

Carolina Royo



Universidad Politécnica de Valencia

Departamento de Biotecnología



Respuesta de los frutos cítricos a las bajas temperaturas: estudio mediante micromatrices

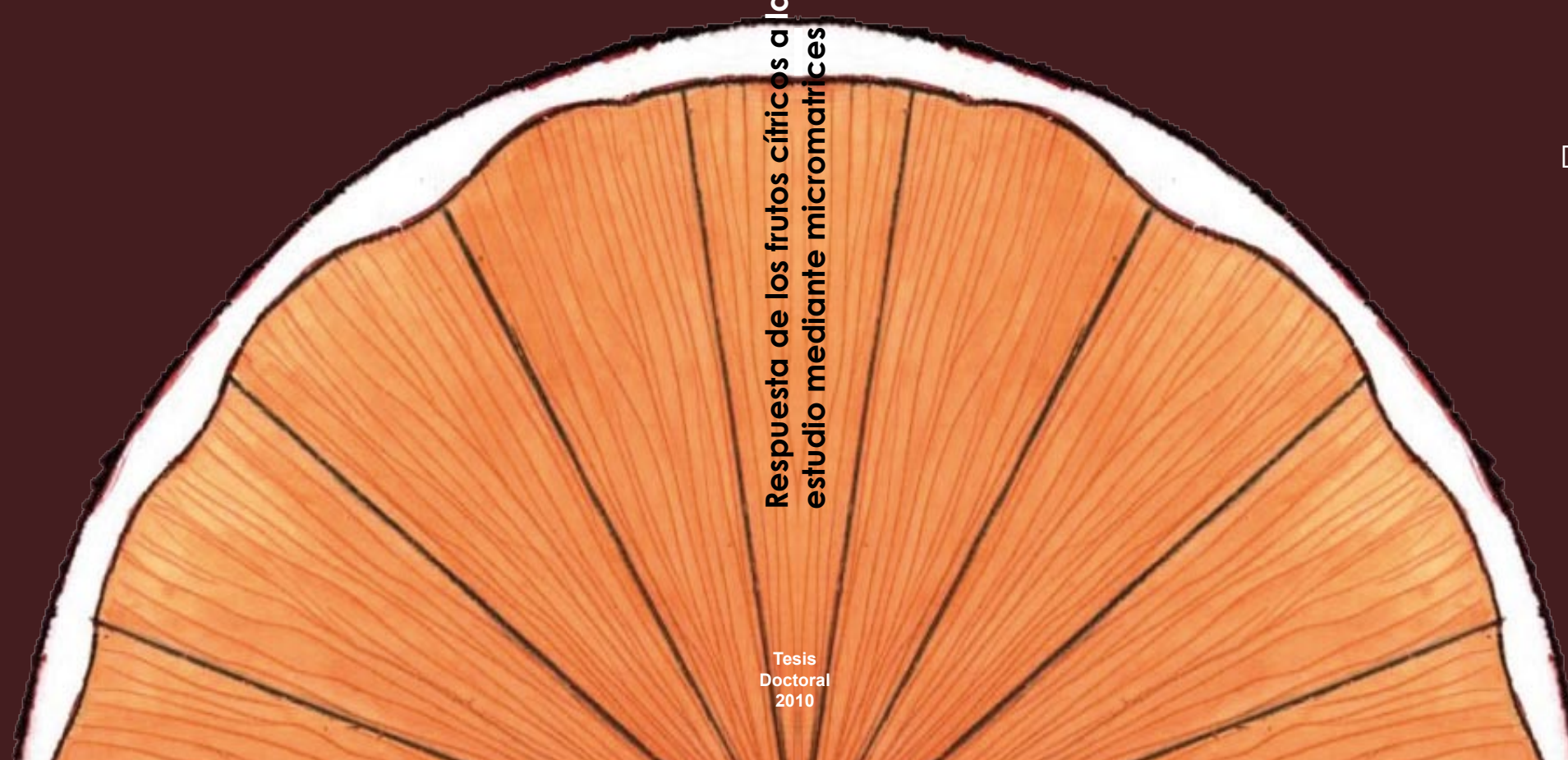
Carolina Royo

Tesis Doctoral
Director Antonio Granell Richart

Respuesta de los frutos cítricos a las bajas temperaturas:
estudio mediante micromatrices

Tesis
Doctoral
2010

Valencia Septiembre 2010





Universidad Politécnica de Valencia
Departamento de Biotecnología



Respuesta de los frutos cítricos a las bajas temperaturas: estudio mediante micromatrices

Carolina Royo

Tesis Doctoral

Director Antonio Granell Richart

Valencia, septiembre 2010

El Dr. ANTONIO GRANELL RICHART, Profesor de investigación del CSIC, perteneciente al Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP, UPV-CSIC) de Valencia,

CERTIFICA que:

CAROLINA ROYO BRUN, Licenciada en Ciencias Biológicas, ha realizado bajo su dirección en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas el trabajo que lleva por título “Respuesta de los frutos cítricos a las bajas temperaturas: estudio mediante micromatrices”, y autoriza su presentación para optar al grado de Doctor por la Universidad Politécnica de Valencia.

Y para que así conste, expide y firma el presente certificado en Valencia, en julio de 2010.

Fdo. Dr. Antonio Granell Richard

En esta Tesis Doctoral se ha abordado el estudio de la respuesta al frío en el flavedo de frutos cítricos. Los frutos cítricos deben someterse a bajas temperaturas durante los tratamientos cuarentenarios requeridos para evitar la propagación de plagas con la exportación. Desafortunadamente, los frutos de variedades sensibles desarrollan síntomas de daño por frío durante este tratamiento, fundamentalmente en el flavedo (parte externa coloreada de la piel).

En este trabajo se utilizaron frutos de Clementina de Nules (CN), variedad tolerante, y de Clementina Fortune (F), sensible, para analizar a nivel transcriptómico las respuestas de adaptación y de desarrollo de daños durante la exposición al frío. Para ello (1) se generaron dos genotecas de cDNA (una de longitud completa) representativas de flavedo de frutos CN sometidos a estrés por frío; (2) los cDNAs novedosos obtenidos se incluyeron junto con otros para generar la micromatriz del Proyecto de Genómica de Cítricos (CFGP1) para el análisis transcriptómico; y (3) utilizando esa micromatriz, se analizaron los cambios que ocurren en el transcriptoma de los flavedos de CN y F a lo largo de una serie temporal de almacenamiento a 2°C.

Las genotecas de frío mostraron un considerable porcentaje de novedad, entre el que se identificaron genes potencialmente específicos de la respuesta a las bajas temperaturas. La micromatriz CFGP1 contiene cDNAs de 12672 ESTs, correspondientes a 6875 unigenes, de los cuales 10.3% ESTs proceden de las genotecas de frío.

El análisis transcriptómico puso de manifiesto que la tendencia general de la respuesta frente a la exposición al frío fue similar en CN y en F durante las cuatro primeras semanas de exposición. En ambas variedades se produjo una represión de procesos biosintéticos, principalmente de proteínas y también de lípidos, y se activó su catabolismo. Sin embargo, también se indujo la expresión de otro grupo de genes relacionados con la síntesis de proteínas, lo que sugiere un reajuste en las funciones celulares a nivel de la traducción. Pese a la similitud, en CN se observaron cambios más intensos durante la primera semana que luego cesaron, mientras que en F los cambios fueron más progresivos.

La comparación transcripcional sí reveló diferencias notables entre los flavedos de CN y F previamente a su exposición al frío. Algunas de estas diferencias podrían ser causantes, al menos en parte, de la tolerancia de CN, al igual que el citado retraso de la respuesta al frío en F. Por último, también se detectó un programa de expresión tardío exclusivo de F, que podría relacionarse con el desarrollo de daños.

En aquesta Tesi Doctoral s'ha abordat l'estudi de la resposta al fred en el flavedo de fruits cítrics. Els fruits cítrics han de sotmetre's a baixes temperatures durant els tractaments quarentenaris requerits per a evitar la propagació de plagues amb l'exportació. Desafortunadament, els fruits de varietats sensibles desenvolupen símptomes de dany per fred durant aquest tractament, fonamentalment en el flavedo (part externa de color taronja del fruit).

En aquest treball es varen utilitzar fruits de Clementina de Nules (CN), varietat tolerant, i de Clementina Fortune (F), sensible, per a analitzar a nivell transcriptòmic les respostes d'adaptació i de desenvolupament de danys durant l'exposició al fred. Amb aquest objectiu: (1) es van generar i caracteritzar dues genoteques de cDNA (una de longitud completa) representatives de flavedo de fruits CN sotmesos a estrès per fred; (2) els cDNAs nous obtinguts es van incloure junt amb altres procedents d'altres genoteques en generar la micromatriu del Projecte de Genòmica de Cítrics (CFGP1) per a l'anàlisi d'expressió; i (3) utilitzant eixa micromatriu, es van analitzar els canvis que ocorren en el transcriptoma del flavedo de CN i F al llarg d'una sèrie temporal d'emmagatzemament a 2°C.

Las genoteques de fred van mostrar un considerable percentatge de novetat, que va permetre identificar gens potencialment específics de la resposta a les baixes temperatures. La micromatriu CFGP1 conté cDNAs de 12672 ESTs, corresponents a 6875 unigens. Un 10.3% dels cDNAs impresos procedeixen de les genoteques de fred.

L'anàlisi transcriptòmic va posar de manifest que la tendència general de la resposta a l'exposició al fred va ser semblant en CN i en F durant les quatre primeres setmanes d'exposició. En ambdós varietats es va produir una repressió de processos biosintètics, principalment de proteïnes i també de lípids, i es va activar el seu catabolisme. No obstant això, també es va induir l'expressió d'un altre grup de gens relacionats amb la síntesi de proteïnes, la qual cosa suggereix un reajustament en les funcions cel·lulars a nivell de la traducció. A pesar de la similitud, en CN es van observar canvis més intensos durant la primera setmana que després van finalitzar, mentre que en F els canvis van ser més progressius. La comparació transcripcional sí va revelar diferències notables entre els flavedos de CN i F prèviament a la seua exposició al fred. Algunes d'estes diferències podrien ser causants, almenys en part, de la tolerància de CN, igual que l'avanç citat retard de la resposta al fred en F. Finalment, també es va detectar un programa d'expressió tardà exclusiu de F, que podria relacionar-se amb el desenvolupament de danys.

The response to cold storage of the flavedo of citrus fruits was approached using a transcriptomics approach. Citrus fruits are normally exposed to low temperatures to satisfy quarantine requirements. These treatments are needed to restrict pest from spreading to other countries where citrus fruits are exported. Unfortunately, fruits of sensitive varieties develop chilling injury under low temperature conditions, mainly in the flavedo (colored external surface).

For this work, we took advantage of Clementina de Nules (CN) mandarins, which are cold-tolerant, and Fortune (F) mandarins, which are cold-sensitive. In this experimental system, we analyzed, at the transcriptomic level, cold-adaptation responses and chilling injury-development responses to low temperature conditions. To do this, (1) two cDNA libraries (one of them full length) were generated from flavedo of CN mandarins exposed to cold; (2) novel cDNAs obtained from these libraries were included for the design of the 'Proyecto de Genómica de Cítricos' expression microarray (CFGP1); and finally, (3) transcriptomic changes in CN and F flavedo were investigated along a time course of storage at 2°C by means of the CFGP1 microarray.

The cold response libraries showed a considerable percentage of novelty, among which putative cold response specific genes were identified. The CFGP1 microarray is composed of 12672 cDNA probe sets, which represent 6875 unique genes. In total, a 10.3% of these cDNAs comes from the cold response libraries.

Transcriptomic analyses revealed a similar trend in the response during the first four weeks of cold storage in CN and F. A significant repression of biosynthetic processes took place in both varieties, mainly for protein biosynthesis, and lipids biosynthesis as well. The catabolism of this type of macromolecules was also activated. However, there was also an enrichment of genes involved in protein biosynthesis among the up-regulated ones, which may reflect a re-organization of the cellular functions at the translational level. Despite the similarities, there were some differences between the two varieties, since the changes in CN were more intense during the first week of cold exposure, while they took place steadier in F.

In contrast to the similar responses during cold exposure, major differences were identified between the transcript profiles of CN and F flavedo before their exposure to cold. Some of these differences may be responsible for the cold tolerance in CN, together with its faster adaptive response during cold storage. Finally, a late expression program specific for F was also identified, including processes probably related with the chilling injury development in the flavedo of this sensitive variety.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Toni, director de esta tesis, por darme la oportunidad de comenzar un sueño y por llegar hasta el final.

Gracias al proyecto de Genómica Funcional de Cítricos de la Generalitat Valenciana por la financiación de este trabajo, cuatro años de beca y uno con contrato. Y a los patrocinadores: Carrefour, Miró, la paraeta, Yoigo y la piscina de la UPV.

Tantos años en el instituto, y mi don de gentes, facilitaron que conociera numerosas personas, algunas de paso, otras no tanto, y muchas amistades que van más allá de la UPV. GRACIAS A TODOS por haberme ayudado con un aparato, una foto, una conversación de pasillo o una simple sonrisa. Muchas gracias a los responsables de los servicios del IBMCP, por su buen humor y eficacia. A Assumpta, con quien compartí biblioteca y numerosos almuerzos. A Eugenio y Ana, por secuenciar tan bien y tan rápido. A las chicas del autoclave, por hacernos la vida más fácil. MD. Ana Mira. Alexis. Ramón. Santiago Roures. A los guardias de seguridad por su sonrisa de bienvenida.

Érase una vez, un laboratorio de chicas donde aterricé desde el zoo. Empecé siguiendo los pasos de Clara, con quien compartí muchísimas cosas (papers, poyata, compras telefónicas, incluso cama en Évora!), aunque somos polos opuestos tenemos algo en común: Radios. También estaban las detractoras de R3: MariBego gracias por muchas vueltas a casa y paseos cromosómicos, y Cresti con su medusa y sus amebas. Al club se unió Yollugo: tú me diste el mejor consejo y no te hice caso, qué inocente fui...

Al otro lado del pasillo conocí a MAP, un gran apoyo en los comienzos, y a M^aAngeles, imprescindible, excepcional y admirable. Ellos estaban en el lab12, con Juan Carbonell el bass, Cristina Urbez la supermami, Carlitos el moderno, David correcaminos.

Arriba, compartiendo lab con las chicas de Carmen Hernández, se acababan de mudar MAB, un cerebritito, Pako y Eugenio que seguía sintiéndose de abajo y lo tuvimos que nombrar "chica del 13", ambos fueron como Sambrook & Maniatis. También estaba Leo y su "historia interminable". Y mi amiga Marta compí de gimnasio, confesiones y mucho más.

Poco a poco empecé a conocer al resto de laboratorios de la planta: las Pías, l@s de Paco Madueño, Chamarro, Ana Ahuir y JL. Todos compartimos muchos momentos en la salita de la segunda planta, comidas, celebraciones...

Muchas gracias a los miembros que formaban parte del CFGP: Pepe, M^aAngeles Genómicos y Javier sin los cuales no existiría esta tesis. Entre todos comenzamos un arduo trabajo en un proyecto pionero. También estaban las genómicas con las que compartí más que un proyecto de tesis, fueron tantas... Julia; Jorge, con quien completé la serie de hibridaciones mucho mejor que en mi lab; Raquelita, la más loca pero la más lista; y las únicas que siguieron mi camino, Cinta, un ejemplo para mí; y Laura, decidida, con las ideas claras.

Agradecimientos

Con los meses el grupo J-T-M fue ampliándose con la llegada de Laura; mi amigo Martín, el misterioso; mi amiga Eavan, tan cerca y tan lejos, siempre conectadas; "el pollo", qué casualidad ser de Alicante y Carbonell como el jefe, compañero de camino aunque pasó mucho hasta que me uní a su club de fans; Dolo; Doctor Hugo; y numerosos invitados Ernst, Elena, Claudia, Crisosto...

Así fui ampliando mi mundo de la segunda planta a otros laboratorios desde Astrid y Emilio hasta una discreta campeona, mi amiga Mónica. Las fiestas del IBMCP me hicieron conocer gente muy marchosa con quién compartir baileos nocturnos con Edu, Santiago ... Y a los genómicos se unieron el monitor Rafa; Andrés "el burlón"; Nuri-Mauri, la más ocurrente!

El 13 fue colonizado por chicos y podríamos haber hecho un cuento con gruñón, Diego, y mudito, Leandro. Pero llegaron nuevas chicas, Sophie y Asun. Más tarde llegaron Paco T (con sus guapísimas polacas), Lucas, y la gran sorpresa, una chica que creíamos que vendría un mes y se quedó un año ¡Saritá! Estos 3 revolucionaron el lab y mi vida.

Con el traslado al nuevo y desastroso edificio llegaron muchos cambios, nos convertimos en 4labos y compartimos planta con diferentes grupos vecinos. Le di la bienvenida a Silvia, sin saber que se convertiría en una persona imprescindible para mí: sin ti no hubiese acabado este trabajo ¡muchísimas gracias!

También descubrí, a pesar de haber empezado unos meses atrás, a la inocente Aurora; Javi, el bombón; el pequeño Andries; Clara de Potries: gracias por dejarme un hueco en el rincón. Y la familia siguió aumentando con Sonia, Amparo, JPathy, Raquel, Berta, Espe, Verónica, Antonella (unidas por skype)...

Gracias a Barto, porque si no hubiese dejado la vacante de chófer y una habitación libre no habría compartido piso con Pablo, Capa, Diego, Patrisia Patrisia... y ahora forman parte de mi familia.

Gracias a Eva Barreno y a sus chicos por acogerme en su laboratorio con alegría y entusiasmo, por confiar en mí, por enseñarme otro mundo.

Un punto y a parte para los que estuvieron conmigo al otro lado de la ciencia desde el principio, en eso que tanto valoro, mi vida privada. Gracias para Txus, Mamen, PabloPedro y los suyos, Pepe, Conchi ... Y también a las ilícitanas de Madrid 🎵 máquina, piedra, planta, animalito 🎵.

Gracias a mis amiguísimas, Esther y Rebeca, por estar siempre ahí, incondicionalmente, por hacerme reír y olvidar los malos tragos, por no pedir explicaciones.

A Amalia, por adoptarme, por las sensaciones pop.

A mi familia, papá, mamá, mi hermana favorita Anabelle, Alex, Olí, Víctor, pépé, mémé, cousins, los tíos... por no preguntar demasiado, por confiar sin entender. Por el Mercamamá semanal, la envidia de mis compis!

Y millones de gracias a Pablo, por aguantar las consecuencias que implican escribir este texto, por las discusiones científicas, por los buenos consejos y sugerencias que forman parte de esta tesis y de mi vida diaria, por la tranquilidad que me transmite, por las risas, las fiestas, los viajes, las manías... por todo lo compartido.

ÍNDICE

ÍNDICE DE CONTENIDOS	
ÍNDICE DE TABLAS SUPLEMENTARIAS	1
ÍNDICE DE TABLAS	3
ÍNDICE DE FIGURAS	5
ABREVIATURAS	7
INTRODUCCIÓN	11
1. Introducción al problema experimental	13
1.1 Necesidad de almacenamiento en frío de los frutos cítricos. El periodo de cuarentena	13
1.2 Sistema experimental empleado para estudiar la sensibilidad y tolerancia a bajas temperaturas en frutos cítricos	14
2. Daños por frío y sensibilidad a las bajas temperaturas en las plantas	15
2.1 Daños por frío durante el desarrollo de las plantas	17
2.2 Síntomas de DF durante la postcosecha de productos vegetales (frutos y hortalizas)	18
2.3 Desarrollo fisiológico del DF	19
3. Cascada de señalización del frío para la respuesta adaptativa en plantas	21
3.1 Mecanismos moleculares de tolerancia al frío	24
4. Efecto de las bajas temperaturas en frutos cítricos	25
4.1 Sensibilidad de los frutos cítricos al frío en la postcosecha	25
4.2 DF característicos de frutos cítricos	26
Daños por frío en frutos Fortune	26
4.3 Principales fitohormonas implicadas en el control hormonal de la respuesta al frío en frutos cítricos	27

4.4 Conservación postcosecha de frutos cítricos	29
4.4.1 Consideraciones generales	29
4.4.2 Estrategias para reducir el daño por frío en los frutos cítricos durante su almacenamiento postcosecha	30
5. Aproximación al estudio de los efectos del frío en los frutos cítricos	32
5.1 Antecedentes	32
5.2 Aproximación genómico-funcional al estudio de la biología de los cítricos	35
OBJETIVOS	37
MATERIALES Y MÉTODOS	41
1. Material biológico	43
1.1 Material vegetal	43
1.2 Cepas bacterianas, vectores y medios de cultivo	43
a) Cepas bacterianas de <i>Escherichia coli</i>	43
b) Vectores plasmídicos	44
c) Medios de cultivo	44
2. Tratamiento de almacenamiento en frío y preparación de muestras: Clemenules y Fortune	44
3. Aislamiento y manipulación de ácidos nucleicos	45
3.1 Extracción y purificación de RNA total de flavedo	45
3.2 Extracción y purificación de RNA mensajero	46
3.3 Aislamiento y purificación de DNA plasmídico de <i>Escherichia coli</i>	46
En placas de 96 pocillos	46
En tubo de 1,5 mL	47
4. Análisis de ácidos nucleicos	47
4.1 Análisis de RNA mediante <i>Northern blot</i>	47
4.2 Síntesis de sondas radiactivas	48
4.3 Electroforesis de ácidos nucleicos	48
5. Métodos de transformación de cepas bacterianas	49
5.1 Transformación por choque térmico	49

5.2 Transformación por electroporación	49
6. Secuenciación de DNA, búsqueda de homologías y alineamientos de ácidos nucleicos	49
7. Construcción y caracterización de una genoteca de fragmentos de cDNA de flavedo de frutos de <i>Clemnules</i> almacenados a 2°C	50
7.1 Obtención de cDNA	50
7.2 Ligación de adaptadores	51
7.3 Ligación al vector y empaquetamiento	51
7.4 Comprobación de tamaños de los insertos mediante por amplificación por PCR	52
7.5 Escisión masiva <i>in vivo</i>	52
8. Análisis genómico	54
8.1 Primera generación de micromatrices del CFGP	54
8.2 Diseño experimental	54
8.3 Marcaje de muestras de cDNA con fluoróforos	56
8.4 Hibridación de las micromatrices	57
8.5 Análisis de los resultados de las micromatrices	58
Obtención de imágenes	58
Filtrados de calidad de las hibridaciones	58
Normalización de los datos de expresión	58
Análisis de Componentes Principales	60
Identificación de genes expresados diferencialmente	60
Análisis funcional de los datos	61

CAPÍTULO 1: ELABORACIÓN DE UNA GENOTECA QUE INCLUYA CLONES DE RESPUESTA/ADAPTACIÓN MOLECULAR DE MANDARINAS A BAJAS TEMPERATURAS	63
Introducción	65
Resultados y Discusión:	71
1. Obtención de la genoteca	71
2. Resumen de la genoteca obtenida	73
3. Anotación de los clones obtenidos en la genoteca	79

4. Distribución de los ESTs de la genoteca FlavFr1 en unigenes	83
--	----

**CAPÍTULO 2: ANÁLISIS DEL TRANSCRIPTOMA DEL FLAVEDO EN
RESPUESTA AL FRÍO DE MANDARINAS SENSIBLES (FORTUNE) Y
TOLERANTES (CLEMENULES)**

Introducción	89
Resultados y discusión:	95
1. Diseño experimental	95
2. Análisis de calidad de los datos de las micromatrices	96
3. Análisis transcriptómico de la serie de almacenamiento en frío en la variedad sensible Fortune	97
3.1 Identificación de genes con cambios de expresión significativos en el flavedo de mandarinas Fortune durante su almacenamiento en frío	97
3.1.1 Aproximación general a los cambios transcriptómicos del flavedo durante el almacenamiento de mandarinas Fortune en frío	97
3.1.2 Análisis funcional de los cambios transcriptómicos del flavedo durante el almacenamiento de mandarinas Fortune en frío	100
4. Identificación de genes con cambios de expresión significativos en el flavedo de mandarinas Clemenules durante su almacenamiento en frío	106
4.1 Identificación de genes con expresión significativamente diferencial en la serie temporal de Clemenules	106
4.1.1 Aproximación general a los cambios transcriptómicos del flavedo durante el almacenamiento en frío de mandarinas Clemenules	106
4.1.2 Análisis funcional de los cambios transcriptómicos del flavedo durante el almacenamiento en frío de mandarinas Clemenules	108
4.2 Identificación de genes de respuesta rápida al frío en Clemenules	114
4.2.1 Análisis de la respuesta transcripcional del flavedo de mandarinas Clemenules durante las primeras horas de almacenamiento en frío	114
4.2.2 Análisis de la respuesta transcripcional del flavedo de mandarinas Clemenules durante las primeras 24 horas de almacenamiento en frío	118
5. Análisis comparativo de los cambios de expresión en el flavedo durante el almacenamiento en frío entre mandarinas Clemenules y Fortune	122

5.1 Comparación de los genes diferenciales identificados en Clemenules (CNmclase) con los identificados en Fortune (Fmclase)	123
5.2 Identificación de genes con respuesta diferencial entre frutos de ambas variedades en series equivalentes y a lo largo de todo su almacenamiento en frío	129
5.2.1 Diferencias de expresión intravarietal potencialmente relacionadas con la tolerancia de Clemenules:	133
SOM 5 (perfil de represión en ambas variedades con niveles de expresión superiores en CN respecto F)	133
SOM 6 (perfil de inducción en ambas variedades con niveles de expresión superiores en CN respecto F)	139
Componentes de la membrana (CN0>2 F0)	139
Biosíntesis de lípidos	139
Proteínas integrales	139
Degradación de proteínas (CN0>2 F0)	139
Respuesta a estrés abiótico (CN0>2 F0)	140
Estrés por metales pesados	140
Estrés oxidativo	140
Estrés hídrico	141
Respuesta a estrés biótico/abiótico (CN0>2 F0)	142
Metabolismo de carbohidratos (CN0>2 F0)	143
Señalización	144
Metabolismo y componentes de la membrana plasmática	144
Degradación de lípidos	144
Proteínas integrales	145
Estrés abiótico	146
Estrés térmico	146
Estrés osmótico	147
Estrés biótico: Patógenos	148
Metabolismo de RNA/DNA	149
Degradación de proteínas	150
Respuesta hormonal	151
Metabolismo de carbohidratos	153
Acumulación de almidón y azúcares	153
Glucolisis	154
Fotosíntesis	155
5.2.2 Expresión de genes potencialmente relacionados con el desarrollo de daños por frío en Fortune:	155

Índice

SOM 3 (perfil de inducción temprana y mayores niveles de expresión en F respecto CN)	155
SOM 4 (perfil de inducción tardía y mayores niveles de expresión en F respecto CN)	161
SOM 8 (perfil de inducción en ambas variedades con niveles de expresión superiores en F respecto CN)	169
6. Regulación hormonal de las respuestas al frío en Clemenules y Fortune	173
6.1 Ácido Abscísico	173
6.2 Etileno	177
7. Expresión de genes de señalización y respuesta al frío	178
7.1 Percepción del frío	178
Fluidez de la membrana plasmática	179
Calcio	180
Fosfolipasas	181
7.2 Transducción de la señal del frío	182
Fosfatasas	182
Proteínas quinasas	184
Genes de respuesta al estrés oxidativo	185
Genes de respuesta al estrés por bajas temperaturas (comparación con otros trabajos)	187
DISCUSIÓN FINAL y perspectivas	189
CONCLUSIONES	197
BIBLIOGRAFÍA	201

ÍNDICE DE TABLAS SUPLEMENTARIAS

(adjuntadas en un CD)

TS 1_FlavFr1 específicos

TS 2_Unigenes de genotecas de CFGP de flavedo

FlavFr1+postHarvC1

FlavFrSub1

5 en ambas PostHarvN FlaFrSub1

TS 3_Unigenes FlavFr1

TS 4a_Fmclase

Fmclase

SOM1

SOM2

SOM3

SOM4

SOM5

SOM6

SOM7

SOM8

TS 4b_Fmclase MapMan

1. Fotosíntesis

2. Pared celular

3. Lípidos

4. Hormonas

5. GST

6. Regulación transcripcional

7. Proteínas

8. Degradación de proteínas

9. Transporte

10. Estrés abiótico

11. Reparación DNA

12. Desarrollo

TS 5_Micromatriz

Clones micromatriz

Unigenes micromatriz

uniAt micromatriz

TS 6a_CNmclase

CNmclase

SOM1

SOM5

SOM2

SOM6

SOM3

SOM7

SOM4

SOM8

TS 6b_CNmclase MapMan

1. Síntesis proteínas ribosomales

6. Estrés abiótico

2. Pared celular

7. Lípidos

3. Metabolismo secundario

8. Fotosíntesis

4. Regulación transcripcional

9. Fenilpropanoides

5. Desarrollo

TS 7_Genes específicos de CNmclase

TS 8_Genes específicos de CNmclase

TS 9_CNftime course

CNftime course

CNftime course F0 normalizado y SOM

SOM1

SOM5 Tolerancia

SOM2

SOM6 Tolerancia

SOM3 DF

SOM7

SOM4 DF

SOM8 DF

TS 10_Genes comunes ente CNmclase y Fmclase

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Datos orientativos para guardar frutos cítricos en cámara, con CO ₂ <0.5%, y 90-95% de humedad relativa	30
TABLA 2. Resumen de las colecciones de ESTs de cítricos depositadas en HarvEST con fecha del 17 de noviembre de 2004	68
TABLA 3. Características de la genoteca FlavFr1	73
TABLA 4. Unigenes específicos de FlavFr1 y diferenciales entre CN y F (CN-F) en respuesta al frío	76
TABLA 5. Genotecas construidas dentro del proyecto CFGP a partir de flavedo de diferentes variedades de frutos cítricos	77
TABLA 6. Unigenes compartidos por las genotecas FlaFr1, PostHarvC1, PostHarveN y FlavFrSub1, todas ellas construidas a partir de flavedo de mandarinas CN o F, almacenadas en frío	79
TABLA 7. Clasificación de unigenes en las categorías de proceso biológico de las genotecas de flavedo	82
TABLA 8. Anotación de los ESTs más representados en la genoteca FlavFr1	85
TABLA 9. Categorías funcionales enriquecidas entre los genes (uniAt) reprimidos en la serie de F (genes diferenciales según el análisis Fmclase con perfil de represión según el agrupamiento SOM) respecto a los presentes en la micromatriz	101
TABLA 10. Categorías funcionales enriquecidas entre los genes (uniAt) inducidos respecto a los reprimidos en la serie de F (genes diferenciales según el análisis Fmclase con perfil de inducción o represión según el agrupamiento SOM)	102
TABLA 11. Categorías funcionales (MapMan) con comportamiento diferencial (según el test de Wilcoxon Rank-Sum) de los uniAt con expresión diferencial en la serie de almacenamiento en frío en F	103
TABLA 12. Genes uniAt diferenciales en F clasificados en la categoría <i>etileno</i>	104
TABLA 13. Categorías funcionales enriquecidas entre los genes (uniAt) reprimidos en la serie de CN (genes diferenciales según el análisis CNmclase con perfil de represión según el agrupamiento SOM) respecto a los presentes en la micromatriz	109
TABLA 14. Categorías funcionales (MapMan) con comportamiento diferencial (según el test de Wilcoxon Rank-Sum) de los uniAt con expresión diferencial en la serie de almacenamiento en frío en CN	111
TABLA 15. Genes de CNmclase clasificados en la categoría <i>metabolismo de lípidos</i> en MapMan	113

TABLA 16. Genes diferenciales según el análisis SAM 2clases de CN0 y CNtc (2+3.5+4.5 h a 2°C)	115
TABLA 17. Patrones de expresión de los genes estadísticamente diferenciales entre CN0 y CNtc (2+3.5+4.5 h a 2°C), según un análisis SAM 2clases con un FDR=20%, en las series completas de CN (excepto CNtc y CN24h) y de F	116
TABLA 18. Genes que mostraron cambios de expresión al menos dos veces entre CN0 y CNtc, sin pasar ningún test estadístico	117
TABLA 19. Valores de expresión de los genes con expresión diferencial en CN según el análisis SAM mclase CN 0-tc-24 h a 2°C con un FDR=5% normalizados a CN0	119
TABLA 20. Valores de expresión de los genes con expresión diferencial a tiempos cortos en CN según el estadístico SAM mclase CN 0-tc-24 h con un FDR=5% normalizados a CN0, en las series de CN y de F en los casos en los que resultaron también diferenciales en las mismas (CNmclase y Fmclase con un FDR=5%, respectivamente)	121
TABLA 21. Resumen de los resultados del análisis individual de las series temporales de CN y F, obtenidos a partir de los uniAt estadísticamente diferenciales con SAM mclase aplicando FatiGO	122
TABLA 22. Categorías de GO de <i>Procesos Biológicos</i> representadas en los uniAt específicos de cada variedad (elaborado mediante la aplicación FatiGO) en los niveles 3 y 9	126
TABLA 23. Valores de expresión de genes de respuesta a estrés con perfil de represión en ambas variedades con mayor expresión en CN, normalizados respecto los niveles en F0	137
TABLA 24. Valores de expresión de genes de respuesta hormonal con perfil de inducción en ambas variedades con mayor expresión en CN, normalizados respecto los niveles en F0	153
TABLA 25. Valores de expresión de factores de transcripción con perfil de inducción tardía y mayores niveles de expresión en F, normalizados respecto los niveles en F0	167

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Calendario de comercialización de las mandarinas CN y F de la empresa Anecoop. Este...	14
Figura 2. Relación de efectos de la temperatura poscosecha sobre frutos y hortalizas no sensibles...	16
Figura 3. Esquema de eventos en el desarrollo y manifestación de DF en plantas. Adaptado de...	20
Figura 4. Esquema de la ruta general de la señalización y respuesta a estrés abiótico. Respuesta...	22
Figura 5. Evolución del DF en el fruto de mandarinas F durante el almacenamiento a 2°C, según...	27
Figura 6. Esquema de la construcción de la genoteca.	51
Figura 7. Mapa del vector plasmídico pBluescript SK(-). En la secuencia entre los nucleótidos 601 y...	53
Figura 8. Diseño experimental.	55
Figura 9. Esquema seguido por el CFGP y en la presente tesis Doctoral para la construcción y...	71
Figura 10. Electroforesis de los productos de PCR de extracciones de DNA plasmídico de 48 clones	72
Figura 11. Diagramas de Venn de los unigenes específicos de la genoteca FlavFr1, en función de...	76
Figura 12. Diagrama de Venn. Distribución de la relación de los unigenes obtenidos en genotecas...	78
Figura 13. Distribución de los unigenes de la genoteca FlavFr1 en función de las proporciones...	80
Figura 14. Clasificación de las secuencias de la genoteca FlavFr1 y la base de datos de cítricos...	83
Figura 15. Distribución del número de ESTs que componen cada unigen de FlavFr1.	84
Figura 16. Diseño experimental utilizado en el estudio de la respuesta del transcriptoma del flavedo...	95
Figura 17. PCA correspondiente a los datos de expresión de las mandarinas F en los diferentes...	98
Figura 18. Análisis de agrupamiento no jerárquico de los perfiles de expresión mediante mapas...	99
Figura 19. Perfil de expresión de varios uniAt homólogos a <i>GST</i> . Los valores de \log_2 ratio...	105
Figura 20. Análisis PCA correspondiente a los datos de expresión de las mandarinas CN en los...	107
Figura 21. Análisis de agrupamiento no jerárquico de los perfiles de expresión mediante mapas...	108
Figura 22. Categorías funcionales enriquecidas en los genes (uniAt) inducidos respecto a los...	110
Figura 23. Representación de los datos de expresión de los uniAt significativamente diferenciales...	112
Figura 24. Valores de expresión de los genes comunes de F y CN de la categoría <i>etileno</i> según...	114
Figura 25. Diagrama de Venn mostrando la relación de genes (unigenes y clones representados...	123
Figura 26. Esquema representativo de las muestras de las series temporales de CN y F....	129
Figura 27. Análisis mediante PCA de la variabilidad de muestras de las series temporales de CN...	130
Figura 28. Análisis de agrupamiento no jerárquico según mapas auto-organizados (SOMs) de los...	132
Figura 29. Valores de expresión del gen <i>SBT</i> normalizados respecto los niveles en F0. En el eje...	134
Figura 30. Valores de expresión del gen <i>germin</i> normalizados respecto los niveles en F0. En el...	135
Figura 31. Valores de expresión de dos factores de elongación, los genes <i>EF-1A</i> y <i>EF-4A</i> ...	136
Figura 32. Valores de expresión de los genes del metabolismo secundario <i>subunidad del</i> ...	138
Figura 33. Valores de expresión de los genes del estrés oxidativo <i>peroxidasa</i> y <i>G6PDH</i> ...	141

Índice de Figuras

Figura 34. Valores de expresión de varios genes <i>miraculina</i> , normalizados respecto los niveles en...	142
Figura 35. Valores de expresión de tres genes <i>quitinasa</i> , normalizados respecto los niveles en F0...	143
Figura 36. Valores de expresión de los genes de respuesta a estrés térmico en SOM6...	147
Figura 37. Valores de expresión del gen <i>RING-H2/XERICO</i> , normalizados respecto los niveles...	147
Figura 38. Valores de expresión del gen <i>S-adenosil-L-metionina: ácido salicílico carboxil...</i>	149
Figura 39. Valores de expresión del gen <i>Myb92</i> , normalizado respecto los niveles en F0. En el...	150
Figura 40. Valores de expresión de los genes del metabolismo de carbohidratos <i>sacarosa</i> ...	154
Figura 41. Valores de expresión de los unigenes <i>COR15</i> , normalizados respecto los niveles en...	157
Figura 42. Media de los valores de expresión de los genes de defensa <i>metalotioneina</i> y...	158
Figura 43. Valores de expresión de factores de transcripción, normalizados respecto los niveles en...	160
Figura 44. Valores de expresión del gen <i>APRR5</i> , normalizado respecto los niveles en F0. En el...	161
Figura 45. Valores de expresión de genes de respuesta a estrés en el SOM4, normalizado respecto...	162
Figura 46. Valores de expresión de los genes que codifican transportadores de membrana...	163
Figura 47. Valores de expresión de genes que codificaban enzimas glucolíticas, normalizados...	164
Figura 48. Valores de expresión genes de defensa, normalizados respecto los niveles en F0. En...	165
Figura 49. Valores de expresión de los genes del metabolismo secundario del SOM4...	166
Figura 50. Las líneas muestran los valores de expresión de los unigenes <i>SAM sintasa 2</i> , y las...	168
Figura 51. Valores de expresión del gen <i>arginina descarboxilasa</i> , normalizados respecto los...	169
Figura 52. Valores de expresión de genes <i>O-metiltransferasa</i> , enzimas clave en la biosíntesis de...	170
Figura 53. Valores de expresión de los unigenes <i>tirosina/DOPA</i> , normalizados respecto los...	171
Figura 54. Valores de expresión de los unigenes <i>LEA5</i> , normalizados respecto los niveles en F0...	172
Figura 55. Valores de expresión del unigen <i>F-box (aC05001B09SK_c)</i> , normalizados respecto...	173
Figura 56. Ruta de biosíntesis del ABA. En un recuadro gris se han destacado los genes...	175
Figura 57. Valores de expresión de los genes relacionados con la membrana plasmática...	180
Figura 58. Valores de expresión del factor de los genes relacionados con calcio, normalizados...	181
Figura 59. Fosfolipasas, normalizados respecto los niveles en F0. En el eje de las X se muestra...	182
Figura 60. Valores de expresión de los genes <i>fosfatasa PP1, PP2A-TAP46, PP2C</i> , normalizados...	183
Figura 61. Valores de expresión de los genes <i>quinasa CDG1, AtPK9</i> y <i>SNT7</i> , normalizados...	184
Figura 62. Valores de expresión de los genes <i>GST</i> , normalizados respecto los niveles en F0...	185
Figura 63. Valores de expresión de los genes <i>peroxidasa</i> , normalizados respecto los niveles en...	186

ABA	ácido abscísico
ACC	ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico
ACS	ACC sintasa
ACO	ACC oxidasa
ACX	acil-CoA oxidasa
AGI	<i>Arabidopsis Gene Identifier</i> , identificador de genes de <i>Arabidopsis</i>
APRR	<i>Arabidopsis</i> pseudo-response regulador
APX	ascorbato peroxidasa
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	adenosina trifosfato
BSA	albúmina de suero bovino
CBF	<i>C-repeat/dehydration responsive element Binding Factor</i> , factor de unión a elementos de respuesta a la deshidratación/repeticiones de C
cDNA	<i>complementary DNA</i> , ADN complementario
CAT	catalasa
CFGP	proyecto de genómica funcional de cítricos
CN	Clemenules
CNmclase	SAM multiclase de la serie temporal CN
CNtime course	SAM <i>time course</i> de las series temporales CN y F en conjunto
CO ₂	anhídrido carbónico
COMT	ácido cafeico O-metiltransferasa
COR	<i>cold-regulated</i> , regulado por frío
Cy	cianina
d	días
DF	daños por frío
DNA	<i>desoxiribonucleic acid</i> , ADN, ácido desoxirribonucleico
DREB	<i>dehydration responsive element binding factor</i> , factor de unión a elementos de respuesta a la deshidratación
DTT	ditriotreitol
EDTA	ácido etilen-diamino-tetracético
EST	<i>expressed sequence tag</i> , etiqueta de secuencia expresada
ET	etileno
F	Fortune
FAD	<i>fatty acid desaturase</i> , ácido graso desaturasa

Abreviaturas

FDR	<i>false discovery rate</i> , tasa de falsos positivos
Fig.	figura
FlavFr1	genoteca obtenida a partir de flavedo almacenado en frío
Fmclase	SAM multiclase de la serie temporal F
GA	giberelinas
GGPP	geranilgeranil bifosfato
GO	<i>gene ontology</i> , ontología génica
GST	glutación S-transferasa
h	horas
HSP	<i>heat shock protein</i>
ICE	<i>inducer of CBF expression</i> , inducido por la expresión de CBF
IPTG	isopropilo-D-tiogalactósido
kb	kilobases
lacZ	β -galactosidasa
LB	medio Luria-Bertani
LEA	<i>late embryogenesis abundant</i>
MCP	metilciclopropeno
min	minuto/minutos
MIPS	<i>Munich Information center for Protein Sequences</i> (ftp://ftpmips.gsf.de/cress/arabiprot)
Misc	miscelánea
mRNA	RNA mensajero
MTS	metilsalicilato
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> (http://www.ncbi.nlm.nih.gov)
PA	poliamina
PAL	fenilalanina-amonio liasa
pb	pares de bases
PCA	<i>principal component analysis</i> , análisis de componentes principales
PC1	primer componente del PCA
PC2	segundo componente del PCA
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , reacción en cadena de la polimerasa
pfu	<i>plaque forming units</i> , unidades formadoras de colonias
PL	fosfolipasa
PP	fosfatasa
PR	<i>pathogenesis related</i>
rpm	revoluciones por minuto
SAM	<i>significance analysis microarray</i> , análisis de significancia de micromatrices

Abreviaturas

SAM	S-adenosilmetionina
SAMdc	S-adenosilmetionina descarboxilasa
SAM mclase	SAM multiclase
sd	desviación estándar
SDS	dodecil sulfato sódico
SOD	superóxido dismutasa
SOM	<i>self organizing map</i> , mapa autoorganizativo
SSH	<i>suppression subtractive hybridization</i> , hibridación supresiva sustractiva
SSC	tampón salino de citrato sódico
TAE	Tris-acetato-EDTA
TAIR	<i>The Arabidopsis Information Resource</i> , http://www.arabidopsis.org/
tc	tiempos cortos
Tris	2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol
TPS	terpeno sintasa
uniAt	unificación de clones con el mismo ortólogo de <i>Arabidopsis</i> y código AGI
UTP	uridina trifosfato
UV	ultravioleta
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónico

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN AL PROBLEMA EXPERIMENTAL

1.1 Necesidad de almacenamiento en frío de los frutos cítricos. El periodo de cuarentena

Dos son las razones fundamentales para el almacenamiento de frutos cítricos en frío. La primera es el mantener la calidad de los frutos hasta el momento de su comercialización. Las bajas temperaturas reducen la germinación de esporas y el crecimiento de patógenos, aunque a 0°C todavía puede observarse crecimiento significativo de *Botrytis*, *Alternaria* o *Penicillium italicum* (Martinez-Javega, 1995). El almacenamiento a bajas temperaturas no sólo reduce el crecimiento de hongos, sino que al retrasar la senescencia del fruto, éste mantiene mayor contenido en sustancias antifúngicas (fitoalexinas), con lo que mejora la resistencia fisiológica al ataque microbiano (Martinez-Javega, 1995). Además, las bajas temperaturas retrasan la pérdida de peso y se mantiene el aspecto fresco de los frutos.

La segunda razón por la que se someten los frutos cítricos al frío es su requerimiento para los programas de cuarentena. Las cuarentenas consisten en tratamientos a los que se someten los frutos destinados a otros países, y que tienen por objeto prevenir la entrada, junto con los frutos, de patógenos vivos. Entre las técnicas cuarentenarias se incluyen la fumigación, tratamientos por frío o por calor, las atmósferas modificadas y las radiaciones ionizantes (Saucedo-Veloz, 1997). Debido a la preocupación creciente que despierta en la población el uso de tratamientos químicos, se ha intensificado el interés por la aplicación de bajas temperaturas para conseguir los objetivos de cuarentena. El mantenimiento de los cítricos a temperaturas entre 0°C y 2,2°C durante un período de tiempo de hasta 24 días (d) es un método cuarentenario aprobado para el control de las moscas (USDA-Animal and Plant Health Inspection Service, <http://www.aphis.usda.gov/>). En España para el control de la mosca del Mediterráneo en cítricos se exigen de 16 a 17 d a temperatura de pulpa inferior a 2°C (Martinez-Javega, 1997). Las bajas temperaturas pueden producir la mortalidad de insectos de la familia *Tephritidae* que incluye a los géneros *Anastrepha*, *Ceratitis* y *Dacus* los cuales constituyen plagas (moscas de la fruta) y son objeto de cuarentena (Martinez-Javega *et al.*, 1999). Las larvas de estos insectos emergen de los huevos depositados por las hembras en el interior de los frutos sanos y causan daño físico que afecta al fruto interna y externamente (Martinez-Javega *et al.*, 1999).

Lamentablemente, además de las dificultades intrínsecas que implican los tratamientos por frío aplicados, tanto para la conservación de los frutos y mantenimiento postcosecha como para satisfacer los requerimientos de cuarentena, suponen un riesgo de pérdida de calidad en algunos cultivares sensibles al frío (Martínez-Javega, 1996; Artes y Artes-Hernández, 2003).

1.2 Sistema experimental empleado para estudiar la sensibilidad y tolerancia a bajas temperaturas en frutos cítricos

El fruto de los cítricos es tipo hesperidio. Es un fruto sincárpico procedente de un ovario súpero, constituido generalmente por diez carpelos cerrados. En todo fruto cítrico se puede distinguir: el epicarpo o flavedo, de carácter parenquimatoso, rico en pigmentos carotenoides y aceites esenciales, el mesocarpo o albedo, de consistencia esponjosa y el endocarpo membranoso, revestido en su interior de numerosos tricomas repletos de jugo. Sobre la superficie externa del epicarpo se forma una capa continua de cutina denominada cutícula.

En esta Tesis Doctoral, el estudio de los efectos del frío se ha centrado en el flavedo que es el tejido más externo del fruto de los cítricos. En concreto, se trabajó con el flavedo de mandarinas de las variedades Clemenules (CN) y Fortune (F), seleccionadas por su diferente sensibilidad al frío y su importancia comercial.

Clemenules, CN, (*Citrus clementine* hort. Ex Tanaka): es la variedad de Clementina más popular en España. Se originó por mutación espontánea de clementina Fina (*Citrus clementine* Hort. ex Tanaka) y fue detectada en 1953 en Nules (Castellón de la Plana). Su recolección es precoz y a su vez escalonada en función de la floración (Fig. 1). Sus frutos no experimentan daños en la corteza durante almacenamientos postcosecha a bajas temperaturas.

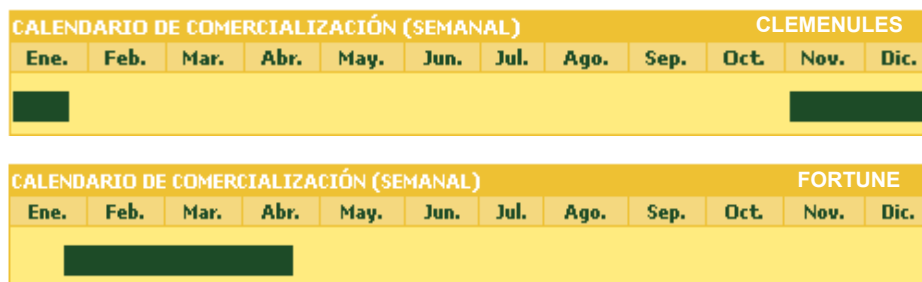


Figura 1. Calendario de comercialización de las mandarinas CN y F de la empresa Anecoop. Este calendario coincide con la cosecha de estos frutos.

Fortune, F, (*Citrus clementine* Hort. ex Tanaka x *Citrus reticulata*, Blanca) resultó de un híbrido de Clementino Fino y Mandarino Dancy obtenido por J.R. Furr en California (1964). La mandarina F es muy apreciada en España, entre otras razones, por su época tardía de maduración (Fig. 1). Desafortunadamente, sus frutos desarrollan daños en la corteza cuando se exponen a bajas temperaturas.

2. DAÑOS POR FRÍO Y SENSIBILIDAD A LAS BAJAS TEMPERATURAS EN LAS PLANTAS

Según Saltveit y Morris (1990), **Daños por Frío** (DF) es el término comúnmente utilizado para especificar los cambios físicos y/o fisiológicos provocados en los vegetales por acción de las bajas temperaturas (por encima de las de congelación), y que se caracterizan por la expresión de síntomas típicos (Levitt, 1980; Raison y Orr, 1990). Raison y Lyons (1986) propusieron el término “sensibilidad al frío” para señalar el umbral de temperatura próximo al cual tiene lugar los DF. Este umbral está dentro del rango de 0-15°C (Raison y Orr, 1990; Saltveit y Morris, 1990). Las plantas que experimentan DF al someterse a bajas temperaturas, superiores a las de congelación, son **plantas sensibles**, mientras que las **plantas tolerantes** al frío son aquellas que aún pudiendo ser sensibles, desarrollan cierta capacidad de retrasar en el tiempo o disminuir la severidad de los síntomas del DF (Graham y Patterson, 1982). Las plantas superiores que crecen en ambiente cálido tropical y/o subtropical, generalmente, son plantas sensibles, que experimentan desórdenes fisiológicos cuando son expuestas a temperaturas inferiores a 15°C (Lyons, 1973; Levitt, 1980; Lynch, 1990; Wang, 1990). También son sensibles al frío plantas anuales como el arroz y el maíz, que experimentan DF irreparables por debajo de 10°C. En cambio, son insensibles al frío las espinacas y patatas que no experimentan DF por encima de 0°C. Por otra parte, son tolerantes al frío especies leñosas de clima templado que experimentan los primeros DF, pero tienen la habilidad de tolerar los daños secundarios (Sharma *et al.*, 2005).

Los **daños por congelación** ocurren por debajo de 0°C, y están relacionados con la formación de hielo inter/intracelular (Saltveit y Morris, 1990; Thomashow, 1999). Las plantas tropicales no sobreviven a la menor congelación; en contraste, las plantas herbáceas de regiones templadas generalmente sobreviven en un rango desde -5°C a -30°C, dependiendo de las especies, mientras que las especies perennes de bosques boreales sobreviven inviernos con temperaturas por debajo de

-30°C. La temperatura precisa de daño por congelación depende de la concentración de solutos de los tejidos. Por ejemplo, la lechuga se congela a partir de -0,2°C, mientras que la uva que tiene un alto contenido en azúcares no se congela hasta los -2°C (Hardenburg *et al.*, 1988; Wang *et al.*, 2003).

La tolerancia al frío se puede inducir en algunas plantas en respuesta a temperaturas bajas, pero superiores a las de congelación, y se denomina **aclimatación al frío** (Levitt, 1980; Guy, 1990). En este sentido, un número cada vez mayor de estudios demuestran la existencia de una “resistencia inducida”, la exposición de un tejido o un organismo a un estrés moderado induce resistencia a otro estrés más severo (Sabehat *et al.*, 1998). La primera función de la aclimatación al frío es estabilizar las membranas, acumular osmoprotectores y la alteración de expresión génica para proporcionar protección en todos los niveles (Thomashow, 1999). Algunos ejemplos de plantas que pueden aclimatarse son *Arabidopsis*, el trigo invernal, la cebada, el centeno y la colza.

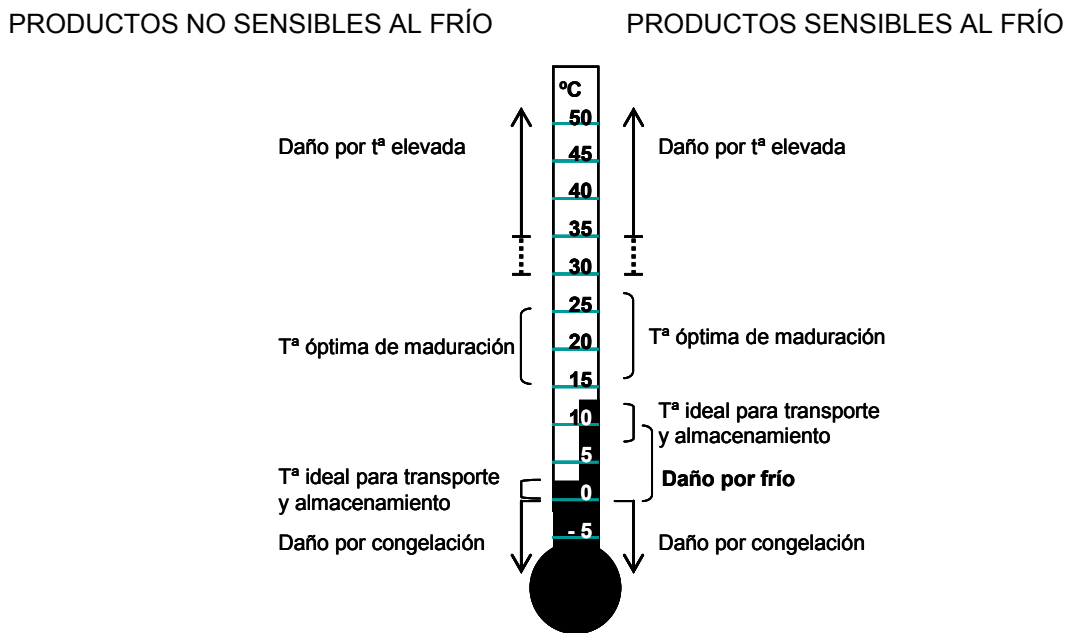


Figura 2. Relación de efectos de la temperatura poscosecha sobre frutos y hortalizas no sensibles (tolerantes) y sensibles al frío (adaptado de Kader, 2003).

En general, el estudio de los daños causados por frío en plantas y de la tolerancia al mismo es de interés por diferentes motivos, entre los que podríamos destacar: 1) La mayoría de frutas y hortalizas frescas se almacenan tras su cosecha a bajas temperaturas entre 1-4°C (Kitinoja y Kader, 2003) (Fig. 2), 2) Los cultivos en campo están expuestos a los cambios climatológicos que pueden afectar a toda la planta, y entre esos cambios se incluyen las bajas temperaturas, 3) la aparición de DF

afecta a cultivos frutícolas y hortícolas de importancia económica, 4) el cultivo de estas plantas se ve limitado, no sólo por su sensibilidad a las temperaturas de conservación tras la recolección (Paull, 1990; Kader y Arpaia, 2002), sino por estar restringido a áreas geográficas y estaciones en las que sus condiciones térmicas lo permitan (Burke *et al.*, 1976; Alberdi y Corcuera, 1991). Por ejemplo, se ha pronosticado que el descenso de 1°C en la temperatura media del mundo tendría como resultado una reducción del 40% de la producción de arroz (Hale y Orcutt, 1987).

Debido a la importancia de sus efectos, existen numerosos estudios que tratan de entender el fenómeno del estrés por bajas temperaturas y la adaptación de las plantas al mismo (Sabehat *et al.*, 1998; Cushman y Bohnert, 2000; Viswanathan y Zhu, 2002; Gong *et al.*, 2002; Iba, 2002; Mahajan y Tuteja, 2005; Sanchez-Ballesta *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2006; Sapitnitskaya *et al.*, 2006; Bargmann y Munnik, 2006; Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2006; Vij y Tyagi, 2007; Chinnusamy *et al.*, 2007; Oguniwin *et al.*, 2008, 2009; Groppa y Benavides, 2008; Guy *et al.*, 2008; Upchurch, 2008; Maul *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2009; Nilo *et al.*, 2010; Rui *et al.*, 2010; Page *et al.*, 2010; Sayyari *et al.*, 2010).

2.1 Daños por frío durante el desarrollo de las plantas

Los DF pueden tener lugar en cualquier etapa del desarrollo de las plantas, desde la germinación de semillas, pasando por el desarrollo de plántulas, el cultivo en el campo, el almacenamiento, transporte y distribución en mercados y finalmente durante su conservación en frigoríficos domésticos (Bramlage, 1982; Watada, 1982; Marcellin y Ulrich, 1983; Luchsinger y Artes, 2000). La naturaleza y severidad de los síntomas depende de la especie, la variedad, el tejido y su estado de desarrollo; así como de la severidad y duración de la exposición a las condiciones de estrés y de las condiciones ambientales antes, durante y después del impacto térmico (Lyons, 1973).

Aunque el énfasis de la mayoría de los estudios se ha centrado en la postcosecha de productos hortofrutícolas, es necesario recordar que plantas silvestres cultivadas en los trópicos y que son sensibles al frío, también son susceptibles en todos sus estadios de desarrollo, con la excepción de las semillas durante el estado de dormancia (Morris, 1982). En contraste, solamente los órganos específicos de plantas silvestres de áreas templadas, tales como los frutos de ciertas caducifolias y brotes de espárrago jóvenes, resultan dañados tras una exposición prolongada a bajas temperaturas (Bramlage, 1982). Algunos cultivos, económicamente importantes, susceptibles a los DF a temperaturas inferiores a 10-15°C e incapaces de aclimatarse

son el maíz, soja, algodón, tomate, limón, lima, pomelo, arroz, plátano, manzana, espárragos, aguacate, judías, café, pepinos, berenjena, mango, melón, papaya, melocotón, pimentón, piña, granada, ciruela, sorgo, calabaza, caña de azúcar, etc.

2.2 Síntomas de DF durante la postcosecha de productos vegetales (frutos y hortalizas)

Durante la postcosecha, el grado de DF de los diferentes productos así como los síntomas asociados puede ser variable. Existe un amplio rango de síntomas de DF que dependen no sólo del cultivar, sino también de la temperatura y tiempo de exposición al frío, del grado de madurez, de las características climáticas de la zona de cultivo y de las temperaturas anteriores a la cosecha (Lill *et al.*, 1989; Kader, 2003; Lurie y Crisosto, 2005). En general, se ha observado que los frutos inmaduros o precoces son más sensibles al frío que los maduros o tardíos de la misma cosecha, con independencia que sean climatéricos, como por ejemplo el tomate Daniela (Artes, 1999) y el melocotón (Fernández-Trujillo y Artes, 1997, 1999), o no, como el pimiento (Serrano *et al.*, 1997). En cambio, en el caso de los frutos cítricos se ha comprobado que la susceptibilidad al frío está más relacionada con las condiciones ambientales en las que se desarrollan los frutos, más que con la maduración en sí, como en F (Gonzalez-Aguilar *et al.*, 2000).

Los síntomas con los que se manifiestan los desórdenes fisiológicos provocados por el frío en frutas y hortalizas recolectadas son muy diversos (Morris, 1982; Saltveit y Morris, 1990). Se distinguen dos categorías, que pueden coexistir y desarrollarse simultáneamente, como sucede con frecuencia en frutos tropicales y subtropicales.

La primera categoría muestra una naturaleza cualitativa y consiste en anomalías del desarrollo o del metabolismo, como la maduración incompleta del tomate, papaya, mango, melocotón y nectarina; el endulzado de las patatas; o el insuficiente sabor y aroma en banana, plátano, piña, papaya, sandía o melón (Hardenburg *et al.* 1990; Marcellin, 1992; Artes, 1995a, b, Artes *et al.*, 2000). Varios metabolitos gaseosos como el anhídrido carbónico (CO₂), etileno (ET), etanol y acetaldehído, pueden ser bioindicadores para evaluar y detectar las alteraciones organolépticas, fisiológicas y patológicas antes de la aparición de los síntomas (Couey, 1982).

La segunda categoría de DF la integran las verdaderas patologías, que presentan muy variadas manifestaciones: depresiones de la piel o picado, que afecta

al 60% de las especies de frutas y hortalizas de regiones tropicales y subtropicales; pardeamientos internos o superficiales (escaldadura), típicos de la fruta de pepita, como cítricos (Alferez *et al.*, 2005b), granada (Elyatem y Kader, 1984), aguacate (van Lelyveld y Bower, 1984); infiltración de agua en los espacios intercelulares frecuente en tomate (Hobson, 1981), pepino, papaya o jícama; desarrollo de textura algodonosa, harinosidad o lanosidad (melocotón y nectarina) (Crisosto *et al.*, 1999); debilitamiento de la resistencia a daños mecánicos y al ataque microbiano (muy generalizado). Se han descrito dentro de esta categoría ciertas alteraciones que son específicas de algunas frutas y hortalizas (Hardenburg *et al.*, 1990; Marcellin, 1992; Artes 1995a, b, Artes *et al.*, 2000).

Generalmente, los síntomas de DF no se manifiestan hasta que los frutos son retirados del almacenamiento en refrigeración y son colocados a temperatura ambiente (Gross *et al.*, 2002). No obstante, en algunas variedades de frutos cítricos, como F, el desarrollo de DF se produce incluso durante el almacenamiento a 2°C.

2.3 Desarrollo fisiológico del DF

Las bajas temperaturas en plantas sensibles producen DF en dos etapas. En una primera fase de latencia, no se manifiestan los síntomas de DF y puede ser reversible (Fig. 3). El daño directo primario por las bajas temperaturas en los vegetales ocurre en las membranas (Lyons *et al.*, 1979; Levitt, 1980; Quinn, 1988; Upchurch, 2008), con la consecuente alteración celular, y con una severidad que depende de la intensidad y duración del estrés. Los principales cambios en la membrana provocan un aumento en la rigidez, la microviscosidad de la matriz lipídica, y la permeabilidad (Lynch y Steponkus, 1987) que derivan en deshidratación celular por pérdida de líquidos, al igual que en fugas de solutos, y perturbación de las funciones celulares. En los casos más graves, se produce la ruptura de las membranas, necrosis y muerte del órgano o de la planta (Mazliak, 1994). La pérdida de la integridad de la membrana podría estar potenciada por procesos de estrés oxidativo (Steponkus, 1984). Las alteraciones primarias e indirectas se dan en el metabolismo y pueden dar lugar a alteraciones secundarias reparables, aunque dependiendo del estado fisiológico (Levitt, 1980). Generalmente se reduce la fotosíntesis, interfiere la producción de energía, aumenta la energía de activación de algunas reacciones, aumenta la diferencia en la presión de vapor entre el producto y el ambiente reduciendo la transpiración (Wang, 1982, 1990). Las bajas temperaturas también afectan a las

actividades enzimáticas y las características termodinámicas de las reacciones, disminuyéndola e incluso inactivan algunas enzimas (Lyons, 1973; Thomashow, 1999; 2001). Además, el frío puede inducir la síntesis de ET, lo cual puede derivar en efectos secundarios como una activación en la velocidad de respiración (Hansen y Hartman, 1937). Algunos de estos componentes pueden retornar a un estado normal, simplemente incrementando la temperatura hasta que esta sea superior a la temperatura crítica de DF.

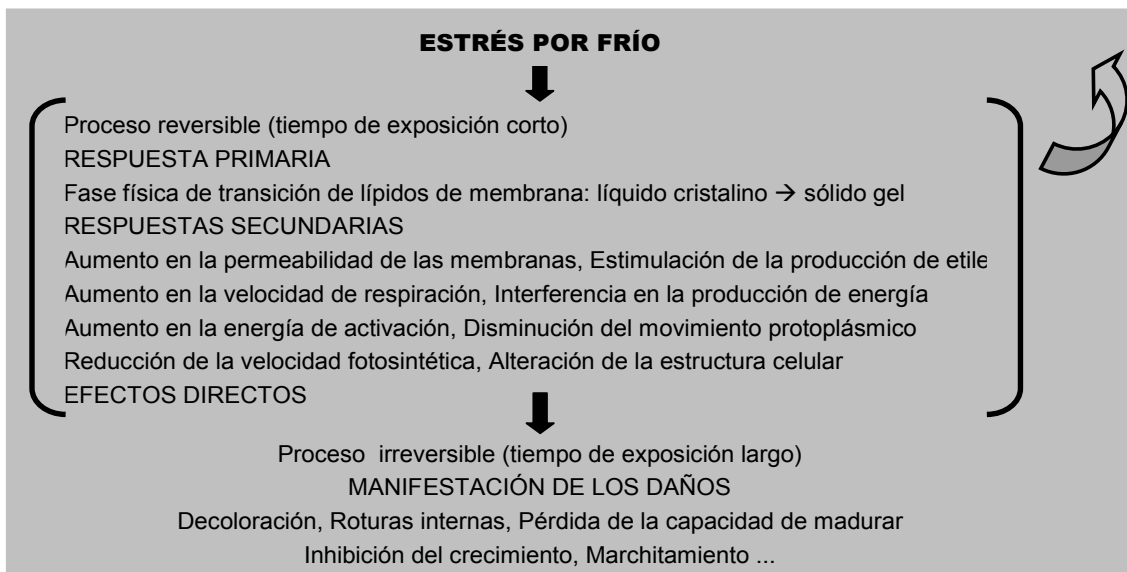


Figura 3. Esquema de eventos en el desarrollo y manifestación de DF en plantas. Adaptado de Wang (1982).

La segunda fase de DF tiene lugar cuando, superado el umbral de inducción, aparecen los síntomas, y su establecimiento es ya irreversible (Fig. 3), por lo que una elevación moderada de la temperatura solo contribuye a acelerar su desarrollo (Marcellin, 1992; Artes, 1995a). Los síntomas de DF incluyen la ralentización del crecimiento, marchitamiento, clorosis, necrosis y eventualmente, muerte de la planta (Lyons, 1973; Graham y Patterson, 1982; Allen y Ort, 2001).

Sin embargo, un estrés severo por un choque de frío, que produce daños de manera muy rápida, ejerce un efecto irremediable y a veces letal, sin que llegue a producir la congelación de los tejidos. Con el retorno a una temperatura superior al umbral crítico de DF, se manifiesta claramente el estado reversible o irreversible de los desórdenes (Marcellin y Ulrich, 1983; Jackman *et al.*, 1988; Marcellin, 1992; Artes, 1995b).

Los cambios fisico-químicos y fisiológicos, que ocasionan la exposición de las plantas o sus partes a las bajas temperaturas, provocan cambios en la expresión

génica (Weiser, 1970; Tseng y Li, 1990; Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1996; Cushman y Bohnert, 2000; Viswanathan y Zhu 2002; Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2006; Ogundiwin *et al.*, 2008, 2010; Zhao *et al.*, 2009). Los cambios en la fluidez de membranas y en los niveles de electrolitos, principalmente el calcio, serían los que en primera instancia activarían el programa de respuesta (Minorsky, 1985; Knight *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 2006).

3. CASCADA DE SEÑALIZACIÓN DEL FRÍO PARA LA RESPUESTA ADAPTATIVA EN PLANTAS

La activación de mecanismos protectores frente a los efectos nocivos del frío requiere de una compleja red de señalización. Parte de los componentes de la red son compartidos para la respuesta a varios estreses abióticos, lo que se traduce en un cierto nivel de solapamiento entre los genes involucrados en la respuesta a cada uno de ellos (Seki *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2002; Rabbani *et al.*, 2003; Mahajan y Tuteja, 2005; Kilian *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2009) (Fig. 4).

Las evidencias apuntan a que la percepción del frío se produce en primera instancia en las membranas (Levitt, 1980; Quinn, 1988; Orvar *et al.*, 2000; Upchurch, 2008). Cambios en las propiedades de las membranas derivan en la liberación de segundos mensajeros como el caso del inositol-trisfosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG) tras la acción de la fosfolipasa C (PLC) (Vergonelle *et al.*, 2005) (Fig. 4). La acción de estos segundos mensajeros contribuye en un incremento de los niveles de calcio citoplásmico por entrada de iones Ca²⁺ desde el apoplasto o liberado de fuentes intracelulares (Alexandre *et al.*, 1990; Knight *et al.*, 1996). Los cambios del nivel de Ca²⁺ citosólico actúan a su vez como otro segundo mensajero, ya que se perciben por sensores de calcio, que interactúan con otros componentes de señalización aguas abajo como quinasas y/o fosfatasa (Kudla *et al.*, 2010). Las citadas proteínas de modificación actúan sobre factores de transcripción provocando cambios que afectan la expresión de la mayoría de genes de respuesta a estrés que finalmente dirigen la respuesta fisiológica.

Actualmente, la cascada transcripcional *C-repeat/dehydration responsive element Binding Factors* (CBFs) es la ruta de regulación mejor caracterizada en relación con la aclimatación al frío. Aunque esta ruta se ha caracterizado en una planta

resistente al frío, *Arabidopsis*, existen homólogos a proteínas CBF en un amplio rango de plantas, incluyendo plantas sensibles al frío como tomate (Jaglo *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2009), arroz (Choi *et al.*, 2002; Dubouzet *et al.*, 2003), y cítricos (<http://bioinfo.ibmcp.upv.es/genomics/cfgpDB>). El frío también activa esta ruta en una especie sensible como el tomate, donde sin embargo, no desencadena una respuesta de tolerancia efectiva (Zhang *et al.*, 2004b).

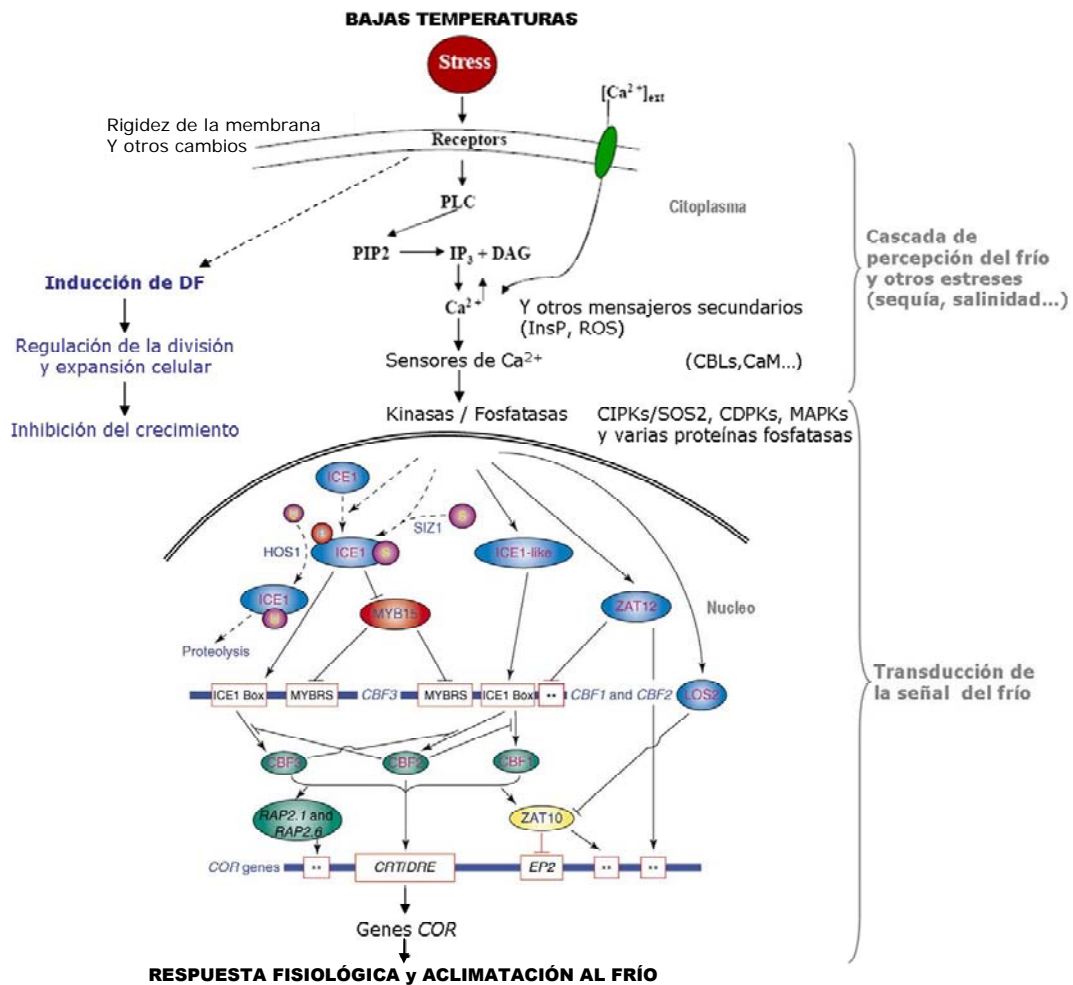


Figura 4. Esquema de la ruta general de la señalización y respuesta a estrés abiótico. Respuesta celular al estrés desde su percepción hasta las respuestas fisiológicas. Las abreviaturas utilizadas corresponden a: PLC, fosfolipasa C; PIP, fisfatidilinositol 4,5-bifosfato IP₃, inositol-trisfosfato; DAG, diacilglicerol; ROS, especies reactivas del oxígeno; CBL, calcineurin B; CaM, calmodulina; CIPK, quinasa que interacciona con CBL; CDPK, quinasa dependiente de Ca²⁺; MAPK, quinasa activada por mitogeno Adaptado de Mahajan y Tujeja (2005) y Chinnusamy *et al.* (2007).

En *Arabidopsis thaliana*, la subfamilia de factores de transcripción *CBF* consiste en 3 genes *CBF1*, *CBF2* y *CBF3* (también conocidos como *DREB1b*, *DREB1c*, y *DREB1a*, respectivamente) responde a bajas temperaturas. En cambio, el factor *CBF4* no responde al frío, posiblemente, porque forme parte de una ruta de señalización diferente implicada en la deshidratación y dependiente de ácido abscísico (ABA) (Haake *et al.*, 2002). *CBF1-3* se inducen rápidamente ante la exposición de plantas a bajas temperaturas (Gilmour *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1998). Estos tres *CBFs* codifican miembros de la familia de factores de transcripción AP2/ERF (Riechmann *et al.*, 2000), los cuales se unen al elemento regulador *CRT/DRE* (*C-repeat/dehydration responsive element*) del promotor de los genes diana (Stockinger *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1998) (Fig.4). Las proteínas CBF inducen la expresión de cientos de genes, denominados en conjunto el regulón CBF (Maruyama *et al.*, 2004; Vogel *et al.*, 2005), el cual da lugar a un aumento en la tolerancia a bajas temperaturas (Jaglo-Ottosen *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1998). Ello se debe a que parte del programa molecular dependiente de CBF resulta en la acumulación de moléculas crioprotectoras de bajo peso molecular, como rafinosa, sacarosa y prolina (Cook *et al.*, 2004; Kaplan *et al.*, 2004), y en la producción de polipéptidos crioprotectores, y otros productos protectores resultado de la expresión de los genes *COR* (*cold-regulated*) (Fig.4).

Existe información considerable sobre la inducción de la expresión génica aguas abajo de *CBF1-3*, pero todavía se desconoce con detalle cómo ellos mismos están inducidos por las bajas temperaturas. En el laboratorio del Dr. Zhu (Chinnusamy *et al.*, 2003; Agarwal *et al.*, 2006) se han identificado dos factores de transcripción relacionados: MYB15, un regulador negativo de *CBF1-3*; y la proteína ICE1 (*inducer of CBF expresión*), un regulador positivo de *CBF3* pero con leve efecto sobre la expresión de *CBF1* y *CBF2* (Chinnusamy *et al.*, 2003; Agarwal *et al.*, 2006) (Fig. 4). Zarka *et al.* (2003) identificaron una región de 155 pares de bases (pb) del promotor de *CBF2* capaz de dirigir la inducción de la transcripción por frío y encontraron en la secuencia de este promotor dos pequeñas regiones, *ICEr1* e *ICEr2* (*ICE region 1 y 2*), importantes para la inducción por frío. No obstante, los factores de transcripción que actúan a través de estas secuencias aún no se han determinado. Adicionalmente, se sabe que se requiere de un rápido flujo de calcio para una correcta inducción por frío de *KIN1*, un miembro del regulón CBF (Knight *et al.*, 1996). De forma parecida, en alfalfa (*Medicago sativa*), la inducción por frío de dos genes, *cas15* y *cas18*, está relacionada con el flujo de calcio (Monroy y Dhindsa, 1995). Sin embargo, no se ha caracterizado la conexión entre el aumento de calcio y la expresión de genes regulados por frío. Un posible nexo de unión entre el calcio y la respuesta al frío podría estar en algunos miembros de la familia de factores de transcripción *CAMTA*

(*calmodulin binding transcription activator*) (Doherty *et al.*, 2009) que se unen a los promotores de *CBF2* y *ZAT12* (Bouche *et al.*, 2002). *ZAT12* es un regulador negativo de los genes *CBFs* (Vogel *et al.*, 2005) (Fig.4).

Los genes de respuesta al frío, *COR*, incluyen entre otros: la familia génica de pequeñas proteínas hidrofílicas denominadas dehidrinas; el grupo II de las proteínas *LEA* (*late embryogenesis abundant*) (Artus *et al.* 1996; Close, 1997; Steponkus *et al.* 1998), que están relacionadas con la estabilidad de la membrana (Thomashow *et al.*, 1998) y que protegen a las células en condiciones de bajas temperaturas, déficit hídrico y estrés salino; los genes implicados en la biosíntesis de proteínas con función crioprotectora o anticongelantes (AFPs) (Hon *et al.*, 1994; Antikainen y Pikhakaski, 1993) y genes relacionados con la defensa de las plantas frente al estrés oxidativo (Sung *et al.*, 2003; Malacrida *et al.*, 2006).

3.1 Mecanismos moleculares de tolerancia al frío

La aparición de métodos de alta capacidad para estudiar la expresión génica está permitiendo identificar un gran número y variedad de genes regulados por las bajas temperaturas, algunos de estos, con una posible función reguladora y muchos todavía con una función desconocida (Seki *et al.*, 2001; Kreps *et al.*, 2002; Maruyama *et al.*, 2004; Vogel *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2005; Cheng *et al.*, 2007; Mantri *et al.*, 2007; Kilian *et al.*, 2007; Usadel *et al.*, 2008; Maul *et al.*, 2008; Fernandez *et al.*, 2008; Guy *et al.* 2008). La aclimatación al frío está correlacionada con la activación de numerosos genes de repuesta a bajas temperaturas (Fowler y Thomashow, 2002). Estudios comparativos han podido relacionar diferencias en los niveles de expresión de mRNAs de genes inducidos por las bajas temperaturas con las diferencias en tolerancia al frío de algunos cultivares (Gulick *et al.*, 2005; Monroy *et al.*, 2007; Amtmann, 2009; Zhao *et al.*, 2009).

Se ha propuesto que las condiciones de aclimatación inducen tolerancia al frío al modificar la expresión génica, de modo que las células quedan más preparadas para soportar el estrés. Por ejemplo, el acondicionamiento incrementa la expresión de varios genes relacionados con estrés en el flavedo de pomelo, incluyendo dos genes que codifican dos dehidrinas (*COR15* y *cpDHN*), cuatro proteínas de choque térmico (*HSP18-I*, *HSP18-II*, *HSP22*, and *HSP70*), y *cNHX1*, un gen que codifica un antiportador de sodio y protones relacionado con la tolerancia a salinidad en plantas (Porat *et al.*, 2002, 2004; Rozenzweig *et al.*, 2004). El curado en F también incrementa la expresión de *COR15*, genes de defensa como *quitinasa*, de estrés oxidativo como

oxigenasa, de metabolismo secundario como *COMT*, *ácido cafeico O-metiltransferasa* (Sanchez-Ballesta *et al.*, 2003, 2004; Gosalbes *et al.*, 2004). El grupo de Steponkus propuso que *COR15am* (proteína *COR15a* modificada al entrar en el cloroplasto) modifica la inducción de la fase II hexagonal a bajas temperaturas porque altera la curvatura intrínseca de la membrana interna de la envoltura cloroplástica (Webb *et al.*, 1996). Se propone que con ello no se adhieren las membranas plasmáticas y cloroplástica. La sobreexpresión de *COR15a* en *Arabidopsis* no aclimatada, aumenta la tolerancia a la congelación en cloroplastos congelados *in situ*, y protoplastos de hojas congelados *in vitro* en un rango de temperatura de [-4, -8°C] (en [-2, -4°C] tenía efectos negativos) (Artus *et al.*, 1996).

El estrés en plantas, incluido el estrés por frío, conduce a la alteración del balance producción/eliminación de especies reactivas del oxígeno (ROS) provocando condiciones de estrés oxidativo en la célula y la respuesta al mismo (Mittler *et al.*, 2004; Apel y Hirt, 2004).

4. EFECTO DE LAS BAJAS TEMPERATURAS EN FRUTOS CÍTRICOS

Los cítricos, por su origen tropical y subtropical, por lo general son plantas sensibles al frío y su capacidad para sobrevivir a temperaturas de congelación no se aproxima a otras plantas leñosas de origen templado (Webber *et al.* 1967). Pero los frutos cítricos pueden presentar alteraciones fisiológicas debidas al frío por encima de la temperatura de congelación (1-10°C), y estas fisiopatías muestran diferente sintomatología según la variedad y condiciones ambientales.

4.1 Sensibilidad de los frutos cítricos al frío en la postcosecha

No todos los frutos cítricos experimentan DF, dependiendo principalmente de la variedad (Agustí, 2000), por lo que se plantea que existe una base genética que determina la sensibilidad. Por ejemplo, las naranjas Navelate son sensibles al frío y la variedad Pinalate, mutante espontáneo de Navelate, es tolerante (Alferez *et al.*, 2005a). Pero además de la variedad, son muchos los factores determinantes de la aparición de estos daños durante la postcosecha en frío. Entre ellos se incluyen las condiciones en que se desarrollaron los frutos, la zona de cultivo, los tratamientos pre- y postcosecha recibidos, las características morfológicas y las condiciones fisiológicas de los tejidos en el momento de su exposición a bajas temperaturas, y la duración e

intensidad de la exposición. Así, por ejemplo, los frutos más maduros, con mayor proporción de azúcares reductores pueden ser más sensibles a mostrar DF (Holland *et al.*, 1999). La variabilidad estacional de dichas condiciones motiva el que el nivel de DF varíe entre campañas (Lafuente *et al.*, 1997, Schirra *et al.*, 1997, Gonzalez-Aguilar *et al.*, 2000).

4.2 DF característicos de frutos cítricos

Las fisiopatías que se producen en los cítricos suelen suceder en la corteza del fruto, especialmente en el flavedo. Los síntomas más habituales del DF en el flavedo de cítricos (Miller, 1945; Martínez-Javega y Cuquerella, 1984) son:

1) El manchado o **picado** (*pitting*). Es el DF más frecuente asociado al almacenamiento de los frutos cítricos a bajas temperaturas, y se caracteriza por la formación de manchas en áreas discretas de la piel que se colapsan formando lesiones profundas (Lindhout *et al.*, 2004). Este tipo de DF se ha detectado en pomelos, limas, limones, naranjas y tangerinas. Es el DF característico en mandarinas F (Martínez-Javega *et al.*, 1992; Sánchez-Ballesta *et al.*, 2003).

