



FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO



CENTRO DE ESTUDIOS FOTOSINTÉTICOS Y BIOQUÍMICOS

TESIS DE DOCTORADO

**“METABOLISMO DE DISTINTAS VARIEDADES DE FRUTOS
CÍTRICOS Y SU RESPUESTA A ESTRÉS BIÓTICO Y ABIÓTICO
DURANTE EL PERÍODO POSCOSECHA”**

Presentada por Alejandra Soledad Moreno

Rosario, Argentina

2018

**“METABOLISMO DE DISTINTAS VARIEDADES DE FRUTOS
CÍTRICOS Y SU RESPUESTA A ESTRÉS BIÓTICO Y ABIÓTICO
DURANTE EL PERÍODO POSCOSECHA”**

Alejandra Soledad Moreno

Licenciada en Biotecnología

Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Centro de Estudios Fotosintéticos y Bioquímicos – CEFOBI, dependiente de la Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas y del CONICET, durante el período comprendido entre el 1 ° de Abril de 2013 y el de 18 de Junio de 2018, bajo la dirección del Dr. Florencio E. Podestá y la Co-dirección de la Dra. Valeria E. Perotti.

Director Dr. Florencio E. Podestá.....

Co-Directora Dra. Valeria E. Perotti.....

Dra. Claudia A. Bustamante.....

Dr. Marcos G. Derita

Dr. Ariel R. Vicente

Defendida.....

Publicaciones

Los resultados de esta Tesis fueron volcados en las siguientes publicaciones:

- Perotti, V.E., Moreno, A.S., Trípodí, K.E.J, Del Vecchio, H.A., Meier, G., Bello, F., Cocco, M., Vázquez, D., Podestá, F. E., **2015**. Biochemical characterization of the flavedo of heat-treated orange during postharvest cold storage. *Postharvest Biology and Technology* 99, 80-88.
- Moreno, A.S., Perotti, V.E., Margarit, E., Bello, F., Vázquez, D.E., Podestá, F.E., Trípodí, K.E.J., **2018**. Metabolic profiling and quality assessment during the postharvest of two tangor varieties subjected to heat treatments. *Postharvest Biology and Technology* 142, 10-18

Presentaciones a Congresos

Durante el transcurso de esta Tesis se presentaron los siguientes trabajos a Congresos

Congresos Nacionales:

- Perfil metabólico pertenecientes a dos variedades de *Citrus reticulata* sometidas a tratamiento térmico poscosecha. Moreno, Alejandra S., Trípodí Karina E.J., Perotti, Valeria E., Margarit, Exequiel, Podestá, Florencio E. VIII Jornadas Argentina de Biología y Tecnología Poscosecha. Balcarce, Buenos Aires Argentina. Noviembre de 2015.
- “Biochemical and molecular characterization of two *Citrus reticulata* varieties: Murcott and Ellendale”. Moreno, A.S., Montecchiarini, M.L., Perotti, V.E., Margarit, E., Vázquez, D.E., Podestá, F.E., Trípodí, K.E.J. LII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigaciones en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Ciudad de Córdoba, Córdoba, Argentina. Noviembre de 2016.

Congresos Internacionales:

- Omics as a useful approach to gain insight into the postharvest physiology of citrus. Moreno, A.S., Perotti, V.E., Tripodi, K.E.J., Podestá, F.E., Cocco, M., Bello, F., Vázquez, D. III International Conference on Food Innovation, Food Innova. Concordia, Entre Ríos, Argentina. Octubre 2014.

A mi abuela Elena

Agradecimientos

En primer lugar, quisiera agradecer al Doctor Florencio Podestá, por haberme dado la oportunidad de continuar con mi formación al permitirme participar en su proyecto de investigación, por su confianza y aliento durante todos estos años.

A toda la gente del INTA de Concordia, por su colaboración en este proyecto.

A la doctora Valeria Perotti quien fue una gran guía durante mis comienzos en la mesada, auxiliándome con su conocimiento y experiencia. También quiero agradecerle por sus sugerencias a lo largo de estos años, las cuales han sido fundamentales para mi formación profesional.

A la doctora Karina Trípodí por haberme ayudado en mi trabajo de mesada, con esa gran humildad e integridad que la caracterizan. Por contribuir a ampliar mi conocimiento no sólo científico sino también docente. Por enseñarme con el ejemplo a superarme y dar lo mejor de mí a la docencia.

Al doctor Ezequiel Margarit por brindarme de manera humilde y desinteresada su conocimiento. Por ayudarme a desarrollar habilidades como la de trabajar de manera enfocada, observando e interpretando de manera crítica los resultados para poder formular nuevas hipótesis de trabajo. Por contagiarme con su enorme curiosidad y dedicación por la ciencia.

A todos mis compañeros que hicieron y hacen del CEFOTI un lugar muy ameno de trabajo.

A mis amigos de toda la vida Cristián, Natalia, Marina y Pamela y a mis nuevos amigos Carolina, Marcos, Luisina, Ezequiel, Ivana y Lisandro por estar siempre, tanto en los momentos lindos como en los difíciles, sacándome siempre una sonrisa.

Finalmente, quiero agradecerle a mi familia, por haber estado siempre presente, por compartir mis alegrías y por ayudarme a seguir adelante en los momentos difíciles. A mis padres, Mary y Jorge, por ser mi inspiración. Por enseñarme la templanza y perseverancia para volver mis sueños realidad. A mi hermano Martín y a mi abuela Elena que es la estrella que ilumina mi camino.

