprenoides (Estevez *et al.* 2001). Estos resultados indican que la disponibilidad de IPP parece ser un factor limitante para la síntesis de derivados isoprenoides y que, por lo menos alguna otra reacción posterior a la síntesis de DXP también juega un papel limitante en la cantidad de IPP sintetizado. La alteración de los niveles de acumulación de DXR, HDS o HDR en menta, *Arabidopsis thaliana* o tabaco produce modificaciones concomitantes del contenido de derivados isoprenoides (Estevez *et al.* 2001; Mahmoud y Croteau 2001; Carretero Paulet *et al.* 2002; Page *et al.* 2004), sugiriendo que estas enzimas ejercen algún control sobre el flujo a través de la ruta MEP. La influencia de los genes de la ruta MEP en la biosíntesis de carotenoides en los frutos es poco conocida. El aumento del contenido de carotenoides que tiene lugar durante el desarrollo y la maduración de frutos de tomate es paralelo al aumento del nivel de expresión de *DXS* y *HDR* (Lois *et al.* 2000; Botella Pavía *et al.* 2004), mientras que *DXR* y *HDS* presentan un patrón de expresión constitutivo (Rodríguez Concepción *et al.* 2001; Rodríguez Concepción *et al.* 2003). En pimiento, la expresión de *DXS* también aumenta durante el desarrollo y la maduración del fruto (Bouvier 1998). En frutos cítricos únicamente se ha caracterizado el patrón de expresión de *DXS* durante la desverdización del flavedo de mandarina 'Clemenules' (Alós *et al.* 2006).

En este trabajo se han estudiado, por primera vez, los patrones de expresión de los genes *DXS*, *HDS* y *HDR* durante el desarrollo y la maduración de los frutos cítricos de distintas especies y variedades (Figura 32, Figura 39 y Figura 49). De acuerdo con los resultados de Alós *et al.* (2006), el gen *DXS* mostró en el flavedo de naranjas, pomelos y mandarinas un nivel de expresión bajo durante el desarrollo del fruto, que aumentó transitoriamente y disminuyó durante los estadios finales de la maduración a un nivel similar al inicial. El aumento transitorio de la expresión se produjo en el flavedo de las naranjas y los

porcelos en el estadio verde-maduro y, alrededor del momento del viraje del color del flavedo en las tres variedades de mandarina. Este aumento en el nivel de expresión de *DXS* podría responder al aumento de IPP plastídico requerido para llevar a cabo la biosíntesis de derivados isoprenoides como GAs (Agustí 2000) o clorofilas (Figura 27, Figura 35 y Figura 46). Finalizada la fase de crecimiento celular e iniciada la degradación de clorofilas, las necesidades de derivados isoprenoides de origen plastídico del fruto disminuyen y, en consecuencia, lo hace el nivel de expresión de *DXS*. En tomate el gen *HDS* presenta un patrón de expresión constitutivo, por lo que se le ha atribuido un papel no limitante en la biosíntesis de IPP plastídico (Rodríguez Concepción *et al.* 2003). Sin embargo, en los frutos de naranjas, pomelos y mandarinas el nivel de expresión de *HDS* aumentó durante el desarrollo y la maduración. La influencia de *DXR* parece ser limitante en función de la especie estudiada, el órgano e incluso del estadio de desarrollo. En plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* los niveles de isoprenoides plastídicos se modifican en función del nivel de acumulación de *DXR* y la acumulación de transcritos correlaciona con el contenido de carotenoides en inflorescencias y durante la desetiología de plántulas (Carretero Paulet *et al.* 2002). Sin embargo, en tomate no se detecta un aumento de la expresión de *DXR* durante el aumento del contenido de carotenoides que tiene lugar durante la maduración del fruto (Rodríguez Concepción *et al.* 2001). Salvo en el flavedo del pomelo 'Marsh', el patrón de expresión de *HDR* en las variedades estudiadas fue muy similar al de *DXS*. También en tomate, donde *DXS* y *HDR* catalizan reacciones limitantes, se ha descrito un patrón de expresión común para ambos genes (Lois *et al.* 2000; Botella Pavía *et al.* 2004). En la pulpa de naranjas, pomelos y mandarinas el nivel de expresión de *DXS*, *HDS* y *HDR* aumentó durante el desarrollo y la maduración del fruto y, al igual que los genes carotenogénicos estudiados, su expresión en este tejido fue menor que en el flavedo, en todos los estadios analizados.

Los resultados presentados en esta Tesis muestran que en los frutos cítricos los niveles de expresión de los genes *DXS*, *HDS* y *HDR* se modifican durante el desarrollo y la maduración indicando que, muy posiblemente, ejercen alguna influencia sobre el flujo metabólico de la ruta MEP. Además, el estudio del mutante de naranja 'Cara Cara', cuyo fenotipo parece responder a la mayor expresión de los genes MEP respecto de la variedad parental (Figura 53), sugiere que en los frutos cítricos, al menos en naranjas, la biosíntesis de carotenoides se encuentra limitada por la disponibilidad de IPP (apartado 4 de este Capítulo).

### b) Genes estructurales de la ruta de biosíntesis de carotenoides

Los mecanismos moleculares que conducen a la práctica ausencia de carotenoides en el pomelo `Marsh` ya han sido discutidos con anterioridad (apartado 5.1 de este Capítulo), y no parecen estar relacionados con diferencias en la expresión de los genes de la biosíntesis de carotenoides estudiados en esta Tesis (Figura 53).

El análisis comparativo de la expresión de los principales genes de la biosíntesis de carotenoides, en el flavedo y la pulpa de los frutos de naranja `Navel` (Figura 31) y de las mandarinas `Clemenules`, `Nova` y `Fortune` (Figura 49 a Figura 52) permite realizar las siguientes consideraciones. Durante el desarrollo y la maduración, en los frutos de todas las especies se produce, tanto en el flavedo como en la pulpa, un aumento del nivel de expresión de los genes iniciales de la ruta *PSY*, *PDS*, *ZDS* y *PTOX* (Figura 33 y Figura 50). Los resultados obtenidos en este trabajo, así como resultados previos en otras variedades (Ikoma *et al.* 2001; Kato *et al.* 2004; Rodrigo *et al.* 2004), muestran que, durante el desarrollo y la maduración de los frutos cítricos existe una buena correlación entre el nivel de expresión de los genes *PSY* y *PDS* y el contenido total de carotenoides. Adicionalmente, trabajos recientes realizados con inhibidores e inductores del cambio de color del flavedo de los frutos cítricos también señalan el papel limitante de *PSY* en la determinación del contenido total de carotenoides. La inhibición, mediante tratamiento con nitrato o GA<sub>3</sub>, del cambio de color de los frutos de `Navel` y `Clemenules` se ha relacionado con un retraso en la acumulación de carotenoides y éste, a su vez, con una disminución de los niveles de expresión de *PSY* respecto de los frutos no tratados (Alós *et al.* 2006; Rodrigo y Zacarías 2006). Por otro lado, durante la inducción del cambio de color del flavedo de naranja `Navel` mediante el tratamiento con etileno se ha observado un aumento del nivel de expresión del gen *PSY* y del contenido total de carotenoides (Rodrigo y Zacarías 2006). Conjuntamente esta serie de resultados indican que la reacción catalizada por *PSY* es el paso limitante que determina el contenido total de carotenoides de los frutos cítricos, como ya se ha indicado en otros frutos, como pimiento, tomate y zanahoria (Huh *et al.* 2001; Bramley 2002; Santos *et al.* 2005). El producto de la reacción catalizada por *PSY* es el fitoeno, que es convertido a fitoflueno y licopeno por la acción secuencial de las enzimas *PDS* y *ZDS*. De los tres genes, *PSY*, *PDS* y *ZDS*, el segundo fue el que presentó, con diferencia, los menores niveles de acumulación de transcritos (Figura 28, Figura 29, Figura 47 y Figura 48). Esta menor

acumulación de transcritos de *PDS* en relación con los del gen *PSY* también ha sido descrita en otros cítricos (Kita *et al.* 2001; Kato *et al.* 2004) y en otros frutos como tomate (Giuliano *et al.* 1993; Ronen *et al.* 1999), pimiento (Hugueney *et al.* 1992) y melocotón (Marty *et al.* 2005). En general, en naranjas y mandarinas los carotenoides más abundantes son las xantofilas, indicando que pese a que el nivel de expresión de *PDS* es muy inferior al de *PSY*, la mayor parte del fitoeno producido es eficientemente transformado a fitoflueno. Lo mismo sucede en tomate, pimiento y melocotón, donde el fitoeno es habitualmente un carotenoide poco abundante. Durante la maduración de la naranja 'Navel' y de las mandarinas 'Clemenules', 'Nova' y 'Fortune' aumenta la concentración de fitoeno (Figura 28, Figura 47 y Figura 49). Este hecho se explicaría por el mayor aumento de la expresión del gen *PSY* que del gen *PDS* durante la maduración del fruto, lo que probablemente conduce a la saturación de la actividad *PDS*. Por ejemplo, en el flavedo de la mandarina 'Nova', donde la expresión de *PSY* aumenta durante los estadios finales de la maduración mientras que la de la *PDS* disminuye, se detectaron hasta 10 µg/g PF de fitoeno. También en limón 'Lisbon' y mandarina Satsuma la reducción de la expresión de *PDS* determinan la acumulación de fitoeno (Kato *et al.* 2004).

El cambio de la composición de carotenoides, de  $\beta,\epsilon$ - a  $\beta,\beta$ -carotenoides, que ocurre en el flavedo de naranjas y mandarinas durante la maduración puede explicarse por reducción de la expresión del gen  $\epsilon$ -*LCY*, implicado en la biosíntesis de  $\alpha$ -caroteno (Figura 28, Figura 31, Figura 47 y Figura 51). Durante los estadios verdes del flavedo se detectan  $\beta,\epsilon$ -carotenoides ( $\alpha$ -caroteno y sus derivados hidroxilados  $\alpha$ -criptoxantina y luteína) cuya concentración disminuye paralelamente al descenso en la expresión de  $\epsilon$ -*LCY*. A partir del estadio verde-maduro no se acumulan  $\beta,\epsilon$ -carotenoides y los transcritos de  $\epsilon$ -*LCY* son prácticamente indetectables. Por otro lado, en la pulpa de naranjas y mandarinas, donde no se produce acumulación de  $\beta,\epsilon$ -carotenoides en ninguno de los estadios analizados, tampoco se detecta acumulación de los transcritos de  $\epsilon$ -*LCY* (Figura 29, Figura 31, Figura 48 y Figura 51). En naranjas 'Navel' y 'Valencia', dado que el patrón de expresión de  $\beta$ -*LCY1* es constitutivo, en el flavedo (Kato *et al.* 2004; Rodrigo *et al.* 2004, Figura 31) y la pulpa (Figura 33), el desvío del flujo de biosíntesis de carotenoides hacia la rama  $\beta,\beta$ - estaría además mediado por la inducción de la expresión del gen  $\beta$ -*LCY2*. En el caso de las mandarinas Satsuma (Kato *et al.* 2004), 'Clemenules', 'Nova' y 'Fortune' (Figura 51) el nivel de expresión del gen  $\beta$ -*LCY1* aumenta durante la maduración.

También lo hace, y en mayor medida, el nivel de expresión de  $\beta$ -*LCY2* (Figura 51). En consecuencia y a diferencia de las naranjas, en las mandarinas tanto  $\beta$ -*LCY1* como  $\beta$ -*LCY2* parecen contribuir al redireccionamiento de metabolitos hacia la rama  $\beta,\beta$ - de la biosíntesis de carotenoides. Sin embargo, existen evidencias que sugieren un papel principal de  $\beta$ -*LCY2* en la biosíntesis de  $\beta,\beta$ -xantofilas. En primer lugar, cabe resaltar que el aumento del nivel de expresión de  $\beta$ -*LCY2* es prácticamente coincidente en el tiempo con la acumulación masiva de  $\beta,\beta$ -xantofilas que se produce durante la maduración tanto en naranjas como en mandarinas. En segundo lugar, en frutos del pomelo 'Star Ruby', donde  $\beta$ -*LCY2* codifica mayoritariamente una enzima con actividad ciclasa muy reducida, se observa acumulación de licopeno (Figura 53), indicando que la actividad  $\beta$ -*LCY1* no es capaz de compensar la ausencia de actividad  $\beta$ -*LCY2*. El papel clave de las enzimas licopeno ciclasa ( $\beta$ - y  $\epsilon$ -) en la regulación de la composición de carotenoides ya ha sido puesto de manifiesto en otras plantas como tomate (Ronen *et al.* 1999; Ronen *et al.* 2000), pimiento (Hugueney *et al.* 1995) y patata (Diretto *et al.* 2006).

Durante el desarrollo y la maduración de los frutos de naranja y mandarinas se estudió la expresión de tres genes implicados en la biosíntesis de xantofilas,  $\epsilon$ -*CHX* y  $\beta$ -*CHX*, responsables de la hidroxilación de los anillos  $\alpha$ - y  $\beta$ -, respectivamente, y *ZEP*. El patrón de expresión de  $\epsilon$ -*CHX* en frutos cítricos, descrito por primera vez en este trabajo, es muy similar al de  $\epsilon$ -*LCY*, mientras que el patrón de expresión de  $\beta$ -*CHX* es muy similar al de  $\beta$ -*LCY2* (Figura 31, Figura 51 y Figura 52). La disminución paralela del nivel de expresión de  $\epsilon$ -*LCY* y  $\epsilon$ -*CHX* conduce a una menor  $\alpha$ -ciclación y a una menor hidroxilación de anillos  $\alpha$ -, respectivamente. Por otro lado, el aumento de la expresión de  $\beta$ -*LCYs* y  $\beta$ -*CHX* favorece la síntesis de  $\beta$ -caroteno y la hidroxilación secuencial de sus anillos  $\beta$ -, respectivamente, produciéndose  $\beta$ -criptoxantina y zeaxantina. La influencia de los niveles de expresión de  $\beta$ -*CHX* en la composición de carotenoides de naranjas y mandarinas ya ha sido discutida previamente (apartado 7.b), Figura 53). En la pulpa del pomelo 'Star Ruby' la baja expresión de  $\beta$ -*CHX* conduce a la práctica ausencia de  $\beta,\beta$ -xantofilas y a la acumulación de  $\beta$ -caroteno (apartado 5.2 de este Capítulo). La influencia de los niveles de expresión de  $\beta$ -*CHX* en la composición de carotenoides también ha sido descrita en otras plantas como tomate y patata. La mutación *wf* de tomate, que conduce a una coloración blanca de los pétalos debido a la práctica ausencia de carotenoides, es consecuencia de alteraciones en la secuencia de una  $\beta$ -*CHX* específica de flores

que resultan en la incapacidad de producir  $\beta,\beta$ -xantofilas, responsables de la coloración amarilla de los pétalos del genotipo parental (Galpaz *et al.* 2006). Por otro lado, frutos transgénicos de tomate que expresan de forma específica en fruto una  $\beta$ -*LCY* y  $\beta$ -*CHX* foráneas adquieren la capacidad de acumular xantofilas (Dharmapuri *et al.* 2002). En tubérculos de patata en los que se ha silenciado la expresión de los genes  $\beta$ -*CHX* endógenos se observa un aumento de hasta 38 veces de  $\beta$ -caroteno y una reducción del contenido de zeaxantina, aunque sorprendentemente no se observa disminución del contenido de otras  $\beta,\beta$ -xantofilas (Diretto *et al.* 2007). Coincidiendo con los resultados descritos por Kato *et al.* (2004) en naranja 'Valencia' y mandarina Satsuma, durante el desarrollo y la maduración de los frutos de la naranja 'Navel' y de las tres mandarinas estudiadas, el nivel de expresión del gen *ZEP* aumentó ligeramente, tanto en el flavedo como en la pulpa (Figura 33 y Figura 52). En la pulpa de la naranja 'Valencia', el nivel de expresión de *ZEP* es superior al existente en la de mandarina Satsuma. Estas diferencias del nivel de expresión de *ZEP* pueden explicar la mayor acumulación de zeaxantina en Satsuma y del producto de epoxidación de la zeaxantina (violaxantina) en naranja 'Valencia' (Kato *et al.* 2004). Sin embargo, en este trabajo no se encontraron diferencias importantes en el nivel de expresión de *ZEP* entre la naranja y las mandarinas estudiadas, ni siquiera entre las mandarinas 'Clemenules' y 'Fortune' pese a que la concentración de violaxantina en el flavedo totalmente coloreado de 'Clemenules' fue un 70% inferior a la de 'Fortune' (Figura 47). Tal y como se ha mencionado anteriormente, diferencias en el nivel de expresión de otros genes no estudiados en este trabajo como *VDE* o *CCDs* específicas de xantofilas, podrían explicar los diferentes contenidos de zeaxantina, anteraxantina y violaxantina en las distintas variedades de mandarinas (apartado 6 de este Capítulo).

En resumen, en líneas generales la variación del contenido y composición de carotenoides que se observa en las naranjas, las mandarinas y la pulpa del pomelo 'Star Ruby' durante el desarrollo y la maduración se correlaciona con los patrones de expresión de los genes de la ruta de biosíntesis de carotenoides. El incremento del contenido de carotenoides podría ser el resultado de un aumento de la transcripción de los genes iniciales de la ruta (*PSY*, *PDS*, *ZDS*, *PTOX*). El cambio en el perfil cualitativo de  $\beta,\epsilon$ - a  $\beta,\beta$ -carotenoides que ocurre en el flavedo durante la maduración puede explicarse por reducción de la expresión de los genes  $\epsilon$ -*LCY* y  $\epsilon$ -*CHX* (implicados en la biosíntesis  $\alpha$ -caroteno y luteína) e inducción de la expresión de  $\beta$ -*LCYs*,  $\beta$ -*CHX* y *ZEP*, desviándose el flujo de la ruta

de biosíntesis de carotenoides hacia la acumulación de  $\beta,\beta$ -xantofilas ( $\beta$ -criptoxantina y violaxantina, fundamentalmente). En la pulpa, donde la expresión de  $\epsilon$ -*LCY* es muy baja o indetectable, no se acumulan  $\beta,\epsilon$ -carotenoides. En el caso de la pulpa del pomelo 'Star Ruby', donde  $\beta$ -*LCY2* codifica una proteína no funcional, se acumula fundamentalmente licopeno y el poco  $\beta$ -caroteno producido parece que no es hidroxilado debido a los bajos niveles de expresión de  $\beta$ -*CHX*. Tanto en naranja 'Navel' como en las mandarinas, el contenido de carotenoides es superior en el flavedo que en la pulpa durante todo el proceso de desarrollo y maduración del fruto, como se ha descrito en frutos con elevada capacidad carotenogénica (Gross 1987). Estos resultados son consistentes con una mayor expresión de todos los genes de la biosíntesis de carotenoides en el flavedo respecto a la pulpa, en todos los estadios analizados (Figura 31, Figura 33 y Figura 50 a Figura 52).