2) El **escaldado** se presenta principalmente en frutos sobremaduros y se caracteriza por un oscurecimiento difuso de la piel que se manifiesta de forma irregular y se extiende paulatinamente por toda la superficie del fruto, por ejemplo en naranjas Navelate (Alferez *et al.*, 2005a), Salustiana, Valencia.

Cuando los frutos cítricos son conservados a una temperatura muy baja pueden aparecer otros daños que afectan tanto a la pulpa como a la corteza, proporcionando una consistencia blanda y esponjosa, y provocando una mayor sensibilidad a los ataques de patógenos (Grierson, 1986; Wardowski *et al.*, 1986). Para evitar los DF deben almacenarse para su comercialización a temperaturas relativamente altas de 11-13°C (Chalutz *et al.*, 1985; Kader y Arpaia, 2002).

DAÑOS POR FRÍO EN FRUTOS FORTUNE

Las mandarinas F son sensibles al frío, ya que cuando se almacenan a bajas temperaturas experimentan DF con características visibles que van del picado y manchado del flavedo hasta la aparición de zonas necróticas (Martínez-Javega *et al.* 1992). El picado de las mandarinas F al igual que el de frutos de otros cultivares, como los limones, puede ocurrir ya en el campo antes de la cosecha (Almela *et al.*, 1992a, b; Vercher *et al.*, 1994). Los frutos más afectados por el picado son los

situados en la parte exterior del árbol, y más concretamente los orientados hacia el Norte y Oeste. Gonzalez-Aguilar *et al.* (1998) concluyeron que los frutos de la mandarina F son más sensibles cuando son recolectados en enero, una vez han adquirido su coloración característica. Cuando la intensidad del picado es mayor aparecen manchas marrones que provocan la depresión y necrosis de amplias áreas de la corteza. Durante el almacenamiento en frío (2°C) de frutos F aparecen DF ligeros durante las primeras 3 semanas (Fig. 5). A partir de la tercera semana, el desarrollo de daños se acelera y rápidamente pasa a ser más que moderado (Fig. 5).

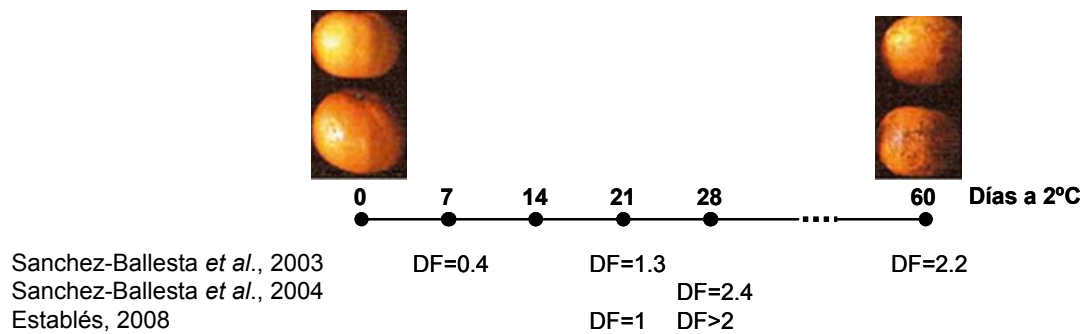


Figura 5. Evolución del DF en el fruto de mandarinas F durante el almacenamiento a 2°C, según cada una de las citas bibliográficas detalladas. El DF se midió visualmente en función del área necrótica y la intensidad de oscurecimiento según la escala 0=no daño, 1=ligero, 2=moderado, y 3=severo (Lafuente *et al.*, 1997). El DF aumenta por incremento de las zonas necróticas, cada vez hay más puntos mientras que sólo algunos agrandan su área.

4.3 Principales fitohormonas implicadas en el control hormonal de la respuesta al frío en frutos cítricos

Algunos estudios han demostrado que la aplicación de giberelinas (GA) incrementa la capacidad de las plantas para tolerar el estrés por bajas temperaturas, por ejemplo en pomelo (Ismail y Grierson, 1977) y en lima (Sierra *et al.*, 1993). Por el contrario, en frutos de mandarina F la aplicación de GA antes del cambio de color se mostró ineficaz (Jackson *et al.*, 1992) o con muy baja eficiencia (Zaragoza *et al.*, 1996), posiblemente porque inhibe el crecimiento de la corteza, se reduce la acumulación de ceras en la superficie (El-Otmani y Coggins, 1985) y cortezas más livianas resultan en frutos más sensibles.

El ABA es uno de los principales señalizadores de diferentes tipos de estrés ambiental (Chinnusamy *et al.*, 2008). El papel del ABA en la respuesta de aclimatación a las bajas temperaturas se basa en parte en que su aplicación exógena es capaz de reducir la susceptibilidad de los tejidos vegetales al frío en un amplio número de

especies (Kawada *et al.*, 1979; Lafuente *et al.*, 1991). En diferentes especies y variedades de cítricos, el ABA incrementa durante la maduración de los frutos (Rasmussen, 1975; Aung *et al.*, 1991; Lafuente *et al.*, 1997). Dicho incremento se relacionó con el aumento en la tolerancia al frío en pomelos (Kawada *et al.*, 1979). No obstante, los cambios en los niveles de ABA a lo largo de la maduración de las mandarinas F no mostraron un paralelismo con los cambios en su susceptibilidad al frío (Lafuente *et al.*, 1997). Por otra parte, el tratamiento con ABA previamente al almacenamiento en frío de frutos de mandarinas F (variedad sensible al frío) y Hernandina (variedad tolerante al frío) no sólo no evita el DF sino que puede ser perjudicial al producir DF en la variedad tolerante (Gosalbes *et al.*, 2004). Asimismo, en las variedades F y Navelate los niveles de ABA aumentan más durante su almacenamiento a 12°C que a 1-2°C (Lafuente *et al.*, 1997; Alferez *et al.*, 2005a). A 1-2°C, los niveles de ABA pueden incluso disminuir tanto en variedades tolerantes, como en variedades sensibles al frío (Lafuente *et al.*, 1997; Lafuente y Sala, 2002). Estos resultados sugieren que no parece haber una relación directa entre el ABA y la tolerancia al frío en los frutos cítricos. Incluso, hay evidencias que sitúan al ABA como promotor de DF en frutos cítricos más que como potenciador de tolerancia. Este es el caso del mutante Pinalate de la naranja Navelate, deficiente en ABA y que no desarrolla DF durante su almacenamiento a 1°C (Rodrigo *et al.*, 2003; Alferez *et al.*, 2005a).

Los procesos principales en los que está implicado el ET están relacionados con algunos aspectos del desarrollo, como la maduración y senescencia de frutos climatéricos (las mandarinas no lo son), pero también con la respuesta a diversos estreses bióticos y abióticos. Se ha observado en numerosas plantas que la exposición a bajas temperaturas estimula la producción de ET mediante la activación de la síntesis de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) (Larrigaudiere y Vendrell, 1993; Mullins *et al.*, 1999). El incremento de ET parece suceder cuando los frutos pasan de condiciones de frío a temperaturas moderadas, ya que en el periodo de frío se transcriben los genes que codifican las enzimas implicadas en la síntesis de ET, ACC sintasa (ACS) y ACC oxidasa (ACO), pero su traducción ocurre a temperaturas moderadas (Wang, 1982; Lelievre *et al.*, 1995).

La aplicación de ET tiene efectos contrapuestos en cuanto al desarrollo de DF por frutos y hortalizas. Se ha demostrado que la ruta de respuesta a ET interviene como mediador de parte de las respuestas de defensa o de protección que se desencadena en los frutos de la mandarina F frente a las bajas temperaturas de conservación (Lafuente *et al.*, 2001). Así, mientras que la aplicación de ET durante la exposición de los frutos de mandarina F al frío ralentiza el desarrollo de los daños en

la piel (Lafuente *et al.*, 2004), los frutos pretratados con el inhibidor de la acción del ET 1-metilciclopropeno (1-MCP) lo aceleran (Lafuente *et al.*, 2001). Este efecto del inhibidor 1-MCP es contrario al observado en frutos de otras especies como melones cantalupo Charentais (Ben-Amor *et al.*, 1999) y nectarinas Flavortop (Zhou *et al.*, 2001). Puede que dichos efectos contrapuestos estén relacionados con el mecanismo del ET en los mecanismos responsables del DF en cada caso particular (Lafuente *et al.*, 2003).

Las poliaminas (PA), espermidina, espermina y putrescina, son aminos alifáticas, implicadas en multitud de procesos en las plantas. La hipótesis que la síntesis de PA puede estar relacionada con la defensa de los tejidos vegetales al frío, está basada en la capacidad de estos compuestos para estabilizar las membranas celulares (Lyons, 1973; Smith, 1985; Wang, 1982, 1987). Las PA, al ser moléculas policatiónicas, pueden interactuar con compuestos aniónicos de las membranas, como los fosfolípidos, y favorecer la estabilización de la bicapa lipídica de la membrana, retardando así su deterioro (Roberts *et al.*, 1986). Igualmente, se piensa que la habilidad de las PAs de conferir protección frente al estrés y la senescencia puede ser debido a su capacidad de secuestrar los radicales libres que se formarían en la peroxidación de lípidos (Drolet *et al.*, 1986; Kumuda y Hara, 2004, Alcázar *et al.*, 2006; Groppa y Benavides, 2008). La aplicación exógena de PA a frutos ya recolectados como melocotón e incluso cítricos, es efectiva en la reducción de DF (Valero *et al.*, 1998). Sin embargo, en cítricos no parece que las PAs tengan una relación directa con el DF de los frutos (Gonzalez-Aguilar *et al.*, 2000).

4.4 Conservación postcosecha de frutos cítricos

4.4.1 Consideraciones generales

La conservación de frutos cítricos se realiza en cámara frigorífica durante períodos que pueden llegar a ser de hasta 3 a 4 meses, en algunas variedades, dependiendo de su estado de madurez (Martinez-Javega, 1999) (Tabla 1). Cuando los frutos se almacenan en un estado de madurez más avanzado es más probable que puedan producirse problemas por generación de sabores extraños (Mazzuz y del Rio, 1997).

Los principales factores a tener en cuenta para una buena conservación son: temperaturas, humedad relativa, CO₂, y recirculación del aire. La temperatura de conservación es diferente según variedades y tratamientos efectuados a la fruta, también depende del tiempo de conservación y estado del fruto (Tabla 1) (Martinez-

Javega, 1997, 2002; Martínez-Javega *et al.*, 1999). La humedad relativa se suele mantener entre el 90-95% ya que si no, se producen pérdidas de peso elevadas (6-7%) (Alferez *et al.*, 2005b). El CO₂, no suele sobrepasar el 0,5%, para evitar que la respiración del fruto pase de la forma aeróbica a anaeróbica, y el fruto tome sabores extraños (a cámara), que son debidos a la formación de etanol y acetaldehído (Mazzuz y del Rio, 1997). La recirculación del aire, mediante el uso de ventiladores, se diseña para permitir un movimiento débil y continuo dentro de la cámara sin que sobrepase la velocidad entre palets de 0,5 m/s, lo que permite una homogeneización de la atmósfera de la cámara y la eliminación de los productos volátiles que la fruta desprende en su respiración y proceso metabólico (Martínez-Javega, 1997).

TABLA 1. Datos orientativos para guardar frutos cítricos en cámara, con CO₂<0.5%, y 90-95% de humedad relativa

VARIEDAD	T^a (°C)	DURACIÓN (d)
Pomelos y limones (Verna)	10-12	60
Limonos finos, mandarinas Fortune	8-10	60
Tangelos ⁽¹⁾	8-10	30-60
Satsumas	4-5	60
Clementinas de Nules ⁽²⁾ y Navelinas	3-4	60
Orovales	3-4	30-60
Fernandinas	4-5	30-60
Salustianas	6-7	30-60
Návels	5-6	60
Navelates	4-5	30-60
Lane-lates	4-5	45
Valencia late	4-5	120

⁽¹⁾ Las Ortaniques se pueden conservar a una temperatura más baja, entre 4-5°C.

⁽²⁾ Si la coloración del fruto es algo verdosa, conservando a 5-6°C, se ha llegado a guardar hasta 90 d.

(datos proporcionados por DECCO IBERICA Post Cosecha S.A.U., grupo [UPL-United Phosphorus Ltd](#)).

4.4.2 Estrategias para reducir el daño por frío en los frutos cítricos durante su almacenamiento postcosecha

Con el objetivo de disminuir o prevenir la incidencia del DF, se han experimentado diversos tratamientos previos al almacenamiento refrigerado (Wang, 1993, Lurie, 1998).

Se pueden seguir dos estrategias para la conservación postcosecha de frutos sensibles al frío para evitar la aparición de DF y disminuir las pérdidas económicas: 1) búsqueda de condiciones menos dañinas para la conservación postcosecha de estos frutos, 2) acondicionamiento previo de los frutos para inducir su tolerancia a las bajas temperaturas. En relación con esas estrategias, se han utilizado tratamientos químicos (Rodov *et al.*, 1995; Artes, 2000), fungicidas (Schirra *et al.*, 1998), o fitohormonas como ET (Lafuente *et al.*, 2004), GAs (Ismail y Grierson, 1977), ABA (Kawada *et al.*, 1979), ácido jasmónico (Meir *et al.*, 1996) y PAs (Valero *et al.*, 1998). Así como la aplicación de recubrimientos, plásticos (D'Aquino *et al.*, 1998) o ceras (Dou, 2004). Otra opción es la postcosecha en cámaras con atmósfera controlada y modificada, por ejemplo, con bajos niveles de O₂ (Jahn *et al.*, 1969), o preacondicionamiento con choque de CO₂ (Artes, 2000).

Los acondicionamientos térmicos son tratamientos de calor que incrementan la tolerancia al frío y reducen la incidencia de podridos en distintos productos hortícolas, incluyendo los frutos cítricos (Lurie, 1998; Artes, 2000). El **acondicionamiento térmico** también se denomina **curado**. Sin embargo, hay que tener cuidado para que el exceso de calor no produzca daño en el fruto. Se emplean tres métodos de acondicionamiento por calor: agua caliente, aire caliente o aire saturado de vapor (Martinez-Javega y Cuquerella, 1994; Schirra y Mulas, 1995; Schirra *et al.*, 1997, 2004a; Porat *et al.*, 2000; Lafuente *et al.*, 1997, 2001). El acondicionamiento térmico es eficaz en limones y pomelos (Ben-Yehoshua *et al.*, 1987), mandarinas incluyendo F (Lafuente *et al.*, 1997; Martínez-Téllez y Lafuente, 1997), naranjas (Schirra *et al.*, 2004a, b) y kumquat (Rodov *et al.*, 1995). Para que estos tratamientos sean efectivos es necesario mantener la humedad relativa alta durante la aplicación del mismo (Wang, 1993; Alferez *et al.*, 2005b). En el caso de los frutos F, el acondicionamiento más eficaz resultó ser el tratamiento de 3d a 37°C antes del almacenamiento a bajas temperaturas (Martínez-Téllez y Lafuente, 1997).

Para disminuir o atenuar los manchados que provoca el frío se recomienda (1) el encerado de los frutos con ceras de conservación, (2) incluir en los tratamientos fungicidas derivados de los bencimidazoles, (3) así como acondicionar la fruta en el frigo progresivamente, es decir, comenzar con temperaturas entre 10-12°C y una vez la cámara llena, ir bajando la temperatura hasta llegar al punto deseado, evitando de esta manera cambios bruscos que pueden predisponer la fruta a la rotura de glándulas de aceite, que causan posteriormente manchados.

5. APROXIMACIÓN AL ESTUDIO DE LOS EFECTOS DEL FRÍO EN LOS FRUTOS CÍTRICOS

5.1 Antecedentes

La importancia económica de la variedad de mandarinas F y su sensibilidad al frío, tanto sobre árbol como en el almacenamiento postcosecha (Almela *et al.*, 1992a; Gonzalez-Aguilar *et al.*, 2000), ha propiciado el interés en estudiar por qué se producían los síntomas de DF, qué diferencia tenían las mandarinas F respecto otras variedades que no muestran DF, y qué procedimientos o estrategias se podrían diseñar para evitar la aparición de los DF (Lafuente *et al.*, 2005).

Vercher *et al.* (1994) compararon la piel de las mandarinas F, sensible, y CN, tolerante y hallaron que la permeabilidad de la cutícula siempre fue menor en los frutos CN que en F, a lo largo de la maduración del fruto en el árbol. Esa diferencia podría ser una causa de la diferente tolerancia al frío, ya que la mayor pérdida de agua que podría experimentar favorecería la aparición de síntomas de DF en F. Sin embargo, estudios más finos sobre la composición y morfología de la cutícula de F, muestran que el picado en F no aparece preferentemente en las zonas donde la cutícula está más deteriorada (Sala, 2000).

También han sido analizados los niveles de PAs en los frutos de F, antes y después de la cosecha, observándose oscilaciones en su contenido, pero sin una correlación directa y clara entre estos cambios y la tolerancia al frío (Gonzalez-Aguilar *et al.*, 2000).

Muchos estudios se han centrado en analizar el modo de acción de los métodos de aclimatación al frío y que proporcionan un nivel aceptable de protección a la posterior exposición al frío, por ejemplo en pomelo (Maul *et al.*, 2008). El mecanismo molecular de la reducción del DF por el curado en F no se conoce pero diferentes resultados sugieren que se debe a la activación de un complejo mecanismo molecular de respuesta del flavedo (Sanchez-Ballesta *et al.*, 2003). El acondicionamiento induce genes de metabolismo secundario, como genes *COMT* relacionados con la síntesis de metabolitos secundarios y fenilpropanoides, de modificación de pared celular, de daño oxidativo y otros genes de respuesta a estrés, así como factores de transcripción, por ejemplo *WRKY* y *TFIIB* (Sanchez-Ballesta *et al.*, 2003). También se ha visto la implicación durante el acondicionamiento de la expresión de genes de respuesta a estrés, como las proteínas de choque térmico (HSP, *heat shock protein*) que persisten durante la exposición al frío (Lafuente *et al.* 1991; Sabehat *et al.* 1998). En cambio, el

curado suprime la expresión del gen *CrCOR15* (Sanchez-Ballesta *et al.*, 2004), un gen de respuesta a estrés por frío y deshidratación en hojas del árbol de F (Sanchez-Ballesta *et al.*, 2004) y en frutos de *Citrus paradisi* (Porat *et al.*, 2002).

También, se han descrito genes marcadores de daño en frutos cítricos como son el gen β -1,3-glucanasa, tanto DF como daños no asociados al frío (Sanchez-Ballesta *et al.*, 2006, 2008), y el gen fenilalanina amonio liasa fenilalanina-amonio liasa (PAL) (Sanchez-Ballesta *et al.*, 2000b).

Para entender mejor los mecanismos moleculares de respuesta al frío y al acondicionamiento en pomelo, se han identificado genes de respuesta a estos tratamientos mediante el estudio de genotecas (Sapitnitskaya *et al.*, 2006) y micromatrices (Maul *et al.*, 2008).

Además del acondicionamiento por calor, se han estudiado tratamientos con ET durante la postcosecha de frutos F (Lafuente *et al.*, 2004). La aplicación de esta hormona durante el almacenamiento de frutos F a 1,5°C aumenta la tolerancia al frío, aunque la aplicación previa al almacenamiento no produce este beneficioso efecto (Lafuente *et al.*, 2001). Según esto, el efecto del ET en F no impide el desarrollo de DF, pero sí es capaz de reducirlo. La disminución de los síntomas de DF en atmósfera de ET podría estar relacionada con un aumento en la actividad PAL y catalasa (CAT) (Martinez-Téllez y Lafuente, 1997; Lafuente *et al.*, 2004). Sin embargo, el curado de los frutos de F, no produce un aumento de ET a pesar de evitar la aparición de DF (Martinez-Téllez y Lafuente, 1997), y la inducción por frío del mRNA de la PAL (Sanchez-Ballesta *et al.*, 2000a, b).

Otro tratamiento que favorece la reducción de DF en frutos F durante el almacenamiento en frío es la aplicación de Ca^{2+} y K^+ antes de la cosecha (Zaragoza *et al.*, 1996; El-Hilali *et al.*, 2003).

La acumulación de azúcares solubles y almidón ha sido relacionada con la aclimatación al frío en diversas plantas (King *et al.*, 1988; Guy *et al.*, 1992; Palomen y Junttila, 1999; Rekart-Cowie *et al.*, 2008; Korn *et al.*, 2008). En mandarinas F (Holland *et al.*, 2002) y naranjas Navelate (Holland *et al.*, 2005) el curado evita la caída de sacarosa y mantiene los niveles de ésta por encima del nivel en los frutos almacenados en frío sin acondicionar. Ambas variedades experimentan DF sin el curado, pero el mantenimiento de los niveles de azúcar sólo explica parcialmente la disminución de los DF ya que las naranjas tolerantes de la variedad Pinalate experimentan daños, no DF, a 12°C (Holland *et al.*, 2005).

En el caso de los cítricos, se ha propuesto que el estrés oxidativo puede participar en el desarrollo de DF (Sala, 1998; Sala y Lafuente, 1999; Sanchez-Ballesta *et al.*, 2003). Las diferencias observadas en la actividad de las enzimas del sistema

antioxidante superóxido dismutasa (SOD), CAT, ascorbato peroxidasa (APX) y glutatión reductasa, que favorecerían la eliminación de ROS, se han relacionado con la mayor tolerancia al frío de frutos de mandarina Clementina y CN respecto a las mandarinas F y Nova (Sala, 1988; Sala y Lafuente, 2000). Además, el curado de mandarinas F también disminuye el daño por estrés oxidativo originado por las bajas temperaturas (Sala, 1998, Sala y Lafuente, 2000). El aumento en la actividad de la enzima CAT tras el curado podría, en última instancia, proteger del estrés oxidativo (Sala y Lafuente, 1999; Martínez-Téllez y Lafuente, 1997).

5.2 Aproximación genómico-funcional al estudio de la biología de los cítricos

La mejora clásica tiene grandes limitaciones en los cítricos debido a diversos factores, como el hecho de ser variedades poliembriónicas, el que muchas variedades de importancia económica, como las Navel, F o Satsumas, presentan esterilidad total o parcial, y el que la mayoría de las especies de cítricos tengan un elevado grado de heterocigotidad. El procedimiento de mejora que mayores resultados ha proporcionado es la selección clonal en campo, aprovechando la tendencia de los cítricos a producir mutaciones espontáneas. Un ejemplo típico de este sistema son las variedades comerciales clementinas, satsumas y naranjos Navel. No obstante, este procedimiento tiene el inconveniente que las mutaciones se producen al azar y en consecuencia no pueden dirigirse (Navarro, 2005; Gmitter *et al.*, 2007).

Por otra parte, la tolerancia al estrés abiótico es un rasgo complejo, influenciado por la expresión diferencial y coordinada de diversos genes. La aplicación de abordajes globales, tal como hace la genómica funcional, resulta muy adecuada para el estudio y comprensión de la respuesta a estreses abióticos, la identificación de genes candidatos para la búsqueda de alelos de interés en poblaciones de mejora o para su alteración mediante ingeniería genética o mediante tratamientos físico-químicos.

Las micromatrices de DNA han sido, hasta la aparición de técnicas de secuenciación masiva, la herramienta más potente para el estudio global del transcriptoma. Y aún actualmente, son una herramienta muy eficaz en este tipo de abordajes por la facilidad de integración e interpretación de los datos en comparación con la secuenciación masiva, además de sus más reducidos costes. Sin embargo, para desarrollar micromatrices se requiere disponer de las secuencias del transcriptoma a estudiar. La secuenciación y anotación, tanto estructural como

funcional, de un genoma, aún con la llegada de las nuevas estrategias de secuenciación, continúa siendo un proceso costoso, lo que explica que dicho proceso se haya completado sólo en algunas especies vegetales. En la actualidad, todavía no se dispone de la secuencia del genoma de cítricos, pese a que se están realizando esfuerzos para ello (Roose *et al.*, 2007; Chen y Gmitter, 2008; Terol y Talón, 2008).

Como alternativa, la secuenciación de colecciones de cDNA y el análisis de colecciones de marcadores de secuencia expresada (ESTs, *expressed sequence tags*) constituye el modo más directo de obtener información de un genoma a nivel de regiones codificantes. Por ello, uno de los objetivos más extendidos de la genómica de plantas ha sido primero la generación de colecciones de ESTs y posteriormente la utilización de dicha información para el desarrollo de una micromatriz que permita el análisis de la expresión génica. En este sentido, la secuenciación masiva de ESTs de cítricos (Hisada *et al.*, 1996, 1997; Shimada *et al.*, 2003; Machado *et al.*, 2006, 2007) ha sido muy útil en la obtención de secuencias, incluyendo el desarrollo de la base de datos Harvest (<http://harvest.ucr.edu/>), que recoge ESTs de diversas especies de interés agronómico, entre ellas cebada, café, soja, arroz, trigo y cítricos (Close *et al.*, 2007).

El Proyecto de Genómica de Cítricos (CFGP, <http://Citrusgenomics.ibmcp-ivia.upv.es>) ha tenido como objetivo general desarrollar herramientas genómicas para su utilización en la mejora genética de cítricos. Cuando se inició el CFGP, la base de datos GenBank del NCBI (*Nacional Center for Biotechnology Information*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) contaba con apenas 2000 secuencias de cítricos, por lo que el CFGP fue la primera aproximación genómica a gran escala iniciada en cítricos. Para llevar a cabo este proyecto se obtuvo una colección de ESTs a partir de genotecas de cDNA de diferentes tejidos y condiciones. Con esta colección de ESTs se construyeron micromatrices de cDNA que están sirviendo para comparar el efecto sobre la expresión génica de diferentes tratamientos, estadios o variedades (Forment *et al.*, 2005; Ancillo *et al.*, 2007; Martínez-Godoy *et al.*, 2008, Huerta *et al.*, 2008). Producto del CFGP (<http://bioinfo.ibmcp.upv.es/genomics/cfgpDB/>) se han clonado numerosas secuencias de cítricos que no se conocían, se han identificado genes homólogos a los de otras especies (Conesa *et al.*, 2005; Terol *et al.*, 2007; Forment *et al.*, 2008) para su utilización en futuros programas de mejora, y se ha diseñado una metodología para el análisis de micromatrices más adecuada, específica para series temporales (Conesa *et al.*, 2006; Nueda *et al.*, 2007).

OBJETIVOS

El trabajo presentado en esta memoria de Tesis Doctoral se ha centrado en la generación de nuevas herramientas de genómica funcional que permitan profundizar en la comprensión de los mecanismos moleculares subyacentes a la biología de cítricos. En particular, en esta tesis se planteó la utilización de estas herramientas al estudio de la respuesta molecular que produce el estrés por bajas temperaturas en mandarinas, con el objetivo de obtener información sobre el desarrollo de los daños por frío y los mecanismos de sensibilidad y tolerancia. Esta información de las alteraciones moleculares detectadas debería ser útil para la selección y mejora de nuevas variedades de cítricos y de las tecnologías de postcosecha. Los objetivos específicos planteados en este trabajo fueron:

1. Generar herramientas genómico-funcionales que faciliten el estudio de los efectos del estrés causado por bajas temperaturas en cítricos, mediante la construcción de librerías de cDNA, secuenciación y análisis de ESTs de materiales relacionados con los DF en frutos.

2. Identificar cambios de expresión subyacentes a la respuesta postcosecha diferencial del flavedo de mandarinas almacenadas en frío entre una variedad sensible (F) y otra tolerante (CN).

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO

1.1 Material vegetal

El trabajo de esta Tesis Doctoral se llevó a cabo con frutos de mandarina de las variedades Clemenules (*Citrus clementina* Hort. Ex Tanaka) y Fortune (*Citrus clementina* Hort. Ex Tanaka x *Citrus reticulata*, blanco).

Los frutos de la variedad CN, tolerantes al frío, se recogieron en diciembre de dos campañas diferentes, en 2001 y en 2003. En ambas ocasiones se cosecharon frutos de varios árboles de un campo del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) ubicado en Moncada (Valencia).

La variedad F, muy sensible al frío, se recogió en los meses de enero y febrero durante las campañas 2000 y 2001, procedentes de una parcela comercial de Paterna (Valencia). Los frutos se cosecharon de 12 árboles adultos en plena producción, injertados sobre Citrange carrizo.

1.2 Cepas bacterianas, vectores y medios de cultivo

a) Cepas bacterianas de *Escherichia coli*:

DH5 α : (Stratagene) supE44, -lacU169, Δ (phi-80 lacZ- Δ -M15), hsdR, recA, endA1 gyrA96, thi-1, relA1.

DH10 β : (Invitrogen) F- mcrA (mrr-hsdRMS-mrcBC) Δ 80diacAZ Δ M15 Δ lacX74 deoR recA1 endA1 araD139 Δ (ara leu)7697 galU galK rpsL nupG (Str^R)

SOLR: (Stratagene) (mcrA) Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr) 171, sbcC, recB, recJ, uvrC, umuC: Tn5 (Kanr) lac gyrA96 relA1 thi-1 endA1 λ R (F' proAB, lacIq, Z Δ M15).

XL1-blue: (Stratagene) (recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17, supE44, relA1, lac, (F proAB, lacIq Z Δ M15, Tn10 (Tetr).

XL1-blue MRF': (Stratagene) Δ (mcrA)183 Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173, endA1, supE44, thi-1 recA, gyrA96, relA1, lac (F' proAB lacIqZ Δ M15 Tn5).

Strataclone™ SoIPack Competent Cells: (Stratagene) lacZ Δ M15, endA, recA.

b) Vectores plasmídicos:

pUC18: plásmido de 2,69 kb utilizado como vector de clonación.

pENTR1A: plásmido de 2,7 kb utilizado como vector de clonación.

pSC-A: plásmido de 3,5 kb utilizado como vector de clonación.

c) Medios de cultivo:

LB: triptona 1%, extracto de levadura 0,5%, NaCl 1 %.

LB agar: medio LB, agar 2%.

LB low salt: triptona 1%, extracto de levadura 0,5%, NaCl 0,5%.

LB agar low salt: medio LB low salt, agar 1,5%.

SM: NaCl 0,58%, MgSO₄·7H₂O 0,2%, Tris-HCl (pH 7,5) 50mM, gelatina 0,01%.

NZY: NaCl 0,5%, MgSO₄·7 H₂O 0,25%, extracto de levadura 0,5%, NZ amina (caseína hidrolizada) 1%, (pH 7).

NZY agar: medio NZY, agar 1,5%.

SOB: triptona 20%, extracto de levadura 5%, NaCl 0,5%, KCl 250 mM, una vez autoclavado se añadió MgCl₂ 2M (pH 7).

SOB agar: medio SOB, agar 1,5%.

SOC: medio SOB suplementado con glucosa 20 mM.

Top agar: triptona 1%, NaCl 0,5%, agar 0,6% y MgSO₄ 10 mM.

2. TRATAMIENTO DE ALMACENAMIENTO EN FRÍO Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS: CLEMENULES Y FORTUNE

Los frutos de mandarina CN y F se recolectaron manualmente descartándose aquellos que presentaban daños mecánicos o causados por insectos. Los frutos seleccionados fueron almacenados en cámara a 1,5°C ± 0,5°C, con 85-90% de humedad relativa. Previamente al almacenamiento, se cogieron al azar 20 frutos control de cada variedad se separó el flavedo, se congeló en N₂ líquido, se homogeneizó y se guardó a -80°C para posteriores análisis.

En cada cosecha los frutos recién traídos de campo se dividieron en grupos: (1) se separó el flavedo de 20 frutos control se trituraron y guardaron a -80°C, (2) el resto de frutos se almacenaron en la cámara a 2°C.

De los frutos de CN de la campaña de Diciembre de 2001 se recuperaron diez frutos de la cámara a 2°C a los 7 y 24 d de almacenamiento, se separó el flavedo, se trituró y guardó a -80°C.

En Diciembre de 2003 se recolectaron más frutos CN que fueron almacenados 2, 3,5, 4,5, y 24 horas (h), 9, 14, 23, 28, 42, y 56 d a 2°C.

En cambio el flavedo de los frutos de F se recogió el control y la muestra de 45 d a 2°C en la campaña 2000, y las muestras almacenadas a bajas temperaturas recogidas a los 7, 14, y 28 d. El tratamiento a 2°C no pudo extenderse en F tanto tiempo como en CN por la sensibilidad de estos frutos al frío, porque el tejido seleccionado fue el tejido sano.

A partir del material vegetal, se extrajo RNA para posteriores análisis.

3. AISLAMIENTO Y MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

3.1 Extracción y purificación de RNA total de flavedo

El material vegetal se pulverizó en nitrógeno líquido con la ayuda de un mortero hasta reducirlo a un polvo fino. A partir de este material se extrajo el RNA total del flavedo siguiendo el protocolo de Cathala *et al.* (1983). A partir de 4 g de tejido fresco triturado y homogenizado con 16 mL de tampón de extracción (tiocianato de guanidinio 5M, Tris·HCl 0,1M pH 8, EDTA 0,01M pH 8, β-mercaptoetanol 100mM) recién preparado. Tras una centrifugación de 30 min a 8500 rpm, el sobrenadante se filtró a través de Miracloth (Boehringer Diagnostics) y el volumen obtenido se separó en dos tubos. Para que precipitase selectivamente el RNA se añadió LiCl a una concentración final 3,5 M y se dejó toda la noche a 4°C. Al día siguiente, las muestras se centrifugaron 90 min a 8500 rpm y el precipitado se resuspendió en 5 mL de LiCl 3 M. Los tubos que provenían de la misma extracción se reunieron y se centrifugaron 60 min a 8500 rpm. A continuación, el precipitado se resuspendió en 4 mL de tampón de solubilización (EDTA 1 mM pH 8, Tris·HCl 10 mM pH 8, SDS 0,1%). A las muestras se les añadió un volumen de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y se centrifugaron 10 min a máxima velocidad. La fase acuosa se pasó a un tubo de vidrio (corex) y ocasionalmente se realizó un lavado más añadiendo un volumen de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) y centrifugando. La fase acuosa se pasó a otro corex y se precipitó con 0,4 volúmenes de acetato amónico 5 M y dos volúmenes de

etanol absoluto, dejándose de 20 a 60 min a -20°C . Tras centrifugar 30 min a máxima velocidad, el precipitado se lavó con 3 mL de etanol al 70% para hidratarlo y finalmente se resuspendió en 150 μL de agua. El RNA extraído se cuantificó en un espectrofotómetro midiendo la absorbancia a 260 nm utilizando el factor de conversión de una unidad de absorbancia es equivalente a 40 μg RNA/mL. La pureza de la preparación se comprobó por una parte con la razón de las absorbancias a 260 nm y 280 nm que debe estar comprendida entre 1,8 y 2,2; y por otra parte en una electroforesis con 1 μg de RNA en un gel de agarosa al 1,2%, que sirvió además para verificar la integridad del RNA. El resto de RNA se guardó a -80°C .

3.2 Extracción y purificación de RNA mensajero

A partir de 200 μg de RNA total extraído se purificó RNA mensajero (mRNA) con el kit de Qiagen *Purification of poly A⁺ RNA from total RNA* siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Este kit se basa en la selección de mRNA (contenido en la fracción de RNA poli A⁺) por la unión de éste a unas partículas de poliestireno y latex que tienen unidas covalentemente a su superficie cadenas dC₁₀T₃₀. Las cadenas poli A⁺ del mRNA hibridaron con las cadenas oligo T⁺ de las partículas y el RNA no mensajero se eliminó tras varios lavados. El último paso fue eluir el mRNA y cuantificarlo.

El mRNA obtenido se cuantificó en un espectrofotómetro UV. Seguidamente, para concentrarlo, se precipitó durante dos días a -80°C tras añadir 1 μL de GlycoBlue™ (Ambion), 35 μL de acetato potásico 2,5 M y 1000 μL de etanol al 100% a la solución. Posteriormente, se centrifugó durante 1 h, a 14000 rpm y 4°C . A continuación, se lavó con etanol al 70%. El precipitado resultante se resuspendió en agua Milli-Q hasta alcanzar 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. La calidad obtenida se determinó por un análisis *Northern blot* (apartado 4.1).

3.3 Aislamiento y purificación de DNA plasmídico de *Escherichia coli*

EN PLACAS DE 96 POCILLOS

Las extracciones de DNA plasmídico se hicieron mediante el método de lisis alcalina con el kit de Eppendorf *Perfectprep Plasmid 96 Vac, Direct Bind*. Este sistema utiliza placas de cultivo de 96 pocillos con un volumen máximo de 2,4 mL. Cada colonia se depositó en un pocillo con 1200-1500 μL de LB con Ampicilina 50 mg/mL y

la placa se incubó 24 h a 37°C y 300 rpm procediendo seguidamente a la extracción de los plásmidos según las instrucciones del fabricante. El DNA se eluyó en 50 µL de agua y la eficiencia de la extracción se comprobó analizando 1 µL en una electroforesis en agarosa al 1% (p/v), en tampón Tris/Acetato/EDTA (TAE) 1X.

Tras el cultivo se realizó un glicerinado utilizando 200 µL de éste y 50 µL de glicerol 80% y se almacenó a -80°C.

EN TUBO DE 1,5 mL

El asilamiento del DNA plasmídico se realizó por el método de lisis alcalina con el kit de Qiagen, de Roche, o con el protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989).

4. ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

4.1 Análisis de RNA mediante *Northern blot*

Para comprobar la calidad y cantidad del mRNA extraído se realizó un *Northern blot* siguiendo el protocolo de Lehrach *et al.* (1977). La sonda utilizada fue un producto de PCR del gen *CrCOR15* (Sanchez-Ballesta *et al.*, 2004) que se expresa abundante y constantemente en el fruto. Se analizó por electroforesis desnaturizante en un gel de agarosa al 1,2%, y tampón 3-morfolino-propano-sulfónico (MOPS: 0,2 M, acetato sódico 50 mM y EDTA 10 mM pH 8) 1X con formaldehído 8%. Las muestras utilizadas fueron 8 µg de RNA total y 0,5 µg de mRNA extraído del anterior. El RNA se añadió a 25 µL de una solución compuesta por formamida 50%, MOPS 1X, formaldehído 6,4%, desnaturizándose 10 min a 65°C. A continuación, se añadieron 2,5 µL de la mezcla de tampón de carga 6X y bromuro de etidio 10 mg/mL en una proporción 30:1 (v/v). El gel se dejó 3 h a 80V, se visualizó y fotografió. Posteriormente, se lavó en SSC 10X en agitación 30 min, y se transfirió por capilaridad a una membrana de Nylon Hybond (Amersham Internacional) empleando un tampón SSC 20X (NaCl 3 M, citrato sódico 300 mM pH 7) según el modelo de transferencia *Northern blot* estándar de Sambrook *et al.* (1989). El RNA se fijó covalentemente a la membrana mediante la irradiación con luz UV con una dosis de 120000 µJ/cm² utilizando un Crosslinker UVC 500 (Hoefer).

4.2 Síntesis de sondas radiactivas

La sonda utilizada para hibridar fue marcada con el kit *Ready-To-Go DNA Labelling Beads (α -dCTP)* (Amersham Biosciences). El marcaje de 25-50 ng de ácidos nucleicos se realizó mediante una reacción de amplificación de la sonda con la incorporación de α -[³²P]-dCTP (10 μ Ci/ μ L). Los cebadores que permitieron la amplificación de la sonda fueron hexanucleótidos que se unieron al azar al RNA/DNA. Éste se desnaturalizó, se añadió a la mezcla del kit y se adicionó la citosina radiactiva. Después de 30 min a 37°C, la muestra marcada se purificó utilizando las columnas de exclusión molecular *MicroSpin Columns* (Amersham Bioscience). Antes de utilizar las columnas se centrifugaron 2 min a 3000 rpm para eliminar el tampón y, posteriormente, se añadió la sonda y se centrifugó 1 min a 3000 rpm; el eluido es la sonda marcada y purificada. A continuación, la sonda marcada se desnaturalizó y se añadió a la membrana prehibridada, 30-60 min con solución de hibridación (Na₃PO₄ 0,5M pH 7,2, SDS 7%, EDTA 1 M, BSA 1%) a 65°C, y se dejó hibridando toda la noche en un horno de hibridación a 65°C, en un tubo en rotación. Las hibridaciones de las membranas de nylon y los lavados se realizaron según los procedimientos descritos por Church y Gilbert (1984). Tras la hibridación se procedió a los lavados de la membrana, que se realizaron siempre en agitación, como sigue: dos lavados con SSC 2X/SDS 0,1%, durante 15 min a 65°C, un lavado con SSC 2X/SDS 0,1% y un lavado con SSC 0.1X/SDS 0,1%, ambos a temperatura ambiente. Las membranas se pusieron en contacto con películas Fuji RX-100 NIF, exponiéndose a -80°C durante el tiempo adecuado. El revelado de las películas autorradiográficas se llevó a cabo en una procesadora automática M35 X-OMAT de Kodak.

4.3 Electroforesis de ácidos nucleicos

En general, las electroforesis se realizaron en geles de agarosa con tampón Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X. Para las electroforesis de RNA se utilizaron geles al 1,2% (p/v) de agarosa y para las de DNA se hicieron al 1% (p/v). A cada gel de 100 mL se añadió 3 μ L de bromuro de etidio 10 mg/mL. Las electroforesis de RNA se corrieron a 80 V y las de DNA a 100 V. Después del tiempo necesario para separar los fragmentos de interés se realizó una fotografía en un transiluminador de UV.

5. MÉTODOS DE TRANSFORMACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS

5.1 Transformación por choque térmico

Las células competentes *E. coli* (*XL1-blue*, *SOLR*, *DH5 α* , *Strataclone*, *BL21-RIL*) se descongelaron en hielo y se añadió una solución con el vector transformante (1 μ L a 1 ng/ μ L). Se incubaron 30 min en hielo y rápidamente se calentaron 2 min a 42°C, se pasaron a hielo y se incubaron 1 h a 37°C. Finalmente, las células se sembraron en placas Petri con medio y antibiótico adecuado para cada caso.

5.2 Transformación por electroporación

La transformación de *E. coli* (*DH10 β*) se llevó a cabo utilizando cubetas de electroporación (Biorad), a las que se añadió la mezcla de las células competentes (40 μ L) con el vector transformante. Las condiciones de electroporación utilizadas fueron 25 μ F de capacitancia, 200 Ω de resistencia y un voltaje de 2,5 V. Se utilizó un aparato Gene Pulser™ (Biorad). Tras el pulso eléctrico (2-3 segundos) se añadió inmediatamente a la cubeta 0,5 mL de medio SOC. Se transfirieron las células transformadas a un tubo y se incubaron 1 h a 37°C en agitación. Finalmente, las células se sembraron en placas Petri con medio LB agar con el antibiótico adecuado.

6. SECUENCIACIÓN DE DNA, BÚSQUEDA DE HOMOLOGÍAS Y ALINEAMIENTOS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

La secuenciación de DNA se llevó a cabo en el servicio de secuenciación del IBMCP. El DNA (100-200 ng) se secuenció utilizando un secuenciador automático modelo ABI PRISM 377 (Perkin-Elmer, Applied Biosystem), siguiendo el protocolo de los didesoxinucleótidos (terminadores) marcados con compuestos fluorescentes (Prober *et al.*, 1987). Para secuenciar clones de la genoteca de Stratagene se utilizaron los cebadores universales M13 dir (GTAAAACGACGGCCAGT) y M13 rev (CAGGAAACAGCTATGAC). Los datos proporcionados por el secuenciador se refinaron mediante el programa Chromas para la resolución de posibles indeterminaciones (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>).

Para asignar una posible función a los ESTs analizados, procedentes de genotecas, se compararon sus secuencias con la colección de unigenes de la base de datos de proteínas no redundante (nr) del NCBI, y con el conjunto completo de proteínas de *Arabidopsis* del MIPS (*Munich Information Center for Protein Sequences*, <ftp://ftpmips.gsf.de/cress/arabiprot>) utilizando el algoritmo BLASTX. Los parámetros utilizados se describen en Forment *et al.* (2005).

7. CONSTRUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA GENOTECA DE FRAGMENTOS DE cDNA DE FLAVEDO DE FRUTOS DE CLEMENULES ALMACENADOS A 2°C

El material utilizado para construir la genoteca de cDNA fue una mezcla equivalente de mRNA de flavedo de frutos almacenados a 2°C durante 7 y 24 d. El esquema de la construcción de la genoteca se muestra en la Figura 6.

7.1 Obtención de cDNA

La genoteca se construyó utilizando el kit de Stratagene *cDNA Synthesis kit*, *ZAP-cDNA Gigapack III Gold Cloning kit* (Fig. 6). La síntesis de cDNA se realizó utilizando un cebador cuya secuencia contenía (GA₁₀), que protegía la secuencia diana del enzima de restricción XhoI, y una secuencia oligo (dT₁₈). Esta diana permitió la inserción dirigida del cDNA en el vector UniZAP XR en el sentido EcoRI-XhoI con respecto al promotor lacZ. La secuencia oligo (dT₁₈) se unió a la cola poli A⁺ del mRNA para sintetizar el cDNA. En la reacción de retrotranscripción se introdujeron nucleótidos 5-metil-dCTP, como medida protectora, para evitar cortes con las digestiones posteriores. El mRNA unido al cDNA se fragmentó con la enzima RNasa H, así estos fragmentos sirvieron de cebadores en la síntesis de la segunda hebra de cDNA. Para asegurar la obtención de hebras completas se añadió la enzima DNA polimerasa Pfu. El producto obtenido fue una hebra de DNA de doble cadena con un extremo romo, un extremo con la cola poli A⁺ y una diana de restricción para el enzima XhoI.

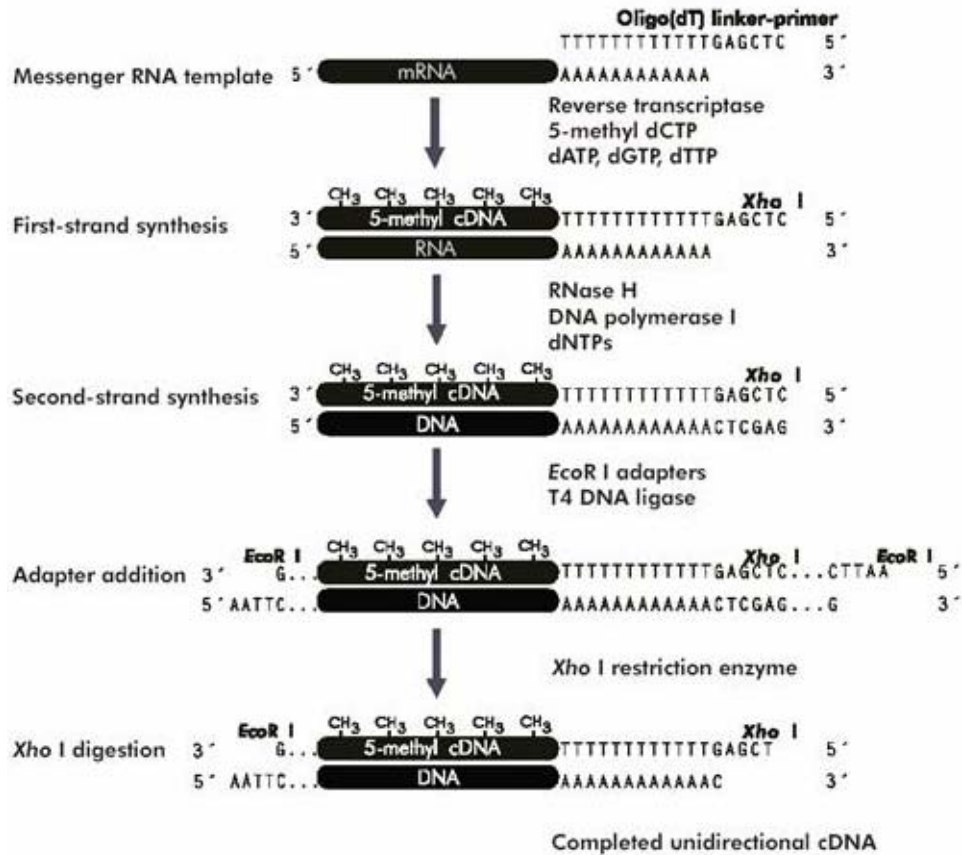


Figura 6. Esquema de la construcción de la genoteca.

7.2 Ligación de adaptadores

Para poder introducir estos fragmentos en un vector de clonación se ligaron unos adaptadores (5'AATTC 3') con extremos romos obteniendo DNA de doble cadena con extremos cohesivos con corte EcoRI. Tras la ligación de los adaptadores, se fosforilaron los extremos y se digirieron con XhoI. Por tanto se consiguieron fragmentos con extremos cohesivos, uno EcoRI y el otro XhoI.

7.3 Ligación al vector y empaquetamiento

Se fraccionó el cDNA por tamaño pasándolo por las columnas *cDNA Size Fractionation Columns* de Invitrogen, y se seleccionaron las fracciones con un tamaño máximo de 2 kb (Fig. 7). La mezcla de fracciones elegidas se ligó al vector Uni-ZAP XR (Stratagene) digerido previamente con EcoRI y XhoI. Este vector combina la elevada eficacia de los vectores lambda y la comodidad de los vectores plasmídicos.

El vector con el inserto se empaquetó en un sistema de elevada eficiencia, *Gigapack III Gold packaging extract*. La genoteca se tituló al sembrar los fagos lambda con inserto junto con células *E. coli* XL1-Blue MRF⁻RecA⁻. Los fagos infectaron las células produciendo calvas en un césped bacteriano. Contando el número de calvas, pfu (unidades formadoras de calvas), se obtuvo el título de la genoteca. A partir de $2,5 \times 10^5$ pfu se amplificó la genoteca sembrando los fagos en 6 placas Petri de 15 cm, de las cuales se recogieron los fagos que se habían replicado en la infección. La genoteca amplificada se almacenó en cloroformo y DMSO (7%) a -80°C.

7.4 Comprobación de tamaños de los insertos mediante amplificación por PCR

Para comprobar el rango real de tamaños de los insertos de la genoteca, estos se amplificaron por PCR, en un termociclador Perkin-Elmer/GenAmp 2400, utilizando como molde los fagos. Tras titular la genoteca, las calvas se recogieron y se les añadió un poco de cloroformo para romper posibles células recogidas junto a los fagos. Los fagos se dejaron un mínimo de 1 h a 4°C en medio SM para que difundieran y así utilizar 10 µL del sobrenadante para la reacción. Las reacciones de amplificación fueron preparadas con los cebadores M13 directo y reverso a una concentración final de 0,25 mM cada uno, dNTPs 0,2 mM, tampón de la DNA polimerasa 1X y 10 unidades de la DNA polimerasa Netzyme (Need), en un volumen final de 50 µL. El programa de amplificación que se siguió tenía un primer ciclo de desnaturalización a 94°C 15 min, 30 ciclos más con un primer paso de desnaturalización de 30 segundos a 94°C, un segundo paso de hibridación de los cebadores de 45 segundos a 52°C, y un tercer paso de extensión de los fragmentos por la polimerasa de 3 min a 72°C. Finalmente, se dejó 10 min a 72°C para que la polimerasa terminara los fragmentos incompletos.

Los productos de PCR obtenidos se visualizaron con luz UV tras una electroforesis en un gel de agarosa al 1% y tampón TAE 1X.

7.5 Escisión masiva *in vivo*

El vector plasmídico pBluescript (Fig. 7) se generó por escisión *in vivo* de los fagos. En primer lugar, se infectaron durante 15 min a 37°C células *E. coli* XL1-Blue MRF⁻RecA⁻ con los fagos de la genoteca y un fago ayudante, porque el vector no sintetiza la proteína f1 y los ayudantes se la proporcionan. Las células *E. coli* SOLR se

añadieron e incubaron 15 min a 37°C y luego se sembraron. En las células SOLR los fagos se comportaron como plásmidos y lo que se obtuvo al sembrarlas fueron colonias y no calvas. Los insertos en el vector interrumpen el gen *lacZ*, esto facilitó la diferenciación de células con inserto (blancas, sin actividad β-galacturonidasa) y las que no lo tenían (azules).

A partir de las colonias SOLR se hicieron extracciones de los plásmidos para secuenciar, desde el extremo 5', las ESTs de los insertos que provenían de mRNAs. Previamente a la extracción del DNA plasmídico se realizaron PCRs de 16 colonias SOLR por placa para comprobar que los plásmidos contenían inserto (Fig. 10). Las PCRs se hicieron del mismo modo que las de los fagos, excepto que se añadió 0,02% de DMSO, para romper las células y facilitar la reacción, y la temperatura de hibridación de los cebadores y el DNA fue de 60°C.

Tras el cultivo se realizaron glicerizados con glicerol al 16% utilizando 200 µL de cada clon y se almacenaron a -80°C.

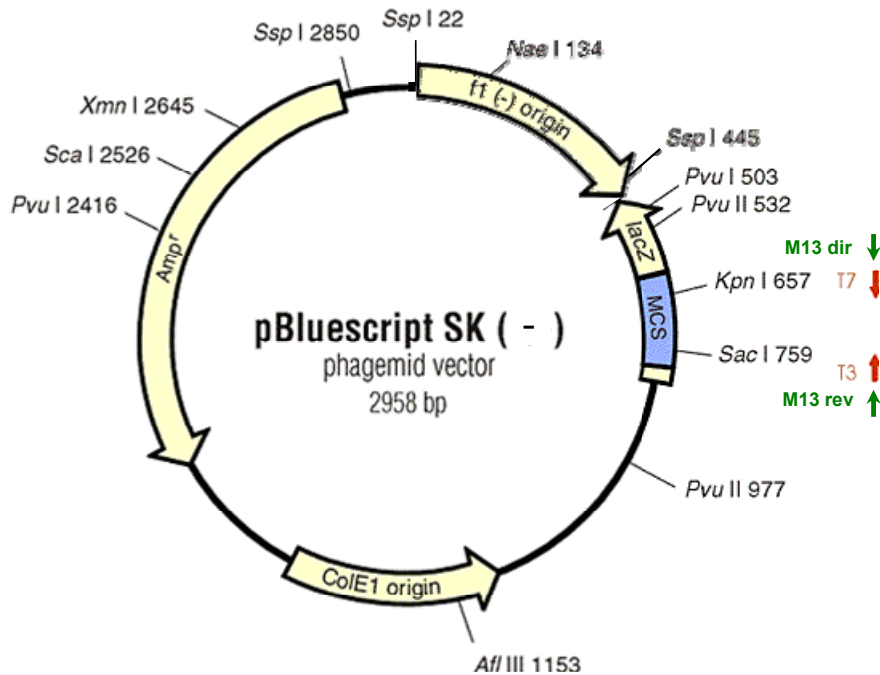


Figura 7. Mapa del vector plasmídico pBluescript SK(-). En la secuencia entre los nucleótidos 601 y 826 se encuentra la región de clonaje múltiple que incluye las secuencias de los cebadores universales M13dir, T7, T3 y M13rev.

8. ANÁLISIS GENÓMICO

8.1 Primera generación de micromatrices del CFGP

La primera generación de micromatrices del CFGP, se imprimió con los productos de PCR de las extracciones plasmídicas de los clones obtenidos hasta mayo del 2003. Las genotecas representadas en esta micromatriz estaban compuestas por diferentes tratamientos, tejidos y variedad de cítricos (Forment *et al.*, 2005). Las micromatrices utilizadas fueron descritas por Forment *et al.* (2005). En el 80,9% de los casos se obtuvo un único producto de PCR, 7,5% tenían una banda predominante, considerada como banda única, 2,1% con banda única débil, de modo que el 92% de los cDNAs depositados en la micromatriz eran de buena calidad. La micromatriz de primera generación contiene 12672 clones y 385 controles. De estos clones 10990 estaban secuenciados (87% de los cDNAs depositados en la micromatriz) y se distribuían en 5403 singletons (secuencias únicas en la base de datos del CFGP) y 1462 contigs (conjunto de secuencias solapantes; en la mayoría de contigs sólo hay dos secuencias solapantes). Por tanto la micromatriz estaba formada por 6865 putativos unigenes (genes distintos).

8.2 Diseño experimental

El diseño experimental utilizado en los experimentos con micromatrices fue el diseño de referencia. Éste consiste en comparar todas las muestras de la serie temporal con una referencia común (Fig. 8). Este tipo de diseño permite, mediante el tratamiento bioinformático adecuado, la posterior comparación entre todas las muestras que utilizan la misma referencia común. La muestra se marca con un fluoróforo y la referencia con otro.

El material utilizado fue el mRNA extraído del flavedo de los frutos CN de la campaña 2003 y los frutos F de las campañas 2000 y 2001. Las muestras de CN utilizadas fueron el tiempo 0, tiempos cortos ($t_c=2+3,5+4,5$ h), 24 h, 9 14, 28, y 56 d a 2°C. Las muestras de F fueron el tiempo 0, 7, 14, 28 y 45 d a 2°C. La referencia en nuestro caso fue una mezcla de los RNAs de la serie temporal de CN entre los tiempos de 0 a 28 d a 2°C (Fig. 8).

Se hicieron 4 réplicas técnicas: en dos réplicas la muestra se marcó con el fluoróforo Cy5 y la referencia con el fluoróforo Cy3, y en las otras dos réplicas las

8.3 Marcaje de muestras de cDNA con fluoróforos

El RNA de flavedo de CN y F se marcó con fluoróforos con el metodo indirecto, basado en el protocolo descrito en TIGR (*The Institute for Genomic Research*, <http://jcvf.org>). Se mezclaron 30 µg de RNA total con oligo dT₂₄-V (6 µg/µL) en un volumen de 18,5 µL y se dejaron 10 min a 70°C para desnaturalizar los ácidos nucleicos con objeto de evitar la formación de estructuras secundarias. Seguidamente, se dejó el tubo a temperatura ambiente 3 min para permitir la unión de los oligonucleótidos y el RNA. Para comenzar la retrotranscripción se añadió 6 µL del tampón 5X del enzima, 3 µL DTT 0,1 M, 0,6 µL de una mezcla de nucleótidos 25 mM (5 µL dATP, dCTP, dGTP 100 mM, 2 µL dTTP 100 mM, 1 µL 5-(3-aminoalil)-2'-deoxiuridina*5' (Sigma) 50 mM), y 400 u de SuperScript III RT (200 u/µL). La reacción se dejó 3 h a 50°C y a continuación se hidrolizó el RNA con 10 µL NaOH 1 M más 10 µL EDTA 0,5 M y se incubó 15 min a 65°C. El cDNA de simple cadena se neutralizó añadiendo HCl 250 µM. La purificación del cDNA se realizó utilizando el kit *Qiaquick PCR Purification kit* (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. El cDNA se eluyó 2 veces al añadir a la columna 30 µL de tampón fosfato de elución (K₃PO₄ 4 mM pH 8,5) incubado 1 min a temperatura ambiente y centrifugado 1 min a 13000 rpm. El cDNA purificado se secó al vacío durante 1 h a 45°C. El cDNA se resuspendió en Na₂CO₃ 0,9 M pH 9 y estos 9 µL sirvieron para resuspender el fluoróforo adecuado que se había preparado anteriormente. Los fluoróforos utilizados fueron NHS-éster-Cy3 (Cy3 Mono –Reactive Dye Pack, Amersham Bioscience), verde y NHS-éster-Cy5 (Cy5 Mono –Reactive Dye Pack, Amersham Bioscience), rojo. La N-hidroxisuccidina indocianina (colorada) se unió a la amina del 5'-(3-aminoalil)-2'-deoxiuridina-5'-trifosfato (aa-UTP) incorporado en la síntesis de cDNA formando un enlace tipo éster, durante la incubación de 1 h a temperatura ambiente en oscuridad. Desde este punto el trabajo se realizó con luz natural tenue, y en ausencia de luz artificial para evitar la degradación de los fluoróforos, que son fotolábiles. En la purificación de la reacción se utilizó de nuevo el kit de Qiagen. Se añadió 35 µL de NaOAc 100 mM pH 5,2, más 250 µL de tampón PB y se transfirió a una columna QIAquick, se centrifugó 1 min a 13000 rpm y se vació el tubo recolector. Luego se lavó tres veces el cDNA marcado con 700, 400 y 300 µL de tampón PE, y se centrifugó una última vez sin tampón para eliminar los restos de etanol 1 min a 13000 rpm. Bajo la columna se puso un tubo eppendorf para recoger el cDNA que se eluyó 2 veces al añadir a la columna 30 µL de tampón EB diluido 5 veces (Tris-HCl 5 mM) incubado 1 min a temperatura ambiente y centrifugado 1 min a 13000 rpm. El cDNA purificado se secó al vacío. El producto seco se resuspendió en 10 µL de agua y se comprobó el marcaje cuantificándolo en el

Nanodrop y en un gel vertical de agarosa 1% y TAE1X en una cubeta BioRadMiniprotein (Bio-Rad Laboratories). Los geles se hicieron así para que fueran suficientemente finos y se visualizara el marcaje en un escáner. Se cargó 1 μL de muestra con 5 μL de glicerol 15% en la electroforesis. Se dejó 20 min a 100V; se cortaron las carreras de dos en dos (parejas de Cy3 y Cy5), se depositaron sobre un portaobjetos de cristal y se secaron sobre una placa térmica a 70-80°C. Una vez deshidratado el gel, se observó el marcaje en un escáner GenePix 4000B (Axon Instruments) con el programa de captura de imágenes y análisis de micromatrices GenePix® 4.1 (Axon Instruments).

Las micromatrices de cDNA fueron hibridadas simultáneamente con sondas derivadas de dos poblaciones de mRNA. El control del proceso se realizó en primer lugar después de la retrotranscripción del cDNA, considerando que entre 10-25 ng/ μL era una cantidad suficiente; en segundo lugar, se cuantificó el cDNA marcado con los fluoróforos antes de la hibridación, estimando 6 pmol/ μL como el umbral mínimo necesario.

8.4 Hibridación de las micromatrices

Las micromatrices se hibridaron siguiendo las instrucciones de Corning para la hibridación de *UltraGaps Coated Slides* (www.corning.com/lifescience). En primer lugar, las micromatrices se prehibridaron incubándolas 30-60 min a 50°C con solución de prehibridación (SSC 3X, SDS 0,1%, BSA 0,1 mg/mL). A continuación, se lavaron en agua e isopropanol durante 15 segundos cada lavado y se secaron centrifugándolas 6 min a 1000 rpm. Después, se prepararon las cámaras de hibridación (Telechem International, Inc.) con unas gotas de agua para aportar humedad a la hibridación y evitar el secado de las muestras marcadas. Las micromatrices y los cubreobjetos (LifterSlip 22x60I, Eire Scientific Company) se limpiaron con aire comprimido y se depositaron en la cámara.

Las muestras marcadas con los dos fluoróforos y el tampón de hibridación (SSC 3X, SDS 0,1%, DNA de esperma de salmón 0,1 mg/mL) se mezclaron obteniendo un volumen final de 100 μL . Esta mezcla se desnaturalizó antes de la hibridación, 5 min a 95°C, se enfrió un poco en hielo antes de depositarla entre la micromatriz y el cubreobjetos repartiéndose por toda la superficie por capilaridad. La hibridación se dejó toda la noche en un baño de agua a 50°C protegido de la luz.

Al día siguiente, se quitó el cubreobjetos sumergiendo los cristales en SSC 2X/SDS 0,1% precalentado a 42°C, y se lavaron en una cubeta diferente con esta solución durante 5 min a 42°C. El segundo lavado fue con SSC 0,1X/SDS 0,1%, 10

min a temperatura ambiente, seguido de varios lavados con SSC 0,1X, 1 min a temperatura ambiente. Por último, se enjuagaron con SSC 0,01X unos segundos y se secaron por centrifugación. Todos los lavados se hicieron en agitación. Finalmente, se escanearon las micromatrices hibridadas.

8.5 Análisis de los resultados de las micromatrices

OBTENCIÓN DE IMÁGENES

Las imágenes fueron escaneadas en un escaner GenePix 4000B (Axon Instruments) con una resolución de 10 μm , el poder del láser al 100% y diferentes valores de ganancia (PMT) ajustando la razón lo más próxima a 1. El programa utilizado fue GenePix® 4.1 (Axon Instruments).

FILTRADOS DE CALIDAD DE LAS HIBRIDACIONES

Previamente al análisis, los cDNAs depositados en la micromatriz se ajustaron a una gradilla que contenía la posición e información de cada cDNA a la imagen obtenida tras la hibridación. Una vez abiertas las imágenes para ambos canales se procedió al ajuste manual de la gradilla. El programa GenePix® 4.1 marca como inválidos los cDNAs donde la intensidad es menor que el ruido de fondo, pero manualmente también se pueden marcar aquellos que estén en una zona con una mancha o tengan una marca anormal (por ejemplo, forma de donut). Con ello se obtienen los resultados, una tabla de datos de las intensidades a cada longitud de onda (Cy5, rojo $\lambda 635\text{nm}$; Cy3, verde $\lambda 532\text{nm}$) y la razón de intensidades asociada a cada cDNA depositado en la micromatriz.

Antes de analizar exhaustivamente los datos, se filtraron y eliminaron aquellos cuya intensidad no era superior al doble del ruido de fondo en uno de los dos canales y, aquellos cuyo producto de PCR tenía bandas múltiples.

El programa GenePix® 4.1 permite realizar un control de calidad de cada micromatriz mediante un análisis estadístico de los datos y el cálculo de diversos parámetros que permiten estimar la calidad de los datos obtenidos en cada micromatriz.

NORMALIZACIÓN DE LOS DATOS DE EXPRESIÓN

La normalización significa ajustar los datos de las micromatrices por los efectos debidos a la variación técnica más que las diferencias biológicas entre muestras de RNA o entre las sondas impresas. Pueden aparecer oscilaciones entre los fluoróforos

rojo y verde debido a diferencias entre la eficiencia de marcado o las propiedades del escaneado. Una observación común es que los valores del \log_2 ratio (ratio=intensidad en canal1/intensidad en canal 2) tienen una dependencia sistemática con la intensidad, lo más común es una desviación de cero para los valores con baja intensidad. Los dos fluoróforos no emiten la misma luz por molécula a diferentes concentraciones, esto es debido al *quenching*: un fenómeno donde las moléculas próximas reabsorben la luz de otras, disminuyendo la señal. La cantidad de reabsorción cambia con la concentración diferencial de los dos fluoróforos. Este artefacto se manifiesta de modo que genes poco expresados aparecen sobreexpresados en el canal rojo y genes moderadamente expresados aparecen sobreexpresados en el canal verde.

Si R y G son las intensidades corregidas por el fondo para cada punto (R=rojo, G=verde), la normalización se aplica normalmente a la expresión del logaritmo de la razón $M = \log_2 R - \log_2 G$. El logaritmo de la intensidad de cada punto es $A = (\log_2 R + \log_2 G)/2$. Una medida del brillo del punto total, valores negativos de R o G producirán valores perdidos para M y A y los puntos correspondientes serán excluidos de los análisis siguientes incluida la normalización. La frecuencia de los valores negativos depende mucho del programa de análisis de imagen y el método de la estimación del fondo (Smith y Speed, 2003).

Normalización lineal

En primer lugar, se realizó una normalización lineal mediante GenePix® 4.1. Esta normalización consiste en igualar a 1 la razón entre los fluoróforos en cada cDNA; en nuestro caso no afectaba considerablemente a los datos porque al escanear la imagen se modificaba la ganancia de cada canal (635nm, 532nm) para obtener imágenes con una razón lo más cercana a 1.

GenePix utiliza la media del fondo que a menudo puede resultar un 30% o más de valores negativos. La pérdida de información que se produce por la omisión de estos puntos del análisis normalmente no es grande porque los puntos negativos para cada R o G son usualmente demasiado débiles para mostrar una buena evidencia de la diferencia de expresión.

Normalización dependiente de la intensidad con lowess

El análisis continuó pasando los datos a otro programa, Acuity® 4.0 (Axon Instruments). Acuity® 4.0 es un software que permite analizar, visualizar e integrar los datos de hibridación y secuencia. En este programa, los datos se normalizaron no linealmente por el método Lowess para evitar sesgos en función de los rangos de intensidad

ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES

El análisis de componentes principales (PCA) se utilizó para validar la reproducibilidad de las micromatrices entre las 4 réplicas. Además, el PCA fue utilizado para identificar la variabilidad en la expresión génica global (Scholz *et al.*, 2005; Kaplan *et al.*, 2007), para simplificar y definir asociaciones entre diferentes etapas del almacenamiento en frío y los datos transcriptómicos globales. Este análisis se realizó con los datos brutos y con los genes estadísticamente diferenciales. Las condiciones en las que se realizó el PCA fueron las que venían por defecto en Acuity.

IDENTIFICACIÓN DE GENES EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE

Previamente a la aplicación de cada test estadístico, para identificar genes expresados diferencialmente, se aplicaron unos filtros de calidad. En primer lugar, se filtraron por el valor de la intensidad del punto, eliminándose los que la intensidad fuera menos del doble que el valor de ruido de fondo y los que coincidían con una mancha o un fallo en el cristal. En segundo lugar, se aplicó un filtro seleccionando los clones que tenían datos válidos en al menos un 80% de las micromatrices de la serie temporal. Por último, se excluyeron los clones cuya PCR, previa a la impresión de la micromatriz, no presentaba una banda única y bien definida.

Análisis estadístico de los datos

Los análisis estadísticos posteriores a la normalización se realizaron con el programa SAM, *significance microarray analysis* (Tusher *et al.*, 2001). SAM es un método para identificar genes en las micromatrices con un cambio de expresión estadísticamente significativo, desarrollado en el contexto de un experimento biológico actual. SAM resulta ser superior a otros métodos convencionales para analizar micromatrices, ajusta umbrales asimétricos a los grupos de genes inducidos y reprimidos, en cambio la alternativa del test de la T de Student impone límites simétricos horizontales. Los límites asimétricos son preferibles porque permiten que los genes inducidos y reprimidos se comporten diferentemente según el experimento biológico. Otra ventaja de este método es que para niveles de expresión elevados, pequeños cambios en la expresión pueden ser reales, pero esos cambios pueden ser refutados por el método de magnitud de cambio y no por SAM.

El método de Benjamini y Hochberg (1995) asume tests independientes y garantiza el límite superior del FDR (*false discovery rate*, falsos positivos) por un procedimiento por encima y debajo aplicado a los valores individuales de p-valor. SAM proporciona una estimación del FDR para cada valor del parámetro variable Δ . En todos los análisis de este trabajo se utilizó el Δ para que FDR fuese del 5%.

SAM tiene varios análisis dependiendo de la naturaleza de las muestras, los análisis realizados en este trabajo fueron los siguientes:

- SAM cuantitativo, diseñado para identificar genes de respuesta a dosis.
- SAM dos clases no pareado, SAM 2clases compara dos clases independientes.
- SAM multiclase, SAM mclase, destaca los clones que en un punto de la serie temporal tienen una expresión diferente al resto.
- SAM serie temporal, SAM *time course*, igual que el SAM cuantitativo pero incluyendo patrones de expresión complejos.

Análisis de agrupamiento de los datos

Los genes estadísticamente diferenciales se agruparon en diferentes patrones de expresión con el método de agrupamiento no jerárquico SOM (*self-organizing map* o mapa autoorganizativo). SOM es una técnica para visualizar datos reduciendo las dimensiones de los datos por autoorganización con una red neuronal realizando un mapa de 1 ó 2 dimensiones que traza similitudes de los datos por agrupamiento de datos similares juntos. Es decir, SOM reduce dimensiones y manifiesta similitudes.

Al igual que el PCA, los agrupamientos por SOM se realizaron antes y después de SAM para distinguir cómo se comportaban los genes en el proceso del estrés. Estos agrupamientos se realizaron con todas las micromatrices, pero de manera rutinaria se calculó la media de las intensidades de las 4 réplicas de cada tiempo y se dividieron todas las micromatrices entre la media de las réplicas del tiempo cero, de este modo se normalizaron los datos respecto al control, este hecho facilitó la observación de inducciones y represiones.

La información de los agrupamientos no sólo permite la identificación de relaciones de patrones de expresión de diferentes genes sino también muestra patrones de expresión de genes individuales sobre un número de experimentos diferentes. También se pueden encontrar grupos de genes con un patrón de expresión deseado (Nikkilä *et al.*, 2002).

ANÁLISIS FUNCIONAL DE LOS DATOS

Las sondas se trataron, por una parte, como unigenes cítricos, sondas que forman parte de un gen en la base de datos CFGP; y por otro lado, se colapsaron aquellos que compartían la máxima similitud con el mismo gen de *Arabidopsis*.

Utilización del gen de *Arabidopsis* con mayor similitud

Una de las ventajas del estudio de la expresión global es que puede proporcionar una visión comprensiva de la regulación transcripcional de los genes involucrados en todos los aspectos de la fisiología de las plantas. Para ello se realizó una clasificación funcional en base a la función de la proteína de *Arabidopsis* más

similar de cada unigen ($e\text{-valor} < 10^{-5}$) para poder utilizar los programas de *Arabidopsis* que clasifican los genes y los distribuyen en rutas metabólicas.

En algunos casos la clasificación de unigenes de cítricos no coincidía con los posibles unigenes de *Arabidopsis*, es decir, había unigenes de cítricos formados por clones que tenían la máxima similitud con diferentes genes de *Arabidopsis*. Así surgió el concepto de **uniAt**: conjunto de clones que comparten la máxima similitud con un gen de *Arabidopsis* independientemente que formen un unigen en cítricos o no. A los clones cítricos se les asignó el código AGI (*Arabidopsis Gene Identifier*) del gen con máxima similitud según el BLAST frente la base de datos UniRef90 (<http://www.ebi.ac.uk/uniref/>), en caso de ser un gen de *Arabidopsis*, o según el BLAST frente al TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*, <http://www.arabidopsis.org/>). Los programas utilizados para el análisis de los uniAt fueron FatiGO (<http://babelomics.bioinfo.cipf.es/cgi-bin/toolos.cgi>, Al-Shahrour *et al.* 2004, 2005, 2006) y MapMan (<http://gabi.rzpd.de/projects/MapMan/>, Thimm *et al.*, 2004; Usadel *et al.*, 2005).

En FatiGO los genes se clasifican en 9 niveles de categorías funcionales, tanto a nivel de proceso biológico como función molecular o componente celular, de niveles más generales hacia niveles más específicos. Cuanto más específico sea el nivel, más informativo, pero no todos los genes pueden ser clasificados hasta los niveles mínimos.

En MapMan los genes se clasifican por rutas metabólicas, y mapas generales; y se comprobó estadísticamente qué proceso o ruta estaba más o menos inducido o reprimido respecto al resto en cada tiempo de la serie temporal. El test estadístico que utiliza MapMan es el *Wilcoxon Rank Sum Test* (Wilcoxon, 1945), este test predice las categorías que exhiben un comportamiento diferente en términos de perfil de expresión comparado con el resto de categorías en un tiempo determinado. Además, se puede obtener el p-valor con la corrección de Benjamini-Hochberg. Este test es una alternativa no paramétrica del test de la T de dos muestras basado únicamente en el orden en el cual las observaciones de las dos muestras caen.

CAPÍTULO 1:

ELABORACIÓN DE UNA GENOTECA QUE INCLUYA CLONES DE RESPUESTA/ADAPTACIÓN MOLECULAR DE MANDARINAS A BAJAS TEMPERATURAS

INTRODUCCIÓN

Las genotecas de cDNA son una fuente importante de información ya que representan el transcriptoma de un organismo en una o varias condiciones definidas (tejido, estadio de desarrollo, condición ambiental). La secuenciación al azar de un gran número de clones de esas genotecas genera una colección de ESTs. El análisis de ESTs puede ser utilizado para: (1) la identificación de nuevos genes y la asignación de función génica con independencia que se trate de especies cuyo genoma se haya o no secuenciado completamente, como es el caso de algunos cultivos de importancia agronómica (Shoemaker *et al.*, 2002; Umezawa *et al.*, 2008); (2) pueden suponer un buen punto de partida para el inicio de proyectos de secuenciación de nuevos genomas (Alba *et al.*, 2004); (3) la confirmación de las regiones codificantes en secuencias genómicas; (4) el estudio de relaciones filogenéticas; (5) la estimación de los niveles de expresión de los genes de los que proceden; (6) y el posterior desarrollo de micromatrices de DNA. En diferentes plantas se han podido analizar clusters de cDNAs, la predicción de proteínas y su expresión diferencial, a partir de colecciones de ESTs de genotecas de diferentes órganos y estadios de desarrollo (Journet *et al.*, 2002; Van der Hoeven *et al.*, 2002; Fei *et al.*, 2004; Ouyang *et al.*, 2007), permitiendo así una primera aproximación al estudio de las rutas bioquímicas que operan en cada tejido y condición específicas.

Las colecciones de ESTs constituyen también una valiosa herramienta para el desarrollo de marcadores moleculares, como los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, *single-nucleotide polymorphism*) y las repeticiones de secuencias simples (SSR, *simple sequence repeats*) cuando se aplica por ejemplo a varias especies silvestres relacionadas. Ejemplos de esas aplicaciones se pueden observar en manzano (Newcomb *et al.*, 2006), en melón (Gonzalez-Ibeas *et al.*, 2007), y en cítricos (Luro *et al.*, 2008). Rudd *et al.* (2005) demostraron la viabilidad de la predicción de marcadores moleculares (SSRs, SNPs) en más de 50 especies vegetales a partir de ESTs (PlantMarkers, <http://markers.btk.fi/>). La mayor ventaja de los marcadores funcionales sobre otros marcadores generados a partir de regiones anónimas del genoma es que pueden estar completamente ligados al rasgo de interés en el caso que afecten al gen responsable de dicho carácter (Varshney *et al.*, 2005).

Una colección de ESTs puede aportar información sobre la expresión génica. El número de ESTs de un gen particular puede reflejar la abundancia del correspondiente cDNA en la genoteca y del nivel de mRNA en el tejido del que

procede, en cuyo caso se denomina *Northern* virtual o *in silico* (Ewing *et al.*, 1999; Ohlrogge y Benning, 2000). Una ventaja del *Northern* virtual es que se trata (al igual que otros análisis en los que se interroga gran parte del genoma) de una aproximación no sesgada (sin hipótesis previa) resultando del análisis de cientos de genes, lo cual permite entender mejor los procesos biológicos dada su visión global (Rafalski *et al.*, 1998; Bevan *et al.*, 1998; Lim *et al.*, 1996; Sterky *et al.*, 1998). De este modo ha sido posible detectar genes de respuesta a determinados estímulos, que todavía no se habían identificado (Chen *et al.*, 2007; Adomas *et al.*, 2006). Esta aplicación puede ser perfeccionada con el uso de micromatrices de DNA (Brown y Botsein, 1999) y otros métodos como SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*, Velculescu *et al.*, 1995) que permiten analizar los niveles de expresión de un elevado número de transcritos con una mayor fiabilidad.

Los análisis de *Northern* virtual se apoyan en el desarrollo de métodos estadísticos robustos que permiten valorar la fiabilidad de la información obtenida (Audic y Claverie, 1997; Romualdi *et al.*, 2003). En plantas, se han identificado genes diferencialmente expresados en distintos tejidos mediante el análisis de colecciones de ESTs en arroz (Ewing *et al.*, 1999), patata (Ronning *et al.*, 2003), trigo (Ogihara *et al.*, 2003) y cebada (Zhang *et al.*, 2004a). Asimismo, esta metodología se ha desarrollado entre otros, para la identificación de genes relacionados con la maduración del fruto en tomate (Fei *et al.*, 2004) y en manzano (Park *et al.*, 2006) y con el desarrollo de la flor y del fruto en vid (da Silva *et al.*, 2005). Además, la caracterización del gran número actual de colecciones de ESTs disponibles para multitud de plantas hace posible la comparación entre diferentes especies, o variedades como en el caso de cítricos (Baig *et al.*, 2009).

Los genes mejor representados en una colección de ESTs serán aquellos que sean más abundantes en el tejido y condiciones de donde deriva la genoteca, y los genes con bajos niveles de expresión estarán infrarrepresentados. La genoteca se puede normalizar o sustraer, enriquecer la cantidad de cDNAs procedentes de mRNAs poco abundantes y eliminar la redundancia de ESTs (Bonaldo *et al.*, 1996), lo que permite incrementar la eficacia de la secuenciación en identificar nuevos transcritos. Así se aumenta la cantidad de información sobre los mecanismos moleculares subyacentes en cada caso de estudio (Yang *et al.*, 2009a). Sin embargo, este proceso de enriquecimiento, altera las proporciones iniciales de transcritos, por lo que impide el análisis *Northern* virtual puesto que ya no se pueden estimar los niveles de los mRNAs presentes en cada situación.

La calidad de la información obtenida a través de las genotecas y sus ESTs, depende de los recursos bioinformáticos (Dong *et al.*, 2005). A raíz del CFGP se han

desarrollado nuevas herramientas bioinformáticas de gestión de datos de ESTs como el Blast2GO (Conesa *et al.*, 2005) y EST2uni (Forment *et al.*, 2008).

Una desventaja de las genotecas clásicas es la cantidad de cDNAs truncados en el extremo 5', y la secuenciación de ESTs puede llevar a algunos errores de anotación. Estos dos puntos se corrigen con la construcción de genotecas de cDNAs completos, en las que se protege la caperuza antes de la retrotranscripción. De esta manera, también se facilita la caracterización génica posterior rescatando un clon de la genoteca con el cDNA completo.

Si se utilizan vectores binarios adecuados, es posible clonar los cDNAs de longitud completa para ensayar su función mediante la transformación directa de plantas. Las transformaciones pueden ser en la misma planta de origen (LeClere y Bartel, 2001; Ichikawa *et al.*, 2006; Nakamura *et al.* 2007; Lein *et al.*, 2008) o transformaciones heterólogas de cDNAs de genotecas de *Thellungiella halophila* (Ni *et al.*, 2007), tomate (Wang *et al.*, 2009), o cítricos (Marques *et al.*, 2009), introducidos en plantas de *Arabidopsis* para la caracterización génica.

A la espera de la secuenciación del genoma completo del doble haploide de Clementino (en curso), la información de secuencias disponible en cítricos procede básicamente de los ESTs. Los ESTs son pequeñas secuencias de mRNA obtenidas de varios tipos, tejidos y tratamientos. El laboratorio de Timothy Close ha ensamblado estas secuencias de *Citrus* y *Poncirus* en una base de datos llamada HarvEST *Citrus* (<http://harvest.ucr.edu/>). Esta base de datos está constituida por genotecas generadas por varias instituciones, entre las que se incluye la Universidad de California, Riverside (Timothy Close & Mikeal Roose), la Universidad de California, Davis (Abhaya Dandekar), y el USDA (*United States Department of Agriculture*, Michael Bausher, Jose Chaparro, Greg McCollum). Además de las secuencias de estas genotecas, HarvEST *Citrus* también contiene secuencias que proceden de la base de datos del GenBank o dbEST. En GenBank se encuentran numerosas ESTs depositadas por el consorcio CFGP al que pertenecemos, la Universidad Politécnica de Valencia (IBMCP), y por el Laboratorio de Biotecnología y el equipo de análisis genómico de cítricos de Japón. En HarvEST hay ESTs de organismos como *Citrus sinensis* (naranja dulce), *Citrus jambhiri* (limón áspero), y *Citrus unshiu* (satsuma o mandarina) obtenidos de una amplia variedad de tejidos, estadios de desarrollo y tejidos vegetales tras la aplicación de diferentes tratamientos.

Dada la importancia del cultivo de los frutos cítricos, la iniciativa de obtener información genómica de los mismos surgió en distintos laboratorios, y propició la formación del Consorcio Internacional de Genómica de Cítricos en el que se incluyen

participantes de Australia, Brasil, China, Francia, Israel, Italia, Japón, EEUU y España (<http://www.citrusgenome.ucr.edu>) (Tabla 2).