ÍNDICE

ÍNDICE	I
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ÍNDICE DE TABLAS	VI
ABREVIATURAS	VII
ANGLICISMOS	X
RESUMEN	XI
1.INTRODUCCIÓN	
1.1. PANORAMA MUNDIAL Y NACIONAL DE LA PRODUCCIÓN DE FRUTOS CÍTRICOS	1
1.2. GENERALIDADES DEL METABOLISMO DE LOS FRUTOS CÍTRICOS DURANTE SU MADURACIÓN	1
1.3. PARÁMETROS QUE DETERMINAN LA CALIDAD INTERNA DE LOS CÍTRICOS	3
1.4. PERÍODO POSCOSECHA Y SU LOCALIZACIÓN EN EL SISTEMA DE PRODUCCIÓN FRUTIHORTÍCOLA	3
1.5. FACTORES QUE DETERMINAN EL FENOTIPO POSCOSECHA EN FRUTAS Y VERDURAS	4
1.6. TIPOS DE ESTRÉS QUE ENFRENTAN LOS CÍTRICOS DURANTE EL PERIODO POSCOSECHA	6
1.6.1. HERIDAS.....	6
1.6.2. PATÓGENOS QUE AFECTAN LA PRODUCCIÓN DE CÍTRICOS Y PROCEDIMIENTOS PARA SU CONTROL	7
1.7. RESISTENCIA INDUCIDA POR TRATAMIENTO TÉRMICO POSCOSECHA DE FRUTOS CÍTRICOS	9
1.8. SISTEMA ANTIOXIDANTE	11
1.8.1. ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO Y MECANISMOS DE DEFENSA	11
1.8.2. ERO Y RESPUESTA A DIFERENTES TIPOS DE ESTRÉS EN FRUTOS	13
1.9. OMICAS.....	14
1.9.1. CONCEPTOS GENERALES DE METABOLÓMICA.....	14
1.9.2. UNA VISIÓN GLOBAL A LA GENERACIÓN Y PROCESAMIENTO DE DATOS.....	15
1.9.3. METABOLÓMICA APLICADA A FRUTOS CÍTRICOS	16
1.9.4. ASPECTOS GENERALES DE LA PROTEÓMICA	16
1.10. ANTECEDENTES EN EL TEMA.....	19
1.11. OBJETIVOS.....	21
1.11.1. OBJETIVO GENERAL	21
1.11.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
2.MATERIALES Y MÉTODOS	
2.1. MATERIAL VEGETAL.....	23
2.1.1. NARANJAS VAR. VALENCIA LATE	23
2.1.2. MANDARINAS VAR. ELLENDALE Y MURCOTT.....	23
2.2. TRATAMIENTOS TÉRMICOS.....	23
2.2.1. APLICADOS A NARANJAS VAR. VALENCIA LATE	23
2.2.2. APLICADOS A MANDARINAS VAR. ELLENDALE Y MURCOTT	24
2.3. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS FISIOLÓGICOS DE FRUTOS DE C. RETICULATA VAR. MURCOTT Y ELLENDALE	25
2.3.1. PARÁMETROS DE CALIDAD INTERNA DE FRUTOS	25
2.3.2. CONTENIDO DE COMPUESTOS VOLÁTILES EN EL JUGO.....	26
2.4. DETERMINACIÓN DE LA INCIDENCIA DE PODREDUMBRE	26
2.5. ANÁLISIS DE METABOLITOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA GASEOSA- ESPECTROMETRÍA DE MASA (CG-EM)	27
2.5.1. ANÁLISIS DE METABOLITOS PRIMARIOS	27
2.5.1.1. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS A PARTIR DE FLAVEDO DE FRUTOS DE C. RETICULATA VAR ELLENDALE Y MURCOTT.....	27
2.5.1.2. DERIVATIZACIÓN DE LAS MUESTRAS Y CORRIDA CROMATOGRÁFICA	28
2.5.2. ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS	29
2.5.2.1. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS A PARTIR DE SACOS Y FLAVEDO DE LOS FRUTOS	29
2.5.2.2. METILACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS ESTERIFICADOS A FOSFOLÍPIDOS Y CORRIDA CROMATOGRÁFICA	29
2.6. ANÁLISIS DE METABOLITOS SECUNDARIOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA- ESPECTROMETRÍA DE MASAS (CL-EM).....	30
2.6.1. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS A PARTIR DE FLAVEDO DE LOS FRUTOS.....	30
2.6.2. CORRIDA CROMATOGRÁFICA	30
2.7. CUANTIFICACIÓN DE AMINOÁCIDOS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN	31
2.8. REPARACIÓN DE EXTRACTOS CRUDOS PARA ENSAYOS DE MEDICIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y WESTERN BLOT	32
2.9. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	32

2.10.	ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRÍA	32
2.10.1.	Alanina aminotransferasa (Ala-AT, EC 2.6.1.2):	33
2.10.2.	Fosfofructokinasa dependiente de ATP (ATP-PFK, EC 2.7.1.11):	33
2.10.3.	Fosfofructokinasa dependiente de pirofosfato (PPI-PFK, EC 2.7.1.90):	33
2.10.4.	Fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC, EC 1.1.1.31):	33
2.10.5.	Fosfoenolpiruvato carboxikinasa (PCK, EC 4.1.1.49):	33
2.10.6.	Fosfoglucoisomerasa (PGI, EC 5.3.1.9):	33
2.10.7.	Fosfoglucomutasa (PGM, EC 2.7.5.1):	33
2.10.8.	Fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa, EC 3.1.3.11):	33
2.10.9.	Fumarasa (EC 4.2.1.2):	34
2.10.10.	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (Ga3DH, EC 1.2.1.12):	34
2.10.11.	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa no fosforilante (npGa3DH, EC 1.2.1.9):	34
2.10.12.	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH, EC 1.1.1.49):	34
2.10.13.	Glutamato oxaloacetato transaminasa (GOT, EC 2.6.1.1):	34
2.10.14.	Hexokinasa (HK, EC 2.7.1.1):	34
2.10.15.	Invertasa neutral (IN, EC 3.2.1.26):	34
2.10.16.	Invertasa ácida (IA, EC 3.2.1.26):	34
2.10.17.	Malato deshidrogenasa (MDH, EC 1.1.1.37):	34
2.10.18.	Enzima málica dependiente de NAD (NAD-ME, EC 1.1.1.39):	35
2.10.19.	Enzima málica dependiente de NADP (NADP-ME, EC 1.1.1.40):	35
2.10.20.	Piruvato kinasa (PK, EC 2.7.1.40):	35
2.10.21.	Sacarosa sintasa (SS, EC 2.4.1.13):	35
2.10.22.	Sacarosa fosfato sintasa (SPS, EC 2.4.1.14):	35
2.10.23.	Succinato deshidrogenasa (EC 1.3.5.1):	35
2.11.	ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS	36
2.11.1.	ELECTROFORESIS EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES	36
2.11.2.	ELECTROFORESIS EN CONDICIONES NO DESNATURALIZANTES	36
2.11.2.1.	ACTIVIDAD SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD)	37
2.11.2.2.	ACTIVIDAD PEROXIDASA (POD)	37
2.11.2.3.	ACTIVIDAD CATALASA (CAT)	37
2.12.	ENSAYOS DE WESTERN BLOT	38
2.13.	ANÁLISIS DEL PROTEOMA DIFERENCIAL MEDIANTE LA TÉCNICA DE SHOTGUN (NANOHPCLC-EM)	39
2.13.1.	PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS PROTEICOS	39
2.13.2.	IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	40
2.13.3.	ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LOS DATOS	41
2.14.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	42
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
3.1.	ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO POSCOSECHA EN NARAJAS CITRUS SINENSIS VAR. VALENCIA LATE	43
3.1.1.	INTRODUCCIÓN	44
3.1.2.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
3.1.2.1.	ANÁLISIS DE LA ENZIMOLOGÍA DEL METABOLISMO DE HIDRATOS DE CARBONO	45
3.1.2.1.1.	METABOLISMO DE LA SACAROSA	45
3.1.2.1.2.	METABOLISMO PRIMARIO: LA GLUCÓLISIS Y LA GLUCONEOGÉNESIS	46
3.1.2.1.3.	ESTADO REDOX	50
3.1.2.1.4.	FUNCIÓN MITOCONDRIAL	51
3.1.2.2.	INDUCCIÓN DE HSP	52
3.1.2.3.	EFFECTO DEL TRATAMIENTO TÉRMICO Y ALMACENAMIENTO EN FRÍO SOBRE LOS FENILPROPANOIDEOS	53
3.1.3.	CONCLUSIÓN	54
3.2.	CARACTERIZACIÓN Y ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO POSCOSECHA EN MANDARINAS CITRUS RETICULATA VAR. ELLENDALE Y MURCOTT	56
3.2.1.	INTRODUCCIÓN	57
3.2.2.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	59
3.2.2.1.	ANÁLISIS DE LOS PARÁMETROS QUE DETERMINAN LA CALIDAD INTERNA DE FRUTOS DE MANDARINA VAR. ELLENDALE Y MURCOTT	59
3.2.2.2.	OBTENCIÓN DEL PERFIL METABÓLICO UTILIZANDO DIVERSAS ESTRATEGIAS CROMATOGRÁFICAS	61
3.2.2.2.1.	CONTENIDO RELATIVO DE METABOLITOS PRIMARIOS EN EPICARPIO DE MANDARINA VAR. ELLENDALE Y MURCOTT	64
3.2.2.2.2.	CONTENIDO DE AMINOÁCIDOS EN EPICARPIO DE MANDARINA VAR. ELLENDALE Y MURCOTT	69
3.2.2.2.3.	ÁCIDOS GRASOS	71
3.2.2.2.4.	CONTENIDO RELATIVO DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN EPICARPIO DE ELLENDALE Y MURCOTT	73
3.2.2.3.	ENZIMAS DEL METABOLISMO ANTIOXIDANTE	75
3.2.2.4.	EFFECTO DEL TRATAMIENTO TÉRMICO POSCOSECHA Y DEL ALMACENAMIENTO A BAJA TEMPERATURA EN LA CALIDAD INTERNA DE MANDARINAS ELLENDALE Y MURCOTT	78