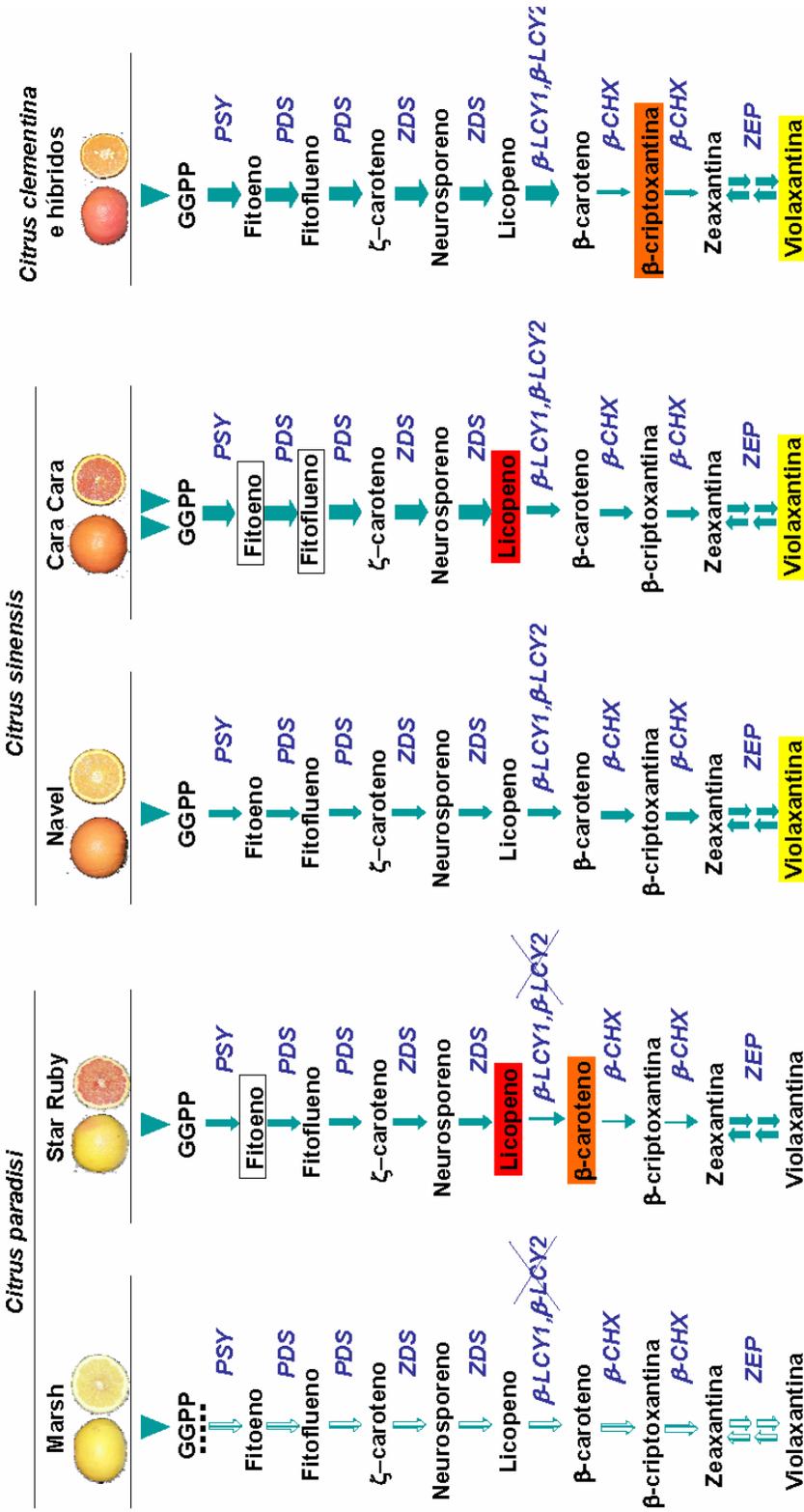


Figura 53: Esquema representativo que ilustra las similitudes y diferencias en las distintas etapas de la ruta de biosíntesis de carotenoides en los frutos de las diferentes variedades de cítricos estudiados en este trabajo, así como las posibles etapas alteradas en cada uno de ellos. Se recuadran los principales carotenoides que se acumulan en cada variedad. El grosor de las flechas representa el flujo metabólico en cada etapa. Las representaciones correspondientes al pomelo `Star Ruby´ y a la naranja `Cara Cara´ se refieren a la pulpa de ambos genotipos.



---

**CONCLUSIONES**

---



## CONCLUSIONES

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

1.- Se han aislado y caracterizado de frutos cítricos los genes  $\beta$ -*LCY1* y  $\epsilon$ -*LCY* y, mediante ensayos de expresión heteróloga en *E.coli*, se ha demostrado que codifican enzimas con actividad  $\beta$ - y  $\epsilon$ -licopeno ciclasa, respectivamente.

2.- Se ha aislado y caracterizado de frutos cítricos un nuevo gen, denominado  $\beta$ -*LCY2* y, mediante ensayos de expresión heteróloga en *E.coli*, se ha demostrado que codifica una enzima con actividad  $\beta$ -licopeno ciclasa, aunque menor que la de  $\beta$ -*LCY1*. El gen  $\beta$ -*LCY2* carece de intrones y presenta una expresión específica de tejido cromoplástico. Su expresión, en el flavedo y la pulpa, se induce durante la maduración del fruto y se correlaciona con la acumulación de  $\beta$ , $\beta$ -xantofilas, sugiriendo que este gen desempeña un papel importante en el redireccionamiento de la ruta y en la acumulación de carotenoides.

3.- Se han identificado en el genoma de las especies de cítricos estudiadas (*C. sinensis*, *C. paradisi* y *C. clementina*), dos alelos del gen  $\beta$ -*LCY2*, que son 96% idénticos en sus secuencias promotoras y codificantes. El alelo  $\beta$ -*LCY2a* codifica una enzima con actividad  $\beta$ -licopeno ciclasa, mientras que  $\beta$ -*LCY2b* codifica una proteína con muy reducida actividad licopeno ciclasa. Se han identificado alteraciones en la secuencia codificante de  $\beta$ -*LCY2b* que podrían explicar su baja actividad licopeno ciclasa. En *C. sinensis* el alelo funcional ( $\beta$ -*LCY2a*) se transcribe en una proporción mayor o similar a la del alelo no funcional ( $\beta$ -*LCY2b*), mientras que en *C. paradisi* se transcribe mayoritariamente el alelo no funcional.

4.- El mutante de naranja 'Cara Cara' acumula altas concentraciones de licopeno en la pulpa, que le proporciona coloración roja, y los carotenos lineales fitoeno y fitoflueno. La mutación incrementa también el contenido de carotenos en el flavedo. Estos efectos se manifiestan desde estadios tempranos del desarrollo del fruto.

5.- No se han detectado deficiencias en la actividad de las enzimas  $\beta$ -LCYs, ni alteraciones en la expresión de los genes estructurales de la ruta de biosíntesis de carotenoides, que justifiquen la acumulación de licopeno en la pulpa de la naranja `Cara Cara`. Sin embargo, se ha observado una mayor expresión de los genes de la ruta MEP (*DXS*, *HDS*, *HDR*), que podría repercutir en un incremento del flujo de entrada de intermediarios metabólicos en la ruta de biosíntesis de carotenoides, y ocasionaría acumulación de carotenos lineales.

6.- El análisis de carotenoides en el pomelo blanco `Marsh` y el pomelo rojo `Star Ruby` reveló que el primero tiene muy bajas concentraciones de carotenoides, tanto en el flavedo como en la pulpa. En el pomelo `Star Ruby` se acumulan fundamentalmente carotenos lineales, siendo los carotenoides mayoritarios el fitoeno en el flavedo y el licopeno en la pulpa.

7.- No se observaron diferencias significativas en la expresión de los genes MEP y de biosíntesis de carotenoides estudiados entre los tejidos de los frutos de los pomelos `Marsh` y `Star Ruby`. Por tanto, la expresión de los genes estudiados no explica la deficiencia de carotenoides en los frutos maduros del pomelo `Marsh`.

8.- El pomelo `Star Ruby` presentó bajos niveles de expresión de los genes  $\beta$ -LCY2 y  $\beta$ -CHX. La baja expresión de  $\beta$ -LCY2 unido a la transcripción mayoritaria del alelo no funcional ( $\beta$ -LCY2b) podría justificar la acumulación de licopeno y sus precursores. La baja expresión de  $\beta$ -CHX explicaría la acumulación de  $\beta$ -caroteno.

9.- La reducción de la iluminación durante la maduración de los frutos del pomelo `Star Ruby` acelera la desverdización y promueve una coloración final más intensa. Este efecto incrementa el contenido en licopeno en el flavedo de los frutos, pero no modifica su contenido total de carotenoides ni la expresión de los genes de biosíntesis de carotenoides estudiados.

10.- La coloración más intensa de los híbridos de mandarina `Fortune` y `Nova` respecto a la mandarina `Clemenules` parece deberse principalmente a la acumulación de  $\beta$ -criptoxantina y  $\beta$ -citraurina. La concentración de estos

carotenoides fue significativamente superior en el flavedo y la pulpa de las mandarinas que en los tejidos de naranja 'Navel'.

11.- No se han encontrado diferencias importantes en la expresión de los genes estudiados entre las tres variedades de mandarina. En los tejidos de las mandarinas la expresión de los genes tempranos de la ruta, particularmente *PSY* y *ZDS*, fue superior a la del gen  $\beta$ -*CHX*, de forma contraria a lo que sucede en los tejidos de naranjas. Parece, por tanto, que el equilibrio entre la expresión de los genes tempranos de la ruta y el del gen  $\beta$ -*CHX*, en los diferentes tejidos y/o variedades de frutos cítricos, puede determinar la acumulación de  $\beta$ -criptoxantina en los mismos.



## BIBLIOGRAFÍA

---



## BIBLIOGRAFÍA

- Agustí, J., Zapater, M., Iglesias, D. J., Cercós, M., Tadeo, F. R., y Talón, M. (2007). Differential expression of putative 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenases and abscisic acid accumulation in water stressed vegetative and reproductive tissues of citrus. *Plant Sci.*, 72(1): 85-94.
- Agustí, M. (2000). *Citricultura*. Barcelona: Mundi-Prensa.
- al Babili, S., Hartung, W., Kleinig, H., y Beyer, P. (1999). CPTA modulates levels of carotenogenic proteins and their mRNAs and affects carotenoid and ABA content as well as chromoplast structure in *Narcissus pseudonarcissus* flowers. *Plant Biol.*, 1(6): 607-612.
- al Babili, S., Huguene, P., Schledz, M., Welsch, R., Frohnmeyer, H., Laule, O., y Beyer, P. (2000). Identification of a novel gene coding for neoxanthin synthase from *Solanum tuberosum*. *FEBS Lett.*, 485(2-3): 168-172.
- al Babili, S., von Lintig, J., Haubruck, H., y Beyer, P. (1996). A novel, soluble form of phytoene desaturase from *Narcissus pseudonarcissus* chromoplasts is Hsp70-complexed and competent for flavinylation, membrane association and enzymatic activation. *Plant J.*, 9(5): 601-612.
- Alba, R., Cordonnier Pratt, M. M., y Pratt, L. H. (2000). Fruit-localized phytochromes regulate lycopene accumulation independently of ethylene production in tomato. *Plant Physiol.*, 123(1): 363-370.
- Alós, E., Cercós, M., Rodrigo, M. J., Zacarías, L., y Talón, M. (2006). Regulation of color break in citrus fruits. Changes in pigment profiling and gene expression induced by gibberellins and nitrate, two ripening retardants. *J. Agric. Food Chem.*, 54(13): 4888-4895.
- Alquézar, B., Rodrigo, M. J., y Zacarías, L. (2005). Molecular characterization of Cara Cara, a red-fleshed mutant of orange fruit (*C. sinensis* L. Osbeck). *Carotenoid Science*, 9: 147.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., y Lipman, D. J. (1990). Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.*, 215(3): 403-410.
- Antognozzi, E., Boco, M., Famiani, F., y Palliotti, A. (1995). Effect of different light intensity on quality and storage life of kiwi fruit. *Acta Hort.*, 379: 483-490.
- Aranda, M. A. (1986). Influencia de la posición de las naranjas W.Navel en el árbol sobre el color y el contenido de pigmentos de las mismas. *Tesis de Licenciatura. Fac. Biol. Univ. Valencia*.

- Bain, J. M. (1958). Morphological, anatomical and physiological changes in the developing fruit of Valencia orange, *Citrus sinensis* L. Osbeck. *Aust.J.Bot.*, 6: 1-28.
- Ballester, A. R., Lafuente, M. T., y Gonzalez Candelas, L. (2006). Spatial study of antioxidant enzymes, peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase in the citrus fruit-*Penicillium digitatum* interaction. *Postharvest Biol.and Technol.*, 39(2): 115-124.
- Banet, E., Romojaro, F., y Llorente, S. (1981). Evolucion de pigmentos fotosinteticos en flavedo y pulpa de pomelo Marsh. *Anales de Edafologia y Agrobiologia*: 259-267.
- Barr, J., White, W. S., Chen, L., Bae, H., y Rodermeil, S. (2004). The GHOST terminal oxidase regulates developmental programming in tomato fruit. *Plant, Cell and Environment*, 27(7): 840-852.
- Barret, M. C. y Rhodes, A. M. (1976). A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated *Citrus* and its close relatives. *Systematic Bot*, 1: 105-135.
- Benedict, C. R., Rosenfield, C. L., Mahan, J. R., Madhavan, S., y Yokoyama, H. (1985). The chemical-regulation of carotenoid biosynthesis in citrus. *Plant Sci.*, 41(3): 169-173.
- Beyer, P., Kröncke, U., y Nievelstein, V. (1991). On the mechanism of the lycopene isomerase/cyclase reaction in *Narcissus pseudonarcissus* L. chromoplasts. *J.Biol.Chem.*, 266(26): 17072-17078.
- Bianchini, R. y Penteado, M. (1998). Carotenoides de pimentoes amarelos (*Capsicum annum*, L.). Caracterizacao e verificacao de mudancas com o conozimento. *Cien.Tecnol.Alimen.*, 18(3): 283-288.
- Blount, J. D., Metcalfe, N. B., Birkhead, T. R., y Surai, P. F. (2003). Carotenoid modulation of immune function and sexual attractiveness in zebra finches. *Science*, 300(5616): 125-127.
- Bonk, M., Hoffmann, B., von Lintig, J., Schledz, M., al Babili, S., Hobeika, E., Kleining, H., y Beyer, P. (1997). Chloroplast import of four carotenoid biosynthetic enzymes *in vitro* reveals differential fates prior to membrane binding and oligomeric assembly. *Eur.J.Biochem.*,(247): 942-950.
- Botella Pavía, P., Besumbes, O., Phillips, M. A., Carretero Paulet, L., Boronat, A., y Rodríguez Concepción, M. (2004). Regulation of carotenoid biosynthesis in plants: evidence for a key role of hydroxymethylbutenyl

- diphosphate reductase in controlling the supply of plastidial isoprenoid precursors. *Plant J.*, 40(2): 188-199.
- Botella Pavía, P. y Rodríguez Concepción, M. (2006). Carotenoid biotechnology in plants for nutritionally improved foods. *Physiol.Plant.*, 126(3): 369-381.
- Bouvier, F. (1998). Dedicated roles of plastid transketolases during the early onset of isoprenoid biogenesis in pepper fruits. *Plant Physiol.*, 117(4): 1423-1431.
- Bouvier, F., Dogbo, O., y Camara, B. (2003a). Biosynthesis of the food and cosmetic plant pigment Bixin (Annato). *Science*, 300: 2089-2091.
- Bouvier, F., d'Harlingue, A., Backhaus, R. A., Kumagai, M. H., y Camara, B. (2000). Identification of neoxanthin synthase as a carotenoid cyclase paralog. *Eur.J.Biochem.*, 267(21): 6346-6352.
- Bouvier, F., d'Harlingue, A., y Camara, B. (1997). Molecular analysis of carotenoid cyclase inhibition. *Arch.Biochem.Biophys.*, 346(1): 53-64.
- Bouvier, F., d'Harlingue, A., Hugueney, P., Marin, E., Marion Poll, A., y Camara, B. (1996). Xanthophyll biosynthesis. Cloning, expression, functional reconstitution, and regulation of  $\beta$ -cyclohexenyl carotenoid epoxidase from pepper (*Capsicum annuum*). *J.Biol.Chem.*, 271(46): 28861-28867.
- Bouvier, F., Hugueney, P., d'Harlingue, A., Kuntz, M., y Camara, B. (1994). Xanthophyll biosynthesis in chromoplasts: isolation and molecular cloning of an enzyme catalyzing the conversion of 5,6-epoxycarotenoid into ketocarotenoid. *Plant J.*, 6(1): 45-54.
- Bouvier, F., Keller, Y., d'Harlingue, A., y Camara, B. (1998). Xanthophyll biosynthesis: molecular and functional characterization of carotenoid hydroxylases from pepper fruits (*Capsicum annuum* L.). *Biochim.Biophys.Acta*, 1391(3): 320-328.
- Bouvier, F., Suire, C., Mutterer, J., y Camara, B. (2003b). Oxidative remodeling of chromoplast carotenoids: identification of the carotenoid dioxygenase *CsCCD* and *CsZCD* genes involved in Crocus secondary metabolite biogenesis. *Plant Cell*, 15(1): 47-62.
- Bouvier, F., Rahier, A., y Camara, B. (2005). Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids. *Prog.Lipid Res.*, 44(6): 357-429.
- Bramley, P. (2002). Regulation of carotenoid formation during tomato fruit ripening and development. *J.Exp.Bot.*, 53(377): 2107-2113.