TABLA 2. Resumen de las colecciones de ESTs de cítricos depositadas en HarVEST con fecha el 17 de noviembre de 2004

Fuente	Genotecas	Clones	Secuencias	%3'
Genoteca	Organismo	Tejido	Estadio	Total ESTs
USDA en Ft. Pierce (Bausher y Shatters)	7	17,705	17,705	1%
FLAVEDO3	<i>Citrus x paradisi</i>	flavado	2-5 g fruto	308
USDA01	<i>Citrus sinensis</i>	plántula	50 DAG	6,050
USDA02	<i>Poncirus trifoliata</i>	ovario	inmaduro	3,288
USDA03	<i>Citrus sinensis</i>	ovario	inmaduro	6,426
USDA04	<i>Citrus sinensis</i>	hoja y peciolo	brotes	963
USDA05	<i>Citrus jambhiri</i>	raíz	plántula 50 mm	955
USDA06	<i>Citrus jambhiri</i>	hoja		23
Burns, JK	3	460	460	2%
VALE01	<i>Citrus sinensis</i>	caliz zona absc	maduro	114
VALE02	<i>Citrus sinensis</i>	limbo	maduro	156
VALE03	<i>Citrus sinensis</i>	flavado	maduro	190
UC Riverside (Close y Roose)	11	36,607	66,830	49%
UCRCR01	<i>Citrus reticulata</i>	albedo	separación flavado	3,653
UCRCS01	<i>Citrus sinensis</i>	flavado/albedo	maduro	3,716
UCRCS02	<i>Citrus sinensis</i>	ovario	antesis	3,231
UCRCS03	<i>Citrus sinensis</i>	tallo	meristemo	3,500
UCRCS04	<i>Citrus sinensis</i>	flor	yema	6,784
UCRCS05	<i>Citrus sinensis</i>	pulpa	madura	3,373
UCRCS06	<i>Citrus sinensis</i>	flavado/albedo	maduro	3,484
UCRCS07	<i>Citrus sinensis</i>	flavado	fruto joven	3,481
UCRCS08	<i>Citrus sinensis</i>	callo	callo	17,256
UCRCS09	<i>Citrus sinensis</i>	semilla	10-65 mm	7,308
UCRPT01	<i>Poncirus trifoliata</i>	corteza	10-30 cm tallos	11,021
UC Davis (Dandekar)	9	9,971	9,971	8%
UCDCS01	<i>Citrus sinensis</i>	flavado	maduro	822
UCDCS02	<i>Citrus sinensis</i>	albedo	maduro	911
UCDCS03	<i>Citrus sinensis</i>	sacos de jugo	38 DAFB	1,405
UCDCS04	<i>Citrus sinensis</i>	piel	38 DAFB	1,304
UCDCS05	<i>Citrus sinensis</i>	fruto	24 DAFB	1,417
UCDCS06	<i>Citrus sinensis</i>	flavado	80 DAFB	1,090
UCDCS07	<i>Citrus sinensis</i>	albedo	80 DAFB	969
UCDCS08	<i>Citrus sinensis</i>	albedo	165 DAFB	1,026
UCDCS09	<i>Citrus sinensis</i>	flavado	165 DAFB	1,021
Kanellis, AK	1	54	54	6%
FLAVEDO2	<i>Citrus sinensis</i>	flavado		54
McCollum, TG	1	308	308	2%
Sanchez-Ballesta, MT	1	72	72	97%
FLAVEDO4	<i>Citrus reticulata</i>	flavado		72
Omura, Mitsuo	5	2,521	2,521	2%
ALBEDO2	<i>Citrus unshiu</i>	sacos de jugo pulpa	maturación	651
ALBEDO3	<i>Citrus unshiu</i>	albedo	separación flavado	608
ALBEDO4	<i>Citrus unshiu</i>	sacos de jugo pulpa	devesarrollando	794
OVARY1	<i>Citrus unshiu</i>	ovario	antesis	383
SEED01	<i>Citrus sinensis</i>	semilla	globular temprano	85
UC Riverside (Walling)	1	21	21	0%
UCRAB01	<i>Citrus sinensis</i>	yema axilar de hoja	árbol 18 años	21
subtotals		37	67,647	34,191

Durante la realización de este trabajo, han surgido numerosas publicaciones de genotecas y ESTs de diferentes variedades de cítricos, tejidos y condiciones, como el de naranja Valencia (Wu y Bruns, 2003), pomelo (Shatters *et al.*, 2004); *Poncirus trifoliata* (Sahin-Cevik y Moore, 2006; Zhang *et al.*, 2008), naranja navel Fengjie (Gao *et al.*, 2007), y *Citrus sinensis* (Berger *et al.*, 2007). Todos con un objetivo común de secuenciar parte del genoma de cítricos y ampliar el conocimiento transcriptómico de los mismos.

Otros trabajos similares en *Citrus sinensis* se han centrado en una ruta concreta como componentes de señalización (Mehta *et al.*, 2007), expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo (Peroni *et al.*, 2007), y metabolismo de fitohormonas (Quecini *et al.*, 2007).

Este trabajo ha seguido una aproximación global similar a la descrita por Ablett *et al.* (2000) *in vivo*, Bausher *et al.* (2003) con plántulas de *Citrus sinensis*, Wang *et al.* (2007) en hormigas, o Douglas *et al.* (2007) en fletán. Se ha basado en la construcción de genotecas relacionadas con la respuesta al frío de los frutos cítricos, la descripción de los datos de la genoteca, estimación de la representación funcional en base a la clasificación de GO, distribución de ESTs, con objeto de (1) contribuir con secuencias nuevas, (2) tener una estimación de posibles genes relevantes en el proceso, (3) añadir secuencias para el diseño de la micromatriz, etc. Consiguiendo los objetivos generales de las genotecas que ya se han mencionado como son la identificación de nuevos genes, el inicio de la secuenciación del genoma, y confirmación de regiones codificantes en el genoma, la genoteca de frutos almacenados en frío permite una aproximación al estudio los mecanismos de respuesta del flavedo de frutos de mandarinas almacenadas en frío.

Aunque el objetivo principal de la construcción de la genoteca de esta Tesis Doctoral fuera la obtención de un buen número de cDNAs para su impresión en una micromatriz, también se identificaron genes específicos de respuesta al frío del flavedo de frutos CN y se asignaron los unigenes a categorías funcionales de GO, de las que se cuantificó su representación entre los ESTs de la genoteca. Se trató del primer trabajo de transcriptómica a gran escala en flavedo. Relacionado con ello está el análisis transcriptómico *in silico* de flavedo de *Citrus sinensis* (Berger *et al.*, 2007). Tanto en nuestro estudio como en el de Berger se identificaron los candidatos más probables de genes flavedo-específicos, indicando perfiles de expresión complejos en el flavedo de frutos en desarrollo y proporcionando una base donde seguir explorando.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. OBTENCIÓN DE LA GENOTECA

Se construyó una genoteca de cDNA con el objetivo de desarrollar herramientas genómicas adecuadas para el estudio de las respuestas tempranas y tardías del flavedo del fruto al estrés causado por exposición a bajas temperaturas. El material de partida utilizado para construir la genoteca de cDNA fue una mezcla equivalente (igual cantidad en ug) de mRNA de flavedo de frutos de CN almacenados a 2°C durante 7 y 24 d. La calidad y cantidad de mRNA extraído se comprobó mediante *Northern blot*, datos no mostrados. La genoteca resultante se llamó FlavFr1 (Flavedo Frío 1ª genoteca). A partir de la genoteca se aislaron, secuenciaron y analizaron un número de clones (Fig. 9), y éstos fueron empleados para la construcción de micromatrices de DNA junto con ESTs procedentes de otras genotecas. Finalmente, las micromatrices se utilizaron para análisis transcriptómicos dirigidos al estudio de los efectos del frío sobre el flavedo de los frutos (Fig. 9).

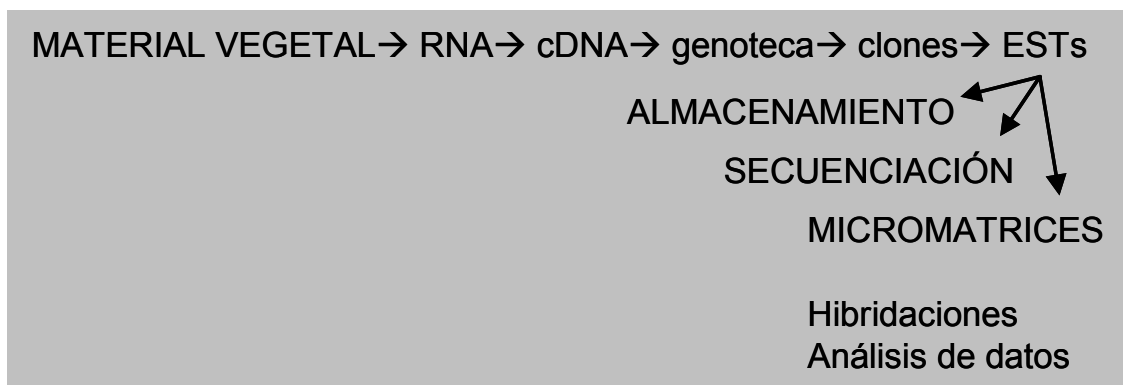


Figura 9. Esquema seguido por el CFGP y en la presente tesis Doctoral para la construcción y aplicación de herramientas genómicas en cítricos.

El rendimiento medio de las extracciones de RNA de flavedo fue de 37,5 µg RNA/g tejido fresco. A partir de 200 µg de RNA total de flavedo, se purificó RNA poliA⁺, con un rendimiento del 1%. Se sintetizaron cDNAs a partir del RNA poliA⁺, utilizando el kit de Stratagene *cDNA Synthesis kit*, *ZAP-cDNA Gigapack III Gold Cloning kit*, tal y como se describe en Materiales y Métodos. En el fraccionamiento del cDNA se seleccionaron las fracciones con un tamaño máximo de 2 kb.

Los cDNAs se incluyeron en fagos y la genoteca de fagos se tituló utilizando células *E. coli* XL1-Blue MRF⁻RecA⁻ y el resultado fue de 5×10^5 pfu (unidades formadoras de calvas) totales. Para evitar la posible inestabilidad en la genoteca primaria y disponer de una mayor cantidad, se amplificó la genoteca de fagos a partir de $2,5 \times 10^5$ pfu de la genoteca primaria, obteniendo un título de la genoteca amplificada de 7×10^5 pfu/ μL , con un total de aproximadamente $2,8 \times 10^{10}$ pfu. Según la fórmula de Clarke-Carbon, el umbral que debe contener una genoteca de cDNA para poder aislar un clon derivado de mRNA de baja abundancia con un 99% de probabilidad es de $3,3 \times 10^5$ clones independientes (Sambrook *et al.*, 1989). Por tanto, se puede decir que la genoteca FlavFr1 es representativa de la actividad transcriptional en los estadios de frutos almacenados en frío de los que fue obtenida.

La calidad de la genoteca se evaluó analizando por PCR el tamaño de los insertos para una selección al azar de clones de la genoteca. El rango de tamaños de los fragmentos de los productos de PCRs de los fagos recogidos en la titulación fue de 500-1500 pb (Fig. 10). Teniendo en cuenta que el tamaño medio de los transcritos de plantas es de 1500 pb (Alexandrov *et al.*, 2006) el rango obtenido es adecuado.

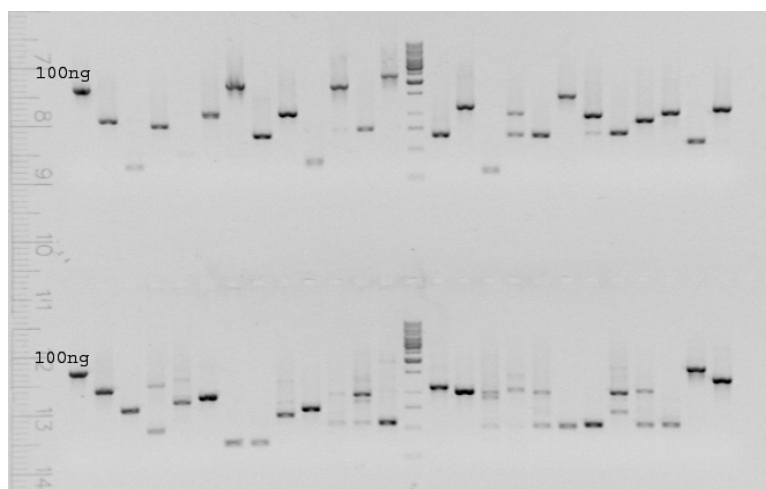


Figura 10. Electroforesis de los productos de PCR de extracciones de DNA plasmídico de 48 clones de la genoteca FlavFr1 selecciones al azar.

A partir de la genoteca amplificada se transformaron células de *E. coli* SOLR y las colonias aisladas de SOLR se utilizaron para extraer los plásmidos, mantener una reserva del clon y secuenciar los ESTs de los insertos. El rendimiento medio de las minipreps fue aproximadamente de 50 ng DNA plasmídico/ μL en cada pocillo/clon, lo que representa una cantidad suficiente para secuenciar, conservar una alícuota de cada clon y amplificar el cDNA por PCR para su inclusión en la micromatriz.

2. RESUMEN DE LA GENOTECA OBTENIDA

El rango de longitud de las ESTs fue de 500 a 1500 pb, con una media aproximada de 1000 pb. El 75% de las ESTs mostraron más de 750 pb. El número de clones secuenciados fue de 2361, de los cuales 2067 se consideraron de alta calidad al tener más de 100 pb de longitud de secuencia leída (Tabla 3). La longitud media de las lecturas de los fragmentos secuenciados fue de 531,1 pb, con una desviación estándar (sd) de 168,3 pb. Esta longitud es relativamente superior a los valores obtenidos en otros proyectos de secuenciación de ESTs como el de álamo con 470 pb (Sterky *et al.*, 2004) o el de manzano con 468 pb (Newcomb *et al.*, 2006), y similar a los 511 pb de *Citrus sinensis* (Bausher *et al.*, 2003). Ello puede ser debido, entre otras razones, a la mejora de la tecnología de secuenciación.

A menudo, para un mismo gen se obtuvieron diferentes ESTs parcialmente solapantes en secuencia, lo que permitió obtener una secuencia teórica mayor o incluso completa de la secuencia codificante (**contig** teórico). El ensamblaje de las secuencias solapantes de los ESTs pertenecientes al mismo gen en un contig se hizo con *Phrap* (<http://www.phrap.org>) (Forment *et al.*, 2005). El ensamblaje de las secuencias de FlavFr1 mostró que el total de 2067 ESTs se distribuyeron en 352 ESTs correspondientes a secuencias no solapantes o singletons, y 1715 ESTs que solapaban con otras ESTs de la misma genoteca, o de la colección de CFGP (Tabla 3). En definitiva, se obtuvieron 1328 unigenes distribuidos en 352 singletons (unigenes constituidos por una sola secuencia) y 976 contigs (unigenes compuestos por más de

TABLA 3. Características de la genoteca FlavFr1

Clones Aislados	2592
Clones Secuenciados	2361
ESTs de buena calidad	2067
ESTs únicas, Singletons	352
ESTs solapantes con otras ESTs	1715
Contigo	976
Unigenes	2067
Redundancia ⁽¹⁾	35%
Novedad ⁽²⁾	46%
Unigenes específicos de la genoteca (septiembre 2007)	387

⁽¹⁾ Redundancia es el porcentaje de ESTs que corresponden a un mRNA ya representado por otro EST en todo el proyecto.

$$\text{Redundancia} = (1 - (\text{unigenes}/\text{ESTs})) \times 100$$

⁽²⁾ Novedad es el porcentaje de unigenes específicos que aporta esta genoteca.

$$\text{Novedad} = (\text{unigenes específicos}/\text{unigenes}) \times 100$$

constituidos por una sola secuencia) y 976 contigs (unigenes compuestos por más de una secuencia).

El porcentaje de ESTs que corresponden a un mRNA ya representado por otro EST en la base de datos se define como **redundancia**. En la genoteca FlavFr1 la redundancia fue del 35% (Tabla 3).

La **novedad** es el porcentaje de unigenes específicos que aporta una genoteca, por tanto, es un dato que también es variable. En diciembre de 2004, la novedad de FlavFr1 era del 46% y en septiembre de 2007 de sólo un 29% (Tabla 3). La novedad se puede considerar una estimación de la capacidad de cada genoteca para aportar clones nuevos a la colección.

Los **unigenes específicos de una genoteca** (que normalmente representa a su vez un estadio de desarrollo o tejido concreto) son aquellos que sólo están integrados por clones procedentes de esa genoteca. Como es lógico, la cantidad de unigenes específicos de FlavFr1 disminuye a medida que aumenta el número de clones de la base de datos del CFGP. De este modo, en diciembre de 2004, la cantidad de unigenes específicos de FlavFr1 era de 661 unigenes y en septiembre de 2007 había disminuido a 387 (Tabla 3), debido fundamentalmente a que en la base de datos se incluyeron genotecas normalizadas y de longitud completa construidas con las mismas muestras que FlavFr1 (Tabla 5).

De los 387 unigenes específicos de FlavFr1 (Tabla Supl. 1), sólo 196 unigenes se pudieron anotar. La anotación asignada a dichos genes revelados como específicos de FlavFr1, nos permitió destacar algunos por su posible participación en la respuesta al frío. Como posibles genes de la cascada de señalización por frío encontramos algunos *kinasa* y *fosfatasa*, un gen que codifica una subunidad del complejo proteína-G y genes que codifican proteínas ricas en leucina. Además, hubo genes relacionados con membrana, como los genes relacionados con fosfolípidos, que podrían estar respondiendo al estrés por frío (Vergonelle *et al.*, 2005), la *PLC2* y un transportador de fosfolípidos. Posiblemente relacionados con estos cambios en las membranas celulares también se encontraron varios genes de transporte de iones, azúcares y aminoácidos. En posible relación con los procesos de pared celular que pudieran ocurrir asociados al DF se encontraron tres genes de remodelación de pared que además pueden participar en la respuesta a diferentes estreses: *precursor de la β -1,3-glucanasa*, *β -1,3-glucanasa* y *poligalacturonasa*. Otros genes de respuesta a estrés que están presentes son siete *carabinas moleculares*, cuatro de ellas tipo DnaJ (Zhu *et al.*, 1993), el gen *ACC sintasa* (Mullins *et al.*, 1999), y dos genes de defensa, *inducible por lesión en Nicotiana* y *respuesta a herida*. Asociados a un posible desmantelamiento de estructuras celulares y del metabolismo a bajas temperaturas

hay ocho genes de degradación, incluyendo proteólisis dependiente de ubiquitina con dos genes de la subunidad 26S del proteosoma, y degradación específica de aminoácidos como una *serina-* y una *tirosina- descarboxilasas*. Relacionado con los posibles daños producidos por el estrés identificamos un par de genes de reparación del DNA, *reparador de roturas de doble hebra MRE11* y *DNA reparador de errores*; y algunos genes de respuesta a estrés oxidativo como una *glutación S-transferasa (GST)*. También se identificaron varios factores de transcripción que podrían estar desencadenando la respuesta transcripcional al frío, incluyendo un factor tipo *MYC*, un *bHLH*, un *BIM*, un *Glo3*, un *WRKY*, uno con dominio dedos de zinc, otro con cremallera de leucina y dos *bZIP*. En el Capítulo 2 se analiza con más detalle la posible implicación de factores en la respuesta al frío, en función de sus patrones de expresión.

Para comprobar si estos genes específicos de la genoteca FlavFr1 (obtenida de flavedo de frutos CN, tolerante al frío) realmente son de respuesta a frío y senescencia, se analizaron sus patrones de expresión a partir de los resultados de las hibridaciones en micromatrices analizadas en el Capítulo 2. De los 387 unigenes específicos de la genoteca FlavFr1, 215 unigenes se imprimieron en la micromatriz utilizada. Solamente 186 unigenes pasaron los tests de calidad después de las hibridaciones realizadas. Tras el análisis estadístico de genes significativos en el estudio de CN y F, se encontró que 40 unigenes resultaron diferenciales en la serie de CN, tolerante al frío, y 83 unigenes diferenciales en el análisis de F, mientras que 48 unigenes resultaron diferenciales entre las dos variedades durante el almacenamiento en frío y 14 de éstos también mostraron cambios significativos en respuesta al frío en cada variedad individual (Fig. 11) (Tabla Supl. 1).

De los 48 unigenes diferenciales entre CN y F (CNF en Fig. 11), 22 tenían asignada una función según la similitud de secuencia. De estos genes anotados, siete unigenes (13 unigenes totales, seis sin función conocida) mostraron cambios significativos en cada variedad individual (Tabla 4). Dos genes con función desconocida; un gen *zinc carboxipeptidasa*; un gen que codifica una proteína integral de membrana, el gen de degradación de ácidos grasos acil-CoA oxidasa (*ACX3*), un gen *DnaJ*, y el gen de pared celular β -1,3-*glucanasa* (Tabla 4). La posible implicación en las respuestas al frío de las proteínas codificadas por los dos últimos unigenes está descrita en mayor profundidad en el Capítulo 2, en el análisis de la serie temporal de CN a tiempos cortos, allí resultaron significativos estadísticamente otros unigenes homólogos a estos.

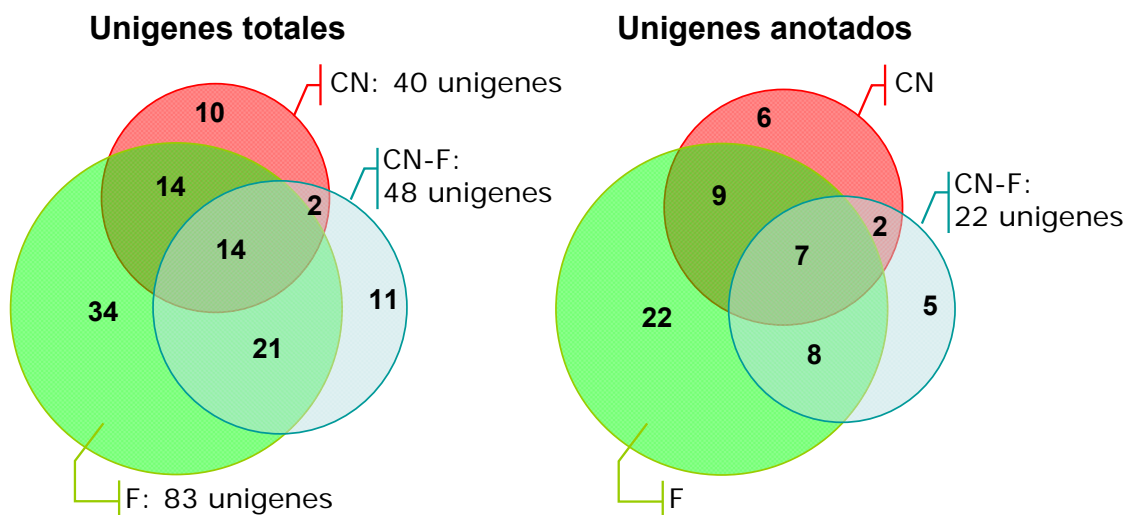


Figura 11. Diagramas de Venn de los unigenes específicos de la genoteca FlavFr1, en función de su presencia en los análisis estadísticos del transcriptoma de CN y F durante el almacenamiento a bajas temperaturas, y los que difieren entre las dos variedades. En el diagrama de la izquierda se muestran todos los unigenes, en el de la derecha sólo se han distribuido los unigenes con homología a una función conocida.

TABLA 4. Unigenes específicos de FlavFr1 y diferenciales entre CN y F (CN-F) en respuesta al frío

unigene 2007	patrón de expresión		anotación2007
	CN	F	
aC04010B06SK_c	represión	represión	DNA genómico <i>Arabidopsis thaliana</i>
aC04011F08SK_c	plano	inducción	Familia zinc carboxipeptidasa proteína
aC04011B08SK_c	inducción	inducción	Proteína expresada
aCL6688Contig1	inducción	inducción	Proteína familia integral membrana
aCL3200Contig1	plano	inducción	Putativo ACX3
aC04013C08SK_c	inducción	inducción	Putativo DnaJ proteína
aC04017A07SK_c	represión	represión	Precursor β -1,3-glucanasa

Dado que los cDNAs de FlavFr1 se sintetizaron a partir de extremos 3' (mediante RT cebada con oligodT) y se realizó una sola reacción de secuenciación por clon desde el extremo 5', es de esperar que se obtengan secuencias parciales. Posteriormente a la construcción de la genoteca FlavFr1, se construyó la genoteca enriquecida en cDNAs de longitud completa normalizada **PostharvC1** (Tabla 5) a partir del mismo material vegetal (flavedo de frutos almacenados en frío) en la que se incluyeron mejoras para evitar truncamiento en 5', y la genoteca **PostharveN** (Tabla 5) enriquecida en cDNAs de longitud completa y normalizada, procedente de flavedo de frutos almacenados en frío y flavedo+albedo de frutos infectados con *Penicillium digitatum* (Marques *et al.*, 2009). De esta forma se enriqueció la fracción de clones de

longitud completa en la colección. Los cDNAs de longitud completa eran aquellos que tras aplicar BLASTX se alineaban con una proteína que incluía su primer aminoácido. En FlavFr1 hay 47,96% unigenes de longitud completa y en PostharvC1 hay 72,91%. Sin embargo, este porcentaje no es equivalente con el de clones de FlavFr1 que hay en la micromatriz, ya que se estima que tan solo 16 sondas de las 1344 sondas depositadas (1,19%) son cDNAs de longitud completa. En cualquier caso, el truncamiento de estas sondas no tiene por qué afectar la evaluación de los niveles de transcritos mediante la micromatriz.

TABLA 5. Genotecas construidas dentro del proyecto CFGP a partir de flavado de diferentes variedades de frutos cítricos

GENOTECA	VARIEDAD	TEJIDO	CONDICIONES
FlavFr1	Clemenules	Flavado	Postcosecha, almacenamiento de frutos a 2°C: 7 y 24 d.
PostharvC1 *	Clemenules	Flavado	Postcosecha, almacenamiento de frutos a 2°C: 7 y 24 d.
PostharveN *	Clemenules	Flavado	Postcosecha, almacenamiento de frutos a 2°C: 2, 3,5, 4,5, 24 h y 9, 14, 23, 28, 42, 56 d. Infección con <i>Penicillium</i>.
FlavRip1	Clemenules	Flavado	Flavado de frutos en maduración.
FlavSen1	Clemenules	Flavado	Flavado de frutos senescentes.
FlavFrSub1	Fortune	Flavado	Postcosecha, almacenamiento de frutos a 2°C y 12°C, 14 d.
FlavCurFr1	Fortune	Flavado	Tratamiento 4, 24, 72 h a 37°C; y 1, 3, 10 d a 1°C.
FlavCurFrS	Fortune	Flavado	Tratamiento 3 d a 37°C y 7 d a 1.5°C; recién traído de campo.
PostharvP1	Clemenules	Piel	Infección con <i>Penicillium</i> .
RindPdig24	Clemenules	Piel	Infección con <i>Penicillium</i> .
RindPdigS	Navelina	Piel	Infección con <i>Penicillium</i> .

(*) genoteca normalizada

En negrita se han destacado las genotecas que comparten material de partida con FlavFr1.

La relación entre los ESTs de las genotecas construidas a partir de flavado de frutos almacenados a 2°C se puede apreciar en los diagramas de Venn de la Figura 12 (Tabla Supl. 2). Por una parte, se compararon las genotecas FlavFr1 (1328 unigenes) y PostharvC1 (716 unigenes). Así se distinguió que 126 unigenes estaban formados por clones procedentes de las dos genotecas, 1202 que tenían alguna EST de FlavFr1 y no de PostharvC1, y 590 unigenes no tenían ESTs de FlavFr1 y sí de PostharvC1. Los 590 unigenes que sólo aparecieron en la genoteca PostharvC1 en principio corresponderían a unigenes poco representados que son difíciles de rescatar en genotecas sin normalizar. Tanto las genotecas enriquecidas en cDNAs de longitud completa como las normalizadas, no se incluyeron en la impresión de la micromatriz

utilizada en el Capítulo 2, por tanto, no tenemos datos de expresión de estos genes. Entre los 590 unigenes específicos de PostharvC1 había algunos genes homólogos a unigenes que sí estaban en la micromatriz y se comentan en el Capítulo 2, como es el caso del gen de biosíntesis de ABA *9,10[9',10']carotenoide dioxigenasa*, los genes de señalización por calcio *Anx1* y *fibra anexina*, los genes de degradación de pared celular *pectinesterasa* y *β-1,3-glucanasa*, genes de defensa a diversos estreses abióticos como *quitinasa*, varios genes *HSP*, una chaperona *DnaJ*, varios genes *RING-H2*, y genes relacionados con la respuesta al estrés oxidativo *GST*, *precursor de peroxidasa*. Aunque también hay genes de respuesta a estrés relacionados con algunos que estudiamos como los genes *Lea14-A*, *putativo tolerante salinidad At1g78600*, *RAD23*, *Deshidratación-inducida ERD15*, *APX*, *Glutación reductasa*, que podrían resultar muy interesantes si su patrón de expresión fuese de inducción ya que indicaría una posible función en proteger las células del flavedo frente a las bajas temperaturas de almacenamiento en postcosecha.

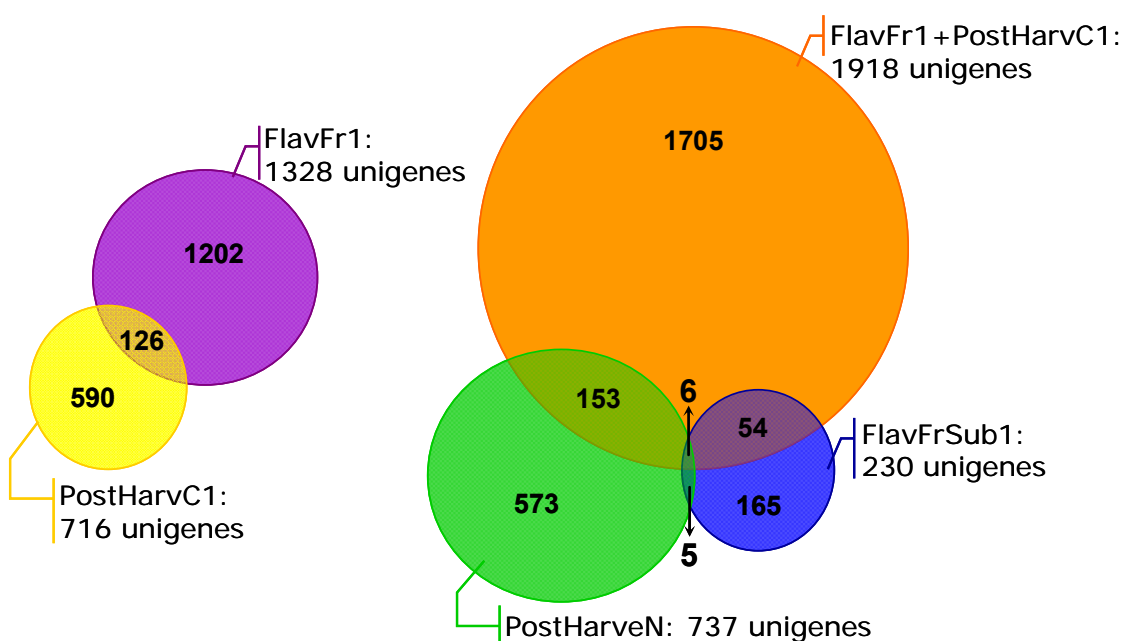


Figura 12. Diagrama de Venn. Distribución de la relación de los unigenes obtenidos en genotecas del CFGP de respuesta a frío en flavedo: FlavFr1 (genoteca sin normalizar), PostharvC1 (genoteca normalizada), PostharveN (genoteca normalizada a partir de muestras de frío junto a otras tras infección por *Penicillium*) y FlavFrSub1 (genoteca de sustracción de flavedo de F en frío).

Por otro lado, se tomó como un conjunto las genotecas FlavFr1 y PostHavrC1 por estar construidas con el mismo material vegetal (flavedo de frutos CN almacenados a 2°C). Este conjunto se comparó con la genoteca normalizada PostharvN, de flavedo de frutos CN almacenados en frío más flavedo de frutos CN

infectados con *Penicillium*, y con la genoteca FlavFrSub1, genoteca de sustracción obtenida a partir de flavedo de frutos almacenados a 2°C de la variedad sensible F (Fig. 12). Se observó que FlavFr1+PostharvC1 eran las genotecas que mayor proporción de unigenes específicos aportaban, mientras que por el contrario, la de FlavFrSub1 es la que compartía una mayor proporción de sus unigenes con FlavFr1+PostharvC1, pese a haber sido generada a partir de la variedad sensible F. Tan sólo se identificaron seis unigenes en las tres genotecas comparadas (Tabla 6), lo cual refuerza que son elementos característicos de la respuesta al frío del flavedo de mandarinas, o al menos de la respuesta a la postcosecha. Entre estos unigenes se identificó un *GST* que podría relacionarse con la amortiguación del equilibrio redox tras el aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS) en respuesta al estrés (Alscher, 2006). Además, un gen *precursor de quitinasa* que podría inducirse por solapamiento de la respuesta a diferentes estreses (Kwon *et al.*, 2007) o como mecanismo de defensa propio del almacenamiento a bajas temperaturas durante la postcosecha (Yeh *et al.*, 2000). También se identificó una *subunidad ClpX1* del complejo proteolítico Clp, que curiosamente en *Arabidopsis* se ha relacionado con la biogénesis plástica y síntesis de clorofilas (Koussevitzky *et al.*, 2007) más que con su degeneración como cabría esperar en la senescencia de los frutos.

TABLA 6. Unigenes compartidos por las genotecas FlaFr1, PostHarvC1, PostHarveN y FlavFrSub1, todas ellas construidas a partir de flavedo de mandarinas CN o F, almacenadas en frío

aCL10Contig9	Precursor quitinasa
aCL13Contig2	At4g15470/dl3775w
aCL1454Contig1	UDP-glucosa: ácido salicílico glucosiltransferasa
aCL184Contig3	GST
aCL303Contig1	1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa, DXR
aCL5318Contig1	subunidad ClpX1 dependiente de ATP

3. ANOTACIÓN DE LOS CLONES OBTENIDOS EN LA GENOTECA

La posible función para cada uno de los unigenes se asignó en base a la proteína de función conocida más similar a nivel de secuencia (E-value<10⁻⁵) (Fig. 13). Para ello se llevó a cabo con cada secuencia obtenida, un BLASTX contra diferentes bases de datos, incluyendo: la base de datos no redundante de proteínas UniRef90, el conjunto completo de proteínas de *Arabidopsis* obtenido del TAIR, y una base de

datos local construída con todas las secuencias públicas de cítricos depositadas en el NCBI. Los unigenes que no quedaron anotados podrían representar genes nuevos y de función desconocida, aunque también pueda deberse en algunos casos a genes con baja similitud con genes anotados por corresponder con regiones no codificantes (UTRs), o a genes que no se pudieron anotar debido a deficiencias en la secuenciación del EST, o como consecuencia de algún otro fallo técnico. La función asignada a los unigenes por homología con otros genes conocidos fue útil en el presente trabajo en la interpretación de los resultados de las hibridaciones de las micromatrices, lo que permitió elaborar los resultados y lanzar hipótesis de qué aspectos o componentes conformarían el mecanismo de respuesta o adaptación del flavedo al estrés aplicado.

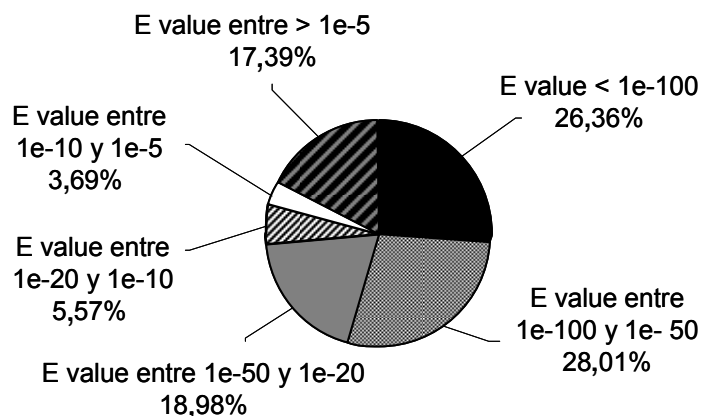


Figura 13. Distribución de los unigenes de la genoteca FlavFr1 en función de las proporciones de unigenes comprendidos en diferentes rangos de similitud de secuencias (*E-value*) tras una búsqueda de similitud BLASTX frente a la base de datos UniRef90. Se consideró similitud significativa en caso de $E\text{-value} < 1e^{-5}$.

De los 1328 unigenes representados en la genoteca FlavFr1, 1097 (82,6%) tuvieron similitud significativa con alguna proteína de la base de datos de proteínas UniRef90; 1084 (81,6%) con alguna proteína de la base de datos de proteínas de *Arabidopsis*, y un total de 1200 (90,4%) con las secuencias públicas de cítricos. En cambio, de los 387 unigenes específicos de la genoteca FlavFr1, sólo se identificó similitud significativa de 196 unigenes (50,6%), lo cual sugiere que una importante proporción de funciones génicas desconocidas participa en el comportamiento postcosecha del flavedo de mandarinas CN almacenadas en frío.

La obtención de una colección de ESTs de frutos cítricos sometidos a bajas temperaturas ha creado un recurso del que obtener genes previamente desconocidos, específicos de respuesta al estrés en el flavedo con los que se podrá trabajar en un futuro para conocer con más detalle su función. Pero también se puede aplicar al

estudio de proteínas nuevas de función desconocida. Luhua *et al.* (2008) mostraron que algunas proteínas de función desconocida tenían un papel importante ante diferentes estreses abióticos. De hecho, algunos de los unigenes más representados en la genoteca codifican proteínas de función desconocida y podrían ser importantes en la respuesta a las bajas temperaturas. El porcentaje de ESTs sin homología (17,39%) tuvo un valor similar (16,2%) al obtenido en otros proyectos como el reportado por Ablett *et al.* (2000) en el análisis de ESTs procedentes de dos genotecas, una de fruto y otra de hojas, de *Vitis vinifera*.

Adicionalmente a la anotación molecular, se realizó una clasificación funcional de los unigenes en ontologías génicas (GO) del *Gene Ontology Consortium* (Ashburner *et al.*, 2000). Esta clasificación se realizó en base a la función de la proteína más similar de *Arabidopsis* obtenida tras un BLASTX contra el conjunto completo de proteínas de *Arabidopsis* derivado del TAIR (<http://www.Arabidopsis.org>). Hay que tener en cuenta, que dicha clasificación resultó ser tan sólo parcial, puesto que a todos los unigenes no se les pudo asignar un gen de *Arabidopsis* y en consecuencia una categoría GO, pero permitió clasificar la información obtenida y proporcionó cierto valor estadístico a las asignaciones y resultados obtenidos.

En la Tabla 7 se representa la distribución de la clasificación GO de los unigenes en cada una de las genotecas construidas a partir de flavedo, junto al resumen de la distribución de clasificaciones para la colección completa de unigenes obtenidos en el proyecto CFGP. De los 1328 unigenes identificados en FlavFr1, se pudo asignar categoría de GO al 51,1% de ellos, y algunos de estos fueron asignados a más de una categoría GO. Las secuencias anotadas se agruparon en base a los principios de ontología génica de *proceso biológico* y *función molecular*.

En términos de unigenes, las categorías GO de *proceso biológico* más representadas en FlavFr1 fueron: *proceso fisiológico celular* (18,1%), *metabolismo de macromoléculas* (16%), y *proceso biológico desconocido* (13%). En comparación con otras genotecas de flavedo, no destaca el enriquecimiento de ninguna categoría de GO en la genoteca FlavFr1. Sin embargo, al comparar con el total de unigenes de CFGP, sí se aprecia cierto enriquecimiento en FlavFr1 de los GO de *respuesta a estímulo*, *proceso fisiológico celular* y *metabolismo de macromoléculas* (Tabla 7).

TABLA 7. Clasificación de unigenes en las categorías de proceso biológico de las genotecas de flavedo

Proceso biológico	CFGP	FlavFr1	PostharvC1	PostharveN	FlavRip1	FlavSen1	FlavFrSub1	FlavCurFr1	FlavCurFrS
Sin anotación GO en proceso no biológico	54,8	48,9	31,7	35,4	49,4	39,2	57,8	47,1	79,5
Proceso fisiólogo celular	14,0	18,1	22,6	21,8	19,9	21,6	9,1	19,4	6,8
Proceso biológico desconocido	14,5	13,0	21,2	20,6	14,2	17,0	10,4	13,4	4,1
Metabolismo macromolécula	12,8	16,0	18,3	20,1	14,6	18,0	9,1	16,3	6,8
Biosíntesis	6,3	8,0	9,6	10,6	10,1	12,9	5,7	11,2	11,2
Metabolismo	4,2	4,8	7,8	6,6	3,7	3,6	3,9	4,0	1,4
Proceso metabólico de nucleobase, nucleósido, nucleótido y ácidos nucleicos	5,0	4,5	5,7	6,2	4,9	4,6	3,9	5,7	5,5
Respuesta a estímulo	3,0	5,0	5,4	3,5	4,5	4,6	4,3	4,4	1,4
Metabolismo de aminoácidos y derivados	1,7	1,9	3,5	2,3	1,9	1,5	1,3	2,5	2,5
Proceso fisiólogo	0,5	0,8	0,8	0,9	1,1	1,5	0,8	0,8	0,8
Catabolismo	1,5	2,3	3,2	3,7	2,2	3,1	1,3	1,9	1,4
Transporte	4,3	5,1	6,0	5,4	3,0	4,1	7,0	5,2	2,7
Regulación procesos biológicos	2,9	2,6	4,2	3,0	2,2	3,1	2,2	2,7	4,1
Transporte electrones	1,8	3,0	2,5	3,0	4,1	4,6	2,2	3,9	1,4
Comunicación celular	1,5	2,0	1,0	1,4	0,4	2,6	2,2	1,0	1,4
Desarrollo	0,6	0,8	1,8	1,5	1,5	1,5	0,4	1,1	1,1
Muerte celular	0,3	0,6	0,8	0,7	0,4	0,5	0,4	0,3	1,4
Proceso biológico	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3
Secreción	0,3	0,3	0,8	0,4	0,4	0,5	0,3	0,1	0,1
Diferenciación celular	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Fusión de membranas	0,1	0,2	0,1	0,1	0,2	0,5	0,2	0,2	0,2
Estructura extracelular, organización y biogénesis	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

La asignación de categorías GO basada en *función molecular* mostró como categorías significativas más representadas en FlavFr1 las de *unión a otra molécula* (10,4%), *actividad hidrolasa* (9%) y *unión a ácidos nucleicos* (8,1%), *oxidoreductasa* (5,9 %) (Fig. 14).

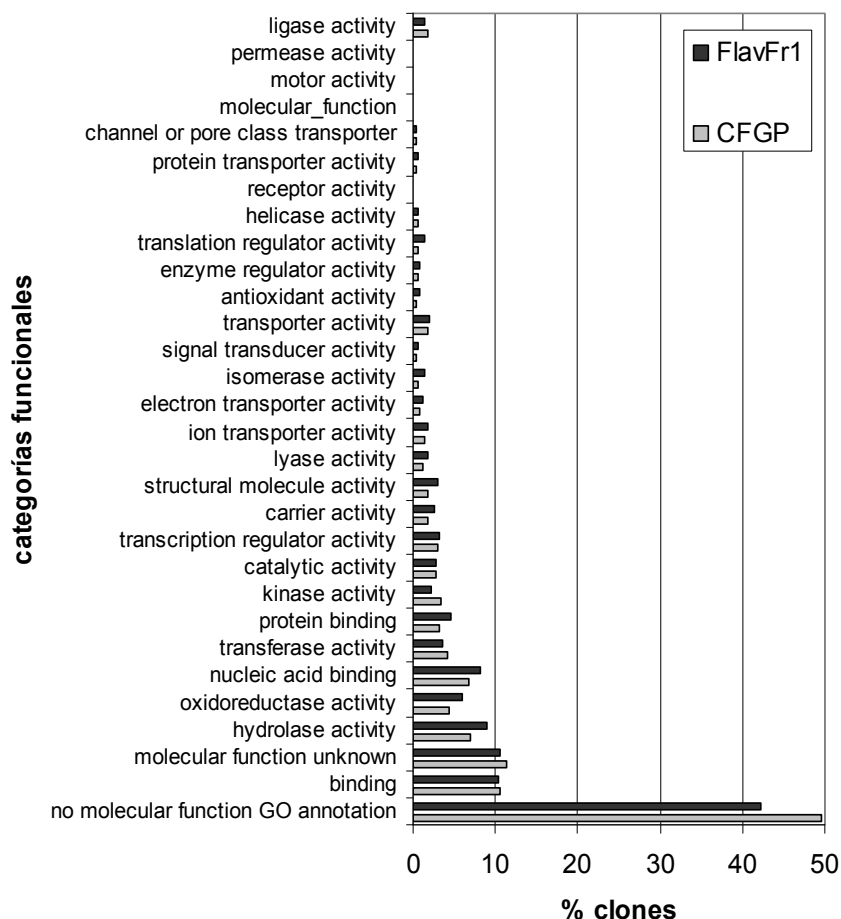


Figura 14. Clasificación de las secuencias de la genoteca FlavFr1 y la base de datos de cítricos CFGP de acuerdo con la clasificación de GO: función molecular.

4. DISTRIBUCIÓN DE LOS ESTs DE LA GENOTECA FlavFr1 EN UNIGENES

Los unigenes representados con al menos un clon en la genoteca FlavFr1 fueron un total de 1328, de los cuales 1051 solamente contenían un clon de FlavFr1 y 277 contenían varias secuencias de FlavFr1. La Figura 15 representa la distribución de los unigenes en función del número de ESTs de FlavFr1 que representan al unigen. Dado que la genoteca no había sido normalizada, el número de ESTs por contig está relacionado con la abundancia relativa del transcrito en la genoteca y por lo tanto con el nivel de expresión relativo en el material de procedencia. El contig con mayor redundancia en la genoteca (*aCL17Contig1*) contenía 117 ESTs. Sin embargo, la mayoría de los unigenes de la genoteca eran singletons y la mayoría de los contigs estaban formados por dos ESTs.

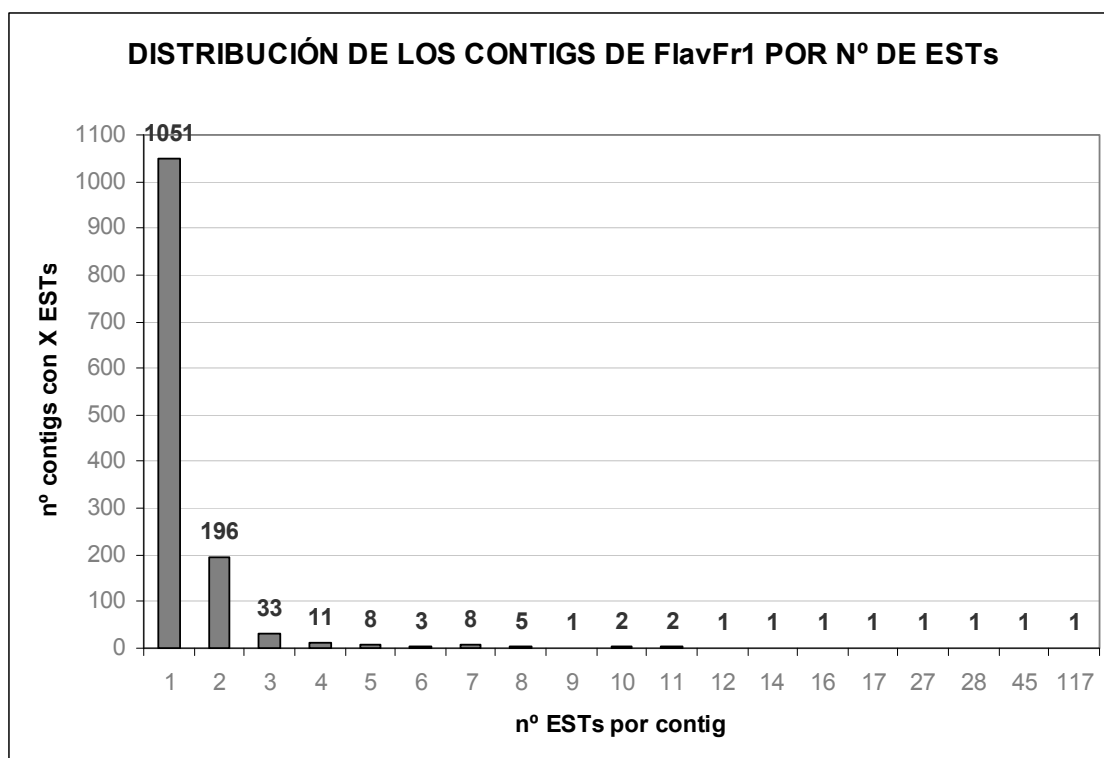


Figura 15. Distribución del número de ESTs que componen cada unigen de FlavFr1.

En la Tabla 8 se muestran los contigs formados por más de 10 ESTs, su anotación basada en la búsqueda de proteínas homólogas por BLASTX, y el número de clones impresos en la micromatriz utilizada para en análisis transcriptómico de CN y F en el Capítulo 2.

Varios de los contigs con mayor representación en la genoteca (Tabla 8) están relacionados con la respuesta a estrés abiótico, como son los dos homólogos a genes *COR15* (contigs *aCL6Contig7* y *aCL6Contig16*), una *chaperona de choque térmico* (*aCL6Contig22*), una *metalotionina* (*aCL7Contig10*) y una *taumatina* (*aCL76Contig1*). La totalidad de los unigenes identificados en FlavFr1, así como los ESTs que se integran en cada contig pueden consultarse en la Tabla Supl. 3.

En el capítulo siguiente queda probada que la abundancia de estos transcritos en la genoteca FlvaFr1 se debe a una fuerte inducción de estos genes en el flavedo de mandarinas CN expuestas al frío.

Desafortunadamente, el unigen más representado en la genoteca FlavFr1, *aCL17Contig 1*, mostró homología con una proteína de *Vitis vinifera* de función desconocida y sólo se imprimió en la micromatriz con una sonda (de las 117 cDNAs que lo forman) que no pasó los análisis estadísticos por la elevada variabilidad entre réplicas. El resto de genes, sí los pasaron y en la mayoría de casos mostraron un patrón de expresión diferencial en ambas variedades y, por tanto, posibles responsables de la tolerancia de CN y sensibilidad de F.

TABLA 8. Anotación de los ESTs más representados en la genoteca FlavFr1

Unigen	n° clones		Anotación
	en FlavFr1	impresos en la micromatriz	
aCL17Contig1	117	1 (de FlavFr1)	Gb AAD21756.1
aCL37Contig1	45	1 (de FlavFr1)	sin anotación disponible
aCL6Contig7	28	29	COR15
aCL6Contig16	27	23	COR15
aCL6Contig22	17	13	HSP
aCL7Contig10	16	43	Metalotioneina
aCL76Contig1	14	16	Taumatina, isoforma 2
aCL16Contig2	12	15	Inhibidor proteasa cisterna
aCL4Contig29	11	62	Poliubiquitina
aCL16Contig1	11	16	Enzima biosíntesis tiazol, precursor cloroplástico
aCL5Contig15	10	10	Putativo inducible tempranamente
aCL5Contig4	10	7	Citocromo P450_TBP

Los unigenes *aCL16Contig1*, *aCL5Contig15* y *aCL5Contig4* no resultaron estadísticamente diferenciales entre CN y F, aunque sí respondieron significativamente en cada serie individual. El unigen *aCL16Contig1*, codifica una enzima de biosíntesis de tiazoles, relacionada con la biosíntesis del cofactor tiamina necesario para la función de las enzimas del metabolismo del carbono. En CN dos clones conformaron este unigen, pero mostraron una gran variabilidad en su perfil de expresión (Tabla Supl. 6a): uno mantuvo un patrón casi plano mientras el otro se indujo más del doble desde la primera semana de almacenamiento, llegando a seis veces más en la cuarta semana. Posteriormente, disminuyó el nivel casi como al principio. En F este gen tuvo un patrón casi plano, similar a uno de los clones de CN (Tabla Supl. 4a). Se ha visto que este gen está implicado en la maduración de los frutos (Jacob-Wilk *et al.*, 1997), aunque en maíz (Rapala-Kozik *et al.*, 2008) y en *Arabidopsis* se ha mostrado su inducción tras someter las plantas a estrés por inundación, sequía y salinidad (Ribeiro *et al.*, 2005). Hay varias posibles explicaciones a la disparidad de resultados según la sonda impresa en la micromatriz. Por una parte, puede haber hibridación cruzada (se trata de una micromatriz de cDNA) y en cada sonda se ha unido un gen diferente de la misma familia pero con un comportamiento opuesto. Por otro lado, podría ser que las sondas representen partes alejadas del gen, una más conservada que la otra, por eso cada una de las sondas puede hibridar

marca fluorescente correspondiente a diferentes genes de la familia en diferente proporción.

El unigen *aCL5Contig15*, codifica una proteína descrita como inducible tempranamente por luz. En CN mantuvo el mismo nivel hasta el estadio de 56 d a 2°C que se reprimió disminuyendo su nivel casi diez veces (Tabla Supl. 6a). La expresión correspondiente a este unigen se reprimió en F hasta un pico menor a la mitad que el nivel inicial a los 28 d a 2°C y después se recuperó levemente (Tabla Supl. 4a). Estos resultados son contrarios a los obtenidos por Zhang *et al.* (2005a, b) en *Poncirus trifoliata*, donde el gen equivalente se induce durante la aclimatación al frío, sugiriendo en este caso que la respuesta al frío de un tejido vegetativo en crecimiento activo y en la luz puede diferir de la del fruto arrancado y en oscuridad.

La expresión correspondiente al unigen *aCL5Contig4*, *citocromo P450*, se reprimió en CN con un fuerte de pico de represión a las 24 h a 2°C, más de cuatro veces menos de nivel respecto al inicial, y desde la primera semana de almacenamiento hasta la cuarta semana se mantuvo a un nivel mitad del inicial, recuperando posteriormente el nivel detectado en las muestras recién traídas de campo. En F este gen mostró una inducción tardía a partir de las cuatro semanas de almacenamiento llegando a tener niveles el doble que el inicial (Tabla Supl. 4a y 6a).

El unigen *aCL37Contig1*, de función desconocida, tuvo un patrón de expresión de inducción en ambas variedades, incrementando los niveles de transcritos 3 veces durante la primera semana de almacenamiento y manteniendo este elevado nivel. Es un gen estadísticamente significativo en las dos variedades estudiadas, CN y F, y entre ambas porque en el último estadio de CN la inducción cayó hasta valores similares a los iniciales y en F se mantuvo dicha inducción (Tabla Supl. 9).

Los unigenes *aCL6Contig7* y *aCL6Contig16*, *COR15*, también tuvieron un patrón de expresión de inducción en ambas variedades (Fig. 41), pero el incremento en F fue ligeramente mayor hasta casi dos veces el valor de las muestras recién traídas de campo. Este gen se identificó significativo y diferencial entre ambas variedades, porque a pesar de tener la misma curva, en CN los niveles siempre fueron menores que en F (los máximos niveles de CN correspondieron con los mínimos niveles de F).

El unigen *aCL6Contig22*, *HSP*, presentó un patrón de inducción diferencial entre CN y F (Tabla Supl. 9). En CN los niveles de expresión aumentaron más de 10 veces respecto el valor recién traído de campo entre la primera y la cuarta semana de almacenamiento a 2°C. En F también aumentó fuertemente el nivel de expresión unas tres veces más que el nivel inicial durante las dos primeras semanas a 2°C y hasta cinco veces más entre la cuarta y la séptima semana a 2°C.

El unigen *aCL7Contig10*, *metalotionina*, presentó una respuesta tardía. CN y F muestran un patrón de expresión opuesto, en CN se induce a los 56 d a 2°C doblando el nivel. En cambio, en F se reprime a la mitad (y más) a partir de los 45 d a 2°C (Tabla Supl. 9).

El unigen *aCL76Contig1*, *taumatina*, se identificó diferencial entre las dos variedades porque la inducción fue más tardía en F que en CN (Tabla Supl. 9, SOM8). En CN los valores de expresión se multiplicaron por cuatro desde la primera semana de almacenamiento a 2°C y siguió aumentando el nivel de expresión hasta 7 veces al cabo de dos semanas y más de diez veces a las cuatro semanas de postcosecha. A los 56 d a 2°C los niveles cayeron hasta niveles similares a los iniciales. Por contraste, en F el incremento de transcrito fue menor de dos veces tras 7 d a 2°C, más del doble a las dos semanas y más de diez veces a partir de cuatro semanas de postcosecha. Esta diferencia es muy interesante porque la taumatina es una proteína de respuesta a estrés por patógenos, pudiendo responder ante varios estreses abióticos (Hon *et al.*, 1995).

El unigen *aCL16Contig2*, *inhibidor de cisteína proteasa*, mantuvo un patrón diferencial entre CN, cuyo perfil fue casi plano, y F, donde se indujo progresivamente a lo largo del tiempo hasta niveles tres veces más que en el inicio a partir de las cuatro semanas (Tabla Supl. 9, SOM 4).

El patrón de expresión del último unigen de la lista, *aCL4Contig29*, *poliubiquitina*, también fue diferencial ente CN y F (Tabla Supl. 9, SOM6). Los niveles de expresión en CN son mayores que en F, y en CN hubo un incremento en la primera semana de almacenamiento inferior al doble, y este aumento se mantuvo hasta una caída que se produjo a los 56 d a 2°C. En cambio, en F hubo un ligero pico de inducción la primera semana de postcosecha y los niveles disminuyeron ya desde la segunda semana a 2°C de forma similar a como ocurrió, pero de forma tardía, en CN.

En resumen, debido a la naturaleza del material de partida para la construcción de la genoteca FlavFr1, se clonaron genes que aunque sean abundantes en alguno de los estadios de estudio muestran unos perfiles de expresión muy variados. Y en definitiva, la genoteca FlavFr1 constituye una buena herramienta para posteriores análisis de genómica funcional como la secuenciación masiva de ESTs, el aislamiento de genes completos, y el análisis de perfiles de expresión génica.

CAPÍTULO 2:

ANÁLISIS DEL TRANSCRIPTOMA DEL FLAVEDO EN RESPUESTA AL FRÍO DE MANDARINAS SENSIBLES (FORTUNE) Y TOLERANTES (CLEMENULES)

El análisis de la expresión génica con micromatrices es un buen ejemplo de convergencia y sinergia de muchas tecnologías, que incluyen la secuenciación automática de DNA, la amplificación de DNA por PCR, la elevada eficiencia en la síntesis de oligonucleótidos, el marcaje de ácidos nucleicos, mejora de la química de estampado y detección, y la bioinformática; más aún, ha supuesto un cambio en la mentalidad del investigador puesto que de trabajar con uno o pocos genes ha pasado a analizar miles (Leung y Cavalieri, 2003).

La disponibilidad de numerosas colecciones de cDNA ha permitido la construcción de micromatrices para un gran número de especies vegetales, muchas de ellas con un alto interés agronómico, como arroz (Rabbani *et al.*, 2003; Lian *et al.*, 2006), maíz (Lee *et al.*, 2002), soja (Vodkin *et al.*, 2004; Ainsworth *et al.*, 2006), patata (Stupar *et al.*, 2007), tomate (Alba *et al.*, 2005), fresa (Aharoni *et al.*, 2004), trigo (Gulick *et al.*, 2005), garbanzo (Mantri *et al.*, 2007), girasol (Fernández *et al.*, 2008), melocotón (Ogundiwin *et al.*, 2008), y cítricos (Forment *et al.*, 2005, Martínez-Godoy *et al.*, 2008).

El progresivo desarrollo de herramientas y conocimiento genómico en cítricos (Forment *et al.*, 2005; Aparicio *et al.*, 2006; Talon y Gmitter, 2008; Luro *et al.*, 2008; Ríos *et al.*, 2008; Terol *et al.*, 2008) está permitiendo averiguar las bases moleculares de diferentes procesos de interés, desde aquellos subyacentes al desarrollo hasta la respuesta al ambiente externo (Terol *et al.*, 2007; Agustí *et al.*, 2008; Alós *et al.*, 2008; Huerta *et al.*, 2008, 2009; Brumos *et al.*, 2009; Gimeno *et al.*, 2009). En cítricos, ese avance se inició hace unos diez años con un proyecto de secuenciación a pequeña escala, en el cual se aislaron 297 ESTs con un 20% de *metalotioneinas* (Moriguchi *et al.*, 1998). Shimada *et al.* (2005) utilizaron una micromatriz de cDNA de cítricos (<http://www.fruit.affrc.go.jp/index-e.html>) conteniendo 2213 (22 K) genes independientes para examinar la expresión génica de diferentes tejidos; más tarde se desarrolló la micromatriz de oligonucleótidos cortos de Affymetrix (GeneChip *Citrus* Genome Array, <http://www.affymetrix.com/analysis/index.affx>), que representa 33879 transcritos de cítricos (Close, 2006).

El proyecto CFGP generó una primera micromatriz de cDNA de 7 K (Forment *et al.*, 2005) con la que se han estudiado diferentes procesos biológicos en diversos tejidos y distintas condiciones. Cabe mencionar algunos de los trabajos ya publicados como el análisis de los cambios transcriptómicos durante el desarrollo y maduración de frutos *Citrus clementina* (Cercós *et al.*, 2006); cambios en la expresión génica en

plantas *Citrus aurantifolia* en respuesta a la infección por el virus de la tristeza (CTV) (Gandía *et al.*, 2007); análisis general para una posible predicción de variedades (Ancillo *et al.*, 2007); el efecto de GA en entrenudos de plantas transgénicas de citrange Carrizo (*Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata*) que sobreexpresan *CcGA20ox1*, y control tratadas con GA₃ (Huerta *et al.*, 2008); análisis global del mutante navel negra de *Citrus sinensis* (Alós *et al.*, 2008); la identificación de genes de respuesta a la abscisión inducida por ET en hojas de CN (Agustí *et al.*, 2008, 2009); la respuesta a estrés hídrico en hojas y raíces (Gimeno *et al.*, 2009); discriminación de la respuesta al estrés salino y la acumulación de cloro con dos tratamientos salinos y dos genotipos, citrange Carrizo sensible y mandarina Cleopatra tolerante (Brumos *et al.*, 2009).

A medida que se realizaban los trabajos, surgían nuevos problemas y nuevas soluciones, como fue el análisis de series temporales, que se puede abordar con mayor precisión a partir de junio 2005 con la versión 2.11 de SAM (Tusher *et al.*, 2001), o por los métodos maSigPro (Conesa *et al.*, 2006) y ASCA (Nueda *et al.*, 2007).

También mejoró la micromatriz y se contruyó una nueva versión de 20 K (Martinez-Godoy *et al.*, 2008), con la que ya se han publicado trabajos como el análisis de expresión de la pulpa del fruto de alotetraploides somáticos interespecíficos entre *Citrus reticulata* cv Willowleaf mandarin y *Citrus limon* cv Eureka lemon (Bassene *et al.*, 2009).

Puesto que la respuesta/aclimatación al frío de las plantas se debe a un sistema multigénico, las técnicas a gran escala son las que permiten obtener mayor información. Las técnicas *differential display* (expresión diferencial) y SSH (*suppression subtractive hybridization*) permitieron una primera aproximación del proceso en diversos cítricos como en F (Sanchez-Ballesta *et al.*, 2003), *Poncirus trifoliata* (Zhang *et al.*, 2005a, b; Sahin-Cevik y Moore, 2006), *Citrus unshiu* (Lang *et al.*, 2005) y *Citrus paradisi* (Sapitnitskaya *et al.*, 2006).

La metodología de las micromatrices ha permitido el análisis de genes de respuesta al frío en diversas especies vegetales, para un conocimiento básico derivado del modelo *Arabidopsis* (Seki *et al.*, 2001, 2002; Chen *et al.*, 2002; Kreps *et al.*, 2002; Maruyama *et al.*, 2004; Vergonelle *et al.*, 2005; Oono *et al.*, 2006; Benedict *et al.*, 2006; Kilian *et al.*, 2007; Swindell *et al.*, 2007), y para la posible identificación de genes responsables de DF en cultivos de interés agronómico como arroz (Rabbani *et al.*, 2003; Ito *et al.*, 2006), pomelo (Maul *et al.*, 2008), girasol (Fernandez *et al.*, 2008), melocotón (Ogundiwin *et al.*, 2008), trigo (Gulick *et al.*, 2005). El único trabajo de análisis transcriptómico mediante micromatrices en cítricos sometidos a estrés por frío publicado hasta la redacción de esta Tesis Doctoral es el realizado por Maul *et al.*

(2008) en pomelo. Este trabajo supuso una primera visión global de la respuesta transcriptómica al frío y al acondicionamiento previo a la postcosecha en frío en frutos cítricos susceptibles de experimentar DF. En el mismo se describe que el tratamiento de frío produce una disminución general del metabolismo primario y secundario, mientras que activa la expresión de transcritos relacionados con el metabolismo de lípidos, la respuesta a estrés, y la biosíntesis de hormonas, así como de varios factores de transcripción.

En nuestro estudio se utilizó la primera micromatriz (7 K) generada en el CFGP, y se abordó la identificación de procesos biológicos subyacentes a la respuesta transcriptómica al frío de dos variedades de mandarinas con una respuesta fisiopatológica diferente y de gran importancia económica. Toda la información generada puede ser una base de hipótesis para dirigir nuevas líneas de investigación con las que comprobar los genes responsables de la respuesta al frío y el DF.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se diseñaron dos experimentos con el fin de analizar los cambios transcriptómicos que tienen lugar en el flavedo de mandarinas CN y F durante su almacenamiento en frío. En el primer experimento se hibridaron y analizaron muestras de la variedad tolerante (CN), correspondientes a diferentes periodos de almacenamiento en frío (2°C). En el segundo experimento se incluyeron las muestras equivalentes de una serie temporal de frutos de la variedad sensible (F) (Fig. 16; apartado 8.2 de Materiales y Métodos). En ambas series, las micromatrices se hibridaron con cDNA obtenido a partir de RNA de cada estadio frente a una referencia que consistió en una mezcla equimolar de cDNAs de una serie temporal de CN. Gracias al uso de una misma referencia, fue posible establecer comparaciones de los datos de expresión entre las series de ambas variedades.

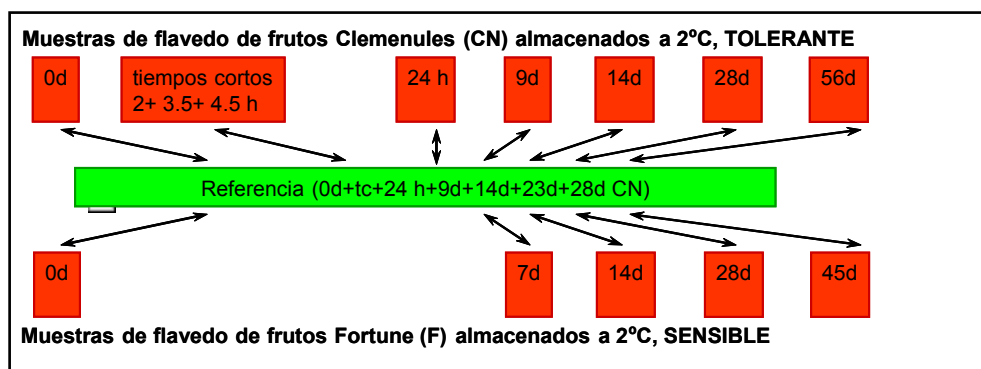


Figura 16. Diseño experimental utilizado en el estudio de la respuesta del transcriptoma del flavedo de frutos almacenados en frío durante periodos crecientes de tiempo en dos variedades de mandarinas (CN y F) que se diferencian en la tolerancia a bajas temperaturas. Los recuadros rojos representan cada una de las muestras analizadas y se indica el periodo de exposición a frío en horas (h) o días (d). El recuadro verde representa la mezcla de referencia que se empleó en todas las hibridaciones.

2. ANÁLISIS DE CALIDAD DE LOS DATOS DE LAS MICROMATRICES

Se evaluó la calidad de las hibridaciones considerando por un lado, el número de sondas que superaban los filtros de calidad de hibridación establecidos; y por otro lado, el ajuste de los datos a una distribución normal previamente a su tratamiento matemático (apartado 8.5 de Materiales y Métodos).

La media total de las sondas eliminadas por micromatriz, debido a presentar una intensidad por debajo del mínimo establecido o por estar en zona manchada, fue de 3145 sondas de un total de 13057 sondas impresas (24,1%), quedando así sondas válidas para unos 4000 unigenes. La media de puntos eliminados en las micromatrices del experimento con CN ascendió hasta un 24,3%. En cambio, en el experimento realizado con F, la eliminación media fue del 16,9%. Diferentes controles de calidad de las hibridaciones, como el ruido de fondo obtenido en cada micromatriz y la media del balance de la señal respecto al fondo, indicaron que la disminución del porcentaje de eliminación en la serie de F (que fue la última en llevarse a cabo) se debió a la mayor experiencia adquirida cuando se analizó la serie de F, más que a un mayor número de genes expresados en esta variedad.

3. ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DE LA SERIE DE ALMACENAMIENTO EN FRÍO EN LA VARIEDAD SENSIBLE FORTUNE

Frecuentemente los frutos de la variedad de mandarinas F desarrollan DF durante el almacenamiento postcosecha a 2°C, mientras que los de la variedad CN son tolerantes al frío. La progresión de esta fisiopatología en F se inicia con ligeros síntomas visibles de DF en la corteza del fruto durante las dos primeras semanas de almacenamiento. Entre dos y cuatro semanas de postcosecha a bajas temperaturas los daños observados en la corteza son medios y a partir de la cuarta semana son severos (Fig. 5 de la Introducción).

3.1 Identificación de genes con cambios de expresión significativos en el flavedo de mandarinas Fortune durante su almacenamiento en frío

Tras aplicar los controles y filtros de calidad descritos en Materiales y Métodos (apartado 8.5) a los datos de las hibridaciones de la serie de F, se seleccionaron 9006 sondas válidas. El término sonda, en este caso, se refiere a los cDNAs impresos en la micromatriz y que hibridan con los transcritos cuya abundancia en las muestras se pretende estimar. Con las sondas válidas tras los controles de calidad, se realizó un análisis SAM mclase fijando el FDR=5% para la identificación de genes con expresión significativamente diferencial a lo largo de la serie. De este modo, se identificaron 3923 sondas diferencialmente expresadas (correspondientes a 2035 unigenes) (Tabla Supl. 4a).

3.1.1 Aproximación general a los cambios transcriptómicos del flavedo durante el almacenamiento de mandarinas Fortune en frío

Se realizó un PCA sobre los datos de expresión de las 3923 sondas con cambios de expresión significativos, para averiguar cómo se distribuía la variabilidad de los datos entre las muestras. Más del 80% de la variabilidad del transcriptoma entre las muestras de F se explicó con los dos primeros componentes (Fig. 17). El primer componente (PC1) explicó más del 60% de la variabilidad y ordenó las muestras en relación con el tiempo que estuvieron sometidas a frío, revelando las mayores diferencias entre las muestras recién traídas de campo y la primera muestra sometida a frío (7 d a 2°C). El PC1 también identificó diferencias importantes entre 14 y 28 d en

frío, coincidiendo con el periodo de mayor desarrollo de DF en el fruto de F. Las muestras de 28 y 45 d resultaron las más similares. El análisis de los transcritos que más contribuían al PC1 identificó a aquellos que se ajustaron a un perfil progresivo y alcanzaron un *plateau* de expresión con las muestras 28 a 45 d. Por otra parte, el segundo componente (PC2) explicó hasta un 20% de la variabilidad y separó las muestras de 7 y 14 d de las demás, con las mayores diferencias entre los dos tiempos iniciales y otro salto de variabilidad importante de 7-14 d a 28-45 d en frío de sentido contrario. Los genes que contribuyeron a este PC2 fueron aquellos que siguieron un patrón con máxima inducción o represión en los estadios 7 ó 14, para retornar a valores menores de inducción o represión con las muestras almacenadas durante más tiempo. El PC2, y con él el patrón de expresión de los genes asociados, podrían estar reflejando por una parte la respuesta al frío hasta los 14 d y la posterior inflexión podría asociarse con el cese de la respuesta ante el fuerte incremento en la severidad de los daños a partir de los 14 d, según describieron Sanchez-Ballesta *et al.* (2003).

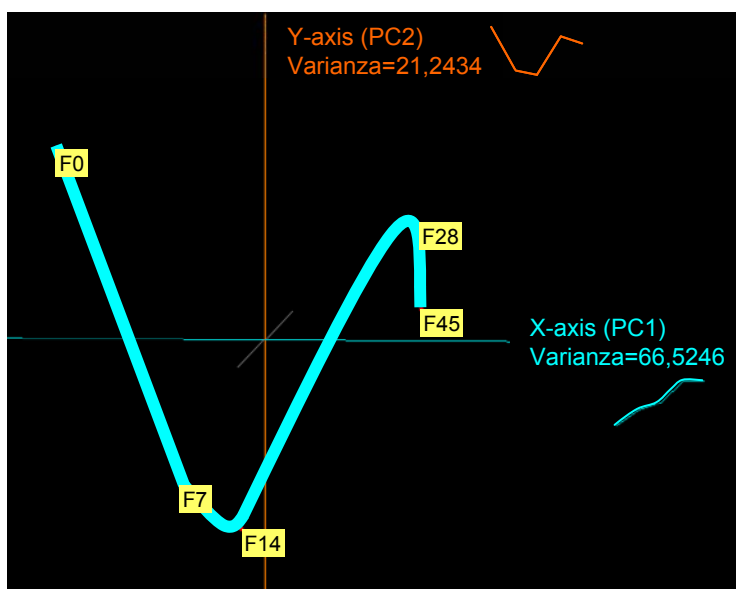


Figura 17. PCA correspondiente a los datos de expresión de las mandarinas F en los diferentes estadios de la serie de almacenamiento postcosecha en frío. Cada punto de la serie temporal representa los datos de expresión promedio de las 4 réplicas que lo forman. Se consideraron los datos de expresión de las 3923 sondas diferenciales según el estadístico SAM mclase, con un FDR=5%.

Un agrupamiento no jerárquico de los genes en función de sus perfiles temporales de expresión mediante un análisis SOM permitió clasificar las 3923 sondas con expresión diferencial en F en 8 patrones (Fig. 18, Tabla Supl. 4). En estos perfiles de expresión se reflejaron de nuevo las dos tendencias mayoritarias identificadas

mediante el PCA. Seis grupos (1, 3, 4, 5, 6 y 8) respondían a patrones con la misma tendencia durante la serie, con un cambio más o menos fuerte entre 0 y 7 y/o entre 14 y 28 d de almacenamiento a 2°C (como los que contribuyeron al PC1 del PCA), que incluyeron un total de 2938 sondas. Los dos patrones de expresión restantes (2 y 7) poseían un pico a los 14 d a 2°C y en ocasiones otra inflexión menor a los 28 d (como los que contribuyeron al PC2), incluyendo 985 sondas. Al igual que en el PCA, los patrones de expresión revelaron cambios a lo largo de la serie temporal en bloques: F0 separada del bloque formado por F7 y F14, a su vez separadas del bloque de los dos últimos tiempos F28 y F45. Los cambios de mayor magnitud ocurrieron entre 7 y 14 d, correspondiendo con el periodo de incremento en la severidad de los daños. Sin embargo, el periodo entre 0 y 7 d en frío fue en el que se detectaron mayor número de genes con cambios de expresión, aunque éstos fueron de menor magnitud. Del agrupamiento SOM (Fig. 18) también se deduce que el número de genes que ven reducida su expresión durante el almacenamiento en frío fue considerablemente mayor que los que la aumentaron (2365 sondas con perfil de represión [grupos 1, 5, 6 y 7], frente a 1558 sondas con perfil de inducción [grupos 2, 3, 4, y 8]).

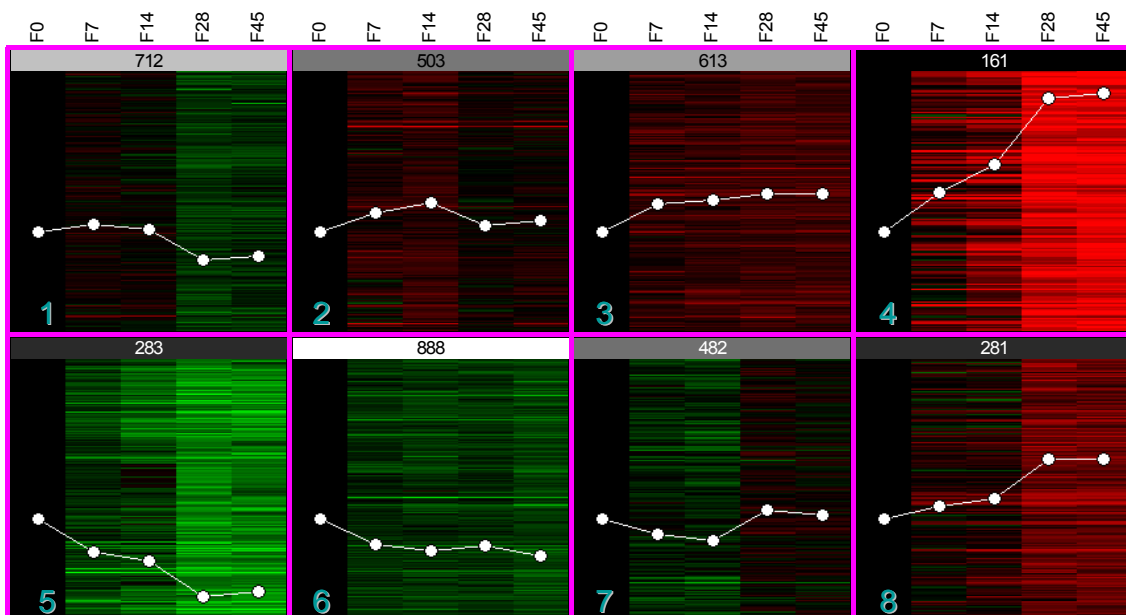


Figura 18. Análisis de agrupamiento no jerárquico de los perfiles de expresión mediante mapas auto-organizados (SOMs) de las 3923 sondas diferenciales en la serie de almacenamiento postcosecha en frío de frutos de F. Se muestra el agrupamiento en 8 grupos SOM resultantes de un análisis 4x2. En rojo se representan los valores de inducción, en verde los de represión y en negro los valores que no cambian respecto a F0. En cada SOM se muestra la línea representativa del perfil promedio del grupo y en la parte superior se indica el número de sondas que se incluyen dentro del perfil.

3.1.2 Análisis funcional de los cambios transcriptómicos del flavedo durante el almacenamiento de mandarinas Fortune en frío

Con el fin de averiguar el significado biológico de los cambios de expresión detectados durante la serie temporal de F, se analizaron las categorías funcionales subyacentes a las 3923 sondas con cambios de expresión significativos, empleando los programas FatiGO y MapMan (apartado 8.5 de Materiales y Métodos). Para poder aplicar estas dos herramientas, se procedió primero a asignar a los genes diferenciales la anotación uniAt más adecuada. Se consiguió asociar 2817 de las sondas diferenciales con un gen de *Arabidopsis* mediante BLASTX contra la base de datos del TAIR, tal y como se hizo con cada clon de la genoteca (apartado 8.5 de Materiales y Métodos). Ello resultó en la asignación de un código AGI para cada una de las sondas diferenciales. Siguiendo esta metodología y tras eliminar la redundancia se consiguió asignar 1478 uniAts que fueron sometidos a un análisis posterior.

Se realizó un análisis de enriquecimiento funcional de aquellas categorías funcionales según la clasificación de GO (Ashburner *et al.*, 2000) que se encontraron sobrerrepresentadas o infrarrepresentadas de forma significativa (p -valor $<0,05$) en cada uno de los grupos, utilizando para ello el algoritmo implementado por el programa FatiGO. En primer lugar, se separaron los uniAt en función de su tendencia general de inducción o represión en la serie de F, de acuerdo con el agrupamiento en SOMs (Fig. 18): se consideraron por un lado los 4 patrones de expresión de inducción [grupos 2, 3, 4 y 8] (1558 sondas, 841 unigenes, 593 uniAt; Tabla Supl. 4a) y por otro los 4 de represión [grupos 1, 5, 6 y 7] (2365 clones, 1296 unigenes, 1005 uniAt; Tabla Supl. 4a) y, a continuación, se analizó el enriquecimiento en la representación de categorías de GO de cada grupo respecto a los 3603 uniAt identificados en la micromatriz (Tabla Supl. 5).

Entre los genes inducidos no se identificó ninguna categoría significativamente enriquecida. En cambio, el análisis de los genes reprimidos sí fue informativo y se halló sobrerrepresentación en *procesos biosintéticos*, en concreto, la *traducción* acompañada del *ensamblaje de cromatina* y de *complejos proteína-DNA* fueron los procesos biológicos más sobrerrepresentados (Tabla 9). También se halló sobrerrepresentación de la función molecular de *unión a actina* (Tabla 9).

TABLA 9. Categorías funcionales enriquecidas entre los genes (uniAt) reprimidos en la serie de F (genes diferenciales según el análisis Fmclase con perfil de represión según el agrupamiento SOM) respecto a los presentes en la micromatriz

Proceso biológico	FDR	Nivel ²	Fmclase	Micromatriz
	p-valor ¹		reprimidos	
Proceso biosintético de macromoléculas	3,55e-04	5	50,00%	10,75%
Traducción	1,03e-03	6	48,00%	10,40%
Organización y biogénesis de orgánulos	3,44e-02	4	29,63%	6,13%
Ensamblaje y desensamblaje de cromatina	3,44e-02	8	44,44%	3,21%
Proceso metabólico de macromoléculas	3,52e-02	3	77,78%	42,23%
Establecimiento y/o mantenimiento de cromatina	3,52e-02	7	30,77%	2,37%
Proceso biosintético celular	3,87e-02	4	48,15%	17,80%
Ensamblaje de cromatina	4,51e-02	9	57,14%	5,22%
Ensamblaje de complejos DNA-proteína	4,61e-02	5	15,38%	1,23%
Procesos biosintéticos	4,92e-02	3	48,15%	18,81%

Función molecular	FDR	Nivel ²	Fmclase	Micromatriz
	p-valor ¹		reprimidos	
Constituyentes estructurales del ribosoma	1,33e-06	3	46,15%	4,87%
Unión a actina	3,52e-02	5	28,57%	0,26%

⁽¹⁾ p-valor<0,05

⁽²⁾ El nivel dentro de la ontología en el que se encuentra la categoría (de 3 a 9, de general a específico).

Se trató de profundizar en la diferencia de funciones entre los uniAt inducidos y los reprimidos, mediante otro análisis de enriquecimiento (en lugar de comparar cada patrón por separado respecto de la representación de la categoría funcional en la micromatriz global como referencia). Se identificaron varios procesos enriquecidos significativamente, todos sobrerrepresentados entre los genes reprimidos respecto a los inducidos, y además, el resultado fue similar al de la comparación de los reprimidos con la micromatriz. El proceso biológico enriquecido entre los genes reprimidos correspondió a *procesos biosintéticos de macromoléculas*, y más específicamente a la *traducción* (Tabla 10). La función molecular más reprimida fue la *ribosomal* (Tabla 10), sugiriendo una vez más que la traducción de proteínas podría estar comprometida, ya que hubo muchos genes implicados reprimidos y su función parece que no se compensó con la inducción de otras isoformas.