3.2.2.5.	ANÁLISIS DE PERFILES METABÓLICOS DE EPICARPIO DE FRUTOS EXPUESTOS A TRATAMIENTO TÉRMICO Y ALMACENAMIENTO POSCOSECHA.....	82
3.2.2.6.	ESTUDIO DEL PROTEOMA DE EPICARPIO DE FRUTOS EXPUESTOS A TRATAMIENTO TÉRMICO DURANTE EL ALMACENAMIENTO EN FRÍO.....	89
3.2.2.6.1.	ANÁLISIS PRELIMINAR DEL PROTEOMA DIFERENCIAL	89
3.2.2.6.2.	ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO DE PROTEÍNAS Y EVALUACIÓN DE LOS METABOLISMOS AFECTADOS POR EL TRATAMIENTO TÉRMICO A 0 DÍAS DE ALMACENAMIENTO	93
3.2.2.6.3.	ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO DE PROTEÍNAS Y EVALUACIÓN DE METABOLISMOS AFECTADOS POR EL TRATAMIENTO TÉRMICO A 7 DÍAS DE ALMACENAMIENTO	103
3.2.2.7.	ESTUDIO DEL SISTEMA ANTIOXIDANTE EN EPICARPIO DE FRUTOS TRATADOS Y CONTROLES DURANTE EL ALMACENAMIENTO EN FRÍO.....	118
3.2.3.	CONCLUSIONES	122
4.CONCLUSIONES		
4.1.	CONCLUSIONES.....	123
5.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		
5.1.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	125

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. 1. Síntomas de daño por frío, picado o pitting	5
Figura 1. 2. Síntomas visuales de la infección por <i>Penicillium digitatum</i>	8
Figura 1. 3. Cámara de aire donde se realizan los tratamientos térmicos largos.....	9
Figura 1. 4. Vías de eliminación de las ERO en plantas	13
Figura 1. 5. Esquema general de generación y procesamiento de datos en metabolómica	16
Figura 1. 6. Esquema de la secuencia de pasos de la técnica de shotgun.....	18
Figura 2. 1. Diseño experimental en mandarinas Ellendale y Murcott	25
Figura 3. 1 Actividad de las enzimas en flavedo control y curado de naranja Valencia Late	46
Figura 3. 2 Actividad de las enzimas en flavedo control y curado de naranja Valencia Late	49
Figura 3. 3. La inmunodetección de PPI-PFK a partir de extractos de epicarpio de naranja Valencia Late.....	50
Figura 3. 4. Inmunodetección de HSP70 y de HSP de bajo peso molecular a partir de extractos de epicarpio de naranja Valencia Late.....	52
Figura 3. 5 Cuantificación relativa de flavonoides en extractos epicarpio de naranja Valencia Late	53
Figura 3. 6. Cuantificación relativa de metabolitos secundarios en extractos de epicarpio de naranja Valencia Late	54
Figura 3. 7. Características externas de frutos de <i>Citrus reticulata</i> var. Ellendale y Murcott.....	58
Figura 3. 8. Determinación de los parámetros de calidad interna en frutos de Ellendale y Murcott.....	60
Figura 3. 9. Agrupamiento jerárquico de metabolitos primarios, secundarios, aminoácidos, ácidos grasos esterificados a fosfolípidos de membrana en extractos de epicarpio de frutos var. Ellendale (E) y Murcott (M).....	63
Figura 3. 10. Cuantificación relativa de metabolitos primarios en extractos de epicarpio de Ellendale y Murcott	64
Figura 3. 11. Cuantificación absoluta de aminoácidos en extractos de epicarpio de Ellendale y Murcott.....	70
Figura 3. 12. Cuantificación relativa de ácidos grasos totales esterificados a fosfolípidos de membrana mono, di o triacilgliceroles en extractos de epicarpio y endocarpio de Ellendale y Murcott	73
Figura 3. 13. Cuantificación relativa de metabolitos secundarios en extractos de epicarpio de mandarinas var. Ellendale y Murcott.....	75
Figura 3. 14. Análisis de las enzimas POD (A), SOD (B), y CAT (C) en extractos de epicarpio de mandarinas var. Ellendale y Murcott mediante electroforesis en condiciones no desnaturalizantes revelados por actividad enzimática.....	75
Figura 3. 15. Densitometría de la actividad de POD, SOD y CAT en extractos de epicarpio de mandarinas var. Ellendale y Murcott.....	76
Figura 3. 16. Ensayos de inhibición de la actividad de SOD en flavedo mandarinas var. Ellendale y Murcott mediante electroforesis en condiciones no desnaturalizantes revelados por actividad enzimática	77
Figura 3. 17. Efecto del tratamiento térmico sobre la incidencia de podredumbre en las variedades Ellendale y Murcott después de 30 días de realizar la inoculación con <i>P. digitatum</i>	79
Figura 3. 18 Parámetros de calidad interna de frutos de mandarina var. Ellendale y Murcott expuestos tratamiento térmico y almacenamiento a 5°C.....	81
Figura 3. 19. Contenido relativo de metabolitos en flavedos de mandarinas Ellendale y Murcott expuestos tratamiento térmico y posterior almacenamiento a 5°C.....	82
Figura 3. 20. Análisis de componentes principales en flavedo de Ellendale y Murcott expuestos a tratamiento térmico y almacenamiento a 5°C	83
Figura 3. 21. Análisis estadístico de metabolitos que contribuyen a la componente principal 1 (CP1).....	85
Figura 3. 22. Análisis estadístico de metabolitos que contribuyen a la componente principal 2 (CP2).....	86
Figura 3. 23. Variación del Índice de doble enlace (DBI) en epicarpio de Ellendale y Murcott	88
Figura 3. 24. Diagrama de Venn para las proteínas que incrementaron y disminuyeron de manera significativa en epicarpios heridos de mandarinas Ellendale y Murcott, expuestos a tratamiento térmico y 0 días de almacenamiento	91
Figura 3. 25. Diagrama de Venn para las proteínas que incrementaron y disminuyeron de manera significativa en epicarpios heridos expuestos de mandarinas Ellendale y Murcott, a tratamiento térmico y 7 días de almacenamiento	92
Figura 3. 26. Enriquecimiento de las 115 proteínas que incrementaron en respuesta a tratamiento térmico a 0 días almacenamiento en flavedo de mandarinas Ellendale	95
Figura 3. 27. Enriquecimiento de las 19 proteínas que incrementaron en respuesta a tratamiento térmico a 0 días almacenamiento en flavedo de mandarinas Ellendale y Murcott.....	98
Figura 3. 28. Enriquecimiento de las 91 proteínas que aumentaron en respuesta a tratamiento térmico a 7 días almacenamiento en flavedo de mandarinas Ellendale	105
Figura 3. 29 Enriquecimiento de las 83 proteínas que disminuyeron en respuesta a tratamiento térmico a 7 días almacenamiento en flavedo de mandarinas Ellendale	108
Figura 3. 30 Enriquecimiento de las 11 proteínas que disminuyeron en respuesta a tratamiento térmico a 7 días almacenamiento en flavedo de mandarinas Murcott	111
Figura 3. 31 Enriquecimiento de las 19 proteínas que incrementaron su nivel en respuesta a tratamiento térmico a 7 días almacenamiento en flavedo de mandarinas Ellendale y Murcott	114