- Brandt, S., Pek, Z., Barna, E., Lugasi, A., y Helyes, L. (2006). Lycopene content and colour of ripening tomatoes as affected by environmental conditions. *J.Sci.Food Agric.*, 86(4): 568-572.
- Breitenbach, J. y Sandmann, G. (2005).  $\zeta$ -Carotene *cis* isomers as products and substrates in the plant poly-*cis* carotenoid biosynthetic pathway to lycopene. *Planta*, 220(5): 785-793.
- Breitenbach, J., Zhu, C. F., y Sandmann, G. (2001). Bleaching herbicide norflurazon inhibits phytoene desaturase by competition with the cofactors. *J.Agric.Food Chem.*, 49(11): 5270-5272.
- Britton, G. (1998). Overview of carotenoid biosynthesis. En: G. Britton, S. Liaaen Jensen, y H. Pfander (Eds.), *Biosynthesis and Metabolism*: 13-148. Basel: Birkhäuser Verlag.
- Britton, G. (1995). Spectroscopy. En: G. Britton, S. Liaaen Jensen, y H. Pfander (Eds.), *Biosynthesis and Metabolism*: 13-62. Basel: Birkhäuser Verlag.
- Bru, C., Courcelle, E., Carrere, S., Beausse, Y., Dalmar, S., y Kahn, D. (2005). The ProDom database of protein domain families: more emphasis on 3D. *Nucl.Acids Res.*, 33(suppl\_1): D212-D215.
- Camara, B. (1993). Plant phytoene synthase complex - Component enzymes, immunology, and biogenesis. *Methods Enzymol.*, 214: 352-365.
- Camara, B. y Bouvier, F. (2004). Oxidative remodeling of plastid carotenoids. *Arch.Biochem.Biophys.*, 430(1): 16-21.
- Cameron, J. W., Soost, R. K., y Olson, F. O. (1964). Chimeral basis for color in pink and red grapefruit. *J.Hered.*, 55: 23-28.
- Campbell, R. J. y Marini, R. P. (1992). Light environment and time of harvest affect Delicious apple fruit characteristics. *J.Am.Soc.Hort.Sci.*, 117(4): 551-557.
- Candau, R., Bejarano, E. R., y Cerdá Olmedo, E. (1991). *In vivo* channeling of substrates in an enzyme aggregate for  $\beta$ -carotene biosynthesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 88(11): 4936-4940.
- Carol, P. y Kuntz, M. (2001). A plastid terminal oxidase comes to light: implications for carotenoid biosynthesis and chlororespiration. *Trends Plant Sci.*, 6(1): 31-36.
- Carretero Paulet, L., Ahumada, I., Cunillera, N., Rodríguez Concepción, M., Ferrer, A., Boronat, A., y Campos, N. (2002). Expression and molecular analysis of the *Arabidopsis* DXR gene encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, the first committed enzyme of the 2-C-

- methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway. *Plant Physiol.*, 129(4): 1581-1591.
- Casas, A. y Mallent, M. D. (1989). El color de los frutos cítricos. III. Modificación del color mediante tratamientos pre-recolección. *Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment.*, 29(2): 173-190.
- Casas, A. y Mallent, M. D. (1988a). El color de los frutos cítricos. II. Factores que influyen en el color (continuación). Influencia de la fertilización, del portainjerto y otros. *Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment.*, 28(3): 344-356.
- Casas, A. y Mallent, M. D. (1988b). El color de los frutos cítricos. I. Generalidades. II. Factores que influyen en el color. Influencia de la especie, la variedad y la temperatura. *Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment.*, 28(2): 183-202.
- Chang, Y. H., Raymundo, L. C., Glass, R. W., y Simpson, K. L. (1977). Effect of high-temperature on CPTA-induced carotenoid biosynthesis in ripening tomato fruits. *J. Agric. Food Chem.*, 25(6): 1249-1251.
- Conesa Martínez, A., Párraga Rosa, M. J., García Lidon, M., Vidal Luna, J. J., Porrás Castillo, I., and Mirasol Carmona, E. (1999). Influencia de la posición del fruto en el árbol sobre la coloración externa del pomelo. Actas V Congreso Nacional del color. Tarrassa (Barcelona). España.
- Cookson, P. J., Kiano, J. W., Shipton, C. A., Fraser, P. D., Romer, S., Schuch, W., Bramley, P., y Pyke, K. A. (2003). Increases in cell elongation, plastid compartment size and phytoene synthase activity underlie the phenotype of the *high pigment-1* mutant of tomato. *Planta*, 217: 896-903.
- Corazza Nunes, M. J., Machado, M. A., Nunes, W. M. C., Cristofani, M., y Targon, M. L. P. N. (2002). Assessment of genetic variability in grapefruits (*Citrus paradisi* Macf.) and pummelos (*C. maxima* (Burm.) Merr.) using RAPD and SSR markers. *Euphytica*, 126(2): 169-176.
- Corelli Grapadelli, L. y Coston, D. C. (1991). Thinning pattern and light environment in peach tree canopies influence fruit quality. *HortScience*, 26(12): 1464-1466.
- Corona, V., Aracri, B., Kosturkova, G., Bartley, G. E., Pitto, L., Giorgetti, L., Scolnik, P. A., y Giuliano, G. (1996). Regulation of a carotenoid biosynthesis gene promoter during plant development. *Plant J.*, 9(4): 505-512.

- Criado, M. N., Motilva, M. J., Goni, M., y Romero, M. P. (2007). Comparative study of the effect of the maturation process of the olive fruit on the chlorophyll and carotenoid fractions of drupes and virgin oils from Arbequina and Farga cultivars. *Food Chem.*, 100(2): 748-755.
- Cunningham, F. X. (2002). Regulation of carotenoid synthesis and accumulation in plants. *Pure and Appl.Chem.*, 74: 1409-1417.
- Cunningham, F. X., Chamovitz, D., Misawa, N., Gantt, E., y Hirschberg, J. (1993). Cloning and functional expression in *Escherichia coli* of a cyanobacterial gene for lycopene cyclase, the enzyme that catalyzes the biosynthesis of  $\beta$ -carotene. *FEBS Lett.*, 328(1-2): 130-138.
- Cunningham, F. X. y Gantt, E. (2001). One ring or two? Determination of ring number in carotenoids by lycopene  $\epsilon$ -cyclases. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 98(5): 2905-2910.
- Cunningham, F. X. y Gantt, E. (1998). Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annu.Rev.Plant Physiol.Plant Mol.Biol.*, 48: 557-589.
- Cunningham, F. X., Pogson, B. J., Sun, Z., McDonald, K. A., DellaPenna, D., y Gantt, E. (1996). Functional analysis of the  $\beta$  and  $\epsilon$  lycopene cyclase enzymes of *Arabidopsis* reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation. *Plant Cell*, 8(9): 1613-1626.
- Curl, A. L. y Bailey, G. F. (1957). Tangerine carotenoids - the carotenoids of tangerines. *J.Agric.Food Chem.*, 5(8): 605-608.
- Curl, A. L. y Bayley, G. F. (1961). The carotenoids of Navel oranges. *J.Food Sci.*, 26: 442-447.
- D'Ambrosio, C., Giorio, G., Marino, I., Merendino, A., Petrozza, A., Salfi, L., Stigliani, A. L., y Cellini, F. (2004). Virtually complete conversion of lycopene into  $\beta$ -carotene in fruits of tomato plants transformed with the tomato lycopene  $\beta$ -cyclase (tlcy-b) cDNA. *Plant Sci.*, 166(1): 207-214.
- Dall'Osto, L., Cazzaniga, S., North, H., Marion Poll, A., y Bassi, R. (2007). The *Arabidopsis aba4-1* mutant reveals a specific function for neoxanthin in protection against photooxidative stress. *Plant Cell*, 19(3): 1048-1064.
- Daood, H. G., Biacs, P., Czinkotai, B., y Hoschke, A. (1992). Chromatographic investigation of carotenoids, sugars and organic acids from *Diospyros kaki* fruits. *Food Chem.*, 45(2): 151-155.
- Davies, B. H. (1976). Carotenoids. New York: Academic Press.

- Davuluri, G. R., van Tuinen, A., Fraser, P. D., Manfredonia, A., Newman, R., Burgess, D., Brummell, D. A., King, S. R., Palys, J., Uhlig, J., Bramley, P., Pennings, H. M. J., y Bowler, C. (2005). Fruit-specific RNAi-mediated suppression of DET1 enhances carotenoid and flavonoid content in tomatoes. *Nature Biotechnology*, 23(7): 890-895.
- De la Guardia, M. D., Aragon, C. M., Murillo, F. J., y Cerdá Olmedo, E. (1971). A carotenogenic enzyme aggregate in *Phycomyces*: evidence from quantitative complementation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 68(9): 2012-2015.
- Delgado Vargas, F., Jimenez, A. R., y Paredes López, O. (2000). Natural pigments: Carotenoids, anthocyanins and betalains -- Characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 40(3): 173-289.
- DellaPenna, D. y Pogson, B. J. (2006). Vitamin synthesis in plants: tocopherols and carotenoids. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57(1): 711-738.
- Dellaporta, S. L., Wood, J., y Hicks, J. B. (1983). A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 1(4): 19-21.
- Demmig Adams, B., Gilmore, A. M., y Adams, W. W. (1996). Carotenoids .3. *In vivo* functions of carotenoids in higher plants. *FASEB J.*, 10(4): 403-412.
- Deruere, J., Bouvier, F., Steppuhn, J., Klein, A., Camara, B., y Kuntz, M. (1994). Structure and expression of two plant genes encoding chromoplast-specific proteins: occurrence of partially spliced transcripts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 199(3): 1144-1150.
- Dharmapuri, S., Rosati, C., Pallara, P., Aquilani, R., Bouvier, F., Camara, B., y Giuliano, G. (2002). Metabolic engineering of xanthophyll content in tomato fruits. *FEBS Lett.*, 519(1-3): 30-34.
- Dhuique Mayer, C., Caris Veyrat, C., Ollitrault, P., Curk, F., y Amiot, M. J. (2005). Varietal and interspecific influence on micronutrient contents in citrus from the Mediterranean area. *J. Agric. Food Chem.*, 53(6): 2140-2145.
- Diretto, G., Tavazza, R., Welsch, R., Pizzichini, D., Mourgues, F., Papacchioli, V., Beyer, P., y Giuliano, G. (2006). Metabolic engineering of potato tuber carotenoids through tuber-specific silencing of lycopene  $\epsilon$ -cyclase. *BMC Plant Biol.*, 6(1): 13.
- Diretto, G., Welsch, R., Tavazza, R., Mourgues, F., Pizzichini, D., Beyer, P., y Giuliano, G. (2007). Silencing of  $\beta$ -carotene hydroxylase increases total

- carotenoid and  $\beta$ -carotene levels in potato tubers. *BMC Plant Biol.*, 7: 11.
- Dogbo, O. y Camara, B. (1987). Purification of isopentenyl pyrophosphate isomerase and geranylgeranyl pyrophosphate synthase from *Capsicum* chromoplasts by affinity-chromatography. *Biochim.Biophys.Acta*, 920(2): 140-148.
- Dragovic Uzelac, V., Levaj, B., Mrkic, V., Bursac, D., y Boras, M. (2007). The content of polyphenols and carotenoids in three apricot cultivars depending on stage of maturity and geographical region. *Food Chem.*, 102(3): 966-975.
- Dussie, M. C., Sugar, D., Azarenko, A. N., y Righetti, T. L. (1997). Colorimetric characterization of red pear cultivars. *Fruit Var.J.*, 51(1): 39-43.
- Eilati, S. K., Budowski, P., y Monselise, S. P. (1975). Carotenoid changes in the "Shamouti" orange peel during chloroplast-chromoplast transformation on and off the tree. *J.Exp.Bot.*, 26(93): 624-632.
- Eilati, S. K., Monselise, S. P., y Budowski, P. (1972). Xanthophyll esterification in flavedo of citrus fruit. *Plant Cell Physiol.*, 13(4): 741-746.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., y Von Heijne, G. (1999). ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Sci.*, 8(5): 978-984.
- Enfissi, E. M. A., Fraser, P. D., Lois, L. M., Boronat, A., Schuch, W., y Bramley, P. (2005). Metabolic engineering of the mevalonate and non-mevalonate isopentenyl diphosphate-forming pathways for the production of health-promoting isoprenoids in tomato. *Plant Biotechnol.J.*, 3(1): 17-27.
- Estevez, J. M., Cantero, A., Reindl, A., Reichler, S., y Leon, P. (2001). 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, a limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants. *J.Biol.Chem.*, 276(25): 22901-22909.
- Fanciullino, A. L., Dhuique Mayer, C., Luro, F., Casanova, J., Morillon, A., y Ollitrault, P. (2006). Carotenoid diversity in cultivated citrus is highly influenced by genetic factors. *J.Agric.Food Chem.*, 54(12): 4397-4406.
- Farin, D., Ikan, R., y Gross, J. (1983). The carotenoid pigments in the juice and flavedo of a mandarin hybrid (*Citrus Reticulata*) cv.Michal during ripening. *Phytochemistry*, 22(2): 403-408.
- Fraser, P. D. y Bramley, P. (2004). The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog.Lipid Res.*, 43(3): 228-265.

- Fraser, P. D., Bramley, P., y Seymour, G. B. (2001). Effect of the *Cnr* mutation on carotenoid formation during tomato fruit ripening. *Phytochemistry*, 58(1): 75-79.
- Fraser, P. D., Kiano, J. W., Truesdale, M. R., Schuch, W., y Bramley, P. (1999). Phytoene synthase-2 enzyme activity in tomato does not contribute to carotenoid synthesis in ripening fruit. *Plant.Mol.Biol.*, 40(4): 687-698.
- Fraser, P. D., Romer, S., Shipton, C. A., Mills, P. B., Kiano, J. W., Misawa, N., Drake, R. G., Schuch, W., y Bramley, P. (2002). Evaluation of transgenic tomato plants expressing an additional phytoene synthase in a fruit-specific manner. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 99(2): 1092-1097.
- Fraser, P. D., Truesdale, M. R., Bird, C. R., Schuch, W., y Bramley, P. (1994). Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development (Evidence for tissue-specific gene expression). *Plant Physiol.*, 105(1): 405-413.
- Fray, R. G., Wallace, A., Fraser, P. D., Valero, D., Hedden, P., Bramley, P., y Grierson, D. (1995). Constitutive expression of a fruit phytoene synthase gene in transgenic tomatoes causes dwarfism by redirecting metabolites from the gibberellin pathway. *The Plant Journal*, 8(5): 693-701.
- Fu, A., Park, S., y Rodermel, S. (2005). Sequences required for the activity of PTOX (IMMUTANS), a Plastid Terminal Oxidase: *In vitro* and in planta mutagenesis of iron-binding sites and a conserved sequence that corresponds to exon 8. *J.Biol.Chem.*, 280(52): 42489-42496.
- Gallagher, C. E., Cervantes Cervantes, M., y Wurtzel, E. T. (2003). Surrogate biochemistry: use of *Escherichia coli* to identify plant cDNAs that impact metabolic engineering of carotenoid accumulation. *Appl.Microbiol.Biotechnol.*, 60(6): 713-719.
- Galpaz, N., Ronen, G., Khalifa, Z., Zamir, D., y Hirschberg, J. (2006). A chromoplast-specific carotenoid biosynthesis pathway is revealed by cloning of the tomato *white-flower* locus. *Plant Cell*, 18(8): 1947-1960.
- Giliberto, L., Perrotta, G., Pallara, P., Weller, J. L., Fraser, P. D., Bramley, P., Fiore, A., Tavazza, M., y Giuliano, G. (2005). Manipulation of the blue light photoreceptor cryptochrome 2 in tomato affects vegetative development, flowering time, and fruit antioxidant content. *Plant Physiol.*, 137: 199-208.
- Giovannoni, J. J. (2004). Genetic regulation of fruit development and ripening. *Plant Cell*, 16(suppl\_1): S170-S180.

- Giuliano, G., al Babili, S., y von Lintig, J. (2003). Carotenoid oxygenases: cleave it or leave it. *Trends Plant Sci.*, 8(4): 145-149.
- Giuliano, G., Bartley, G. E., y Scolnik, P. A. (1993). Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato development. *Plant Cell*, 5(4): 379-387.
- Gmitter, F. G. (1993). Marsh grapefruit. *Fruit Var.J.*, 47(3): 130-133.
- Gómez Cadenas, A., Mehouchi, J., Tadeo, F. R., Primo Millo, E., y Talón, M. (2000). Hormonal regulation of fruitlet abscission induced by carbohydrate shortage in citrus. *Planta*, 210(4): 636-643.
- Goodner, K. L., Rouseff, R. L., y Hofsommer, H. J. (2001). Orange, mandarin, and hybrid classification using multivariate statistics based on carotenoid profiles. *J.Agric.Food Chem.*, 49(3): 1146-1150.
- Goodwin, T. W. (1980). The biochemistry of carotenoids. London.
- Goodwin, T. W. (1983). Developments in carotenoid biochemistry over 40 years. *Biochem.Soc.Trans.*, 11(5): 473-483.
- Gross, J. (1987). Pigments in fruits. London: Academic Press.
- Gross, J., Gabay, M., y Lifshitz, A. (1972). A comparative study of the carotenoid pigments in juice of Shamouti, Valencia and Whashington Oranges, three varieties of *Citrus sinensis*. *Phytochemistry*, 11: 303-308.
- Gross, J., Ikan, R., y Eckhardt, G. (1983). Carotenoids of the fruit of Averrhoa-Carambola. *Phytochemistry*, 22(6): 1479-1481.
- Gross, J. y Timberg, R. (1983). Pigment and ultrastructural changes in the developing pummelo *Citrus grandis* 'Goliath'. *Bot.Gaz.*, 144(3): 401-406.
- Gruszecki, W. I. y Strzalka, K. (2005). Carotenoids as modulators of lipid membrane physical properties. *Biochim.Biophys.Acta*, 1740(2): 108-115.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol.Biol.*, 166(4): 557-580.
- Harker, M. y Bramley, P. (1999). Expression of prokaryotic 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphatases in *Escherichia coli* increases carotenoid and ubiquinone biosynthesis. *FEBS Lett.*, 448(1): 115-119.
- Hayman, E. P., Yokoyama, H., y Poling, S. M. (1977). Carotenoid induction in orange endocarp. *J.Agric.Food Chem.*, 25(6): 1251-1253.
- Henikoff, S. y Henikoff, J. G. (1992). Amino-acid substitution matrices from protein blocks. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S A*, 89(22): 10915-10919.
- Herrero, R., Asins, M. J., Carbonell, E. A., y Navarro, L. (1996). Genetic diversity in the orange subfamily *Aurantioideae* .1. Intraspecies and intragenus genetic variability. *Theor.Appl.Genet.*, 92(5): 599-609.