TABLA 10. Categorías funcionales enriquecidas entre los genes (uniAt) inducidos respecto a los reprimidos en la serie de F (genes diferenciales según el análisis Fmclase con perfil de inducción o represión según el agrupamiento SOM)

Proceso biológico	FDR	Nivel ²	Finducidos	Freprimidos
	p-valor ¹			
Proceso biosintético de macromoléculas	1,79e-06	5	4,27%	21,44%
Traducción	1,21e-05	6	3,03%	19,85%
Proceso biosintético	1,64e-05	3	14,40%	32,39%
Proceso biosintético celular	2,34e-05	4	13,14%	30,60%
Proceso metabólico celular de macromoléculas	1,08e-02	4	19,07%	33,14%
Proceso metabólico primario	2,54e-02	3	48,00%	62,31%
Proceso metabólico proteico	4,86e-02	4	19,07%	31,38%

Función molecular	FDR	Nivel ²	Finducidos	Freprimidos
	p-valor ¹			
Constituyentes estructurales del ribosoma	9,55e-06	3	0,75%	10,51%

⁽¹⁾ p-valor<0,05

⁽²⁾ El nivel dentro de la ontología en el que se encuentra la categoría (de 3 a 9, de general a específico).

Complementariamente a los análisis de enriquecimiento funcional, se investigó la implicación funcional y metabólica de los cambios identificados a través del análisis de los equivalentes a los uniAt con cambios de expresión significativos en la serie de F. Se utilizó en este caso el programa MapMan, que permite visualizar los datos de expresión en mapas de rutas metabólicas y funciones celulares, así como detectar aquellas con un comportamiento significativamente diferencial (apartado 8.5 de Materiales y Métodos). En la Tabla 11 se visualizan las categorías significativamente diferenciales (según el test de Wilcoxon con la corrección de Benjamini-Hochberg para tests múltiples) identificadas a partir de los datos de expresión de los genes diferenciales en F (Tabla Supl. 4b). MapMan reveló categorías con comportamiento significativamente diferencial equivalentes a las halladas en el enriquecimiento funcional (*síntesis proteica*, *proteínas ribosomales* y *regulación de la transcripción*), pero también otras como el *metabolismo de lípidos*, el de *etileno* y la relacionada con *GST*.

Los genes relacionados con la *fotosíntesis*, que codifican proteínas de unión a clorofila a/b (*chlorophyll a/b binding protein*), se indujeron a los 7 d a 2°C y luego se reprimieron (Tabla Supl. 4b). Este aumento podría ir dirigido a disipar el estrés oxidativo debido al estrés por frío, como se ha propuesto que ocurre en el maíz donde

el aumento en la expresión de los genes *rubisco* y los relacionados con el *malico* (Foyer *et al.*, 2002), pueden tener esa función además de ser enzimas limitantes en la fotosíntesis en condiciones de aclimatación al frío.

TABLA 11. Categorías funcionales (MapMan) con comportamiento diferencial (según el test de Wilcoxon Rank-Sum) de los uniAt con expresión diferencial en la serie de almacenamiento en frío en F

BIN	CATEGORÍA	uniAt	p-valor<0,05			
			F7	F14	F28	F45
1	Fotosíntesis	41			0,0386	
10	Pared celular	39	0,0291	4,50E-3	7,85E-4	3,11E-3
10.2	Pared celular. Síntesis de celulosa	6			0,0186	0,0278
11	Metabolismo de lípidos	45	0,0370			
11.6	Metabolismo de lípidos. Proteínas de transferencia de lípidos	5	0,0441		0,0291	
17.5	Metabolismo hormonas.Etileno	8	0,0369			
26.9	Misc.glutación S transferasa	7			0,0300	
27	RNA	117				
27.3	RNA.regulación de transcripción	91	1,98E-4	0,0174		
29	Protein	259	0,041	4,92E-4		0,0311
29.2	Proteína.síntesis	95	3,96E-5	2,26E-9	5,29E-4	2,83E-7
29.2.2	Proteína.síntesis.misc.proteína ribosomal	65	4,12E-5	2,25E-9	0,0180	1,98E-5
35	No asignado	375		3,56E-5		
35.1	No asignado.no ontología	160		0,0285		
35.2	No asignado.desconocido	89		0,0412		

Varios procesos relacionados con la *pared celular* mostraron comportamiento diferencial (Tabla Supl. 4b). Mientras que algunos genes de la síntesis de celulosa se reprimieron, se indujeron los correspondientes a enzimas de degradación de pared celular (*pectato liasas*, *pectin liasas*, *xilosil-endotransglicosilasas*). Ambas tendencias podrían estar relacionadas con el ablandamiento del fruto durante la postcosecha y desarrollo de daños (Prasanna *et al.*, 2007; Sanchez-Ballesta *et al.*, 2008; Maul *et al.*,

2008). Nos obstante, en cítricos se produce mayor ablandamiento en los frutos almacenados a 12°C que a 2°C, pero la inducción de un gen β -1,3-glucanasa se relaciona con el DF y no con el ablandamiento (Sanchez-Ballesta *et al.*, 2008).

En general, los genes de síntesis de *lípidos* se reprimieron (7 de 11 uniAt; Tabla Supl. 4b) y también algunas *desaturadas de ácidos grasos* (3 de 5 uniAt). Si la inducción de desaturadas de ácidos grasos se ha asociado al acondicionamiento a las bajas temperaturas y a la tolerancia (Murata *et al.*, 1992; Tang *et al.*, 2007), entonces la represión en los frutos de F podría estar asociada al desarrollo de síntomas de DF detectados. Aunque el grado de insaturación de lípidos de membrana en F no parece ser un elemento determinante en la tolerancia al frío (Mulas *et al.*, 1996, 1997).

TABLA 12. Genes uniAt diferenciales en F clasificados en la categoría *etileno*

AGI	log ₂ F7/F0*	Descripción
At2g30830	0,967	Putativo 2-oxoglutarato-dependiente dioxigenasa
At3g61510	0,444	Putativo ACS
At1g05010	1,639	ACO
At1g03400	0,757	ACO
At3g04580	0,966	Putativo receptor de etileno (EIN4)
At3g20770	0,068	Insensible a etilenos 3 (EIN3)
At3g53990	-0,120	Hipotética proteína ER6
At3g58680	0,196	Putativo coactivador transcripcional de respuesta a etileno
At2g23620	1,312	Similar a esterasa inducible por etileno (<i>Citrus sinensis</i>)

(*) Media de las cuatro replicas de log₂F7/F0. Los valores de expresión negativos indican represión, los positivos inducción, respecto el valor a tiempo cero.

El análisis de enriquecimiento de categorías funcionales también reveló una posible implicación de la señalización por ET en la respuesta al frío en F, ya que la categoría *metabolismo hormonal/etileno* estaba significativamente destacada. Una inspección detallada reveló que durante toda la serie temporal hubo genes inducidos etiquetados con relación con ET y que correspondían a genes de síntesis (un gen *dioxigenasa dependiente de 2-oxoglutarato*, dos ACO y un ACS), lo cuál sugiere que podría aumentarse la producción de ET en el flavedo durante la postcosecha de las mandarinas en frío (Tabla 12) (Martinez-Téllez y Lafuente, 1997; Lafuente *et al.*, 2003). La inducción de un gen homólogo a *EIN3*, uno de los elementos principales en la activación de la respuesta a ET en *Arabidopsis* (Chao *et al.*, 1997) también apunta hacia la activación por frío de la respuesta a esta hormona en el flavedo. También se halló inducción de un homólogo al receptor *EIN4*. Es interesante el aumento de expresión del gen *esterasa* inducible por ET, homólogo al gen de *Citrus sinensis* que

se induce fuertemente en hojas tratadas con ET acompañado del aumento de actividad enzimática (Zhong *et al.*, 2001). Además, este gen incrementa débilmente su expresión tras una herida. Por tanto, este gen podría estar regulado por ET o por cierta percepción al estrés por frío.

La mayoría de genes *GSTs* se inducían desde la primera semana de almacenamiento en frío hasta la última semana estudiada, presentando un pico en la inducción en F28, con un valor mayor al doble que F0 (Fig. 19). Las enzimas *GST* forman una amplia familia con una importante función en el mecanismo de defensa frente a xenobióticos, conjugando los compuestos químicos tóxicos para la célula (Armstrong, 1997). La inducción de estos genes en el flavedo de F podría estar implicada en la respuesta de aclimatación al estrés causado por las bajas temperaturas, como ocurre en hojas de *Citrus sinensis* con el gen *CsGSTU1* (Lo Piero *et al.*, 2009), o en *Arabidopsis* con el gen *GSTF3* (*At1g02930*) que, además de ser de respuesta al frío, se induce en respuesta a otros agentes causantes de estrés (Kilian *et al.*, 2007) y correspondería al unigen *aCL113Contig1* de cítricos. Mayores niveles de glutatión suelen correlacionar con mayor tolerancia al frío (Kocsy *et al.*, 2000a, b), al igual que la sobreexpresión de *GSTs* (Roxas *et al.*, 1997; Zhao *et al.*, 2006). Sería interesante comprobar si en el flavedo de F incrementan los niveles de glutatión y sus conjugados en respuesta al frío, pero dado el desarrollo de DF en estas mandarinas, este aumento no sería suficiente para prevenir todos los efectos del estrés.

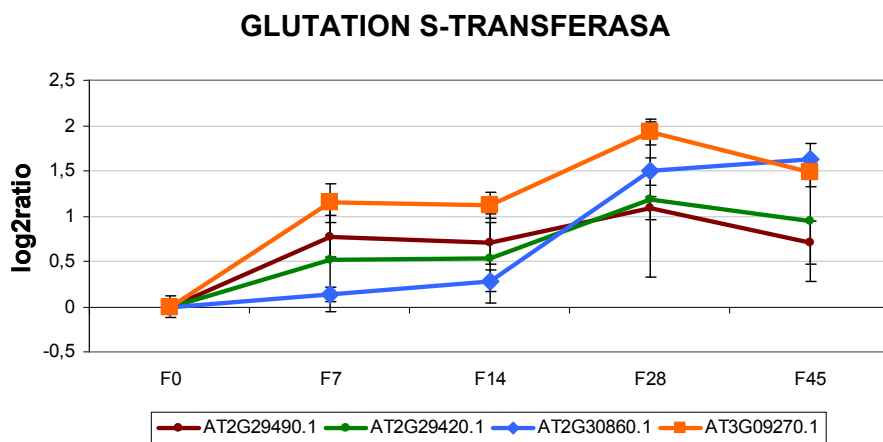


Figura 19. Perfil de expresión de varios uniAt homólogos a *GST* normalizados a F0. Los valores de $\log_2\text{ratio}$ ($\text{ratio} = F_x/F_0$ siendo F_x cada muestra de la serie temporal de frutos F) negativos indican represión, los positivos inducción, respecto el tiempo 0.

La expresión de genes de la categoría *síntesis de proteínas* se reprimió tras la primera semana de almacenamiento a 2°C, y más todavía tras la segunda. Por el contrario, la categoría funcional *degradación de proteínas* estaba inducida. Estos datos

sugieren que el flavedo de F podría entrar en una fase de ahorro energético y aprovechamiento de los recursos en la que la maquinaria celular invertiría sus esfuerzos en contrarrestar la situación de estrés (Lyons, 1973; Wang, 1982), o alternativamente que las bajas temperaturas afecten la conformación proteica y las proteínas mal plegadas son eliminadas proteolíticamente (Schaffer y Fischer 1988, 1990; Taylor, 1987; Hershko, 1988).

4. IDENTIFICACIÓN DE GENES CON CAMBIOS DE EXPRESIÓN SIGNIFICATIVOS EN EL FLAVEDO DE MANDARINAS CLEMENULES DURANTE SU ALMACENAMIENTO EN FRÍO

En el experimento con CN los datos se trataron de igual modo que en el ensayo equivalente con la serie de F (apartado 8.5 de Materiales y Métodos). Siguiendo ese procedimiento, se eliminaron aquellos datos de expresión que no superaron los criterios de calidad, considerando finalmente 7103 sondas como válidas (Tabla Supl. 6a).

4.1 Identificación de genes con expresión significativamente diferencial en la serie temporal de Clemenules

4.1.1 Aproximación general a los cambios transcriptómicos del flavedo durante el almacenamiento en frío de mandarinas Clemenules

Los datos de expresión de las 7103 sondas que superaron los filtros de calidad, se analizaron con el test estadístico SAM mclase (CNmclase), dirigido a la búsqueda de genes que mostraban expresión diferencial en alguno de los estadios respecto al inicial. El test identificó 1739 sondas (930 unigenes) con expresión diferencial, aplicando un FDR=5% (Tabla Supl. 6a).

Como primera aproximación a la distribución de la variabilidad de los datos entre los puntos temporales contemplados, se realizó un PCA sobre los datos de expresión de las 1739 sondas diferenciales. El PCA indicó que la mayor parte de la variabilidad (más del 90%) se explicó por los dos primeros componentes que comprendieron el 66,5% (PC1) y el 27,8% (PC2) (Fig. 20). El PCA indicó claramente que las muestras de tiempos cortos se parecían mucho entre sí, y divergían a tiempos

mayores. De acuerdo con el PC1, el transcriptoma variaba en el sentido de la serie temporal durante las tres primeras semanas, después de un salto grande desde tiempo cero a la primera semana. Sin embargo, la tendencia respecto al PC1 se revertía después de las tres semanas y en los frutos del estadio tardío de 56 d de almacenamiento en frío quedaba al nivel del estadio inicial. En cambio, el PC2 no mostró variabilidad durante la primera semana y a partir de entonces las muestras se separaron progresivamente en el mismo sentido y proporcionalmente al tiempo de almacenamiento, de modo que la muestra de 56 d quedó muy separada del estadio inicial.

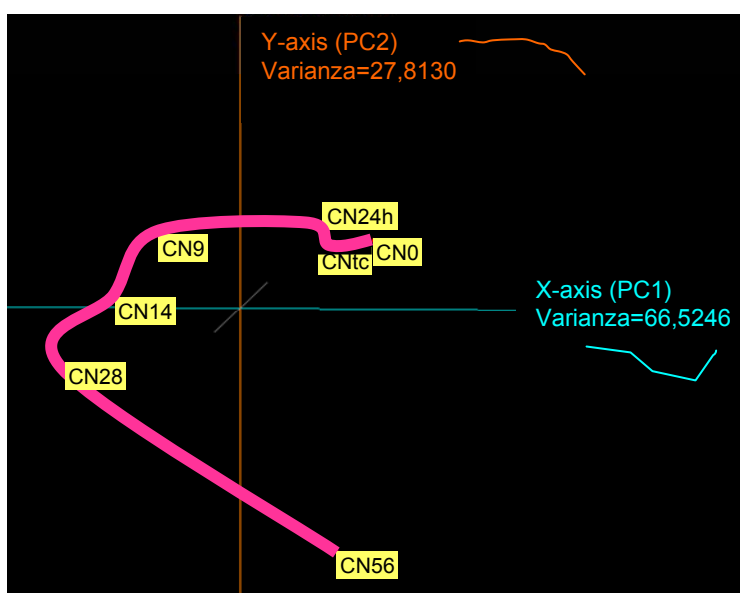


Figura 20. Análisis PCA correspondiente a los datos de expresión de las mandarinas CN en los diferentes estadios de la serie de almacenamiento postcosecha en frío. Cada punto de la serie temporal representa el dato de expresión promedio de las 4 réplicas que lo forman. Se consideraron los datos de expresión de las 1739 sondas diferenciales según el estadístico SAM mclase con un FDR=5%.

Con las 1739 sondas diferenciales en CN se identificaron mediante análisis SOM ocho patrones temporales de expresión diferentes (Fig. 21). Este agrupamiento mostró las grandes tendencias que, además, fueron compatibles con los resultados del PCA. Estas tendencias describieron cambios en el mismo sentido hasta los 28 d de exposición al frío, generalmente presentando las diferencias más acusadas entre 0 y 9 d, y una reversión de la expresión a los 56 d hacia niveles iniciales (patrones 2, 5 y 8) o incluso más pronunciada (patrones 1, 3 y 7). También, se pudo distinguir dos grandes tendencias: genes inducidos (patrones 3, 4, 7 y 8) o reprimidos (patrones 1, 2, 5 y 6), aunque los reprimidos fueran aproximadamente 9% más numerosos (Fig. 21).

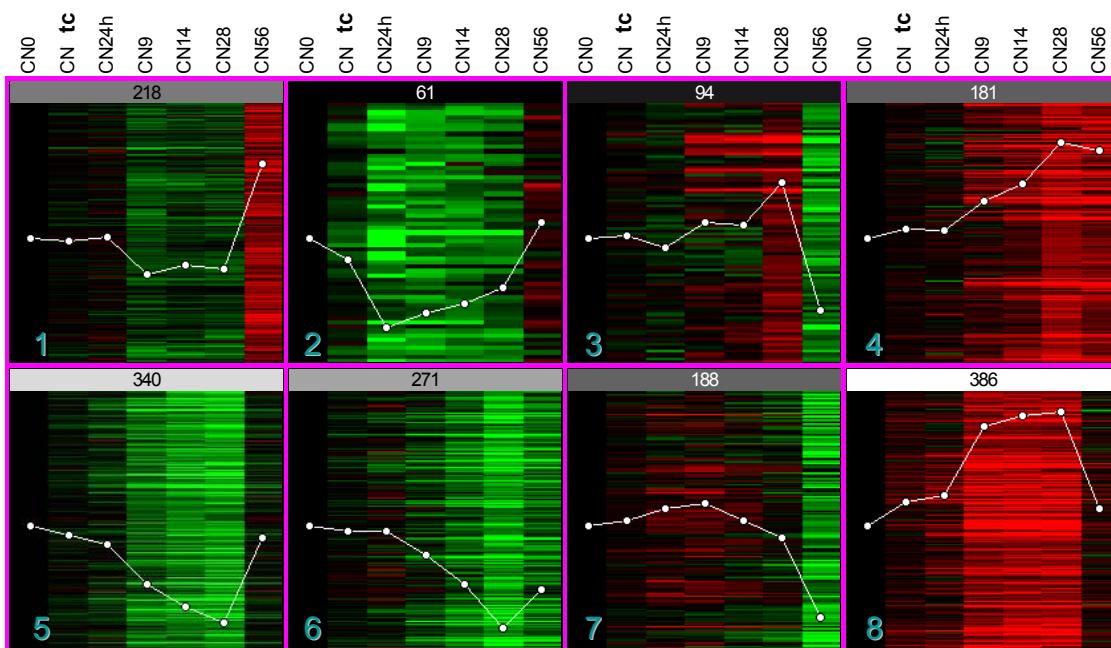


Figura 21. Análisis de agrupamiento no jerárquico de los perfiles de expresión mediante mapas auto-organizados (SOMs) de las 1739 sondas diferenciales en la serie de almacenamiento postcosecha en frío de frutos de CN. Se muestra el agrupamiento en 8 grupos SOM resultantes de un análisis 4x2. En rojo se representan los valores de inducción, en verde los de represión y en negro los valores que no cambian respecto a CN0. En cada SOM se muestra la línea representativa del perfil promedio del grupo y en la parte superior se indica el número de sondas que se incluyen dentro del perfil.

4.1.2 Análisis funcional de los cambios transcriptómicos del flavedo durante el almacenamiento en frío de mandarinas Clemenules

El significado biológico de los cambios de expresión detectados durante la serie temporal de CN se analizó empleando los programas FatiGO y MapMan. Para ello, previamente se consiguió asociar un código AGI a 1263 de las 1739 sondas diferenciales, que tras eliminar la redundancia, resultaron en 690 uniAt susceptibles de análisis posterior.

Se realizó un análisis de enriquecimiento funcional buscando sobrerrepresentación o infrarrepresentación significativa (p -valor $<0,05$) en categorías de GO en los grupos de genes con perfil de inducción y de represión de acuerdo con la agrupación resultante del análisis SOM. Por un lado se consideraron los cuatro patrones de expresión de inducción (patrones 3, 4, 7 y 8 en Fig. 21) (849 sondas, 434 unigenes, 312 uniAt; Tabla Supl. 6a), y por otro, los cuatro de represión (patrones 1, 2, 5 y 6 en Fig. 21) (890 clones, 519 unigenes, 401 uniAt; Fig. 21, Tabla Supl. 6a). A continuación, se analizó el enriquecimiento en la representación de categorías de GO

de cada grupo respecto a los 3603 uniAt identificados en la micromatriz (Tabla Supl. 5).

Entre los uniAt inducidos no se identificó enriquecimiento significativo respecto a la micromatriz en ninguna de las categorías contempladas. En cambio, entre los uniAt reprimidos sí se hallaron categorías enriquecidas significativamente (Tabla 13). En concreto, se halló sobrerrepresentación de la categoría de procesos biológicos de la *traducción*, por lo que se puede decir que éste fue un proceso significativamente desactivado mientras las mandarinas CN estuvieron en la cámara a 2°C. Este resultado se fortaleció al averiguar la sobrerrepresentación entre los genes reprimidos de las funciones moleculares de: *constituyentes estructurales del ribosoma* y *unión a actina*, y de los componentes celulares: *ribosomas* y *orgánulos con unión a membrana intracelular* (Tabla 13). La represión de funciones relacionadas con la traducción de proteínas durante el almacenamiento en frío en CN fue similar al resultado de la serie de F, pero en F también se observó un peso importante del *ensamblaje de la cromatina* entre los genes reprimidos.

Asimismo, la sobrerrepresentación de la función molecular de *unión a actina* mayor en CN podría reflejar que en esta variedad el frío decelerara los procesos biosintéticos y que en F, al mismo tiempo de esta deceleración, se diera un deterioro celular. Los experimentos de Orvar *et al.* (2000) indican que la reorganización del citoesqueleto es un componente integral de la señal de transducción de bajas temperaturas, sirviendo como enlace entre la rigidez de la membrana y el flujo de calcio en la aclimatación de cultivos celulares de alfalfa. De modo que, tras una

TABLA 13. Categorías funcionales enriquecidas entre los genes (uniAt) reprimidos en la serie de CN (genes diferenciales según el análisis CNmclase con perfil de represión según el agrupamiento SOM) respecto a los presentes en la micromatriz

Proceso biológico	FDR p-valor ¹	Nivel ²	CNmclase reprimidos	Micromatriz reprimidos
Traducción	1,42e-02	6	53,14%	11,62%
Proceso biosintético de macromoléculas	3,47e-02	5	53,33%	12,29%
Función molecular	FDR p-valor ¹	Nivel ²	CNmclase reprimidos	Micromatriz reprimidos
Constituyentes estructurales del ribosoma	2,76e-04	3	53,33%	5,64%
Unión a actina	7,21e-03	5	100%	0,42%

⁽¹⁾ p-valor<0,05

⁽²⁾ El nivel dentro de la ontología en el que se encuentra la categoría (de 3 a 9, de general a específico).

respuesta rápida y temprana que desencadenaría respuestas a las temperaturas las categorías *ribosomas* y *orgánulos con unión a membrana intracelular* se reprimirían.

Adicionalmente, se realizó otro análisis de enriquecimiento en el que se comparó la representación en categorías de GO entre los genes inducidos y los reprimidos en CN. El resultado fue que la categoría *procesos biosintéticos celulares* estaba significativamente más reprimida que inducida (Fig. 22).

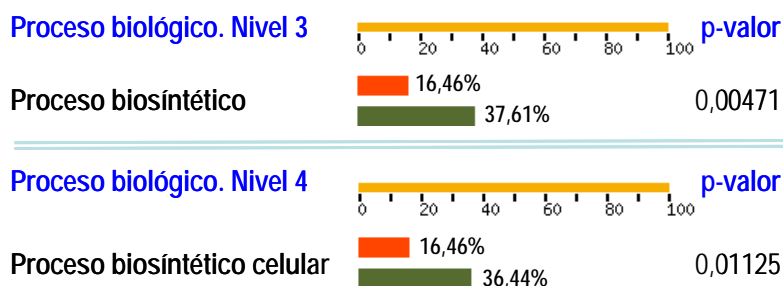


Figura 22. Categorías funcionales enriquecidas en los genes (uniAt) inducidos respecto a los reprimidos en frutos de CN durante su almacenamiento en frío. En la derecha, se muestra el p-valor de significatividad de cada categoría estadísticamente diferencial ($p\text{-valor} < 0,005$). En la izquierda, se muestra la categoría GO y el nivel en el que se encuentra (de 3 a 9, de general a específico). El diagrama de barras representa el porcentaje de genes (uniAt): inducidos en color naranja, reprimidos en verde.

En definitiva, de estos análisis funcionales se deduce que la exposición al frío detiene una porción importante de los procesos biosintéticos que tienen lugar en los frutos de CN recién traídos de campo, afectando especialmente a algunos relacionados con la síntesis proteica.

También se analizó mediante la aplicación MapMan el significado funcional de los genes regulados en la serie de CN a través de los uniAt correspondientes (Tabla 14). Según estos tests, se identificó comportamiento diferencial en categorías de *síntesis de proteínas* (en los puntos de la serie CN9 y CN14) confirmando así el resultado obtenido mediante el estudio de enriquecimiento funcional. También resultó diferencial la categoría de *pared celular* (en CN14) aunque debido sólo a un gen diferencial, en concreto a la inducción de un gen de modificación de pared *xiloglucosil-transferasa*. Por otra parte, resultó diferencial el comportamiento de la categoría *metabolismo de isoprenoides* (en CN14 y CN28), con una tendencia a la represión (Tabla Supl. 6b). Los genes que formaban parte del metabolismo secundario/isoprenoides, comenzaban a reprimirse desde CN9, y correspondían a genes de la ruta de biosíntesis de carotenoides (*geranilgeranil pirofosfato sintetasa*,

fitoeno sintasa, licopeno ciclasa, β-caroteno hidroxilasa) (Tabla Supl. 6b). Además de la propia síntesis de carotenos (activa en el flavedo y responsable del color del mismo), la ruta de síntesis de carotenoides está implicada también en la síntesis de precursores de ABA. El flavedo acumula niveles altos de ABA, que disminuyen en la postcosecha a 2°C (Lafuente *et al.*, 1997). Según esto, el estrés por frío a largo plazo no parecería inducir la síntesis de ABA en el flavedo sino todo lo contrario. En el posterior apartado 6.1 se comparan los resultados de F y CN, y se señala la inducción del gen activador de la respuesta a ABA, *ABI3* (Tabla 24).

TABLA 14. Categorías funcionales (MapMan) con comportamiento diferencial (según el test de Wilcoxon Rank-Sum) de los uniAt con expresión diferencial en la serie de almacenamiento en frío en CN

BIN	CATEGORÍA	uniAt	p-valor<0,05			
			CNtc	CN9	CN14	CN28
10	Pared celular	22			0,0374	
16.1	Metabolismo secundario.Isoprenoides	13			0,0374	0,0201
29.2	Síntesis proteica	53		0,0234	1,15e-3	
29.2.2	Síntesis proteica. Misc. proteína ribosomal	34		0,0154	1,95e-3	
35	No asignado	156	0,0459	0,0086	1,33e-4	0,00011
35.1	No asignado. No ontología	67			0,0404	
35.2	No asignado. Desconocido	89			0,0412	

Desde los 9 hasta los 28 d en frío, se notó una progresiva represión de gran parte de elementos implicados en la *biosíntesis proteica* (Fig. 23). En cambio, la degradación de proteínas mostró una tendencia a la activación a partir de CN9 (Fig. 23, Tabla Supl. 6b). La caída en la síntesis proteica y la activación de la proteólisis son procesos que también se detectaron en la serie de F y sugieren que, pese a que las mandarinas se conserven en frío y que CN no presenten daños visuales frente al mismo, estas mandarinas también podrían estar iniciando un programa de desarrollo característico de senescencia. Sin embargo, no se identificó la activación de otro tipo de genes relacionados con senescencia, por lo que la proteólisis podría estar relacionada con un programa de eliminación de proteínas incorrectamente plegadas por el estrés por frío (Schaffer y Fischer 1988, 1990; Taylor, 1987; Hershko, 1988).

Teniendo en cuenta la posible activación de la proteólisis en las mandarinas almacenadas en frío, sería interesante un análisis proteómico para determinar si el descenso general en la biosíntesis observado a nivel del transcriptoma es más acusado a nivel del proteoma o si la proteólisis afecta a alguna fracción específica del proteoma.

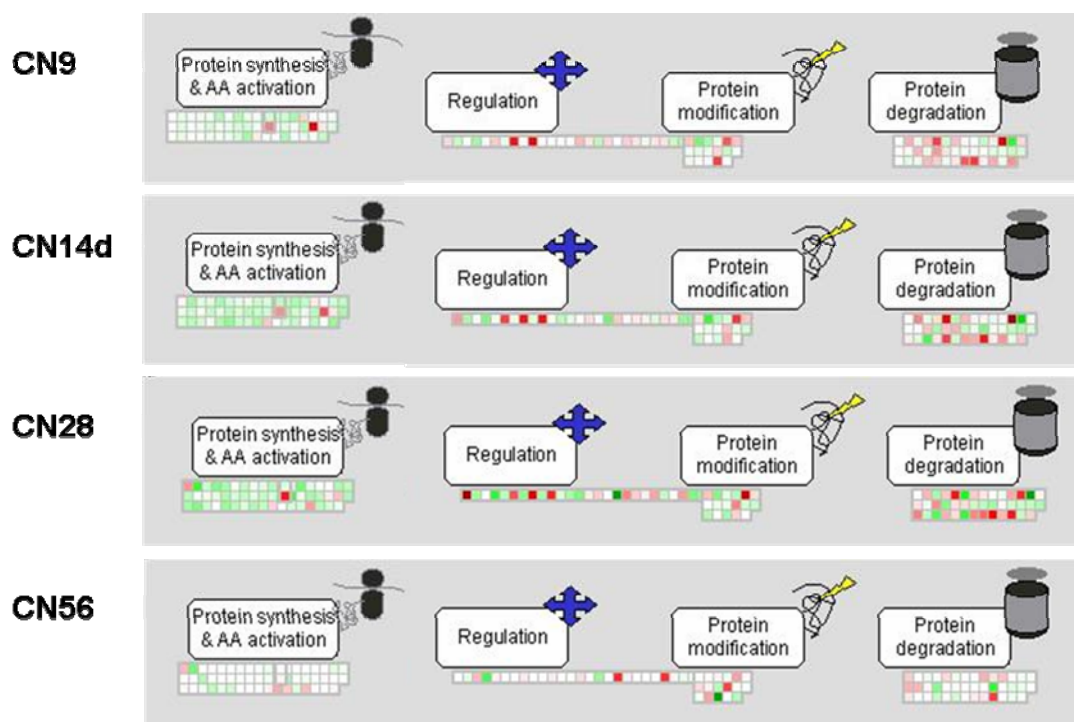


Figura 23. Representación de los datos de expresión de los uniAt significativamente diferenciales durante el almacenamiento en frío en CN en los mapas de MapMan correspondientes a la síntesis, degradación y modificación proteica. Se representan los datos de expresión normalizados a tiempo cero, en rojo los genes inducidos, en verde los reprimidos y en blanco los que no cambian respecto a CN0.

Como tendencia general en el *metabolismo central* de CN se observó una disminución en la expresión de enzimas metabólicas. De 9 a 28 d en frío se observaron numerosos cambios, muchos de ellos en genes implicados en la reacción lumínica de la *fotosíntesis*, la mayoría de ellos reprimidos durante ese periodo, pudiendo ser también indicativo de un cese del metabolismo primario (Tabla Supl. 6b).

Aunque en CN la categoría *fotosíntesis* no fuese diferencial por el test de Wilcoxon, una serie de genes relacionados con esta categoría se reprimieron. A tiempo cero, F tuvo mayor nivel de expresión que CN en genes de la clase *reacción lumínica* y menos expresados los del *ciclo de Calvin* y la *fotorrespiración* (Tabla Supl.

6b). La luz es necesaria para la acumulación de todos los componentes cloroplásticos y el frío retarda completamente el desarrollo de los cloroplastos en un sistema foliar de reverdecimiento. Yang *et al.* (2005) encontraron que la mayoría de genes reprimidos por frío (*cos*, *cold-supressed*) en hojas, tenían una función importante en el desarrollo del cloroplasto y la fotosíntesis. En el caso de las mandarinas donde el almacenaje a 2°C se realizó en una cámara fría en oscuridad se esperaba que todo el sistema fotosintético estuviese reprimido.

Al igual que en F, el *metabolismo de lípidos* en CN parecía estar reprimido, tanto en la síntesis y elongación de ácidos grasos, como en la degradación de lípidos

TABLA 15. Genes de CNmclase clasificados en la categoría *metabolismo de lípidos* en MapMan.

AGI	log ₂ ratio (*)				Descripción
	CN9	CN14	CN28	CN56	
FA elongación					
At2g22230	-0,406	-0,806	-1,122	-0,161	β-hidroxiacil-ACP deshidratasa
At1g08510	0,428	0,812	1,239	-0,698	acil-(proteína transportadora de acilos) tioesterasa
At5g36880	0,064	-0,19	-0,205	-0,474	Putativo acetil-CoA sintetasa
At1g55320	1,611	2,144	2,912	0,66	Enzima activadora de acilos 18 (AAE18)
At1g65890	0,073	-0,123	-0,856	-0,215	Enzima activadora de acilos 12 (AAE12)
At2g47240	-1,031	-1,086	-1,543	0,509	Ácido-graso de cadena larga-CoA ligasa
At5g04530	-0,889	-0,721	-0,845	-0,043	β-ketoacil-CoA sintasa
At2g26250	-1,405	-0,959	-1,539	0,026	β-ketoacil-CoA sintasa
At1g31812	-0,578	-0,752	-0,95	-0,545	acil-CoA unión proteína/ACBP
At2g43710	-0,731	-0,755	-1,145	0,262	acil-(acil-carrier-proteína) desaturasa
At1g01090	-1,196	-1,025	-0,89	-0,331	Subunidad α piruvato deshidrogenasa E1
FA desaturasa					
At2g43710	-0,731	-0,755	-1,145	0,262	S-ACP-DES (SSI2)
At5g05580 aCL5Contig18	-0,455	-0,98	-0,796	0,338	ω-3-FAD, cloroplasto, sensible a temperatura (FAD8)
At4g30950 aCL1Contig2	0,641	1,029	1,253	0,429	Ω-6-FAD, cloroplasto (FAD6)
Exóticos.esfingolípidos					
At3g07020	-0,915	-0,604	-0,787	0,168	UDP-glucosa:esterol glucosiltransferasa
At5g42890	0,32	-0,292	-0,932	-0,233	transportador estero 2 (SCP-2)
At5g20060	-0,434	-0,629	-1,152	-0,273	fosfolipasa/carboxilesterasa
At1g27980	0,375	0,595	0,63	-0,182	LCB 1-fosfato liasa
Degradación.lisofosfolipasas					
At5g20060	-0,434	-0,629	-1,152	-0,273	fosfolipasa/carboxilesterasa
At1g52570	-0,84	-0,933	-1,756	-0,692	PLD α 2
At3g51460	-1,177	-1,562	-2,38	-2,594	fosfoinositido fosfatasa SAC1
Degradación.β-oxidación.acilCoA.DH					
At1g06290	0,69	0,903	1,346	1,412	ACX3

(*) Media de las cuatro réplicas de log₂ratio=log₂CNx/CN0, siendo CNx cada muestra de la serie temporal CN. Niveles de expresión normalizados a CN0, los valores negativos indican represión y positivos inducción respecto el valor a tiempo cero.

por PLs. No obstante el único gen representante de la degradación por β -oxidación sí estaba fuertemente inducido a lo largo de la serie temporal (Tabla 15), lo cuál es de nuevo característico de procesos senescentes (Graham y Eastmond, 2002). El ungen *aCL5Contig18*, ω -3-FAD (ácido graso desaturasa), se reprimía a lo largo de la serie temporal hasta la mitad del valor de expresión recién traído de campo (Tabla 15). En cambio, el unigen *aCL1Contig2*, Ω -6-FAD, presentaba una fuerte inducción de tres a cuatro veces mayor nivel de expresión que el obtenido en las muestras recién traídas de campo (Tabla 15).

En F, pero no en CN, se identificó como categoría diferencial la categoría de genes relacionados con el ET con 8 genes implicados. Para investigar esta diferencia, se revisaron los datos de expresión de estos 8 genes en la serie de CN. Cuatro de los genes (*2-oxoglutarato dependiente dioxigenasa*, *At2g30830*; *ACO*, *At1g05010*; *ER6*, *At3g53990*; *esterasa inducida por ET*, *At2g23620*) también presentaron expresión diferencial en CN, con un patrón de expresión similar al de F (Fig. 24). Probablemente este efecto se explicaría por el menor número de sondas que pasaron los filtros de calidad después de las hibridaciones en CN. De hecho, al analizar los datos de expresión de los genes de biosíntesis de ET independientemente de la calidad de hibridación de las sondas, se observó que los perfiles de expresión eran similares en ambas variedades, aunque existen diferencias descritas en el siguiente apartado 5.2. Estos resultados se discuten en el apartado 6.2.

Genes de la categoría ETILENO

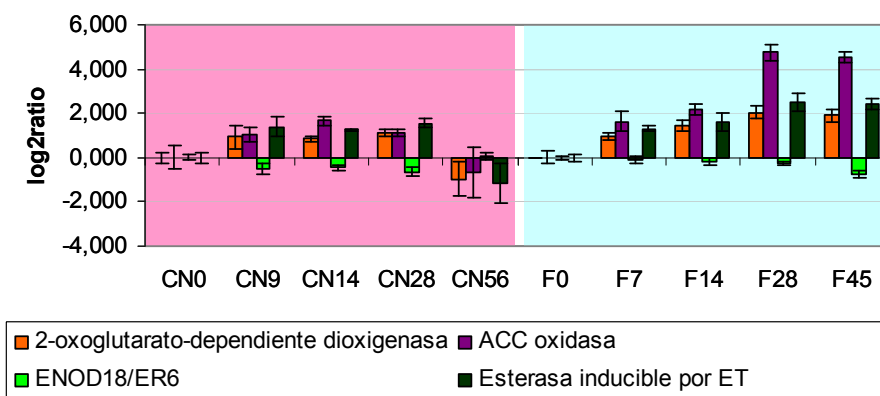


Figura 24. Valores de expresión de los genes comunes de F y CN de la categoría *etileno* según MapMan, normalizados respecto de sus niveles a tiempo 0. En el eje de las X se muestra el valor del log₂ratio, log₂CNx/CN0 (siendo CNx cada muestra de la serie temporal de CN) y log₂Fx/F0 (siendo Fx cada muestra de la serie temporal de F). En el eje Y las muestras de CN (rosa) y F (azul) en los cinco tiempos analizados de almacenamiento a 2°C. La barra de error corresponde a la sd de las cuatro réplicas.

4.2 Identificación de genes de respuesta rápida al frío en Clemenules

4.2.1 Análisis de la respuesta transcripcional del flavedo de mandarinas Clemenules durante las primeras horas de almacenamiento en frío

Para caracterizar la respuesta rápida de los frutos CN al almacenamiento a 2°C, se compararon los niveles de transcritos correspondientes a los frutos recién traídos de campo con los de los frutos que permanecieron durante cortos periodos de tiempo (pocas horas) a 2°C. Con el fin de identificar genes con expresión significativamente diferencial, se llevó a cabo un análisis SAM 2clases (ver Materiales y Métodos), atribuyendo el tiempo cero (frutos recién traídos de campo) a una clase, y los tiempos cortos (una mezcla de 2, 3.5 y 4.5 h a 2°C) a la segunda clase. Se detectaron muy pocos cambios significativos para esa respuesta rápida. El FDR mínimo con el que se obtuvieron genes diferenciales fue de 20%, identificando 5 sondas correspondientes a 4 genes (Tabla 16). A pesar de ser un resultado con baja confianza estadística, los genes fueron examinados. Tres de estos genes presentaron un patrón de expresión de inducción a tiempos cortos de exposición al frío, y esa inducción se acentuó en las muestras correspondientes a los 9 ó 28 d a 2°C, para disminuir a partir de ese punto, aproximándose a los valores iniciales en el estadio correspondiente a los 56 d (Tabla 17). Los niveles de estos transcritos aumentaron hasta 16 veces al cabo de pocas horas en frío. El único gen significativamente reprimido a tiempos cortos fue el *CCR4-associated factor 1 (CAF1)* que disminuyó su expresión 4 veces en este intervalo de tiempo.

TABLA 16. Genes diferenciales según el análisis SAM 2clases de CN0 y CNtc (2+3.5+4.5 h a 2°C)

Sonda/Unigen	Proceso biológico	Anotación	CN0*	CNtc*
C02014A09/aCL206Contig3	Metab. de RNA	CAF1	0	-0,9
C02021G11/aCL99Contig1	Metab. 2io	UDP-xilosiltransferasa	0	1,84
C04016D08/aCL99Contig1	Metab. 2io	UDP-xilosiltransferasa	0	1,75
C04002H12/aCL1751Contig1	Función desconocida	T26J12.8	0	0,93
C04019A12/aCL927Contig2	Metab. carbohidratos, pared celular	β-1,3-glucanasa 2	0	1,05

(*) Media de las cuatro réplicas del $\log_2\text{ratio} = \log_2(\text{CNx}/\text{CN0})$, siendo CNx CN0 ó CNtc. Los valores de expresión negativos indican represión, mientras que los positivos indican inducción respecto CN0.

En naranja se resaltan los genes procedentes de la genoteca FlavFr1.

Hay que destacar que esta respuesta rápida no fuese transitoria, puesto que la tendencia de expresión de estos cuatro genes a tiempos cortos se fue intensificando con el tiempo de exposición al frío; tan sólo se vio un retorno hacia los niveles de expresión iniciales en la muestra tardía de CN56 d (Tabla 17). De hecho, estos genes también se identificaron como diferencialmente expresados a lo largo de las series de tiempos largos de CN y F. Sin embargo, los perfiles de expresión fueron similares en ambas variedades por lo que probablemente estarían implicados en la respuesta al frío, pero no en la mayor tolerancia de CN.

TABLA 17. Patrones de expresión de los genes estadísticamente diferenciales entre CN0 y CNtc (2+3.5+4.5 h a 2°C), según un análisis SAM 2clases con un FDR=20%, en las series completas de CN (excepto CNtc y CN24h) y de F

Anotación	log ₂ ratio ^(*)									
	CN0	CN24h	CN14	CN28	CN56	F0	F7	F14	F28	F45
CAF1	0	-0,71	-1,62	-1,45	0,01	-0,05	-1,86	-1,83	-1,45	-1,66
UDP-xilosiltransferasa	0	1,35	4,11	4,90	1,06	1,02	3,36	3,22	3,32	4,63
UDP-xilosiltransferasa	0	1,57	3,80	4,56	1,80	1,83	3,35	3,42	3,40	4,20
T26J12.8	0	1,88	1,62	11,93	0,09	0,59	1,08	0,90	1,98	1,94
β-1,3-glucanasa 2	0	1,13	2,43	1,88	0,63	1,40	3,45	2,75	2,21	2,79

(*) Media de las cuatro réplicas de log₂ratio=log₂X/CN0, siendo X cada muestra de la serie temporal de CN y F. Niveles de expresión normalizados a CN0, los valores negativos indican represión y los positivos inducción respecto CN0.

En naranja se resaltan los genes procedentes de la genoteca FlavFr1.

La proteína asociada al factor CCR4 (CAF1) pertenece al complejo CCR4-NOT, con un importante papel en el control de la transcripción y catabolismo del mRNA en eucariotas (Liu *et al.*, 2001). Su función en plantas está asociada al desarrollo normal, así como a la defensa contra infecciones patógenas (Liang *et al.*, 2009). Pese a que *At3g44260*, *CCR4-NOT*, se induzca en tallos de *Arabidopsis* después de 1 h de estrés de frío, sequía y luz UV-B (Kilian *et al.*, 2007), nuestro estudio no evidenció dicha respuesta al estrés por bajas temperaturas en los frutos de CN y F.

Por otro lado, el gen *UDP-xilosiltransferasa*, podría estar relacionada con la xilosidación de grupos hidroxilo de fenoles de los componentes de la lignina (Kondo *et al.*, 1993) o de otros componentes de la pared celular, como ramnogalacturonano II, y xilogalacturonano.

El unigen *aCL927Contig2*, *β-1,3-glucanasa* sí mostró un perfil algo dispar entre CN y F, presentando las diferencias del mayor nivel inicial y menor caída final en F

(Tabla 17). Además, se ha descrito la activación de genes β -1,3-glucanasa, y de otros genes relacionados con defensa, en el transcurso de senescencia en plantas (Balandin y Castresana, 1997; Obregon *et al.*, 2001). Estas diferencias, de acuerdo con otros estudios de la expresión del gen β -1,3-glucanasa *CrGlcQ* en diversos cítricos (Navelate, Pinalate, F), muestran que el aumento de niveles de expresión estarían ligados al desarrollo de desórdenes en la piel del fruto, producidos durante la postcosecha a bajas temperaturas (Sanchez-Ballesta *et al.*, 2006, 2008).

TABLA 18. Genes que mostraron cambios de expresión al menos dos veces entre CN0 y CNtc, sin pasar ningún test estadístico

Sonda Unigen	Anotación	media ^(*) CN0	sd CN0	media ^(*) CNtc	sd CN0
C04016H01 aCL261Contig2	Gen asociado a senescencia	0	0,80	-1,20	1,71
C02021G11 aCL99Contig1	UDP-xilosiltransferasa	0	0,43	1,84	0,82
C04016D08 aCL99Contig1	UDP- xilosiltransferasa	0	1,23	1,75	0,68
C18015B06 aCL1649Contig1	Sin anotación	0	0,53	1,07	0,25
C04019A12 aCL927Contig2	β -1,3-glucanasa 2	0	0,43	1,05	0,45
C04013G09 aCL22Contig1	ACO	0	0,25	1,05	0,67
C20008B04 aCL9058Contig1	ORF72B	0	0,87	1,04	0,80

(*) Media de las cuatro réplicas del $\log_2\text{ratio}=\log_2X/\text{CN0}$, siendo X CN0 ó CNtc. Los valores de expresión negativos indican represión y positivos inducción respecto CN0.

En naranja se destacan las sondas procedentes de la genoteca FlavFr1. En azul se destaca la sd.

Se comprobó si realmente la respuesta transcriptómica a tiempos cortos era tan poco pronunciada, o la imposibilidad de identificar más cambios era debida a la rigidez del análisis estadístico aplicado, o a la heterogeneidad entre réplicas. Para ello, se rastreó el conjunto de datos buscando los genes que presentasen un nivel de cambio de al menos 2 veces entre CN0 y CNtc, independientemente de la variabilidad entre réplicas (Tabla 18). Tan sólo se hallaron 3 genes no identificados mediante el análisis estadístico y efectivamente su variabilidad fue elevada. En todo caso, los datos apuntaron a un bajo número de genes de respuesta a tiempos cortos de exposición de las mandarinas CN al frío, lo cual sugiere que la mayor tolerancia de CN no se debe a una respuesta de defensa ante el estrés (al menos no a una respuesta rápida). Quizás CN tenga un transcriptoma preparado para el estrés a bajas temperaturas y no necesite una activación temprana para resistir a dicho estrés. Sin

embargo, no se puede descartar la posibilidad que no se identifique una respuesta temprana debido a la ausencia en la micromatriz de genes específicos de la misma. En ese sentido, en la micromatriz empleada no se incluyeron sondas de cDNAs procedentes de muestras de frutos sometidas a frío durante tiempos menores a una semana. Aunque, en la micromatriz hay genes procedentes de genotecas obtenidas a partir de hojas y raíces sometidas a sequía en 5, 10 y 24 h, así como, hojas sometidas a estrés salino durante 6 h, 24 h y 7 d (Forment *et al.*, 2005), y posiblemente podrían aportar genes de respuesta temprana y común al estrés por frío, sequía y salinidad puesto que en los tres estreses se produce deshidratación.

4.2.2 Análisis de la respuesta transcripcional del flavedo de mandarinas Clemenules durante las primeras 24 h de almacenamiento en frío

Con el objetivo de identificar genes cuya expresión cambiase significativamente a tiempos cortos o a las 24 h de almacenamiento a 2°C respecto a muestras recién traídas de campo, se realizó un análisis SAM mclase (detecta cambios diferenciales en un punto cualquiera de la serie temporal [0, tc y 24 h de almacenamiento en frío]). De este modo se identificaron 24 sondas significativamente diferenciales, correspondientes a 13 unigenes, con una confianza del 95% (FDR=5%). Entre estas sondas no se hallaron ninguna de las identificadas en el análisis de tiempos cortos (SAM 2clases CN0-tc, FDR=20%), por lo que su significatividad debe venir por una expresión diferencial a 24 h a 2°C.

En la Tabla 19 (SAM mclase CN0-tc-24 h) se muestra la anotación de estos genes destacando la presencia de 15 sondas procedentes de clones de la genoteca FlavFr1 (10,3% sondas de FlavFr1 en la micromatriz). Este enriquecimiento en sondas procedentes de la genoteca FlavFr1 (obtenida con muestras de frutos tras varios días de almacenamiento en frío) entre los genes identificados de respuesta rápida al frío (hasta 24 h) sugiere que también se expresan a tiempos medio-largos de almacenamiento en frío.

La mayoría de estos genes presentaron inducción a las 24 h (Tabla 19), incluyendo: el unigen *T26J12.8*, que es similar a una proteína asociada a senescencia; una *lipoxigenasa*, posiblemente implicada en la biosíntesis del ácido jasmónico u otros derivados lipídicos; tres factores de transcripción con dominio NAC; dos genes que codifican chaperonas, una tipo DnaJ y una proteína de estrés térmico; un gen similar a *MGC84136* de *Xenopus laevis*; y 10 sondas a las que no se pudo asignar anotación (ocho de ellas procedentes de sondas sin anotación por mala calidad de secuencia). Por el contrario, dos genes se reprimieron, correspondientes a un gen *COMT* del

TABLA 19. Valores de expresión de los genes con expresión diferencial en CN según el análisis SAM mclase CN 0-tc-24 h a 2°C con un FDR=5% normalizados a CN0

Sonda	Unigen	Anotación	CN0*	CNtc*	CN24h*
C04016H08	aCL1422Contig1	COMT	0	-0,65	-1,74
C18001A09	aCL1136Contig2	DnaJ	0	0,84	2,05
C04011A03	aCL6Contig22	HSP	0	-0,34	0,89
C07009E12	aCL6Contig22	HSP	0	-0,21	1,20
C04018C11	aCL241Contig1	Lipoxigenasa	0	0,27	0,85
C04023C09	aCL608Contig1	MGC84136	0	0,30	0,94
C04006H07	aCL1571Contig1	Dominio NAC, NAC1	0	0,58	1,57
C18015B04	aCL35Contig3	Dominio NAC, NAC4	0	0,70	1,85
C04011G07	aCL943Contig1	Familia NAC	0	0,59	1,71
C04016G06	Sin unigen	Sin anotación	0	0,88	2,05
C04022C04	Sin unigen	Sin anotación	0	0,02	1,26
C04022F05	Sin unigen	Sin anotación	0	-0,13	1,23
C04022F08	Sin unigen	Sin anotación	0	-0,20	1,40
C04023A11	Sin unigen	Sin anotación	0	0,31	0,98
C04023C10	Sin unigen	Sin anotación	0	0,44	1,45
C04023C12	Sin unigen	Sin anotación	0	0,16	1,34
C02009F03	Sin unigen	Sin anotación	0	0,78	1,69
C02013C04	Sin unigen	Sin anotación	0	0,32	1,18
C02015H01	aCL144Contig2	Sin anotación	0	-0,41	-1,58
C08004E04	aCL5425Contig1	Sin anotación	0	0,27	1,30
C20008C01	aCL4708Contig1	Putativo ATPF3	0	-0,22	-1,06
C04002H12	aCL1751Contig1	T26J12.8	0	0,93	1,88
C04013E07	aCL1751Contig1	T26J12.8	0	0,74	1,28
C08001D09	aCL1751Contig1	T26J12.8	0	0,64	1,33

(*) Media de las cuatro réplicas de $\log_2\text{ratio}=\log_2X/\text{CN0}$, siendo X el valor de CN0, CNtc o CN24h en cada caso. Los valores de expresión negativos indican represión y positivos inducción respecto CN0.

En naranja se destacan las sondas procedentes de la genoteca FlavFr1.

metabolismo secundario de fenilpropanoides y un gen posible *ATFP3* implicado en la unión, transporte y almacenamiento de metales (Dykema *et al.*, 1999). La función de varios de estos genes es compatible con el establecimiento de la tolerancia al frío en las mandarinas CN. Por ejemplo, se ha descrito la importancia de proteínas tipo HSP (Iba, 2002; López-Matas *et al.*, 2004; Swindell *et al.*, 2007) y DnaJ (Zhu *et al.*, 1993; Futamura *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2004; Hwang *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2009b) en la aclimatación de diferentes especies a situaciones de estrés, incluyendo el causado por bajas temperaturas. De similar manera, la inducción de factores de transcripción de tipo NAC podría estar regulando la respuesta y aclimatación al frío como se ha determinado en otras especies como *Arabidopsis* y arroz (Yoo *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2008).

Al comprobar los patrones de expresión de estos genes en la serie completa de CN (Tabla 20), se observó que la mayoría de los genes inducidos a las 24 h permanecían inducidos hasta los 28 d de almacenamiento en frío y después decaían. En general, los máximos de expresión de estos genes en CN se detectaron a los 9 d de almacenamiento a bajas temperaturas. En cambio, *COMT* y *ATFP3* alcanzaron la mayor represión a los 9 d y después de la cuarta semana en frío, recuperaron niveles de expresión próximos a los iniciales.

Con objeto de investigar si la expresión de estos genes podría estar relacionada con la tolerancia al frío de CN, o por el contrario con la respuesta al almacenamiento en frío compartida entre CN y F, se estudió si la expresión de los mismos también resultaba diferencial en las series temporales de almacenamiento en frío de cada una de las variedades por separado y en el de la comparación entre las dos variedades (Tabla 20). Se observó que todos los genes diferenciales en CN lo fueron también en F (análisis Fmclase) excepto uno de los no anotados. En general, los perfiles de expresión de estos genes fueron similares en ambas variedades, aunque el nivel de expresión en el tiempo inicial de la mayoría de genes con perfil de inducción fue menor en F que en CN, como por ejemplo el caso de los gen *DnaJ* (*aCL1136Contig2*), *COMT*, *HSP* y de los *factores de transcripción tipo NAC*. El nivel de expresión de estos genes en F en frutos recién traídos de campo fue la mitad respecto a CN. El aumento de expresión en F a lo largo del tiempo fue menor que en CN. Los niveles de expresión en CN durante la primera semana de almacenamiento en frío aumentaron cuatro veces, sin embargo en F sólo incrementaron dos. Además, en F no se analizó ningún tiempo intermedio en la primera semana de almacenamiento a bajas temperaturas. Estos resultados sugieren la posibilidad que las mandarinas F estén menos preparadas para soportar el frío incluso a nivel de su transcriptoma basal. Según esta idea, la respuesta a las bajas temperaturas sería similar en CN y F, pero

en F no llegaría a alcanzar el umbral que le permitiese combatir el estrés eficientemente.

TABLA 20. Valores de expresión de los genes con expresión diferencial a tiempos cortos en CN según el estadístico SAM mclase CN 0-tc-24 h con un FDR=5% normalizados a CN0, en las series de CN y de F en los casos en los que resultaron también diferenciales en las mismas (CNmclase y Fmclase con un FDR=5%, respectivamente)

Anotación	CN0*	CN9*	CN14*	CN28*	CN56*	F0*	F7*	F14*	F28*	F45*
COMT	0	-2,20	-2,10	-1,93	0,32	-0,13	-0,69	-0,71	-0,69	-1,25
DnaJ	0	1,37	1,44	1,89	0,74	-1,96	0,40	0,22	-0,05	-0,88
HSP	0	2,42	2,52	2,07	-0,29	-1,46	-0,52	-0,48	0,07	-0,02
HSP	0	2,98	3,07	2,7	0,30	-1,69	-0,50	-0,68	0,03	0,13
Lipoxigenasa	0	0,12	-0,35	-1,02	-0,55	-0,69	0,12	-0,11	-1,01	-2,18
MGC84136	0	0,89	0,31	-0,68	-0,40	-0,57	0,12	-0,65	0,22	0,11
Dominio NAC, NAC1	0	2,61	2,41	2,38	0,49	-1,69	0,61	0,64	0,54	0,24
Dominio NAC, NAC4	0	2,41	1,71	1,22	-0,04	-1,49	0,37	-0,53	0,49	0,42
Familia NAC	0	2,20	1,70	1,87	0,44	-0,74	0,08	-0,17	-0,20	0,24
No anotado	0	3,05	3,04	2,64	1,36	-1,10	1,80	1,83	1,74	2,51
No anotado	0	2,84	2,74	2,37	0,40	-1,98	-0,64	-0,83	0,23	0,32
No anotado	0	3,23	3,32	2,39	0,11	-2,12	-0,61	-0,90	0,26	0,22
No anotado	0	3,17	3,40	2,38	0,26	-2,05	-0,39	-0,86	0,24	0,12
No anotado	0	0,76	0,57	-0,12	-0,05	-0,65	0,21	-0,47	0,22	0,33
No anotado	0	1,57	0,67	-1,05	-0,73	-1,08	0,26	-1,33	0,16	0,34
No anotado	0	2,84	2,85	2,14	0,19	-1,77	-0,38	-0,89	-0,01	0,37
No anotado	0	2,13	1,40	1,01	0,20	-1,22	0,27	-0,33	0,27	0,38
No anotado	0	0,44	-0,08	-0,80	0,50	-1,09	-0,31	-0,55	0,01	-0,73
No anotado	0	-0,53	-0,77	-0,14	-0,01	Sin dato en F				
No anotado	0	0,95	0,39	-0,51	-0,31	-1,02	-0,49	-1,05	-0,93	-0,98
ATFP3	0	-1,29	-1,16	-1,31	-0,58	0,23	0,32	0,49	-0,27	-0,55
T26J12.8	0	1,79	1,68	1,92	-0,03	-1,08	-0,64	-0,82	0,54	0,23
T26J12.8	0	1,25	1,20	1,59	0,42	-1,05	-0,28	-0,53	0,41	0,36
T26J12.8	0	1,55	1,49	1,61	-0,29	-1,04	-0,92	-0,65	0,61	0,22

(*) Media de las cuatro réplicas de $\log_2\text{ratio}=\log_2X/\text{CN0}$, siendo X cada una de las muestras de la serie temporal de CN y F. Los valores de expresión negativos indican represión y positivos inducción respecto CN0.

En naranja se destacan las sondas procedentes de la genoteca FlavFr1.

5. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LOS CAMBIOS DE EXPRESIÓN EN EL FLAVEDO DURANTE EL ALMACENAMIENTO EN FRÍO ENTRE MANDARINAS CLEMENULES Y FORTUNE

Los análisis individuales de cada variedad de frutos almacenados en frío resultaron muy similares en cuanto a las categorías funcionales enriquecidas con los genes reprimidos de cada grupo (Tabla 21). Con el test Wilcoxon de MapMan se revelaron algunas categorías diferenciales en algunos puntos de la serie temporal y que resultaron ser diferentes entre variedades. En el caso de F se identificó como diferencial entre variedades la *fotosíntesis*, *metabolismo de lípidos* y *etileno*, y en el de CN el *metabolismo secundario*.

TABLA 21. Resumen de los resultados del análisis individual de las series temporales de CN y F, obtenidos a partir de los uniAt estadísticamente diferenciales con SAM mclase aplicando FatGO

	CN mclase reprimidos	F mclase reprimidos
PROCESO BIOLÓGICO	Traducción	Traducción
		Ensamblaje cromatina
		Ensamblaje de complejos proteína-DNA
FUNCIÓN MOLECULAR	Constituyentes estructurales del ribosoma	Constituyentes estructurales del ribosoma
	Unión a actina	Unión a actina
COMPONENTES CELULARES	Ribosomas	Subunidad pequeña ribosomal
	Orgánulos de unión a membrana intracelular	Cloroplasto
		Parte del cromosoma
		Parte citosólica
	CN mclase ind vs rep	F mclase ind vs rep
PROCESO BIOLÓGICO	Proceso de biosíntesis de macromoléculas	Traducción
FUNCIÓN MOLECULAR	X	Constituyentes estructurales del ribosoma
COMPONENTES CELULARES	X	Ribosomas
		Cloroplasto
		Orgánulos no unidos a membrana

5.1 COMPARACIÓN DE LOS GENES DIFERENCIALES IDENTIFICADOS EN CLEMULES (CNmclase) CON LOS IDENTIFICADOS EN FORTUNE (Fmclase)

Una forma adicional de visualizar las respuestas transcripcionales de los frutos CN y F al frío, consistió en representar mediante un diagrama de Venn las relaciones entre los transcritos, representados por la sonda impresa en la micromatriz, con cambios temporales de expresión significativos en cada variedad que habían sido identificados mediante el análisis estadístico SAM multiclase (Fig. 25). De este modo, la mayoría de transcritos de expresión diferencial en CN (variedad tolerante) lo fueron también en F (variedad sensible), por tanto podrían corresponder con genes que intervienen en el proceso de adaptación/respuesta de los frutos de ambas variedades a las condiciones de frío durante la postcosecha (Fig. 25). Se identificaron 995 unigenes (representados por 1484 sondas en la micromatriz) significativamente regulados en ambas variedades (según los respectivos análisis SAM multiclase en cada una de ellas) (Tabla Supl. 10). Sin embargo, que ambas variedades cambiasen la expresión de un mismo conjunto de genes no es indicativo que el cambio fuera de la misma magnitud, ni en el mismo sentido de inducción o represión, como se describirá a continuación en el apartado 5.2.

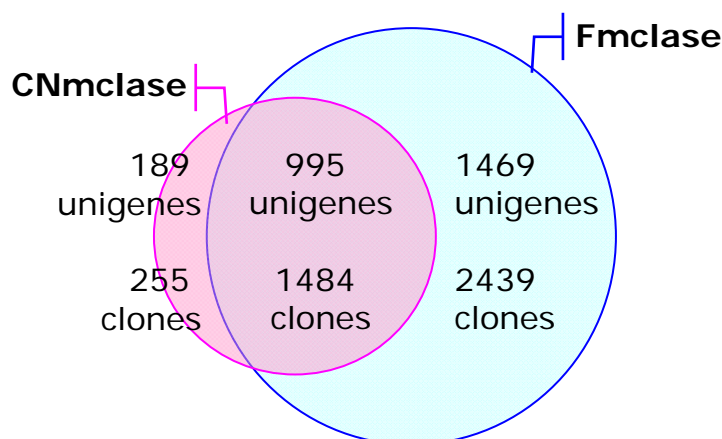


Figura 25. Diagrama de Venn mostrando la relación de genes (unigenes y clones representados por una sonda) con cambios de expresión significativos de cada variedad CN (tolerante) y F (sensible), según los respectivos análisis SAM multiclase.

La Figura 25 muestra la identificación de transcritos de expresión diferencial en una variedad o en otra. Estos transcritos podrían explicar el diferente comportamiento frente al frío. Se identificaron 255 sondas con cambios de expresión significativos

exclusivamente en CN (189 unigenes de los cuales 148 presentan anotación funcional). Estos podrían estar implicados en el mecanismo de tolerancia al frío. En cuanto a las respuestas moleculares específicas de F, se identificaron 2439 sondas (que representan a 1469 unigenes, de los cuales 1241 presentan anotación funcional), cuya expresión resultó diferencialmente alterada exclusivamente en la variedad sensible F. Es posible que entre esos genes se encuentren los que participan en el desarrollo de los daños por frío, o los implicados en la susceptibilidad o falta de adaptación al frío.

La gran cantidad de genes (1469) con cambios de expresión significativos identificados exclusivamente en F (Tabla Supl. 8) podría ser explicada, al menos en parte, por el mayor número de sondas que no superaron los filtrados de calidad en CN (apartado 2 del Capítulo 2). En cambio, algunos de estos genes sí podrían estar regulados específicamente en F, por ejemplo, en relación con el desarrollo de daños. Como ya se apuntó en el análisis de tiempos cortos de CN, quizás esta variedad esté preparada para soportar el estrés por frío y no necesite activar una serie de genes que sí necesite F. Los genes exclusivos de CN estarían libres de esa reserva.

Para indagar más en los procesos específicos de cada variedad, los genes identificados como significativamente regulados en cada variedad se clasificaron en categorías de GO en todos los niveles posibles. En la Tabla 22 se muestra la clasificación en las categorías de *proceso biológico* de los niveles 3, el más general, y 9, el más específico que estaría incluido en el nivel 3. Para ello, primero se asociaron los genes identificados exclusivamente en cada variedad con su código AGI y se agruparon en uniAts obteniendo 81 genes específicos de CN (Tabla Supl. 7), y 592 de F (Tabla Supl. 8).

Algunos de los genes específicos de CN se describieron en el Capítulo 1: en el apartado 2 el gen *UDP-glucosa: ácido salicílico glucosiltransferasa (aCL1454Contig1)*; y en el apartado 4 los genes *COR15 (aCL6Contig7, aCL6Contig16)*, y *poliubiquitina (aCL4Contig29)* como algunos de los genes más abundantes en la genoteca FlavFr1 (Tabla 8). Estos últimos genes también se identificaron diferenciales entre ambas variedades y posteriormente se comentan.

En cambio, otros genes como *enzima biosíntesis tiazol, precursor cloroplástico (aCL16Contig1)*, *inhibidor de cisteína proteasa (aCL16Contig2)*, y *miraculina (aCL1Contig10, aCL1Contig11)* se identificaron en ambas variedades (en CN específicos y F específicos) porque se representaron con diferentes sondas en cada caso.

Con más detalle se examinaron las funciones y los patrones de expresión de los genes que mostraron cambios significativos exclusivos de CN que se clasificaron en las categorías de *respuesta a estrés*, *procesos de desarrollo celular*, *procesos catabólicos* y *muerte* (Tabla Supl. 7), ya que *a priori* podrían estar implicados en la aclimatación al frío.

Entre los genes significativamente diferenciales exclusivos de CN, se identificó un gen *SUMO E3*, unigen *aCL5236Contig1* inducido en CN14 y con un patrón plano en F (Tabla Supl. 7). Este gen se clasificó en las categorías *proceso metabólico celular*, *proceso metabólico primario*, *proceso metabólico de macromoléculas*, y *regulación de procesos biológicos* en el nivel 3 y *regulación de la transcripción* en los niveles 7 y 8. En *Arabidopsis*, la sumoilización de ICE1 dependiente de AtSIZ1 (SUMO E3) parece necesaria para favorecer la inducción de *CBF3/DREB1A* y represión de *MYB15* implicados en tolerancia a bajas temperaturas (Miura *et al.*, 2007). La mayor expresión de *aCL5236Contig1* en CN podría estar relacionada con la activación de mecanismos de respuesta al frío. Análisis de genética reversa sobre este gen en cítricos serían interesantes para testar su implicación en la tolerancia al frío.

También se identificó un gen *RING-H2 finger*, *aCL198Contig1*, en la categoría *respuesta a estrés*, significativamente inducido en CN de 9 a 28 d a 2°C, y cuyos datos de expresión en F variaron poco (Tabla Supl. 7, Fig. 37). El ortólogo de este gen, *AtXERICO*, se induce por estrés osmótico, salino y sequía, y activa la expresión de genes de biosíntesis de ABA (Ko *et al.*, 2006), por lo que podría contribuir en mandarinas de CN a proporcionar tolerancia a las bajas temperaturas. Dado que el análisis CNmclase (Tabla Supl. 6a) indicó que la síntesis de carotenoides precursores de la síntesis de ABA se reprimió, esta posible interacción requeriría de una activación de genes específicos de la ruta ABA que no se pudo identificar.

Entre los genes incluidos en la categoría de GO de *desarrollo celular* destacaron varios genes. Uno de ellos, un *factor de inicio de la transcripción gamma-IIA*, *aCL5775Contig1*, que se inducía en CN9, mientras que en F mantenía un patrón plano a lo largo del almacenamiento en frío (Tabla Supl. 7; Tabla Supl. 9, SOM6). Este gen podría estar implicado en la síntesis de proteínas de respuesta al estrés que incrementarían la tolerancia al frío en CN. Como apoyo a esta hipótesis se encuentra el trabajo de Ruffel *et al.* (2005) en el que un factor de elongación *eIF4E-pvr2* confiere resistencia a pimiento frente a un potivirus; o el incremento de expresión de *eIF4A* por deshidratación en *Nicotiana tabacum* (Kawaguchi *et al.*, 2003). En cambio, los genes *CNG2*, *aCL5832Contig1* (clasificado también en la categoría GO de *Muerte*) y *SEP3*, *aCL176Contig1*, se reprimieron en CN pero no mostraron cambios significativos en F (Tabla Supl. 6a y 7). El gen *AtCNGC2/DND1* (*Cyclic Nucleotide Gated Channel 2/*

TABLA 22. Categorías de GO de *Procesos Biológicos* representadas en los uniAt específicos de cada variedad (elaborado mediante la aplicación FatiGO) en los niveles 3 y 9

CATEGORÍA en nivel 3	CLEMENULES		FORTUNE	
	Nº GENES - %	Nº GENES - %	Nº GENES - %	Nº GENES - %
Procesos metabólicos celulares	39	68,4%	257	68,5%
Procesos metabólicos primarios	31	54,4%	206	54,9%
Procesos metabólicos de macromoléculas	22	38,6%	152	40,5%
Proceso biosintético	9	15,8%	104	27,7%
Organización y biogénesis de componente celulares	7	12,3%	54	14,4%
Establecimiento de localización	5	8,8%	54	14,4%
Respuesta a estrés	12	21,0%	52	13,87%
Respuesta a estímulo abiótico	11	19,3%	51	13,6%
Respuesta a estímulo químico	4	7,02%	47	12,5%
Regulación de procesos biológicos	8	14,0%	35	9,3%
Procesos catabólicos	4	7,0%	29	7,7%
Desarrollo de estructuras anatómicas	1	1,8%	29	7,7%
Respuesta a estímulos endógenos	6	10,5%	29	7,7%
Desarrollo organismo multicelular	2	3,5%	25	6,7%
Comunicación celular	4	7,0%	20	5,3%
Procesos desarrollo celular	5	8,8%	19	5,1%
Proceso reproductivo	1	1,8%	19	5,1%
Proceso metabólico de compuestos nitrogenados	1	1,8%	18	4,8%
Fotosíntesis	1	1,8%	17	4,5%
Proceso metabólico secundario	3	5,3%	15	4,0%
Localización proteica	2	3,5%	11	2,9%
Respuesta defensa	2	3,5%	10	2,7%
Muerte	1	1,8%	5	1,3%
Respuesta inmune	2	3,5%	5	1,3%
Regulación de función molecular	1	1,8%	2	0,5%
Envejecimiento	1	1,8%	2	0,5%
Ciclo celular	1	1,8%	2	0,5%
Respuesta a estímulo biótico			11	2,9%
Regulación de calidad biológica			10	2,7%
Respuesta a estímulos externos			10	2,7%
División celular			3	0,8%
Respuesta celular a estímulos			2	0,5%
Coagulación			1	0,3%
Movimiento de estomas			1	0,3%
Adhesión celular			1	0,3%
Autofagia			1	0,3%
Desarrollo maduración			1	0,3%
Crecimiento corporal			1	0,3%
Proliferación celular			1	0,3%
Ritmo circadiano	1	1,8%		
CATEGORÍA en nivel 9	Nº GENES - %		Nº GENES - %	
Procesos catabólicos dependientes de modificación proteica	3	33,33%	12	17,14%
Dirección de proteínas a vacuola	1	11,11%	2	2,85%
Transporte de Golgi a vacuola	1	11,11%		
proceso metabólico del almidón	1	11,11%		
Miristoilación de proteínas	1	11,11%	7	10,0%
dATP proceso metabólico	1	11,11%		
ADP proceso metabólico	1	11,11%		
UTP proceso metabólico	1	11,11%	1	1,43%

Continuación Tabla 22

CATEGORÍA en nivel 9	CLEMENULES		FORTUNE	
	Nº GENES	- %	Nº GENES	- %
CTP proceso metabólico	1	11,11%	1	1,43%
GTP proceso metabólico	1	11,11%	1	1,43%
Proceso biosintético de purina ribonucleósido trifosfato	1	11,11%	2	2,85%
Proceso biosintético de pirimidina ribonucleósido trifosfato	1	11,11%		
Proceso biosintético de purina desoxiribonucleósido trifosfato	1	11,11%		
Ensamblaje de cromatina	1	11,11%	3	4,29%
Proceso metabólico de glucosa			6	8,57%
Proceso catabólico hexosa			4	5,71%
Proceso biosintético sacarosa			3	4,29%
Proceso biosintético glucano			3	4,29%
Proceso biosintético hexosa			3	4,29%
Inicio traduccional			3	4,29%
Ubiquitinación de proteínas			3	4,29%
Proceso catabólico sacarosa			2	2,85%
Homeostasis iones metálicos			2	2,85%
Proceso biosintético de SAM			2	2,85%
Homeostasis cationes inorgánicos di-, tri- valentes			2	2,85%
Regulación de la apoptosis			2	2,85%
Proceso biosintético oxilipina			2	2,85%
Proceso metabólico JA			2	2,85%
Dirección de proteínas a cloroplasto			2	2,85%
Ensamblaje de complejos proteínas celulares			2	2,85%
B-oxidación de ácidos grasos			2	2,85%
Procesos biosintéticos de regulación de flavonoides			2	2,85%
Morfogénesis de hojas			2	2,85%
Procesos metabólicos de celulosa			2	2,85%
Modificación covalente cromatina			2	2,85%
Autoprosesado de proteínas			1	1,43%
Splicing de RNA, via reacciones de transesterificación con adenosina como nucleófilo			1	1,43%
Regulación positiva mediante señalización por ABA			1	1,43%
Regulación negativa de la transcripción dependiente de DNA			1	1,43%
Dirección de proteínas a mitocondria			1	1,43%
Remodelación de proteínas			1	1,43%
Proceso biosintético de ET			1	1,43%
Proceso biosintético de metionina			1	1,43%
Regulación de proceso metabólico de antocianina			1	1,43%
Proceso catabólico de de triacilglicéridos			1	1,43%
Proceso biosintético de hexitol			1	1,43%
Proceso metabólico manitol			1	1,43%
Transporte ion cobre			1	1,43%
Transporte SAM			1	1,43%
Importación de proteínas al núcleo			1	1,43%
Biosíntesis rafinosa, familia oligosacáridos			1	1,43%
Proceso metabólico fosfatidilcolina			1	1,43%
Metilación aminoácidos de proteínas			1	1,43%
Morfogénesis raíces laterales			1	1,43%
Proceso metabólico NADP			1	1,43%
Proceso biosintético glicerofosfolípidos			1	1,43%

Defense No Death 1) codifica una proteína que forma canales de cationes con localización en la membrana (Clough *et al.*, 2000; Chan *et al.*, 2003). En *Arabidopsis* este canal se ha implicado con la entrada de calcio al interior celular (Kelling y Schulte, 1998; Leng *et al.*, 1999) y con respuestas de adaptación a estrés abiótico y biótico (Chan *et al.* 2003; 2008). Sin embargo, en el caso de las mandarinas, la represión específica en CN sugeriría que la actividad de este canal podría derivar en respuestas al frío que desencadenen daños como los de F. El gen SEP3 está implicado en la formación de los complejos MADS box que determinan la identidad de los órganos florales (Immink *et al.*, 2009, Melzer *et al.*, 2009, Marques *et al.*, 2009) y el desarrollo de frutos, incluyendo cítricos (Endo *et al.*, 2006). Atendiendo a las diferencias de expresión entre CN y F, sería posible que en CN, la represión de este gen estuviese favoreciendo de algún modo la tolerancia al frío.

En otros casos de genes diferenciales específicamente en CN con función potencialmente interesante en cuanto a la tolerancia al frío, se observó un patrón de expresión similar en ambas variedades, si bien la mayor variabilidad en los datos de F para esos genes impidió que se identificasen como diferenciales según el estadístico SAM mclase (Tabla Supl. 6a y 7). Este fue el caso de la inducción en ambas del gen *Citrus low temperature (Cit1, aCL231Contig2)*, homólogo al gen de *Arabidopsis AtRCI2B (Rare Cold Inducible)* (Medina *et al.*, 2001) en las categorías *respuesta a estímulo abiótico, respuesta a estrés, respuesta a estímulo endógeno*, en el nivel 3; de la inducción de una proteína rica en glicina (*aCL5Contig23*), relacionada con el *ciclo circadiano*; o de la represión del factor de transcripción de tipo MYB, *aCL3899Contig1*; y de una acuaporina (*aCL62Contig1*) en las categorías *respuesta a estrés y respuesta a estímulos abióticos*. Para aclarar la posible implicación de genes que sólo se identificaron como diferenciales en una de las variedades, se debería hacer una RT-qPCR en ambas variedades para comprobar más fidedignamente las diferencias observadas mediante micromatrices.

Sin embargo, algunos genes descritos como específicos en cada variedad fueron genes diferenciales en el análisis conjunto de CN y F. Algunos genes específicos de CN que posteriormente se discuten en el Capítulo 2 en el apartado 5.2.1 fueron: el gen *subtilasa (aCL2182Contig1)*, *poliubiquitina (aCL4Contig29)*, *COR15 (aCL6Contig7 aCL6Contig16)*, *β -caroteno hidroxilasa (aCL35Contig1)*, *DnaJ (aC04010E05SK_c)*, el gen *inhibidor de cisteína proteasa (aCL16Contig2)*. Genes específicos en F también se identificaron en el análisis en ambas variedades, como ejemplo: *NB-ARC (aC05011H05SK_c)*, *CPRD47 (aC05014A08SK_c)*, *quitinasa (aCL10Contig3)*, *diacina (aCL12Contig3, aCL12Contig4)*, *COMT (aCL18Contig10)*, *tiooredoxina (aCL18Contig3)*, y *GGPP sintasa (aCL1306Contig1)*.

5.2 Identificación de genes con respuesta diferencial entre frutos de ambas variedades en series equivalentes y a lo largo de todo su almacenamiento en frío

El análisis aplicado sobre los datos de expresión de CN y F para la búsqueda de genes con comportamiento diferencial entre variedades fue el SAM *time course* con dos clases y réplicas no apareadas (CNF*time course*). El test se efectuó con los datos correspondientes a tiempos equivalentes en las dos series, y concretamente los tiempos 0, 9, 14, 28 y 56 d a 2°C de CN; y 0, 7, 14, 28 y 45 d a 2°C de F (Fig. 26). Se partió de 7653 sondas, que después de los filtrados de calidad (ver Materiales y Métodos) presentaron dato válido en más del 80% de las micromatrices analizadas. Tras aplicar un FDR igual al 5%, resultaron 1861 sondas, correspondientes a 1048 unigenes, con perfil de expresión significativamente diferencial entre CN y F. Seguidamente, se analizaron mediante un análisis PCA (Fig. 27) y un agrupamiento por SOM (Fig. 28) las tendencias y perfiles de expresión de los genes que mostraron expresión diferencial entre variedades.

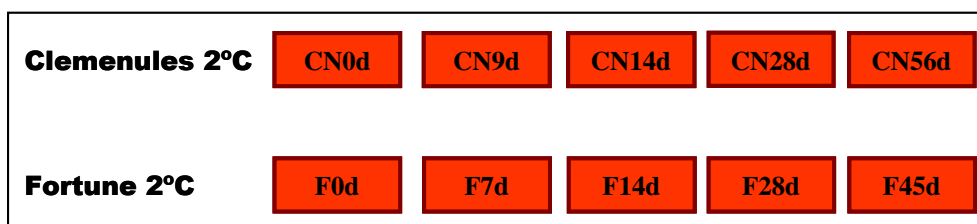


Figura 26. Esquema representativo de las muestras de las series temporales de CN y F comparadas mediante análisis SAM *time course* con el objetivo de identificar genes con respuesta diferencial entre ambas variedades durante la postcosecha en frío. Se consideraron los estadios de CN que aparecen en la figura como serie 1 y los de F como serie 2.

Se analizó la variabilidad mediante PCA (Fig. 27), considerando los datos de expresión del conjunto de genes diferenciales según los resultados del análisis CNF*time course* indicado. El primer componente explicó un 51% de la varianza y el segundo un 20%. En ambas variedades, los cambios más acusados de variabilidad en los dos componentes sucedieron durante la primera semana de almacenamiento en frío y, además, en el mismo sentido. Sin embargo, después de la primera semana las muestras CN estuvieron más cerca unas de otras que las de F, indicando una menor variabilidad/cambios en el transcriptoma en aquella variedad. Tras las cuatro semanas, se revirtió la tendencia en CN, de modo que la muestra de 56 d se asemejó más a los estadios iniciales. En cambio, en F apenas hubo diferencias entre la muestra de 28 y

la de 45 d, indicando una respuesta radicalmente diferente a tiempos largos entre las dos variedades. Un resultado importante del PCA es que las muestras recién traídas de campo, ya estaban separadas considerablemente antes de su exposición al frío, lo que indicó que gran parte de la expresión diferencial identificada entre CN y F fue independiente de la respuesta al frío, y se debió a diferencias de expresión basales presentes en los frutos recién traídos de campo. Estas diferencias podían deberse a factores intrínsecos de cada variedad, pero también podían deberse a las condiciones medioambientales (<http://www.telefonica.net/web2/jgarciaf/meteo/meteo.htm>), puesto que las mandarinas de cada variedad maduraron en épocas diferentes. Los frutos CN se recolectaron en diciembre (2001, 2003) en el que las temperaturas máximas y mínimas fueron cercanas a los 10°C. En cambio, los frutos F se recolectaron en marzo (2000, 2001) con temperaturas mínimas superiores a 10°C, y máximas cercanas a los 20°C (<http://www.telefonica.net/web2/jgarciaf/meteo/meteo.htm>). Mientras los frutos de CN estuvieron anclados al árbol podrían estar induciendo un mecanismo general de tolerancia a estrés que se manifestaría posteriormente por el diferente comportamiento de CN y F. En cuanto a diferencias durante la postcosecha en frío, tanto el PC1 como

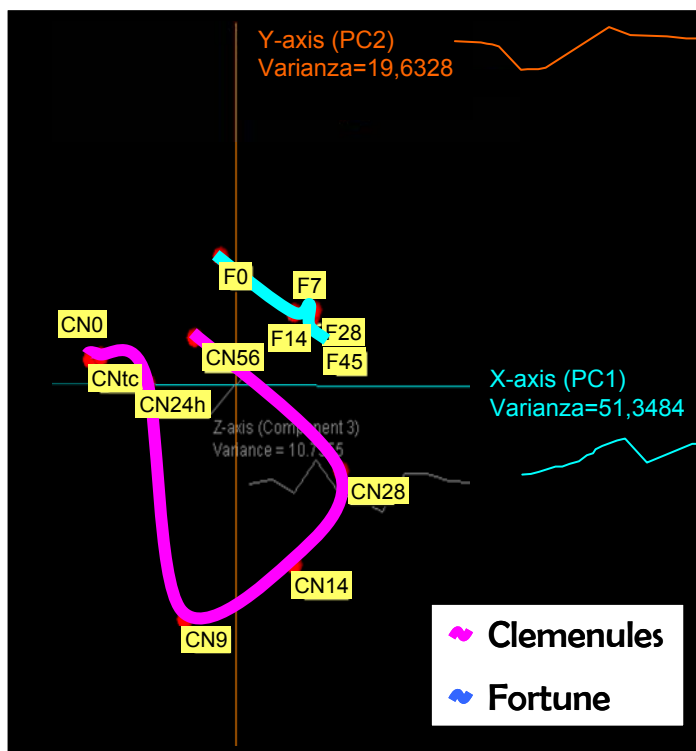


Figura 27. Análisis mediante PCA de la variabilidad de muestras de las series temporales de CN (izquierda) y F (derecha) a partir de los datos de expresión de los genes con expresión diferencial entre ambas series según un análisis SAM *time course*. Cada punto de la serie temporal representa los datos de expresión promedio de las 4 réplicas que lo forman. Se consideraron los datos de expresión de las 1861 sondas diferenciales según el estadístico SAM *time course*, con un FDR=5%.

el PC2 revelaron tendencias similares en ambas variedades hasta los 14 d, con cambios más acusados durante la primera semana en CN en lo que se refería al segundo componente. En cambio, entre la segunda y la cuarta semana, los cambios parecían poco significativos en CN, mientras que en F fueron los más acusados de toda la serie. Teniendo en cuenta el resultado del PCA y la respuesta fisiológica diferencial entre CN y F, las diferencias en los niveles de expresión inicial, así como los mayores cambios durante la primera semana en CN podrían estar implicados en la aclimatación al frío en esta variedad. Por el contrario, los genes que diferencialmente presentaron mayor variabilidad en F que en CN entre la segunda y la cuarta semana de almacenamiento en frío coincidieron con el incremento en la severidad de los daños en F y por tanto podrían estar implicados en el desarrollo de daños, e incluso también con la caída de la expresión de elementos que contribuyeran a tolerar el frío.