Figura 3. 32 Enriquecimiento de las 23 proteínas que disminuyeron en respuesta a tratamiento térmico a 7 días almacenamiento en flavedo de mandarinas Ellendale y Murcott..... 115

Figura 3. 33. Análisis de las enzimas POD (A, D), SOD (B, E) y CAT (C, F) en extractos de epicarpio herido mandarinas var. Ellendale y Murcott expuestos a tratamiento térmico y almacenamiento a 5°C mediante electroforesis en condiciones no desnaturalizantes revelados por actividad enzimática 119

Figura 3. 34. Densitometría de la actividad de POD, SOD y CAT en extractos de epicarpio heridos de mandarinas var. Ellendale y Murcott expuestas a tratamiento térmico y almacenamiento a 5°C. 120

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3. 1. Metabolitos determinados por CG-EM, HPLC y CL-EM.....	62
Tabla 3. 2. Porcentaje de contribución de cada uno de los metabolitos a las componentes principales 1 (CP1) y 2 (CP2)	84
Tabla 3. 3. Proteínas identificadas a partir de los programas Proteome Discoverer y Perseus.....	90
Tabla 3. 4. Descripción de los principales proteínas involucradas en la categoría de ontología génica: Respuesta estímulo, que incrementaron en epicarpio de Ellendale en respuesta al tratamiento térmico a los 0 días de almacenamiento	97
Tabla 3. 5. Descripción de los principales metabolismos afectados por tratamiento térmico en flavedo mandarinas Ellendale y Murcott almacenadas a 0 días	102
Tabla 3. 6. Descripción de las principales proteínas involucradas en la categoría de ontología génica: Respuesta estímulo abiótico, que aumentaron en epicarpio de Ellendale en respuesta al tratamiento térmico a los 7 días de almacenamiento	106
Tabla 3. 7. Descripción de las principales proteínas involucradas en la categoría de ontología génica: Respuesta estímulo abiótico, que disminuyeron en epicarpio de Ellendale en respuesta al tratamiento térmico a los 7 días de almacenamiento	109
Tabla 3. 8 Descripción de las principales proteínas involucradas en la categoría de ontología génica: Procesos metabólicos primarios, que disminuyeron en epicarpio de Murcott en respuesta al tratamiento térmico a los 7 días de almacenamiento	113
Tabla 3. 9. Descripción de los principales metabolismos afectados por tratamiento térmico en flavedo mandarinas Ellendale y Murcott almacenadas a 7 días	117

ABREVIATURAS

2-ME	2-mercaptoetanol
2 ODD	2-oxoglutarato dioxigenasa dependiente de Fe (II)
AA	Aminoácido
ACP	Análisis de componentes principales
ADP	Adenosina difosfato
AG	Ácido graso
AGI	Ácido graso insaturado
AGT	Ácido grado triénico
Ala-AT	Alanina aminotransferasa
APG	Agar papa glucosado
AT	Acidez titulable
ATP	Adenosina trifosfato
ATP-PFK	Fosfofructoquinasa dependiente de ATP
BCA	Ácido bicinconínico
BCIP	5-bromo 4-cloro 3-indol-fosfato
BSA	Albúmina sérica bovina
CAT	Catalasa
CG-EM	Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa
CL-EM	Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa
CoA	Coenzima A
Da	Dalton
DBI	Índice de doble enlace
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	Ácido etilenglicoltetraacético
EM-NAD	Enzima málica dependiente de NAD
EM-NADP	Enzima málica dependiente de NADP
ERO	Especies reactivas del oxígeno
ESI	Ionizador de electrospray
FBPasa	Fructosa-1,6-bisfosfatasa
Fru-2,6-P2	Fructosa-2,6-bisfosfato
Fru-6-P	Fructosa-6-fosfato
Fructosa-1,6-P2	Fructosa-1,6-bisfosfato

Full MS	Espectro de masa completo
G6P DH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
Ga3DH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GDH/TPI	Glicerofosfato deshidrogenasa/triosa fosfato isomerasa
Glc-6-P	Glucosa-6-fosfato
GOT	Glutamato oxaloacetato transaminasa
gpf	Gramo de peso fresco
GPX	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
HK	Hexoquinasa
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HSP	Proteína del shock térmico
IA	Invertasa ácida
IM	Índice de madurez
IN	Invertasa neutral
IPTG	Isopropil β -D tiogalactopiranósido
KDa	Kilodalton
LDH	Lactato deshidrogenasa
MDH	Malato deshidrogenasa
MSMS	Espectro de masa en tándem
MSTFA	N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NAD-MDH	Malato deshidrogenasa dependiente de NAD
NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NBT	Azul de nitrotetrazolio
NEA	Noreste argentino
npGa3PDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa no fosforilante
OAA	Oxaloacetato
PA	Poliaminas
PAL	Fenilalanina amonioliasa
PBS	Buffer fosfato salino
PCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
PDC	Piruvato decarboxilasa
PEG	Polietilenglicol

PEP	Fosfoenolpiruvato
PEPC	Fosfoenolpiruvato carboxilasa
PGI	Fosfogluco isomerasa
PGM	Fosfogluco mutasa
PK	Piruvato quinasa
PMSF	Fenil metil sulfonil fluoruro
POD	Peroxidasa
PPi	Pirofosfato
PPi-PFK	Fosfofructoquinasa dependiente de PPi
ppm	Partes por millón
PVPP	Polivinil poli pirrolidona
SOD	Superóxido dismutasa
SPS	Sacarosa fosfato sintasa
SS	Sacarosa sintasa
SST	Sólidos solubles totales
TBE	Tris borato EDTA
TBS	Buffer Tris salino
TCA	Ciclo de ácidos tricarboxílicos
TEA	Trietanolamina
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
UDP	Uridina difosfato
UDPG	Uridina difosfogluco
UV	Ultravioleta

ANGLICISMOS

Pellet: precipitado.