- Higo, K., Ugawa, Y., Iwamoto, M., y Korenaga, T. (1999). Plant *cis*-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucl.Acids Res.*, 27(1): 297-300.
- Hirschberg, J. (2001). Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Curr.Opin.Plant Biol.*, 4(3): 210-218.
- Hodgson, R. W. (1948). Horticultural varieties of citrus. En: H. J. Webber y L. D. Batchelor (Eds.), *The citrus industry*. Univ of California Press.
- Hornero Mendez, D. y Britton, G. (2002). Involvement of NADPH in the cyclization reaction of carotenoid biosynthesis. *FEBS Lett.*, 515(1-3): 133-136.
- Hornero Mendez, D., Costa-Garcia, J., y Mínguez Mosquera, M. I. (2002). Characterization of carotenoid high-producing *Capsicum annuum* cultivars selected for paprika production. *J.Agric.Food Chem.*, 50(20): 5711-5716.
- Hornero Mendez, D. y Mínguez Mosquera, M. I. (2000). Xanthophyll esterification accompanying carotenoid overaccumulation in chromoplast of *Capsicum annuum* ripening fruits is a constitutive process and useful for ripeness index. *J.Agric.Food Chem.*, 48(5): 1617-1622.
- Howitt, C. A. y Pogson, B. J. (2006). Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues. *Plant, Cell and Environment*, 29(3): 435-445.
- Hsieh, M. H. y Goodman, H. M. (2005). The Arabidopsis *Isph* homolog is involved in the plastid non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Plant Physiol.*, 138(2): 641-653.
- Huguene, P., Badillo, A., Chen, H.-C., Klein, A., Hirschberg, J., Camara, B., y Kuntz M (1995). Metabolism of cyclic carotenoids: a model for the alteration of this biosynthetic pathway in *Capsicum annuum* chromoplasts. *Plant J.*, 8(3): 417-424.
- Huguene, P., Romer, S., Kuntz, M., y Camara, B. (1992). Characterization and molecular cloning of a flavoprotein catalyzing the synthesis of phytofluene and  $\zeta$ -carotene in *Capsicum* chromoplasts. *Eur.J.Biochem.*, 209(1): 399-407.
- Huh, J. H., Kang, B. C., Nahm, S. H., Kim, S., Ha, K. S., Lee, M. H., y Kim, B. D. (2001). A candidate gene approach identified phytoene synthase as the locus for mature fruit color in red pepper (*Capsicum* spp.). *Theor.Appl.Genet.*, 102(4): 524-530.

- Hummell, A. K. y Ferree, D. C. (1997). Response of two french hybrid wine-grape cultivars to low light environment. *Fruit Var.J.*, 51(2): 101-111.
- Ibdah, M., Azulay, Y., Portnoy, V., Wasserman, B., Bar, E., Meir, A., Burger, Y., Hirschberg, J., Schaffer, A. A., y Katzir, N. (2006). Functional characterization of CmCCD1, a carotenoid cleavage dioxygenase from melon. *Phytochemistry*, 67(15): 1579-1589.
- Ikoma, Y., Komatsu, A., Kita, M., Ogawa, K., Omura, M., Yano, M., y Moriguchi, T. (2001). Expression of a phytoene synthase gene and characteristic carotenoid accumulation during citrus fruit development. *Physiol.Plant.*, 111(2): 232-238.
- Inoue, K. (2004). Carotenoid hydroxylation -P450 finally! *Trends Plant Sci.*, 9(11): 515-517.
- Inoue, K., Furbee, K. J., Uratsu, S., Kato, M., Dandekar, A. M., y Ikoma, Y. (2006). Catalytic activities and chloroplast import of carotenogenic enzymes from citrus. *Physiol.Plant.*, 127(4): 561-570.
- Isaacson, T., Ronen, G., Zamir, D., y Hirschberg, J. (2002). Cloning of *tangerine* from tomato reveals a carotenoid isomerase essential for the production of  $\beta$ -carotene and xanthophylls in plants. *Plant Cell*, 14(2): 333-342.
- Iwagaki, I. y Kudo, K. (1977). Fruit quality of the location of fruit in a canopy of Satsuma mandarin tree. *Bull.Shidoku Agric.Exp.Stn.*, 30: 17-23.
- Iwagaki, I. (1981). Tree configuration and pruning of Satsuma mandarin in Japan. *Proc.Int.Soc.Citriculture*, 1: 169-172.
- Jones, D. T. (1999). Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J.Mol.Biol.*, 292(2): 195-202.
- Kato, M., Ikoma, Y., Matsumoto, H., Sugiura, M., Hyodo, H., y Yano, M. (2004). Accumulation of carotenoids and expression of carotenoid biosynthetic genes during maturation in citrus fruit. *Plant Physiol.*, 134(2): 824-837.
- Kato, M., Matsumoto, H., Ikoma, Y., Okuda, H., y Yano, M. (2006). The role of carotenoid cleavage dioxygenases in the regulation of carotenoid profiles during maturation in citrus fruit. *J.Exp.Bot.*, 57(10): 2153-2164.
- Katz, E., Lagunes, P. M., Riov, J., Weiss, D., y Goldschmidt, E. E. (2004). Molecular and physiological evidence suggests the existence of a system II-like pathway of ethylene production in non-climacteric Citrus fruit. *Planta*, 219(2): 243-252.

- Khan, M. y Mackinney, G. (1953). Carotenoids in grapefruit, *Citrus Paradisi*. *Plant Physiol.*, 28(3): 550-552.
- Kishimoto, S. y Ohmiya, A. (2006). Regulation of carotenoid biosynthesis in petals and leaves of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*). *Physiol.Plant.*, 128(3): 436-447.
- Kita, M., Komatsu, A., Omura, M., Yano, M., Ikoma, Y., y Moriguchi, T. (2001). Cloning and expression of *CitPDS1*, a gene encoding phytoene desaturase in citrus. *Biosci.Biotech.Biochem.*, 65(6): 1424-1428.
- Knee, M. (1988). Carotenol esters in developing apple fruits. *Phytochemistry*, 27(4): 1005-1009.
- Kopsell, D. A. y Kopsell, D. E. (2006). Accumulation and bioavailability of dietary carotenoids in vegetable crops. *Trends Plant Sci.*, 11(10): 499-507.
- Krubasik, P. y Sandmann, G. (2000). Molecular evolution of lycopene cyclases involved in the formation of carotenoids with ionone end groups. *Biochem.Soc.Trans.*, 28(6): 806-810.
- Kuntz, M., Romer, S., Suire, C., Hugueney, P., Weil, J. H., Schantz, R., y Camara, B. (1992). Identification of a cDNA for the plastid-located geranylgeranyl pyrophosphate synthase from *Capsicum annum* - Correlative increase in enzyme-activity and transcript level during fruit ripening. *Plant J.*, 2(1): 25-34.
- Lafuente, M. T., Zacarías, L., Martinez Tellez, M. A., Sanchez Ballesta, M. T., y Granell, A. (2003). Phenylalanine ammonia-lyase and ethylene in relation to chilling injury as affected by fruit age in citrus. *Postharvest Biol.and Technol.*, 29(3): 309-318.
- Lange, B. M. y Ghassemian, M. (2003). Genome organization in *Arabidopsis thaliana*: a survey for genes involved in isoprenoid and chlorophyll metabolism. *Plant.Mol.Biol.*, 51(6): 925-948.
- Lee, H. S. (2002). Characterization of major anthocyanins and the color of red-fleshed budd blood orange (*Citrus sinensis*). *J.Agric.Food Chem.*, 50(5): 1243-1246.
- Lee, H. S. (2000). Objective measurement of red grapefruit juice color. *J.Agric.Food Chem.*, 48: 1507-1511.
- Lee, H. S. (2001). Characterization of carotenoids in juice of red navel orange (Cara Cara). *J.Agric.Food Chem.*, 49: 2563-2568.

- Lefebvre, V., Kuntz, M., Camara, B., y Palloix, A. (1998). The *capsanthin-capsorubin synthase* gene: a candidate gene for the *y* locus controlling the red fruit colour in pepper. *Plant.Mol.Biol.*, 36(5): 785-789.
- Lewinsohn, E., Sitrit, Y., Bar, E., Azulay, Y., Ibdah, M., Meir, A., Yosef, E., Zamir, D., y Tadmor, Y. (2005a). Not just colors-carotenoid degradation as a link between pigmentation and aroma in tomato and watermelon fruit. *Trends in Food Science and Technology*, 16(9): 407-415.
- Lewinsohn, E., Sitrit, Y., Bar, E., Azulay, Y., Meir, A., Zamir, D., y Tadmor, Y. (2005b). Carotenoid pigmentation affects the volatile composition of tomato and watermelon fruits, as revealed by comparative genetic analyses. *J.Agric.Food Chem.*, 53(8): 3142-3148.
- Li, L., Lu, S., Cosman, K. M., Earle, E. D., Garvin, D. F., y O'Neill, J. (2006).  $\beta$ -Carotene accumulation induced by the cauliflower *Or* gene is not due to an increased capacity of biosynthesis. *Phytochemistry*, 67(12): 1177-1184.
- Li, L., Paolillo, D. J., Parthasarathy, M. V., Dimuzio, E. M., y Garvin, D. F. (2001). A novel gene mutation that confers abnormal patterns of  $\beta$ -carotene accumulation in cauliflower (*Brassica oleracea* var. botrytis). *Plant J.*, 26(1): 59-67.
- Lime, B. J., Stephens, T. S., y Griffiths, F. P. (1954). Processing characteristics of colored Texas grapefruit. I. Color and maturity studies of Ruby Red grapefruit. *Food Technol.*, 566-569.
- Lin, W. C. y Jolliffe, P. A. (1996). Light intensity and spectral quality affect fruit growth and shelf life of greenhouse-grown long English cucumber. *J.Am.Soc.Hort.Sci.*, 121(6): 1168-1173.
- Liu, Y., Wang, H., Ye, H. C., y Li, G. F. (2005). Advances in the plant isoprenoid biosynthesis pathway and its metabolic engineering. *Journal of Integrative Plant Biology*, 47(7): 769-782.
- Liu, Y. S., Roof, S., Ye, Z. B., Barry, C., van Tuinen, A., Vrebalov, J., Bowler, C., y Giovannoni, J. (2004). Manipulation of light signal transduction as a means of modifying fruit nutritional quality in tomato. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 101(26): 9897-9902.
- Lois, L. M., Rodríguez Concepción, M., Gallego, F., Campos, N., y Boronat, A. (2000). Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: regulatory role of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase. *Plant J.*, 22(6): 503-513.

- Lu, S., Van Eck, J., Zhou, X., Lopez, A. B., O'Halloran, D. M., Cosman, K. M., Conlin, B. J., Paolillo, D. J., Garvin, D. F., Vrebalov, J., Kochian, L. V., Kupper, H., Earle, E. D., Cao, J., y Li, L. (2006). The cauliflower *Or* gene encodes a DnaJ cysteine-rich domain-containing protein that mediates high levels of  $\beta$ -carotene accumulation. *Plant Cell*, 18(12): 3594-3605.
- Mahmoud, S. S. y Croteau, R. B. (2001). Metabolic engineering of essential oil yield and composition in mint by altering expression of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase and menthofuran synthase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 98(15): 8915-8920.
- Malachi, T., Gross, J., Lifshitz, A., y Sklarz, B. (1974). Flavedo carotenoid pigments of the ripe Washington-Navel orange. *Lebensmittle-Wissenschaft and Technologie*, 7(6): 330-334.
- Mandel, M. A., Feldmann, K. A., Herrera Estrella, L., Rocha Sosa, M., y Leon, P. (1996). *CLA1*, a novel gene required for chloroplast development, is highly conserved in evolution. *Plant J.*, 9(5): 649-658.
- Manning, K., Tor, M., Poole, M., Hong, Y., Thompson, A. J., King, G. J., Giovannoni, J. J., y Seymour, G. B. (2006). A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SBP-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening. *Nat.Genet.*, 38(8): 948-952.
- Marcos, J. F., Gonzalez Candelas, L., y Zacarías, L. (2005). Involvement of ethylene biosynthesis and perception in the susceptibility of citrus fruits to *Penicillium digitatum* infection and the accumulation of defence-related mRNAs. *Journal of Experimental Botany*, 56(418): 2183-2193.
- Marty, I., Bureau, S., Sarkissian, G., Gouble, B., Audergon, J. M., y Albagnac, G. (2005). Ethylene regulation of carotenoid accumulation and carotenogenic gene expression in colour-contrasted apricot varieties (*Prunus armeniaca*). *J.Exp.Bot.*, 56(417): 1877-1886.
- Mathieu, S., Terrier, N., Procureur, J., Bigey, F., y Gunata, Z. (2005). A Carotenoid Cleavage Dioxygenase from *Vitis vinifera* L.: functional characterization and expression during grape berry development in relation to C-13-norisoprenoid accumulation. *J.Exp.Bot.*, 56(420): 2721-2731.
- Matsumoto, H., Ikoma, Y., Kato, M., Kuniga, T., Nakajima, N., y Yoshida, T. (2007). Quantification of carotenoids in Citrus fruit by LC-MS and

- comparison of patterns of seasonal changes for carotenoids among Citrus varieties. *J.Agric.Food Chem.*, 55(6): 2356-2368.
- Matthews, P. D. y Wurtzel, E. T. (2000). Metabolic engineering of carotenoid accumulation in *Escherichia coli* by modulation of the isoprenoid precursor pool with expression of deoxyxylulose phosphate synthase. *Appl.Microbiol.Biotechnol.*, 53(4): 396-400.
- Maudinas, B., Bucholtz, M. L., Papastephanou, C., Katiyar, S. S., Briedis, A. V., y Porter, J. W. (1977). Partial purification and properties of a phytoene synthesizing enzyme-system. *Arch.Biochem.Biophys.*, 180(2): 354-362.
- McGhie, T. K. (2002). Color in fruit of the genus *Actinidia*: Carotenoid and chlorophyll compositions. *J.Agric.Food Chem.*, 50(1): 117-121.
- Melendez Martinez, A. J., Britton, G., Vicario, I. M., y Heredia, F. J. (2005). Identification of zeinoxanthin in orange juices. *J.Agric.Food Chem.*
- Melendez Martinez, A. J., Vicario, I. M., y Heredia, F. J. (2004). Importancia nutricional de los pigmentos carotenoides. *Arch.Latinoam.Nutr.*, 54(2): 149-155.
- Melendez Martinez, A. J., Vicario, I. M., y Heredia, F. J. (2003). A routine high-performance liquid chromatography method for carotenoid determination in ultrafrozen orange juices. *J.Agric.Food Chem.*, 51: 4219-4224.
- Merchant, S. y Sawaya, M. R. (2005). The light reactions: A guide to recent acquisitions for the picture gallery. *Plant Cell*, 17(3): 648-663.
- Meredith, F. I. y Young, R. H. (1969). Effect of temperature on pigment development in red blush grapefruit and ruby blood oranges. *Proceedings First International Citrus Symposium*, 1: 271-276.
- Misawa, N. y Shimada, H. (1998). Metabolic engineering for the production of carotenoids in non-carotenogenic bacteria and yeasts. *Journal of Biotechnology*, 59(3): 169-181.
- Monselise, S. P. y Halevy, A. H. (1961). Detection of lycopene in pink orange fruit. *Science*, 133(3463): 1478.
- Montefiori, M. (2005). Pigments in the fruit of red-fleshed kiwifruit (*Actinidia chinensis* and *Actinidia deliciosa*). *J.Agric.Food Chem.*, 53(24): 9526-9530.
- Moore, G. (2001). Oranges and lemons: clues of the taxonomy of *Citrus* from molecular markers. *Trends Genet.*, 17(9): 536-539.