Los genes diferenciales entre las series de CN y F fueron agrupados según sus patrones temporales de expresión, con el fin de visualizar perfiles diferenciales entre las variedades (Fig. 28).

Con el fin de identificar grupos de genes que reflejasen las diferencias de expresión entre CN y F antes y durante la postcosecha en frío, se realizó un agrupamiento SOM de perfiles de expresión de los genes diferenciales en el análisis *CNFtime course* tras normalizar ambas series respecto F0 (Fig. 28). La normalización de los valores de expresión en cada variedad con respecto a los correspondientes de F0 facilitó la visualización de las diferencias entre las variedades. Si bien en este caso, lo que se observó fue fundamentalmente la respuesta al frío más que los niveles “absolutos” de los transcritos en cada caso.

Una posible hipótesis era la activación de un conjunto específico de genes de respuesta al frío en la variedad tolerante CN. No se identificó ningún grupo de genes que respondieran al almacenamiento en frío exclusivamente en CN. Cabría la posibilidad que la respuesta de aclimatación de CN fuese rápida y ya no se detectara tras la primera semana de almacenamiento en frío. Aunque esa posibilidad (no acertar la ventana temporal para identificar las diferencias relevantes) no se puede descartar, el análisis de la respuesta de CN a tiempos cortos tampoco reveló ningún programa de respuesta rápida al frío considerable, por lo que cabría la posibilidad que la resistencia al frío de las mandarinas CN fuera algo inherente a ellas previamente a la exposición al frío, y por tanto independientemente de su respuesta. En ese sentido, sí destacaron dos grupos de genes diferenciales entre CN y F (SOMs 5 y 6 de Fig. 28) con mayor expresión en CN desde antes del almacenamiento en frío, y que podrían conferirle una capacidad de mantenimiento de la homeostasis celular sin desarrollar daños visibles.

Por el contrario, en F sí se encontraron respuestas específicas de esta variedad, que incluyeron una leve activación a tiempos cortos de un numeroso grupo de genes (SOM 3 de Fig. 28) y respuestas específicas o más acusadas en F a partir de la segunda/cuarta semana de almacenamiento (SOMs 4 y 8 respectivamente de (Fig. 28), coincidiendo con el desarrollo de DF en la variedad sensible, y por tanto, posiblemente relacionado.

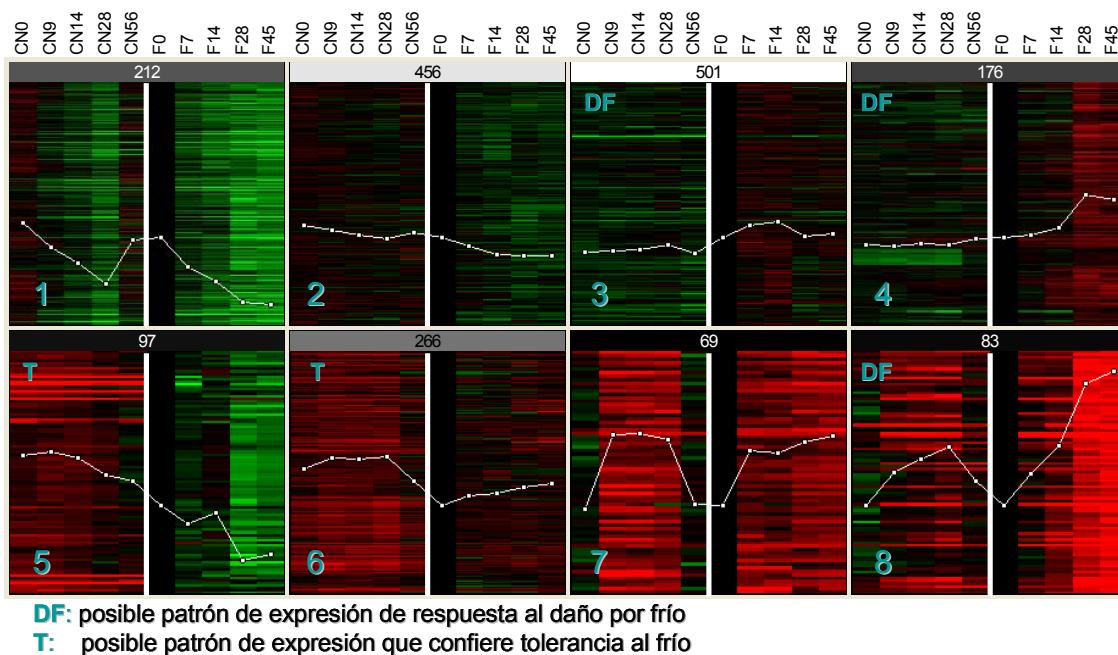


Figura 28. Análisis de agrupamiento no jerárquico según mapas auto-organizados (SOMs) de los datos de expresión durante el almacenamiento en frío de los genes diferenciales entre las variedades CN y F según el análisis estadístico SAM *time course*. Se muestran los datos normalizados frente al tiempo cero de F. Se muestra el agrupamiento en 8 grupos SOM de un análisis 4x2. En rojo se representan los valores de inducción, en verde los de represión y en negro los valores que no cambian respecto a F0. En cada SOM aparece la línea de tendencias representativa del perfil promedio de expresión de las sondas incluidas en el grupo. En cada SOM se indica el número de sondas que se incluyen dentro del perfil.

El siguiente paso fue tratar de identificar los procesos moleculares subyacentes al diferente comportamiento de CN y F durante el almacenamiento en frío. Para ello, se profundizó en el análisis de los grupos SOM con perfiles diferenciales potencialmente relacionados con las diferencias fisiológicas, utilizando para ello la clasificación funcional de los genes incluidos (Tabla Supl.9).

5.2.1 Diferencias de expresión intravarietal potencialmente relacionadas con la tolerancia de Clemenules

Se partió de la hipótesis que genes relacionados con la defensa frente al estrés con perfiles de mayores niveles de expresión en CN que en F podrían ser responsables de la aclimatación al frío específicamente en CN. De hecho, la mayor expresión en CN se mostró en tiempos iniciales anteriores al tratamiento de bajas temperaturas.

SOM 5 (perfil de represión en ambas variedades con niveles de expresión superiores en CN respecto F):

En primer lugar, cabe destacar los genes con niveles de expresión iniciales superiores al doble en CN respecto de F:

En los genes identificados de señalización se encontró el sensor de calcio *EF-hand*, *aCL26Contig9*, que se reprimió en ambas variedades, pero más severamente en F que, además, ya presentó la mitad de expresión respecto a CN antes de la exposición al frío (Tabla Supl.9, SOM5). Según estas diferencias, la actividad de esta proteína de unión a calcio podría ser importante en el establecimiento de la tolerancia de CN.

En la categoría degradación se clasificó un gen *putativo subtilasa (SBT)*, *aCL2182Contig1*, cuyos niveles de expresión disminuyeron hasta llegar a un mínimo a los 28 d a 2°C de manera similar en ambas variedades, pero CN mostró niveles cuatro veces más elevados que F desde el tiempo inicial (Fig. 29). Las subtilasas son proteasas que se han relacionado con la defensa frente a patógenos (Tornero *et al.*, 1996; 1997). Sin embargo, la actividad de alguna de ellas también se ha mostrado esencial para el correcto funcionamiento de la percepción o respuesta temprana al estrés abiótico en *Arabidopsis* (Rautengarten *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2007). Según esto último, la actividad de esta subtilasa podría ser importante para el correcto procesamiento de la señalización de estrés por bajas temperaturas, de modo que en F la respuesta funcionaría peor.

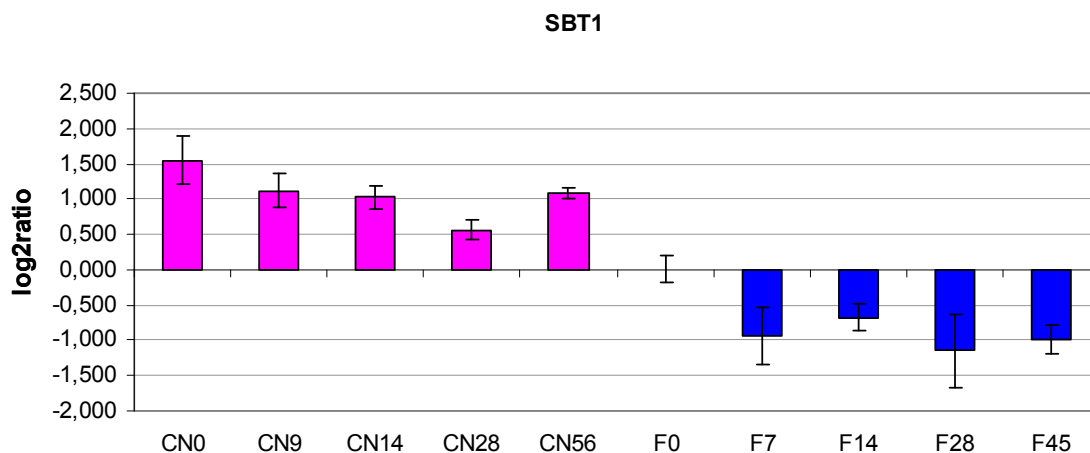


Figura 29. Valores de expresión del gen *SBT* normalizados respecto los niveles en F0. En el eje de las X se muestra el valor de la media de las cuatro réplicas $\log_2 X/F_0$, siendo X cada muestra de la serie temporal de CN y F. En el eje Y las muestras de CN (rosa) y F (azul) en los cinco tiempos analizados de almacenamiento a 2°C. La barra de error corresponde a la sd de las cuatro réplicas.

Se identificaron diversos genes de respuesta a estrés que también presentaban este patrón. Un gen de respuesta a estrés biótico fue el gen *precursor tipo germin*, *aCL311Contig2*, que presentó una expresión más de 12 veces superior en CN que en F desde el tiempo inicial si bien a partir de las cuatro semanas estas diferencias de expresión se redujeron (Fig. 30). Existen varios genes *germin* que forman parte de un QTL de resistencia a enfermedad en arroz (Manosalva *et al.*, 2009). En cambio el estudio de seis subfamilias de *germin* en plántulas de cebada, reveló que dos de ellos se inducían por frío (Zimmermann *et al.*, 2006). Las germinas podrían actuar como receptores de estrés, poseen actividad oxalato oxidasa y liberan mensajeros secundarios como el H_2O_2 y Ca^{2+} , de modo que sería esperable que tuviesen una respuesta rápida y temprana al estrés y que los niveles de transcrito disminuyeran a tiempos medios y largos (Lane *et al.*, 1993, Berna y Bernier, 1999; Membré *et al.*, 2000). De acuerdo con esto, los mayores niveles de expresión de *germin* en CN le permitirían aclimatarse mejor al frío.

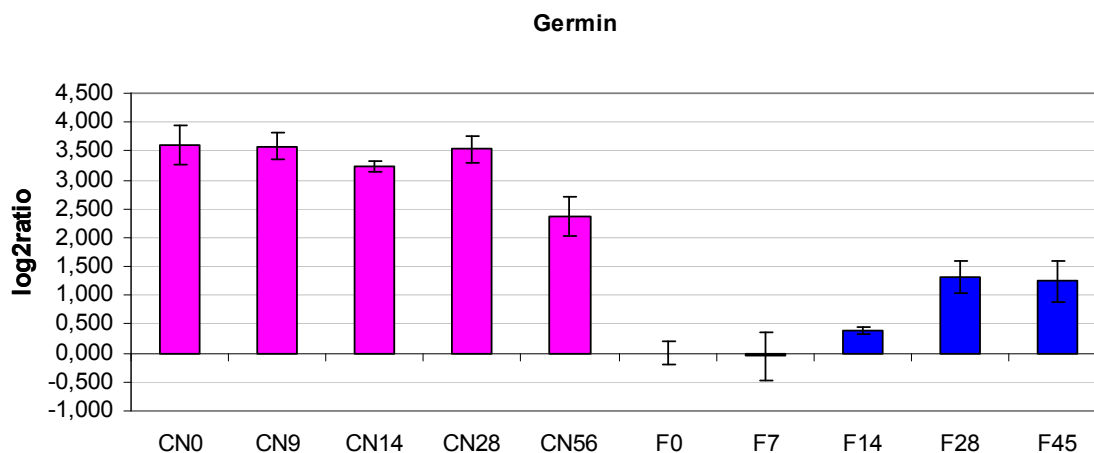


Figura 30. Valores de expresión del gen *germin* normalizados respecto los niveles en F0. En el eje de las X se muestra el valor de la media de las cuatro réplicas $\log_2\text{ratio}=\log_2X/F0$, siendo X cada muestra de la serie temporal de CN y F. En el eje Y las muestras de CN (rosa) y F (azul) en los cinco tiempos analizados de almacenamiento a 2°C. La barra de error corresponde a la sd de las cuatro réplicas.

Dentro de la categoría *respuesta a estrés hídrico* el gen *Miraculin-like protein 2, aCL1Contig11*, se mostró mucho más inducido en CN que en F (apartado 5.2.1 “SOM6 (perfil de inducción en ambas variedades con niveles de expresión superiores en CN respecto F)”, Tabla Supl. 9). Incluso en F se apreció una disminución de su expresión a los 28 d a 2°C, coincidiendo con la mayor severidad del DF. Esta observación sugiere que CN podría estar más preparada que F ante una posible deshidratación.

En cuanto al metabolismo secundario, se encontraron varios genes con valores de expresión sustancialmente mayores en CN incluso antes de la exposición al frío (Fig. 32). Entre ellos, dos genes importantes de la ruta de biosíntesis de terpenos, *subunidad pequeña de geranil difosfato sintasa, aCL960Contig1*, precursor del geranilgeranil bifosfato (GGPP); y *terpeno sintasa (TPS) aCL4874Contig1*.

Los restantes genes del SOM 5 (perfil de represión en ambas variedades con niveles de expresión superiores en CN respecto F) también mostraron mayor expresión en CN0 pero destacaron por los cambios de expresión en otros tiempos del almacenamiento en frío:

En consonancia con lo observado para cada variedad en anteriores apartados, donde se identificó una represión significativa de la traducción, el unigen *aC08002B12SK_c* que codifica un factor de elongación 4A (EF-4A), con caja DEAD y similitud con helicasas de RNA, se reprimió en ambas variedades (Fig. 31). No

obstante, los niveles de expresión de EF-4A fueron considerablemente mayores en CN en muestras recién traídas de campo, y esta tendencia continuó en el resto de la serie ya que la represión fue incluso más pronunciada en F. El homólogo de este gen en *Arabidopsis*, responde a estrés por hipoxia (Koroleva *et al.*, 2009), la actividad de esta helicasa podría ser importante para la traducción de proteínas implicadas en respuesta a estrés. En el apartado 5.1 ya se comentó el *factor de inicio de la transcripción gamma-IIA*, *aCL5775Contig1*, inducido la primera semana de almacenamiento a bajas temperaturas en CN y sin cambios de expresión en F a lo largo de la postcosecha. En esta misma situación podría estar el factor de elongación EF-1A, *aC05014F01SK_c*, que en CN presentó mayor expresión inicialmente y se indujo transitoriamente la primera semana, mientras que en F se reprimió a las cuatro semanas (Fig. 31). Este gen promueve la unión de GTP del aminoacil-tRNA a los ribosomas durante la traducción, siendo un modificador postraduccional de eucariotas (Riis *et al.*, 1990). Ante diversas situaciones, las células pueden ser selectivas en la traducción activando y desactivando factores de elongación según convenga (Bailey-Serres, 1999). Esta respuesta selectiva podría explicar que algunos genes *eF* se reprimieran y otros se indujeran en el flavedo de mandarinas sometidas a bajas temperaturas postcosecha.

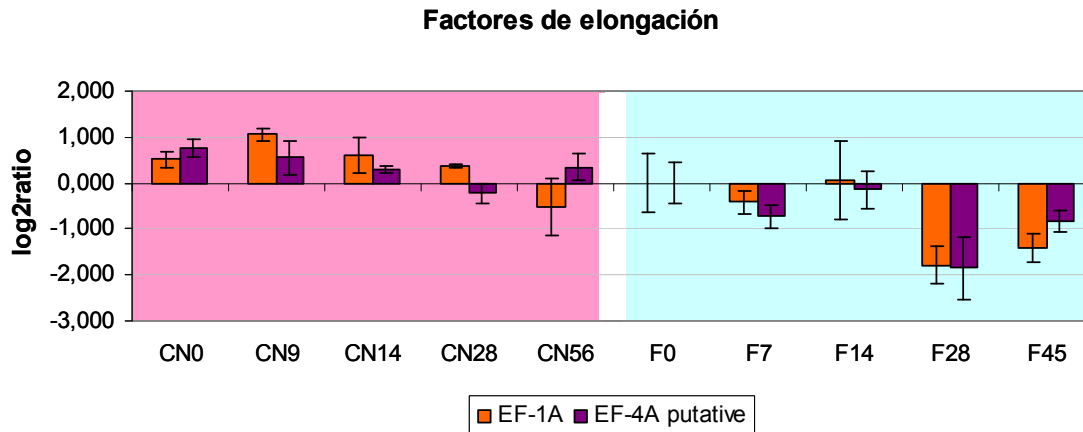


Figura 31. Valores de expresión de dos factores de elongación, los genes *EF-1A* y *EF-4A*, normalizados respecto los niveles en F0. En el eje de las X se muestra el valor de la media de las cuatro réplicas $\log_2\text{ratio}=\log_2X/F_0$, siendo X cada muestra de la serie temporal de CN y F. En el eje Y las muestras de CN (rosa) y F (azul) en los cinco tiempos analizados de almacenamiento a 2°C. La barra de error corresponde a la sd de las cuatro réplicas.

Los genes de respuesta a estrés presentaban una gran diferencia entre variedades en las muestras correspondientes a la cuarta semana de almacenamiento a bajas temperaturas: se reprimían sustancialmente en F coincidiendo con el máximo DF acumulado mientras que en CN se observaba cierta inducción. Tal es el caso del

unigen *aC05011H05SK_c* (Tabla 23), que codifica una proteína con dominio NB-ARC característico de algunas proteínas que se activan por muerte celular (Biezen y Jones, 1998). La represión en F coincidió con el desarrollo de DF y por tanto con mayores niveles de muerte celular asociado a las zonas necróticas propias del DF en F. Este gen podría estar implicado en los procesos iniciales de aparición de DF. El unigen *aCL1972Contig1*, codifica una proteína de transporte Sec61. En CN hubo una pequeña inducción que alcanzó el máximo de expresión entre la primera y la segunda semana de almacenamiento a 2°C y posteriormente se reprimió, sobre todo después de las cuatro semanas (Tabla 23). En cambio, en F hubo una gran represión tardía, a las cuatro semanas, sin inducción previa como ocurrió en CN, llegando a niveles 2,5 veces inferiores a los iniciales. Este gen se ha descrito como inducible por estrés salino en *Arabidopsis* (Gong *et al.*, 2001), y por tanto, podría formar parte de la red entrecruzada de respuesta a estrés salino y frío, confiriendo con su inducción, durante estadíos intermedios de la exposición a bajas temperaturas, parte de la tolerancia a CN. Con el mismo patrón de expresión que Sec otros genes de defensa podrían proteger a CN durante el estrés por bajas temperaturas (Tabla Supl. 9, SOM5) (Tabla 23). Uno de estos genes fue el que codifica una proteína básica inducible por herida *aCL564Contig1* (*Wound-induced basic protein*, Shen y Mehdy, 1993); el unigen *aCL4477Contig1* que codifica una HSP; y el unigen *aC05014A08SK_c*, *CPRD47* (*cowpea clones responsive to dehydration*), que pertenece a una familia de genes de respuesta a deshidratación, aunque no responden al estrés por frío (Iuchi *et al.*, 1996).

TABLA 23. Valores de expresión de genes de respuesta a estrés con perfil de represión en ambas variedades con mayor expresión en CN, normalizados respecto los niveles en F0

Anotación Unigen	log ₂ ratio (*)									
	CN0	CN9	CN14	CN28	CN56	F0	F7	F14	F28	F45
NB-ARC <i>aC05011H05SK_c</i>	0,511	0,722	0,878	0,655	-0,064	0	-0,411	0,313	-1,488	-1,311
Sec61 <i>aCL1972Contig1</i>	0,373	0,772	0,742	0,451	-0,018	0	-0,141	0,001	-1,293	-1,230
Wound-induced basic protein <i>aCL564Contig1</i>	0,391	1,091	0,928	0,534	-0,440	0	0,030	0,092	-0,991	-1,046
HSP <i>aCL4477Contig1</i>	0,379	0,296	0,853	0,643	-0,052	0	-0,337	0,155	-1,412	-0,993
CPRD47 <i>aC05014A08SK_c</i>	0,371	0,678	0,930	0,737	0,403	0	-0,059	0,366	-0,697	-0,962

(*) Media de las cuatro réplicas de log₂ratio=log₂X/F0, siendo X cada una de las muestras de la serie temporal de CN y F. Los valores de expresión negativos indican represión y positivos inducción respecto F0.

Dentro de la categoría de genes del metabolismo secundario, se identificaron dos genes de biosíntesis de polifenoles, un *orcinol-OMT (OOMT)*, *aCL3052Contig1*, y un *citocromo P450 CASS tipo hidroxilasa*, *aCL627Contig1*, posiblemente implicados en la biosíntesis de compuestos fenólicos importantes para el desarrollo y defensa (Franke *et al.*, 2002). En general, estos genes mostraron una ligera represión a tiempos largos de almacenamiento en frío (Fig. 32), pero en los frutos de la serie de CN mostraron mayores niveles de expresión que cualquiera de los puntos de la serie de F. Algunos metabolitos secundarios juegan un papel importante en la protección frente a diversos estreses, por su poder de atenuación del estrés oxidativo que se produce como respuesta general al estrés (Vickers *et al.*, 2009).

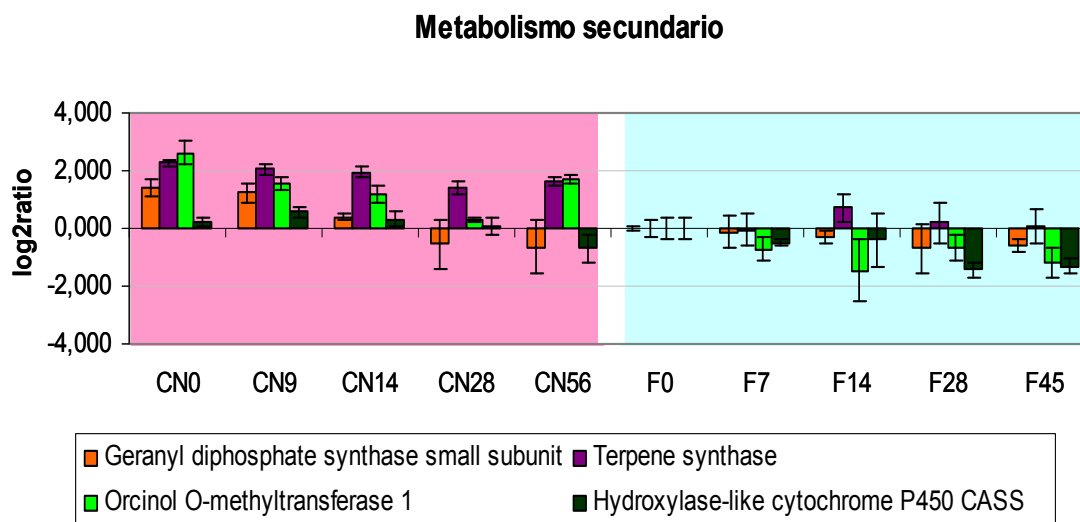


Figura 32. Valores de expresión de los genes del metabolismo secundario *subunidad del precursor del GGPP*, *TPS*, *OOMT*, *CP450 CASS*, normalizados respecto los niveles en F0. En el eje de las X se muestra el valor de la media de las cuatro réplicas $\log_2\text{ratio}=\log_2X/F0$, siendo X cada muestra de la serie temporal de CN y F. En el eje Y las muestras de CN (rosa) y F (azul) en los cinco tiempos analizados de almacenamiento a 2°C. La barra de error corresponde a la sd de las cuatro réplicas.

Teniendo en cuenta todos los datos de genes del metabolismo secundario del SOM 5 (perfil de represión en ambas variedades con niveles de expresión superiores en CN respecto F), cabría pensar que CN estaba mejor preparada para hacer frente al estrés que F, fundamentalmente porque en las muestras recién traídas de campo de CN los niveles de transcritos de genes correspondientes al metabolismo secundario fueron más del doble que los de F.

SOM 6 (perfil de inducción en ambas variedades con niveles de expresión superiores en CN respecto F):

En el SOM6 se identificaron algunos genes con una expresión inicial en CN que era mayor al doble que la de F:

COMPONENTES DE LA MEMBRANA (CN0>2 F0)

Biosíntesis de lípidos

El gen *fosfatidato citidiltransferasa*, *aC01008H04SK_c*, que participa en la biosíntesis de fosfolípidos se reprimió desde los 14 d a 2°C en CN, y se indujo a partir de 28 d a 2°C en F (Tabla Supl. 9, SOM6). Sin embargo, los niveles de expresión en CN fueron mayores a los de F en todos los tiempos de la serie, ya que en muestras recién traídas de campo los niveles en CN fueron casi ocho veces superiores a los de F. Este gen se expresa fuertemente en manzanas, en estadios jóvenes del fruto (Lee *et al.*, 2007), y codifica una proteína que posiblemente forme parte de la membrana interna plastidial relacionada con la importación de proteínas y el metabolismo de glicerolípidos en *Arabidopsis* (Koo y Ohlrogge, 2002). Podría estar implicada en la tolerancia de CN en caso que su función sea importante para dotar a la membrana de una estructura estable ante las bajas temperaturas.

Proteínas integrales

El *transportador dicarboxilato tonoplástico (tDT)*, *aCL5Contig3*, tuvo mayor expresión en flavedo de frutos CN previamente a la exposición al frío y se reprimió levemente, mientras que en F se indujo más de dos veces el valor inicial desde la cuarta semana de almacenamiento a bajas temperaturas (Tabla Supl. 9, SOM6). La actividad tDT es crítica en la regulación de la homeostasis del pH en *Arabidopsis*, al permitir el transporte de ácidos como el ácido málico (Hurth *et al.*, 2005). Teniendo en cuenta esto, cabe pensar que la actividad de este gen sea necesaria para mantener la homeostasis celular en situaciones de estrés y que su mayor expresión en CN, independientemente del estrés, le haga más tolerante al mismo. En cambio, en F se induciría el transportador al extremarse el estrés, pero posiblemente, demasiado tarde como para poder evitar los daños.

DEGRADACIÓN DE PROTEÍNAS (CN0>2 F0)

El gen *precursor de la enzima de procesado vacuolar, gamma-VPE*, *aCL554Contig1*, siempre mantuvo niveles superiores en CN (los niveles en la variedad tolerante fueron más del doble hasta la primera semana en frío) respecto a la variedad sensible (Tabla Supl. 9, SOM6). El gen *Citvac*, que también codificaba una VPE,

aumenta su expresión durante la maduración de frutos *Citrus sinensis*, y este aumento era mayor en frutos tratados con ET (Alonso y Granell, 1995). La enzima de procesado vacuolar (VPE, *vacuolar processing enzyme*) es una cisteín-proteinasa responsable del procesamiento proteolítico y/o activación de varias proteínas vacuolares, y en *Arabidopsis* la expresión de la gamma-VPE se induce en respuesta a diversos estreses (Kinoshita *et al.*, 1999). Según esto, la mayor expresión de este gen en CN incluso antes de la exposición al frío puede ser un indicativo más que esta variedad presenta un transcriptoma preadaptado a situaciones de estrés incluidas las de bajas temperaturas.

RESPUESTA A ESTRÉS ABIÓTICO (CN0>2 F0)

Estrés por metales pesados

El gen *F22L4.5*, *aCL3704Contig1*, codifica un putativo transportador de metales, que se indujo de forma similar en ambas variedades, pero que en CN0 presentó más del doble de expresión que en F0 (Tabla Spl. 9). Podría ser un gen de respuesta general al frío o de senescencia, y por eso las dos variedades tuvieron un patrón similar, pero la mayor expresión inicial en CN podría suponerle una mayor capacidad de detoxificación de metales.

Estrés oxidativo

El gen *peroxidasa*, *aCL201Contig1*, se indujo en ambas variedades pero en tiempos iniciales los niveles de expresión en CN fueron el doble que en F (Fig. 33).

El gen *glucosa 6-fosfato deshidrogenasa plastidial (G6PDH)*, *aCL7786Contig1*, mostró una ligera tendencia a la represión en ambas variedades, pero los niveles de CN durante el almacenamiento a 2°C fueron prácticamente el doble que los de F en toda la serie (Fig. 33). La enzima codificada por este gen cataliza la primera reacción de la ruta de las pentosas fosfato y produce NADPH que es necesario como poder reductor para la biosíntesis de metabolitos como ácidos grasos y glutatión. Como ya se ha comentado, estos metabolitos son importantes para paliar los efectos del frío en cuanto a la estabilidad de la membrana y el estrés oxidativo, de modo que la mayor expresión de este gen en toda la serie de CN podría dotarle de una mayor capacidad de aclimatación. No obstante, la actividad G6PDH parece ser importante para determinar la capacidad antioxidante de las plantas frente a diversos estreses (Wang *et al.*, 2008). Esta actividad incrementa durante la aclimatación a la congelación de *Populus* concomitante con el aumento de la capacidad antioxidante (Lin *et al.*, 2005) y también tras tratamientos de frío en trigo de invierno (Okuda *et al.*, 1992).

Estrés oxidativo

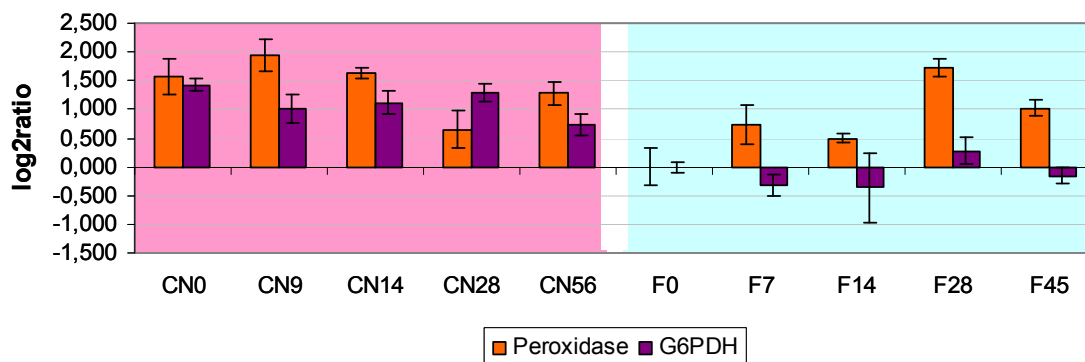


Figura 33. Valores de expresión de los genes del estrés oxidativo *peroxidasa* y *G6PDH* normalizados respecto los niveles en F0. En el eje de las X se muestra el valor de la media de las cuatro réplicas $\log_2\text{ratio}=\log_2X/F0$, siendo X cada muestra de la serie temporal de CN y F. En el eje Y las muestras de CN (rosa) y F (azul) en los cinco tiempos analizados de almacenamiento a 2°C. La barra de error corresponde a la sd de las cuatro réplicas.

Estrés hídrico

Destacan las diferencias en la familia génica de las miraculinas. Hasta diez contigs de miraculina presentaron una expresión considerablemente mayor en muestras de CN recién traídas de campo (*aCL297Contig1*, *aCL297Contig2*, *aCL1Contig1*, *aCL1Contig10*, *aCL1Contig11*, *aCL1Contig13*, *aCL1Contig19*, *aCL1Contig33*, *aCL1Contig5*, *aCL1Contig12*) (Tabla Supl. 9, SOM6). No obstante, la mayoría de ellas presentaron una respuesta similar al almacenamiento en frío en ambas variedades, con una tendencia general a la inducción, aunque modesta (Fig. 34). El gen *aCL1Contig11* también se identificó en el SOM 5 (perfil de represión en ambas variedades con niveles de expresión superiores en CN respecto F). Según Gimeno *et al.* (2009), estos diez contigs podrían corresponder realmente a cinco genes (*Miraculin-like protein 1*: *aCL297Contig1*, *aCL297Contig2*; *Miraculin-like protein 2*: *aCL1Contig19*, *aCL1Contig1*; *Miraculin-like protein 3*: *aCL1Contig12*; *Miraculin-like protein 5*: *aCL1Contig13*, *aCL1Contig33*, *aCL1Contig11*, *aCL1Contig5*; y *Miraculin-like protein 6*: *aCL1Contig10*). De estos genes, los de las miraculinas 3, 5 y 6 se inducen en respuesta a daño en raíces y hojas de mandarino, mientras que la 1 y la 2 no se expresan en estos órganos (Gimeno *et al.*, 2009), por lo que éstas dos miraculinas podrían ser específicas de fruto, o bien haberse obtenido por hibridación cruzada en alguna de las sondas de la micromatriz. En cambio, la *miraculina 4*, inducida por estrés hídrico (Gimeno *et al.*, 2009), no se mostró diferencial entre los flavedos de CN y F. Las miraculinas tienen estructura homóloga a inhibidores de tripsina (Theerasilp *et al.*, 1989) y éstos suelen inducirse en respuesta a distintos estreses (Botelho-Junior *et al.*,

2008) y proteger frente a los mismos (Srinivasan *et al.*, 2009). Asimismo, las miraculinas parecen ser parte de una situación preformada (previa a la exposición al estrés) que resultaría en un estado de tolerancia más activada en CN que en F.

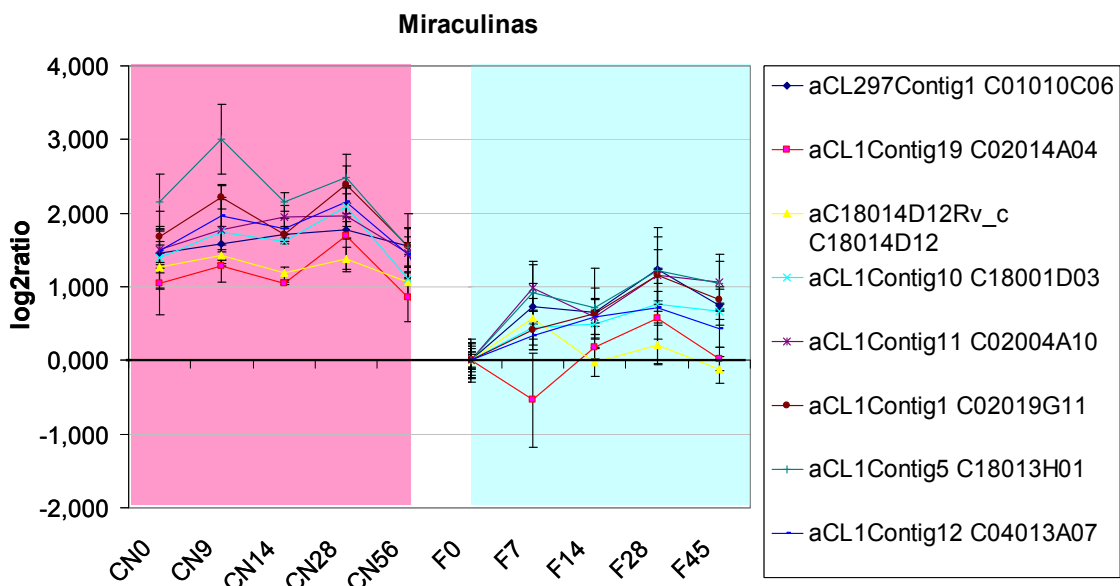


Figura 34. Valores de expresión de varios genes *miraculina*, normalizados respecto los niveles en F0. En el eje de las X se muestra el valor de la media de las cuatro réplicas $\log_2\text{ratio}=\log_2X/F_0$, siendo X cada muestra de la serie temporal de CN y F. En el eje Y las muestras de CN (rosa) y F (azul) en los cinco tiempos analizados de almacenamiento a 2°C. La barra de error corresponde a la sd de las cuatro réplicas.

RESPUESTA A ESTRÉS BIÓTICO/ABIÓTICO (CN0>2 F0)

Los genes *quitinasa*, *aCL10Contig3*, *aCL10Contig7*, *aCL10Contig1*, *aCL10Contig4*, *aCL10Contig9*, generalmente asociados a la defensa de las plantas frente a hongos patógenos, se reprimieron en ambas variedades, pero presentaron mayor expresión a tiempo cero en CN (Fig. 35). Ello reforzaría la idea que los frutos de CN recién cosechados tendrían más activado un programa de defensa amplio que incluiría estreses bióticos y abióticos. Estudios previos ponen de manifiesto un gen *quitinasa* que se reprime con el almacenamiento en frío, pero se mantiene durante el acondicionamiento (Sanchez-Ballesta *et al.*, 2003). Aunque está por precisar en el caso de estos genes de cítricos, se sabe que en hojas de centeno de invierno algunos genes *quitinasas* no son catalíticamente activos sino que codifican proteínas anticongelantes en respuesta al frío (Yeh *et al.*, 2000). Por tanto, los elevados niveles de expresión iniciales de *quitinasas* en CN, antes y durante la exposición prolongada al frío, podría dotar de tolerancia a CN que de esta forma se comportaría como si estuviera “preaclimatada” al frío.

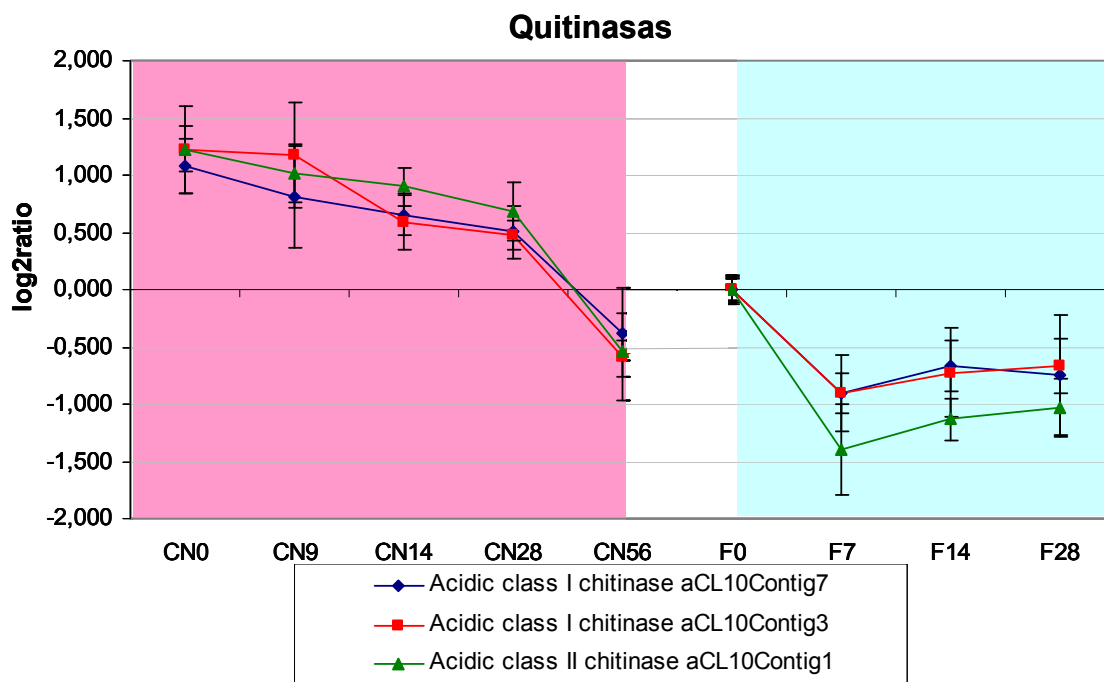


Figura 35. Valores de expresión de tres genes *quitinasa*, normalizados respecto los niveles en F0. En el eje de las X se muestra el valor de la media de las cuatro réplicas $\log_2\text{ratio}=\log_2X/F0$, siendo X cualquier muestra de la serie temporal de CN y F, y en el eje Y las muestras de CN (rosa) y F (azul) en los cinco tiempos analizados de almacenamiento a 2°C. La barra de error corresponde a la sd de las cuatro réplicas.

METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS (CN0>2 F0)

El gen *sacarosa sintasa (SS)*, *aCL923Contig1*, se indujo levemente, de forma similar en ambas variedades; sin embargo, en CN los niveles iniciales doblaron los de F, y por tanto, también en el resto de la serie (Fig. 40). Según esto, el flavedo de CN podría tener más actividad SS que el de F. Esta diferencia también fue hallada entre otras dos variedades de cítricos que diferían en su tolerancia al frío, Navelate sensible y Pinalate resistente y con mayor actividad SS y acumulación de sacarosa (Holland *et al.*, 2005). Además, la aclimatación por calor evita la caída de los niveles de sacarosa tanto en Navelate como en Pinalate (Holland *et al.*, 2005). Este aumento también se produce en condiciones de estrés por frío en garbanzo, específicamente en líneas tolerantes (Kaur *et al.*, 2009).

Los demás genes del SOM 6 (perfil de inducción en ambas variedades con niveles de expresión superiores en CN respecto F) no presentaron tanta diferencia inicial y se pueden clasificar en:

SEÑALIZACIÓN

En los SOM 5 y 6 (niveles de expresión superiores en CN respecto F) destacó la presencia de genes de *Señalización*, que podrían estar implicados en la tolerancia de CN. Uno de estos genes, en el SOM6, fue la *quinasa tipo CDG1, aCL7304Contig1* (Fig. 61 en el posterior apartado 7.2 “Proteínas quinazas”). Se indujo con un perfil similar en ambas variedades, pero su mayor expresión en CN podría estar relacionada con la efectividad de la respuesta de adaptación al frío para evitar DF, en el caso que esta quinasa participe en la activación de defensas frente al frío.

El gen *TAP46 subunidad reguladora de PP2, aCL1457Contig1*, se indujo específicamente en CN a partir de dos semanas (Fig. 60 en el posterior apartado 7.2 “Fosfatasa”). *TAP46* es un gen inducible por bajas temperaturas en *Arabidopsis*, que interacciona con la subunidad catalítica de PP2A (Harris *et al.* 1999). PP2A tiene una importante función en la regulación del crecimiento y desarrollo (DeLong, 2006) y de la transducción de la señal por frío (Monroy *et al.*, 1998;). Teniendo en cuenta esta diferencia, es posible que esta fosfatasa participe de algún modo en la tolerancia de las mandarinas CN.

Así como el gen *UPI0000162BA0 (aC05011D04SK_c, inositol o fosfatidilinositol quinasa/fosfotransferasa, grupo alcohol como aceptor)* se indujo específicamente en CN desde la primera semana a 2°C, por lo que podría actuar en la cascada que induce la aclimatación en esta variedad (Tabla Supl. 9, SOM6).

METABOLISMO Y COMPONENTES DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA

Degradación de lípidos

La degradación de ácidos grasos por β -oxidación la realizan las enzimas ACX y, la última reacción, las 3-ketoacil-CoA aciltransferasa (tiolasas) (Froman *et al.*, 2000). Genes codificantes de ambos tipos de enzimas se indujeron durante la postcosecha en frío en el flavedo de las mandarinas CN y F, con la diferencia que la expresión previa a la exposición al frío era considerablemente más alta en CN (Tabla Supl. 9, SOM6). Atendiendo a estas diferencias, es posible que en CN haya una mayor degradación de lípidos de membrana, que podría favorecer la fluidez de la membrana ante las bajas temperaturas (Thomashow, 1999). Uno de estos casos es el del gen *precursor peroxisomal ACX3, aCL3200Contig2*. El ortólogo de este gen en *Arabidopsis* se induce en flores y en hojas senescentes (Froman *et al.*, 2000). Por otra parte, el

ácido indol-3-butírico (IBA) se convierte en la auxina activa ácido indol-3-acético (IAA) en un proceso similar a la β -oxidación de los ácidos grasos en el que se encuentran implicados algunos genes como *ACX3* (Adham *et al.*, 2005). Similar es el caso de la *tiolasa*, *aCL4525Contig1*, cuya inducción en ambas variedades sería consistente con el aumento de su expresión en senescencia de hojas en *Arabidopsis* (Castillo y León, 2008; Yang y Ohlrogge, 2009). Podría tener una función en la respuesta de defensa frente a patógenos y herida porque forma parte de la ruta de biosíntesis de moléculas de defensa como el gossipol en algodón (Dowd *et al.*, 2004) y el JA (Afitlhile *et al.*, 2005). Los mayores niveles de expresión de este gen CN desde el tiempo inicial, independientemente del perfil similar al de F podría favorecer la protección de CN. Otro gen de degradación de lípidos con mayor expresión en CN independientemente a la exposición de frío fue el gen saposina *P0028E10.2*, *aCL685Contig1* (Tabla Supl. 9, SOM6). Sin embargo, el grado de instauración de lípidos de membrana no parece ser un factor crítico en tolerancia al frío de frutos cítricos, como mandarinas F (Mulas *et al.*, 1996, 1997) y naranjas Olinda (Schirra y Cohen, 1999). Además, si realmente la β -oxidación está más activa en CN ello le proporcionaría una forma adicional de obtención de energía por parte de las células (Goepfert y Poirier, 2007).

Sería interesante analizar la composición de lípidos de membrana de las células del flavedo en las dos variedades durante el almacenamiento a bajas temperaturas. De hecho hay trabajos que demuestran que ocurren cambios en la composición lipídica, tanto en la longitud de las cadenas de carbono como en el número de insaturaciones, durante la aclimatación al frío en *Arabidopsis* (Wang *et al.*, 2006).

Proteínas integrales

El gen que codifica un polipéptido de membrana plasmática, *aCL817Contig4*, con la máxima similitud del gen *At4g20260* (Tabla Supl. 9, SOM6). En CN mostró un perfil prácticamente plano durante las cuatro primeras semanas de almacenamiento en frío y sólo se indujo en el estadio tardío de 56 d. En cambio, en F se indujo desde la primera semana, pero sus niveles de expresión apenas alcanzaron los niveles de la muestra de CN previamente a la exposición al frío. El transcrito de *At4g20260* se induce por bajas temperaturas (Kawamura y Uemura, 2003), aunque no se detecta el incremento de proteína (Ide *et al.*, 2007). Hay genes que codifican polipéptidos de membrana plasmática que también se inducen con el frío, como un polipéptido de 19 kDa identificado en suspensiones celulares embrionarias de trigo de invierno (tolerante a las bajas temperaturas) tratadas con ABA en frío (Koike *et al.*, 1997). Las diferencias en la expresión de este gen *péptido membrana* entre las dos variedades podrían ser

un indicativo más que en el flavedo de CN ya hay respuestas al frío activadas previamente al almacenamiento postcosecha. Sin embargo, estas diferencias podrían tener origen en las diferentes condiciones de temperatura en el momento de la recolección.

Por otra parte, un transportador de zinc, *aCL188Contig1*, se indujo en CN, alcanzando un pico a las dos semanas y se reprimió levemente en F (Tabla Supl. 9, SOM6). Es posible que este transportador sea necesario para facilitar el transporte de ese micronutriente ante las bajas temperaturas y que por tanto la piel de F quedaría deficitaria en el mismo, contribuyendo a su deterioro. En ese sentido, el transporte de zinc sería menos eficiente a bajas temperaturas y genes codificantes de transportadores de este tipo se inducen ante situaciones deficitarias del nutriente (Grotz *et al.*, 1998; Hacisalihoglu *et al.*, 2001).

ESTRÉS ABIÓTICO

Estrés térmico

Se identificaron cuatro genes codificantes de chaperonas con un perfil de expresión significativamente diferencial entre CN y F, que pese a no mostrar respuestas importantes al tratamiento de frío, sí presentaron mayores niveles de expresión en el flavedo de frutos de CN recién traídos de campo (Fig. 36). Entre ellos el gen *HSP de bajo peso molecular citosólico de clase II, aCL186Contig1*; el gen *70 kDa peptidilprolil isomerasa, aCL4Contig11*; y el gen *DnaJ, aCL179Contig2*, codifica una carabina molecular, con inducción la primera semana de frío en CN e inducción tardía en F. Ese patrón sería compatible con que el producto génico contribuyera a la paliación de los efectos del frío en CN, mientras que en F su activación ocurriría demasiado tarde como para impedir la aparición de daños. Como ya se citó en el apartado 4.2.2 (Tablas 19 y 20), la fuerte inducción del gen *DnaJ, aCL1136Contig2*, fue una de las respuestas más significativas en el flavedo de CN a las 24 h de postcosecha a 2°C. En caso que la mayor expresión de estos genes en mandarinas CN les proporcionase una mayor actividad chaperona, les podría permitir una mejor aclimatación al frío al facilitar el correcto plegamiento/actividad de otras proteínas a bajas temperaturas. En general, las chaperonas HSP no se inducen por bajas temperaturas, pero sí se ha descrito tras la exposición de los frutos a calor, lo cual mejora su posterior tolerancia al frío (Polenta *et al.*, 2007). Es posible que la mayor expresión en frutos de CN recién recogidos responda a exposiciones de los frutos a unas condiciones diferentes durante su desarrollo en el campo, o bien ser característico de la variedad.

Estrés térmico

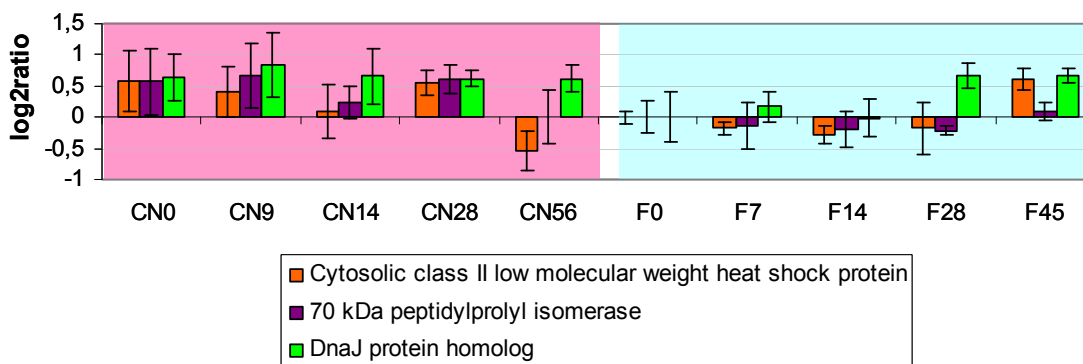


Figura 36. Valores de expresión de los genes de respuesta a estrés térmico en SOM6, normalizados respecto los niveles en F0. En el eje de las X se muestra el valor de la media de las cuatro réplicas $\log_2\text{ratio}=\log_2X/F_0$, siendo X cada muestra de la serie temporal de CN y F. En el eje Y las muestras de CN (rosa) y F (azul) en los cinco tiempos analizados de almacenamiento a 2°C. La barra de error corresponde a la sd de las cuatro réplicas.

Estrés osmótico

El gen *RING-H2 finger*, *aCL198Contig1*, ortólogo de *AtXERICO*, mostró cambios significativos en la serie de CN, con una fuerte inducción desde la primera semana (Fig. 37). En cambio, en F su expresión no presentó apenas cambios. Este gen ya se identificó en el apartado 5.1, como allí se indicó podría contribuir en mandarinas de CN a proporcionar tolerancia a las bajas temperaturas.

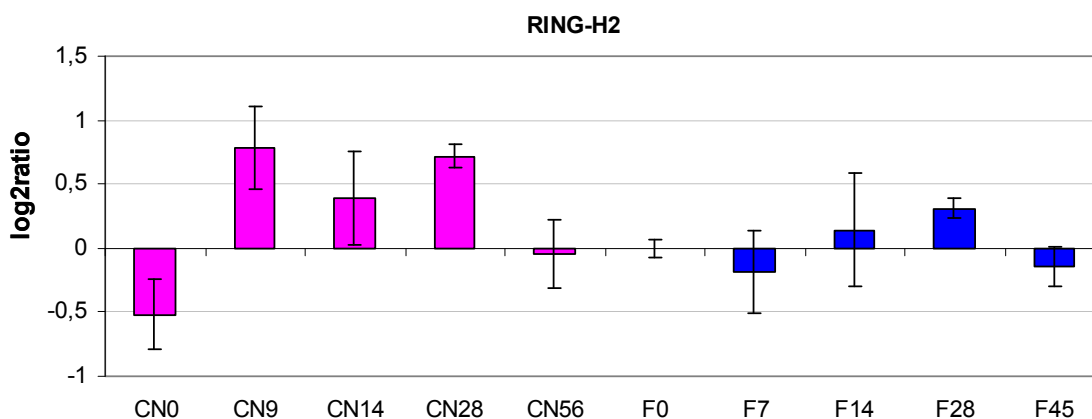


Figura 37. Valores de expresión del gen *RING-H2/XERICO*, normalizados respecto los niveles en F0. En el eje de las X se muestra el valor de la media de las cuatro réplicas $\log_2\text{ratio}=\log_2X/F_0$, siendo X cada muestra de la serie temporal de CN y F, y en el eje Y las muestras de CN (rosa) y F (azul) en los cinco tiempos analizados de almacenamiento a 2°C. La barra de error corresponde a la sd de las cuatro réplicas.

ESTRÉS BIÓTICO: Patógenos

Un caso similar al de las miraculinas es el del *inhibidor de proteinasa tipo I*, *aCL699Contig1*. Pese a que este gen se indujo a partir de las dos semanas en F y presentó una leve tendencia de inducción en CN, sus valores de expresión en CN eran el doble de los de F en el tiempo 0 inicial, y esa diferencia no se compensó hasta las cuatro semanas en frío (Tabla Supl. 9, SOM6).

Con un patrón de inducción temprana en CN y más tardía en F y, además, con mayores niveles iniciales en CN se hallaron dos genes homólogos a *HSR203J*, *aCL122Contig1* y *aCL122Contig2* (Tabla Supl. 9, SOM6). El gen *HSR203J* de tabaco codifica una carboxilesterasa de la familia de las hidrolasas serina (Baudouin *et al.*, 1997) y su expresión es considerada como marcador específico de la respuesta hipersensible en tabaco (Pontier *et al.*, 1994), *Arabidopsis* (Govrin y Levine, 2000) y vid (Bézier *et al.*, 2002). Las diferencias de expresión entre CN y F parecen sugerir de nuevo que CN posea una activación temprana de diversos genes de defensa. En este caso, la inducción tardía en F podría relacionarse con la muerte celular programada durante el DF, ya que la expresión de este gen correlaciona con muerte celular en tabaco y tomate independientemente de la respuesta hipersensible (Pontier *et al.*, 1998). En ese caso y dado que su función parece encaminada a retrasar la muerte celular más que a promoverla (Tronchet *et al.*, 2001) estaría más de acuerdo con un papel protector del DF.

El gen *cathepsin tipo-B (CatB) cisteína proteinasa*, *aCL422Contig1*, se indujo específicamente en F a partir de la cuarta semana de almacenamiento en frío (Tabla Supl. 9, SOM6). Dado que ese momento coincidía con el de máxima acumulación de DF (si bien la velocidad de aparición de daño estaría ya disminuyendo) puede que este gen participe en regular/prevenir el posible proceso de muerte celular programada que acompaña al desarrollo de la necrosis del DF (similar al papel definido para este gen por Solomon *et al.*, 1999). Este tipo de proteínas se inducen ante diversos estreses incluyendo el frío (Martinez *et al.*, 2003), y patógenos, durante la respuesta hipersensible (Gilroy *et al.*, 2007).

El gen *aCL32Contig1*, codifica una putativa *S-adenosil-L-metionina: ácido salicílico carboxil metiltransferasa* que cataliza la formación de metilsalicilato (MTS). El patrón de expresión diferencial entre las variedades indicó una inducción más temprana y potente en CN que alcanzó su máximo a las dos semanas y permaneció inducido incluso hasta 28 d (Fig. 38). En cambio, en F se reprimió a partir de la cuarta semana de almacenamiento a 2°C. La diferencia en los perfiles sugiere que el gen pueda ayudar a la tolerancia o frente al ataque de patógenos en CN. El MTS es volátil y forma parte de la inducción sistémica de defensas (Shulaev *et al.*, 1997), pero

también se ha demostrado su efecto en la reducción de DF en frutos de tomate (Fung *et al.*, 2006), por lo que CN podría producir MTS para promover defensas que palien los daños de las bajas temperaturas en CN.

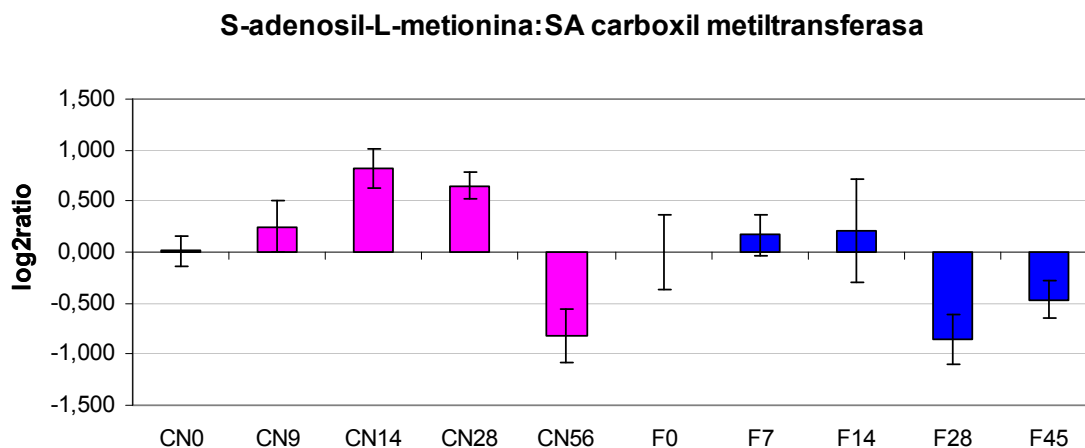


Figura 38. Valores de expresión del gen *S-adenosil-L-metionina: ácido salicílico carboxil metiltransferasa*, normalizados respecto los niveles en F0. En el eje de las X se muestra el valor de la media de las cuatro réplicas $\log_2\text{ratio}=\log_2X/F_0$, siendo X cada muestra de la serie temporal de CN y F. En el eje Y las muestras de CN (rosa) y F (azul) en los cinco tiempos analizados de almacenamiento a 2°C. La barra de error corresponde a la sd de las cuatro réplicas.

METABOLISMO DE RNA/DNA

El gen *F9L1.28, aCL261Contig3*, presentó una inducción desde la primera semana específicamente en CN y codifica una posible proteína con dominio metil-CpG-uniión (Tabla Supl. 9, SOM6).

El gen *DNA topoisomerasa I, aC01003A09SK_c*, presentó mayor expresión en CN0, por lo que quizás facilite la transcripción de genes de respuesta al estrés por frío en CN (Tabla Supl. 9, SOM6). En tabaco también se induce un gen *DNA topoisomerasa I* en condiciones de estrés por frío, luz y ABA (Mudgil *et al.*, 2002).

El gen *aCL9235Contig1*, similar a *At1g79650* que codifica la proteína RAD23 reparadora de DNA (Hays, 2002) pese a que no mostró cambios de expresión demasiado amplios, sí presentó mayor expresión en CN antes de la exposición al frío y durante las cuatro primeras semanas en frío (Tabla Supl. 9, SOM6). Este gen también podría incluirse dentro del grupo de genes de defensa que presentaron mayor expresión en CN previamente a la exposición al estrés.

El factor de transcripción *MYB92, aC20006B02SK_c*, difería entre CN y F en cuanto a que el nivel de los frutos recién traídos de campo de F fue dos veces menor que en CN, pero luego se indujo su expresión (Fig. 39), de modo que los niveles

fueron equivalentes en ambas variedades a partir de la primera semana de exposición a bajas temperaturas. Es posible que la actividad de este factor de transcripción sea importante para la activación del programa de aclimatación al frío. En este sentido, la mayor expresión en CN previamente a la exposición al estrés le permitiría una respuesta de aclimatación más efectiva evitando los daños.

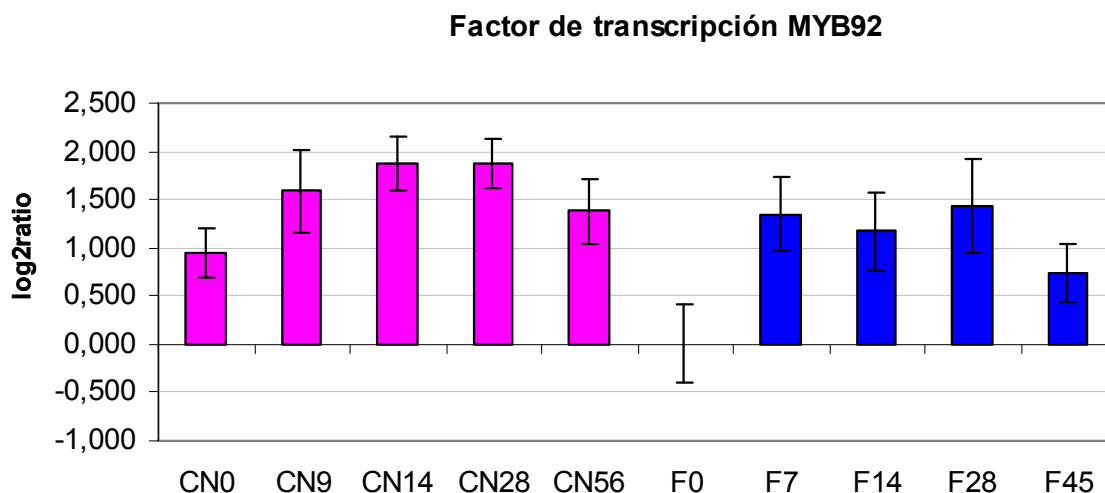


Figura 39. Valores de expresión del gen *Myb92*, normalizado respecto los niveles en F0. En el eje de las X se muestra el valor de la media de las cuatro réplicas $\log_2\text{ratio}=\log_2X/F0$, siendo X cada muestra de la serie temporal de CN y F. En el eje Y las muestras de CN (rosa) y F (azul) en los cinco tiempos analizados de almacenamiento a 2°C. La barra de error corresponde a la sd de las cuatro réplicas.

Los genes que codifican las proteínas ribosomales 60S L23 y 50S L18, *aCL2028Contig1* y *aCL3424Contig1*, respectivamente, se indujeron en CN y se reprimieron a tiempos medios en F (Tabla Supl. 9, SOM6). Por tanto, aunque esto sugiere que la traducción general se reprimió, también es de esperar que se tradujeran a proteínas los transcritos inducidos tras la respuesta al frío y aquellos asociados con la senescencia. En ese caso el flavedo de CN estaría mejor preparado inicialmente y mantuvo mayores nivel de transcritos para estas proteínas ribosomales que F.

DEGRADACIÓN DE PROTEÍNAS

Las poliubiquitinas etiquetan proteínas específicas para una degradación selectiva en el proteasoma 26S. Los genes *poliubiquitina*, *aCL4Contig18*, *aCL4Contig29*, *aCL4Contig31* y *aCL24Contig4*, se indujeron levemente tras la primera semana en ambas variedades, pero en F la inducción fue más fugaz, ya que se reprimieron a las dos semanas y, además, los niveles de F0 ya fueron algo menores a los de CN0 (Tabla Supl. 9, SOM6). La inducción de poliubiquitinas por frío se ha identificado también en otras especies como arroz (Nigam *et al.*, 2008), y caña de

azúcar donde al menos cinco genes poliubiquitinas responden al estrés por frío hasta las 48 h (Nogueira *et al.*, 2003). En el sistema de degradación por ubiquitinas también participan las culinas, y el gen *culina 1*, *aCL4Contig33*, también se indujo en ambas variedades, pero con una cinética más rápida en CN (Tabla Supl. 9, SOM6). En dos variedades de trigo invernal (tolerantes a las bajas temperaturas) se inducen varios genes *culina* durante la aclimatación al frío (Monroy *et al.*, 2007). También, un posible gen *ubiquitina carboxil-terminal proteinasa*, *aCL1661Contig3*, mostró una inducción temprana y continuada en CN, mientras que la inducción era más tardía y menos acusada en F (Tabla Supl. 9, SOM6). En definitiva, parece que en ambas variedades podría activarse la degradación selectiva de proteínas por ubiquitinación, pero que ésta podría ser más intensa y persistente en CN. En *Arabidopsis* se ha determinado que modificaciones postraduccionales mediadas por ubiquitinación regulan negativamente la respuesta al frío disminuyendo su tolerancia (Dong *et al.*, 2006), pero se sabe poco acerca de una posible implicación de la ubiquitinación en respuestas favorables frente al frío. En cambio, sí se ha demostrado que el sistema de ubiquitinación puede ser importante para evitar senescencia prematura (Raab *et al.*, 2009), y en este sentido, las mandarinas de CN expuestas al frío sí podrían estar dotadas de un mecanismo que las permitiría mantener la homeostasis en periodos largos de almacenamiento

La *pirrolidona carboxil peptidasa*, *aCL236Contig1*, se indujo en ambas variedades, pero en CN hay considerablemente mayores niveles de expresión previamente a la exposición al frío. Esta diferencia desapareció la segunda semana de almacenamiento a bajas temperaturas, aunque a tiempos más largos de exposición al frío, el repunte en CN volvió a ser mayor (Tabla Supl. 9, SOM6). Este resultado es contrario al observado en hojas de uno de los cítricos más resistentes al frío, *Poncirus trifoliata* (tolerante) durante la aclimatación de plantas al frío, donde un gen *pirrolidona carboxil peptidasa* se reprimía (Zhang *et al.*, 2005b). Es difícil interpretar las razones para estas diferencias, pero sin duda el tratarse de tejidos diferentes (fruto vs plántulas), y condiciones diferentes (frutos arrancados y en oscuridad vs plantas en crecimiento activo) puede contribuir a ello.

RESPUESTA HORMONAL

El gen *tRNA isopentenilpirofosfato transferasa (IPT)*, *aCL5095Contig1*, presentó un perfil de inducción progresiva durante las cuatro primeras semanas de almacenamiento en frío exclusivamente en CN (Tabla 24). Este gen está implicado en la síntesis de citoquininas (Miyawaki *et al.*, 2006). La sobreproducción de citoquininas en plantas transgénicas de *Arabidopsis* sobreexpresantes de *IPT* potencia la tolerancia

al frío (Guo *et al.*, 2009). Según esto, el flavedo de CN podría producir mayores niveles de citoquininas que el de F en su respuesta al frío, lo cual podría colaborar en su mejor aclimatación. Esta hipótesis se podría probar cuantificando las citoquininas del flavedo de CN y F en campo y durante la postcosecha a bajas temperaturas. Si realmente existiesen diferencias a nivel de metabolito, se podrían plantear experimentos de pretratamientos con citoquininas para testar si éstas favorecen la aclimatación al frío.

El gen *At1g03400/F21B7_31*, *aCL322Contig1*, posible ACO, se indujo inicialmente en ambas variedades, pero hasta los 28 d a 2°C en CN mientras que en F a los 28 d a 2°C hubo un pico reprimido (Tabla 24). Con un patrón de expresión similar, se halló el gen *esterase inducible por etileno*, *aCL5654Contig1* (Tabla 24), que se caracterizó en hojas de *Citrus sinensis* como inducible por ET (Zhong *et al.*, 2001) y fue destacado en el test de Wilcoxon de MapMan y comentado en el apartado 3.1.2 (Tabla 12). Los datos de expresión para ambos genes sugieren un incremento de ET en el fruto durante la postcosecha, debido al estrés por frío o simplemente por la senescencia que desarrollan. El análisis transcriptómico de frutos de mandarinas *Citrus unshiu* tratados con ET demostró que el ET reprime la transcripción de muchos genes relacionados con la fotosíntesis, biogénesis de cloroplasto y metabolismo de azúcares, mientras que induce la transcripción de numerosos genes de resistencia, defensa, estrés, síntesis de aminoácidos, degradación de proteínas y metabolismo secundario (Fujii *et al.*, 2007). No obstante, en frutos de *Citrus sinensis* sometidos a frío se incrementa la producción de ET (Wong *et al.*, 1999). La producción de ET se ha medido en diferentes variedades de frutos cítricos durante el almacenamiento a bajas temperaturas, aumentando la producción de ET en frutos sensibles al frío, como F, pero no en variedades tolerantes (Lafuente *et al.*, 2003). Por una parte, el aumento transitorio de ACO en F podría ser suficiente para el aumento de ET (Lafuente *et al.*, 2001). Por otra parte, podría ser que diferentes genes ACO tengan distintos patrones de expresión y éste no nos muestra la evidencia del aumento real de ET que ocurre en las células. Pero el aumento en CN no concuerda con los datos de otras variedades tolerantes como las naranjas Valencia late ni Navelina (Lafuente *et al.*, 2003). En el posterior apartado 6.2 se discute en mayor profundidad todos los resultados obtenidos para genes relacionados con ET.

El gen *S-adenosilmetionina descarboxilasa (SAMdc)*, *aCL3Contig3*, que codifica una enzima clave en la biosíntesis de PA, se indujo durante las dos primeras semanas a 2°C específicamente en CN y sólo muy tardíamente en F (Tabla 24). El frío incrementa la actividad SAMdc en espinaca, y el incremento derivado en los niveles de PAs es necesario para su correcta aclimatación al frío (He *et al.*, 2002). En hojas de varias especies de cítricos aclimatados al frío mediante bajas temperaturas también

umentan los niveles de PAs (Kushad y Yelenovsky, 1987). Según esto, y la inducción específica del *SAMdc* en CN, el flavedo de CN podría responder al frío incrementando los niveles de PAs, lo cual podría favorecer su adaptación a la situación de estrés.

El factor de transcripción activador de la respuesta a ABA, *VP1/ABI3*, *aCL4518Contig1*, implicado en la tolerancia al frío en *Arabidopsis* (Tamminen *et al.*, 2001) se indujo en respuesta al almacenamiento en frío en CN y F (Tabla 24), pero los niveles de CN fueron ligeramente mayores antes y durante la postcosecha a bajas temperaturas respecto a los de F, pudiendo justificar así parte de la mayor tolerancia de CN. No obstante, el ABA no parece jugar un papel clave en la tolerancia al frío en frutos cítricos (Lafuente *et al.*, 1997; Gosalbes *et al.*, 2004; Maul *et al.*, 2008).

TABLA 24. Valores de expresión de genes de respuesta hormonal con perfil de inducción en ambas variedades con mayor expresión en CN, normalizados respecto los niveles en F0

Anotación Unigen	log ₂ ratio *									
	CN0	CN9	CN14	CN28	CN56	F0	F7	F14	F28	F45
<i>IPT</i> <i>aCL5095Contig1</i>	0,245	0,526	0,690	1,295	-0,850	0	0,353	0,030	-0,236	0,815
posible ACO <i>aCL322Contig1</i>	0,211	0,799	0,748	0,923	0,046	0	0,643	0,604	0,053	0,306
esterase inducible por etileno <i>aCL5654Contig1</i>	1,062	1,311	1,063	1,108	-0,039	0	0,796	0,931	0,144	0,567
<i>SAMdc</i> <i>aCL3Contig3</i>	0,057	0,684	0,821	0,429	0,085	0	-0,180	0,061	0,159	0,724
<i>VP1/ABI3</i> <i>aCL4518Contig1</i>	0,370	1,218	1,188	1,597	0,554	0	0,953	0,789	0,780	0,851

(*) Media de las cuatro réplicas de log₂ratio=log₂X/F0, siendo X cada una de las muestras de la serie temporal de CN y F. Los valores de expresión negativos indican represión y positivos inducción respecto F0.

METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS

Acumulación de almidón y azúcares:

El gen citoplásmico *fosfoglucomutasa*, *aCL2323Contig1*, presentó niveles de expresión superiores en CN durante las cuatro primeras semanas del almacenamiento en frío e incluso anteriormente en las muestras CN0 (Fig. 40). Este gen codifica una enzima crítica para la movilización/almacenamiento de almidón. El gen *β-amilasa* (*BMV*), *aCL5Contig5*, también implicado en la movilización de almidón, mostró una respuesta diferencial al frío, ya que en CN se dio un pico de fuerte inducción (más de dos veces el nivel 0) en la primera semana de almacenamiento a bajas temperaturas.

Los niveles altos de expresión continuaron en CN hasta los 56 d a 2°C, estadio en el que su expresión no bajó a niveles similares a los iniciales; sin embargo, en F se reprimió levemente durante toda la postcosecha (Fig. 40). En plantas de *Arabidopsis* estresadas por frío también se inducen ciertas isoenzimas de BMY (Kaplan y Guy, 2004), lo cual resulta en la acumulación de maltosa, que ejerce diversos efectos protectores (Kaplan y Guy, 2005). Si esto fuese así, CN estaría más protegida que F.

En conjunto, los datos de expresión de los SOMs 5 y 6 (mayor nivel de expresión en CN respecto F), apuntan a que CN responde al frío con una mayor movilización de almidón y acumulación de azúcares como la sacarosa, lo que podría suponer una de las características que le permitan a CN una mejor adaptación al frío.

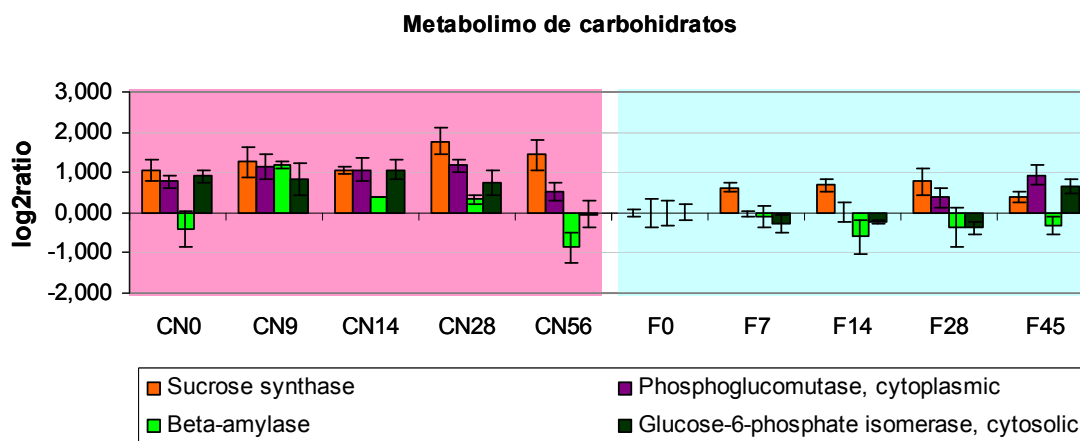


Figura 40. Valores de expresión de los genes del metabolismo de carbohidratos *sacarosa sintasa* (SOM5), *fosfoglucomutasa*, β -*amilasa* y *G6P isomerasa*, normalizado respecto los niveles en F0. En el eje de las X se muestra el valor de la media de las cuatro réplicas $\log_2\text{ratio}=\log_2X/F0$, siendo X cada muestra de la serie temporal de CN y F. En el eje Y las muestras de CN (rosa) y F (azul) en los cinco tiempos analizados de almacenamiento a 2°C. La barra de error corresponde a la sd de las cuatro réplicas.

Glucolisis:

El gen citosólico *glucosa-6-fosfato isomerasa*, *aCL3781Contig1*, además de tener niveles iniciales superiores en CN mostró una leve represión en F (Fig. 40). Con un patrón de expresión similar, aunque con menores diferencias a tiempo cero, pero mayor represión en F, se identificó el gen *piruvato quinasa*, *aCL7091Contig1* (Tabla Supl. 9, SOM6). Las diferencias de expresión en estos dos genes podrían resultar en una mayor tasa neta de glucolisis en CN, lo cual sería importante en las condiciones del almacenamiento. Concretamente podría proporcionar ATP como fuente de energía para construir las macromoléculas implicadas respuesta de defensa/tolerancia/adaptación así como de los metabolitos precursores para la biosíntesis de compuestos necesarios en la respuesta. En ese sentido, otros estreses

tales como el osmótico y escasez de O₂, incluso bajas temperaturas, en arroz (Minhas y Grover, 1999) en *Pinus taeda* por sequía (Watkinson *et al.*, 2003), también inducen la expresión de los genes de esta ruta. De forma similar en espinacas y en alubias la actividad enzimática aumenta a bajas temperaturas (Holaday *et al.*, 1992).

FOTOSÍNTESIS

Llama la atención la presencia de genes relacionados con la fotosíntesis entre aquellos que presentaron mayor expresión en CN, como fue el caso de la *proteína de unión a clorofila a/b CP24*, *aCL1214Contig1*; las subunidades pequeñas *1A* y *3B* de *ribulosa bifsosfato carboxilasa*, *aCL43Contig2* y *aCL43Contig3* respectivamente (Tabla Supl. 9, SOM6). Las diferencias a favor de CN se detectaron incluso antes del sometimiento a bajas temperaturas.

5.2.2 Expresión de genes potencialmente relacionados con el desarrollo de daños por frío en Fortune

Se partió de la hipótesis que los genes implicados en el desarrollo de DF podrían incluirse entre los que presentan perfiles de mayor inducción tardía en F, coincidiendo con la aparición de síntomas visibles (aquellos perfiles marcados como DF en la Fig. 28). Esos serían los agrupamientos 3 (501 clones, 359 unigenes, 144 uniAt), 4 (176 clones, 126 unigenes, 49 uniAt) y 8 (83 clones, 38 unigenes, 8 uniAt).

SOM 3 (perfil de inducción temprana y mayores niveles de expresión en F respecto CN):

En el SOM3 se incluyeron genes que respondían al frío tempranamente pero exclusivamente en F, aunque de forma leve. Al profundizar en la función molecular de los genes del SOM3 se encontró una gran proporción de genes que podrían relacionarse con una respuesta defensiva frente al estrés. Esta respuesta defensiva podría ser activada en F para tratar de compensar su peor situación inicial, de acuerdo a lo determinado en la valoración de los SOM 5 y 6 (niveles de expresión superiores en CN respecto F) que sugiere que el flavedo de CN tiene un estado celular más preparado para hacer frente al frío, independientemente de la respuesta posterior. Una hipótesis es que, esta respuesta temprana específica de F resultó en inducciones tan livianas que no fueron eficaces, como demuestra el desarrollo final de daños en la piel de F. Esta respuesta diferencial entre CN y F sugiere que las bajas temperaturas

suponen un estrés para el flavedo de F, al menos desde la primera semana de exposición al frío, mientras que en CN el frío no generaría una situación de estrés al flavedo.

Con este perfil se identificaron varios genes propios de la defensa frente a las bajas temperaturas (Tabla Supl. 9, SOM3), tales como varios genes de dehidrinas tipo *COR15* (*aCL6Contig6*, *aCL6Contig7* y *aCL6Contig16*) (Fig. 41); varias *HSP* (*aC07008D01SK_c*, *aC04010E05SK_c*, *aCL80Contig2* y *aCL897Contig2*) que podrían tratar de reconstituir el plegamiento de proteínas alterado por las bajas temperaturas; y genes que codificarían proteínas de unión a calcio como *aCL4516Contig1*. También se identificaron varios genes codificantes de proteínas relacionadas con el metabolismo de lípidos, posiblemente implicadas en la protección a la posible deshidratación tras la desestabilización de la membrana ante las bajas temperaturas como es *esfingosina-1-fosfato liasa* (*aCL4647Contig1*). Este tipo de enzimas se han mostrado importantes para evitar la deshidratación celular en *Arabidopsis* (Nishikawa *et al.*, 2008). También se halló una *δ -12-FAD* (*aCL578Contig1*) que se reprimió en CN, pero no en F (Tabla Supl. 9, SOM3) y codifica una enzima de girasol implicada en fluidificar la membrana y que confiere tolerancia al estrés por frío y salinidad en levaduras (Rodríguez-Vargas *et al.*, 2007). Quizás, la membrana plasmática de CN ya tuviera una composición lipídica idónea para la tolerancia al frío, previamente a la exposición al mismo, y por ello no necesitó responder activando estos genes. Existen evidencias que en el flavedo de frutos F no se reorganizan las membranas lipídicas en condiciones de almacenamiento a bajas temperaturas (Mulas *et al.*, 1996, 1997). Además, hay datos que indican que la expresión de diferentes genes *FAD* puede ser distinta en respuesta al frío (Tang *et al.*, 2007).

El gen *COR15* codifica una dehidrina con una importante función de protección en plantas al estrés por bajas temperaturas y deshidratación. La inducción de *CrCOR15* se produce en el flavedo de frutos de variedades sensibles, como F (Sanchez-Ballesta *et al.*, 2004) y pomelo (Porat *et al.*, 2002), cuando son sometidas a acondicionamiento previo al almacenamiento a bajas temperaturas. Sin embargo, en el flavedo de frutos F este aumento se produce durante la postcosecha porque el curado reduce la expresión de este gen. Además, en los frutos F sin acondicionar y almacenados a 2°C el nivel de *CrCOR15* se mantiene tan elevado como antes del estrés (Sanchez-Ballesta *et al.*, 2004). Los niveles de expresión de *COR15* en la variedad tolerante CN fueron siempre inferiores a los de la variedad sensible, lo que quizás nos esté indicando que las dehidrinas son parte del síndrome de DF y que posiblemente el flavedo de la variedad sensible está experimentando una mayor

perdida de agua que induce a las células del flavedo de F a sintetizar más dehidrinas para protegerse (Vercher *et al.*, 1994; Sala, 2000; Sanchez-Ballesta *et al.*, 2004).

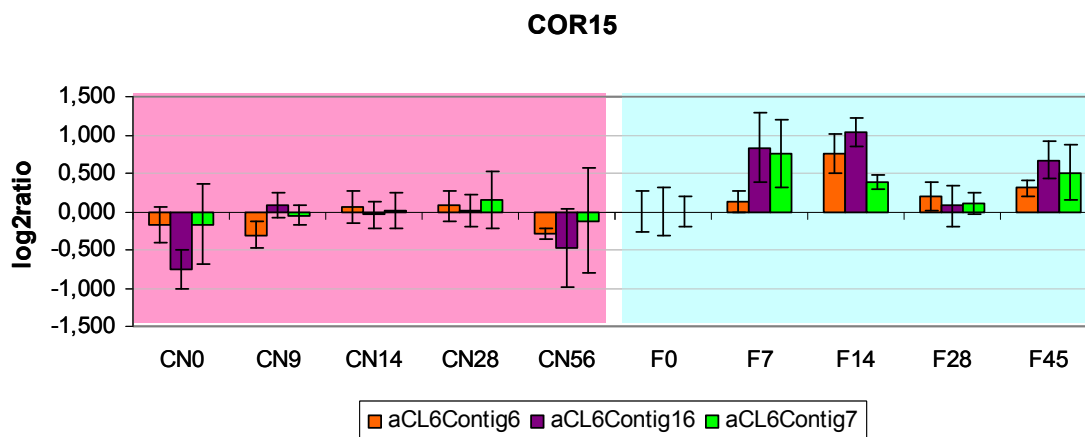


Figura 41. Valores de expresión de los unigenes *COR15*, normalizados respecto los niveles en F0. En el eje de las X se muestra el valor de la media de las sondas que forman cada unigen $\log_2\text{ratio}=\log_2X/F0$, siendo X cada muestra de la serie temporal de CN y F. En el eje Y las muestras de CN (rosa) y F (azul) en los cinco tiempos analizados de almacenamiento a 2°C. La barra de error corresponde a la sd de las sondas de cada unigen.