Buffer: solución reguladora, amortiguadora o tampón, que permite controlar la concentración libre de un determinado componente a pesar de un cambio en su concentración total (por ejemplo, pH).

Western blot: se refiere a la técnica que emplea la transferencia de proteínas separadas electroforéticamente a una membrana apropiada para un posterior revelado con anticuerpos específicos.

Heat map: representación bidimensional de datos en donde los valores se representan por colores

Shotgun: técnica de proteómica utilizada para identificar proteínas en mezclas complejas usando una combinación de cromatografía líquida de alta resolución combinada con espectrometría de masas para separar e identificar los péptidos resultantes de la digestión proteolítica.

Boxplot: diagrama de caja

Missed Cleavages: Muestra el número de sitios de escisión en una secuencia de péptido que un reactivo de escisión (enzima) no escindió. Este número excluye los casos en que un aminoácido como la prolina inhibe la enzima de escisión.

RESUMEN

Los cítricos, al igual que todos los frutos, son órganos que permanecen vivos aún después de ser cosechados. Por lo tanto, respiran y transpiran continuando de esta manera su ontogenia hacia la senescencia y muerte. Al ser privados de su fuente de nutrientes y agua, son más susceptibles a deteriorarse rápidamente si no se toman las medidas adecuadas. En adición, durante el período poscosecha, el cual comienza con la cosecha y termina cuando el fruto llega a manos del consumidor, los cítricos deben enfrentar distintos tipos de estrés. Dentro de los más comunes, se encuentran las heridas, el almacenamiento a bajas temperaturas y la infección por parte de una amplia gama de patógenos. Si bien, el almacenamiento a bajas temperaturas es una estrategia ampliamente utilizada para prolongar la vida poscosecha, en el caso particular de los cítricos puede tener consecuencias negativas ya que éstos son susceptibles al daño por frío.

En conjunto, las diversas dificultades mencionadas en el párrafo anterior junto a la creciente exigencia de los mercados consumidores tendientes a evitar la utilización de fungicidas químicos para el control de podredumbre causada por distintos patógenos, impulsaron a la tecnología poscosecha a desarrollar una amplia gama de técnicas dentro de las cuales se encuentran los tratamientos térmicos.

En cítricos, la podredumbre verde, causada por el hongo patógeno *Penicillium digitatum*, es la principal causa de las pérdidas durante la poscosecha de este cultivar; no sólo en nuestro país sino también a nivel mundial. Los tratamientos térmicos reducen la incidencia de podredumbre gracias a la combinación de efectos directos sobre el patógeno e indirectos sobre el fruto. Además, también incrementan la tolerancia a frío.

En la presente Tesis se describen estudios dirigidos a encontrar los cambios que ocurren a nivel proteico y metabólico durante la poscosecha en frutos de naranja (*Citrus sinensis*) y en dos variedades de mandarina (*Citrus reticulata*) expuestos al tratamiento de curado y almacenados a 5°C durante diferentes períodos de tiempo, emulando las condiciones de comercialización. El tratamiento en estudio es empleado como método alternativo al uso de fungicidas para el control de *Penicillium digitatum*. Fue posible observar varias alteraciones en el metabolismo

de los frutos bajo tratamiento térmico respecto de los controles. Particularmente, dichos cambios están vinculados a respuestas de defensa y virulencia, lo que explicaría la efectividad del tratamiento evaluado frente al ataque de los patógenos fúngicos. Paralelamente, se observan modificaciones tendientes al mantenimiento de la homeostasis celular, lo que se evidencia en la excelente calidad poscosecha de los frutos tratados.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. PANORAMA MUNDIAL Y NACIONAL DE LA PRODUCCIÓN DE FRUTOS CÍTRICOS

La producción y el consumo mundial de cítricos, ya sea como fruta fresca o como producto elaborado, han registrado un fuerte incremento desde mediados de los años 1980. Los principales productores mundiales de cítricos son China, Brasil, Estados Unidos, seguidos de México, España, Egipto, Turquía y Argentina. En este contexto, nuestro país en el año 2016, produjo 3,280 millones de toneladas de cítricos, ocupando de esta manera el octavo puesto en el ranking mundial (<http://www.federcitrus.org/wp-content/uploads/2017/10/Act-Citricola-17.pdf> , consultado 12 de Marzo de 2018). En Argentina, la producción citrícola se divide en dos regiones principales, el **NOROESTE ARGENTINO (NOA)**, constituido por las provincias de Tucumán, Salta, Catamarca y Jujuy, y el **NORESTE (NEA)** formado por las provincias de Entre Ríos, Corrientes, Misiones y Buenos Aires. Mientras que la primera región se destaca por producir limones y pomelos, siendo Tucumán la principal provincia exportadora a nivel mundial de limones, la segunda se caracteriza por la producción de naranjas y mandarinas que, a través de innumerables variedades orientadas a los gustos de los distintos mercados, se cosechan y exportan a lo largo de casi todo el año. Estadísticas publicadas por Federcitrus en el año 2017, ubican a Entre Ríos como la principal provincia productora de naranjas y mandarinas (<http://www.federcitrus.org/wp-content/uploads/2017/10/Act-Citricola-17.pdf> , consultado 12 de Marzo de 2018). Cabe destacar que la importancia del cultivo de cítricos en esta provincia no sólo radica en el elevado volumen de producción sino también en el alto grado de exportación que posee. Los principales mercados externos de cítricos frescos argentinos son la Unión Europea y la federación Rusa (<http://www.federcitrus.org/wp-content/uploads/2017/10/Act-Citricola-17.pdf> , consultado 12 de Marzo de 2018).

1.2. GENERALIDADES DEL METABOLISMO DE LOS FRUTOS CÍTRICOS DURANTE SU MADURACIÓN

Los estadios tempranos en el desarrollo de los frutos cítricos se caracterizan por una acumulación masiva de ácido cítrico en la vacuola y la consecuente disminución del pH vacuolar.