- Moran, R. y Rom, C. (1991). Canopy side and height affect apple spur and fruit quality. *Compact Fruit Tree*,(24): 80-82.
- Mustilli, A. C., Fenzi, F., Ciliento, R., Alfano, F., y Bowler, C. (1999). Phenotype of the tomato high pigment-2 mutant is caused by a mutation in the tomato homolog of DEETIOLATED1. *Plant Cell*, 11(2): 145-158.
- Nakai, K. y Horton, P. (1999). PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem.Sci.*, 24(1): 34-35.
- Niizu, P. Y. y Rodríguez Amaya, D. B. (2005). New data on the carotenoid composition of raw salad vegetables. *J.Food Compost.Anal.*, 18(8): 739-749.
- North, H. M., Almeida, A., Boutin, J. P., Frey, A., To, A., Botran, L., Sotta, B., y Marion-Poll, A. (2007). The Arabidopsis ABA-deficient mutant *aba4* demonstrates that the major route for stress-induced ABA accumulation is via neoxanthin isomers. *The Plant Journal*, 50(5): 810-824.
- Oberholster, R., Cowan, A. K., Molnar, P., y Toth, G. (2001). Biochemical basis of color as an aesthetic quality in *Citrus sinensis*. *J.Agric.Food Chem.*, 49(1): 303-307.
- Ohmiya, A., Kishimoto, S., Aida, R., Yoshioka, S., y Sumitomo, K. (2006). Carotenoid cleavage dioxygenase (CmCCD4a) contributes to white color formation in *Chrysanthemum* petals. *Plant Physiol.*, 106.
- Okada, K., Saito, T., Nakagawa, T., Kawamukai, M., y Kamiya, Y. (2000). Five geranylgeranyl diphosphate synthases expressed in different organs are localized into three subcellular compartments in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 122(4): 1045-1056.
- Oliveira, C., Ferreira, A. C., Costa, P., Guerra, J., y Guedes de Pinho P. (2004). Effect of some viticultural parameters on the grape carotenoid profile. *J.Agric.Food Chem.*, 52(13): 4178-4184.
- Page, J. E., Hause, G., Raschke, M., Gao, W. Y., Schmidt, J., Zenk, M. H., y Kutchan, T. M. (2004). Functional analysis of the final steps of the 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP) pathway to isoprenoids in plants using virus-induced gene silencing. *Plant Physiol.*, 134(4): 1401-1413.
- Palaisa, K. A., Morgante, M., Williams, M., y Rafalski, A. (2003). Contrasting effects of selection on sequence diversity and linkage disequilibrium at two phytoene synthase loci. *Plant Cell*, 15(8): 1795-1806.

- Pascual, M., Mallent, M. D., y Cuñat, P. (1993). Estudio de los carotenoides de naranjas Navelina. *Rev.Esp.Cien.Tecnol.Aliment.*, 33: 179-196.
- Patten, K. D. y Proebsting, E. L. (1986). Effect of different artificial shading times and natural light intensities on the fruit quality of "Bing" sweet cherry. *J.Am.Soc.Hort.Sci.*, 111(3): 360-363.
- Pecker, I., Gabbay, R., Cunningham, F. X., y Hirschberg, J. (1996). Cloning and characterization of the cDNA for lycopene  $\beta$ -cyclase from tomato reveals decrease in its expression during fruit ripening. *Plant.Mol.Biol.*, 30(4): 807-819.
- Poling, S. M., Hsu, W. J., y Yokoyama, H. (1973). New chemical inducers of carotenoid biosynthesis. *Phytochemistry*, 12(11): 2665-2667.
- Poling, S. M., Hsu, W. J., y Yokoyama, H. (1976). Synthetic regulators of carotenoid biosynthesis in *Citrus paradisi*. *Phytochemistry*, 15(11): 1685-1687.
- Poling, S. M., Hsu, W. J., y Yokoyama, H. (1980). Chemical induction of poly-*cis* carotenoid biosynthesis. *Phytochemistry*, 19(8): 1677-1680.
- Pott, I., Breithaupt, D. E., y Carle, R. (2003). Detection of unusual carotenoid esters in fresh mango (*Mangifera indica* L. cv. 'Kent'). *Phytochemistry*, 64(4): 825-829.
- Querol, J., Campos, N., Imperial, S., Boronat, A., y Rodríguez Concepción, M. (2002). Functional analysis of the *Arabidopsis thaliana* GCPE protein involved in plastid isoprenoid biosynthesis. *FEBS Lett.*, 514(2-3): 343-346.
- Rawat, R., Xu, Z. F., Yao, K. M., y Chye, M. L. (2005). Identification of *cis*-elements for ethylene and circadian regulation of the *Solanum melongena* gene encoding cysteine proteinase. *Plant.Mol.Biol.*, 57(5): 629-643.
- Raymundo, L. C., Chichester, C. O., y Simpson, K. L. (1976). Light-dependent carotenoid synthesis in tomato fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 24(1): 59-64.
- Roca, M. y Mínguez Mosquera, M. I. (2003). Carotenoid levels during the period of growth and ripening in fruits of different olive varieties (Hojiblanca, Picual and Arbequina). *J.Plant Physiol.*, 160(5): 451-459.
- Rodrigo, M. J., Alquézar, B., y Zacarias, L. (2006). Cloning and characterization of two 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase genes, differentially regulated

- during fruit maturation and under stress conditions, from orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *J.Exp.Bot.*, 57(3): 633-643.
- Rodrigo, M. J., Marcos, J. F., Alférez, F., Mallent, M. D., y Zacarías, L. (2003). Characterization of Pinalate, a novel *Citrus sinensis* mutant with a fruit-specific alteration that results in yellow pigmentation and decreased ABA content. *J.Exp.Bot.*, 54(383): 727-738.
- Rodrigo, M. J., Marcos, J. F., y Zacarías, L. (2004). Biochemical and molecular analysis of carotenoid biosynthesis in flavedo of orange (*Citrus sinensis* L.) during fruit development and maturation. *J.Agric.Food Chem.*, 52(22): 6724-6731.
- Rodrigo, M. J. y Zacarías, L. (2006). 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 Biol.and Technol.*, 43(1): 14-22.
- Rodríguez Concepción, M. (2006). Early steps in isoprenoid biosynthesis: Multilevel regulation of the supply of common precursors in plant cells. *Phytochemistry Reviews*, V5(1): 1-15.
- Rodríguez Concepción, M., Ahumada, I., Diez Juez, E., Sauret Gueto, S., Lois, L. M., Gallego, F., Carretero Paulet, L., Campos, N., y Boronat, A. (2001). 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase and plastid isoprenoid biosynthesis during tomato fruit ripening. *Plant J.*, 27(3): 213-222.
- Rodríguez Concepción, M. y Boronat, A. (2002). Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiol.*, 130(3): 1079-1089.
- Rodríguez Concepción, M., Querol, J., Lois, L. M., Imperial, S., y Boronat, A. (2003). Bioinformatic and molecular analysis of hydroxymethylbutenyl diphosphate synthase (*GCPE*) gene expression during carotenoid accumulation in ripening tomato fruit. *Planta*, 217(3): 476-482.
- Rohmer, M., Knani, M., Simonin, P., Sutter, B., y Sahm, H. (1993). Isoprenoid biosynthesis in bacteria - A novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem.J.*, 295: 517-524.
- Romer, S. y Fraser, P. D. (2005). Recent advances in carotenoid biosynthesis, regulation and manipulation. *Planta*, 221(3): 305-308.

- Romer, S., Fraser, P. D., Kiano, J. W., Shipton, C. A., Misawa, N., Schuch, W., y Bramley, P. (2000). Elevation of the provitamin A content of transgenic tomato plants. *Nat Biotech*, 18(6): 666-669.
- Romer, S., Hugueney, P., Bouvier, F., Camara, B., y Kuntz, M. (1993). Expression of the genes encoding the early carotenoid biosynthetic-enzymes in *Capsicum annuum*. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 196(3): 1414-1421.
- Romojaro, F., Banet, E., y Llorente, S. (1979). Carotenoids in both flavedo and pulp of Marsh seedless grapefruit. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, 19(3): 385-392.
- Ronen, G., Carmel Goren, L., Zamir, D., y Hirschberg, J. (2000). An alternative pathway to  $\beta$ -carotene formation in plant chromoplasts discovered by map-based cloning of *beta* and *old-gold* color mutations in tomato. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 97(20): 11102-11107.
- Ronen, G., Cohen, M., Zamir, D., y Hirschberg, J. (1999). Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: expression of the gene for lycopene  $\epsilon$ -cyclase is down-regulated during ripening and is elevated in the mutant *Delta*. *Plant J.*, 17(4): 341-351.
- Rosati, C., Aquilani, R., Dharmapuri, S., Pallara, P., Marusic, C., Tavazza, R., Bouvier, F., Camara, B., y Giuliano, G. (2000). Metabolic engineering of  $\beta$ -carotene and lycopene content in tomato fruit. *Plant J.*, 24(3): 413-419.
- Rouseff, R. L., Raley, L., y Hofsommer, H. J. (1996). Application of diode array detection with a C-30 reversed phase column for the separation and identification of saponified orange juice carotenoids. *J.Agric.Food Chem.*, 44: 2176-2181.
- Rouseff, R. L., Sadler, G. D., Putnam, T. J., y Davis, J. E. (1992). Determination of  $\beta$ -carotene and other hydrocarbon carotenoids in red grapefruit cultivars. *J.Agric.Food Chem.*, 40(1): 47-51.
- Saks, Y., Copel, A., y Barkai Golan, R. (1996). Improvement of harvested strawberry quality by illumination: colour and botrytis infection. *Postharvest Biol.and Technol.*, 8(1): 19-27.
- Sambrook, J., Fitch, E. F., y Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor.
- Sandmann, G. (2001). Carotenoid biosynthesis and biotechnological application. *Arch.Biochem.Biophys.*, 385(1): 4-12.

- Sandmann, G. (2002). Molecular evolution of carotenoid biosynthesis from bacteria to plants. *Physiol. Plant.*, 116(4): 431-440.
- Sandmann, G. (1994). Phytoene desaturase - Genes, enzymes and phylogenetic aspects. *J. Plant Physiol.*, 143(4-5): 444-447.
- Sandmann, G., Romer, S., y Fraser, P. D. (2006). Understanding carotenoid metabolism as a necessity for genetic engineering of crop plants. *Metab. Eng.*, 8(4): 291-302.
- Santos, C. A., Senalik, D., y Simon, P. W. (2005). Path analysis suggests phytoene accumulation is the key step limiting the carotenoid pathway in white carrot roots. *Genetics and Molecular Biology*, 28(2): 287-293.
- Sass Kiss, A., Kiss, J., Milotay, P., Kerek, M. M., y Toth Markus, M. (2005). Differences in anthocyanin and carotenoid content of fruits and vegetables. *Food Research International*, 38(8-9): 1023-1029.
- Saunt, J. (2000). En: Citrus varieties of the world. England. Sinclair international limited.
- Schaub, P., al Babili, S., Drake, R., y Beyer, P. (2005). Why is golden rice golden (yellow) instead of red? *Plant Physiol.*, 138(1): 441-450.
- Schledz, M., al Babili, S., von Lintig, J., Haubruck, H., Rabbani, S., Kleinig, H., y Beyer, P. (1996). Phytoene synthase from *Narcissus pseudonarcissus*: functional expression, galactolipid requirement, topological distribution in chromoplasts and induction during flowering. *Plant J.*, 10(5): 781-792.
- Schofield, A. y Paliyath, G. (2005). Modulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit ripening through phytochrome regulation of phytoene synthase activity. *Plant Physiol. Biochem.*, 43(12): 1052-1060.
- Schwartz, S. H., Qin, X., y Loewen, M. C. (2004). The biochemical characterization of two carotenoid cleavage enzymes from *Arabidopsis* indicates that a carotenoid-derived compound inhibits lateral branching. *J. Biol. Chem.*, 279(45): 46940-46945.
- Schwartz, S. H., Qin, X., y Zeevaart, J. A. (2001). Characterization of a novel carotenoid cleavage dioxygenase from plants. *J. Biol. Chem.*, 276(27): 25208-25211.
- Senger, K. y Marini, R. P. (2003). Relationship between flesh firmness and ground colour in peach as influenced by light and canopy position. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 128(2): 163-170.

- Simkin, A. J., Laboure, A. M., Kuntz, M., y Sandmann, G. (2003a). Comparison of carotenoid content, gene expression and enzyme levels in tomato (*Lycopersicon esculentum*) leaves. *Zeitschrift fur Naturforschung C-A Journal of Biosciences*, 58(5-6): 371-380.
- Simkin, A. J., Schwartz, S. H., Auldrige, M., Taylor, M. G., y Klee, H. J. (2004a). The tomato carotenoid cleavage dioxygenase 1 genes contribute to the formation of the flavor volatiles  $\beta$ -ionone, pseudoionone, and geranylacetone. *Plant J.*, 40(6): 882-892.
- Simkin, A. J., Underwood, B. A., Auldrige, M., Loucas, H. M., Shibuya, K., Schmelz, E., Clark, D. G., y Klee, H. J. (2004b). Circadian regulation of the *PhCCD1* carotenoid cleavage dioxygenase controls emission of  $\beta$ -ionone, a fragrance volatile of petunia flowers. *Plant Physiol.*, 136(3): 3504-3514.
- Simkin, A. J., Zhu, C., Kuntz, M., y Sandmann, G. (2003b). Light-dark regulation of carotenoid biosynthesis in pepper (*Capsicum annuum*) leaves. *J. Plant Physiol.*, 160(5): 439-443.
- Sites, J. W. y Reitz, H. J. (1949). The variation in individual Valencia oranges from different locations of the tree as a guide to sampling methods and spot-picking for quality .1. Soluble solids in the juice. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, 54(DEC): 1-10.
- Smith, J. H. C. y Benítez, A. (1955). Chlorophylls. En: K. Paech y M. M. Tracey (Eds.), *Modern Methods of Plant Analysis*: 142-196. Berlin: Springer.
- Snodderly, D. M. (1995). Evidence for protection against age-related macular degeneration by carotenoids and antioxidant vitamins. *Am J Clin Nutr*, 62(6): 1448S-1461.
- Solovchenko, A. E., Avertcheva, O. V., y Merzlyak, M. N. (2006). Elevated sunlight promotes ripening-associated pigment changes in apple fruit. *Postharvest Biol. and Technol.*, 40(2): 183-189.
- Sonnen, H. D. (1977). Carotenoid formation in ripening "Satsuma" fruit. *Proc. Int. Soc. Citriculture*, 3: 1089-1092.
- Stalberg, K., Lindgren, O., Ek, B., y Hoglund, A. S. (2003). Synthesis of ketocarotenoids in the seed of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 36(6): 771-779.
- Stein, E. R., Brown, H. E., y Cruse, R. R. (1986). Seasonal and storage effects on color of red-flesh grapefruit juice. *J. Food Sci.*, 51(3): 574-577.

- Stewart, I. (1977). Provitamin A and carotenoid content of citrus juices. *J.Agric.Food Chem.*, 25(5): 1132-1137.
- Stewart, I. y Leuenberger, U. B. (1976). Citrus color. *Alimenta*, 15: 33-36.
- Stewart, I. y Wheaton, T. A. (1972). Carotenoids in Citrus - Their accumulation induced by ethylene. *J.Agric.Food Chem.*, 20(2): 448-449.
- Stewart, I. y Wheaton, T. A. (1973). Carotenoids in citrus. *Proc.1st.Cong.Mundial Citric.*, 325-330.
- Subagio, A., Morita, N., y Sawada, S. (1996). Carotenoids and their fatty-acid esters in banana peel. *J.Nutr.Sci.Vitaminol.*, 42(6): 553-566.
- Sun, Z., Gantt, E., y Cunningham, F. X. (1996). Cloning and functional analysis of the  $\beta$ -carotene hydroxylase of *Arabidopsis thaliana*. *J.Biol.Chem.*, 271(40): 24349-24352.
- Tao, J., Zhang, S., An, X., y Zhao, Z. (2005a). Effects of light on carotenoid biosynthesis and color formation of citrus fruit peel. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao*, 14(11): 1833-1836.
- Tao, N., Hu, Z., Liu, Q., Xu, J., Cheng, Y., Guo, L., Guo, W., y Deng, X. (2007). Expression of phytoene synthase gene (*Psy*) is enhanced during fruit ripening of Cara Cara navel orange (*Citrus sinensis* Osbeck). *Plant Cell Rep.*, 26(6): 837-843.
- Tao, N., Xu, J., Cheng, Y., y Deng, X. (2005b). Lycopene- $\epsilon$ -cyclase pre-mRNA is alternatively spliced in Cara Cara Navel orange (*Citrus sinensis* Osbeck). *Biotechnol.Lett.*, 27(11): 779-782.
- Taylor, I. B., Sonneveld, T., Timothy, D. H. B., y Thompson, A. J. (2005). Regulation and Manipulation of the Biosynthesis of Abscisic Acid, Including the Supply of Xanthophyll Precursors. *J.Plant Growth Regul.*, V24(4): 253-273.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., y Gibson, T. J. (1994). Clustal-W - Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl.Acids Res.*, 22(22): 4673-4680.
- Tian, L. y DellaPenna, D. (2001). Characterization of a second carotenoid  $\beta$ -hydroxylase gene from *Arabidopsis* and its relationship to the LUT1 locus. *Plant.Mol.Biol.*, 47(3): 379-388.
- Tian, L. y DellaPenna, D. (2004). Progress in understanding the origin and functions of carotenoid hydroxylases in plants. *Arch.Biochem.Biophys.*, 430(1): 22-29.

- Tian, L., Magallanes Lundback, M., Mutterer, J., y DellaPenna, D. (2003). Functional analysis of  $\beta$  and  $\epsilon$  ring carotenoid hydroxylases in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 15: 1320-1333.
- Tian, L., Musetti, V., Kim, J., Magallanes Lundback, M., y DellaPenna, D. (2004). The *Arabidopsis* LUT1 locus encodes a member of the cytochrome P450 family that is required for carotenoid  $\epsilon$ -ring hydroxylation activity. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 101(1): 402-407.
- Ting, S. V. y Deszyck, E. J. (1958). The internal color and carotenoid pigments of Florida red and pink grapefruit. *American Society for Horticultural Science*, 71: 271-277.
- Uchida, M., Yoshinaga, K., y Kawasae, K. (1985). The effects of temperature and light intensity surrounding the Kavano Natsudaidai fruit bagged with some materials on fruit enlargement quality and peel color. *Bull.Fruit Tree Res.Stn.D.*, 7: 57-76.
- Ulmasov, T., Liu, Z. B., Hagen, G., y Guilfoyle, T. J. (1995). Composite structure of auxin response elements. *Plant Cell*, 7(10): 1611-1623.
- van den Berg, H., Faulks, R., Granado, H. F., Hirschberg, J., Olmedilla, B., Sandmann, G., Southon, S., y Stahl, W. (2000). The potential for the improvement of carotenoid levels in food and the likely systemic effects. *J.Sci.Food Agric*, 80(7): 880-912.
- Vishnevetsky, M., Ovadis, M., y Vainstein, A. (1999). Carotenoid sequestration in plants: the role of carotenoid-associated proteins. *Trends Plant Sci.*, 4(6): 232-235.
- von Lintig, J., Welsch, R., Bonk, M., Giuliano, G., Batschauer, A., y Kleinig, H. (1997). Light-dependent regulation of carotenoid biosynthesis occurs at the level of phytoene synthase expression and is mediated by phytochrome in *Sinapis alba* and *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant J.*, 12(3): 625-634.
- Wall, M. M. (2006). Ascorbic acid, vitamin A, and mineral composition of banana (*Musa* sp.) and papaya (*Carica papaya*) cultivars grown in Hawaii. *J.Food Compost.Anal.*, 19(5): 434-445.
- Welsch, R., Beyer, P., Huguency, P., Kleinig, H., y von Lintig, J. (2000). Regulation and activation of phytoene synthase, a key enzyme in carotenoid biosynthesis, during photomorphogenesis. *Planta*, 211(6): 846-854.