Como posible parte del mecanismo de inducción de tolerancia a las bajas temperaturas, localizamos la leve activación temprana en F de genes posiblemente encaminados a la acumulación de osmolitos compatibles para combatir la desecación. En concreto de genes de biosíntesis de prolina, con el gen *δ-1-pirrolina-5-carboxilato sintetasa* (*aCL174Contig2*), y de azúcares, con varias invertasas (*aCL2322Contig1*, *aCL7Contig2*), y un transportador de azúcares (*ST14*; *aCL7536Contig1*) (Tabla Supl. 9, SOM3).

En este agrupamiento también se hallaron genes clásicos que confieren tolerancia al estrés oxidativo. Entre ellos se encuentra la *SOD* (*aCL1180Contig1*), varios *GST* (*aCL110Contig2*, *aCL184Contig3*, *aCL110Contig1*, *aCL4064Contig1* y *aCL87Contig1*) (Fig. 62), una *tioredoxina* (*aCL18Contig1*), una *APX* (*aC02003D06SK_c*), otras *peroxidasa* (*aCL98Contig3*, *aCL98Contig2*) (Fig. 63), una *tocoferol ciclasa* (*aCL5732Contig1*) y también una *CAT* (*aCL63Contig4*) reprimida tempranamente sólo en CN que podrían estar asociados con el desarrollo de la necrosis (apartado 7.2 “Genes de respuesta al estrés oxidativo”).

También se incluyeron en este perfil, de inducción temprana y mayores niveles de expresión en F respecto CN, genes propios de defensa general frente al estrés como los de varias *metalotionina* (*aCL3Contig10*, *aCL3Contig27*, *aCL3Contig33* y

aCL3Contig34) (Fig. 42), varias *miraculina* (*aCL190Contig1*, *aCL1Contig10*, *aCL1Contig11*, *aCL1Contig33* y *aCL1Contig12*) (Fig. 42), una *chaperona de cobre* (*aCL205Contig3*), una *fosfatasa ácida púrpura* (*aCL2471Contig1*), un *inhibidor Bax1* (*aCL386Contig1*) y un posible miembro de la familia *PR4* (*aCL1Contig14*) (Tabla Supl. 9, SOM3).

Los genes *miraculina* ya se habían identificado y discutido en los SOMs 5 y 6 (niveles de expresión superiores en CN respecto F) de tolerancia al frío, pero también se identificaron en este grupo de genes de DF y con la misma tendencia a la inducción en ambas variedades. Estos genes coinciden con los descritos por Gimeno *et al.* (2009) en cítricos (*Miraculin-like protein 3: aCL1Contig12; Miraculin-like protein 5: aCL1Contig33, aCL1Contig11; y Miraculin-like protein 6: aCL1Contig10*) y con los anteriormente citados en los SOMs 5 y 6. Una explicación a este fenómeno es que estamos ante una familia génica que podría ser difícil de diferenciar por las ESTs secuenciadas, así que, (1) podrían formar parte del mismo contig genes diferentes si sólo estamos comparando la parte más conservada, (2) puede haber hibridación cruzada en la micromatriz de genes de la misma familia y nosotros sólo los identificamos por nuestra conocida sonda impresa y por eso se aprecian diferentes patrones de expresión entre duplicados del mismo gen.

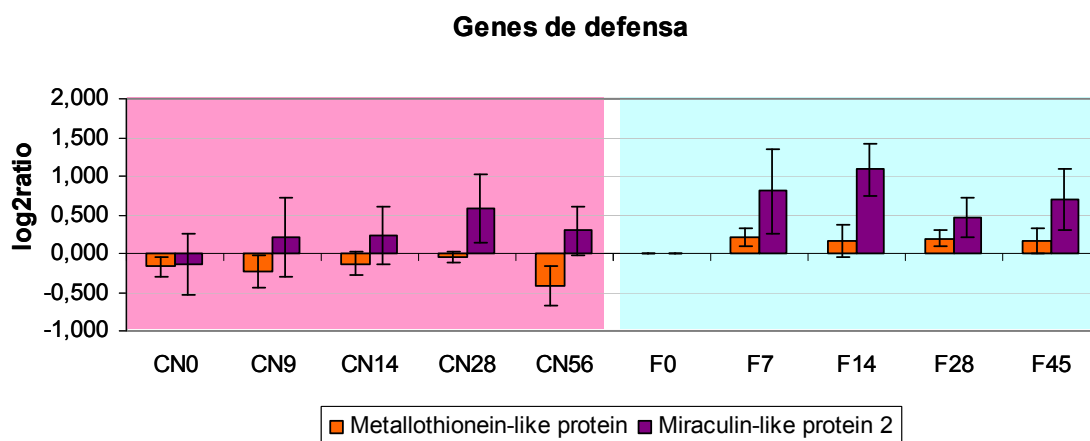


Figura 42. Media de los valores de expresión de los genes de defensa *metalotionenina* y *miraculina*, normalizados respecto los niveles en F0. En el eje de las X se muestra el valor de la media de las sondas que forman cada unigen $\log_2\text{ratio}=\log_2X/F_0$, siendo X cada muestra de la serie temporal de CN y F. En el eje Y las muestras de CN (rosa) y F (azul) en los cinco tiempos analizados de almacenamiento a 2°C. La barra de error corresponde a la sd de los unigenes con la misma anotación.

Con el perfil descrito, también encontramos en el SOM 3 (perfil de inducción temprana y mayores niveles de expresión en F respecto CN) genes candidatos a

participar en la señalización de la leve respuesta defensiva temprana que es específica de F. Este sería el caso de dos genes presumiblemente implicados con la biosíntesis de ABA con pequeños picos de mayor expresión temprana en F, una *alcohol deshidrogenasa de cadena corta* (*aCL6108Contig1*) y una *β -caroteno hidroxilasa* (*aCL35Contig1*) (Fig. 56 en el apartado 6.1). Paradójicamente, con un perfil similar, también mostró una cierta inducción temprana en F el *RING-H2 finger*, *aCL198Contig1*. Este gen es homólogo al gen *XERICO* de *Arabidopsis*, que se ha comentado en los apartados 5.1 (Tabla Supl. 7) y 5.2.1 (Fig. 37).

Asimismo, encontramos señalizadores a nivel de fosforilación, como *aCL7618Contig1*, un homólogo a *AtPK19* inducible por frío en *Arabidopsis* (Mizoguchi *et al.*, 1995). El homólogo de cítricos, *aCL7618Contig1*, se indujo en F desde la primera semana de almacenamiento en frío, mientras que en CN se dio una inducción más liviana y tardía, a partir de la cuarta semana de almacenamiento a bajas temperaturas (Fig. 61, en el posterior apartado 7.2). Pese a que en *Arabidopsis* este gen se induce ante diversos estreses y actúa como activador traduccional (Mizoguchi *et al.*, 1996), hasta ahora su actividad no se ha relacionado directamente con procesos de tolerancia o daño ante el estrés. También una *serina/treonina quinasa asociada a tilacoide* *SNT7*, *aCL3987Contig1*, se reprimió en CN durante las dos primeras semanas en frío, mientras que en F se indujo levemente las dos primeras semanas a bajas temperaturas y sólo se reprimió después (Fig. 61, en el apartado 7.2). A 14 d en frío se dio la mayor diferencia de expresión a favor de F, llegando a ser 2,4 veces mayor. Este tipo de quinastas se ha visto importante en la fosforilación de la proteína colectora de luz (LHCII) y la adaptación de los fotosistemas a cambios lumínicos (Bellafiore *et al.*, 2005), pero desconocemos cual puede ser su función en el flavedo de frutos almacenados en frío cuyas células no acumulan proteínas del LHC (Azoulay *et al.*, 2008).

Además, se identificaron varios factores de transcripción que presentaron un pequeño pico de inducción temprana exclusivamente en F y podrían estar dirigiendo en parte esta respuesta temprana al frío en F (Fig. 43). Se destacan los casos de uno de la familia *WRKY* (*aC04005E02SK_c*), uno tipo *MYB* (*aCL8980Contig1*), y un *bHLH* (*aC08014B07SK_c*), entre otros factores de transcripción como *aCL2849Contig1*, putativo factor de transcripción, y *aC18006A08Rv_c*, tipo *dedos de zinc* (Tabla Supl. 9, SOM3).

SOM3: Factores de transcripción

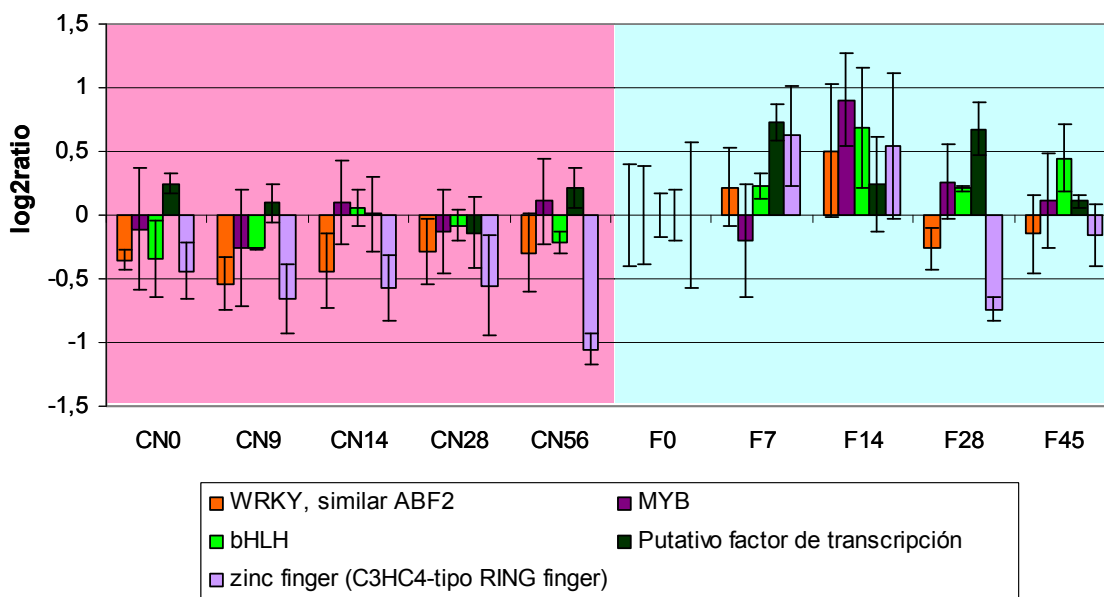


Figura 43. Valores de expresión de factores de transcripción, normalizados respecto los niveles en F0. En el eje de las X se muestra el valor de la media de las cuatro réplicas $\log_2\text{ratio}=\log_2X/F_0$, siendo X cada muestra de la serie temporal de CN y F. En el eje Y las muestras de CN (rosa) y F (azul) en los cinco tiempos analizados de almacenamiento a 2°C. La barra de error corresponde a la sd de las cuatro réplicas.

Con una posible relación con la sensibilidad al frío de F podría estar el producto del gen *Two-component response regulator-like APRR5 (Arabidopsis pseudo-response regulator 5)*, *aCL4006Contig2*, un componente de la maquinaria del ciclo circadiano. Este gen se indujo durante las dos primeras semanas de almacenamiento a bajas temperaturas en F, mientras que su expresión no cambió en CN (Fig. 44). Mutantes de *Arabidopsis* nulos para *PPR5* y otros *PPR* tienen aumentada la expresión de genes de respuesta a frío y son más tolerantes al frío igual que CN (Nakamichi *et al.*, 2009). Los genes *APRR* estarían relacionados con un mecanismo de oscilación circadiana de genes de respuesta a estrés, incluyendo *DREB1/CBF* (Nakamichi *et al.*, 2009). Según esto, la mayor inducción de *PPR5* por frío en F podría ser una de las causas de su deficiente respuesta de adaptación al estrés.

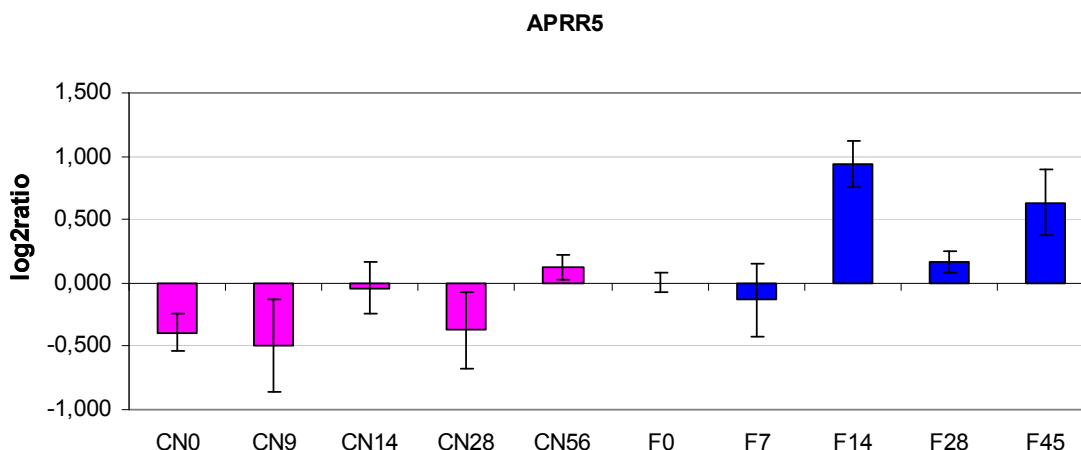


Figura 44. Valores de expresión del gen *APRR5*, normalizado respecto los niveles en F0. En el eje de las X se muestra el valor de la media de las cuatro réplicas $\log_2\text{ratio}=\log_2X/F_0$, siendo X cada muestra de la serie temporal de CN y F. En el eje Y las muestras de CN (rosa) y F (azul) en los cinco tiempos analizados de almacenamiento a 2°C. La barra de error corresponde a la sd de las cuatro réplicas.

Por otra parte, llama la atención la abundancia de genes relacionados con fotosíntesis dentro del grupo de genes del SOM3 (perfil de inducción temprana y mayores niveles de expresión en F respecto CN) (Tabla Supl. 9) y para lo cual no tenemos una explicación lógica. Se conoce que para la desverdización del flavedo durante la maduración del fruto hace falta la exposición del fruto a temperaturas bajas (razón por la que los cítricos en regiones tropicales conservan la piel verde aún cuando están maduros) y que en cítricos se puede dar el fenómeno de reverdización en circunstancias y variedades muy específicas (Hsu *et al.*, 1989), este fenómeno también se pudo observar levemente en nuestros frutos. Puede que este sea parte de un mecanismo general de adaptación que sería funcional en tejidos verdes para disipar estrés oxidativo derivado de la exposición lumínica a bajas temperaturas (Takahashi y Murata, 2008) y que se despierta en los frutos almacenados a bajas temperaturas incluso en la oscuridad.

SOM 4 (perfil de inducción tardía y mayores niveles de expresión en F respecto CN):

El SOM 4 agrupó genes que se inducen a partir de las 2-4 semanas específicamente en F (Fig. 28), coincidiendo con la aparición de daños. También destaca la abundancia de genes de respuesta a estrés, principalmente al oxidativo, entre los genes con este perfil. Además, se identificó una inducción en varios

transportadores de membrana en F y en una porción de metabolismo secundario, sobre todo, del relacionado con compuestos fenólicos (Tabla Supl. 9, SOM4).

Entre los genes inducidos con mayores niveles de expresión a tiempos tardíos específicamente en F, destacan los relacionados con el estrés oxidativo y la respuesta a patógenos. Respecto al estrés oxidativo, se cuentan hasta seis *GST* (*aCL110Contig1* [Fig. 62], *aCL3761Contig1*, *aCL1507Contig2*, *aCL1881Contig2*, *aCL7288Contig1* y *aCL1507Contig1*), dos tiorredoxina (*aC08008G07SK_c* y *aCL18Contig3*) y una glutarredoxina (*aCL5576Contig1*) (Tabla Supl. 9, SOM4). Estos genes podrían inducirse en F para tratar de paliar el estrés oxidativo que incrementaría en F al intensificarse el deterioro celular generado por las bajas temperaturas. Por otra parte, una *glicolato oxidasa*, *aCL494Contig2*, podría ser la responsable de una mayor acumulación de H_2O_2 (Fahnenstich *et al.*, 2008a y b) a tiempos largos en F (Fig. 45). Sin embargo, la inducción de la *glicolato oxidasa* produciría un acúmulo de oxalatos que intervienen en regulación por calcio, balance iónico, protección y destoxificación de metales pesados (Xu *et al.*, 2006). En cuanto a estrés abiótico, también se hallaron posibles genes de respuesta a desecación, como un gen putativo de estrés universal homólogo de *RD2* (*aCL5203Contig1*), lo cual podría ser reflejo de defectos en la membrana de las células de F (Fig. 45).

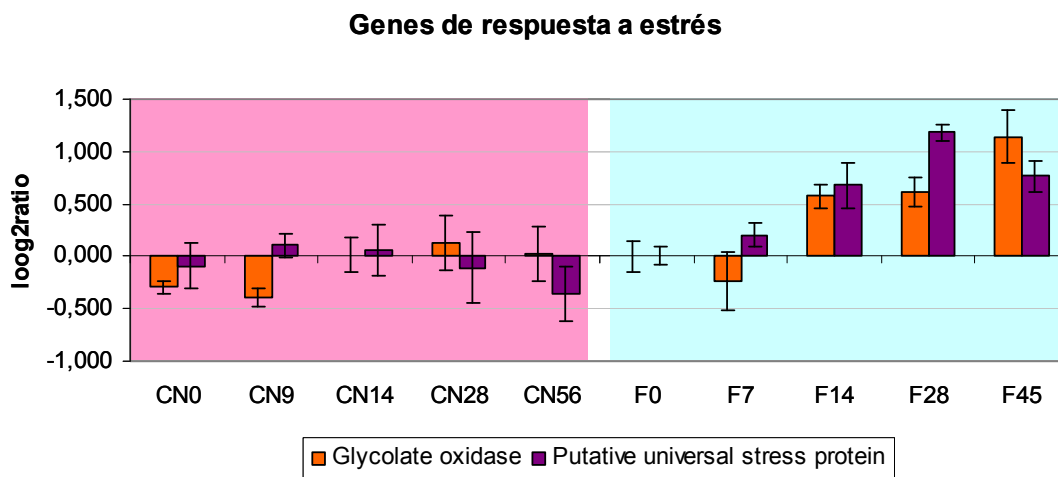


Figura 45. Valores de expresión de genes de respuesta a estrés en el SOM4, normalizado respecto los niveles en F0. En el eje de las X se muestra el valor de la media de las cuatro réplicas $\log_2\text{ratio}=\log_2X/F_0$, siendo X cada muestra de la serie temporal de CN y F. En el eje Y las muestras de CN (rosa) y F (azul) en los cinco tiempos analizados de almacenamiento a 2°C. La barra de error corresponde a la sd de las cuatro réplicas.

La inducción de numerosos transportadores de membrana en F podría producirse en consonancia con los presumibles defectos en la membrana de F, para

tratar de mantener la homeostasis celular. Estos transportadores incluyeron un posible *MATE-efflux* (*aC08004B02SK_c*) y tres posibles transportadores tipo ABC (*aCL912Contig1*, *PDR-type ABC transporter 1*; *aCL387Contig3*, *PDR11*; *aCL5595Contig1*, *P-glycoprotein -like protein*) (Fig. 46). Los genes *PDR*, como posiblemente sea el caso de *aCL387Contig3*, tienen una función principal detoxificadora, esta propiedad les da un carácter de genes de resistencia y responden a diversos estreses bióticos y abióticos (Crouzet *et al.*, 2006). Además, *aCL387Contig3* se indujo más de tres veces en hojas de CN bajo condiciones de sequía (Gimeno *et al.*, 2009). También se identificaron un intercambiador $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ (*aCL900Contig1*), una H^+ -ATPasa vacuolar (*aC18012A05Rv_c*) o un transportador de dicarboxilatos de la familia *DIC* (*aCL536Contig2*) (Tabla Supl. 9, SOM4), esto últimos, posiblemente implicados en la estabilización del pH y el equilibrio redox, ya que la familia de genes *DIC* son la principal conexión redox entre mitocondria y citosol (Palmieri *et al.*, 2008). Algunos genes de transportadores del SOM 4 (perfil de inducción tardía y mayores niveles de expresión en F respecto CN) también podrían estar relacionados con la necesidad de ATP en F, como sería el caso de un *translocador de nucleótidos de adenina* (*aCL657Contig1*), una *ferredoxina* de transporte de electrones (*aC04010C04SK_c*) y una *proteína de membrana del complejo de biogénesis de citocromo c* (*aCL3893Contig1*) (Tabla Supl. 9, SOM4).

TRANSPORTADORES

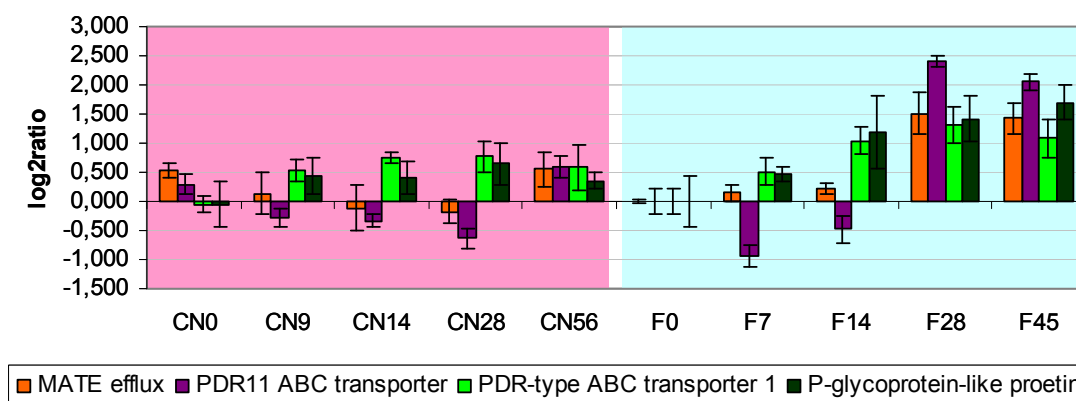


Figura 46. Valores de expresión de los genes que codifican transportadores de membrana, normalizados respecto los niveles en F0. En el eje de las X se muestra el valor de la media de las cuatro réplicas $\log_2\text{ratio}=\log_2X/F_0$, siendo X cada muestra de la serie temporal de CN y F. En el eje Y las muestras de CN (rosa) y F (azul) en los cinco tiempos analizados de almacenamiento a 2°C. La barra de error corresponde a la sd de las cuatro réplicas.

La respuesta al estrés detectada específicamente en F debe suponer un gasto energético adicional. En ese sentido, también hubo inducción tardía en F de genes de varias enzimas glucolíticas, tales como una *fructosa-bisfosfato aldolasa* (*aCL34Contig3*), una *gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa* (*aCL715Contig1*) y una *piruvato quinasa* (*aCL670Contig1*) (Fig. 47).

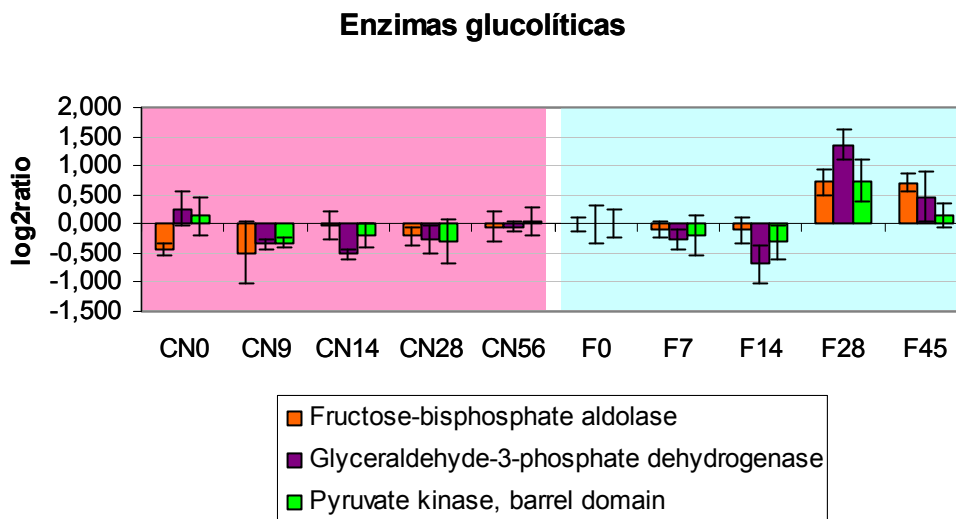


Figura 47. Valores de expresión de genes que codifican enzimas glucolíticas, normalizados respecto los niveles en F0. En el eje de las X se muestra el valor de la media de las cuatro réplicas $\log_2\text{ratio}=\log_2X/F_0$, siendo X cada muestra de la serie temporal de CN y F. En el eje Y las muestras de CN (rosa) y F (azul) en los cinco tiempos analizados de almacenamiento a 2°C. La barra de error corresponde a la sd de las cuatro réplicas.

Un grupo de genes de defensa frente a patógenos mostró una inducción tardía específicamente en F, incluyendo un precursor de *PR-4A* (*aCL1Contig14*) (Fig. 48), dos *quitinasa* (*aCL856Contig1* y *aCL371Contig1*) (Fig. 48), un *inhibidor de proteasas* (*aCL16Contig2*) (Tabla 8, Tabla Supl.9 SOM4) y una *miraculina* (*aCL1Contig10*) (Fig. 34, Fig. 42, Tabla Supl. 9). Las quitinasas también podrían responder al estrés oxidativo ocurrido durante el DF (Ernst *et al.*, 1992).

Genes de defensa

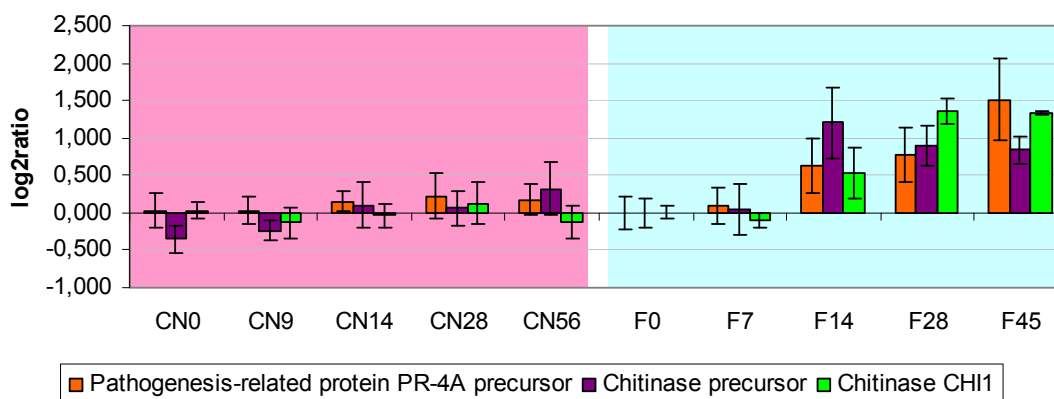


Figura 48. Valores de expresión genes de defensa, normalizados respecto los niveles en F0. En el eje de las X se muestra el valor de la media de las cuatro réplicas $\log_2\text{ratio}=\log_2X/F_0$, siendo X cada muestra de la serie temporal de CN y F. En el eje Y las muestras de CN (rosa) y F (azul) en los cinco tiempos analizados de almacenamiento a 2°C. La barra de error corresponde a la sd de las cuatro réplicas.

Respecto al metabolismo secundario, en el SOM 4 (Fig. 28) se identificaron un gen *PAL* (*aC02002A11SK_c*), de la parte basal de la ruta de biosíntesis de fenilpropanoides y dos posibles *COMT*, *aCL139Contig* y *aCL18Contig10*, que mostraron patrones de inducción en F a partir de las cuatro semanas en frío y patrones sin cambios en la serie de CN (Fig. 49). En relación con la biosíntesis de flavonoides (corriente abajo en la misma ruta) también se halló una posible *leucoantocianidina dioxigenasa*, *aCL869Contig1*, que inducida en F en mayor medida que en CN (Fig. 49). La inducción de una *tirosina/dopa descarboxilasa* (*aCL4076Contig1*) (Fig. 53) y una *aC02002A11SK_c 3-desoxi-D-arabino-heptulosonato 7-fosfato sintasa* (*aCL214Contig1*) podrían estar relacionadas con un mayor incremento en la biosíntesis de siquimato (Guillet *et al.*, 2000) en F (Fig. 49). El gen *3-deoxi-D-arabino-heptulosonato 7-fosfato (DAHP) sintasa 3*, *aCL214Contig1*, codifica la primera enzima de la ruta del siquimato y de esta ruta deriva la síntesis de aminoácidos aromáticos, y fenilpropanoides. Este gen se regula por factores del desarrollo y se induce por patógenos (Adomas *et al.*, 2007). También se halló inducción específica en F de una *limoneno sintasa* (*aC02013A08SK_c*), en relación con la biosíntesis de monoterpenos esenciales. Las glándulas del flavedo de los frutos cítricos son ricas en terpenos como el limoneno, el terpeno más abundante en *Citrus lemon*. Los terpenos parecen tener un papel en la defensa de los frutos de los ataques patógenos, herbívoros y de varios estreses (Lewinsohn *et al.*, 1993; Steele *et al.*, 1998; Dornelas y Mazzafera, 2007).

Una hipótesis plausible es que los niveles más altos en los frutos CN0 y en los frutos de CN expuestos al frío durante tiempos cortos pudieran contribuir a mantener el

estado de tolerancia. En cambio la expresión de PAL se requeriría para el suministro de precursores fenilpropanoides necesarios, en el caso de F14-28, que pueden participar en mecanismo de defensa contra estreses abióticos o bióticos, o modificación de la pared asociada a la necrosis. Esta hipótesis es consistente con los resultados de Sanchez-Ballesta *et al.* (2000a, b), el transcrito y la actividad PAL aumentan en el almacenamiento en frío de F a medida que aparece el DF, se puede considerar un marcador de DF. Al igual que CN, en la variedad de mandarinas Hernandina (tolerante al frío) disminuyó el nivel de PAL a lo largo del tiempo en el almacenamiento a 2°C (Lafuente *et al.*, 2001). Aunque la actividad PAL puede ser inducida por ET en frutos F a temperatura de no DF, la inhibición de ET inhibe el aumento de PAL y aumenta el DF, por tanto, la PAL protege de DF (Lafuente *et al.*, 2001, 2004).

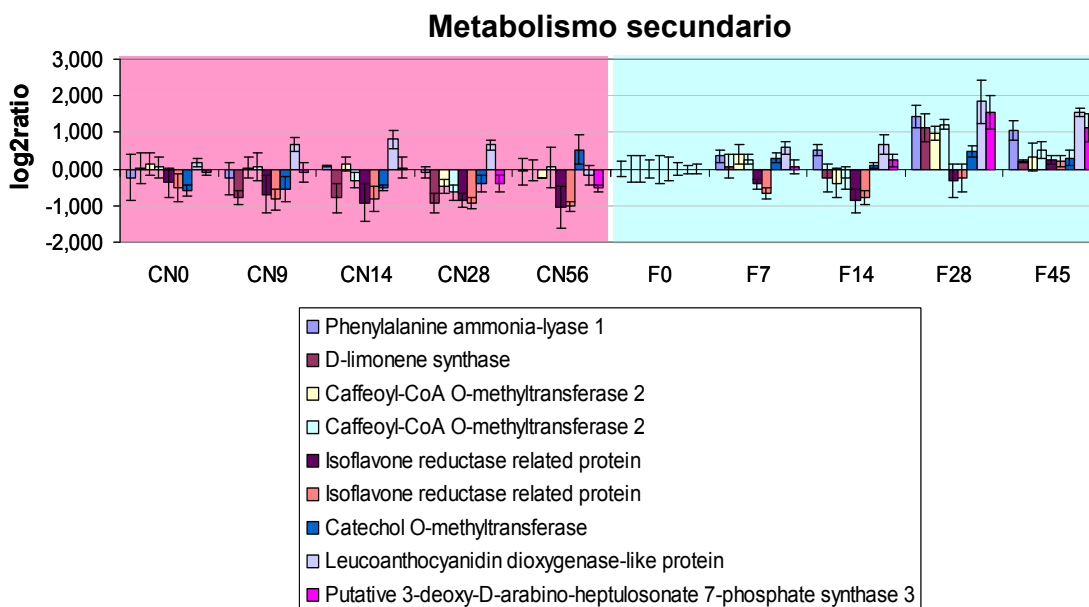


Figura 49. Valores de expresión de los genes del metabolismo secundario del SOM4, normalizados respecto los niveles en F0. En el eje de las X se muestra el valor de la media de las cuatro réplicas $\log_2\text{ratio}=\log_2X/F_0$, siendo X cada muestra de la serie temporal de CN y F. En el eje Y las muestras de CN (rosa) y F (azul) en los cinco tiempos analizados de almacenamiento a 2°C. La barra de error corresponde a la sd de las cuatro réplicas.

Como posibles reguladores de esta respuesta tardía específica de F, en el SOM 4 se incluyeron varios factores de transcripción, entre ellos dos de tipo WRKY (*aCL1506Contig1* y *aCL1201Contig1*) y un *bZIP* homólogo a *AREB1* (*aCL3553Contig1*) (Tabla 25), que en *Arabidopsis* es un activador parte de los genes de respuesta a ABA en relación con la tolerancia a estrés hídrico (Lee *et al.*, 2009).

Por lo que corresponde a los genes del mecanismo de respuesta a ABA, identificamos que el unigen *aCL3553Contig1* codifica posiblemente un factor de transcripción de respuesta a ABA tipo AREBs/ABFs. Los factores de transcripción AREBs/ABFs tipo bZIP se unen al elemento de respuesta a ABA *cis*, ABRE, activando la expresión de los genes aguas abajo aumentando la tolerancia a sequía y otros estreses en tejidos vegetativos (Kim *et al.*, 2004; Furihata *et al.* 2006). Este gen se indujo en respuesta al frío en los frutos de F28 y F45, mientras que en la serie de CN tuvo un patrón casi plano. Esta diferencia entre variedades podría ser respuesta a una mayor deshidratación en F porque los frutos F tienen mayor permeabilidad en la piel que CN (Vercher *et al.*, 1994) y esa deshidratación activaría la respuesta del ABA.

TABLA 25. Valores de expresión de factores de transcripción con perfil de inducción tardía y mayores niveles de expresión en F, normalizados respecto los niveles en F0

Anotación Unigen	log ₂ ratio*									
	CN0	CN9	CN14	CN28	CN56	F0	F7	F14	F28	F45
<i>SPF1</i> <i>aCL1506Contig1</i>	-0,037	0,888	0,607	-0,191	0,110	0	0,373	0,130	1,309	1,307
<i>WRKY31</i> <i>aCL1201Contig1</i>	-0,607	0,785	0,326	-0,177	-0,120	0	0,350	0,475	1,477	1,167
<i>bZIP/AREB1</i> <i>aCL3553Contig1</i>	-0,660	0,112	-0,041	0,204	-0,405	0	0,020	-0,020	0,641	0,716

(*) Media de las cuatro réplicas de log₂ratio=log₂X/F0, siendo X cada una de las muestras de la serie temporal de CN y F. Los valores de expresión negativos indican represión y positivos inducción respecto F0.

En el SOM 4 (perfil de inducción tardía y mayores niveles de expresión en F) también se hallaron tres genes *SAM sintetasa* (*aCL33Contig2*, *aCL55Contig2*, *aCL414Contig1*), con inducción a las 4 semanas en F y represión en toda la serie de CN (Fig. 50). El posible incremento en los niveles de S-adenosil metionina (SAM) en F podría relacionarse con un aumento en la producción de ET, o estar relacionada con otros procesos que requieran de donadores de grupos metilo. El ET es capaz de inducir aclimatación al frío en mandarinas F, e incrementa la actividad de la PAL (Lafuente *et al.*, 2004) de modo que éstas podrían ser algunas de las respuestas al frío propias de F, aunque demasiado tardías como para evitar DF.

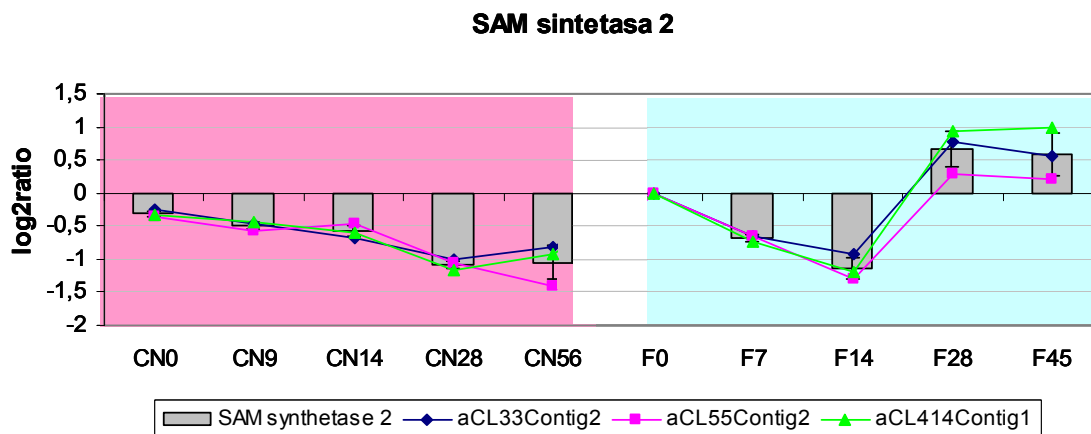


Figura 50. Las líneas muestran los valores de expresión de los unigenes *SAM sintetasa 2*, y las barras son la media de los tres unigenes, normalizados respecto los niveles en F0. En el eje de las X se muestra el valor de la media de las cuatro réplicas $\log_2\text{ratio}=\log_2X/F_0$, siendo X cada muestra de la serie temporal de CN y F. En el eje Y las muestras de CN (rosa) y F (azul) en los cinco tiempos analizados de almacenamiento a 2°C. La barra de error corresponde a la sd de los tres unigenes.

La síntesis de PA también podría inducirse específicamente en F atendiendo a la expresión del gen *arginina descarboxilasa*, *aCL1233Contig1* (Fig. 51). La inducción de expresión de los genes que codifican la arginina descarboxilasa (inducción tardía en F) y la SAMdc (inducción temprana en CN) indican (1) que en el flavedo de mandarinas almacenadas a 2°C las PA se estarían sintetizando a partir de la arginina, aunque la falta de datos para los otros enzimas de la ruta (espermina/espermidina sintasa y ornitina descarboxilasa) no permiten asegurar que no participe también la ruta ornitina descarboxilasa aunque sea poco probable y (2) que los niveles mayores de arginina descarboxilasa en F parecen estar asociados al desarrollo del DF.

En cítricos, McDonald y Kushad (1986) midieron la concentración de putrescina, espermidina y espermina en flavedo y sacos de jugo de limón y pomelo, observando aumento en la concentración de putrescina con el frío (más del 40% con el tratamiento de frío que en el control) pero no en espermidina y espermina. La correlación entre concentración de putrescina y DF es de casi 1, sin embargo no se determinó si la putrescina aumentaba con el frío o con el DF.

La síntesis de PA aumenta con la temperatura y tiempo de exposición del acondicionamiento en el flavedo de mandarinas F sometidas a distintas condiciones de temperaturas de acondicionamiento, y posterior almacenamiento a 2°C (Gonzalez-Aguilar *et al.*, 1997, 1998 y 2000). En cambio, en frutos aún unidos al árbol, las PA aumentan después de la exposición a temperaturas mínimas en campo (Gonzalez-

Aguilar *et al.*, 1997, 1998 y 2000). En definitiva, los datos publicados indican cambios en los niveles de PA tanto durante la maduración y el desarrollo del fruto F, como en las distintas temperaturas a las que se expone al fruto. Sin embargo, las PA no parecen estar directamente relacionadas con la tolerancia de los frutos de F al frío.

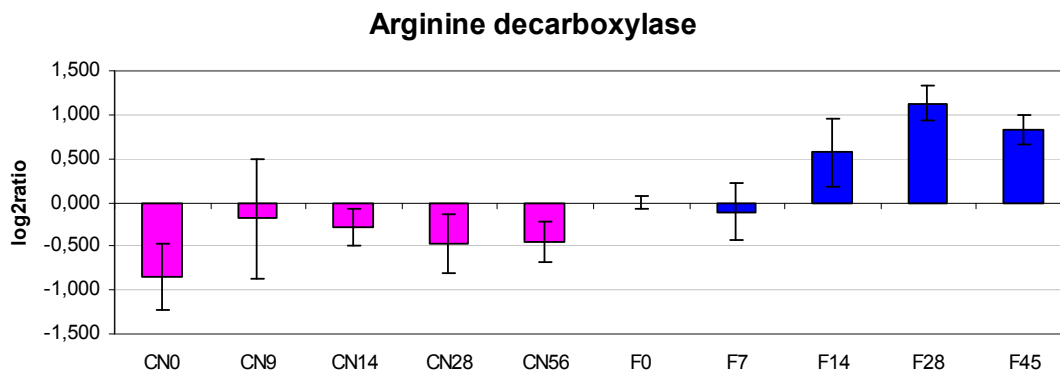


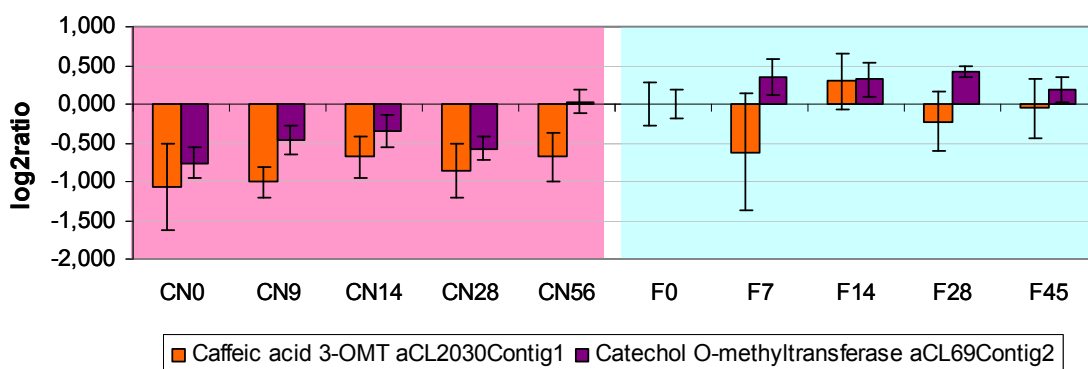
Figura 51. Valores de expresión del gen *arginina descarboxilasa*, normalizados respecto los niveles en F0. En el eje de las X se muestra el valor de la media de las cuatro réplicas $\log_2\text{ratio}=\log_2X/F0$, siendo X cada muestra de la serie temporal de CN y F. En el eje Y las muestras de CN (rosa) y F (azul) en los cinco tiempos analizados de almacenamiento a 2°C. La barra de error corresponde a la sd de las cuatro réplicas.

SOM 8 (perfil de inducción en ambas variedades con niveles de expresión superiores en F respecto CN):

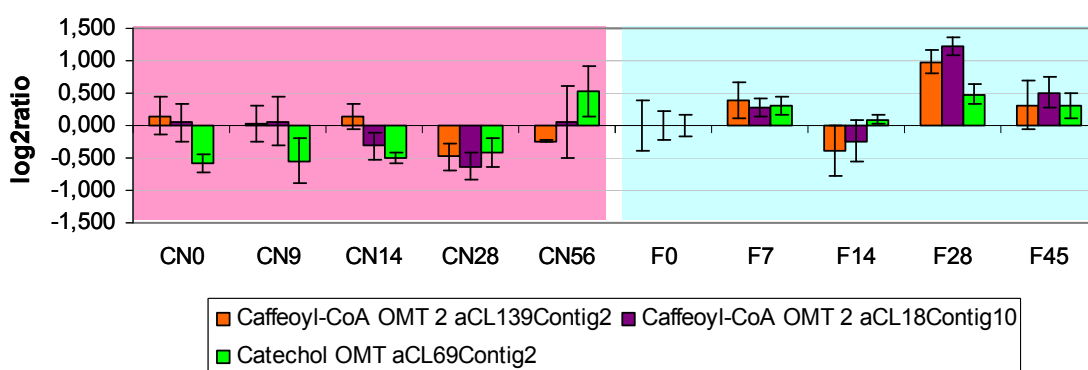
El SOM 8 está conformado por un reducido número de genes (38 unigenes) que se indujeron a tiempos largos de almacenamiento en frío, pero en mayor medida en F (Fig. 28). Gran parte de estos genes pueden relacionarse con la biosíntesis de fenilpropanoides y con defensa (Tabla Supl. 9, SOM8).

Entre los genes posiblemente implicados en biosíntesis de fenilpropanoides, en el SOM 8 se identificaron dos unigenes de *COMT* (*aCL38Contig1* y *aCL38Contig3*), una *catecol O-metiltransferasa* (*aCL38Contig4*), una *floroglucinol O-metiltransferasa* (*aCL38Contig2*) (Fig. 52) y una *laccasa* (Tabla Supl. 9, SOM8), posiblemente implicada en la polimerización de la lignina (Brown *et al.*, 2005). Estos genes podrían actuar, en conjunto con los citados en la descripción del SOM 4, en la biosíntesis y modificación de compuestos de defensa a estrés, como estrés oxidativo (Lluch, 2006) como estrés oxidativo (Establés, 2008).

SOM3 DF: O-metiltransferasas



SOM4 DF: O-metiltransferasas



SOM8 DF: O-metiltransferasas

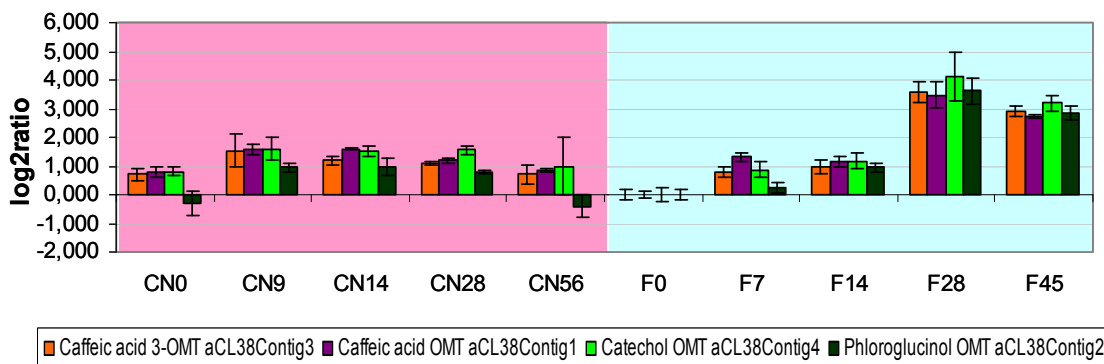


Figura 52. Valores de expresión de genes *O-metiltransferasa*, enzimas clave en la biosíntesis de fenilpropanoides, normalizados respecto a F0. En el eje de las X se muestra el valor de la media de las cuatro réplicas $\log_2\text{ratio}=\log_2X/F_0$, siendo X cada muestra de la serie temporal de CN y F. En el eje Y las muestras de CN (rosa) y F (azul) en los cinco tiempos analizados de almacenamiento a 2°C. La barra de error corresponde a la sd de las cuatro réplicas.

En los SOMs 4 (perfil de inducción tardía y mayores niveles de expresión en F respecto CN) y 8 (perfil de inducción en ambas variedades con niveles de expresión superiores en F respecto CN) se identificó el gen *tirosina/DOPA descarboxilasa* (Fig. 53) que podría implicarse en la biosíntesis de precursores del metabolismo secundario de polifenoles y de siquimato (Guillet *et al.*, 2000) en F.

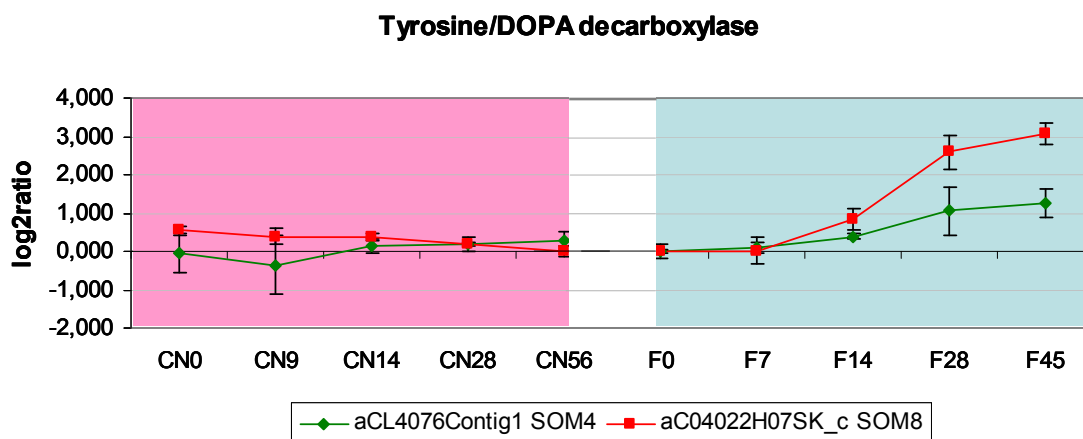


Figura 53. Valores de expresión de los unigenes *tirosina/DOPA*, normalizados respecto los niveles en F0. En el eje de las X se muestra el valor de la media de las cuatro réplicas $\log_2\text{ratio}=\log_2X/F0$, siendo X cada muestra de la serie temporal de CN y F. En el eje Y las muestras de CN (rosa) y F (azul) en los cinco tiempos analizados de almacenamiento a 2°C. La barra de error corresponde a la sd de los dos unigenes.

En el perfil de inducción en ambas variedades con niveles de expresión superiores en F respecto CN abundaron los genes relacionados con defensa frente a patógenos (Tabla Supl. 9, SOM8), como es el caso de dos genes *PR-4A* (*aCL1Contig14* y *aCL1Contig18*), un *PR5-1* (*aCL5030Contig1*), dos *quitinasa* (*aCL371Contig2* y *aCL856Contig1*), dos *miraculina* (*aCL1Contig11* y *aCL1Contig19*) y tres *taumatina* (*aCL76Contig1*, *aCL747Contig1* y *aCL747Contig2*), todos ellos codificantes de proteínas antifúngicas típicas de la respuesta hipersensible, pero que también se inducen en un complejo similar durante la formación de lesiones necróticas ante situaciones de estrés abiótico (Rao *et al.*, 2002; Naranjo *et al.*, 2003), y en heridas (Francia *et al.*, 2007). Algunas proteínas anticongelantes son similares a proteínas tipo taumatina en la epidermis de plántulas de centeno (Hon *et al.*, 1995). Especies reactivas del oxígeno podrían ser el activador común de esta respuesta en todos los casos (Almeras *et al.*, 2003; Bueso *et al.*, 2007). La inducción de varios genes de defensa específicamente en F, como los identificados en el SOM 4 (perfil de inducción tardía y mayores niveles de expresión en F respecto CN), además, de dos *dicianina* (*aCL12Contig3* y *aCL12Contig4*) identificadas en el SOM 8 como inducidas específicamente en F (Tabla Supl. 9), son un indicativo que efectivamente en F el

estrés oxidativo debe intensificarse entre la segunda y la cuarta semana de almacenamiento en frío. En definitiva, el estrés oxidativo podría extremarse en el trauma de las lesiones en F, lo cual podría acarrear la activación de un conjunto de genes de defensa como los identificados en los SOMs 4 y 8.

En el SOM 8 también aparecieron tres contigs de *LEA5* (*aCL9Contig21*, *aCL9Contig23* y *aCL9Contig8*). La expresión de estos genes respondió al almacenamiento en frío en ambas variedades, pero de manera menos acusada en CN, presentando los frutos CN mayores niveles previamente a la postcosecha en frío (Fig. 54). Este tipo de hidrofílicas confieren tolerancia a desecación y frío (Battaglia *et al.*, 2008), por lo que podrían ser un indicativo más que los frutos de CN están mejor preparados para soportar las bajas temperaturas y que F responde para adaptarse, pero ineficazmente.

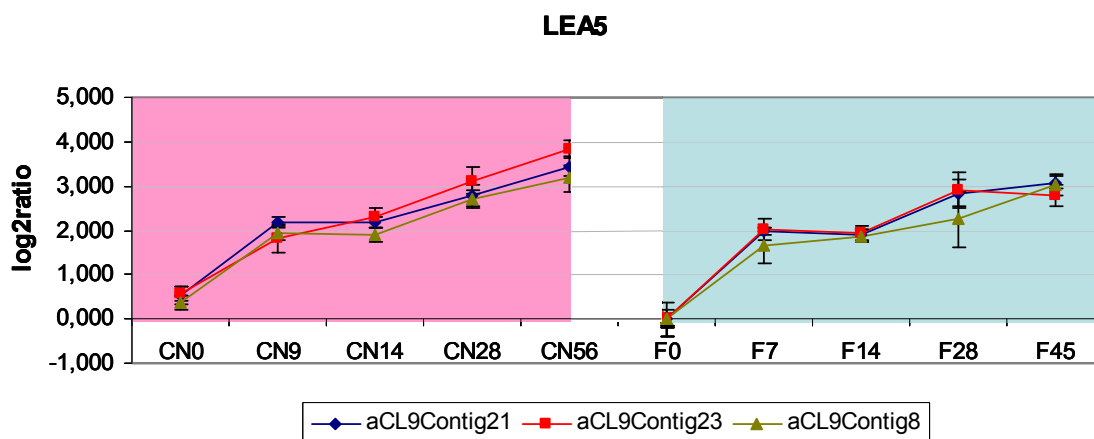


Figura 54. Valores de expresión de los unigenes *LEA5*, normalizados respecto los niveles en F0. En el eje de las X se muestra el valor de la media de las sondas que forman cada unigen $\log_2\text{ratio}=\log_2X/F_0$, siendo X cada muestra de la serie temporal de CN y F. En el eje Y las muestras de CN (rosa) y F (azul) en los cinco tiempos analizados de almacenamiento a 2°C. La barra de error corresponde a la sd de las sondas de cada unigen.

Como posibles reguladores de todos procesos, en el SOM 8 (perfil de inducción en ambas variedades con niveles de expresión superiores en F respecto CN) sólo se halló el unigen *aC05001B09SK_c*, correspondiente a una posible F-box (Fig. 55).

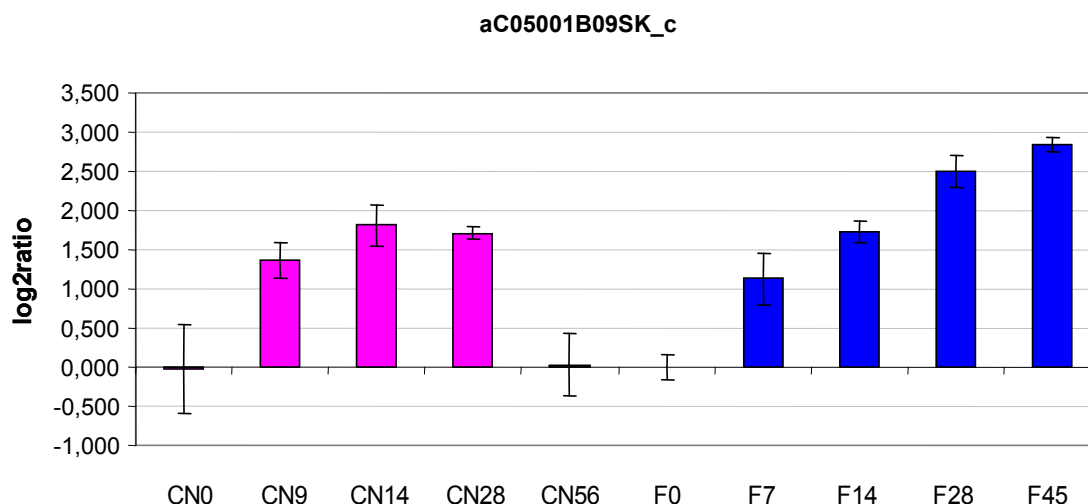


Figura 55. Valores de expresión del unigen *F-box* (*aC05001B09SK_c*), normalizados respecto los niveles en F0. En el eje de las X se muestra el valor de la media de las cuatro réplicas $\log_2\text{ratio}=\log_2X/F0$, siendo X cada muestra de la serie temporal de CN y F. En el eje Y las muestras de CN (rosa) y F (azul) en los cinco tiempos analizados de almacenamiento a 2°C. La barra de error corresponde a la sd de las cuatro réplicas.

6. REGULACIÓN HORMONAL DE LAS RESPUESTAS AL FRÍO EN CLEMENULES Y FORTUNE

En vista de las diferencias de expresión observadas y de la implicación del ABA y del ET con la respuesta de la planta al estrés por bajas temperaturas, se realizó un análisis específico sobre los genes relacionados con estas dos hormonas vegetales.

6.1 Ácido Abscísico

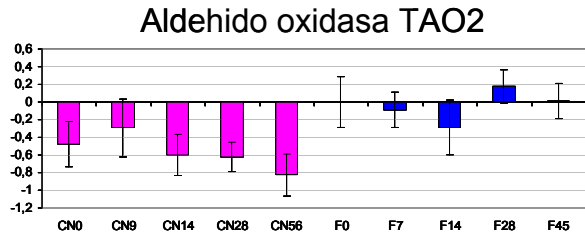
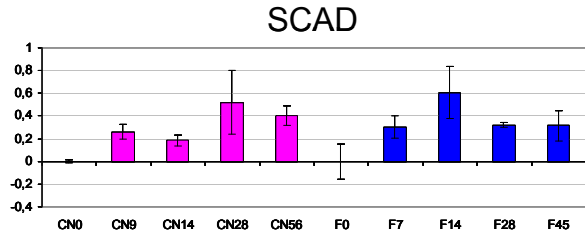
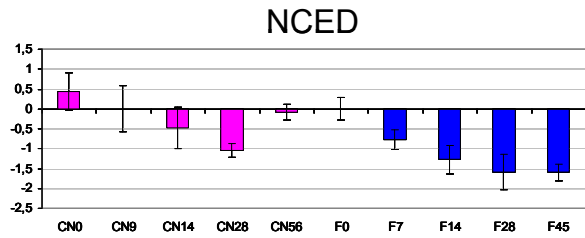
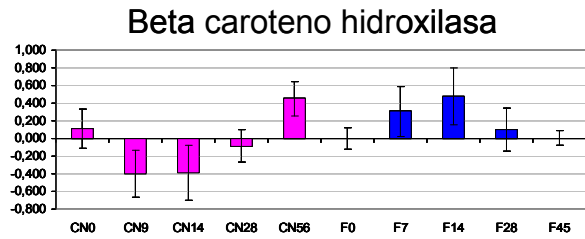
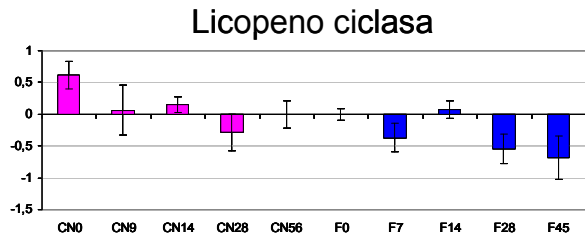
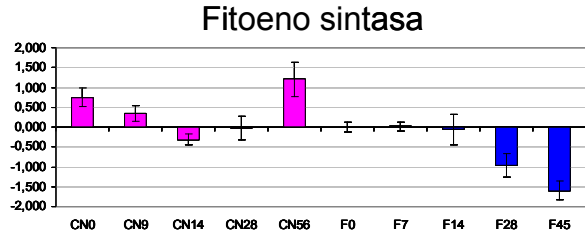
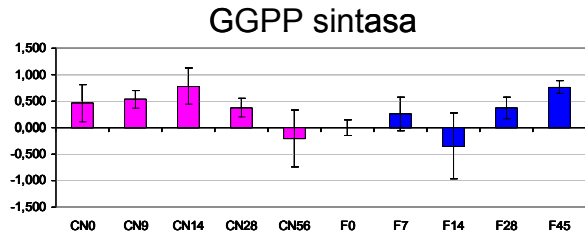
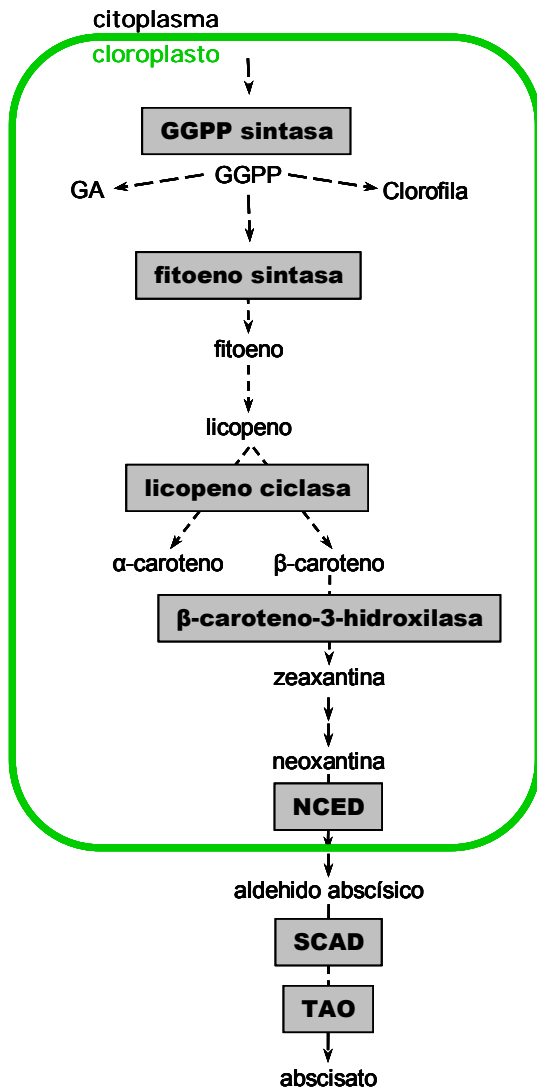
Está altamente reconocido que el estrés salino, hídrico y por bajas temperaturas causa aumento de biosíntesis y acumulación autocatalítica de ABA, amplificando así la respuesta al estrés (Xiong *et al.*, 2002). Pero en nuestro caso del flavedo de las mandarinas CN y F no pudimos observar un aumento en los niveles transcriptómicos de los genes de biosíntesis de ABA representado en la micromatriz. Aunque no podemos descartar que eso ocurra, escapa a nuestra plataforma de análisis. Sin embargo, los datos transcriptómicos concuerdan con trabajos en los que se ha medido la cantidad de ABA en el flavedo de frutos F almacenados a bajas temperaturas demuestran pequeños cambio (Lafuente *et al.*, 1997).

Los genes de la ruta de biosíntesis de carotenoides, precursora de la biosíntesis de ABA, que resultaron diferencialmente expresados entre las series temporales en frío de CN y F (apartado 5.2, Tabla Supl. 9, SOM3) y que, además, fueron diferenciales en la serie de CN (apartado 4.1.2, Tabla 6a y 6b), fueron (Fig. 56): *GGPP sintasa (aCL1306Contig1)*, *fitoeno sintasa (aCL4078Contig1)*, *z-caroteno desaturasa (aCL4451Contig1)*, *licopeno ciclasa (aCL1461Contig1)*, y *β-caroteno hidroxilasa (aCL35Contig1)*. En cuanto a los genes implicados en la ruta específica de síntesis de ABA, fueron diferenciales entre CN y F un transcrito de *NCED (9,10[9',10'] carotenoide dioxigenasa, aCL920Contig2)*, uno de *SCAD (short chain alcohol dehydrogenase, aCL6108Contig1)* y otro de *TAO (aldehído oxidasa, aC01005D04)* (Fig. 56). En general, los niveles de expresión de los citados genes de biosíntesis de carotenoides y ABA disminuyeron con el frío en el flavedo de CN y F, pero mostraron mayores niveles en CN0 que en F0 (Fig. 56). El único gen en la ruta de síntesis de ABA que presentó una ligera inducción, similar en ambas variedades, fue *SCAD*.

La reacción catalizada por la enzima *NCED* es el principal paso limitante en la síntesis de ABA (Xiong y Zhu, 2003; Nambara y Marion-Poll, 2005). El transcrito de *NCED* que disminuyó sus niveles a lo largo de la serie en ambas variedades, presentó en todo momento mayor expresión en CN (Fig. 56), lo cual podría sugerir mayor síntesis de ABA que en F durante el almacenamiento a bajas temperaturas. El gen *NCED* forma parte de una familia génica y cada gen puede tener un patrón de expresión específico temporal y espacialmente (Rodrigo *et al.*, 2006), de modo que el identificado en estos análisis podría ser un gen de los que contribuye poco a la síntesis de ABA en frío.

Por el contrario, un gen *TAO* mostró mayor nivel de expresión en F que en CN antes y durante la postcosecha a bajas temperaturas, pudiendo resultar en una mayor síntesis de ABA en F que en CN (Fig. 56). La inducción puntual de *TAO* en F28 a 2°C podría responder a un aumento en el estrés oxidativo en F, según apuntan otros indicios comentados anteriormente. Es conocido que la biosíntesis de ABA puede activarse por acción de las especies reactivas del oxígeno con objeto de activar el sistema antioxidante dependiente de ABA (Xiong *et al.*, 2002; Sala y Lafuente, 2004). Parece que F experimente un mayor estrés oxidativo (Sala y Lafuente, 2004) y podría tener mayor cantidad de ABA que CN. La relación entre DF y ABA no es directa, la concentración de ABA no depende de la susceptibilidad al frío en frutos F (Lafuente *et al.*, 1997), incluso puede ser perjudicial (Gosalbes *et al.*, 2004). La situación entre CN y F respecto al ABA podría ser similar a la que se ha determinado en las naranjas Navelate y Pinalate: Pinalate es un mutante de Navelate deficiente en ABA y no experimenta ninguna fisiopatología a bajas temperaturas, mientras que Navelate sí

Figura 56. Ruta de biosíntesis del ABA. En un recuadro gris se han destacado los genes diferencialmente expresados en el flavedo de frutos CN y F almacenados a 2°C. A la derecha se muestran los valores de expresión de cada gen. En el eje X se muestra el valor de la media de las cuatro réplicas como $\log_2 X/F_0$, siendo X cada muestra de la serie temporal de CN y F. En el eje de las Y las muestras de CN (rosa) y F (azul) en los cinco tiempos analizados de almacenamiento a 2°C. La barra de error corresponde a la sd de las cuatro réplicas de cada unigen.



(Alferez *et al.*, 2005a). Apuntando en ese mismo sentido, el acondicionamiento de 3 d a 37°C en F evita el DF a 2°C y disminuye los niveles de ABA (Lafuente *et al.*, 1997). Sería interesante medir los niveles de ABA tanto en CN como en F antes y durante el almacenamiento a bajas temperaturas para verificar o no esa asociación inversa.

En cuanto a elementos de señalización por ABA, nuestros resultados indican que un homólogo a *ABI3* presentó un patrón de inducción en ambas variedades. Sin embargo los niveles a tiempo inicial así como la inducción de su expresión en frío fueron algo mayores en CN (apartado 5.2.1 SOM6) (Tabla 24). Los homólogos a *ABI3* son factores reguladores de la transcripción que activan genes de respuesta a ABA en multitud de plantas, desde briófitos a angiospermas (Sakata *et al.*, 2010). La mayor expresión de este *ABI3* en CN podría ser una de las razones de su tolerancia al frío. En relación con ello, la sobreexpresión ectópica de *ABI3* en *Arabidopsis* incrementa la expresión de genes de respuesta a ABA/frío/sequía e intensifica la tolerancia a congelación y la respuesta a tratamientos con ABA (Tamminen *et al.*, 2001).

Por otra parte, también se pudo detectar la represión, significativamente más acusada en CN que en F, de dos proteínas PP2C (Fig. 60 en el apartado 7.2). Las PP2C reprimen la respuesta de ABA (Umezawa *et al.*, 2009; Vlad *et al.*, 2009), de modo que la expresión de estos genes también apoyaría una posible respuesta de tolerancia mediada por ABA más potenciada en CN.

En resumen, los datos de expresión no aclaran si la acumulación de ABA puede ser mayor en alguna de las dos variedades, pero la mayor expresión de *ABI3* y la menor de dos *PP2C* en CN sí podría estar potenciando una mayor tolerancia mediada por la cadena de transducción de ABA en los frutos CN. Otra posibilidad es que un mismo estímulo de ABA no produzca la misma respuesta en ambas variedades, ya que en F y también en Hernandina (tolerante al frío) el tratamiento de ABA previamente a la exposición a bajas temperaturas intensifica el desarrollo de DF (Gosalbes *et al.*, 2004). Sería interesante comprobar qué efecto causaría la aplicación de ABA en frutos CN previamente a su exposición al frío.

6.2 Etileno

Los procesos principales en los que está implicado el ET están relacionados con diferentes aspectos del desarrollo, maduración, senescencia y con la respuesta a diversos estreses bióticos y abióticos (Yang y Hoffman, 1984; Benavente y Alonso, 2006; Stepanova y Alonso, 2009).

Dentro de los genes diferenciales entre las variedades CN (apartado 4.1.2) y F (apartado 3.1.2) los de la categoría *etileno*, tanto de biosíntesis como de respuesta, se indujeron en ambas variedades (Tabla 12 del apartado 3.1.2, Fig. 24 del apartado 4.1.2, Tablas Spl. 4a y 6a). Sin embargo, el análisis conjunto de CN y F (Tabla 24 en el apartado 5.2) manifestó que la respuesta molecular no es completamente igual en ambas variedades por la identificación de genes *dioxigenasa* y *esterasa inducible por ET* en el patrón de expresión del SOM6 (perfil de inducción en ambas variedades con niveles de expresión superiores en CN respecto F) (Tabla Supl. 9). No obstante, los datos de expresión de los genes relacionados con la síntesis de ET, sugieren un aumento en la capacidad de producir ET en el flavedo a lo largo del almacenamiento en frío. Sin embargo, los frutos CN muestran mayores niveles de expresión de esos mismos genes previo al almacenamiento en frío indicando que el ET podría estar implicado en el establecimiento de un mecanismo de tolerancia preformado. El incremento en la producción de ET en mandarinas F en respuesta al frío ha sido descrito por Lafuente *et al.* (2001). Este incremento podría participar en la inducción del mecanismo de adaptación al frío de ambas variedades que resultaría más exitoso por precoz e intenso en CN. Sin embargo, el aumento de ET va asociado a la aparición de DF en frutos cítricos, como F, y CN no manifiesta daños (Lafuente *et al.*, 2003). El ET podría estar implicado en la inducción de senescencia postcosecha durante el almacenamiento en frío, independientemente de daños o tolerancia. De hecho, está extensamente descrita la producción de ET durante procesos de senescencia en plantas y su papel como promotor de la misma (Lanahan *et al.*, 1994; Grbic y Bleecker, 1995). Por otra parte, los elementos de respuesta identificados tras la activación de la ruta de ET parecen ser más persistentes en F que en CN, quizás, debido al desarrollo de procesos senescentes/desarrollo de la necrosis en el caso de F mediados por esta hormona (Goldschmidt *et al.*, 1973, Zacarias *et al.*, 2003).

También cabe la posibilidad que el ET aumente en ambas variedades, pero la respuesta a la hormona en cada una sea diferente. Esta hipótesis podría estar relacionada con los resultados de Cajuste *et al.* (2010) que describen cambios debidos

al ET en el contenido y la morfología de la epicutícula de naranjas Navelate y Pinalate a 22°C, que en el caso de bajas temperaturas podrían aumentar la tolerancia al frío.

El ET reduce el DF en naranjas Navelate (Alferez *et al.*, 2005a) y mandarinas F (Lafuente *et al.*, 2004). La aplicación de inhibidores de la síntesis/acción del ET en F aumenta el DF (Lafuente *et al.*, 2001). La producción de ET en F es mayor en células dañadas que en sanas (Lafuente *et al.* 2001; Zacarias *et al.*, 2003). Esto podría indicar que las mandarinas responden al frío sintetizando ET y esta hormona ejercería un efecto de protección que, sin embargo, no resultaría suficientemente efectivo.

Puesto que los resultados en CN son contradictorios con la bibliografía (Lafuente *et al.*, 2003) sería interesante: (1) medir la producción real de ET, (2) inhibir la síntesis/acción del ET en mandarinas CN expuestas al frío y comprobar si aparecen DF.

7. EXPRESIÓN DE GENES DE SEÑALIZACIÓN Y RESPUESTA AL FRÍO

El seguimiento de la expresión de genes relacionados con el frío en función de la bibliografía, se hizo sobre los genes con expresión diferencial identificados tras el análisis de las series temporales de CN y F que superaron los test estadísticos SAM. Se siguió para la selección el esquema propuesto por Sharma *et al.* (2005).

Debido al diseño de trabajo, un estudio a tiempos largos de almacenamiento en frío, es difícil abordar la percepción y transducción de la señal del estrés que debería ser rápida y temprana, por lo que es de esperar que aquellos elementos de señalización que estén continuamente siendo estimulados por la exposición prolongada estén enmascarados con respuestas secundarias. Pero podemos intuir la participación de ciertos elementos de señalización en el DF en F, y diferencias con CN que se puedan asociar a elementos de señalización para conferir tolerancia.

7.1 Percepción del frío

Las membranas celulares son estructuras fluidas dada su consistencia lipídica, y las bajas temperaturas pueden reducir su fluidez, aumentando su rigidez (Levitt, 1980; Steponkus, 1984; Uemura *et al.*, 1995). Las células de plantas pueden sentir el estrés por frío a través de cambios en la fluidez de la membrana, pero también por cambios en la conformación de proteínas y ácidos nucleicos y/o en la concentración de metabolitos (Thomashow, 1999; Chinnusamy *et al.*, 2007).

FLUIDEZ DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA

En el flavedo de frutos CN (CNmclase, 4.1.2; Tabla Supl. 6a) y F (Fmclase, 3.1.2; Tabla Supl. 4a) los genes *desaturasa de ácidos grasos* tuvieron diversos perfiles de expresión: ω -3-*FAD* (*aCL5Contig18*) se reprimió (Tabla 15), *FAD6* (*aCL1Contig2*) se indujo (Tabla 15), pero δ -12-*FAD* (*aCL578Contig1*) (Fig. 57) se mantuvo a bajos niveles de expresión en CN y se indujo transitoriamente en F a tiempos largos (apartado 5.2.2, SOM3). Diversos trabajos con genes *FADs* han comprobado los cambios esperados en la tolerancia al frío (aumento desaturasas > aumento fluidez > aumento en la tolerancia) (Tang *et al.*, 2007; Craig *et al.*, 2008), sin embargo, también hay resultados contradictorios (Tang *et al.*, 2007). En el flavedo de pomelos hay activación de genes del metabolismo de lípidos, incluida la inducción de varios genes *FAD* (Sapitnitskaya *et al.*, 2006; Maul *et al.*, 2008). Pero en el caso de F la reorganización de sus membranas lipídicas no juega un papel importante en la tolerancia al frío (Mulas *et al.*, 1996, 1997).

Los fosfolípidos representan la segunda familia lipídica, después de los galactolípidos, en los tejidos fotosintéticos, y la primera en los no fotosintéticos. En el análisis del conjunto de genes diferenciales entre CN y F (apartado 5.2, Tabla Supl. 9) se identificaron 2 unigenes correspondientes a la biosíntesis de fosfolípidos, *aCL746Contig1* y *aCL25Contig1*. El primero, *aCL746Contig1*, codifica una proteína fosfolípido/glicerol aciltransferasa y su patrón de expresión se localizó en el SOM4 (perfil de inducción tardía y mayores niveles de expresión en F respecto CN) (Fig. 57). En cambio, el segundo, *aCL25Contig1*, correspondió con un *inositol3P sintasa* que se reprimió en ambas variedades y se clasificó en los SOMs de respuesta general de CN *time course*, aunque presentó mayores niveles de expresión en CN (Fig. 57).

El unigen *aCL7977Contig1*, un *transportador de fosfolípidos ATPasa 1*, mostró un patrón de expresión de fuerte inducción en ambas variedades y su patrón se clasificó dentro del SOM8 (perfil de inducción en ambas variedades con niveles de expresión superiores en F respecto CN) (Fig. 57, Tabla Supl. 9).

En resumen, nuestros resultados mostraron que la expresión de los genes relacionados con componentes de la membrana plasmática fue dinámica y respondió al frío en ambas variedades. Los resultados apuntan a que ocurrieron cambios más acusados en F, lo cual podría responder a que las membranas de F estuvieran menos preparadas para su adaptación al frío, o bien, ser consecuencia de las condiciones de campo en el momento de la recogida, como ya se ha ido comentando anteriormente en otros apartados.

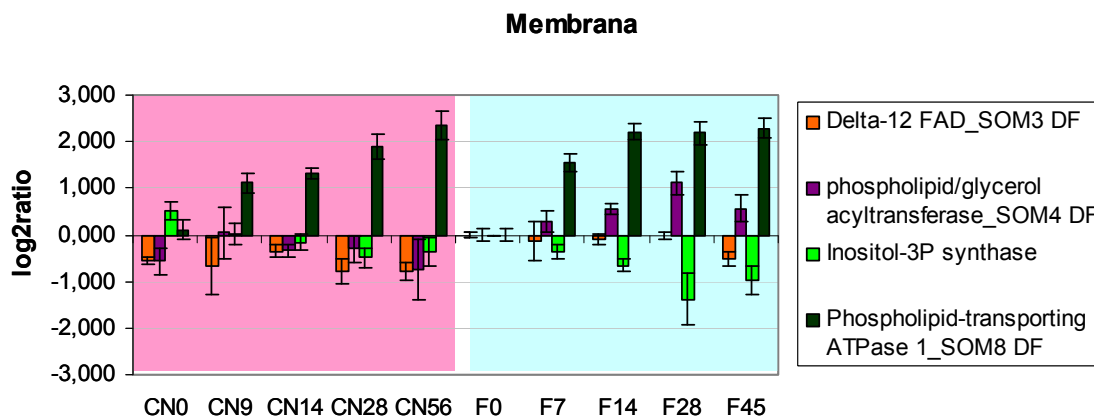


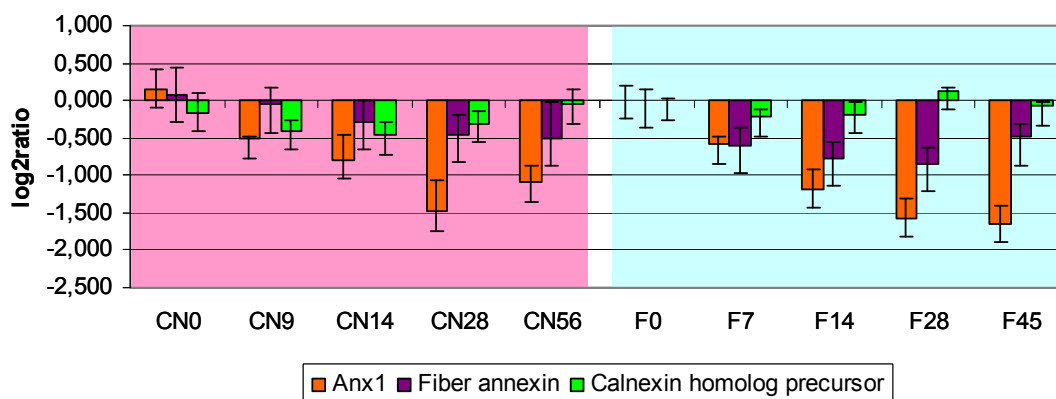
Figura 57. Valores de expresión de los genes relacionados con la membrana plasmática, normalizados respecto los niveles en F0. En el eje de las X se muestra el valor de la media de las cuatro réplicas $\log_2\text{ratio}=\log_2X/F_0$, siendo X cada muestra de la serie temporal de CN y F. En el eje de las Y las muestras de CN (rosa) y F (azul) en los cinco tiempos analizados de almacenamiento a 2°C. Las barras de error corresponden con la sd de las cuatro réplicas.

CALCIO

En el análisis *CNFtime course* (apartado 5.2) se identificaron diversos genes relacionados con la señalización de calcio con expresión diferencial entre ambas variedades (Fig. 58): dos genes de respuesta general (*Anx1*, *aCL296Contig1*, y *fiber annexin*, *aCL530Contig1*) presentaron una represión general en ambas variedades; un gen con el motivo EF-hand y cuyo patrón de expresión correspondió con el SOM5-perfil de represión en ambas variedades con niveles de expresión superiores en CN respecto F (*aCL26Contig9*, *calcium-binding EF hand*); tres genes con un patrón de estar posible asociado al DF por tener niveles de expresión superiores en F respecto CN (*calcium-binding EF-hand*, *aCL7645Contig1* y *aCL57Contig2* en SOM3-perfil de inducción temprana en F, *aCL26Contig5* en SOM4-perfil de inducción tardía en F); y un gen calnexina (*calnexin homolog precursor*, *aCL567Contig1*), también significativos en las series individuales.

En vista a los datos de expresión, no parece que la señalización por calcio sea característica de protección o producción de daños, sino más bien que diferentes componentes de la señalización por calcio podrían estar actuando en cada caso. Además, el número de elementos relacionados con calcio que se regulan también es reducido, por lo que no parece que esta señalización sea fundamental para la respuesta al frío, al menos a largo plazo (a partir de una semana de la exposición).

Genes relacionados con Calcio



Ca EF-hand

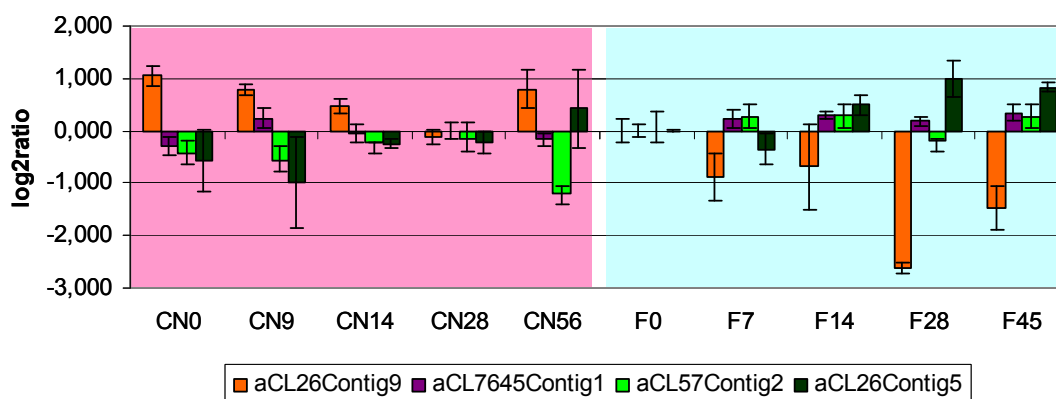


Figura 58. Valores de expresión del factor de los genes relacionados con calcio, normalizados respecto los niveles en F0. En el eje de las X se muestra el valor de la media de las cuatro réplicas $\log_2\text{ratio}=\log_2X/F_0$, siendo X cada muestra de la serie temporal de CN y F. En el eje Y las muestras de CN (rosa) y F (azul) en los cinco tiempos analizados de almacenamiento a 2°C. La barra de error corresponde a la sd de las cuatro réplicas.