Transcurriendo el desarrollo de los frutos, el contenido de ácido cítrico en la vacuola disminuye en forma dependiente de la temperatura ambiente y de otras

condiciones ambientales, con un incremento concomitante en el pH (Marsh, 2000; Yamaki, 1990). El citrato sale de la vacuola al citosol por un mecanismo poco conocido, pero se postula que sería de manera pasiva, en tanto que la V-PPiase (bomba de protones del tonoplasto dependiente de PP_i) podría utilizar el gradiente de protones para sintetizar PP_i , incrementando el pH vacuolar (Marsh, 2000), como se amplía a continuación.

A medida que el fruto madura, algunas características anatómicas y físicas del pericarpio desarrollan una barrera efectiva contra el intercambio de gas, resultando en una privación parcial de oxígeno y una respiración aeróbica reducida en el interior de las células de los sacos de jugo. Este cambio en el metabolismo de los hidratos de carbono se evidencia por aumentos en los niveles de etanol y acetaldehído en los frutos en maduración y almacenados (Hirai, 1997; Roe, 1984). En las células vegetales, en respuesta a la baja presión de oxígeno, el contenido de ATP decrece con el correspondiente incremento de la relación ADP/ATP. Esta marcada disminución en el estado energético fue observada en células de los sacos de jugo de fruta cítrica madura (Bruemmer, 1985). Cuando los niveles de ATP son bajos adquieren un rol importante la fosfofructoquinasa dependiente de PP_i (PFP) así como también la vía de la sacarosa sintasa en la degradación de sacarosa, dado que en ambos casos se utiliza PP_i , cuyos niveles permanecen constantes en el citosol bajo estas condiciones (Plaxton, 2006). De esta manera, la V-PPiase vacuolar involucrada en la desacidificación tendría una función importante en las condiciones anaeróbicas (ATP limitado) que predominan durante los últimos estadios de la maduración del fruto proporcionando PP_i para las enzimas mencionadas.

En síntesis, durante el desarrollo del fruto la sacarosa importada desde la planta es metabolizada por la vía glicolítica, previa acción de las enzimas hidrolíticas (invertasa ácida y neutra y sacarosa sintasa) cuyas actividades son altas en los primeros estadios, generándose así la acumulación de citrato (Holland, 1999; Lowell, 1989). Posteriormente, durante la maduración, los niveles de citrato disminuyen, ya que éste es metabolizado, generándose sustratos para la respiración y biosíntesis, y acumulándose azúcares (sacarosa, fructosa y glucosa). (Holland, 1999; Lowell, 1989). De esta manera, el aumento en el contenido de los azúcares y el concomitante descenso en los ácidos resultan en un incremento en el índice de madurez (relación azúcares solubles/ácidos).

1.3. PARÁMETROS QUE DETERMINAN LA CALIDAD INTERNA DE LOS CÍTRICOS

La calidad interna de los cítricos se encuentra definida por distintos parámetros, dentro de los cuales el sabor es uno de los más relevantes. Este parámetro está gobernado por tres factores principales: gusto, aroma y palatabilidad. El gusto se encuentra definido por el contenido de azúcares y ácidos orgánicos presentes en los sacos de jugo. En cítricos, los principales hidratos de carbono son: glucosa, fructosa y sacarosa; mientras que el ácido cítrico constituye entre el 85% y 90% del contenido total de ácidos orgánicos (Tietel y col., 2017). El parámetro sólidos solubles totales (SST) describe el nivel de azúcares en los sacos de jugo y el contenido de ácidos orgánicos es definido por la acidez titulable (AT). La relación que existe entre ellos es conocida como índice de madurez ($IM=SST/AT$) y es un parámetro muy utilizado por los productores a la hora de cosechar y decidir si los frutos serán destinados al mercado interno o al externo. En Argentina el IM se encuentra reglamentado por el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA). Otro de los factores que determinan el sabor es el aroma; el mismo se encuentra definido por diferentes compuestos volátiles como por ejemplo alcoholes, cetonas, aldehídos, terpenos y ésteres, entre otros (Barboni y col., 2009; Elmaci y Altug, 2005; Dharmawan y col., 2007; Moshonas y Shaw, 1997; Perez y col., 2005; Qiao y col., 2007, Tietel y col., 2010; 2011). Por último, la interacción fisicoquímica de macromoléculas, como por ejemplo la pectina, con compuestos volátiles y no volátiles, durante la masticación del fruto determina la palatabilidad (Tietel y col., 2010).

Finalmente, cabe destacar que, además de la calidad interna de los frutos, diversos estudios han demostrado que la elección del consumidor a la hora de comprar un fruto fresco se basa fuertemente en la apariencia exterior del mismo. Un aspecto desagradable puede ser suficiente para descartar el producto de inmediato. Los aspectos de la calidad externa importantes para los consumidores son tamaño, color, forma y firmeza (Gao y col., 2011).

1.4. PERÍODO POSCOSECHA Y SU LOCALIZACIÓN EN EL SISTEMA DE PRODUCCIÓN FRUTIHORTÍCOLA

El sistema de producción frutihortícola, como todo sistema productivo, es muy complejo. Existen estrechas interrelaciones entre los diferentes componentes, bióticos o abióticos y naturales o con participación del hombre que interactúan en

el sistema. Dentro del mismo existen dos áreas bien diferenciadas en el tiempo y en el espacio conocidas como precosecha y poscosecha. Así, durante la precosecha, la interacción del ambiente y el genotipo junto con otros factores bióticos dan como resultado la producción de frutas y hortalizas de una determinada calidad. Estas, una vez cosechadas, comienzan el período de vida poscosecha. En esta etapa, la calidad del producto va disminuyendo a medida que transcurre el tiempo.

Es fundamental tener en cuenta que durante el período poscosecha se trabaja con productos vivos que, por lo tanto, respiran y transpiran continuando de esta manera su ontogenia hacia la senescencia y muerte. Estos, al ser privados de su fuente de nutrientes y agua, son susceptibles de deteriorarse rápidamente si no se toman las medidas correspondientes. Esta problemática impulsó a la tecnología poscosecha a desarrollar una amplia gama de estrategias dentro de las cuales se encuentran: el almacenamiento a bajas temperaturas, tratamientos térmicos, tratamientos químicos, entre otros. A pesar de la gran variedad de técnicas utilizadas, todas tienen como objetivo reducir la velocidad de respiración, retardar la maduración y senescencia y detener el desarrollo de patógenos, extendiendo de esta manera la vida poscosecha sin afectar de manera significativa la calidad de las frutas y hortalizas.

En conclusión, los tratamientos poscosecha desencadenan respuestas que pueden impactar tanto positiva como negativamente en la calidad interna y/o externa de las frutas y hortalizas. Es por esta razón que, en los últimos años, diversas investigaciones han tratado de dilucidar los cambios fisiológicos y moleculares que subyacen a las diferentes técnicas poscosecha (Pedreschi, R. y Lurie, S., 2015). La información generada hasta el momento es de suma utilidad en cuanto contribuye de manera significativa a la optimización o rediseño de un determinado tratamiento.