- Welsch, R., Medina, J., Giuliano, G., Beyer, P., y von Lintig, J. (2002). Structural and functional characterization of the phytoene synthase promoter from *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 216(3): 523-534.
- Wurtzel, E. T., Valdez, G., y Matthews, P. D. (1997). Variation in expression of carotenoids genes in transformed *E.coli* strains. *Bioresarch J.*, 1: 1-11.
- Xu, C. J., Fraser, P. D., Wang, W. J., y Bramley, P. (2006). Differences in the carotenoid content of ordinary citrus and lycopene-accumulating mutants. *J.Agric.Food Chem.*, 54(15): 5474-5481.
- Yamagata, H., Yonesu, K., Hirata, A., y Aizono, Y. (2002). TGTCACA motif is a novel *cis*-regulatory enhancer element involved in fruit-specific expression of the *cucumis* gene. *J.Biol.Chem.*, 277(13): 11582-11590.
- Yokoyama, H., Coggins, C. W., y Henning, G. L. (1971). Chemical regulation of carotenoid biosynthesis .2. Effect of 2-(4-chlorophenylthio)-triethylamine hydrochloride on formation of carotenoids in citrus. *Phytochemistry*, 10(8): 1831-1834.
- Yokoyama, H., Debenidi, C., Coggins, C. W., y Henning, G. L. (1972). Chemical regulation of cartenoid biosynthesis .3. Induced color changes in grapefruit and orange. *Phytochemistry*, 11(5): 1721-1724.
- Yokoyama, H. y Vanderco, C. E. (1967). Citrus Carotenoids .I. Comparison of carotenoids of mature-green and yellow lemons. *J.Food Sci.*, 32(1): 42-48.
- Yokoyama, H. y White, M. J. (1967). Carotenoids in the flavedo of Marsh seedless grapefruit. *J.Agric.Food Chem.*, 15(4): 693-696.
- Yokoyama, H. y White, M. J. (1966). Citrus carotenoids--VI. : Carotenoid pigments in the flavedo of Sinton citrangequat. *Phytochemistry*, 5(6): 1159-1173.
- Zacarías, L., Lafuente, M. T., Marcos, J. F., Saladie, M., y Dupille, E. (2003). Regulation of ethylene biosynthesis during cold storage of the cold-sensitive Fortune mandarin fruit. En: M. Vendrell, H. Klee, J. C. Pech, y F. Romojaro (Eds.), *Biology and Biotechnology of the Plant Hormone Ethylene*: 112-117.
- Zacarías, L., Tudela, D., y Primo Millo, E. (1991). Role of ethylene in the opening and senescence of Citrus flowers. *Sci.Hortic.*, 46(1-2): 55-60.
- Zeevaart, J. A. D. y Creelman, R. A. (1988). Metabolism and physiology of abscisic acid. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 39:439-473.







## Anexo I

ARAB_BLCY	...MCTILKTN.....KIDFFIQFHGFERLCSNNFYHSRVRLGVKK...RA	42
ADONIS_BLCY	...MCTILRTHN.....KLELLPTLHGFAEKQHLVSTSKLQNVQVRIA...SR	42
DAUCUS_BLCY	MKVMCTILKTHN.....KLEFFNPIHGFPDKVGTLSCLKFRNQELRFG...SR	45
CITRUS_BLCY1	...MCTILKTHN.....KLEFLPQVHGALEKSSLSLSIKIQNBELRFG...LK	42
S.LYC_BLCY	...MCTILKTN.....NLEFLNPHHGFAVKASTFRSEKHHN...FG...SR	38
C.ANNU_BLCY	...MCTILRTEN.....NLEFL...HGFGVKVSFAFSSVKSOK...FG...AK	35
NICOT_BLCY	...MCTILKTN.....KLEFLHPVHGFSVKASSENSVVKPHK...FG...SR	38
GENT_BLCY	...MCTIVKTN.....KLEFLHPLCGFVDKVSFCLRSNHOEYNKYFLKKS	46
BIXA_BLCY	...MCTILKTN.....CLEFLI...HGFNDSKALFSTVHKQKFGPRKS...CE	40
SANDER_BLCY	...MCTILKTHS.....RLELLHLQSORHILSTAKPSS...LISAK...KP	38
TAGETES_BLCY	...MCTILRTYN.....SPEFVHPSNKFAGNLNNINQINQSKSQFQDFRFGPKK	46
NARCIS_BLCY	...MCTILRTHN.....RLELLYPLHELAKRHF LSPS ENPQNPNEKFF...SR	42
ZEAL_BLCY	.....MATALLRTHHHCKPPEVLC...RA	23
S.LYC_NSY	...METLLKFFPSLLLSPTPYRSIVQCNPSFLSPPTTKK.....	36
CITRUS_BLCY2	...MATLLSFF.....SPSELAKVSIIDSTSSPSFLFLGRONAC...SR	41
S.LYC_BLCY2	...MEALLKFFPSLLLSPTPHRSIFQCNPSFLSPPTTKK.....	36
S.TUB_NSY	...METLLKPLTSLLSPTPHRSIFQCNPSFLNPTTKK.....	36
C.ANNU_CCS	...METLLKFFPSLLLSPTPNMYSFKHNSTFPNETKK.....	36
ARAB_BLCY	.IKIVS.....SVVS.GSAALIDVVEETKRENIDFEIPLYDT.SKSCVVDLAVG	89
ADONIS_BLCY	.NIHPC.RNGTVKA.RGSALLIDVVEETKRENIDFEIPLYDP.SRGIWVDLAVG	92
DAUCUS_BLCY	.SNVMNG.KNGSVKA.SSSALLIDVVEETKRENIDFEIPLYDP.SNGIWVDLAVG	96
CITRUS_BLCY1	KSRQKRN.RSCFIKA.SSSALLIDVVEETKRENIDFEIPLYDP.SKGIWVDLAVG	94
S.LYC_BLCY	KFCETLG.RSVCVKG.SSSALLIDVVEETKRENIDFEIPLYDP.SKGIWVDLAVG	90
C.ANNU_BLCY	KFCBGLGSRVVCVKA.SSSALLIDVVEETKRENIDFEIPLYDP.SKGIWVDLAVG	88
NICOT_BLCY	KICENMG.KGVCVKA.KSSALLIDVVEETKRENIDFEIPLYDP.SKGIWVDLAVG	90
GENT_BLCY	.LKTGSK.KGFCVRA.GSSALLIDVVEETKRENIDFEIPLYDP.SKGIWVDLAVG	98
BIXA_BLCY	KL...GS.RSCFVKA.SSSALLIDVVEETKRENIDFEIPLYDP.SRGIWVDLAVG	89
SANDER_BLCY	.HLMRC...SVVA.KSSALLIDVVEETKRENIDFEIPLYDP.SKSLTVDLAVG	85
TAGETES_BLCY	.SQFKLG.QKYCVKA.SSSALLIDVVEETKRENIDFEIPLYDP.SRNWVDLAVG	97
NARCIS_BLCY	.KPYQKCRNGYIGV.SSNCLLDVVEETKRENIDFEIPLYDP.SKALTDLAVG	94
ZEAL_BLCY	.TAGMAGBASA.....AALRSIAPPTREBILLSLIPRYDP.AFARFVLDLAVG	69
S.LYC_NSY	.KSRKCL.LRNKSSK.LFCSFIDLAPTSKBESIDVNI SWVD PNSRAQFVILIG	88
CITRUS_BLCY2	.KADHHH.HHRIRTS.KFNFIELTPEESVPEFIDFIIEMFHP.SDRIRYVILIG	92
S.LYC_BLCY2	.KSRKCL.LRNKSSK.LFCSFIDLAPTSKBESIDVNI SWVD PNSRAQFVILIG	88
S.TUB_NSY	.KSRKCH.FRNESK.LFCSFIDLAPTSKBESIDVNI SWVD PNSGRAQFVILIG	88
C.ANNU_CCS	.DSRKPH.YRNKSSK.LFCSFIDLAPTSKBESIDVNI SWVD TDLDGAEFVILIG	88
ARAB_BLCY	GGEAGLAVACQVSEA.GLSVCSI.DESEKLIWENNYGVWVDEFEAMDILLCLDIT	142
ADONIS_BLCY	GGEAGLAVACQVSEA.GLIVCSI.DESEKLIWENNYGVWVDEFEAMDILLCLDIT	145
DAUCUS_BLCY	GGEAGLAVACQVSEA.GLAVVSI.DESEKLIWENNYGVWVDEFEAMDILLCLDIT	149
CITRUS_BLCY1	GGEAGLAVACQVSEA.GLSVCSI.DESEKLIWENNYGVWVDEFEAMDILLCLDIT	147
S.LYC_BLCY	GGEAGLAVACQVSEA.GLSVCSI.DPNEKLIWENNYGVWVDEFEAMDILLCLDIT	143
C.ANNU_BLCY	GGEAGLAVACQVSEA.GLSVCSI.DPNEKLIWENNYGVWVDEFEAMDILLCLDIT	141
NICOT_BLCY	GGEAGLAVACQVSEA.GLSVSI.DESEKLIWENNYGVWVDEFEAMDILLCLDIT	143
GENT_BLCY	GGEAGLAVACQVSEA.GLSVCSI.DESEKLIWENNYGVWVDEFEAMDILLCLDIT	151
BIXA_BLCY	GGEAGLAVACQVSEA.GLVCVSI.DPEKLIWENNYGVWVDEFEAMDILLCLDIT	142
SANDER_BLCY	GGEAGLAVACQVSEA.GLSVCSI.DESEKLIWENNYGVWVDEFEAMDILLCLDIT	138
TAGETES_BLCY	GGEAGLAVACQVSEA.GLTVCSI.DESEKLIWENNYGVWVDEFEAMDILLCLDIT	150
NARCIS_BLCY	GGEAGLAVACQVSEA.GLSVSI.DPNEKLIWENNYGVWVDEFEAMDILLCLDIT	146
ZEAL_BLCY	GGEAGLAVACQVSEA.GLSVCAI.DESPAVWENNYGVWVDEFEAMDILLCLDIT	122
S.LYC_NSY	AGEAGLRLABCVSKY.GI.KVCCVDESPLSMWENNYGVWVDEFEENLGLBCLDIT	141
CITRUS_BLCY2	AGEAGLRLABCVSKY.GI.KVCCVDESPLSMWENNYGVWVDEFEENLGLBCLDIT	146
S.LYC_BLCY2	AGEAGLRLABCVSKY.GI.KVCCVDESPLSMWENNYGVWVDEFEENLGLBCLDIT	141
S.TUB_NSY	AGEAGLRLABCVSKY.GI.KVCCVDESPLSMWENNYGVWVDEFEENLGLBCLDIT	141
C.ANNU_CCS	TAGEAGLRLABCVSKY.GI.KVCCVDESPLSMWENNYGVWVDEFEENLGLBCLDIT	141

ARAB.\_BLCY WSGAWVYVDEGVRKQLSREYGRVNRKQLRSKMLCQCIITNGVREHQSQVTVNVEE 197  
 ADONIS\_BLCY WSGAWVYTDNSKQLLDREYGRVNRKQLRSKMLCQCVINGVREHCAKVIKVIIEE 200  
 DAUCUS\_BLCY WSSAIVYIIDDTTKQLREYGRVNRKQLRSKMMCKCISNGVREHCAKVVVKVIEE 204  
 CITRUS\_BLCY1 WSGAWVHIDDNTKQLNREYGRVNRKQLRSKMLCQCIITNGVREHCAKVIKVIIEE 202  
 S.LYC.\_BLCY WSGAAVYIIDNTAKQLLDREYGRVNRKQLRSKMMCKCITNGVREHCAKVVVKVIEE 198  
 C.ANNU.\_BLCY WSGAAVYIIDKTKQLNREYGRVNRKQLRSKMMCKCITNGVREHCAKVIKVIIEE 196  
 NICOT.\_BLCY WSGVWVYIIDNTTKQLLDREYGRVNRKQLRSKMMCKCITNGVREHCAKVIKVIIEE 198  
 GENT.\_BLCY WSGAWVYIDDKHSKQLLDREYGRVNRKQLRSKMMCKCISNGVREHCAKVVVKVIEE 206  
 BIXA\_BLCY WSGAAVYADEBSTKQLLDREYGRVNRKQLRSKMMCKCITANGVREHQSQVTVNVEE 197  
 SANDER.\_BLCY WEGAWVYIDESTRKLDDREYGRVNRKQLRSKMMHRCVANGVREHCAKVVVKVIEE 193  
 TAGETES\_BLCY WSSAIVYIDDKSTKSLNREYGRVNRKQLRSKMLCQCIITANGVREHCAKVIKVIIEE 205  
 NARCIS.\_BLCY WSGAIVYVDDRSTKQLNREYGRVNRKQLRSKMMCKCISNGVREHCAKVVVKVIEE 201  
 ZEA\_BLCY WESASVYIDDGAKSLDREYGRVNRKQLRSKMMHRCVANGVREHCAKVVVKVIEE 177  
 S.LYC.\_NSY WEMTCVHINDNKTQLLDREYGRVNRKQLRSKMLCQCIITNGVREHCAKVVVKVIEE 196  
 CITRUS\_BLCY2 WEMTCVHINDHKTQLLDREYGRVNRKQLRSKMLCQCIITNGVREHCAKVVVKVIEE 201  
 S.LYC\_BLCY2 WEMTCVHINDNKTQLLDREYGRVNRKQLRSKMLCQCIITNGVREHCAKVVVKVIEE 196  
 S.TUB.\_NSY WEMTCVHINDHKTQLLDREYGRVNRKQLRSKMLCQCIITNGVREHCAKVVVKVIEE 196  
 C.ANNU.\_CCS WEPVSCVHISDHTKQLLDREYGRVNRKQLRSKMLCQCIITNGVREHCAKVVVKVIEE 196

ARAB.\_BLCY ANSTVQCSDFGKICASVWVLDATGFSRCLVQYDKFYNQCYQVAYGIVABVDEGHEFD 252  
 ADONIS\_BLCY SKSLLIICNDGCTIINATVWVLDATGFSRCLVQYDKFYNQCYQVAYGIVABVDEGHEFD 255  
 DAUCUS\_BLCY AKSLLIICDGVTTICAAVWVLDATGFSRCLVQYDKFYNQCYQVAYGIVABVDEGHEFD 259  
 CITRUS\_BLCY1 SKSLLIICNDGVTIICAAVWVLDATGFSRCLVQYDKFYNQCYQVAYGIVABVDEGHEFD 257  
 S.LYC.\_BLCY SKSMLIICNDGCTICATWVWVLDATGFSRSLVQYDKFYNQCYQVAYGIVABVDEGHEFD 253  
 C.ANNU.\_BLCY SKSMLIICNDGCTIICATWVWVLDATGFSRSLVQYDKFYNQCYQVAYGIVABVDEGHEFD 251  
 NICOT.\_BLCY AKSMLIICNDGVTIICATWVWVLDATGFSRCLVQYDKFYNQCYQVAYGIVABVDEGHEFD 253  
 GENT.\_BLCY SKSIVICNDGVTIICAAVWVLDATGFSRCLVQYDKFYNQCYQVAYGIVABVDEGHEFD 261  
 BIXA\_BLCY SKAMLIICNDGCTIICAAVWVLDATGFSRSLVQYDKFYNQCYQVAYGIVABVDEGHEFD 252  
 SANDER.\_BLCY AKSMLIICNDGVTIICARVWVLDATGFSRCLVQYDKFYNQCYQVAYGIVABVDEGHEFD 248  
 TAGETES\_BLCY1 KSLIICNDGVTIICATVWVLDATGFSRSLVQYDKFYNQCYQVAYGIVABVDEGHEFD 260  
 NARCIS.\_BLCY KESYLIICDGVTTIDARVWVLDATGFSRCLVQYDKFYNQCYQVAYGIVABVDEGHEFD 256  
 ZEA\_BLCY ASSLLIICDGVAVVAVWVLDATGFSRCLVQYDKFYNQCYQVAYGIVABVDEGHEFD 232  
 S.LYC.\_NSY FESSIVCIDGKIRGSIWVLDASGFASDFTEYDKPRNHQYQIAHCVLVEVMEHNEFD 251  
 CITRUS\_BLCY2 FESSIVCIDGKIRGSIWVLDASGFASDFTEYDKPRNHQYQIAHCVLVEVMEHNEFD 256  
 S.LYC\_BLCY2 FESSIVCIDGKIRGSIWVLDASGFASDFTEYDKPRNHQYQIAHCVLVEVMEHNEFD 251  
 S.TUB.\_NSY FESSIVCIDGKIRGSIWVLDASGFASDFTEYDKPRNHQYQIAHCVLVEVMEHNEFD 251  
 C.ANNU.\_CCS FESSIVCIDGKIRGSIWVLDASGFASDFTEYDKPRNHQYQIAHCVLVEVMEHNEFD 251