FOSFOLIPASAS

Los ácidos fosfatídicos liberados de la membrana por la acción de las PLC y PLD pueden actuar como mensajeros secundarios (Fig. 4 en la Introducción, Fig. 59), activando respuesta temprana a estrés (Vergonelle *et al.*, 2005). La acción de estas PLs genera un aumento en el inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG) citosólico dependiente de calcio (Bargmann y Munnik, 2006). El IP₃ actúa como un mensajero secundario para mediar el aumento de Ca²⁺ del tonoplasto (Alexandre *et al.*, 1990). De hecho, PLD y PLC están implicadas en la respuesta a bajas temperaturas en plantas (Ruelland *et al.* 2002, Welti *et al.* 2002, Li *et al.* 2004) e incluso, la PLD δ confiere tolerancia a congelación en *Arabidopsis* (Li *et al.*, 2004). No obstante, el aumento de la actividad PL en frutos almacenados a bajas temperaturas

produce DF, y el acondicionamiento disminuye esa actividad al igual que disminuye los DF (Pinhero *et al.*, 1998; Mao *et al.*, 2007; Rui *et al.*; 2010). Las isoformas de las PL pueden tener diferentes funciones (Wang, 2001).

En el flavedo de frutos de CN y F almacenados a bajas temperaturas, se reprimió la expresión de los genes *PLC2* (*aCL9388Contig*) y *precursor de PLD1* (*aCL2623Contig*). Sin embargo, esta represión fue más temprana y acusada en F, por lo que quizás estas PLs podrían ser necesarias como mensajeros para un correcto establecimiento de la aclimatación al frío.

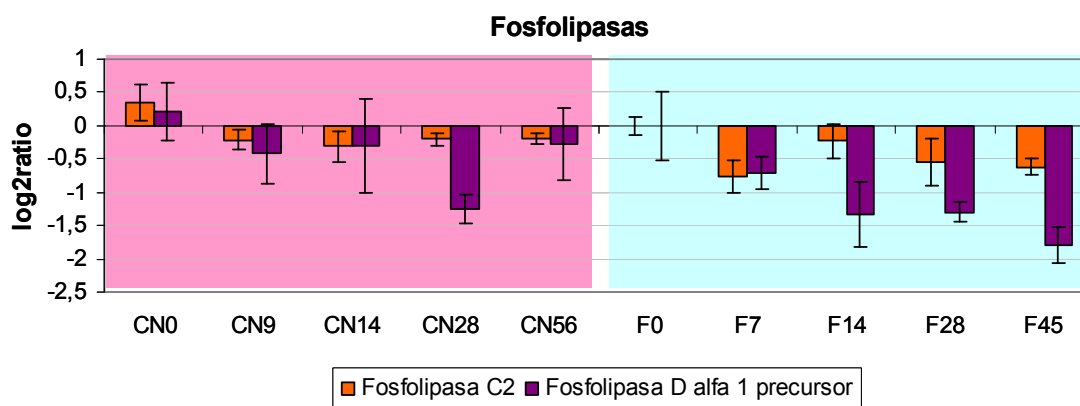


Figura 59. Fosfolipasas, normalizados respecto los niveles en F0. En el eje de las X se muestra el valor del $\log_2\text{ratio}=\log_2X/F_0$, siendo X cada muestra de la serie temporal de CN y F. En el eje Y las muestras de CN (rosa) y F (azul) en los cinco tiempos analizados de almacenamiento a 2°C. La barra de error corresponde a la sd de las cuatro réplicas.

7.2 Transducción de la señal del frío

La señal de transducción requiere una coordinación espacio-temporal de varias moléculas señalizadoras en la célula. Después de la señal de percepción se producen los mensajeros secundarios, éstos inician una cascada señalizadora en gran medida mediada por fosforilaciones/desfosforilaciones (Fig. 4).

FOSFATASAS

Las serina/treonina fosfatasas intervienen en la señalización de estrés a continuación de la señal de calcio, y las PP2C en relación con la percepción de ABA. Se identificaron varias fosfatasas con expresión diferencial entre las variedades, entre ellas el gen de la *TAP46* (subunidad reguladora de la PP2A) en el SOM6 (perfil de inducción en ambas variedades con niveles superiores en CN respecto F) (Fig. 60). Dada la mayor expresión de *TAP46* a lo largo de toda la serie en CN, cabe pensar en

un posible papel regulador de respuesta de tolerancia para este gen. De hecho, en *Arabidopsis* también se induce **PP2A** por bajas temperaturas (Monroy *et al.* 1998).

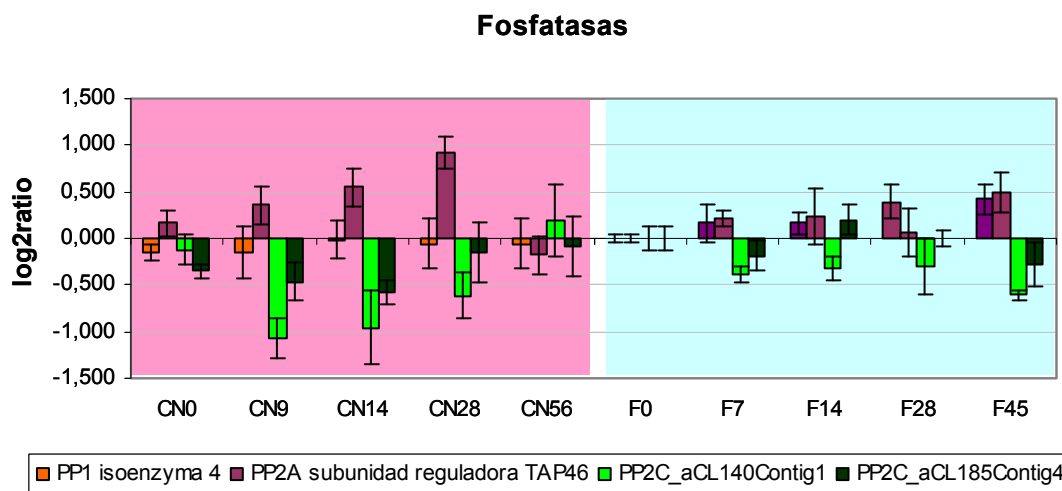


Figura 60. Valores de expresión de los genes *fosfatasa PP1*, *PP2A-TAP46*, *PP2C*, normalizados respecto los niveles en F0. En el eje de las X se muestra el valor de la media de las cuatro réplicas $\log_2\text{ratio}=\log_2X/F_0$, siendo X cada muestra de la serie temporal de CN y F. En el eje Y las muestras de CN (rosa) y F (azul) en los cinco tiempos analizados de almacenamiento a 2°C. La barra de error corresponde a la sd de las cuatro réplicas.

Las **PP2C** identificadas como diferenciales son homólogas a ABI1 y ABI2, reguladores negativos de la transducción de la señal de ABA (Meyer *et al.*, 1994; Leung *et al.*, 1994; Schweighofer *et al.*, 2004; Yoshida *et al.*, 2006) por su interacción con receptores de ABA (Ma *et al.*, 2009; Santiago *et al.*, 2009). Podrían estar actuando de nódulo entre el estímulo de ABA y el estrés por frío. En ambas variedades de mandarinas los genes *PP2C* se mostraron reprimidos por el frío, aunque la represión fue más acusada en CN. En plantas de *Arabidopsis* estresadas por frío también se reprimen (Lee *et al.*, 2005), lo cual debería implicar una potenciación de la respuesta al estrés mediada por ABA. De hecho, el silenciamiento del gen *AtPP2CA* aumenta la expresión de los genes *CBF1*, *RAB18*, *RCI2A*, y *LT178 (RD29A)* en tratamientos de frío, exhibiendo un alto grado de aclimatación al frío en las plantas transgénicas de *Arabidopsis* (Tähtiharju y Palva, 2001). Si esto ocurre en el flavedo de las mandarinas, la mayor represión en CN podría resultar en una mayor respuesta a ABA, y por consiguiente, en la inducción de la expresión los genes de tolerancia al frío. Aunque en el flavedo de frutos F el ABA no evita la manifestación de DF, e incluso puede aumentarla (Lafuente *et al.*, 1997; Gosalbes *et al.*, 2004).

PROTEÍNAS QUINASAS

En el apartado en el que se analizaron las diferencias transcriptómicas entre CN y F, se señaló una quinasa en el SOM6 (perfil de inducción en ambas variedades con niveles de expresión superiores en CN respecto a F) que podría señalar la respuesta de tolerancia en CN (*Protein kinase CDG1-like*, *aCL7304Contig1*; Fig. 61).

Los genes codificantes de proteínas serina/treonina quinasa *AtPK19*, *aCL7618Contig1*, y *SNT7*, *aCL3987Contig1* (Fig. 61) se comentaron en el apartado de potenciales señalizadores del desarrollo de DF en el apartado 5.2.2 “SOM3 (perfil de inducción temprana y mayores niveles de expresión en F respecto CN)”.

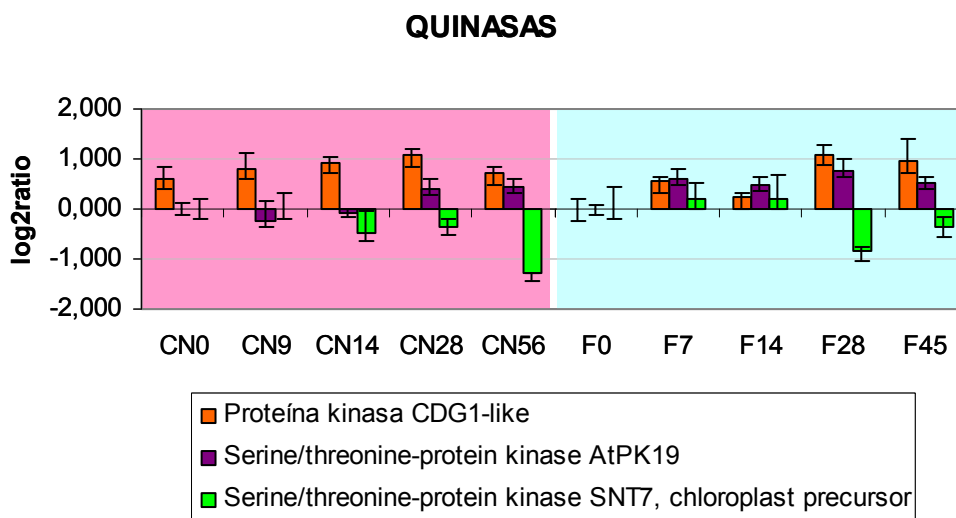


Figura 61. Valores de expresión de los genes *quinasa CDG1*, *AtPK9* y *SNT7*, normalizados respecto los niveles en F0. En el eje de las X se muestra el valor del $\log_2\text{ratio} = \log_2 X / F_0$, siendo X cada muestra de la serie temporal de CN y F. En el eje Y las muestras de CN (rosa) y F (azul) en los cinco tiempos analizados de almacenamiento a 2°C. La barra de error corresponde a la sd de las cuatro réplicas.

Como resumen en cuanto a las cascadas de fosforilación/desfosforilación, los datos de expresión apuntan a que en F podría haber mayor tendencia a la fosforilación. Esto estaría soportado por la menor represión de dos *PP2C* y la mayor expresión en F de los genes codificantes de las quinasa similares a *AtPK19* y *SNT7*, además de por la mayor inducción en CN de una *PP2A*. Estos datos contrastan con los publicados para un fruto cítrico sensible como el pomelo (Maul *et al.*, 2008), donde el frío parece reprimir masivamente las proteínas quinasa, mientras que activa las fosfatasa.

GENES DE RESPUESTA AL ESTRÉS OXIDATIVO

Una respuesta deletérea de la planta frente al estrés por bajas temperaturas es la producción de daño oxidativo, sin embargo, los ROS también podrían actuar como moléculas señalizadoras (Apel y Hirt, 2004). A lo largo de la tesis se ha sugerido que el sistema de respuesta a estrés oxidativo parece estar mejor establecido en CN previamente a la exposición al almacenamiento en frío, con mayores niveles de transcritos iniciales que le ayudan a actuar rápidamente. Este fue el caso, por ejemplo, de genes implicados en el metabolismo secundario que incluye la síntesis de compuesto antioxidantes fenilpropanoides (SOM5 y SOM6, mayores niveles de expresión en CN respecto a F).

En cambio, como respuesta al almacenamiento en frío, en la serie de F se detectó la activación significativa a las cuatro semanas de exposición al frío de genes *GST* (según el text Wilcoxon de la aplicación MapMan; apartado 3.1.2, Fig. 19, Fig. 62). Esta activación en F fue diferencial frente a CN (apartado 5.2.2). Como se comentó en el apartado 3.1.2, la activación de *GST* en F podría ser una respuesta al incremento de ROS que podría producirse en relación con el desarrollo de DF.

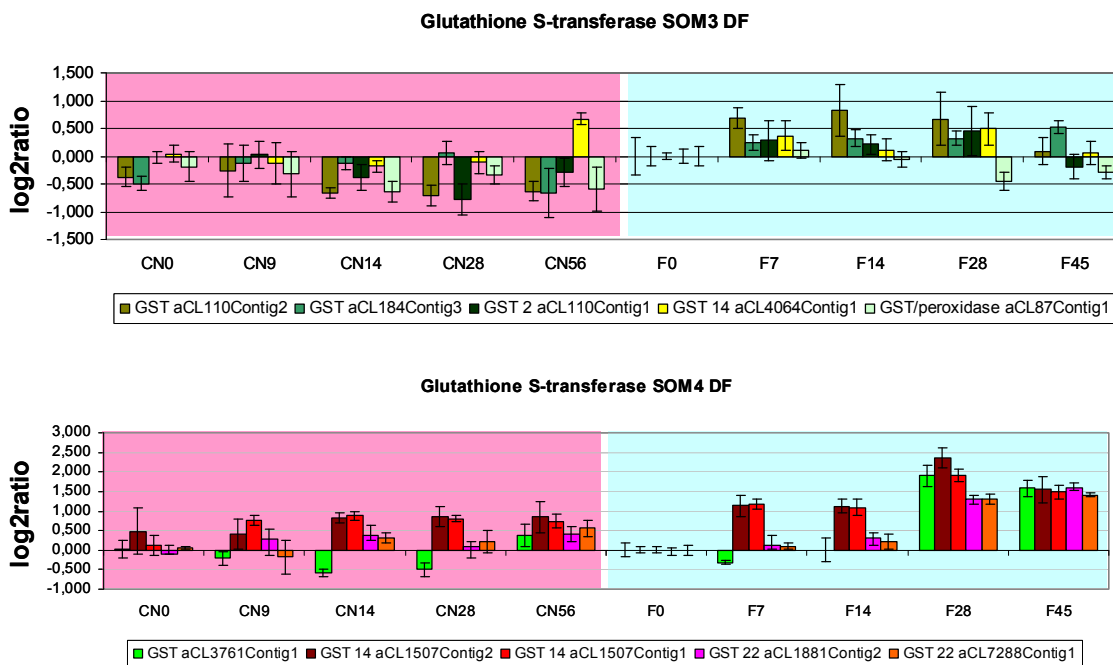


Figura 62. Valores de expresión de genes *GST*, normalizados respecto los niveles en F0. En el eje de las X se muestra el valor de la media de las cuatro réplicas $\log_2\text{ratio}=\log_2X/F0$, siendo X cada muestra de la serie temporal de CN y F. En el eje Y las muestras de CN (rosa) y F (azul) en los cinco tiempos analizados de almacenamiento a 2°C. La barra de error corresponde a la sd de las cuatro réplicas.

Similar al caso de las GST fue el de las peroxidasas (Fig. 63), también con una tendencia a estar más expresadas en F a tiempos largos de exposición al frío (Tabla Supl. 9). En el análisis de F se identificaron las *peroxidasas aCL1534Contig1*; *aCL201Contig1*, *aCL98Contig1*, *aCL98Contig2*, *aCL98Contig3* (Tabla Supl. 4a). Algunos de estos genes también se identificaron en el análisis diferencial entre CN y F como *aCL201Contig1* (Tabla Supl. 9, SOM6), y *aCL98Contig2*, *aCL98Contig3* (Tabla Supl. 9, SOM3). Aunque también hubo genes *peroxidasa* reprimidos en CN, como *aCL201Contig2* (Fig. 63) (Tabla Supl. 4a, Tabla Supl. 9, SOM3).

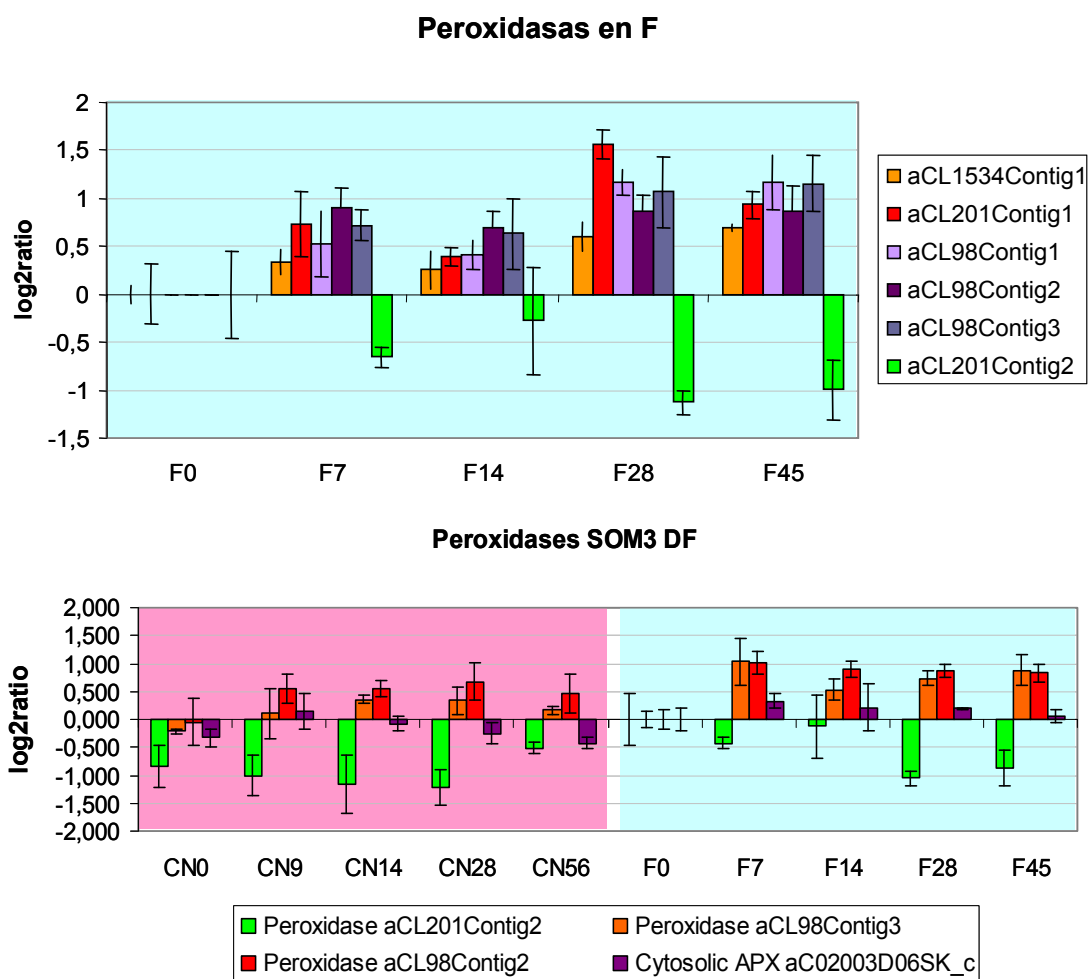


Figura 63. Valores de expresión de los genes *peroxidasa*, normalizados respecto los niveles en F0. En el eje de las X se muestra el valor de la media de las cuatro réplicas $\log_2\text{ratio}=\log_2X/F_0$, siendo X cada muestra de la serie temporal de CN y F. En el eje Y las muestras de CN (rosa) y F (azul) en los cinco tiempos analizados de almacenamiento a 2°C. La barra de error corresponde a la sd de las cuatro réplicas.

Estos resultados concuerdan con datos previos que indican que el estrés oxidativo en cítricos es una de las causas de DF y las células deben responder al

mismo (Sala, 1998). Así que el flavedo de las mandarinas F acondicionadas induce genes (Sanchez-Ballesta *et al.*, 2003) y la actividad de enzimas antioxidantes, como las peroxidasas (Sala y Lafuente, 2000; Lafuente *et al.*, 2004), protegiendo del frío.

GENES DE RESPUESTA AL ESTRÉS POR BAJAS TEMPERATURAS (comparación con otros trabajos)

Hannah *et al.* (2005) estimaron que un 20% de los genes codificados en el genoma de *Arabidopsis thaliana* está regulado por frío. Desde entonces se han publicado numerosos trabajos basados en micromatrices sobre el estudio de genes de respuesta al frío en *Arabidopsis* (Kilian *et al.*, 2007) y otras especies (Mantri *et al.*, 2007; Fernandez *et al.*, 2008; Maul *et al.*, 2008). Incluso ya se han realizado trabajos metabolómicos que permiten asignar mejor las funciones de los genes implicados (Guy *et al.*, 2008; Usadel *et al.*, 2008).

La comparación con los antecedentes estudios de cítricos sensibles al frío no es sencilla puesto que en cada caso se han estudiado variedades y tratamientos diferentes: mandarina F mediante SSH (Sanchez-Ballesta *et al.*, 2003) y pomelo mediante micromatrices (Maul *et al.*, 2008). En el caso de la micromatriz de pomelo, contenía 30171 sondas y la micromatriz de primera generación apenas llegaba a los 7000 unigenes. Por tanto, la diferencia de sondas utilizadas podría enmascarar resultados similares pero puede resaltar resultados muy diferentes.

La caracterización general de la respuesta de las mandarinas al frío es similar a la encontrada en pomelo (Maul *et al.*, 2008): (1) aparecen más genes reprimidos que inducidos; (2) sólo el 60% de los genes se anotaron con una posible función y 45-50% se identificaron con un homólogo de *Arabidopsis* en pomelo y en 70% uniAts en mandarinas; (3) tanto en pomelo como en mandarinas CN y F se advirtió enriquecimiento de la respuesta a los estímulos bióticos/abióticos y estrés, y una infrarrepresentación del metabolismo de proteínas, la biogénesis y organización celular, y el metabolismo de ácidos nucleicos.

La respuesta general del frío en el flavedo de frutos de pomelo almacenados en frío (Maul *et al.*, 2008) es similar a la identificada en ambas variedades de mandarinas en la represión de genes de la pared celular (F y CN, apartados 3.1.2 y 4.1.2 respectivamente), fotosíntesis y respiración (F, apartado 3.1.2), metabolismo secundario (CN, apartado 4.1.2), la inducción de genes de respuesta a estrés y estímulos bióticos y abióticos, y biosíntesis de ET (apartado 6.2). Por tanto, estos

cambios se podrían considerar generales en la respuesta de los frutos cítricos al frío. Pero hay otros cambios que son contrarios en pomelo y mandarinas, como la biosíntesis de carotenoides y ABA (apartado 6.1), y el gen *CAT* de respuesta a estrés oxidativo (inducido en pomelo, reprimido en mandarinas), o la biosíntesis de JA (reprimida en pomelo, sin embargo, presentó un patrón plano en mandarinas). En cambio, el gen *β -amilasa*, inducido en pomelo y CN se reprimió en F (apartado 5.2.1).

Cabe destacar, que el pomelo es un fruto más sensible a las bajas temperaturas que las mandarinas F. La base genética de cada especie lleva consigo diferencias en la susceptibilidad al frío, percepción y en la respuesta al mismo. Los antecedentes demuestran los frutos pomelos y mandarinas F responden de diferente forma al ABA, protegiendo a los pomelos (Kawada, 1980) y pudiendo perjudicar a F (Gosalbes *et al.*, 2004). Otro ejemplo es la acumulación de azúcares osmoprotectores, en pomelos dicha acumulación aumenta la tolerancia al frío (Purvis *et al.*, 1979) y en F no (Holland *et al.*, 1999). Como ya se apuntó, en los frutos de pomelo y F, sensibles al frío, hay inducción de fosfatasa, mayor que en la variedad tolerante CN. En cambio, en pomelo hay una represión masiva de proteínas quinasas, que no se reflejó en los resultados de CN y F.

DISCUSIÓN FINAL

y perspectivas

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral contribuyen a incrementar el conocimiento actual tanto de las bases fisiológicas y moleculares relacionadas con los mecanismos de tolerancia al frío como de las rutas asociadas al desarrollo de DF en frutos cítricos.

En primer lugar, se clonaron cDNAs que sirven para la ampliación del conocimiento del transcriptoma de cítricos. Estos cDNAs fueron usados para el desarrollo de herramientas genómicas que permiten abordar problemas biológicos en cítricos. Los clones aportados durante el trabajo de esta tesis para la construcción de la micromatriz de cítricos (CFGF; Forment *et al.*, 2005; Martínez-Godoy *et al.*, 2008), no sólo pueden ser útiles para estudios de efectos del frío (Establés, 2008; esta tesis), sino también el de otros estreses (Brumos *et al.*, 2009; Gimeno *et al.*, 2009) y el de procesos de desarrollo (Agustí *et al.*, 2008; 2009; Huerta *et al.*, 2008; Marques *et al.*, 2009).

El análisis transcriptómico mediante el uso de la tecnología de micromatrices es una poderosa herramienta para identificar genes de respuesta a frío en plantas (Fowler y Thomashow, 2002; Seki *et al.*, 2002; Hannah *et al.*, 2005). En el trabajo de esta tesis se ha comparado a nivel transcriptómico el comportamiento postcosecha en frío de las citadas mandarinas resistentes, con el de frutos de la variedad sensible F. En esta comparación no se pretendió tanto la identificación de genes tempranos de respuesta al frío, ya que a tiempos largos resulta difícil establecer un buen control que permita distinguir la respuesta al frío en postcosecha. En un futuro se podría emplear como control temporal muestras almacenadas a 12°C, ya que estas condiciones permiten ralentizar la senescencia y en cambio los frutos no experimentan DF en las variedades empleadas (Pons *et al.*, 2004), lo que nos permitiría tener un nivel adicional de comprensión de los cambios transcripcionales asociados a cada proceso. En cambio, el análisis realizado sí que nos ha permitido identificar numerosas diferencias a nivel de expresión génica entre ambas variedades de mandarinas. Más aún, hemos podido identificar que a nivel transcripcional existen diferencias que son detectables incluso antes del tratamiento de estrés, como otras que sólo se producen durante la postcosecha en frío. En ambos casos las diferencias observadas a nivel transcripcional pueden relacionarse con la diferente sensibilidad y respuesta fisiopatológica al frío que observan las dos variedades estudiadas.

Los resultados aportados por esta tesis revelan que previamente a la exposición a las bajas temperaturas los frutos de la variedad tolerante CN muestran mayores niveles de expresión para un amplio grupo de genes potencialmente relacionados con resistencia/tolerancia. Entre estos genes se encuentran varios de respuesta a estrés abiótico y biótico. Una serie de genes del metabolismo secundario también se encuentran más expresados específicamente en los frutos CN recién traído de campo como genes de biosíntesis de terpenos (*subunidad pequeña de geranil difosfato sintasa*, *aCL960Contig1*, precursor del geranilgeranil bifosfato; y *terpeno sintasa*, *aCL4874Contig1*) y genes de biosíntesis de polifenoles (una *orcinol-OMT*, *aCL3052Contig1*, y un *citocromo P450 tipo CASS hidroxilasa*, *aCL627Contig1K*). Entre los genes con mayor expresión en CN previamente a la exposición al frío, llama la atención un sensor de calcio *EF-hand*, *aCL26Contig9*, que podría participar en el establecimiento del mecanismo de tolerancia al frío en CN.

Las diferencias de expresión previas a la exposición a bajas temperaturas pueden ser una de las causas de la tolerancia al frío de las mandarinas de CN (mecanismo preformado). En ese sentido, se han publicado otros casos de resistencia diferencial a estrés abiótico donde las plantas tolerantes presentan mayor expresión de genes de resistencia incluso en condiciones que no suponen estrés. Este es el caso entre *Thellungiella halina* y *Arabidopsis thaliana*, que son filogenéticamente próximas, aunque *T. halina* es mucho más resistente a frío, salinidad y sequía (Amtmann, 2009). Estudios transcriptómicos comparativos muestran que en condiciones de no estrés *T. halina* tiene mayor expresión de genes de tolerancia que *Arabidopsis*, que en cambio responde incrementando la expresión de genes de resistencia a dosis más bajas de estrés que *T. halina* (Taji *et al.*, 2004; Gong *et al.*, 2005). Además, hay resultados que indican que algunas de estas diferencias de expresión entre estas dos Brassicaceae ocasionan cambios metabólicos, como la acumulación de prolina, que es mayor en *T. halina* incluso en ausencia de estrés (Kant *et al.*, 2006). Otro caso en el que la resistencia al frío se adopta previamente a la exposición al estrés sería el de los brotes latentes de *Gentiana triflora*, en los que se expresan genes de respuesta a estrés anteriormente a la bajada de temperatura del otoño/invierno y de manera diferencial respecto a un mutante sensible al frío (Takahashi *et al.*, 2006). Sin embargo, en el caso entre CN y F, dadas las condiciones experimentales de campo, no podemos asegurar que estas diferencias de expresión sean debidas exclusivamente a las variedades, ya que cabe la posibilidad que se deban al resultado de las diferentes condiciones ambientales en el momento de recolección de los frutos. Habría sido interesante haber podido llevar a cabo el

experimento bajo condiciones controladas para poder analizar más ciertamente las diferencias interespecíficas, pero ello es técnicamente difícil y las dos variedades producen frutos que alcanzan la madurez en diferentes épocas del año (<http://www.ivia.es/sdta/pdf/cuadernos/varcitricos.pdf>).

El hecho que en F se identificase un mayor número de genes con cambios de expresión tras el tratamiento de bajas temperaturas que en CN podría venir dado por factores técnicos en lugar de biológicos, aunque este hecho apoya la idea que CN no necesita cambiar su estado inicial para hacer frente al frío o ya lo había hecho en campo. Los análisis transcriptómicos realizados en esta tesis revelan que el mayor número de genes con cambios significativos en F incluye cambios potencialmente implicados con respuesta de defensa frente al estrés, y por otra parte, de genes potencialmente relacionados con el síndrome del daño. Sin embargo, el hecho de encontrar la activación de un programa de respuesta a estrés más amplio en F que en CN también apunta a que realmente CN está preparada para soportar el estrés antes de someterse al mismo y no necesita responder de la manera que sí parece hacerlo F. En el programa de respuesta a estrés activado específica o más acusadamente en F se destacaron elementos de defensa frente al estrés oxidativo, como varias *GST*, genes específicos de la respuesta al estrés por bajas temperaturas como *COR15* y varias *ácido graso desaturasa*, genes de respuesta general a estrés como un amplio grupo de *metalotioninas* y *miraculinas*, etc. Con el mismo perfil pero con una respuesta más exagerada en F se encuentran varios factores de transcripción que podrían participar en la promoción de esta respuesta, incluyendo un gen similar *AtXERICO*, y también una quinasa similar a *AtPK19*.

Un análisis de la respuesta transcriptómica rápida al frío en la variedad tolerante CN mostró que ésta parece ser prácticamente inexistente. En este sentido, sería interesante analizar la respuesta rápida al frío en F, para contrastar la idea de que la variedad sensible al frío sí activa respuestas defensivas específicas, pese a que finalmente no resulten efectivas para evitar el desarrollo de daños. Tampoco se puede descartar por completo la posibilidad que no se haya identificado una respuesta rápida al frío en CN debido a la ausencia en la micromatriz de los genes que participan en la misma, ya que en las genotecas desarrolladas para la obtención de los ESTs impresos en la micromatriz no se incluyeron muestras sometidas a menos de cuatro horas de estrés abiótico. A las 24 h de exposición al frío sí empezamos a detectar cambios de expresión en el flavedo de CN. Estos resultados concuerdan en cierta medida con los descritos en plántulas de *Arabidopsis*, donde la mayoría de cambios transcriptómicos

de respuesta al frío ocurren a las 24 h (Lee *et al.* 2005). En *Arabidopsis* se propone que este retraso en la respuesta al estrés podría ser debido a la inhibición inicial del metabolismo, asociada a la reducción de actividad enzimática causada por las bajas temperaturas (Lee *et al.* 2005). Sin embargo, los genes *CBF* sí se inducen a los pocos minutos de exposición al frío en *Arabidopsis*, pese a que el regulón de defensa aparezca inducido con bastantes horas de retraso (Stockinger *et al.*, 1997; Gilmour *et al.* 1998, Liu *et al.*, 1998).

Posteriormente a la impresión de la micromatriz utilizada (Forment *et al.*, 2005), en el CFGP se aislaron y secuenciaron genes homólogos de los factores de transcripción CBF. Sería interesante realizar algún experimento de expresión de CBFs, RT-qPCR, a lo largo de la serie temporal analizada en CN y F para identificar si existen cambios intravarietales en la expresión de los mismos. Con esto también podríamos ver si en frutos cítricos se dan respuestas rápidas a la exposición al frío. En *Arabidopsis* los CBFs se activan rápidamente, 15 minutos después de la exposición (Stockinger *et al.*, 1997; Gilmour *et al.* 1998, Liu *et al.*, 1998) y seguidamente se activa el conjunto de genes de respuesta que inducirían los genes de tolerancia. Es posible que incluso también se active esta cascada en F y por eso hay mayor número de cambios en la expresión génica, aunque lo haría de forma infructuosa al menos en cuanto a la componente de *pitting* del daño por frío. En tomate, planta y fruto sensibles al frío, también se activa el regulón CBF en respuesta al frío, pero lo hace de diferente forma que en *Arabidopsis* y de manera ineficaz (Zhang *et al.*, 2004b).

Por otra parte, cabe pensar que diferencias histológicas/morfológicas o de estructura de la cutícula entre CN y F podrían ser responsables de la diferente tolerancia al frío (Vercher *et al.*, 1994; Sala, 2000; Sanchez-Ballesta *et al.*, 2004), independientemente de las diferencias de expresión previa o posterior a la exposición al frío. Sin embargo, el hecho que la aclimatación sea capaz de prevenir los DF en F (Schirra y Mulas, 1995; Zaragoza *et al.*, 1996; Lafuente *et al.*, 1997), indica que las mandarinas de F son capaces de activar respuestas que le confieren tolerancia independientemente de su estructura tisular (con la salvedad de que los tratamientos térmicos cambien, por ejemplo, la estructura de la cutícula/o ceras epicuticulares). No obstante, el curado a 37°C de mandarinas F supone la activación de genes de respuesta a estrés (varias *quitinasa*, *COR12*, *COR15*, *LEA5*, factores de transcripción *NAC*, *WRKY*, etc.), y la mayor expresión de estos genes correlaciona con la prevención del DF (Sanchez-Ballesta *et al.*, 2003, 2004; Establés, 2008). De hecho, algunos de los genes inducidos durante el curado por calor en F como *LEA5*, se

inducen también tras 20 d de sometimiento a frío en mandarinas no curadas (Sanchez-Ballesta *et al.*, 2003; Establés, 2008). Teniendo en cuenta esto, sería interesante hacer estudios dirigidos para comprobar si el transcriptoma del flavedo de F después de tratamientos de aclimatación es más similar al de CN no sometido a estrés.

A pesar que la respuesta de estrés al frío parezca mayor en F, también se identificó una parte de la respuesta en CN más acusada, y ésta podría relacionarse con su tolerancia. Entre los procesos que podrían favorecer la tolerancia de CN estaría su mayor activación de la degradación de ácidos grasos que proporcionaría una forma adicional de obtención de energía por parte de las células en CN (Goepfert y Poirier, 2007), o más bien como moléculas señalizadoras derivadas de fosfolípidos (Xue *et al.*, 2009) (Fig. 4). La activación de genes de movilización de almidón y acumulación de azúcares en CN también podrían favorecer su tolerancia, como ocurre en las naranjas tolerantes al frío Pinalate (Holland *et al.*, 2005) y garbanzos tolerantes (Kaur *et al.*, 2009). Las diferencias de expresión entre CN y F también apuntan a una tasa neta de glucólisis mayor en CN que en F, lo cual también podría ser importante para la obtención de energía en las condiciones del almacenamiento. Con este perfil de expresión, niveles superiores en CN que en F, se identificaron algunos reguladores relacionados con señalización, incluyendo el factor de transcripción *MYB92* y el gen de respuesta a ABA, *ABI3*, además de genes de respuesta a estrés abiótico, incluyendo chaperonas. Es destacable el hecho que se hallase el gen *Two-component response regulator-like APRR5, aCL4006Contig2*, inducido específicamente en F. En *Arabidopsis*, la represión de genes *APRR* induce la expresión de genes de tolerancia a estrés por bajas temperaturas, incluyendo *DREB1/CBF*, con una oscilación circadiana (Nakamichi *et al.*, 2009). Según esto, la mayor inducción de *PPR5* por frío en F podría ser una de las causas de su deficiente respuesta de tolerancia al estrés. No obstante, es difícil establecer relaciones causa efecto en todos estos casos, y sería necesario hacer más experimentos (por ejemplo, analizando otras variedades, generando mutantes o transgénicas) para definir mejor la participación de esos genes en los mecanismos propuestos de tolerancia/sensibilidad o de desarrollo de los síntomas de DF.

Por último, se identificó un grupo de genes potencialmente relacionados con el DF por su inducción en F en paralelo con el agravamiento de los síntomas de DF. Es probable que los productos de algunos de estos genes estén intentando paliar procesos lesivos que se puedan estar produciendo como en el caso de genes de respuesta a estrés oxidativo, principalmente *GSTs*, proteínas LEA o algunos

transportadores de membrana. Con este perfil de asociación al daño por frío, también se hallaron algunos genes de biosíntesis de fenilpropanoides que podrían formar parte de ligninas o suberinas. Como posibles reguladores de esta respuesta al daño podrían estar implicados dos factores de transcripción *WRKY* y un *AREB1*. Sería interesante analizar con más detalle la expresión de estos genes entre zonas necróticas y sanas del flavedo de frutos F almacenados a 2°C, en tejido sano de frutos acondicionados posteriormente expuestos a 2°C, y en tejido sano de frutos control almacenados a 12°C, para averiguar si realmente están asociados al daño o no.

En definitiva, en esta tesis se aportan pistas acerca de las posibles bases de la diferente sensibilidad al frío entre CN y F. A partir de toda esta información, se podrían desarrollar diferentes actividades para testar algunas de las hipótesis que se ha ido señalando.

CONCLUSIONES

1. La colección de ESTs, derivada de la genoteca de cDNA FlavFr1 (correspondiente al flavedo de frutos cítricos almacenados en frío) y la obtención de la secuencia para un buen número de ellos proporciona un valioso recurso para la comunidad científica, sobre todo por su grado de novedad de secuencias.

2. La micromatriz de primera generación generada en el Proyecto de Genómica Funcional de Cítricos incluye un porcentaje elevado de clones de la genoteca de frío, y ha demostrado ser útil, entre otros, para el análisis de expresión de la respuesta al almacenamiento en frío y su dependencia varietal.

3. Los frutos de las variedades Clemenules y Fortune presentan diferencias en el transcriptoma de sus flavedos que permiten plantear hipótesis para explicar su distinta sensibilidad al frío. En ambas variedades se activa un programa de respuesta a condiciones de estrés cuando los frutos son almacenados a bajas temperaturas, pero que presenta diferencias específicas entre variedades. Dicho programa no resulta efectivo en Fortune debido probablemente a que opera sobre un programa molecular previo que resulta menos adecuado que en el caso de Clemenules. Por otra parte, los cambios de expresión de un amplio conjunto de genes identificados en este estudio están relacionados con el desarrollo de los daños por frío en la variedad sensible F.

4. Estos resultados transcriptómicos aportan una base de conocimientos que permiten dirigir nuevas líneas de investigación para definir con mayor precisión los elementos clave de la diferente sensibilidad al frío que presentan las mandarinas Clemenules y Fortune, y dirigir programas de mejora o de actuación en diferentes tecnologías postcosecha que permitan disminuir la incidencia de los DF.

BIBLIOGRAFÍA

- Ablett E, Seaton G, Scott K, Shelton D, Graham MW, Baverstock P, Lee LS, Henry R** (2000) Analysis of grape ESTs: global gene expression patterns in leaf and berry. *Plant Science* 159: 87-95.
- Adham AR, Zolman BK, Millius A, Bartel B** (2005). Mutations in *Arabidopsis* acyl-CoA oxidase genes reveal distinct and overlapping roles in β -oxidation. *Plant J* .41(6): 859-874.
- Adomas A, Eklund M, Johansson M, Asiegbu FO** (2006) Identification and analysis of differentially expressed cDNAs during nonself-competitive interaction between *Phlebiopsis gigantea* and *Heterobasidion parviporum*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 57(1): 26-39.
- Adomas A, Heller G, Li G, Olson A, Chu TM, Osborne J, Craig D, van Zyl L, Wolfinger R, Sederoff R, Dean RA, Stenlid J, Finlay R, Asiegbu FO** (2007) Transcript profiling of a conifer pathosystem: response of *Pinus sylvestris* root tissues to pathogen (*Heterobasidion annosum*) invasion. *Tree Physiol.* 27(10): 1441-1458.
- Afitlhile MM, Fukushige H, Nishimura M, Hildebrand DF** (2005) A defect in glyoxysomal fatty acid beta-oxidation reduces jasmonic acid accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology Biochem.* 43(6): 603-609.
- Agarwal M, Hao Y, Kapoor A, Dong CH, Fujii H, Zheng X, y Zhu JK** (2006) A R2R3 type MYB transcription factor is involved in the cold regulation of CBF genes and in acquired freezing tolerance. *J. Biol. Chem.* 281: 37636–37645.
- Agustí M** (2000) Citricultura. *Mundi Prensa. Madrid.* pp 420.
- Agustí J, Merelo P, Cercós M, Tadeo FR, Talón M** (2008) Ethylene-induced differential gene expression during abscission of *Citrus* leaves. *J. Exp. Bot.* 59(10): 2717-2733.
- Agustí J, Merelo P, Cercós M, Tadeo FR, Talón M** (2009) Comparative transcriptional survey between laser-microdissected cells from laminar abscission zone and petiolar cortical tissue during ethylene-promoted abscission in *Citrus* leaves. *BMC Plant Biol.* 9: 127.
- Aharoni A, Giri AP, Verstappen FW, Berteaux CM, Sevenier R, Sun Z, Jongsma MA, Schwab W, Bouwmeester HJ** (2004) Gain and loss of fruit flavour compounds produced by wild and cultivated strawberry species. *Plant Cell* 16: 3110-3131.
- Ainsworth EA, Rogers A, Vodkin LO, Walter A, Schurr U** (2006) The effects of elevated CO₂ concentration on soybean gene expression. An analysis of growing and mature leaves. *Plant Physiology* 142: 135-147.
- Alba R, Fei Z, Payton P, Liu Y, Moore SL, Debbie P, Cohn J, D'Ascenzo M, Gordon JS, Rose JK, Martin G, Tanksley SD, Bouzayen M, Jahn MM, Giovannoni J** (2004) ESTs, cDNA microarrays, and gene expression profiling: tools for dissecting plant physiology and development. *Plant J.* 39: 697-714.

- Alba R, Payton P, Fei Z, McQuinn R, Debbie P, Martin GB, Tanksley SD, Giovannoni JJ** (2005) Transcriptome and selected metabolite analyses reveal multiple points of ethylene control during tomato fruit development. *Plant Cell* 17(11): 2954-65.
- Alberdi M, Corcuera LJ** (1991) Cold acclimation in plants. *Phytochemistry* 30: 3177-3184.
- Alcázar R, Marco F, Cuevas JC, Patron M, Ferrando A, Carrasco P, Tiburcio AF, Altabella T** (2006) Involvement of polyamines in plant response to abiotic stress. *Biotechnol. Lett.* 28: 1867–1876.
- Alexandre J, Lasalle JP, Kado RT** (1990) Opening of Ca²⁺-channels in isolated red beet vacuole membrane by inositol-1, 4, 5-triphosphate. *Nature* 343: 567–570.
- Alexandrov NN, Troukhan ME, Brover VV, Tatarinova T, Flavell RB, Feldmann KA** (2006) Features of *Arabidopsis* genes and genome discovered using full-length cDNAs. *Plant Mol. Biol.* 60: 69-85.
- Alferez F, Sala JM, Sanchez-Ballesta MT, Mulas M, Lafuente MT, Zacarias L** (2005a) A comparative study of the postharvest performance of an ABA-deficient mutant of oranges I. Physiological end quality aspects. *Postharvest Biol. Technol.* 37: 222-231.
- Alferez F, Zacarias L, Burns JK** (2005b) Low relative humidity at harvest and before storage at high humidity influence the severity of postharvest peel pitting in *Citrus*. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 130(2): 225-231.
- Allen DJ, Ort DR** (2001) Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants. *Trends in Plant Science* 6: 36-42.
- Almela V, Agustí M, Juan M** (1992a) El picado del fruto de la mandarina Fortune. Descripción de la alteración y factores que lo influyen. *Levante Agrícola* 319: 80-86.
- Almela V, Agustí M, Pons J** (1992b) Rind spots in Fortune mandarin. Origin and control. *Physiologia Plantarum* 85: A60 (Abstract).
- Almeras E, Stolz S, Vollenweider S, Reymond P, Mene-Saffrane L, Farmer EE** (2003) Reactive electrophile species activate defense gene expression in *Arabidopsis*. *Plant J.* 34: 205–216.
- Alonso JM, Granell A** (1995) A putative vacuolar processing protease is regulated by ethylene and also during fruit ripening in *Citrus* fruit. *Plant Physiology* 109(2): 541-547.
- Alós E, Roca M, Iglesias DJ, Mínguez-Mosquera MI, Damasceno CM, Thannhauser TW, Rose JK, Talón M, Cercós M** (2008) An evaluation of the basis and consequences of a stay-green mutation in the navel negra *Citrus* mutant using transcriptomic and proteomic profiling and metabolite analysis. *Plant Physiology* 147(3): 1300-1315.
- Alscher RG** (2006) Biosynthesis and antioxidant function of glutathione in plants. *Physiologia Plantarum* 77(3): 457–464.
- Al-Shahrour F, Díaz-Uriarte R, Dopazo J** (2004) FatiGO: a web tool for finding significant associations of Gene Ontology terms with groups of genes. *Bioinformatics* 20: 578-580.
- Al-Shahrour F, Mínguez P, Vaquerizas JM, Conde L, Dopazo J** (2005) BABELOMICS: a suite of web tools for functional annotation and analysis of groups of genes in high-throughput experiments. *Nucleic Acids Res.* 33 (Web Server issue): W460-4.

- Al-Shahrour F, Minguez P, Tárraga J, Montaner D, Alloza E, Vaquerizas JM, Conde L, Blaschke C, Vera J, Dopazo J** (2006) BABELOMICS: a systems biology perspective in the functional annotation of genome-scale experiments. *Nucleic Acids Res.* 34 (Web Server issue): W472-6.
- Amtmann A** (2009) Learning from evolution: Thellungiella generates new knowledge on essential and critical components of abiotic stress tolerance in plants. *Mol Plant.* 2(1): 3-12.
- Ancillo G, Gadea J, Forment J, GFuerri J, Navarro L** (2007) Class prediction of closely related plant varieties using gene expression profiling. *J. Exp. Bot.* 58: 1927-1933.
- Antikainen M, Pikhakaski S** (1993) Cold-induced changes in the polysome pattern and protein synthesis in winter rye (*Secale cereale*) leaves. *Physiol. Plant.* 89: 111-116.
- Aparicio G, Götz S, Conesa A, Segrelles D, Blanquer I, García JM, Hernandez V, Robles M, Talon M** (2006) Blast2GO goes grid: developing a grid-enabled prototype for functional genomics analysis. *Stud Health Technol Inform.* 120: 194-204.
- Apel K, Hirt H** (2004) Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55: 373-399.
- Armstrong RN** (1997) Structure, Catalytic Mechanism, and Evolution of the Glutathione Transferases. *Chem. Res. Toxicol.* 10(1): 2-18.
- Artes F** (1995a) Innovaciones en los tratamientos físicos modulados para preservar la calidad de los productos hortofrutícolas en la postrecolección. I. Pretratamientos térmicos. *Rev. Esp. Ciencia Tecnol. Alim.* 35: 45-64, 139-149, 247-269.
- Artes F** (1995b) Innovaciones en los tratamientos físicos modulados para preservar la calidad de los productos hortofrutícolas en la postrecolección. II. Tratamientos térmicos cíclicos. *Rev. Esp. Ciencia Tecnol. Alim.* 35: 139-149.
- Artes F** (1999) Nuevas tendencias en la postrecolección del tomate fresco. *Alimentación, Equipos y Tecnología* 5: 143-151.
- Artes F** (2000) Tratamientos alternativos para preservar mejor la calidad de los cítricos refrigerados. *Levante Agrícola* 352: 229-238.
- Artes F, Tudel JA, Villaescusa R** (2000) Thermal postharvest treatments for improving pomegranate quality and shelf life. *Postharvest Biol. Technol.* 245-251.
- Artes F, Artes-Hernandez F** (2003) Daños por frío en la postrecolección de frutas y hortalizas. *Avances en Ciencias y Técnicas del Frío-1*. Editores: A López, A Esnoz y F Artes. Edit: UPCT y SECYTEF: 299-310.
- Artus NN, Uemura M, Steponkus PL, Gilmour SJ, Lin CT, Thomashow MF** (1996) Constitutive expression of the cold-regulated *Arabidopsis thaliana* COR15a gene affects both chloroplast and protoplast freezing tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 13404-13409.

- Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G (2000) Gene ontology: tool for the unification of biology. *The Gene Ontology Consortium. Nat. Genet.* 25(1): 25-29.
- Audic S, Claverie JM (1997) The significance of digital gene expression profiles. *Genome Res.* 7: 986-995.
- Aung LH, Houck LG, Norman SM (1991) The abscisic acid content of *Citrus* with special reference to lemon. *J. Exper. Bot.* 42: 1083-1088.
- Azoulay Shemer T, Harpaz-Saad S, Belausov E, Lovat N, Krokhin O, Spicer V, Standing KG, Goldschmidt EE, Eyal Y (2008) *Citrus* chlorophyllase dynamics at ethylene-induced fruit color-break: a study of chlorophyllase expression, posttranslational processing kinetics, and in situ intracellular localization. *Plant Physiology* 148(1): 108-118.
- Baig MN, Yu A, Guo W, Deng X (2009) Construction and characterization of two *Citrus* BAC libraries and identification of clones containing the phytoene synthase gene. *Genome* 52(5): 484-489.
- Bailey-Serres J (1999) Selective translation of cytoplasmic mRNAs in plants. *Trends Plant Sci.* 4(4): 142-148.
- Balandin T, Castresana C (1997) Silencing of a beta-1,3-glucanase transgene is overcome during seed formation. *Plant molecular biology* 34(1): 125-137.
- Bargmann BO, Munnik T (2006) The role of phospholipase D in plant stress response. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9(5): 515-522.
- Bassene JB, Froelicher Y, Dubois C, Ferrer RM, Navarro L, Ollitrault P, Ancillo G (2009) Non-additive gene regulation in a *Citrus* allotetraploid somatic hybrid between *C. reticulata* Blanco and *C. limon* (L.) Burm. *Heredity*.
- Battaglia M, Olvera-Carrillo Y, Garcarrubio A, Campos F, Covarrubias AA (2008) The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant Physiology* 148(1): 6-24.
- Baudouin E, Charpentreau M, Roby D, Marco Y, Ranjeva R, Ranty B (1997) Functional expression of a tobacco gene related to the serine hydrolase family -- esterase activity towards short-chain dinitrophenyl acylesters. *Eur. J. Biochem.* 248(3): 700-706.
- Bausher M, Shatters R, Chaparro J, Dang P, Hunter W, Niedz R (2003) An expressed sequence tag (EST) set from *Citrus sinensis* L. Osbeck whole seedlings and the implications of further perennial source investigations. *Plant Science* 165(2): 415-422.
- Bellafiore S, Barneche F, Peltier G, Rochaix JD (2005) State transitions and light adaptation require chloroplast thylakoid protein kinase STN7. *Nature* 433(7028): 892-895.
- Ben-Amor M, Flores F, Latché A, Bouzayen M, Pech JC, Romojaro F (1999) Inhibition of ethylene biosynthesis by antisense ACC oxidase RNA prevents chilling injury in Charentais cantaloupe melons. *Plant Cell Environ.* 22: 1579-1586.

- Benavente LM, Alonso JM** (2006) Molecular mechanisms of ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Mol. Biosyst.* 2(3-4):165-173.
- Benedict C, Geisler M, Trygg J, Huner N, Hurry V** (2006) Consensus by democracy. Using meta-analyses of microarray and genomic data to model the cold acclimation signaling pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 141(4): 1219-1232.
- Benjamini Y, Hochberg Y** (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Statist. Soc.* 57: 289-300.
- Ben-Yehoshua S, Barak E, Shapiro B** (1987) Postharvest curing at high temperatures reduces decay of individually sealed lemons, pomelos and other *Citrus* fruits. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 112: 658-663.
- Berger IJ, Freitas-Astúa J, Reis MS, Targon ML PN, Machado MA** (2007) In silico prediction of gene expression patterns in *Citrus* flavedo. *Genetics and Molecular Biology* 30(3 suppl): 752-760.
- Berna A, Bernier F** (1999) Regulation by biotic and abiotic stress of a wheat germin gene encoding oxalate oxidase, a H₂O₂-producing enzyme. *Plant. Mol. Biol.* 39(3): 539-549.
- Bevan M, Bancroft I, Bent E, Love K, Goodman H, Dean C, Bergkamp R, Dirkse W, Van Staveren M, Stiekema W, Drost L, Ridley P, Hudson SA, Patel K, Murphy G, Piffanelli P, Wedler H, Wedler E, Wambutt R, Weitzenegger T, Pohl TM, Terry N, Gielen J, Villarroel R, De Clerck R, Van Montagu M, Lecharny A, Auborg S, Gy I, Kreis M, Lao N, Kavanagh T, Hempel S, Kotter P, Entian KD, Rieger M, Schaeffer M, Funk B, Mueller-Auer S, Silvey M, James R, Montfort A, Pons A, Puigdomenech P, Douka A, Voukelatou E, Milioni D, Hatzopoulos P, Piravandi E, Obermaier B, Hilbert H, Düsterhöft A, Moores T, Jones JD, Eneva T, Palme K, Benes V, Rechman S, Ansorge W, Cooke R, Berger C, Delseny M, Voet M, Volckaert G, Mewes HW, Klosterman S, Schueller C, Chalwatzis N** (1998) Analysis of 1.9 Mb of contiguous sequence from chromosome 4 of *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 391(6666): 485-488.
- Bézier A, Lambert B, Baillieul F** (2002) Cloning of a grapevine Botrytis-responsive gene that has homology to the tobacco hypersensitivity-related hsr203J. *J. Exp. Bot.* 53(378): 2279-2280.
- Biezen EA van der, Jones JDG** (1998) The NB-ARC domain: a novel signalling motif shared by plant resistance gene products and regulators of cell death in animals. *Curr. Biol.* 8(7): R226- R227.
- Bonaldo MF, Lennon G, Soares MB** (1996) Normalization and subtraction: two approaches to facilitate gene discovery. *Genome Res.* 6: 791-806.
- Botelho-Junior S, Siqueira-Júnior CL, Jardim BC, Machado OL, Neves-Ferreira AG, Perales J, Jacinto T** (2008) Trypsin inhibitors in passion fruit (*Passiflora f. edulis* flavicarpa) leaves: accumulation in response to methyl jasmonate, mechanical wounding, and herbivory. *J. Agric. Food Chem.* 56(20): 9404-9409.

- Bouche N, Scharlat A, Snedden W, Bouchez D, Fromm H** (2002) A novel family of calmodulin-binding transcription activators in multicellular organisms. *J. Biol. Chem.* 277: 21851–21861.
- Bramlage WJ** (1982) CI of crops of temperature origin. *HortScience* 17(2): 165-168.
- Brown DM, Zeef LA, Ellis J, Goodacre R, Turner SR** (2005) Identification of novel genes in *Arabidopsis* involved in secondary cell wall formation using expression profiling and reverse genetics. *Plant Cell* 17: 2281-2295.
- Brown PO, Botstein D** (1999) Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nat. Genet.* 21(1 Suppl): 33-37.
- Brumos J, Colmenero-Flores JM, Conesa A, Izquierdo P, Sánchez G, Iglesias DJ, López-Climent MF, Gómez-Cadenas A, Talón M** (2009) Membrane transporters and carbon metabolism implicated in chloride homeostasis differentiate salt stress responses in tolerant and sensitive *Citrus* rootstocks. *Funct. Integr. Genomics* 9(3): 293-309.
- Bueso E, Alejandro S, Carbonell P, Perez-Amador MA, Fayos J, Bellés JM, Rodríguez PL, Serrano R** (2007) The lithium tolerance of the *Arabidopsis* cat2 mutant reveals a cross-talk between oxidative stress and ethylene. *Plant J.* 52(6): 1052-1065.
- Burke MJ, Gusta LV, Quamme HA, Weiser CJ, Li PH** (1976) Freezing and injury in plants. *Annual Review of Plant Physiology* 27: 507-528.
- Cajuste JF, Gonzalez-Candelas L, Veyrat A, Garcia-Breijo FJ, Reig-Arminana J, Lafuente MT** (2010) Epicuticular wax content and morphology as related to ethylene and storage performance of 'Navelate' orange fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 55(1): 29-35.
- Castillo MC, León J** (2008) Expression of the beta-oxidation gene 3-ketoacyl-CoA thiolase 2 (KAT2) is required for the timely onset of natural and dark-induced leaf senescence in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 59(8): 2171-2179.
- Cathala G, Savanret JF, Mendez B, West BL, Karon M, Martial J, Baxter J** (1983) A method for isolation of intact, translationally active ribonucleic acid. *DNA* 2: 324-335.
- Cercós M, Soler G, Iglesias DJ, Gadea J, Forment J, Talón M** (2006) Global analysis of gene expression during development and ripening of *Citrus* fruit flesh. A proposed mechanism for citric Acid utilization. *Plant. Mol. Biol.* 62(4-5): 513-527.
- Chalutz E, Waks J, Schiffmann-Nadel M** (1985) Reducing susceptibility of grapefruit to chilling injury during cold treatment. *HortScience* 20: 226-228.
- Chan CWM, Schorrak LM, Smith RK, Bent AF, Sussman MR** (2003) A cyclic nucleotide-gated ion channel, CNGC2, is crucial for plant development and adaptation to calcium stress. *Plant Physiology* 123: 728–731.
- Chan CWM, Wohlbach DJ, Rodesch MJ, Sussman MR** (2008) Transcriptional changes in response to growth of *Arabidopsis* in high external calcium. *FEBS Lett.* 582: 967–976.
- Chao Q, Rothenberg M, Solano R, Roman G, Terzaghi W, Ecker JR** (1997) Activation of the Ethylene Gas Response Pathway in *Arabidopsis* by the Nuclear Protein ETHYLENE-INSENSITIVE3 and Related Proteins. *Cell* 89: 1133–1144.

- Chen C, Gmitter FG** (2008) *Citrus* EST characterization and integrated genome mapping. In *Plant & Animal Genome XVI Conference. Town & Country Convention Center. San Diego, CA. USA.*
- Chen W, Provart NJ, Glazebrook J, Katagiri F, Chang HS, Eulgem T, Mauch F, Luan S, Zou G, Whitham SA, Budworth PR, Tao Y, Xie Z, Chen X, Lam S, Kreps JA, Harper JF, Si-Ammour A, Mauch-Mani B, Heinlein M, Kobayashi K, Hohn T, Dangl JL, Wang X, Zhu T** (2002) Expression profile matrix of *Arabidopsis* transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. *Plant Cell* 14(3): 559-74.
- Chen X, Shen G, Wang Y, Zheng X, Wang Y** (2007) Identification of *Phytophthora sojae* genes upregulated during the early stage of soybean infection. *FEMS Microbiol. Lett.* 269(2): 280-288.
- Cheng C, Yun KY, Ressom HW, Mohanty B, Bajic VB, Jia Y, Yun SJ, de los Reyes BG** (2007) An early response regulatory cluster induced by low temperature and hydrogen peroxide in seedlings of chilling-tolerant japonica rice. *BMC Genomics* 8: 175.
- Chinnusamy V, Ohta M, Kanrar S, Lee BH, Hong X, Agarwal M, Zhu JK** (2003) ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 17(8): 1043-54.
- Chinnusamy V, Zhu J, Zhu JK** (2007) Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends Plant Sci.* 12(10): 444-51.
- Chinnusamy V, Gong Z, Zhu JK** (2008) Abscisic acid-mediated epigenetic processes in plant development and stress responses. *J. Integr. Plant Biol.* 50(10): 1187-1195.
- Choi DW, Rodriguez EM, Close TJ** (2002) Barley CBF3 gene identification, expression pattern, and map location. *Plant Physiology* 129: 1781-1787.
- Church GM, Gilbert W** (1984) Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81(7): 1991-1995.
- Close TJ** (1997) Dehydrins: a commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiol. Plant* 100: 291-296.
- Close TJ** (2006) Dehydrins: A commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiologia Plantarum* 100(2): 291-296.
- Close TJ, Wanamaker S, Lyon M, Roose ML** (2007) HarvEST: A portable and companion online browser for genome research. In *Plant & Animal Genomes XV Conference. Town & Country Convention Center. San Diego, CA. USA.*
- Clough Clough SJ, Fengler KA, Yu IC, Lippok B, Smith RK Jr, Bent AF** (2000) The *Arabidopsis* *dnd1* "defense, no death" gene encodes a mutated cyclic nucleotide-gated ion channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 9323-9328.
- Conesa A, Götz S, García-Gómez JM, Terol J, Talón M, Robles M** (2005) Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* 21(18): 3674-3676.

- Conesa A, Nueda MJ, Ferrer A, Talón M** (2006) maSigPro: a method to identify significantly differential expression profiles in time-course microarray experiments. *Bioinformatics* 22(9): 1096-1102.
- Cook D, Fowler S, Fiehn O, Thomashow MF** (2004) A prominent role for the CBF cold response pathway in configuring the low-temperature metabolome of *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 15243–15248.
- Couey HM** (1982) Chilling injury of crops of tropical and subtropical origin. *HortScience* 17: 162-165.
- Craig W, Lenzi P, Scotti N, De Palma M, Saggese P, Carbone V, McGrath Curran N, Magee AM, Medgyesy P, Kavanagh TA, Dix PJ, Grillo S, Cardi T** (2008) Transplastomic tobacco plants expressing a fatty acid desaturase gene exhibit altered fatty acid profiles and improved cold tolerance. *Transgenic Res.* 17(5): 769-782.
- Crisosto CH, Mitchell FG, Ju Z** (1999) Susceptibility to chilling injury of peach, nectarine, and plum cultivars grown in California. *HortScience* 34: 1116–1118.
- Crouzet J, Trombik T, Frayse AS, Boutry M** (2006) Organization and function of the plant pleiotropic drug resistance ABC transporter family. *FEBS Lett.* 580(4): 1123-30.
- Cushman JC, Bohnert HJ** (2000) Genomic approaches to plant stress tolerance. *Curr Opin Plant Biol.* 3(2): 117-24.
- D'Aquino S, Piga A, Agablio M, McCollum TG** (1998) Film wrapping delays aging of “Minneola” tangelos under shelf-life conditions. *Postharvest Biol. Technol.*, 14(1): 107-116.
- Da Silva FG, Iandolino A, Al-Kayal F, Bohlman MC, Cushman MA, Lim H, Ergul A, Figueroa R, Kabuloglu EK, Osborne C, Rowe J, Tattersall E, Leslie A, Xu J, Baek J, Cramer GR, Cushman JC, Cook DR** (2005) Characterizing the grape transcriptome. Analysis of expressed sequence tags from multiple *Vitis* species and development of a compendium of gene expression during berry development. *Plant Physiol* 139: 574-597.
- DeLong A** (2006) Switching the flip: protein phosphatase roles in signalling pathways. *Curr Opin Plant Biol* 9: 470–477.
- Doherty CJ, Van Buskirk HA, Myers SJ, Thomashow MF** (2009) Roles for *Arabidopsis* CAMTA Transcription Factors in Cold-Regulated Gene Expression and Freezing Tolerance. *The Plant Cell* 21: 972-984.
- Dong Q, Krois L, Oakley FD, Wang BB, Brendel V** (2005) Comparative EST analyses in plant systems. *Methods Enzymol.* 395: 400-418.
- Dong CH, Agarwal M, Zhang Y, Xie Q, Zhu JK** (2006) The negative regulator of plant cold responses, HOS1, is a RING E3 ligase that mediates the ubiquitination and degradation of ICE1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103(21): 8281-6.
- Dornelas MC, Mazzafera P** (2007) A genomic approach to characterization of the *Citrus* terpene synthase gene family. *Genet. Mol. Biol.* 30(3).
- Dou H** (2004) Effect of coating application on chilling injury of grapefruit cultivars. *HortScience* 39(3): 558-561.

- Douglas SE, Knickle LC, Kimball J, Reith ME** (2007) Comprehensive EST analysis of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*), a commercially relevant aquaculture species. *BMC Genomics* 8: 144.
- Dowd C, Wilson IW, McFadden H** (2004) Gene expression profile changes in cotton root and hypocotyl tissues in response to infection with *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 17(6): 654-667.
- Drolet G, Dumbroff EB, Legg R, Thompson JE** (1986) Radical scavenging properties of polyamines. *Phytochemistry* 25: 367-371
- Dubouzet JG, Sakuma Y, Ito Y, Kasuga M, Dubouzet EG, Miura S, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki Y** (2003) OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought, salt, and cold-responsive gene expression. *Plant J.* 33: 751-763.
- Dykema PE, Sipes PR, Marie A, Biermann BJ, Crowell DN, Randall SK** (1999) A new class of proteins capable of binding transition metals. *Plant Mol. Biol.* 41(1):139-150.
- EI-hilali F, Ait-Oubahou A, Remah A, Akhayat O** (2003) Chilling Injury And Peroxidase Activity Changes In Fortune Mandarin Fruit During Low Temperature Storage *Bulg. J. Plant Physiology* 29(1–2): 44–54
- EI-Otmani M, Coggins CWJR** (1985) Fruit age and growth regulator effects on the quality and structure of the epicuticular wax of 'Washington' navel orange fruit. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 110: 371-378.
- Elyatem SM, Kader AA** (1984) Post-harvest physiology and storage behaviour of pomegranate fruits. *Sci. Hortic.* 24: 287-298.
- Endo T, Shimada T, Fujii H and Omura M** (2006) Cloning and characterization of 5 MADS-box cDNAs isolated from *Citrus* fruit tissue. *Scientia Horticulturae* 109(4): 315-321.
- Ernst D, Schraudner M, Langebartels C, Sandermann H Jr** (1992) Ozone-induced changes of mRNA levels of beta-1,3-glucanase, chitinase and 'pathogenesis-related' protein 1b in tobacco plants. *Plant Mol. Biol.* 20(4): 673-682.
- Establés B** (2008) Tesis doctoral: Estudio transcriptómico de los mecanismos implicados en la tolerancia inducida por el curado al daño de frío y por el etileno al colapso de la corteza en los frutos cítricos.
- Ewing RM, Ben Kahla A, Poirot O, Lopez F, Audic S, Claverie JM** (1999) Large-scale statistical analyses of rice ESTs reveal correlated patterns of gene expression. *Genome Res.* 9(10): 950-959.
- Fahnenstich H, Scarpeci TE, Valle EM, Flugge UI, Maurino VG** (2008a) Generation of Hydrogen Peroxide in Chloroplasts of *Arabidopsis* Overexpressing Glycolate Oxidase as an Inducible System to Study Oxidative Stress. *Plant Physiology* 148: 719–729.
- Fahnenstich H, Flugge UI, Maurino VG** (2008b) *Arabidopsis thaliana* overexpressing glycolate oxidase in chloroplasts H₂O₂-induced changes in primary metabolic pathways. *Plant Signaling & Behavior* 3(12): 1122-1125.
- FatiGO+** (<http://babelomics.bioinfo.cipf.es/cgi-bin/toolos.cgi>)

- Fei Z, Tang X, Alba RM, White JA, Ronning CM, Martin GB, Tanksley SD, Giovannoni JJ** (2004) Comprehensive EST analysis of tomato and comparative genomics of fruit ripening. *The Plant J.* 40: 47–59.
- Fernandez P, Di Rienzo J, Fernandez L, Hopp HE, Paniego N, Heinz RA** (2008) Transcriptomic identification of candidate genes involved in sunflower responses to chilling and salt stresses based on cDNA microarray analysis. *BMC Plant Biology* 8: 11.
- Fernández-Trujillo JP, Artes F** (1997) Keeping quality of cold stored peaches using intermittent warming. *Food Res. Inter.* 30: 441-450.
- Fernández-Trujillo JP, Artes F** (1999) Conservación frigorífica de melocotón bajo propileno perforado y calentamiento intermitente. *Rev. Iberoamer. Tecnol. Postcosecha* 1: 12-15.
- Forment J, Gadea J, Huerta L, Abizanda L, Agusti J, Alamar S, Alós E, Andres F, Arribas R, Beltran JP, Berbel A, Blazquez MA, Brumos J, Canas LA, Cercos M, Colmenero-Flores JM, Conesa A, Establés B, Gandia M, Garcia-Martinez JL, Gimeno J, Gisbert A, Gomez G, Gonzalez-Candelas L, Granell A, Guerri J, Lafuente MT, Madueno F, Marcos JF, Marques MC, Martinez F, Martinez-Godoy MA, Miralles S, Moreno P, Navarro L, Pallas V, Perez-Amador MA, Perez-Valle J, Pons C, Rodrigo I, Rodriguez PL, Royo C, Serrano R, Soler G, Tadeo F, Talon M, Terol J, Trenor M, Vaello L, Vicente O, Vidal Ch, Zacarias L, Conejero V** (2005) Development of a *Citrus* genome-wide EST collection and cDNA microarray as resources for genomic studies. *Plant Mol. Biol.* 57(3): 375-91.
- Forment J, Gilabert F, Robles A, Conejero V, Nuez F, Blanca JM** (2008) EST2uni: an open, parallel tool for automated EST analysis and database creation, with a data mining web interface and microarray expression data integration. *BMC Bioinformatics* 9: 5.
- Fowler S, Thomashow MF** (2002) *Arabidopsis* Transcriptome Profiling Indicates That Multiple Regulatory Pathways Are Activated during Cold Acclimation in Addition to the CBF Cold Response Pathway. *Plant Cell* 14(8): 1675–1690.
- Foyer CH, Vanacker H, Gomez LD, Harbinson J** (2002) Regulation of photosynthesis and antioxidant metabolism in maize leaves at optimal and chilling temperature: review. *Plant Physiology Biochem.* 40: 659-668.
- Francia D, Demaria D, Calderini O, Ferraris L, Valentino D, Arcioni S, Tamietti G, Cardinale F** (2007) Wounding induces resistance to pathogens with different lifestyles in tomato: role of ethylene in cross-protection. *Plant Cell Environ.* 30(11): 1357-65.
- Franke R, Hemm MR, Denault JW, Ruegger MO, Humphreys JM, Chapple C** (2002) Changes in secondary metabolism and deposition of an unusual lignin in the ref8 mutant of *Arabidopsis*. *Plant J.* 30(1): 47-59.
- Froman BE, Edwards PC, Bursch AG, Dehesh K** (2000) ACX3, a novel medium-chain acyl-coenzyme A oxidase from *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 123(2): 733-742.
- Fujii H, Shimada T, Sugiyama A, Nishikawa F, Endo T, Nakano M, Ikoma Y, Shimizu T, Omura M** (2007) Profiling ethylene-responsive genes in mature mandarin fruit using a *Citrus* 22K oligoarray. *Plant Science* 173(3): 340-348.

- Fung RW, Wang CY, Smith DL, Gross KC, Tao Y, Tian M** (2006) Characterization of alternative oxidase (AOX) gene expression in response to methyl salicylate and methyl jasmonate pre-treatment and low temperature in tomatoes. *J Plant Physiology* 163(10): 1049-1060.
- Furihata T, Maruyama K, Fujita Y, Umezawa T, Yoshida R, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2006) Abscisic acid-dependent multisite phosphorylation regulates the activity of a transcription activator AREB1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103(6): 1988-1993.
- Furr JR** (1964) New tangerines for the desert. *California Citrograph* 49: 266-276.
- Futamura N, Ishiiminami N, Hayashida N, Shinohara K** (1999) Expression of DnaJ homologs and Hsp70 in the Japanese willow (*Salix gilgiana* Seemen). *Plant Cell Physiol.* 40(5): 524-531.
- Gandía M, Conesa A, Ancillo G, Gadea J, Forment J, Pallás V, Flores R, Duran-Vila N, Moreno P, Guerri J** (2007) Transcriptional response of *Citrus aurantifolia* to infection by *Citrus tristeza virus*. *Virology* 367(2): 298-306.
- Gao X, Li ZG, Fan J, Yang YW** (2007) Construction and preliminary analysis of subtractive library for peel pitting of 'Fengjie' navel orange fruit. *Zhi Wu Sheng Li Yu Fen Zi Sheng Wu Xue Xue Bao* 33(1): 71-6.
- Gilmour SJ, Zarka DG, Stockinger EJ, Salazar MP, Houghton JM, Thomashow MF** (1998) Low temperature regulation of the *Arabidopsis* CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression. *Plant J.* 16(4): 433-42.
- Gilroy EM, Hein I, van der Hoorn R, Boevink PC, Venter E, McLellan H, Kaffarnik F, Hrubikova K, Shaw J, Holeva M, Lopez EC, Borrás-Hidalgo O, Pritchard L, Loake GJ, Lacomme C, Birch PRJ** (2007) Involvement of cathepsin B in the plant disease resistance hypersensitive response. *The Plant J.* 52: 1-13.
- Gimeno J, Gadea J, Forment J, Pérez-Valle J, Santiago J, Martínez-Godoy MA, Yenush L, Bellés JM, Brumos J, Colmenero-Flores JM, Talón M, Serrano R** (2009) Shared and novel molecular responses of mandarin to drought. *Plant Mol. Biol.* 70(4): 403-420.
- Gmitter FG Jr, Grosser JW, Castle WS, Moore GA** (2007) A comprehensive *Citrus* genetic improvement programme. *En, ed. I. Ahmad Khan*: 9-18.
- Goepfert S, Poirier Y** (2007) Beta-oxidation in fatty acid degradation and beyond. *Curr Opin Plant Biol.* 10(3): 245-251.
- Goldschmidt EE, Goren R, Even-Chen Z, Bittner S** (1973) Increase in Free and Bound Abscisic Acid during Natural and Ethylene-induced Senescence of *Citrus* Fruit Peel. *Plant Physiology* 51(5): 879-82.
- Gong Q, Li P, Ma S, Indu Rupassara S, Bohnert HJ** (2005) Salinity stress adaptation competence in the extremophile *Thellungiella halophila* in comparison with its relative *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 44(5): 826-839.

- Gong Z, Koiwa H, Cushman MA, Ray A, Bufford D, Kore-eda S, Matsumoto TK, Zhu J, Cushman JC, Bressan RA, Hasegawa PM** (2001) Genes that are uniquely stress regulated in salt overly sensitive (sos) mutants. *Plant Physiology* 126(1): 363-375.
- Gong Z, Lee H, Xiong L, Jagendorf A, Stevenson B, Zhu JK** (2002) RNA helicase-like protein as an early regulator of transcription factors for plant chilling and freezing tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99(17): 11507-11512.
- Gonzalez-Aguilar GA, Zacarias L, Muela M, Lafuente MT** (1997) Temperature and duration of water dips influence chilling injury, decay and polyamine content in Fortune mandarins. *Postharvest Biol. Technol.* 12(1): 61-69.
- Gonzalez-Aguilar GA, Zacarias L, Lafuente MT** (1998) Ripening Affects High-Temperature-Induced Polyamines and Their Changes during Cold Storage of Hybrid Fortune Mandarins. *J. Agric. Food Chem.* 46 (9): 3503–3508.
- Gonzalez-Aguilar GA, Zacarias L, Perez-Amador MA, Carbonell J, Lafuente MT** (2000) Polyamine content and chilling susceptibility are affected by seasonal changes in temperature and by conditioning temperature in cold-stored Fortune mandarin. *Physiologia Plantarum* 108: 140-146.
- Gonzalez-Ibeas D, Blanca J, Roig C, Gonzalez-To M, Picó B, Truniger V, Gómez P, Deleu W, Caño-Delgado A, Arús P, Nuez F, Garcia-Mas J, Puigdomènech P, Aranda MA** (2007) MELOGEN: an EST database for melon functional genomics. *BMC Genomics* 8: 306.
- Gosalbes MJ, Zacarias L, Lafuente MT** (2004) Characterization of the expression of an oxygenase involved in chilling-induced damage in *Citrus* fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 33(3): 219-228.
- Govrin EM, Levine A** (2000) The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Curr. Biol.* 10(13): 751-757.
- Graham D, Patterson BD** (1982) Response of plants to low, non-freezing temperatures: proteins, metabolism and acclimation. *Ann. Rev. Plant Physiology* 33: 347-372.
- Graham IA, Eastmond PJ** (2002) Pathways of straight and branched chain fatty acid catabolism in higher plants. *Progress in Lipid Research* 41: 156–181.
- Grbic V, Bleecker AB** (1995) Ethylene regulates the timing of leaf senescence in *Arabidopsis*. *The Plant J.* 8: 595-602.
- Grierson W** (1986) Physiological disorders. *The Biochemistry of Plants* 7: 577-625.
- Groppa MD, Benavides MP** (2008) Polyamines and abiotic stress: recent advances. *Amino Acids* 34(1): 35-45.
- Gross K, Wang CY, Saltveit ME** (2002) The commercial storage of fruit, vegetables and florist and nursery stocks. *USDA Agr. Hndbk.* 66.
- Grotz N, Fox T, Connolly E, Park W, Guerinot ML, Eide D** (1998) Identification of a family of zinc transporter genes from *Arabidopsis* that respond to zinc deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 7220-7224.

- Guillet G, Poupart J, Basurco J, De Luca V** (2000) Expression of tryptophan decarboxylase and tyrosine decarboxylase genes in tobacco results in altered biochemical and physiological phenotypes. *Plant Physiology* 122(3): 933-943.
- Gulick PJ, Drouin S, Yu Z, Danyluk J, Poisson G, Monroy AF, Sarhan F** (2005) Transcriptome comparison of winter and spring wheat responding to low temperature. *Genome* 48: 913–923.
- Guo JC, Duan RJ, Hu XW, Li KM, Fu SP** (2009) Isopentenyl transferase gene (*ipt*) downstream transcriptionally fused with gene expression improves the growth of transgenic plants. *Transgenic Res.*
- Guy CL** (1990) Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41: 3673-3677.
- Guy CL, Huber JLA, Huber SC** (1992) Sucrose phosphate synthase and sucrose accumulation at low temperature. *Plant Physiology* 100: 502-508.
- Guy C, Kaplan F, Kopka J, Selbig J, Hinch DK** (2008) Metabolomics of temperature stress. *Physiologia Plantarum* 132: 220–235.
- Haake V, Cook D, Riechmann JL, Pineda O, Thomashow MF, Zhang JZ** (2002) Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in Arabidopsis. *Plant Physiology* 130(2): 639-648.
- Hacisalihoglu G, Hart JJ, Kochian LV** (2001) High- and low-affinity zinc transport systems and their possible role in zinc efficiency in bread wheat. *Plant Physiology* 125: 456-63.
- Hale MG, Orcutt DM** (1987) The physiology of plants under stress. *John Wiley & Sons, New York, NY.*
- Hannah MA, Heyer AG, Hinch DK** (2005) A global survey of gene regulation during cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet* 1(2): e26.
- Hansen E, Hartman H** (1937) Effect of ethylene and certain metabolic gases upon respiration and ripening of pears before and after cold storage. *Plant Physiol* 12: 441–454.
- Hardenburg RE, Watada AE, Wang CY** (1988) Almacenamiento comercial de frutas, legumbres y existencias de floristerías y viveros. U.S. Dept. of Agriculture. *Agricultural Handbook No.66. Washington, D.C, U.S.A(Spanish traslation).*
- Hardenburg RE, Watada Ae, Wang CY** (1990) The comercial storage of fruits vegetables and florist and nursery stocks. *Agricultural Handbook 66. Ed. USDA. Washintong: 130.*
- Harris DM, Myrick TL, Rundle SJ** (1999) The *Arabidopsis* homolog of yeast TAP42 and mammalian a4 binds to the catalytic subunit of protein phosphatase 2A and is induced by chilling. *Plant Physiol* 121: 609–617.
- Hays JB** (2002) *Arabidopsis thaliana*, a versatile model system for study of eukaryotic genome-maintenance functions. *DNA Repair* 1: 579–600.
- He L, Nada K, Kasukabe Y, Tachibana S** (2002) Enhanced susceptibility of photosynthesis to low-temperature photoinhibition due to interruption of chill-induced increase of S-adenosylmethionine decarboxylase activity in leaves of spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Plant Cell Physiol.* 43(2): 196-206.

- Hershko A** (1988) Ubiquitin-mediated protein degradation. *J. Biol. Chem.* 263: 15237-15240.
- Hisada S, Moriguchi T, Hidaka T, Koltunow AM, Akihama T, Omura M** (1996) Random sequencing of sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck) cDNA library derived from young seeds. *J. Japan Soc. Hort. Sci.* 65(3): 487-495.
- Hisada S, Akihama T, Endo T, Moriguchi T, Omura M** (1997) Expressed sequence tags of *Citrus* fruit during rapid cell development phase. *Journal of the American Society for Horticultural Science.* 122(6): 808–812.
- Hobson G** (1981) The short term storage of tomato fruit. *J. Hortic. Sci.* 56: 363-368.
- Holaday AS, Martindale W, Alred R, Brooks AL, Leegood RC** (1992) Changes in Activities of Enzymes of Carbon Metabolism in Leaves during Exposure of Plants to Low Temperature. *Plant Physiology* 98(3): 1105-1114.
- Holland N, Sala JM, Menezes HC, Lafuente MT** (1999) Carbohydrate content and metabolism as related to maturity and chilling sensitivity of cv. Fortune mandarins. *J. Agric. Food Chem.* 47: 2513-2518.
- Holland N, Menezes HC, Lafuente MT** (2002) Carbohydrates as related to the heat-induced chilling tolerance and respiratory rate of Fortune mandarin fruit harvested at different maturity stages. *Postharvest Biol. Technol.* 25: 181-191.
- Holland N, Menezes HC, Lafuente MT** (2005) Carbohydrate Metabolism As Related to High-Temperature Conditioning and Peel Disorders Occurring during Storage of *Citrus* Fruit. *J. Agric. Food Chem.* 53(22): 8790-8796.
- Hon WC, Griffith M, Chong P, Yang DSC** (1994) Extraction and isolation of antifreeze proteins from winter rye (*Secale cereale* L.) leaves. *Plant Physiology* 104: 971-980.
- Hon WC, Griffith M, Mlynarz A, Kwok YC, Yang DS** (1995) Antifreeze proteins in winter rye are similar to pathogenesis-related proteins. *Plant Physiology* 109(3):879-89.
- Hsu WJ, DeBenedict C, Lee SD, Poling SM, Yokoyama H** (1989) Preharvest Prevention of Regreening in Valencia Oranges [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. *J. Agric. Food Chem.* 37: 12-14.
- Hu H, You J, Fang Y, Zhu X, Qi Z, Xiong L** (2008) Characterization of transcription factor gene SNAC2 conferring cold and salt tolerance in rice. *Plant Mol. Biol.* 67(1-2): 169-181.
- Huerta L, Forment J, Gadea J, Fagoaga C, Peña L, Pérez-Amador MA, García-Martínez JL** (2008) Gene expression analysis in *Citrus* reveals the role of gibberellins on photosynthesis and stress. *Plant Cell Environ.* 31(11): 1620-1633.
- Huerta L, Garcia-Lor A, Garcia-Martínez JL** (2009) Characterization of gibberellin 20-oxidases in the *Citrus* hybrid Carrizo citrange. *Tree Physiol.* 29(4): 569-577.
- Hurth MA, Suh SJ, Kretschmar T, Geis T, Bregante M, Gambale F, Martinoia E, Neuhaus HE** (2005) Impaired pH homeostasis in *Arabidopsis* lacking the vacuolar dicarboxylate transporter and analysis of carboxylic acid transport across the tonoplast. *Plant Physiology* 137(3): 901-910.