1.5. FACTORES QUE DETERMINAN EL FENOTIPO POSCOSECHA EN FRUTAS Y VERDURAS

El fenotipo poscosecha se define como el conjunto de características resultantes de la interacción entre el genotipo y el medio ambiente poscosecha; y determina tanto la calidad del producto frutihortícola como su capacidad de almacenamiento (Rudell, 2010). Los principales rasgos que lo describen son la apariencia, la

integridad estructural y el sabor. El primero está conformado por el color, el brillo, la frescura y la madurez, mientras que el segundo se encuentra constituido por la firmeza y la textura. Este rasgo puede verse alterado por trastornos relacionados con la refrigeración, como es el caso del picado o pitting en cítricos (Figura 1.1), y la susceptibilidad a patógenos (Rudell, 2010). Finalmente, como ya fue descrito, el sabor es un rasgo complejo que se encuentra integrado por el gusto, el aroma y la palatabilidad (Goldenberg y col., 2017).



Figura 1. 1. Síntomas de daño por frío, picado o pitting

El picado aparece en el epicarpio del fruto y se caracteriza por depresiones en forma circular y con una ligera decoloración que posteriormente se pardea. Ocurre durante el almacenamiento a bajas temperaturas durante la poscosecha.

La adquisición de un fenotipo poscosecha que presente una buena calidad y una alta capacidad de almacenamiento depende de varios factores. Por un lado, se encuentran aquellos relacionados al tratamiento poscosecha utilizado, como por ejemplo, el tipo de estrés abiótico al que el producto frutihortícola es expuesto (calor/frío, oxígeno, dióxido de carbono, deshidratación, etc), la severidad con la que es aplicado, el tiempo de duración, el número de exposiciones y las combinaciones que se realicen. Por otro lado, también es importante considerar el fenotipo precosecha adquirido durante la maduración *in planta*, el tipo de órgano que se esté tratando (frutos, inflorescencias, tubérculos, etc), el estadio de maduración y genotipo (Pedreschi, R. y Lurie, S., 2015).

Como se mencionó en la sección anterior, diversas investigaciones han tratado de dilucidar los cambios fisiológicos y moleculares inducidos por los tratamientos poscosecha con el objetivo de obtener marcadores moleculares que describan el fenotipo poscosecha deseado. En este contexto, las técnicas ómicas, como la transcriptómica, la proteómica y la metabolómica, han sido de gran utilidad a la hora

de estudiar características claves como por ejemplo el color (Liu y col., 2003; Saliba-Colombani y col., 2001), componentes del sabor de la fruta (Dirlewanger y col., 1999; Saliba-Colombani y col., 2001; Tietel y col., 2010; Zanon y col., 2009) y compuestos del aroma (Doligez y col., 2006; Dunemann y col., 2009; Tadmor y col., 2002; Tietel y col., 2010).

En resumen, la perspectiva a futuro es integrar la inmensa cantidad de datos que están siendo generados por la transcriptómica, proteómica y metabolómica, con el objetivo de diseñar modelos matemáticos que puedan predecir cómo responderá un sistema biológico cuando sea expuesto a determinadas perturbaciones como, por ejemplo, diferentes tratamientos y factores ambientales (Pedreschi R. y Lurie., 2015).

1.6. TIPOS DE ESTRÉS QUE ENFRENTAN LOS CÍTRICOS DURANTE EL PERIODO POSCOSECHA

1.6.1. HERIDAS

En plantas, las heridas son altamente frecuentes. Las mismas pueden ser generadas por factores abióticos como el viento, la lluvia y el granizo; y por factores bióticos como la alimentación de insectos y herbívoros (Cheong y col., 2002). Las respuestas inducidas por este tipo de estrés han sido ampliamente estudiadas (Leon y col., 2001; Schillmiller y Howe, 2005). La generación de especies reactivas del oxígeno (ERO) es una de las primeras respuestas inducidas y se encuentra relacionada con la síntesis de macromoléculas que constituyen la pared celular, como por ejemplo glicoproteínas, calosa y lignina (Huckelhoven y Kogel, 2003).

En frutos, las heridas son muy frecuente durante la cosecha y la poscosecha. Estas inducen el metabolismo de fenilpropanoides en células vecinas a las dañadas (Brown, 1989). La primera enzima de esta vía metabólica es la fenilalanina amonioliase (PAL). Un estudio realizado por Vilanova y col. (2012) en frutos de naranja Valencia Late mostró que la expresión de genes que codificaban para la PAL y otras enzimas de la biosíntesis de cumarinas y flavonoides, como la ácido cafeico-O-metiltransferasa (COMT) y la peroxidasa (POX), se incrementó en respuesta a la herida. Por otro lado, Ballester y col. (2010) observaron un patrón de expresión de similar de los genes *FPal1*, *pox 1* y *pox 2* en frutos que habían sido inoculados con el patógeno *P. digitatum*. En concordancia, diversos estudios han

demostrado que la herida en plantas regula una amplia variedad de genes que se encuentran involucrados tanto en la respuesta innata como en la patógeno específica (Castro-Mercado y col., 2009; Durrant y col., 2000; Maleck y Dietrich, 1999; Reymond y col., 2000).

1.6.2. PATÓGENOS QUE AFECTAN LA PRODUCCIÓN DE CÍTRICOS Y PROCEDIMIENTOS PARA SU CONTROL

Al igual que otros frutos, los cítricos son atacados por una variedad de patógenos que juegan un papel adverso en su calidad y rendimiento. En países en vías de desarrollo, donde la protección y el manejo del fruto fresco son inadecuados, las principales pérdidas ocurren durante el transporte y el almacenamiento.

La mayoría de las pérdidas se asocian a un amplio rango de patógenos comunes. Entre ellos se incluyen distintos tipos de hongos como el moho verde (*Penicillium digitatum*), el moho azul (*Penicillium italicum*), el moho gris (*Botrytis cinerea* Pers ex Fr) (Agrios, 1997), *Aspergillus niger* Van Tiegh, *Alternaria citri* Elli y Pierce (Whiteside, 1988), *Collectotrichum gloeosporioides* Penz (Davies, 1994), *Phytophthora poracitica* Dast y *Geotrichum candidum* Link ex Pers (Howard, 1936), y bacterias como *Xanthomonas axonopodis* y *Xylella fastidiosa*, entre otras.

En la región mesopotámica, el principal agente patógeno a controlar es el moho verde (*Penicillium digitatum*), el cual provoca grandes deterioros en la calidad de la fruta como se puede apreciar en la figura 1.2. *P. digitatum* es un patógeno necrotrófico que requiere de una herida en la epidermis del fruto para poder ingresar e infectarlo.



Figura 1. 2. Síntomas visuales de la infección por *Penicillium digitatum*
Fruto de mandarina (*C. reticulata*) infectado con el patógeno fúngico *P. digitatum*, conocido comúnmente como moho verde.