ARAB.\_BLCY VDKMVEMLWRDHLKHSYPEIKERNSKIETFLYAMFESSNRIFLEETSIVARECLR 307  
 ADONIS\_BLCY LDKMVEMLWRDHLKONLEIKERNSKIETFLYAMFESSNRIFLEETSIVARECLR 310  
 DAUCUS\_BLCY VDKMVEMLWRDHLKONLEIKERNSKIETFLYAMFESSNRIFLEETSIVARECLA 314  
 CITRUS\_BLCY1 LDKMVEMLWRDHLNNSSEIKERNSKIETFLYAMFESSNRIFLEETSIVARECLV 312  
 S.LYC.\_BLCY VDKMVEMLWRDHLKNNVILKERNSKIETFLYAMFESSNRIFLEETSIVARECLR 308  
 C.ANNU.\_BLCY VDKMVEMLWRDHLKNNVILKERNSKIETFLYAMFESSNRIFLEETSIVARECLG 306  
 NICOT.\_BLCY TSKMVEMLWRDHLNMMELKERNKRVETFLYAMFESSNRIFLEETSIVARECLR 308  
 GENT.\_BLCY INKMVEMLWRDHLNNTNINKERNKRVETFLYAMFESSNRIFLEETSIVARECLA 316  
 BIXA\_BLCY LDKMVEMLWRDHLKONLEIKERNSKIETFLYAMFESSNRIFLEETSIVARECLVA 307  
 SANDER.\_BLCY LDKMVEMLWRDHLKONLEIKERNSKIETFLYAMFESSNRIFLEETSIVARECLA 302  
 TAGETES\_BLCY VDKMVEMLWRDHLKONLEIKERNSKIETFLYAMFESSNRIFLEETSIVARECLK 315  
 NARCIS.\_BLCY VDKMVEMLWRDHLKONLEIKERNSKIETFLYAMFESSNRIFLEETSIVARECLK 311  
 ZEA\_BLCY LDKMVEMLWRDHLKONLEIKERNSKIETFLYAMFESSNRIFLEETSIVARECLA 287  
 S.LYC.\_NSY LDKMVEMLWRDHLKONLEIKERNSKIETFLYAMFESSNRIFLEETSIVARECLV 306  
 CITRUS\_BLCY2 LDKMVEMLWRDHLKONLEIKERNSKIETFLYAMFESSNRIFLEETSIVARECLV 311  
 S.LYC\_BLCY2 LDKMVEMLWRDHLKONLEIKERNSKIETFLYAMFESSNRIFLEETSIVARECLV 306  
 S.TUB.\_NSY LDKMVEMLWRDHLKONLEIKERNSKIETFLYAMFESSNRIFLEETSIVARECLV 306  
 C.ANNU.\_CCS LDKMVEMLWRDHLKONLEIKERNSKIETFLYAMFESSNRIFLEETSIVARECLV 306

ARAB._BLCY	MELICBRMAARIRHEICINVKRIBEDERCVIEMCGGLEFVI	FORVVGICGCTAGMVHP	362
ADONIS_BLCY	FELICBRMVARIHEICIKVKKSIEEDERCVIEMGGLEFVI	FORVVGICGCTAGMVHP	365
DAUCUS_BLCY	MELICBRMVARIHEICIKVKKSIEEDERCVIEMCGGLEFVI	FORVVGICGCTAGMVHP	369
CITRUS_BLCY	IMKLTICBRMVARIHEICIKVKKSIEEDERCVIEMCGGLEFVI	FORVVGICGCTAGMVHP	367
S.LYC._BLCY	IDLICBRMVARIHEICIKVKKSIEEDERCVIEMGGLEFVI	FORVVGICGCTAGMVHP	363
C.ANNU._BLCY	MDDICBRMVARLSHICIKVKKSIEEDERCVIEMCGGLEFVI	FORVVGICGCTAGMVHP	361
NICOT._BLCY	MDDICBRMVARIHEICIKVKKSIEEDERCVIEMGGLEFVI	FORVVGICGCTAGLVHP	363
GENT._BLCY	IBLICBRMVARIHEICIKVKKSIEEDERCVIEMCGGLEFVI	FORVVGICGCTAGMVHP	371
BIXA_BLCY	PEDICBRMVARIHEICIKVKKSIEEDERCVIEMGGLEFVI	FORVVGICGCTAGMVHP	362
SANDER._BLCY	MELICBRMVARIHEICIKVKKSIXXDERCVIEMGGLEFVI	FORVVGICGCTAGMVHP	357
TAGETES_BLCY	MELICBRMAYRIHEICIKVKKSIEEDERCVIEMGGLEFVI	FORVVGICGCTAGMVHP	370
NARCIS._BLCY	MELICBRMVARIHEICIRIKSIEEDERCVIEMGGLEFVI	FORVVGICGCTAGMVHP	366
ZEA_BLCY	MDDICBRMAARIRHEICIRVRSVEEDERCVIEMCGGLEFVI	FORVVGICGCTAGMVHP	342
S.LYC._NSY	YMEVKRRMVARIHEICIKVKSVIEEDERCVIEMGGLEPRI	FORVMAICGNSGIVHP	361
CITRUS_BLCY	ZYKEVKSMAARIRHMGIRVRFVIEEDERCVIEMGGLEFVI	FOSVMAICGCTAGLVHP	366
S.LYC_BLCY2	YMEVKRRMVARIHEICIKVKSVIEEDERCVIEMGGLEPRI	FORVMAICGNSGIVHP	361
S.TUB._NSY	YMEVKRRMVARIHEICIKVRSVIEEDERCVIEMGGLEPRI	FORVMAICGNSGIVHP	361
C.ANNU._CCS	YMEVKRRMVARIHEICIKVRSVLEEDERCVIEMGGLEPRI	FORVMAICGTSIVHP	361
ARAB._BLCY	STCYMVARTIAAAEIVANAVRYIIGSESSN.S...LR...	GDCLSAEVMKDIWP	409
ADONIS_BLCY	STCYMVARTIAAAEIVAKSIVCYLG..SDR.S...LS...	GNELSAEVMKDIWP	410
DAUCUS_BLCY	STCYMVARTIAAAEIVANAVCYLGG.SKK.G...AL...	GNELSAEVMKDIWP	415
CITRUS_BLCY1	STCYMVARTIAAAEIVANAVRSLS..SDR.S...IS...	GHLKSAEVMKDIWP	412
S.LYC._BLCY	STCYMVARTIAAAEIVANAVICYLG..SER.S...HS...	GNELSTAVVMKDIWP	408
C.ANNU._BLCY	STCYMVARTIAAAEIVANAVICYLS..SER.S...HS...	GDLSAAVMKDIWP	406
NICOT._BLCY	STCYMVARTIAAAEIVANAVIHYLG..SEK.D...LL...	GNELSAAVVMKDIWP	408
GENT._BLCY	STCYMVARTIAAAEIVANAVRYIG..SEK.R...HL...	GABELSGEVMKDIWP	416
BIXA_BLCY	STCYMVARTIAAAEIVANSIVFYSS..SDHNS...AS...	GDLLAAQVMKDIWP	408
SANDER._BLCY	STCYMVARTIAAAEIVAGSIVRYISSNRGI.S.....	GDCLISARVMKDIWP	402
TAGETES_BLCY	STCYMVARTIAAAEIVAKSIIIRYLN..NEK.S...MVADV	GDLLAAGIWRDIWP	419
NARCIS._BLCY	STCYMVARTIAAAEIVANSIVCYLV..SDS.G...LS...	GNLLSADVMKDIWP	411
ZEA_BLCY	STCYMVARTIAAEIVADAVRFIDTGTGN.GMGSLA...	GDALSAEVMKDIWP	392
S.LYC._NSY	STCYMVARSMAIAEVIABAVVEGLG..STR.M...IR...	GSCLYHRVMKDIWP	406
CITRUS_BLCY	ZATCYMVARTIMALABALADATAECLG..STR.M...IR...	GRFLHOKVMKDIWP	411
S.LYC_BLCY2	STCYMVARSMAIAEVIABAVVEGLG..STR.M...IR...	GSCLYHRVMKDIWP	406
S.TUB._NSY	STCYMVARSMAIAEVIABAVKGLG..STR.M...IR...	GSCLYHRVMKDIWP	406
C.ANNU._CCS	SSCYMVARSMAIAEVIABAVVESIG..STR.M...IR...	GSCLYHRVMKDIWP	406
ARAB._BLCY	IBRRRCREFFCFGMDIILKLLDQATRRRFFDAFFDLEPRYWHGF	FISSRLEFIBELLV	464
ADONIS_BLCY	IBRRRCREFFCFGMDIILKLLDQATRRRFFDAFFDLEPRYWHGF	FISSRLEFIBELLF	465
DAUCUS_BLCY	IBRRRCREFFCFGMDIILKLLDQATRRRFFSAFFDLEPRYWHGF	FISSRLEFIBELFF	470
CITRUS_BLCY1	IBRRRCREFFCFGMDIILKLLDQATRRRFFDAFFDLEPRYWHGF	FISSRLEFIBELLV	467
S.LYC._BLCY	IBRRRCREFFCFGMDIILKLLDQATRRRFFDAFFDLEPRYWHGF	FISSRLEFIBELTV	463
C.ANNU._BLCY	IBRRRCREFFCFGMDIILKLLDQATRRRFFDAFFDLEPRYWHGF	FISSRLEFIBELTV	461
NICOT._BLCY	IBRRRCREFFCFGMDIILKLLDQATRRRFFDAFFDLEPRYWHGF	FISSRLEFIBELTF	463
GENT._BLCY	IBRRRCREFFCFGMDIILKLLDQATRRRFFDAFFDLEPRYWHGF	FISSRLEFIBELAL	471
BIXA_BLCY	IBRRRCREFFCFGMDIILKLLDQATRRRFFDAFFDLEPRYWHGF	FISSRLEFIBEL.V	462
SANDER._BLCY	IBRRRCREFFCFGMDIILKLLDQATRRRFFDAFFDLEPRYWHGF	FISSRLEFIBELVF	457
TAGETES_BLCY	IBRRRCREFFCFGMDIILKLLDQATRRRFFDAFFDLEPRYWHGF	FISSRLEFIBELVT	474
NARCIS._BLCY	IBRRRCREFFCFGMDIILKLLDQATRRRFFDAFFDLEPRYWHGF	FISSRLEFIBELVP	466
ZEA_BLCY	ANRRRCREFFCFGMDIILKLLDQATRRRFFDAFFDLEPRYWHGF	FISSRLEFIBELM	447
S.LYC._NSY	LDRRRCREFFCFGMDIILKLLDQATRRRFFDAFFDLEPRYWHGF	FISSRLEFIBEL	461
CITRUS_BLCY2	IDRRRCREFFCFGMDIILKLLDQATRRRFFDAFFDLEPRYWHGF	FISSRLEFIBEL	466
S.LYC_BLCY2	LDRRRCREFFCFGMDIILKLLDQATRRRFFDAFFDLEPRYWHGF	FISSRLEFIBEL	461
S.TUB._NSY	LDRRRCREFFCFGMDIILKLLDQATRRRFFDAFFDLEPRYWHGF	FISSRLEFIBEL	461
C.ANNU._CCS	SDRRRCREFFCFGMDIILKLLDQATRRRFFDAFFDLEPRYWHGF	FISSRLEFIBEL	461

ARAB._BLCY	FGLSLEFSHASNTSRLEIMTKCTVELAKMINNLVCDRD.....	501
ADONIS_BLCY	FGLSLEFSHASNASRLEIMAKCTVELVMMNLLIQDTP.....	502
DAUCUS_BLCY	FGLSLEFSNASNTSRLEIMAKCTVELVMMNLLIKDRE.....	507
CITRUS_BLCY1	FGLSLEFSHASNTSRLEIMAKCTVELVMMINNLVCDTP.....	504
S.LYC._BLCY	FGLSLEFSHASNTSRFEIMTKCTVELVMMINNLQDKE.....	500
C.ANNU._BLCY	FGLSLEFSHASNTSRLEIMTKCTVELVHMNLLQDKE.....	498
NICOT._BLCY	FGLSLEFSRASNTSRLEIMTKCTVELVMMINLLQDTE.....	500
GENT._BLCY	FGLSLEFSHANTSRLEIMSKCTVELINMINLLQDKE.....	508
BIXA_BLCY	FGLSLEFSHASNTSRVEIMAKCTVELVMMINLLQDKD.....	499
SANDER._BLCY	FGLSLEFGHASNTCRLEIMAKGSEIVHMVNNLLQDRD.....	494
TAGETES_BLCY	FGLSLEFGHASNTCRVEIMAKCTVELATMIGNLVQDRE.....	511
NARCIS._BLCY	FGLSLEFSHASNTCKLEIMAKCTVELVMMINNLVCDRD.....	503
ZEA_BLCY	FGLALEFGNASNSRLEIMAKCTVELGKMIGNLLIQDRG.....	485
S.LYC._NSY	LSLQLEFGHCSNMTRLDIVTKCEVELVRLIGNLATESL.....	498
CITRUS_BLCY2	LSLQLEFGHASNSRRLDIVTKCEVELVMMNLLALETI.....	503
S.LYC_BLCY2	LSLQLEFGHCSNMTRLDIVTKCEVELVRLIGNLATESL.....	498
S.TUB._NSY	LSLQLEFGHCSNLTTRLDIVTKCEVELVRLIGNLATESL.....	498
C.ANNU._CCS	LSLQLEFGHASNLARLDIVTKCTVELVKILIGNLATESL.....	498

Anexo I: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos codificadas por los genes *Csβ-LCY1* (Citrus bLCY1) y *Csβ-LCY2* (Citrus bLCY2) con β-LCYs, NSY y CCS de otras especies de plantas. Arab bLCY, *Arabidopsis thaliana* β-LCY (AAB53337); Adonis bLCY, *Adonis palaestina* β-LCY (AAK07430); Daucus bLCY, *Daucus carota* subsp. β-LCY (ABB52071); S.Lyc bLCY, *Solanum lycopersicon* β-LCY (CAA60170); Bixa bLCY, *Bixa orellana* β-LCY (CAD70565); S.Lyc NSY, *Solanum lycopersicon* NSY (CAB93342); Nicot. bLCY, *Nicotiana tabacum* β-LCY (CAA57386); Gent bLCY, *Gentiana lutea* β-LCY (BAA88840); Sander bLCY, *Sandersonia aurantiaca* β-LCY (AAL92175); C.annu. bLCY, *Capsicum annuum* β-LCY (CAA60119); Tagetes bLCY, *Tagetes erecta* β-LCY (AAG10429); S.Lyc bLCY, *Solanum lycopersicon* β-LCY2 (AAG21133); Narcis bLCY, *Narcissus pseudonarcissus* β-LCY (CAA67331); S.tub NSY, *Solanum tuberosum* NSY (CAB92977); Zea bLCY, *Zea mays* β-LCY (AAO18661); C. Annu. CCS, *Capsicum annuum* CCS (Q42435). Los aminoácidos en fondo negro corresponden a residuos conservados en todas de las secuencias alineadas, en fondo rosa aquellos conservados en un 75% de las secuencias y los que son equivalentes a estos y en fondo azul aquellos conservados en un 50% de las secuencias y los que son equivalentes a estos. Las rayas (-) representan los espacios introducidos en las secuencias para un alineamiento óptimo.