- Hwang EW, Kim KA, Park SC, Jeong MJ, Byun MO, Kwon HB** (2005) Expression profiles of hot pepper (*Capsicum annuum*) genes under cold stress conditions. *J Biosci.* 30(5): 657-67.
- Iba K** (2002) Acclimative response to temperature stress in higher plants: approaches of gene engineering for temperature tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53: 225-45.
- Ichikawa T, Nakazawa M, Kawashima M, Iizumi H, Kuroda H, Kondou Y, Tsuhara Y, Suzuki K, Ishikawa A, Seki M, Fujita M, Motohashi R, Nagata N, Takagi T, Shinozaki K, Matsui M** (2006) The FOX hunting system: an alternative gain-of-function gene hunting technique. *Plant J.* 48(6): 974-985.
- Ide Y, Nagasaki N, Tomioka R, Suito M, Kamiya T, Maeshima M** (2007) Molecular properties of a novel, hydrophilic cation-binding protein associated with the plasma membrane. *J. Exp. Bot.* 58(5): 1173-1183.
- Immink RG, Tonaco IA, de Folter S, Shchennikova A, van Dijk AD, Busscher-Lange J, Borst JW, Angenent GC** (2009) SEPALLATA3: the 'glue' for MADS box transcription factor complex formation. *Genome Biol.* 10(2):R24.
- Ismail MA, Grierson W** (1977) Seasonal susceptibility of grapefruit to chilling injury as modified by certain growth regulators. *HortScience* 12: 118-120.
- Ito Y, Katsura K, Maruyama K, Taji T, Kobayashi M, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2006) Functional analysis of rice DREB1/CBF-type transcription factors involved in cold-responsive gene expression in transgenic rice. *Plant Cell Physiol.* 47(1): 141-153.
- Iuchi S, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao T, Terao T, Shinozaki K** (1996) Novel Drought-Inducible Genes in the Highly Drought-Tolerant Cowpea: Cloning of cDNAs and Analysis of the Expression of the Corresponding Genes. *Plant and Cell Physiology* 37(8): 1073-1082.
- Jackman RL, Yada RY, Marangoni A, Parkin KL, Satnley DW** (1988) Chilling injury. A review of quality aspects. *J. Food Quality* 11: 253-278.
- Jackson PR, Agustí M, Almela V, Juan M** (1992) Tratamientos para mejorar la conservación en el árbol del fruto de la mandarina Fortune. *Levante Agrícola*, 317/318: 16-22.
- Jacob-Wilk D, Goldschmidt EE, Riov J, Sadka A, Holland D** (1997) Induction of a *Citrus* gene highly homologous to plant and yeast thi genes involved in thiamine biosynthesis during natural and ethylene-induced fruit maturation. *Plant Mol. Biol.* 35: 661-666.
- Jaglo KR, Kleff S, Amundsen KL, Zhang X, Haake V, Zhang JZ, Deits T, Thomashow MF** (2001) Components of the *Arabidopsis* C-repeat/dehydration-responsive element binding factor cold-response pathway are conserved in Brassica napus and other plant species. *Plant Physiology* 127 (3): 910-917.
- Jaglo-Ottosen KR, Gilmour SJ, Zarka DG, Schabenberger O, Thomashow MF** (1998) *Arabidopsis* CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. *Science* 280(5360): 104-106.

- Jahn OL, Chace WG Jr, Cubbedge RH** (1969) Degreening of *Citrus* fruits in response to varying levels of oxygen and ethylene. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 94: 123–125.
- Journet EP, van Tuinen D, Gouzy J, Crespeau H, Carreau V, Farmer MJ, Niebel A, Schiex T, Jaillon O, Chatagnier O, Godiard L, Micheli F, Kahn D, Gianinazzi-Pearson V, Gamas P** (2002) Exploring root symbiotic programs in the model legume *Medicago truncatula* using EST analysis. *Nucleic Acids Res.* 30(24): 5579-592.
- Kader AA** (2003) A perspective on postharvest horticulture (1978-2003). *HortScience* 38: 1004-1008.
- Kader AA, Arpaia ML** (2002) Postharvest handling systems: subtropical fruit. Postharvest technology of horticultural crops. Edited by AA Kader. Oakland, CA: Regents of the University of California, Division of Agricultural and Natural Resource: 375-384.
- Kant S, Kant P, Raveh E, Barak S** (2006) Evidence that differential gene expression between the halophyte, *Thellungiella halophila*, and *Arabidopsis thaliana* is responsible for higher levels of the compatible osmolyte proline and tight control of Na⁺ uptake in *T. halophila*. *Plant Cell Environ.* 29(7): 1220-1234.
- Kaplan F, Guy CL** (2004) beta-Amylase induction and the protective role of maltose during temperature shock. *Plant Physiology* 135(3): 1674-1684.
- Kaplan F, Guy CL** (2005) RNA interference of *Arabidopsis* beta-amylase prevents maltose accumulation upon cold shock and increases sensitivity of PSII photochemical efficiency to freezing stress. *Plant J.* 44(5): 730-743.
- Kaplan F, Kopka J, Haskell DW, Zhao W, Schiller KC, Gatzke N, Sung DY, Guy CL** (2004) Exploring the temperature stress metabolome of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 136: 4159–4168.
- Kaplan F, Kopka J, Sung DY, Zhao W, Popp M, Porat R, Guy CL** (2007) Transcript and metabolite profiling during cold acclimation of *Arabidopsis* reveals an intricate relationship of cold-regulated gene expression with modifications in metabolite content. *Plant J.* 50(6): 967-981.
- Kaur S, Gupta AK, Kaur N, Sandhu JS, Gupta SK** (2009) Antioxidative Enzymes and Sucrose Synthase Contribute to Cold Stress Tolerance in Chickpea. *Journal of Agronomy and Crop Science* 195(5): 393-397.
- Kawada K, Wheaton TA, Purvis AC, Grierson W** (1979) Levels of growth regulators and reducing sugars of 'Marsh' grapefruit peel as related to seasonal resistance to chilling injury. *HortScience* 14: 446.
- Kawada K** (1980) Some physiological and biochemical aspects of chilling injury of grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.) with emphasis on growth regulators. *PhD dissertation. University of Florida, FL, USA.*
- Kawaguchi R, Williams AJ, Bray EA, Bailey-Serres J** (2003) Water-deficit-induced translational control in *Nicotiana tabacum*. *Plant, Cell and Environment* 26: 221–229.

- Kawamura Y, Uemura M** (2003) Mass spectrometric approach for identifying putative plasma membrane proteins of *Arabidopsis* leaves associated with cold acclimation. *Plant J.* 36: 141–154.
- Kelling K, Schulte E** (1998) A2523 Soil and Applied Calcium. *Cooperative Extension Publications, University of Wisconsin-Extension: 1–2.*
- Kilian J, Whitehead D, Horak J, Wanke D, Weinl S, Batistic O, D'Angelo C, Bornberg-Bauer E, Kudla J, Harter K** (2007) The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses. *The Plant J.* 50: 347–363.
- Kim S, Kang JY, Cho DI, Park JH, Kim SY** (2004) ABF2, an ABRE-binding bZIP factor, is an essential component of glucose signaling and its overexpression affects multiple stress tolerance. *Plant J.* 40(1): 75-87.
- King AI, Joyce DC, Reid MS** (1988) Role of carbohydrates in diurnal chilling sensitivity of tomato seedlings. *Plant Physiology* 86: 764-768.
- Kinoshita T, Yamada K, Hiraiwa N, Kondo M, Nishimura M, Hara-Nishimura I** (1999) Vacuolar processing enzyme is up-regulated in the lytic vacuoles of vegetative tissues during senescence and under various stressed conditions. *Plant J.* 19(1): 43-53.
- Kitinoja L, Kader AA** (2003) Técnicas de Manejo Postcosecha a pequeña escala: Manual para los Productos Hortofrutícolas. *Serie Horticultura Nº 8. Universidad de California, Davis USA: 260.*
- Knight H, Trewavas AJ, Knight MR** (1996) Cold Calcium Signaling in *Arabidopsis* Involves Two Cellular Pools and a Change in Calcium Signature after Acclimation. *The Plant Cell* 8: 489-503.
- Ko JH, Yang SH, Han KH** (2006) Upregulation of an *Arabidopsis* RING-H2 gene, XERICO, confers drought tolerance through increased abscisic acid biosynthesis. *Plant J.* 47(3): 343-355.
- Kocsy G, Szalai G, Vágújfalvi A, Stéhli L, Orosz G, Galiba G** (2000a) Genetic study of glutathione accumulation during cold hardening in wheat. *Planta* 210(2): 295-301.
- Kocsy G, von Ballmoos P, Suter M, Rügsegger A, Galli U, Szalai G, Galiba G, Brunold C** (2000b) Inhibition of glutathione synthesis reduces chilling tolerance in maize. *Planta* 211(4): 528-36.
- Koike M, Takezawa D, Arakawa K, Yoshida S** (1997) Accumulation of 19-kDa plasma membrane polypeptide during induction of freezing tolerance in wheat suspension-cultured cells by abscisic acid. *Plant Cell Physiol.* 38(6): 707-716.
- Kondo R, Yamagami H, Sakai K** (1993) Xylosylation of Phenolic Hydroxyl Groups of the Monomeric Lignin Model Compounds 4-Methylguaiacol and Vanillyl Alcohol by *Coriolus versicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(2): 438-441.
- Koo AJ, Ohlrogge JB** (2002) The predicted candidates of *Arabidopsis* plastid inner envelope membrane proteins and their expression profiles. *Plant Physiology* 130(2): 823-836.

- Korn M, Peterek S, Mock HP, Heyer AG, Hinch DK** (2008) Heterosis in the freezing tolerance, and sugar and flavonoid contents of crosses between *Arabidopsis thaliana* accessions of widely varying freezing tolerance. *Plant Cell Environ.* 31(6): 813-827.
- Koroleva OA, Calder G, Pendle AF, Kim SH, Lewandowska D, Simpson CG, Jones IM, Brown JW, Shaw PJ** (2009) Dynamic behavior of *Arabidopsis* eIF4A-III, putative core protein of exon junction complex: fast relocation to nucleolus and splicing speckles under hypoxia. *Plant Cell* 21(5): 1592-1606.
- Koussevitzky S, Stanne TM, Peto CA, Giap T, Sjögren LL, Zhao Y, Clarke AK, Chory J** (2007) An *Arabidopsis thaliana* virescent mutant reveals a role for ClpR1 in plastid development. *Plant Mol. Biol.* 63(1): 85-96.
- Kreps JA, Wu Y, Chang HS, Zhu T, Wang X, Harper JF** (2002) Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic, and cold stress. *Plant Physiology* 130: 2129–2141.
- Kudla J, Batistic O, Hashimoto K** (2010) Calcium signals: the lead currency of plant information processing. *Plant Cell* 22(3): 541-563.
- Kumuda CD, Hara PM** (2004) Hydroxyl radical scavenging and singlet oxygen quenching properties of polyamines. *Mol. Cell Biochem.* 262: 127–133.
- Kushad MM, Yelenosky G** (1987) Evaluation of Polyamine and Proline Levels during Low Temperature Acclimation of *Citrus*. *Plant Physiology* 84(3): 692-695.
- Kwon Y, Kim SH, Jung MS, Kim MS, Oh JE, Ju HW, Kim KI, Vierling E, Lee H, Hong SW** (2007) *Arabidopsis* hot2 encodes an endochitinase-like protein that is essential for tolerance to heat, salt and drought stresses. *The Plant J.* 49: 184-193.
- Lafuente MT, Belver A, Guye MG, Saltveit ME** (1991) Effect of Temperature Conditioning on Chilling Injury of Cucumber Cotyledons: Possible Role of Abscisic Acid and Heat Shock Proteins. *Plant Physiology* 95(2): 443-449.
- Lafuente MT, Martinez-Tellez MA, Zacarias L** (1997) Abscisic Acid in the Response of Fortune. Mandarins to Chilling. Effect of Maturity and High-Temperature Conditioning. *J. Sci. Food Agric* 73: 494-502.
- Lafuente MT, Zacarias L, Martinez-Téllez MA, Sanchez-Ballesta MT, Dupille E** (2001) Phenylalanine ammonia-lyase as related to ethylene in the development of chilling symptoms during cold storage of *Citrus* fruits. *J. Agric. Food Chem.* 49: 6020-6025.
- Lafuente MT, Sala JM** (2002) Abscisic acid levels and the influence of ethylene, humidity and storage temperature on the incidence of postharvest rindstaining of Navelina orange (*Citrus sinensis* L.Osbeck) fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 25: 49-57.
- Lafuente MT, Zacarias L, Martinez-Tellez MA, Sanchez-Ballesta MT, Granell A** (2003) Phenylalanine ammonia-lyase and ethylene in relation to chilling injury as affected by fruit age in citrus. *Postharvest Biol. Technol.* 29(3): 309-318.
- Lafuente MT, Sala JM, Zacarias L** (2004) Active oxygen detoxifying enzymes and phenylalanine ammonia-lyase in the ethylene-induced chilling tolerance in *Citrus* fruit. *J. Agric. Food Chem.* 52(11): 3606-3611.

- Lafuente MT, Zacarias L, Sala JM, Sanchaz-Ballesta MT, Gosalbes MJ, Lluch Y, Granel A** (2005) Understanding the basis of chilling injury in *Citrus* fruit. En: *Proceedings 5th International Postharvest symposium, F Mencarelli y P Tonutti (Eds) Acta Horticulturae 682. ISHS: 831-842.*
- Lanahan MB, Yen HC, Giovannoni JJ, Klee HJ** (1994) The *Never ripe* mutation blocks ethylene perception in tomato. *The Plant Cell* 6: 521-530.
- Lane BG, Dunwell JM, Ray JA., Schmitt MR, Cuming AC** (1993) Germin, a Protein Marker of Early Plant Development, Is an Oxalate Oxidase. *The Journal Of Biological Chemistry* 268(17): 12239-12242.
- Lang P, Zhang CK, Ebel RC, Dane F, Dozier WA** (2005) Identification of cold acclimated genes in leaves of *Citrus unshiu* by mRNA differential display. *Gene* 359: 111-118.
- Larrigaudiere C, Vendrell M** (1993) Short-term activation of the conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene in rewarmed Granny Smith apples. *Plant Physiol. Biochem.* 31: 585–591.
- LeClere S, Bartel B** (2001) A library of *Arabidopsis* 35S-cDNA lines for identifying novel mutants. *Plant Mol. Biol.* 46(6): 695-703.
- Lee BH, Henderson DA, Zhua JK** (2005) The *Arabidopsis* Cold-Responsive Transcriptome and Its Regulation by ICE. *The Plant Cell* 17: 3155-3175.
- Lee JM, Williams ME, Tingey SV, Rafalski JA** (2002) DNA array profiling of gene expression changes during maize embryo development. *Funct Integr Genomics* 2(1-2): 13-27.
- Lee SJ, Cho DI, Kang JY, Kim SY** (2009) An ARIA-interacting AP2 domain protein is a novel component of ABA signaling. *Mol. Cells* 27(4): 409-416.
- Lee YP, Yu GH, Seo YS, Han SE, Choi YO, Kim D, Mok IG, Kim WT, Sung SK** (2007) Microarray analysis of apple gene expression engaged in early fruit development. *Plant Cell Rep.* 26(7): 917-926.
- Lehrach H, Diamond D, Wozney JM, Boedtker H** (1977) RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical re-examination. *Biochemistry* 16: 4743-4751.
- Lein W, Usadel B, Stitt M, Reindl A, Ehrhardt T, Sonnewald U, Börnke F** (2008) Large-scale phenotyping of transgenic tobacco plants (*Nicotiana tabacum*) to identify essential leaf functions. *Plant Biotechnol. J.* 6(3): 246-263.
- Lelievre JM, Tichit L, Fillion L, Larrigaudiere C, Vendrell M, Pech JC** (1995) Cold-induced accumulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase protein in Granny Smith apples. *Postharvest Biol. Technol.* 5: 11–17.
- Leng Q, Mercier RW, Yao W, Berkowitz GA** (1999) Cloning and first functional characterization of a plant cyclic nucleotide-gated cation channel. *Plant Physiology* 121: 753–761.
- Leung J, Bouvier-Durand M, Morris PC, Guerrier D, Cheddor F, Giraudat J** (1994) *Arabidopsis* ABA response gene ABI1: features of a calcium-modulated protein phosphatase. *Science* 264: 1448–1452.

- Leung YF, Cavalieri D** (2003) Fundamentals of cDNA microarray data analysis. *Trends in Genetics* 19(11).
- Levitt J** (1980) Responses of plants to environmental stresses: chilling, freezing and high temperatures stresses. *TT Kozlowsky, ed, Physiological Ecology: A Series of Monographs, Texts and Treatises, Ed 2, Vol 1. Academic Press, New York: 23-64.*
- Lewinsohn E, Gijzen M, Muzika RM, Barton K, Croteau R** (1993) Oleoresinosis in grand fir (*Abies grandis*) saplings and mature trees: modulation of this wound response by light and water stresses. *Plant Physiology* 101: 1021–1028.
- Li W, Li M, Zhang W, Welte R, Wang X** (2004) The plasma membrane-bound phospholipase D delta enhances freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Biotechnol.* 22(4): 427-433.
- Lian X, Wang S, Zhang J, Feng Q, Zhang L, Fan D, Li X, Yuan D, Han B, Zhang Q** (2006) Expression profiles of 10422 genes at early stage of low nitrogen stress in rice assayed using a cDNA microarray. *Plant Mol. Biol.* 60: 617-630.
- Liang W, Li C, Liu F, Jiang H, Li S, Sun J, Wu X, Li C** (2009) The *Arabidopsis* homologs of CCR4-associated factor 1 show mRNA deadenylation activity and play a role in plant defence responses. *Cell Res.* 19: 307-316.
- Lill RE, O'Donoghue EM, King GA** (1989) Postharvest physiology of peaches and nectarines. *Hort. Rev.* 11: 413-452.
- Lim CO, Kim HY, Kim MG, Lee SI, Chung WS, Park SH, Hwang I, Cho MJ** (1996) Expressed sequence tags of Chinese cabbage flower bud cDNA. *Plant Physiology* 111(2): 577-588.
- Lin SZ, Zhang ZY, Liu WF, Lin YZ, Zhang Q, Zhu BQ** (2005) Role of glucose-6-phosphate dehydrogenase in freezing-induced freezing resistance of *Populus suaveolens*. *Zhi Wu Sheng Li Yu Fen Zi Sheng Wu Xue Xue Bao* 31(1): 34-40.
- Lindhout K, Treeby MT, Parish RW** (2004) Chill out: Chilling-related injuries in navel oranges. *Acta Horticulturae* 687: 77-84.
- Liu HY, Chiang YC, Pan J, Chen J, Salvatore C, Audino DC, Badarinarayana V, Palaniswamy V, Anderson B, Denis CL** (2001) Characterization of CAF4 and CAF16 reveal a functional connection between the CCR4-NOT complex and a subset of SRB proteins of the RNA polymerase II holoenzyme. *J. Biol. Chem.* 276: 7541–7548.
- Liu JX, Srivastava R, Che P, Howell SH** (2007) Salt stress responses in *Arabidopsis* utilize a signal transduction pathway related to endoplasmic reticulum stress signaling. *Plant J.* 51(5):897-909.
- Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (1998) Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with and EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10: 1391–1406.

- Lluch Y** (2006) Tesis doctoral: Bases moleculares del mecanismo de tolerancia al frío inducido por tratamientos de acondicionamiento a altas temperaturas en frutos cítricos.
- Lo Piero AR, Mercurio V, Puglisi I, Petrone G** (2009) Gene isolation and expression analysis of two distinct sweet orange [*Citrus sinensis* L. (Osbeck)] tau-type glutathione transferases. *Gene* 443(1-2): 143-150.
- Lopez-Matas MA, Nuñez P, Soto A, Allona I, Casado R, Collada C, Guevara MA, Aragoncillo C, Gomez L** (2004) Protein cryoprotective activity of a cytosolic small heat shock protein that accumulates constitutively in chestnut stems and is up-regulated by low and high temperatures. *Plant Physiology* 134(4): 1708-1717.
- Luchsinger L, Artes F** (2000) Alleviating chilling injuries in stone fruit. *En: Improving postharvest technologies for fruits, vegetables and ornamentals. Edit. Intern. Institute of refrigeration. Eds: F Artes, M Gil y MA Conesa. II: 474-479.*
- Luhua S, Cifti-Yilmaz S, Harper J, Cushman J, Mittler R** (2008) Enhanced tolerance to oxidative stress in transgenic *Arabidopsis* plants expressing proteins of unknown functions. *Plant Physiology* 148: 280-292.
- Lurie S** (1998) Postharvest heat treatments. *Postharvest Biol. Technol.* 14 (3): 257-269.
- Lurie S, Crisosto C** (2005) Chilling injury in peach and nectarine. *Postharvest Biol. Technol.* 37: 195-208.
- Luro FL, Costantino G, Terol J, Argout X, Allario T, Wincker P, Talon M, Ollitrault P, Morillon R** (2008) Transferability of the EST-SSRs developed on Nules clementine (*Citrus clementina* Hort ex Tan) to other *Citrus* species and their effectiveness for genetic mapping. *BMC Genomics* 9: 287.
- Lynch DV** (1990) Chilling injury in plants: the relevance of membrane lipids. *In Environmental Injury to Plants (ed. F. Katterman): 17-34.*
- Lynch DV, Steponkus PL** (1987) Plasma membrane lipid alterations associated with cold acclimation of winter rye seedlings (*Secale cereale* L. cv Puma). *Plant Physiol* 83: 761-767.
- Lyons JM** (1973) Chilling injury in plants. *Annual Rev. Plant* 24: 445-466.
- Lyons JM, Raison JK, Steponkus PL** (1979) The plant membrane in response to low temperature: an overview. In: *Lyons JM, Graham D, Raison JK, eds. Low temperature stress in crop plants. New York: Academic Press: 1-24.*
- Ma Y, Szostkiewicz I, Korte A, Moes D, Yang Y, Christmann A, Grill E** (2009) Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science* 324(5930): 1064-1068.
- Machado MA, Souza AA, Targon ML, Takita MA, Freitas-Astua J, Filho HC, Amaral AM, Palmieri DA, Boscariol-Camargo R, Cristofani M, Carlos EF, Reis MS** (2006) Current situation of *Citrus* genome project in Brazil (CiEST). *In: Plant & Animal Genome XIV Conference. Town & Country Convention Center. San Diego, CA. USA: 77.*

- Machado MA, Amaral AM, Freitas-Astua J, Berger IJ, Boscariol-Camargo RL, Carlos EF, Filho HC, Locali EC, Lucheta AR, Stach-Machado DR, Palmieri AC, Palmieri D, Peroni LA, Silvapinhati ACO** (2007) Analysis of *Citrus* transcriptome: CitEST in Brazil. *In: Plant & Animal Genome XV Conference. Town & Country Convention Center. San Diego, CA. USA.*
- Mahajan S, Tuteja N** (2005) Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Arch Biochem Biophys.* 444(2): 139-158.
- Malacrida C, Valle EM, Boggio SB** (2006) Postharvest chilling induces oxidative stress response in the dwarf tomato cultivar Micro-Tom. *Physiologia Plantarum* 127: 10–18.
- Manosalva PM, Davidson RM, Liu B, Zhu X, Hulbert SH, Leung H, Leach JE** (2009) A germin-like protein gene family functions as a complex quantitative trait locus conferring broad-spectrum disease resistance in rice. *Plant Physiology* 149(1): 286-296.
- Mantri NL, Ford R, Coram TE, Pang ECK** (2007) Transcriptional profiling of chickpea genes differentially regulated in response to high-salinity, cold and drought. *BMC Genomics* 8: 303.
- MapMan** (<http://gabi.rzpd.de/projects/MapMan/>)
- Marcellin P** (1992) Les amladies physiologiques du froid. *En: Les végétaux et le froid. Ed. D. Côme. Edit. Hermann: Paris: 53-105.*
- Marcellin P, Ulrich R** (1983) Comportement des fruits et légumes en conditions modules et programme. *Int. J. Refrigeration* 6: 329-336.
- Marques MC, Alonso-Cantabrana H, Forment J, Arribas R, Alamar S, Conejero V, Perez-Amador MA** (2009) A new set of ESTs and cDNA clones from full-length and normalized libraries for gene discovery and functional characterization in *Citrus*. *BMC Genomics* 10: 428.
- Martinez M, Rubio-Somoza I, Carbonero P, Diaz I** (2003) A cathepsin B-like cysteine protease gene from *Hordeum vulgare* (gene CatB) induced by GA in aleurone cells is under circadian control in leaves. *J. Exp. Bot.* 54(384): 951-959.
- Martinez-Godoy MA, Mauri N, Juarez J, Marques MC, Santiago J, Forment J, Gadea J** (2008) A genome-wide 20 K *Citrus* microarray for gene expression analysis. *BMC Genomics* 9: 318.
- Martinez-Javega JM** (1995) Tendencias actuales en la conservación refrigeradas de frutas como marcadores de la calidad higiénicas de los frutos. *Microbiología SEN* 11: 111-114.
- Martinez-Javega JM** (1996) Manejo del frío: Conservación y transporte de frutos cítricos. Primera reunión internacional de poscosecha y mercados cítricos. *FAO-RIAC. Concordia, Arg.:* 73-81.
- Martinez-Javega JM** (1997) La frigoconservación en naranjas y mandarinas. *Phytoma.* 90: 136-140.
- Martinez-Javega JM** (1999) Tendencias actuales de la frigoconservación de frutos. *Fruticultura profesional. N°102:* 58-60.

- Martinez-Javega JM** (2002) Estado actual de las aplicaciones del frío en la postcosecha de cítricos. *Actas del I Congreso Español de Ciencias y Técnicas del Frío, CYTEF'2002: Avances en Ciencias y Técnicas del Frío-I*. Eds. López, A., Esnoz, A., Artes, F. ISBN: 84-95781-17-4: 433-442.
- Martinez-Javega JM, Cuquerella J** (1984) Factors affecting cold storages of Spanish oranges and mandarines. *Proceeding Internat. Society Citriculture 1*: 511-514.
- Martinez-Javega JM, Saucedo C, Del Rio MA, Mateos M** (1992) Influence of storage temperature and coating on the keeping quality of Fortune mandarins. *Proc. Int. Soc. Citriculture 3*: 1102–1103.
- Martinez-Javega JM, Navarro P, Cuquerella J, del Rio MA** (1999) Aplicaciones del frío en postcosecha de cítricos: panorama actual. *Rev. Levante Agrícola, N°348, Especial Postcosecha*: 253-262.
- Martinez-Téllez MA, Lafuente MT** (1997) Effect of high temperature conditioning on ethylene, phenylalanine ammonia-lyase, peroxidase and polyphenol oxidase activities in flavedo of chilled Fortune mandarin fruit. *Journal Plant Physiology 150*: 674-678.
- Maruyama K, Sakuma Y, Kasuga M, Ito Y, Seki M, Goda H, Shimada Y, Yoshida S, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2004) Identification of cold-inducible downstream genes of the *Arabidopsis* DREB1A/CBF3 transcriptional factor using two microarray systems. *Plant J. 38*: 982–993.
- Mao LC, Pang HG, Wang GZ and Zhu CG** (2007) Phospholipase D and lipoxygenase activity of cucumber fruit in response to chilling stress. *Postharvest Biol. Technol. 44*: 42-47.
- Maul P, McCollum GT, Popp M, Guy CL, Porat R** (2008) Transcriptome profiling of grapefruit flavedo following exposure to low temperature and conditioning treatments uncovers principal molecular components involved in chilling tolerance and susceptibility. *Plant, Cell & Environ. 31*: 752-768.
- Mazliak P** (1994) Desaturation processes in fatty-acid and acyl lipid biosynthesis. *Journal of Plant Physiology 143(4-5)*: 399-406.
- Mazzuz CF, del Rio MA** (1997) Aplicación del análisis sensorial al control de calidad de frutos cítricos sometidos a tratamientos cuarentenarios. *Workshop "Medición de la calidad en frutos tropicales y subtropicales con tratamientos de cuarentena". CYTED. Proyecto XI.10*. Ed. C. Saucedo y J.M. Martinez-Javega:16-28.
- McDonald RE, Kushad MM** (1986) Accumulation of Putrescine during Chilling Injury of Fruits. *Plant Physiology 82*: 324-326.
- Medina J, Catalá R, Salinas J** (2001) Developmental and stress regulation of RC12A and RC12B, two cold-inducible genes of *Arabidopsis* encoding highly conserved hydrophobic proteins. *Plant Physiology 125(4)*: 1655-1666.
- Mehta A, Silva MS, Guidetti-Gonzalez S, Carrer H, Takita MA, Martins NF** (2007) Signaling pathways in a *Citrus* EST database. *Genetics and Molecular Biology 30(3 suppl)*: 734-751.

- Meir S, Philosoph-Hadas S, Lurie S, Droby S, Akerman M, Zauberman G, Shapiro B, Cohen E, Fuchs Y** (1996) Reduction of chilling injury in stored avocado, grapefruit, and bell pepper by methyl jasmonate. *Can. J. Bot.* 74:870-874.
- Melzer R, Verelst W, Theissen G** (2009) The class E floral homeotic protein SEPALLATA3 is sufficient to loop DNA in 'floral quartet'-like complexes in vitro. *Nucleic Acids Res.* 37(1): 144-157.
- Membré N, Bernier F, Staiger D, Berna A** (2000) *Arabidopsis thaliana* germin-like proteins: common and specific features point to a variety of functions. *Planta* 211(3): 345-354.
- Meyer K, Leube MP, Grill E** (1994) A protein phosphatase 2C involved in ABA signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Science* 264: 1452-1455.
- Miller EV** (1945) The physiology of *Citrus* fruits in storage. *Florida State Horticultural Society* 58: 128-133.
- Minhas D, Grover A** (1999) Transcript levels of genes encoding various glycolytic and fermentation enzymes change in response to abiotic stresses. *Plant Science* 146: 41-51.
- Minorsky PV** (1985) An heuristic hypothesis of chilling injury in plants: a role for calcium as the primary physiological transducer of injury. *Plant Cell Environ* 8: 75-94.
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F** (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* 9(10): 490-498.
- Miura K, Jin JB, Lee J, Yoo CY, Stirm V, Miura T, Ashworth EN, Bressan RA, Yun DJ, Hasegawa PM** (2007) SIZ1-mediated sumoylation of ICE1 controls CBF3/DREB1A expression and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19(4): 1403-1414.
- Miyawaki K, Tarkowski P, Matsumoto-Kitano M, Kato T, Sato S, Tarkowska D, Tabata S, Sandberg G, Kakimoto T** (2006) Roles of *Arabidopsis* ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103(44): 16598-16603.
- Mizoguchi T, Hayashida N, Yamaguchi-Shinozaki K, Kamada H, Shinozaki K** (1995) Two genes that encode ribosomal-protein S6 kinase homologs are induced by cold or salinity stress in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 358(2): 199-204.
- Mizoguchi T, Irie K, Hirayama T, Hayashida N, Yamaguchi-Shinozaki K, Matsumoto K, Shinozaki K** (1996) A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activated protein kinase and an S6 ribosomal protein kinase by touch, cold, and water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93(2): 765-769.
- Monroy AF, Dhindsa RS** (1995) Low-temperature signal transduction: induction of cold acclimation-specific genes of alfalfa by calcium at 25°C. *Plant Cell* 7: 321-331.
- Monroy AF, Dryanova A, Malette B, Oren DH, Ridha Farajalla M, Liu W, Danyluk J, Ubayasena LW, Kane K, Scoles GJ, Sarhan F, Gulick PJ** (2007) Regulatory gene candidates and gene expression analysis of cold acclimation in winter and spring wheat. *Plant Mol. Biol.* 64(4): 409-423.

- Monroy AF, Sangwan V, Dhindsa RS** (1998) Low temperature signal transduction during cold acclimation: protein phosphatase 2A as an early target for cold-inactivation. *Plant J.* 13(5): 653-660.
- Moriguchi T, Kita M, Hisada S, Endo-Inagaki T, Omura M** (1998) Characterization of gene repertoires at mature stage of *Citrus* fruits through random sequencing and analysis of redundant metallothionein-like genes expressed during fruit development. *Gene* 211: 221–227.
- Morris LL** (1982) Chilling injury of horticultural crops: An overview. *HortScience* 17: 161-162.
- Mudgil Y, Singh BN, Upadhyaya KC, Sopory SK, Reddy MK** (2002) Cloning and characterization of a cell cycle-regulated gene encoding topoisomerase I from *Nicotiana tabacum* that is inducible by light, low temperature and abscisic acid. *Mol. Genet. Genomics* 267(3): 380-90.
- Mulas M, Lafuente MT, Zacarias** (1996) Chilling effects on fatty acid composition of flavedo lipids in stored Fortune mandarins. *Advances Hort. Sci.* 2: 85-90.
- Mulas M, Lafuente MT, Zacarias** (1997) Postharvest temperature conditioning and chilling effects on flavedo lipid composition of Fortune mandarin. *Proc. Inter. Soc. Citric* 2:1132-1135.
- Mullins ED, McCollum TG, McDonald RE** (1999) Ethylene: A regulator of stress-induced ACC synthase activity in nonclimateric fruit. *Physiol. Plant.* 107: 1-7.
- Murata N, Ishizaki-Nishizawa O, Higashi S, Hayashi H, Tasaka Y, Nishida I** (1992) Genetically engineered alteration in the chilling sensitivity of plants. *Nature* 356: 710-713.
- Nakamichi N, Kusano M, Fukushima A, Kita M, Ito S, Yamashino T, Saito K, Sakakibara H, Mizuno T** (2009) Transcript profiling of an *Arabidopsis* PSEUDO RESPONSE REGULATOR arrhythmic triple mutant reveals a role for the circadian clock in cold stress response. *Plant Cell Physiol.* 50(3): 447-462.
- Nakamura H, Hakata M, Amano K, Miyao A, Toki N, Kajikawa M, Pang J, Higashi N, Ando S, Toki S, Fujita M, Enju A, Seki M, Nakazawa M, Ichikawa T, Shinozaki K, Matsui M, Nagamura Y, Hirochika H, Ichikawa H** (2007) A genome-wide gain-of function analysis of rice genes using the FOX-hunting system. *Plant Mol. Biol.* 65(4): 357-371.
- Nambara E, Marion-Poll A** (2005) Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56: 165-185.
- Naranjo MA, Romero C, Bellés JM, Montesinos C, Vicente O, Serrano R** (2003) Lithium treatment induces a hypersensitive-like response in tobacco. *Planta* 217(3): 417-424.
- Navarro L** (2005) Necesidades y problemáticas de la mejora sanitaria y genética de los cítricos en España. *Phytoma* 170: 2-5.
- Newcomb RD, Crowhurst RN, Gleave AP, Rikkerink EH, Allan AC, Beuninig LL, Bowen JH, Gera E, Jamieson KR, Janssen BJ** (2006) Analyses of expressed sequence tags from apple. *Plant Physiol* 141: 147-166.

- Ni WS, Lei ZY, Chen X, Oliver DJ, Xiang CB** (2007) Construction of a Plant Transformation-ready Expression cDNA Library for *Thellungiella halophila* Using Recombination Cloning. *Journal of Integrative Plant Biology* 49 (9): 1313-1319.
- Nigam N, Singh A, Sahi C, Chandramouli A, Grover A** (2008) SUMO-conjugating enzyme (Sce) and FK506-binding protein (FKBP) encoding rice (*Oryza sativa* L.) genes: genome-wide analysis, expression studies and evidence for their involvement in abiotic stress response. *Mol. Genet. Genomics* 279(4): 371-383.
- Nikkilä J, Törönen P, Kaski S, Venna J, Castrén E, Wong G** (2002) Analysis and visualization of gene expression data using self-organizing maps. *Neural Networks* 15: 953-966.
- Nilo R, Saffie C, Lilley K, Baeza-Yates R, Cambiazo V, Campos-Vargas R, Gonzalez M, Meisel LA, Retamales J, Silva H, Orellana A** (2010) Proteomic analysis of peach fruit mesocarp softening and chilling injury using difference gel electrophoresis (DIGE). *BMC Genomics* 11: 43.
- Nishikawa M, Hosokawa K, Ishiguro M, Minamioka H, Tamura K, Hara-Nishimura I, Takahashi Y, Shimazaki K, Imai H** (2008) Degradation of sphingoid long-chain base 1-phosphates (LCB-1Ps): functional characterization and expression of AtDPL1 encoding LCB-1P lyase involved in the dehydration stress response in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 49(11): 1758-1763.
- Nogueira FT, De Rosa VE Jr, Menossi M, Ulian EC, Arruda P** (2003) RNA expression profiles and data mining of sugarcane response to low temperature. *Plant Physiology* 132(4):1811-1824.
- Nueda MJ, Conesa A, Westerhuis JA, Hoefsloot HC, Smilde AK, Talón M, Ferrer A** (2007) Discovering gene expression patterns in *time course* microarray experiments by ANOVA-SCA. *Bioinformatics* 23(14): 1792-1800.
- Obregon P, Martín R, Sanz A, Castresana C** (2001) Activation of defence-related genes during senescence: a correlation between gene expression and cellular damage. *Plant Mol. Biol.* 46(1): 67-77.
- Ogihara Y, Mochida K, Nemoto Y, Murai K, Yamazaki Y, Shin-I T, Kohara Y** (2003) Correlated clustering and virtual display of gene expression patterns in the wheat life cycle by large-scale statistical analyses of expressed sequence tags. *Plant J* 33: 1001-1011.
- Ogundiwin EA, Martí C, Forment J, Pons C, Granel A, Gradziel TM, Peace CP, Crisosto CH** (2008) Development of ChillPeach genomic tools and identification of cold-responsive genes in peach fruit. *Plant Mol. Biol.* 68: 379-397.
- Ogundiwin EA, Peace CP, Gradziel TM, Parfitt DE, Bliss FA, Crisosto CH** (2009) A fruit quality gene map of *Prunus*. *BMC Genomics* 10: 587.
- Ohlrogge J, Benning C** (2000) Unraveling plant metabolism by EST analysis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3: 224-228.

- Okuda T, Matsuda Y, Sugawara M, Sagisaka S** (1992) Metabolic response to treatment with cold, paraquat, or 3-amino-1, 2, 4-triazole in leaves of winter wheat. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 56(12):1911-1915.
- Oono Y, Seki M, Satou M, Iida K, Akiyama K, Sakurai T, Fujita M, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2006) Monitoring expression profiles of *Arabidopsis* genes during cold acclimation and deacclimation using DNA microarrays. *Funct. Integr. Genomics* 6(3): 212-234.
- Orvar BL, Sangwan V, Omann F, Dhindsa RS** (2000) Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. *Plant J.* 23(6): 785-794.
- Ouyang B, Yang T, Li H, Zhang L, Zhang Y, Zhang J, Fei Z, Ye Z** (2007) Identification of early salt stress response genes in tomato root by suppression subtractive hybridization and microarray analysis. *J. Exp. Bot.* 58(3): 507-520.
- Page D, Gouble B, Valot B, Bouchet JP, Callot C, Kretschmar A, Causse M, Renard CM, Faurobert M** (2010) Protective proteins are differentially expressed in tomato genotypes differing for their tolerance to low-temperature storage. *Planta* 232(2): 483-500.
- Palmieri L, Picault N, Arrigoni R, Besin E, Palmieri F, Hodges M** (2008) Molecular identification of three *Arabidopsis thaliana* mitochondrial dicarboxylate carrier isoforms: organ distribution, bacterial expression, reconstitution into liposomes and functional characterization. *Biochem J.* 410(3): 621-629.
- Palomen P, Junttila O** (1999) Cold hardening of raspberry plants in vitro is enhanced by increasing sucrose in the culture medium. *Physiol. Plant.* 106: 386-392.
- Park S, Sugimoto N, Larson MD, Beaudry R, van Nocker S** (2006) Identification of genes with potential roles in apple fruit development and biochemistry through large-scale statistical analysis of expressed sequence tags. *Plant Physiology* 141: 811-824.
- Paull RE** (1990) Chilling injury of crops of tropical and subtropical origin. *Chilling injury of horticultural crops*: 17-36.
- Peroni LA, Ferreira RR, Figueira A, Machado MA, Stach-Machado DR** (2007) Expression profile of oxidative and antioxidative stress enzymes based on ESTs approach of *Citrus*. *Genetics and Molecular Biology* 30(3 suppl): 872-880.
- Pinhero RG, Paliyath G, Yada RY, Murr DP** (1998) Modulation of phospholipase D and lipoxygenase activities during chilling. Relation to chilling tolerance of maize seedlings. *Plant Physiol. Biochem.* 36: 213-224.
- Polenta GA, Calvete JJ, Gonzalez CB** (2007) Isolation and characterization of the main small heat shock proteins induced in tomato pericarp by thermal treatment. *FEBS J.* 274(24): 6447-6455.
- Pons C, Royo C, Lluch Y, Gadea J, Forment J, Kanellis AK, Zacarias L, Lafuente MT, Granell A** (2004) Response of *Citrus* fruit to cold as revealed by a customized cDNA microarray. *Workshop on the making of a fruit: From genes to phenotype*.

- Pontier D, Godiard L, Marco Y, Roby D** (1994) hsr203J, a tobacco gene whose activation is rapid, highly localized and specific for incompatible plant/pathogen interactions. *The Plant J.* 5: 507–521.
- Pontier D, Tronchet M, Rogowsky P, Lam E, Roby D** (1998) Activation of hsr203, a plant gene expressed during incompatible plant-pathogen interactions, is correlated with programmed cell death. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 11(6): 544-554.
- Porat R, Daus A, Weiss B, Cohen L, Fallik E, Droby S** (2000) Reduction of postharvest decay in organic *Citrus* fruit by a short hot water brushing treatment. *Postharvest Biol. Technol.* 18: 151–157.
- Porat R, Pavoncello D, Lurie S, McCollum TG** (2002) Identification of a grapefruit cDNA belonging to a unique class of *Citrus* dehydrins and characterization of its expression patterns under temperature stress conditions. *Physiol. Plant* 115: 598-603.
- Porat R, Pasentsis K, Rozentzvieg D, Gerasopoulos D, Falara V, Samach A, Lurie S, Kanellis AK** (2004) Isolation of a dehydrin cDNA from orange and grapefruit *Citrus* fruit that is specifically induced by the combination of heat followed by chilling temperatures. *Physiol. Plant* 120: 256-264.
- Prasanna V, Prabha TN, Tharanathan RN** (2007) Fruit Ripening Phenomena-An Overview. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 47(1): 1-19.
- Prober JM, Trainor GL, Dam RJ, Hobbs FW, Robertson CW, Zagursky RJ, Cocuzza AJ, Jensen MA, Baumeister K** (1987) A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science* 238(4825): 336-341.
- Purvis AC, Kawada K, Grierson W** (1979) Relationship between mid-season resistance to chilling injury and reducing sugar level in grapefruit peel. *HortScience* 14: 227-229.
- Quecini V, Torres GAM, de Rosa VE Jr, Gimenes MA, de M. Machado JB, de O. Figueira AV, Benedito V, Targon ML PN, Cristofani-Yaly M** (2007) In silico analysis of phytohormone metabolism and communication pathways in *Citrus* transcriptome. *Genetics and Molecular Biology* 30(3 suppl): 713-733.
- Quinn PJ** (1988) Effects of temperature on cell membranes. *Symp Soc Exp Biol.* 42: 237-258.
- Raab S, Drechsel G, Zarepour M, Hartung W, Koshiba T, Bittner F, Hoth S** (2009) Identification of a novel E3 ubiquitin ligase that is required for suppression of premature senescence in *Arabidopsis*. *Plant J.* 59(1):39-51.
- Rabbani MA, Maruyama K, Abe H, Khan MA, Katsura K, Ito Y, Yoshiwara K, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2003) Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA gel-blot analyses. *Plant Physiology* 133(4): 1755-1767.
- Rafalski JA, Hanafey M, Miao GH, Ching A, Lee JM, Dolan M, Tingey S** (1998) New experimental and computational approaches to the analysis of gene expression. *Acta Biochem. Pol.* 45(4): 929-934.

- Raison JK, Lyons JM** (1986) Chilling injury: a plea for uniform terminology. *Plant, Cell and Environment* 9: 685-686.
- Raison JK, Orr GR** (1990) Proposals for a better understanding of the molecular basis of chilling injury. C.Y. Wang (ed) *Chilling Injury of Horticultural Crops*. CRC Press, Boca Raton FL: 145-164.
- Rao MV, Lee HI, Davis KR** (2002) Ozone-induced ethylene production is dependent on salicylic acid, and both salicylic acid and ethylene act in concert to regulate ozone-induced cell death. *Plant J.* 32(4): 447-456.
- Rapala-Kozik M, Kowalska E, Ostrowska K** (2008) Modulation of thiamine metabolism in Zea mays seedlings under conditions of abiotic stress. *J. Exp. Bot.* 59(15): 4133-4143.
- Rasmussen GK** (1975) Cellulase activity, endogenous abscisic acid and ethylene in four *Citrus* cultivars during maturation. *Plant Physiol* 56: 765-767.
- Rautengarten C, Steinhäuser D, Büssis D, Stintzi A, Schaller A, Kopka J, Altmann T** (2005) Inferring Hypotheses on Functional Relationships of Genes: Analysis of the *Arabidopsis thaliana* Subtilase Gene Family. *PLoS Comput Biol* 1(4): e40.
- Rekarte-Cowie I, Ebshish OS, Mohamed KS, Pearce RS** (2008) Sucrose helps regulate cold acclimation of *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 59(15): 4205-4217.
- Ribeiro DT, Farias LP, de Almeida JD, Kashiwabara PM, Ribeiro AF, Silva-Filho MC, Menck CF, Van Sluys MA** (2005) Functional characterization of the thi1 promoter region from *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 56(417): 1797–1804.
- Riechmann JL, Heard J, Martin G, Reuber L, Jiang C, Keddie J, Adam L, Pineda O, Ratcliffe OJ, Samaha RR** (2000) *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* 290: 2105-2110.
- Riis B, Rattan SIS, Clark BFC, Merrick WC** (1990) Eukaryotic protein elongation factors. *Trends Biochem. Science* 15: 420-424.
- Ríos G, Naranjo MA, Iglesias DJ, Ruiz-Rivero O, Geraud M, Usach A, Talón M** (2008) Characterization of hemizygous deletions in *Citrus* using array-comparative genomic hybridization and microsynteny comparisons with the poplar genome. *BMC Genomics* 9: 381.
- Roberts DR, Dumbroff EB, Thompson JE** (1986) Exogenous polyamines alter membrane fluidity in bean leaves - a basis for potential misinterpretation of their true physiological role. *Planta* 167 (3): 395-401.
- Rodov V, Ben-Yehoshua S, Fang DQ, Kim JJ, Ashkenazi R** (1995) Preformed antifungal compounds of lemon fruit: citral and its relation to disease resistance. *J. Agric. Food Chem.* 43: 1057–1061.
- Rodrigo MJ, Marcos JF, Alferez F, Mallent M, Zacarias 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: 727–738.

- Rodrigo MJ, Alquezar B, 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.
- Rodriguez-Vargas S, Sánchez-García A, Martínez-Rivas JM, Prieto JA, Randez-Gil F** (2007) Fluidization of membrane lipids enhances the tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to freezing and salt stress. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(1): 110-116.
- Romualdi C, Bortoluzzi S, D'Alessi F, Danieli GA** (2003) IDEG6: a web tool for detection of differentially expressed genes in multiple tag sampling experiments. *Physiol. Genomics* 12: 159-162.
- Ronning CM, Stegalkina SS, Ascenzi RA, Bougri O, Hart AL, Utterbach TR, Vanaken SE, Riedmuller SB, White JA, Cho J, Perteau GM, Lee Y, Karamycheva S, Sultana R, Tsai J, Quackenbush J, Griffiths HM, Restrepo S, Smart CD, Fry WE, Van Der Hoeven R, Tanksley S, Zhang P, Jin H, Yamamoto ML, Baker BJ, Buell CR** (2003) Comparative analyses of potato expressed sequence tag libraries. *Plant Physiology* 131: 419-429.
- Roose ML, Niedz RP, Gmitter FG, Close TJ, Dandekar AM, Cheng JF, Rokhsar DS** (2007) Analysis of a 1.2x whole genome sequence of *Citrus sinensis*. In *Plant & Animal Genome XV Conference. Town & Country Convention Center. San Diego, CA. USA.*
- Roxas VP, Smith RK Jr, Allen ER, Allen RD** (1997) Overexpression of glutathione S-transferase/glutathione peroxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedlings during stress. *Nat. Biotechnol.* (10): 988-991.
- Rozenzweig D, Elmaci C, Samach A, Lurie S, Porat R** (2004) Isolation of four heat shock protein cDNAs from grapefruit peel tissue and characterization of their expression in response to heat and chilling temperature stresses. *Physiologia Plantarum* 121: 421-428.
- Rudd S, Schoof H, Mayer K** (2005) PlantMarkers - a database of predicted molecular markers from plants. *Nucleic Acids Res* 33: D628-D632.
- Ruelland E, Cantrel C, Gawer M, Kader JC, Zachowski A** (2002) Activation of phospholipases C and D is an early response to a cold exposure in *Arabidopsis* suspension cells. *Plant Physiology* 130: 999-1007.
- Rui HJ, Cao SF, Shang HT, Jin P, Wanga K, Zhenga Y** (2010) Effects of heat treatment on internal browning and membrane fatty acid in loquat fruit in response to chilling stress. *J. Sci. Food Agric.* 90(9): 1557-1561.
- Ruffel S, Gallois JL, Lesage ML, Caranta C** (2005) The recessive potyvirus resistance gene *pot-1* is the tomato orthologue of the pepper *pvr2-eIF4E* gene. *Mol. Genet. Genomics* 274(4): 346-353.
- Sabehat A, Lurie S, Weiss D** (1998) Expression of small heat-shock proteins at low temperatures. A possible role in protecting against chilling injuries. *Plant Physiol* 117: 651-658.

- Sahin-Cevik M, Moore GA** (2006) Identification and expression analysis of cold-regulated genes from the cold-hardy *Citrus* relative *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. *Plant Mol. Biol.* 62(1-2): 83-97.
- Sakata Y, Nakamura I, Taji T, Tanaka S, Quatrano RS** (2010) Regulation of the ABA-responsive Em promoter by ABI3 in the moss *Physcomitrella patens*: Role of the ABA response element and the RY element. *Plant Signal Behav.* 5(9).
- Sala JM** (1998) Involvement of oxidative stress in chilling injury in cold-stored mandarin fruits. *Postharvest Biol. Technol.* 13: 255-261.
- Sala JM** (2000) Content, chemical composition and morphology of epicuticular wax of Fortune mandarin fruits in relation to peel pitting. *J. Sci. Food Agric.* 80: 1887-1894.
- Sala JM, Lafuente MT** (1999) Catalase in the heat-induced chilling tolerance of cold-stored hybrid Fortune mandarin fruits. *J. Agric. Food Chem.* 47: 2410-2414.
- Sala JM, Lafuente MT** (2000) Catalase enzyme activity is related to tolerance of mandarin fruits to chilling. *Postharvest Biol. Technol.* 20: 81-89.
- Sala JM, Lafuente MT** (2004) Antioxidant enzymes activities and rindstaining in 'Navelina' oranges as affected by storage relative humidity and ethylene conditioning. *Postharvest Biol. Technol.* 31: 277-285.
- Saltveit ME, Morris LL** (1990) Overview on chilling injury of horticultural crops. In: C.Y. Wang (ed) *Chilling Injury of Horticultural Crops*. CRC Press, Boca Raton FL: 3-15.
- Sambrook J, Frish EF, Maniatis T** (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanchez-Ballesta MT, Lafuente MT, Zacarias L, Granell A** (2000a) Involvement of phenylalanine ammonia-lyase in the response of Fortune mandarin fruits to cold. *Physiologia Plantarum* 108: 382-389.
- Sanchez-Ballesta MT, Zacarias L, Granell A, Lafuente MT** (2000b) Accumulation of PAL transcript and PAL activity as affected by heat-conditioning and low-temperature storage and its relation to chilling sensitivity in mandarin fruits. *J. Agric. Food Chem.* 48(7): 2726-2731.
- Sanchez-Ballesta MT, Lluch Y, Gosalbes MJ, Zacarias L, Granell A, Lafuente MT** (2003) A survey of genes differentially expressed during long-term heat-induced chilling tolerance in *Citrus* fruit. *Planta* 218(1): 65-70.
- Sanchez-Ballesta MT, Rodrigo MJ, Lafuente MT, Granell A, Zacarias L** (2004) Dehydrin from *Citrus*, which confers in vitro dehydration and freezing protection activity, is constitutive and highly expressed in the flavedo of fruit but responsive to cold and water stress in leaves. *J. Agric. Food Chem.* 52(7): 1950-1957.
- Sanchez-Ballesta MT, Gosalbes MJ, Rodrigo MJ, Granell A, Zacarias L, Lafuente MT** (2006) Characterization of a beta-1,3-glucanase from *Citrus* fruit as related to chilling-induced injury and ethylene production. *Postharvest Biol. Technol.* 40(2): 133-140.

- Sanchez-Ballesta MT, Zacarias L, Granell A, Lafuente MT** (2008) beta-1,3-Glucanase gene expression as a molecular marker for postharvest physiological disorders in *Citrus* fruit and its hormonal regulation. *Postharvest Biol. Technol.* 48: 146–149.
- Santiago J, Rodrigues A, Saez A, Rubio S, Antoni R, Dupeux F, Park SY, Márquez JA, Cutler SR, Rodriguez PL** (2009) Modulation of drought resistance by the abscisic acid receptor PYL5 through inhibition of clade A PP2Cs. *Plant J.* 60(4): 575-588.
- Sapitnitskaya M, Maul P, McCollum GT, Guy CL, Weiss B, Samach A, Porat R** (2006) Postharvest heat and conditioning treatments activate different molecular responses and reduce chilling injuries in grapefruit. *J. Exp. Bot.* 57(12): 2943–2953.
- Saucedo-Veloz C** (1997) Tratamientos Físicos De Cuarentena. En: *Tratamientos físicos de cuarentena en frutos tropicales y subtropicales*. C. Saucedo-Veloz y R. Baez-Sañudo, eds. CYTED. Subprograma XI. Proyecto XI.10. La Habana: 7-14.
- Sayyari M, Valero D, Babalar M, Kalantari S, Zapata PJ, Serrano M** (2010) Prestorage oxalic acid treatment maintained visual quality, bioactive compounds, and antioxidant potential of pomegranate after long-term storage at 2 degrees C. *J. Agric. Food Chem.* 58(11): 6804-6808.
- Schaffer MA, Fischer RL** (1988) Analysis of mRNAs that accumulate in response to low temperature identifies a thiol protease gene in tomato. *Plant Physiology* 87: 431-436.
- Schaffer MA, Fischer RL** (1990) Transcriptional activation by heat and cold of a thiol protease gene in tomato. *Plant Physiology* 93: 1486-1491.
- Schirra M, Mulas M** (1995) Fortune mandarin quality following prestorage water dips and intermittent warming during cold-storage. *HortScience* 30(3): 560-561.
- Schirra M, Agabbio M, D'hallewin G, Pala M, Ruggiu R** (1997) Response of Tarocco Oranges to Picking Date, Postharvest Hot Water Dips, and Chilling Storage Temperature. *J. Agric. Food Chem.* 45 (8): 3216-3220.
- Schirra M, D'Hallewin G, Cabras P, Angioni A, Garau VL** (1998) Seasonal susceptibility of Tarocco oranges to chilling injury as affected by hot water and thiabendazole postharvest dip treatments. *J. Agric. Food Chem.* 46(3): 1177-1180.
- Schirra M, Cohen** (1999) Long-term storage of Olinda oranges under chilling and intermittent warming temperatures. *Postharvest Biol. Technol.* 16: 63-69.
- Schirra, M, Mulas M, Fadda A, Cauli E** (2004a) Cold quarantine responses of blood oranges to postharvest hot water and hot air treatments. *Postharvest Biol. Technol.* 31: 191-200.
- Schirra M, Mulas M, Fadda A, Mignani I, Lurie S** (2004b) Chemical and quality traits of Olinda and Campbell oranges after heat treatment at 44 or 46°C for fruit fly disinfestations. *Leben. Wissen. Technol.* 101: 279-283.
- Scholz M, Kaplan F, Guy CL, Kopka J, Selbig J** (2005) Non-linear PCA: a missing data approach. *Bioinformatics* 21(20): 3887-3895.
- Schweighofer A, Hirt H, Meskiene I** (2004) Plant PP2C phosphatases: emerging functions in stress signaling. *Trends Plant Sci.* 9: 236–243.

- Seki M, Narusaka M, Abe H, Kasuga M, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Hayashizaki Y, Shinozaki K** (2001) Monitoring the expression pattern of 1300 *Arabidopsis* genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray. *Plant Cell* 13(1): 61-72.
- Seki M, Narusaka M, Ishida J, Nanjo T, Fujita M, Oono Y, Kamiya A, Nakajima M, Enju A, Sakurai T, Satou M, Akiyama K, Taji T, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y, Shinozaki K** (2002) Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant J.* 31(3): 279-292.
- Serrano M, Martinez-Madrid MC, Pretel MT, Riquelme F, Romojaro F** (1997) Modified atmosphere packaging minimizes increases in putrescine and abscisic acid levels caused by chilling injury in pepper fruit. *J. Agric. Food Chem.* 5: 1668-1672.
- Sharma P, Sharma N, Deswal R** (2005) The molecular biology of the low-temperature response in plants. *BioEssays* 27:1048–1059.
- Shatters RG Jr, Bausher MG, Hunter WB, Chaparro JX, Dang PM, Niedz RP, Mayer RT, McCollum TG, Sinisterra X** (2004) Putative protease inhibitor gene discovery and transcript profiling during fruit development and leaf damage in grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.). *Gene* 326: 77-86.
- Shimada T, Kita M, Endo T, Fujii H, Ueda T, Moriguchi T, Omura M** (2003) Expressed sequence tags of ovary tissue cDNA library in *Citrus unshiu* Marc. *Plant Science* 165(1): 167-168.
- Shimada T, Fujii H, Endo T, Yazaki J, Kishimoto N, Shimbo K, Kikuchi S, Omura M** (2005) Toward comprehensive expression profiling by microarray analysis in *Citrus*: monitoring the expression profiles of 2213 genes during fruit development. *Plant Science* 168(5): 1383-1385.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (1996) Molecular responses to drought and cold stress. *Curr. Opin. Biotechnol.* 7(2): 161-167.
- Shoemaker R, Keim P, Vodkin L, Retzel E, Clifton SW, Waterston R, Smoller D, Coryell V, Khanna A, Erpelding J, Gai X, Brendel V, Raph-Schmidt C, Shoop EG, Vielweber CJ, Schmatz M, Pape D, Bowers Y, Theising B, Martin J, Dante M, Wylie T, Granger C** (2002) A compilation of soybean ESTs: generation and analysis. *Genome* 45: 329–338.
- Shulaev V, Silverman P, Raskin I** (1997) Airborne signalling by methyl salicylate in plant pathogen resistance. *Nature* 386(6626): 738-738.
- Sierra CC, Molina EB, Zaldivar CP, Flores LP, De Leon Garcia LP** (1993) Effect Of Harvesting Season And Postharvest Treatments On Storage Life Of Mexican Limes (*Citrus Aurantifolia* Swingle). *J. Food Quality* 16(5): 339-354.
- Smith GK, Speed TP** (2003). Normalization of cDNA microarray data. *Methods* 31: 265-273.
- Smith TA** (1985) Polyamines. *Annu Rev Plant Physiol* 36: 117-143.

- Solomon M, Belenghi B, Delledonne M, Menachem E, Levine A** (1999) The Involvement of Cysteine Proteases and Protease Inhibitor Genes in the Regulation of Programmed Cell Death in Plants. *The Plant Cell* 11: 431–443.
- Srinivasan T, Kumar KR, Kirti PB** (2009) Constitutive expression of a trypsin protease inhibitor confers multiple stress tolerance in transgenic tobacco. *Plant Cell Physiol.* 50(3): 541-53.
- Steele CL, Kato S, Bohlmann J, Croteau R** (1998) Regulation of oleoresinosis in grand fir (*Abies grandis*): differential transcriptional control of monoterpene, sesquiterpene, and diterpene synthase genes in responses to wounding. *Plant Physiology* 116: 1497–1504.
- Stepanova AN, Alonso JM** (2009) Ethylene signaling and response: where different regulatory modules meet. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12(5): 548-555.
- Steponkus PL** (1984) Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. *Annual Review of Plant Physiology* 35: 543-584.
- Steponkus PL, Uemura M, Joseph RA, Gilmour SJ, Thomashow MF** (1998) Mode of action of the COR15a gene on the freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95(24): 14570-14575.
- Sterky F, Regan S, Karlsson J, Hertzberg M, Rohde A, Holmberg A, Amini B, Bhalerao R, Larsson M, Villaruel R, Van Montagu M, Sandberg G, Olsson O, Teeri TT, Boerjan W, Gustafsson P, Uhlén M, Sundberg B, Lundeberg J** (1998) Gene discovery in the wood-forming tissues of poplar: analysis of 5692 expressed sequence tags. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95(22): 13330-13335.
- Sterky F, Bhalero RR, Unneberg P, Segerman B, Nilsson P, Brunner AM, Charbonnel-Campaa L, Lindvall JJ, Tandré K, Strauss SH** (2004) A *Populus* EST resource for plant functional genomics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 13951-13956.
- Stockinger EJ, Gilmour SJ, Thomashow MF** (1997) *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 1035-1040.
- Stupar RM, Bhaskar PB, Yandell BS, Rensink WA, Hart AI, Ouyang S, Veilleux RE, Busse JS, Erhardt RJ, Buell CR, Jiang J** (2006) Phenotypic and transcriptomic changes associated with potato autopolyploidization. *Genetics* 176: 2055-2067.
- Sung P, Krejci L, Van Komen S, Sehorn M** (2003) Rad51 recombinase and recombination mediators. *J. Biol. Chem.* 278: 42729–42732.
- Swindell WR, Huebner M, Weber AP** (2007) Transcriptional profiling of *Arabidopsis* heat shock proteins and transcription factors reveals extensive overlap between heat and non-heat stress response pathways. *BMC Genomics* 8:125.
- Tähtiharju S, Palva T** (2001). Antisense inhibition of protein phosphatase 2C accelerates cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 26: 461–470.

- Taji T, Seki M, Satou M, Sakurai T, Kobayashi M, Ishiyama K, Narusaka Y, Narusaka M, Zhu JK, Shinozaki K** (2004) Comparative genomics in salt tolerance between *Arabidopsis* and *Arabidopsis*-related halophyte salt cress using *Arabidopsis* microarray. *Plant Physiology* 135(3): 1697-1709.
- Takahashi M, Hikage T, Yamashita T, Saitoh Y, Endou M, Tsutsumi K** (2006) Stress-related proteins are specifically expressed under non-stress conditions in the overwinter buds of the gentian plant *Gentiana triflora*. *Breeding Science* 56: 39-46.
- Takahashi S, Murata N** (2008) How do environmental stresses accelerate photoinhibition? *Trends Plant Sci.* 13(4):178-182.
- Talon M, Gmitter FG Jr** (2008) *Citrus* genomics. *Int J Plant Genomics* 2008: 528361.
- Tamminen I, Mäkelä P, Heino P, Palva ET** (2001) Ectopic expression of ABI3 gene enhances freezing tolerance in response to abscisic acid and low temperature in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 25(1): 1-8.
- Tang S, Guan R, Zhang H, Huang J** (2007) Cloning and expression analysis of three cDNAs encoding omega-3 fatty acid desaturases from *Descurainia Sophia*. *Biotechnology Letters* 29: 1417-1424.
- Taylor MJ** (1987) Physico-chemical principles in low temperature biology. In *BWW Grout, GJ Morris, eds, The Effects of Low Temperature on Biological Systems*. Edward Arnold, London: 3-71
- Terol J, Conesa A, Colmenero JM, Cercos M, Tadeo F, Agustí J, Alós E, Andres F, Soler G, Brumos J, Iglesias DJ, Götz S, Legaz F, Argout X, Courtois B, Ollitrault P, Dossat C, Wincker P, Morillon R, Talon M** (2007) Analysis of 13000 unique *Citrus* clusters associated with fruit quality, production and salinity tolerance. *BMC Genomics* 8: 31.
- Terol J, Naranjo MA, Ollitrault P, Talon M** (2008) Development of genomic resources for *Citrus clementina*: characterization of three deep-coverage BAC libraries and analysis of 46,000 BAC end sequences. *BMC Genomics* 9: 423.
- Terol J, Talon M** (2008) Analysis of the repetitive content of the genome *Citrus clementina* based on BAC-end sequencing. In *Plant & Animal Genome XVI Conference*. Town & Country Convention Center. San Diego, CA. USA.
- The *Arabidopsis* Information Resource** [<http://www.Arabidopsis.org/>]
- Theerasilp S, Hitotsuya H, Nakajo S, Nakaya K, Nakamura Y, Kurihara Y** (1989) Complete amino-acid sequence and structure characterization of the taste- modifying protein miraculin. *J. Biol. Chem.* 264: 6655–6659.
- Thimm O, Bläsing O, Gibon Y, Nagel A, Meyer S, Krüger P, Selbig J, Müller LA, Rhee SY, Stitt M** (2004) MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *Plant J.* 37(6): 914-39.
- Thomashow MF** (1998) Role of cold-responsive genes in plant freezing tolerance. *Plant Physiology* 118(1): 1-8.

- Thomashow MF** (1999) Plant Cold Acclimation: Freezing Tolerance Genes and Regulatory Mechanisms. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol. Biol.*, 50:571-599.
- Thomashow MF** (2001) So what's new in the field of plant cold acclimation? Lots! *Plant Physiology* 125(1): 89-93.
- Tornero P, Conejero V, Vera P** (1996) Primary structure and expression of a pathogen-induced protease (PR-P69) in tomato plants: similarity of functional domains to subtilisin-like endoproteases. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 93: 6332-6337.
- Tornero P, Conejero V, Vera P** (1997) Identification of a new pathogen-induced member of the subtilisin-like processing protease family from plants. *J. Biol. Chem.* 272: 14412-14419.
- Tronchet M, Ranty B, Marco Y, Roby D** (2001) HSR203 antisense suppression in tobacco accelerates development of hypersensitive cell death. *Plant J.* 27(2): 115-127.
- Tseng MJ, Li PH** (1990) Alterations of gene expression in potato (*Solanum commersonii*) during cold acclimation. *Physiol. Plant.* 78: 538-547.
- Tusher VG, Tibshirani R, Chu G** (2001) Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98(9): 5116-5121.
- Uemura M, Joseph RA, Steponkus PL** (1995) Cold Acclimation of *Arabidopsis thaliana* (Effect on Plasma Membrane Lipid Composition and Freeze-Induced Lesions). *Plant Physiology* 109(1): 15-30.
- Umezawa T, Sakurai T, Totoki Y, Toyoda A, Seki M, Ishiwata A, Akiyama K, Kurotani A, Yoshida T, Mochida K, Kasuga M, Todaka D, Maruyama K, Nakashima K, Enju A, Mizukado S, Ahmed S, Yoshiwara K, Harada K, Tsubokura Y, Hayashi M, Sato S, Anai T, Ishimoto M, Funatsuki H, Teraishi M, Osaki M, Shinano T, Akashi R, Sakaki Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2008) Sequencing and analysis of approximately 40,000 soybean cDNA clones from a full-length-enriched cDNA library. *DNA Res.* 15(6): 333-346.
- Umezawa T, Sugiyama N, Mizoguchi M, Hayashi S, Myouga F, Yamaguchi-Shinozaki K, Ishihama Y, Hirayama T, Shinozaki K** (2009) Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acid-activated protein kinases in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106(41): 17588-17593.
- Upchurch RG** (2008) Fatty acid unsaturation, mobilization, and regulation in the response of plants to stress. *Biotechnol. Lett.* 30(6): 967-77.
- Usadel B, Nagel A, Thimm O, Redestig H, Blaesing OE, Palacios-Rojas N, Selbig J, Hannemann J, Piques MC, Steinhauser D, Scheible WR, Gibon Y, Morcuende R, Weicht D, Meyer S, Stitt M** (2005) Extension of the visualization tool MapMan to allow statistical analysis of arrays, display of corresponding genes, and comparison with known responses. *Plant Physiology* 138(3): 1195-1204.
- Usadel B, Bläsing Oe, Gibon Y, Poree F, Höhne M, Günter M, Trethewey R, Kamlage B, Poorter H, Stitt M** (2008) Multilevel genomic analysis of the response of transcripts, enzyme activities and metabolites in *Arabidopsis* rosettes to a progressive decrease of temperature in the non-freezing range. *Plant, Cell and Environment* 31: 518–547.

- Valero D, Martinez-Romero D, Serrano M, Riquelme F** (1998) Postharvest gibberellin and heat-treatment effects on polyamines, abscisic acid and firmness in lemons. *J. Food. Sci.* 63: 611-615.
- Van der Hoeven R, Ronning C, Giovannoni J, Martin G, Tanksley S** (2002) Deductions about the Number, Organization, and Evolution of Genes in the Tomato Genome Based on Analysis of a Large Expressed Sequence Tag Collection and Selective Genomic Sequencing. *The Plant Cell* 14: 1441–1456.
- Van Lelyveld LJ, Bower JP** (1984) Enzyme reactions leading to avocado fruit mesocarp discolouration. *J. Hortic. Sci.* 59: 257-263.
- Varshney RK, Graner A, Sorrells ME** (2005) Genomics-assisted breeding for crop improvement. *Trends Plant Sci.* 10: 621-630.
- Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW** (1995) Serial analysis of gene expression. *Science* 270(5235): 484-487.
- Vercher R, Tadeo FR, Almela V, Zaragoza S, Primo-Millo E, Agustí M** (1994) Rind structure, epicuticular wax morphology and water permeability of Fortune mandarin affected by peel pitting. *Annals of Botany* 74: 619-625.
- Vergonelle C, Vaultier MN, Taconnat L, Renou JP, Kader JC, Zachowski A, Ruelland E** (2005) The cold-induced early activation of phospholipase C and D pathways determines the response of two distinct clusters of genes in *Arabidopsis* cell suspensions. *Plant Physiology* 139(3): 1217-1233.
- Vickers CE, Gershenzon J, Lerdau MT, Loreto F** (2009) A unified mechanism of action for volatile isoprenoids in plant abiotic stress. *Nature Chemical Biology* 5: 283-291.
- Vij S, Tyagi AK** (2007) Emerging trends in the functional genomics of the abiotic stress response in crop plants. *Plant Biotechnol. J.* 5(3): 361-380.
- Viswanathan C, Zhu JK** (2002) Molecular genetic analysis of cold-regulated gene transcription. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 357(1423): 877-886.
- Vlad F, Rubio S, Rodrigues A, Sirichandra C, Belin C, Robert N, Leung J, Rodriguez PL, Laurière C, Merlot S** (2009) Protein phosphatases 2C regulate the activation of the Snf1-related kinase OST1 by abscisic acid in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21(10): 3170-3184.
- Vodkin LO, Khanna A, Shealy R, Clough SJ, Gonzalez DO, Philip R, Zabala G, Thibaud-Nissen F, Sidarous M, Strömvik MV, Shoop E, Schmidt C, Retzel E, Erpelding J, Shoemaker RC, Rodriguez-Huete AM, Polacco JC, Coryell V, Keim P, Gong G, Liu L, Pardinás J, Schweitzer P** (2004) Microarrays for global expression constructed with a low redundancy set of 27500 sequenced cDNAs representing an array of development stages and physiological conditions of the soybean plant. *BMC Genomics* 5: 73.
- Vogel JT, Zarka DG, Van Buskirk HA, Fowler SG, Thomashow MF** (2005). Roles of the CBF2 and ZAT12 transcription factors in configuring the low temperature transcriptome of *Arabidopsis*. *Plant J.* 41: 195–211.

- Wang CY** (1982) Physiological and biochemical responses of plants to chilling stress. *HortScience* 17: 173-186.
- Wang CY** (1987) Changes of polyamines and ethylene in cucumber seedlings in response to chilling stress. *Physiol. Plant.* 69: 253-257.
- Wang CY** (1990) Chilling Injury of Horticultural Crops. *CRC Press, Boca Raton, FL, USA.*
- Wang CY** (1993) Chilling injury of horticultural crops. *CY Wang (ed), CRC Press, Boca Raton, Fla: 301.*
- Wang X** (2001) Plant phospholipases. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 211-231.
- Wang J, Li L, Dan Y** (2003) The correlation between freezing point and soluble solids of fruits. *J. Food Engineering* 60: 481-484.
- Wang CS, Su TH, Huang YJ, Jiang L, Jauh GY** (2004) Gene expression profiles of cold-stored and fresh pollen to investigate pollen germination and growth. *Plant Cell Physiol.* 45(10): 1519-1528.
- Wang X, Li W, Li M, Welti R** (2006) Profiling lipid changes in plant response to low temperatures. *Physiologia Plantarum* 126: 90–96.
- Wang J, Jemielity S, Uva P, Wurm Y, Gräff J, Keller L** (2007) An annotated cDNA library and microarray for large-scale gene-expression studies in the ant *Solenopsis invicta*. *Genome Biol.* 8(1): R9.
- Wang X, Ma Y, Huang C, Li J, Wan Q, Bi Y** (2008) Involvement of glucose-6-phosphate dehydrogenase in reduced glutathione maintenance and hydrogen peroxide signal under salt stress. *Plant Signal Behav.* 3(6): 394-395.
- Wang YH, Mosebach CM, Kibbey AS, Ryhal MK, Jones AD, Palmer JA, Kochian LV** (2009) Generation of *Arabidopsis* Mutants by Heterologous Expression of a Full-Length cDNA Library from Tomato Fruits. *Plant Mol. Biol. Rep.* 27: 454-461.
- Wardowski WF, Nagy S, Grierson W** (1986) (Eds.) *Fresh Citrus Fruits.* AVI Publishing Co, Inc., Westport, CT.
- Watada AE** (1982) CI of horticultural crops: Introduction. *HortScience* 17(2): 160.
- Watkinson JI, Sioson AA, Vasquez-Robinet C, Shukla M, Kumar D, Ellis M, Heath LS, Ramakrishnan N, Chevone B, Watson LT, van Zyl L, Egertsdotter U, Sederoff RR, Grene R** (2003) Photosynthetic acclimation is reflected in specific patterns of gene expression in drought-stressed loblolly pine. *Plant Physiology* 133(4): 1702-1716.
- Webb MS, Gilmour SJ, Thomashow MF, Steponkus PL** (1996) Effects of COR6.6 and COR15am Polypeptides Encoded by COR (Cold-Regulated) Genes of *Arabidopsis thaliana* on Dehydration-Induced Phase Transitions of Phospholipid Membranes. *Plant Physiology* 111(1): 301-312.
- Webber HJ, Reuther W, Lawton HW** (1967) History and development of the *Citrus* industry. *In: W. Reuther, H.J. Webber, and L.D. Batchelor (eds.). The Citrus industry, Vol. I. Div. of Agr. Sci., Univ. of California, Berkeley: 1-39.*

- Weiser CJ** (1970) Cold Resistance and Injury in Woody Plants: Knowledge of hardy plant adaptations to freezing stress may help us to reduce winter damage. *Science* 169(3952): 1269-1278.
- Welti R, Li W, Li M, Sang Y, Biesiada H, Zhou HE, Rajashekar CB, Williams TD, Wang X** (2002) Profiling membrane lipids in plant stress responses. Role of phospholipase D alpha in freezing-induced lipid changes in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 277: 31994–32002.
- Wilcoxon F** (1945) Individual Comparisons by Ranking Methods. *Biometrics Bulletin* 1(6): 80-83.
- Wong WS, Ning W, Xu PL, Kung SD, Yang SF, Li N** (1999) Identification of two chilling-regulated 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase genes from *Citrus* (*Citrus sinensis* Osbeck) fruit. *Plant Mol. Biol.* 41(5): 587-600.
- Wu Z, Burns JK** (2003) Isolation and characterization of a cDNA encoding a lipid transfer protein expressed in 'Valencia' orange during abscission. *J. Exp. Bot.* 54(385): 1183-1191.
- Xiong L, Lee H, Ishitani M, Tanaka Y, Stevenson B, Koiwa H, Bressan RA, Hasegawa PM, Zhu JK** (2002) Repression of stress-responsive genes by FIERY2, a novel transcriptional regulator in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99(16): 10899-10904.
- Xiong L, Zhu JK** (2003) Regulation of abscisic acid biosynthesis. *Plant Physiology* 133(1): 29-36.
- Xu HW, Ji XM, He ZH, Shi WP, Zhu GH, Niu JK, Li BS, Peng XX** (2006) Oxalate accumulation and regulation is independent of glycolate oxidase in rice leaves. *J. Exp. Bot.* 57(9): 1899–1908.
- Xue HW, Chen X, Mei Y** (2009) Function and regulation of phospholipid signalling in plants. *Biochem J.* 421(2): 145-56.
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2006) Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57: 781-803.
- Yang SF, Hoffman NE** (1984) Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiology* 35: 155-189.
- Yang MT, Chen SL, Lin CY, Chen YM** (2005) Chilling stress suppresses chloroplast development and nuclear gene expression in leaves of mung bean seedlings. *Planta* 221(3): 374-385.
- Yang D, Tang ZH, Zhang LP, Zhao ZP, Zheng YL** (2009a) Construction, Characterization, and Expressed Sequence Tag (EST) Analysis of Normalized cDNA Library of Thermo-Photoperiod-Sensitive Genic Male Sterile (TPGMS) Wheat from Spike Developmental Stages. *Plant Molecular Biology Reporter* 27(2): 117-125.
- Yang KZ, Xia C, Liu XL, Dou XY, Wang W, Chen LQ, Zhang XQ, Xie LF, He L, Ma X, Ye D** (2009b) A mutation in Thermosensitive Male Sterile 1, encoding a heat shock protein

- with DnaJ and PDI domains, leads to thermosensitive gametophytic male sterility in *Arabidopsis*. *Plant J.* 57(5): 870-882.
- Yang Z, Ohlrogge JB** (2009) Turnover of fatty acids during natural senescence of *Arabidopsis*, Brachypodium, and switchgrass and in *Arabidopsis* beta-oxidation mutants. *Plant Physiology* 150(4): 1981-1989.
- Yeh S, Moffatt BA, Griffith M, Xiong F, Yang DS, Wiseman SB, Sarhan F, Danyluk J, Xue YQ, Hew CL, Doherty-Kirby A, Lajoie G** (2000) Chitinase genes responsive to cold encode antifreeze proteins in winter cereals. *Plant Physiology* 124(3): 1251-1264.
- Yoo SY, Kim Y, Kim SY, Lee JS, Ahn JH** (2007) Control of flowering time and cold response by a NAC-domain protein in *Arabidopsis*. *PLoS ONE.* 2(7): e642.
- Yoshida T, Nishimura N, Kitahata N, Kuromori T, Ito T, Asami T, Shinozaki K, Hirayama T** (2006) ABA-hypersensitive germination3 encodes a protein phosphatase 2C (AtPP2CA) that strongly regulates abscisic acid signaling during germination among *Arabidopsis* protein phosphatase 2Cs. *Plant Physiol* 140: 115–126.
- Yu X, Peng YH, Zhang MH, Shao YJ, Su WA, Tang ZC** (2006) Water relations and an expression analysis of plasma membrane intrinsic proteins in sensitive and tolerant rice during chilling and recovery. *Cell Res.* 16(6): 599-608.
- Zacarias L, Lafuente MT, Marcos JF, Saladie M, Dupille E** (2003) Regulation of ethylene biosynthesis during cold storage of the chilling-sensitive Fortune mandarin fruit. *En: Vendrel M, Klee H, Pech JC, Romojaro F (eds). Biology and Biotechnology of the Plant Hormone Ethylene, IOS Press, Amsterdam: 112-117.*
- Zaragoza S, Almela V, Tadeo FR, Primo-Millo E, Agustí M** (1996) Effectiveness of calcium nitrate and GA3 on the control of peel-pitting of Fortune mandarin. *J. Hort. Sci.* 71: 321-326.
- Zarka DG, Vogel JT, Cook D, Thomashow MF** (2003) Cold induction of *Arabidopsis* CBF genes involves multiple ICE (inducer of CBF expression) promoter elements and a cold-regulatory circuit that is desensitized by low temperature. *Plant Physiol* 133: 910–918.
- Zhang CK, Lang P, Dane F, Ebel RC, Singh NK, Locy RD** (2005a) Cold acclimation induced genes of trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata*). *Plant Cell Rep* 23: 764–769.
- Zhang CK, Lang P, Ebel RC, Dane F, Singh NK, Locy RD, Dozier WA** (2005b) Down-regulated gene expression of cold acclimated *Poncirus trifoliata*. *Can. J. Plant Sci.* 85: 417-424.
- Zhang H, Sreenivasulu N, Weschke W, Stein N, Rudd S, Radchuk V, Potokina E, Scholz U, Schweizer P, Zierold U, Langridge P, Varshney RK, Wobus U, Graner A** (2004a) Large-scale analysis of the barley transcriptome based on expressed sequence tags. *Plant J* 40: 276-290.
- Zhang JZ, Li ZM, Liu L, Mei L, Yao JL, Hu CG** (2008) Identification of early-flower-related ESTs in an early-flowering mutant of trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata*) by suppression subtractive hybridization and macroarray analysis. *Tree Physiol.* 28(10): 1449-1457.

- Zhang X, Fowler SG, Cheng H, Lou Y, Rhee SY, Stockinger EJ, Thomashow MF** (2004b) Freezing-sensitive tomato has a functional CBF cold response pathway, but a CBF regulon that differs from that of freezing-tolerant *Arabidopsis*. *Plant J.* 39(6): 905-919.
- Zhang Y, Chen C, Jin XF, Xiong AS, Peng RH, Hong YH, Yao QH, Chen JM** (2009) Expression of a rice DREB1 gene, OsDREB1D, enhances cold and high-salt tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *BMB Rep.* 42(8): 486-492.
- Zhao FY, Wang YX, Zhang H** (2006) Transferring the Suaeda salsa glutathione S-transferase and catalase genes enhances low temperature stress resistance in transgenic rice seedlings. *ZhiWu ShenLi Yu Fen Zi ShengWuXueXue Bao* 32: 231–238.
- Zhao DY, Shen L, Fan B, Liu KL, Yu MM, Zheng Y, Ding Y, Sheng JP** (2009) Physiological and genetic properties of tomato fruits from 2 cultivars differing in chilling tolerance at cold storage. *J. Food Sci.* 74(5): C348-352.
- Zhong GY, Goren R, Riov J, Sisler EC, Holland D** (2001) Characterization of an ethylene-induced esterase gene isolated from *Citrus sinensis* by competitive hybridization. *Physiol. Plant.* 113(2): 267–274.
- Zhou H-W, Dong L, Ben-Arie R, Lurie S** (2001) The role of ethylene in the prevention of chilling injury in nectarines. *Journal of Plant Physiology* 158: 55–61.
- Zhu JK, Shi J, Bressan RA, Hasegawa PM** (1993) Expression of an Atriplex nummularia gene encoding a protein homologous to the bacterial molecular chaperone DnaJ. *Plant Cell* 5(3): 341-349.
- Zimmermann G, Bäumllein H, Mock HP, Himmelbach A, Schweizer P** (2006) The multigene family encoding germin-like proteins of barley. Regulation and function in Basal host resistance. *Plant Physiology* 142(1): 181-192.