## Anexo II

Spinac_eLCY.....MVKQRQNFQTFCFWRPNSSNVVVECSRRSGSVLRS.....	38
Tagetes_eLCY.....MSMRAGHMTATMAAFTCFRMTSIRYTKQLKCNAAKSQLVVKQEI..	45
Adonis_eLCY .MELLGVRNLISSCFVWTFGTRNLSSSKLAYNIHRYGSSCRVDRQVRADGGSG..	52
Daucus_eLCY MESYCIIGRRNFITMAVFSTCPTWRRFRKRLRRSNVVKVSCGRKSEMRCVKEVI..	53
G.lutea_eLCY..MECFKVRNFVAVAVK.CPYSRRSRRRRLILSEKQVFYNHSSHANSLVLQV..	50
Arab_eLCY ..MECVGARNFAAMAVSTFPWSC..RRKFPVVKRYSYRNIRFGLCSVRASGGGS	51
S.lyc_eLCY ..MECVGVQNVGAMAVLTRPRLNRSWGGELQEQKSIIFLAYEQYKSCNSS.....	48
Citrus_eLCY MEYYCIGARNFAAMAVSPFPTGRA..RRKALRVKTKQSAVDCNHSYKVTARATS	53
Spinac_eLCY.....NSDS..SCVIAPEDFAMEEDFIRAGGSELLYVQMCKNKAMDYCSKIS	83
Tagetes_eLCY.....EE.....EEDYVKAGGSELLYVQMCKNKSMDAQSSIS	77
Adonis_eLCY .....SRTS.....VAYKEGFVDEEDFIRAGGSELLYVQMCKNKSMERQAKLA	95
Daucus_eLCY .....SCVA.....VVEDEEFADIEDFVKAGGSELLYVQMCKNKAMDITQSKLA	96
G.lutea_eLCY.....RCSGSRRESCVVKKEEFSDEEDYVKAGGSELLYVQMCKNKQMAQSSKIS	99
Arab_eLCY S..GSESCVA..VREDFAD.....EEDFVKAGGSELLYVQMCKNKMDQSKLV	96
S.lyc_eLCY .....SGSD..SCVVDKEDFADEEDYVKAGGSELLYVQMCKNKMDQSSKIS	93
Citrus_eLCY NNAGSESCVA..VK.....EEDYVKAGGSELLYVQMCKNKSMQSKLA	95
Spinac_eLCYDKLRQISDANEL.....IDLVVIGCGFAGIALAESAAGLGRVGLVGPDLPTNN	133
Tagetes_eLCYCKLPRVPIGGGDSNCLIDLVVIGCGFAGIALAESAAGLGLNVALIGPDLPTNN	132
Adonis_eLCY DKLPIIPFGESV.....MDLVVIGCGFAGLSLAESAAGLGRVGLVGPDLPTNN	145
Daucus_eLCY HKLPRIPIRDSV.....IDLVVIGCGFAGIALAESAAGLGRVGLVGPDLPTNN	146
G.lutea_eLCYDKLPRISSANNV.....MDLVVIGCGFAGIALAESAAGLGRVGLVGPDLPTNN	149
Arab_eLCY DKLPIISIGDGA.....IDLVVIGCGFAGIALAESAAGLGRVGLVGPDLPTNN	146
S.lyc_eLCY DELRQISAGQTV.....IDLVVIGCGFAGIALAESAAGLGLNVALVGPDLPTNN	143
Citrus_eLCY DKLPIISINGI.....IDLVVIGCGFAGIALAESAAGLGLNVALVGPDLPTNN	145
Spinac_eLCY YGVWDEDFRALGLGECIEHVWRDTIVYIDEDNEIYIGRSYGRVSRQLLHBEELIR	188
Tagetes_eLCY YGVWDEDFEFIGLGLGECIEHVWRDTIVYIDEDNEIYIGRSYGRVSRQLLHBEELIR	187
Adonis_eLCY YGVWDEDFKDLGLERCIIEHVWRDTIVYIDEDNEIYIGRSYGRVSRQLLHBEELIR	200
Daucus_eLCY YGVWDEDFIDLGLGECIEHVWRDTIVYIDEDNEIYIGRSYGRVSRQLLHBEELIR	201
G.lutea_eLCY YGVWDEDFKDLGLGACIEHVWRDTIVYIDEDNEIYIGRSYGRVSRQLLHBEELIR	204
Arab_eLCY YGVWDEDFNDLGLQRCIEHVWRDTIVYIDEDNEIYIGRSYGRVSRQLLHBEELIR	201
S.lyc_eLCY YGVWDEDFKDLGLQACIEHVWRDTIVYIDEDNEIYIGRSYGRVSRQLLHBEELIR	198
Citrus_eLCY YGVWDEDFRDLGLGECIEHVWRDTIVYIDEDNEIYIGRSYGRVSRQLLHBEELIR	200
Spinac_eLCY CVESGVSYLNAKVERTIEAGDGHSLVCEENNIVIPCRLATVASGAASGKILQYEL	243
Tagetes_eLCY CMESGVSYLSSKVERTIEAPNGLSLIECEGNITIPCRLATVASGAASGKILQYEL	242
Adonis_eLCY CVESGVSYLNSKVERTIEAGDGHSLVCEENNIVIPCRLATVASGAASGKILQYEL	255
Daucus_eLCY CVESGVSYLSSKVERTIEAGDGHSLVCEENNIVIPCRLATVASGAASGKILQYEL	256
G.lutea_eLCY CVESGVSYLSSKVERTIEAANGHSVVECDNVSIPCRLATVASGAASGKILQYEL	259
Arab_eLCY CVESGVSYLSSKVERTIEASDGLRLVACDENNVIPCRLATVASGAASGKILQYEL	256
S.lyc_eLCY CVEAGVLYLNSKVERTIEAATNCQSLVECEGDVVI PCRFVTVASGAASGKILQYEL	253
Citrus_eLCY CVESGVSYLSSKVERTIEASTSGHRLVACEHDMIVPCRLATVASGAASGKILQYEL	255
Spinac_eLCY GGFVSVQVTAYGVEVEVENSEYDPNVVVMFYRDYTKLSVQSLIEAAYPTFLYVWP	298
Tagetes_eLCY GGFVSVQVTAYGVEVEVESIPYDPSLVVMFYRDYTKHKSQSLIEAAYPTFLYVWP	297
Adonis_eLCY GGFVSVQVTAYGVEVEVENNYPDPNVVVMFYRDYMQQRILQCSDEEYPTFLYVWP	310
Daucus_eLCY GGFVSVQVTAYGVEVEVENNYPDPSLVVVMFYRDYTKRQVFGMAEYPTFLYVWP	311
G.lutea_eLCY GGFVSVQVTAYGVEVEVENNYPDPNVVVMFYRDYTKRQVFGMAEYPTFLYVWP	314
Arab_eLCY GGFVSVQVTAYGVEVEVENSEYDPDQVVMFYRDYTKRQVFGMAEYPTFLYVWP	311
S.lyc_eLCY GGFVSVQVTAYGVEVEVENNYPDPSLVVVMFYRDYTKRQVFGMAEYPTFLYVWP	308
Citrus_eLCY GGFVSVQVTAYGVEVEVENNYPDPSLVVVMFYRDYTKRQVFGMAEYPTFLYVWP	310

Spinac_eLCY	LENTEQKRNIAFGAAASMVHPATGYSVVRSLSEAPKYASATAIILIKNDISKVAILR	408
Tagetes_eLCY	LENTEQKRNIAFGAAASMVHPATGYSVVRSLSEAPNYAAVIAKILGKGNKQMDH	407
Adonis_eLCY	LENTEQKRNIAFGAAASMVHPATGYSVVRSLSEAPKYASVIAKILKQDNSAYVVG	420
Daucus_eLCY	LENTEQKRNIAFGAAASMVHPATGYSVVRSLSEAPNYAAVIANILKSSQMNGMINY	421
G.lutea_eLCY	LENTEQKRNIAFGAAASMVHPATGYSVVRSLSEAPKYASATAKIFKQHHAKMLTR	424
Arab_eLCY	LENTEQKRNIAFGAAASMVHPATGYSVVRSLSEAPKYASVIAEILRETTTKINS.	420
S.lyc_eLCY	LENTEQKRNIAFGAAASMVHPATGYSVVRSLSEAPKQASVIANILRQHSKVMITS	418
Citrus_eLCY	LENTEQKRNIAFGAAASMVHPATGYSVVRSLSEAPNYASATAIILKHDHSRGRILH	420
Spinac_eLCY	QRSVGNISMCAWNTLWPCERKRQRAFFIFGLSLIVQIDIEGIRTFEFTFFRVEKW	463
Tagetes_eLCY	GRYTTNISKQAWETLWPLERKRQRAFFIFGLALIVQMDIEGIRTFEFTFFRIPITW	462
Adonis_eLCY	QSSAVNISMCAWSSLWPKERKRQRAFFIFGLLIVQIDIEARTFEFTFFRIPITW	475
Daucus_eLCY	GRYTTNISMCAWNTLWPCERKRQRAFFIFGLALILIQIDIDIGIRTFEFTFFRIPITW	476
G.lutea_eLCY	.....NISSCAWNTLWPERKRQRAFFIFGLALILIDIDIEGIRTFEFTFFCIEKW	474
Arab_eLCY	.....NISQAWNTLWPPERKRQRAFFIFGLALIVQHDTEGIRSFTEFTFFRIPITW	470
S.lyc_eLCY	SSIPS.ISTCAWNTLWPCERKRQRAFFIFGLALILIQIDIEGIRSFTEFTFFRIPITW	472
Citrus_eLCY	EQSNENISMCAWNTLWPCERKRQRAFFIFGLALILIQIDIEGIRTFEFTFFRIPITW	475
Spinac_eLCY	MWEGFLGSMISADLLIFAFYMEIIAENDLRKGLIFHLLSDEPTGATMIRTYITL	517
Tagetes_eLCY	MWGFGLGSSLSSTDLIFAFYMEIIAEPHSLRGLVIFHLLSDEPTGGTMIKAYITI	516
Adonis_eLCY	MWGFGLGSSLSSEDLVLFMSYMEVLAENSMRMSIVFHLLSDPSGAVMVKAYLER	529
Daucus_eLCY	MWGFGLGSSLSVDELVIFAFYMEIIAEPHLLRMSIVFHLLSDEPTGATMVKTYITA	530
G.lutea_eLCY	MQGFLGSIISSTDLIFAFYMEIIAENDLRKSLIFHLLSDEPTGATMVRTYLEM	528
Arab_eLCY	MWGFGLGSIISGDLVIFAFYMEVISENNLRKGLINHLLSDEPTGATMIRTYIKV	524
S.lyc_eLCY	MWGFGLGSSLSADLLIFAFYMEIIAENDMRKGLIFHLLSDEPTGATMIRTYITF	526
Citrus_eLCY	MWGFGLGSSISADLLIFAFYMEIIAENDLRKGLIFHLLSDEPTGATMVRTYITL	529

Anexo II: Alineamiento de la secuencia de aminoácidos codificadas por el gen *Cse-LCY* (Citrus eLCY) con  $\epsilon$ -LCYs de otras especies de plantas. Spinac eLCY, *Spinacia oleracea* e-LCY (AAL69394); Tagetes eLCY, *Tagetes erecta*  $\epsilon$ -LCY (AAG10428); Adonis eLCY, *Adonis palaestina*  $\epsilon$ -LCY (AAK07431); Daucus eLCY, *Daucus carota* subsp.  $\epsilon$ -LCY (ABB52073); G.lutea eLCY, *Gentiana lutea*  $\epsilon$ -LCY (BAA88845); Arab eLCY, *Arabidopsis thaliana*  $\epsilon$ -LCY (BAA97033); S.Lyc eLCY, *Solanum lycopersicon*  $\epsilon$ -LCY (O65837). Los aminoácidos en fondo negro corresponden a residuos conservados en todas de las secuencias alineadas, en fondo rosa aquellos conservados en un 75% de las secuencias y los que son equivalentes a estos y en fondo azul aquellos conservados en un 50% de las secuencias y los que son equivalentes a estos. Las rayas (-) representan los espacios introducidos en las secuencias para un alineamiento óptimo.

## Anexo III

bLCY2a	CGGAAAGTTCGAGAAAGCTTTAAAACCGCCCGGTTTTAA	-1114
bLCY2b	CAGGAAAGTTCGAGAAAGCTTTAAAACCGCCCGGTTTTAA	
bLCY2a	AGGATTACAGTTTTAAGCTTTTAAAAACCATACAGTTTTA	-1074
bLCY2b	AGGATTACAGTTTTAAGCTTTTAAAAACCATACAGTTTTA	
bLCY2a	ATCTTTTTAAGTCATACAGTTTTTAAGCTTTACCGCACCTT	-1034
bLCY2b	ATCTTTTTAAGTCATACAGTTTTTAAGCTTTACCGCACCTT	
bLCY2a	TCCCCTACTTTAAAATTTCCGGACTGAAATATTTATATATA	-994
bLCY2b	TCCCCTACTTTAAAATTTCCGGACTGAAATATTTATATATA	
bLCY2a	TATAAATCAGTAAGCCATTTCTCATGATGGCAAA ATCTA	-954
bLCY2b	TATAAATCAGTAAGCCATTTCTCATGATGGCAAA ATCTA	
bLCY2a	TCATCAA ATCTA NTAGAAGTTATTTCTTCTATTAGAAGG	-914
bLCY2b	TCATCAA ATCTA NTAGAAGTTATTTCTTCTATTAGAAGG	
bLCY2a	CATGTACCTTAAAACCGGTAAGTTAAGCTCATAAAAAGTT	-874
bLCY2b	CATGTACCTTAAAACCGGTAAGTTAAGCTCATAAAAAGTT	
	<b>Etileno</b>	
bLCY2a	TGAGCAATTGACAA ATTTCAF TAAAACAACAACATAAAGA	-834
bLCY2b	TGAGCAATTGACAA ATTTCAF TAAAACAACAACATAAAGA	
bLCY2a	AAATAAGTAGGGAGACAAAATGCAAAGAAATTAAGATAAT	-794
bLCY2b	AAATAAGTAGGGAGACAAAATGCAAAGAAATTAAGATAAT	
bLCY2a	TGAGATAGGTGATAGTTGAGAATTTGAGAAGTAAAAGATA	-754
bLCY2b	TGAGATAGGTGATAGTTGAGAATTTGAGAAGTAAAAGATA	
	<b>Etileno</b>	
bLCY2a	AATCAAAC AAAACTAAAGAAATA TAAAGAGATGAGGGT T	-714
bLCY2b	AATCAAAC AAAACTAAAGAAATA TAAAGAGATGAGGGT T	
	<b>Fruto</b>	
bLCY2a	GTGACA ATTAGTTGGTGTG ATAGAAAAAAATGAATTTT	-674
bLCY2b	GTGACA ATTAGTTGGTGTG ATAGAAAAAAATGAATTTT	
bLCY2a	TAAATCATTTTCATAAGGTATGTTTAGAAAAGCGGTTCTCAC	-634
bLCY2b	TAAATCATTTTCATAAGGTATGTTTAGAAAAGCGGTTCTCAC	
bLCY2a	TTTTCAGTCAATACAGGGGTGCCAATAGTTCAGCTCAAATC	-594
bLCY2b	TTTTCAGTCAATACAGGGGTGCCAATAGTTCAGCTCAAATC	
bLCY2a	CAATTCTTTTTTGGGCTTTGCAAAGCTAAGCCCAAAAACC	-554
bLCY2b	CAATTCTTTTTTGGGCTTTGCAAAGCTAAGCCCAAAAACC	
bLCY2a	TTCCAGAGTGGTCTCCTATACTCCGATTCGGGAATGCGA	-514
bLCY2b	TTCCAGAGTGGTCTCCTATACTCCGATTCGGGAATGCGA	
bLCY2a	AGATTCCATGTTTCTAGTGGTTACCACCTCTTTGGTCCAA	-474
bLCY2b	AGATTCCATGTTTCTAGTGGTTACCACCTCTTTGGTCCAA	

bLCY2a	TCAACATTTTGCACACAATTAAGTTATTTTTTACTTCTCT	-434
bLCY2b	TCAACATTTTGCACACAATTAAGTTATTTTTGACTTCTCT	
bLCY2a	AATACAGTAATATTTTGTGTGTTTGGTAACCTCTGTTTAA	-394
bLCY2b	AATACAGTAATATTTTGTGTGTTTGGTACTCTGTTTAA	
bLCY2a	AATTAGGTC AATTC AATGCCGTA TGA TTTT GAGATGAGAG	-354
bLCY2b	AATTAGGTT AATTC AATGCCGTA CAAT TTTT GAGATGAGAG	
bLCY2a	TTACAAGACCGGCCAGAACTTTTCTTAATATGACAAAACA	-314
bLCY2b	TTACAAGACCGGCCAGAACTTTTCTTAATATGACAAAACA	
bLCY2a	TAATTCGCAAAACGCCATGCGAACCTGCCAATAATAATATG	-274
bLCY2b	TAATTCGCAAAACGCCATGTCAGCCTGCCAATAATAATATG	
bLCY2a	GAGTATG TGGTGCGGTGGCAGCAGTAGCTGATATCTTTAG	-234
bLCY2b	GAGTATG TGGTGCGGTGGCAGCAGTAGCTGATATCTTTAG	
bLCY2a	TGCGGATTGACGATATTTGGCGCTGCA GCAAT AAAATATT	-194
bLCY2b	TGCGGATTGACGATATTTGGCGCTGCA GCAAT AAAATATT	
	<b>Etilleno</b>	
bLCY2a	GA AATTC A A A SCACCCAT T GCTTTATTA ACTT A A CAGTG	-154
bLCY2b	GA AATTC A A A SCACCCAT C GCTTTATTA ACTT A A CAGTG	
bLCY2a	AATTATGGTCTCCTCTCCACTTAGAAAATGCGCCAAAAC	-114
bLCY2b	AATTATGGTCTCCTCTCCACTTAGAAAATGCGCCAAAAC	
bLCY2a	AAGTAAGAGAGCATCATTTTCTCTTCTTCTCTGAGATC	-74
bLCY2b	AAGTAAGAGAGCATCATTTTCTCTTCTTCTCTGAGATC	
bLCY2a	CCTCTGTTCTTTTATCTCAATTATTGACTCCTCTCCACT	-34
bLCY2b	CCTCTGTTCTTTTATCTCAATTATTGACTCCTCTCCACT	
bLCY2a	TTCTTTTGTCTTTCTCATTCTCTGCGCTCTGGC ATG BCA	+6
bLCY2b	TTCTTTTGTCTTTCTCATTCTCTGCGCTCTGGC ATG BCA	
bLCY2a	ACTCTTCTTAGCCCGTTTTCTCCTTCTCCCTTAGCTAAAG	+46
bLCY2b	ACTCTTCTTAGCCCGTTTTCTCCTTCTCCCTTAGCTAAAG	
bLCY2a	TTTCGCAAAATAATTGATTCAACATCATCA C TFCATTTTC	+86
bLCY2b	TTTCGCAAAATAATTGATTCAACATCATCA A TFCATTTTC	
bLCY2a	<b>2</b> C TATTTTCCATTAGGCCGCCAAAATGCATGTTTCGAGAAG	+126
bLCY2b	<b>2</b> G TATTTTCCATTAGGCCGCCAAAATGCATGTTTCGAGAAG	
bLCY2a	GCGGATCATCATCATCATCACAGGATCCGGACAAGCAAGT	+146
bLCY2b	GCGGATCATCATCATCATCACAGGATCCGGACAAGCAAGT	
bLCY2a	TTGGTAACTTCTTAGAGTTGACACCGGAGTCG T ACCTGA	+186
bLCY2b	TTGGTAACTTCTTAGAGTTGACACCGGAGTCG A ACCTGA	

bLCY2a	ATTCCTTAACTTTTGATCTCCOCTGGTTTCATCCGTCCGAT	+226
bLCY2b	ATTCCTTAACTTTTGATCTCCOCTGGTTTCATCCGTCCGAT	
bLCY2a	CGTATTCGATATGACGTGATCATCATTTGGCACTGGACCTG	+266
bLCY2b	CGTATTCGATATGACGTGATCATCATTTGGCACTGGACCTG	
bLCY2a	CCGGCCTCCGTCTAGCTGAGCAAGTCTCATCGCGTCATA	+306
bLCY2b	CCGGCCTCCGTCTAGCTGAGCAAGTCTCATCGCGTCATA	

Anexo III: Alineamiento de las secuencias de nucleótidos de los promotores y de un fragmento de la región codificante de  $\beta$ -*LCY2a* (bLCY2a) y  $\beta$ -*LCY2b* (bLCY2b). Se recuadran los elementos *cis* reguladores identificados en la base de datos PLACE (Higo *et al.* 1999), para más detalles consultar apartado 4.3 del Capítulo I de resultados. En verde se recuadra el codón correspondiente al inicio de la región codificante de la proteína y en rojo los SNPs identificados en las secuencias, según la numeración de la Tabla 12.