El uso de fungicidas químicos se ha extendido ampliamente para atenuar las pérdidas causadas por podredumbre. Los mismos constituyen un punto de control de hongos patógenos tanto antes como después de la cosecha. En la actualidad existe un grupo definido de antifúngicos utilizados entre los que destacan el imazalil y el tiabendazol. Sin embargo, existen también crecientes demandas tanto por parte de productores como de consumidores sobre los posibles riesgos que se corren al aplicar estos compuestos químicos. La utilización de los mismos implica la presencia de residuos que constituyen un potencial peligro para la salud humana. Es por ello que su uso se está volviendo cada vez más difícil de justificar. Por otro lado, su uso masivo ha llevado al aumento en el número de cepas resistentes (Dianz, 2002; Wilson, 1989). Debido a esto, el interés en métodos no convencionales para el control de plagas en frutos poscosecha ha tomado auge en los últimos tiempos.

Los esfuerzos presentes se centran en aumentar la resistencia a los patógenos por medios físicos, químicos y biológicos (Palau, 2008). Dentro de los métodos físicos, los tratamientos con calor parecen ser los más promisorios. De hecho, ya están en uso y han mostrado resultados alentadores en una gran variedad de especies. Su mecanismo de acción se basa tanto en su capacidad de inhibición directa del patógeno, así como también en la inducción de ciertas respuestas defensivas del fruto. Adicionalmente, estos tratamientos también favorecen la resistencia de los frutos al daño por frío en variedades sensibles (Lara y col, 2009; Perotti y col, 2011), pudiendo, en algunos casos, afectar también la velocidad de maduración, prolongando la vida en estantería (Civello y col., 1997).

1.7. RESISTENCIA INDUCIDA POR TRATAMIENTO TÉRMICO POSCOSECHA DE FRUTOS CÍTRICOS

Como se mencionó en la sección anterior en los últimos años se ha desarrollado una amplia gama de tratamientos físicos con el objetivo de reemplazar el uso de fungicidas.

En este contexto los tratamientos térmicos también conocidos como “curado” o “acondicionamiento” constituyen uno de los tratamientos más utilizados para disminuir los síntomas de daño por frío e incidencia de patógenos en frutos (Lurie y Pedreschi, 2014; Perotti y col., 2011, 2015; Yun y col., 2013). Estos métodos pueden clasificarse en dos tipos según la intensidad del calor y la duración de los mismos. Los tratamientos con altas temperaturas durante pequeños lapsos de tiempo se denominan “de shock térmico” y en general se aplican mediante inmersión de los frutos. Los tratamientos con calor cuya duración varía entre 12 horas y 4 días, son llevados a cabo en cámaras de aire a una temperatura entre 36-46°C (Figura 1.3) y se denominan “tratamientos largos” (Paull y McDonald, 1994).



Figura 1. 3. Cámara de aire donde se realizan los tratamientos térmicos largos

En cítricos los tratamientos térmicos reducen la podredumbre verde generada por el hongo *P. digitatum* gracias a la combinación de efectos directos sobre el patógeno e indirectos sobre el fruto (Schirra y col. 2000). El calor puede afectar a las esporas o hifas de *P. digitatum*. Dentro de los efectos observados en el hongo se puede mencionar cambios en los núcleos, paredes celulares, desnaturalización de las proteínas, destrucción de las mitocondrias, alteración de la membrana

vacuolar, formación de huecos en el citoplasma, liberación de lípidos, destrucción de hormonas, asfixia del tejido, agotamiento de los alimentos de reserva, o lesión metabólica con o sin acumulación de intermediarios tóxicos. Más de un mecanismo mencionado puede estar involucrado al mismo tiempo (Barkai-Golan, R., 1991; Schirra y col., 2000).

Por otro lado, es sabido que los tratamientos térmicos estimulan mecanismos de defensa del propio fruto frente a la infección y colonización de los hongos. El calor aplicado a la piel de los frutos es capaz de activar en los tejidos la biosíntesis de lignina, así como diferentes sustancias endógenas (fitoalexinas) que inhiben el desarrollo fúngico (Ben-Yehoshua y col., 1992). Una mayor lignificación en un tejido vegetal se ha asociado al incremento de la resistencia a infecciones, debido al hecho de que la mayoría de los patógenos no son capaces de degradar la lignina y, por lo tanto, sirve como una fuerte barrera mecánica contra la invasión (Huckelhoven y Kogel, 2003). Es por ello que la vía de ingreso de los patógenos son las heridas producidas generalmente durante la manipulación poscosecha, como se mencionó anteriormente. El curado aumenta la resistencia de la fruta al inducir un proceso reparativo que involucra la biosíntesis de precursores de la lignina, a partir de la fenilalanina, en un proceso iniciado por la fenilalanina amonioliasa (PAL), una enzima clave en el metabolismo de los compuestos fenilpropanóideos (Ortuño y col., 2006).

Los mecanismos de defensa de los frutos contra los patógenos involucran interacciones complejas que abarcan más de una línea de defensa, tales como barreras mecánicas a los microorganismos, compuestos químicos antimicrobianos, proteínas asociadas a la patogénesis PR (de las siglas en inglés Pathogenesis Related), aumento tanto en la expresión de genes que codifican para las enzimas β -1,3-glucanasa y quitinasa, como en sus actividades (Ballester y col., 2010; Porat y col., 2001). De hecho, la pérdida de la resistencia a la podredumbre está relacionada con la degradación de compuestos antifúngicos que se hallan constitutivamente presentes en el exocarpio. Un ejemplo de lo anterior es el citral, presente en limones (Ben-Yehoshua y col., 1992; Kim y col., 1991; Rodov y col., 1995). En frutos cítricos jóvenes verdes inmaduros, estos compuestos antifúngicos constitutivos conforman una primera línea de defensa contra los patógenos.

Finalmente, cabe recordar que la aplicación de los tratamientos térmicos en cítricos no sólo incrementa la resistencia a la infección por *P. digitatum* sino que

también induce resistencia al daño por frío (Lafuente y col., 2017; Perotti y col., 2011; Yun y col., 2013). El almacenamiento a bajas temperaturas es una estrategia ampliamente utilizada en poscosecha. Los cítricos son frutos susceptibles al daño por frío al ser expuestos a temperaturas menores a 2-5°C (Figura 1.1). Se ha observado que el aumento en la relación ácidos grasos insaturados: saturados genera membranas más fluidas, induciendo la tolerancia a las bajas temperaturas (Lurie y col., 1997). Por otro lado, el incremento en la expresión de proteínas de choque térmico (HSP de las siglas en inglés Heat Shock Proteins), el aumento en la actividad de enzimas involucradas en el sistema antioxidante, el incremento en la síntesis de poliaminas y prolina, la alteración en la actividad de la PAL y polifenoloxidasas y el incremento en el metabolismo de hidratos de carbono son factores que se encuentran asociados al aumento en la tolerancia a daño por frío (Morteza y Samad, 2014). En el año 2000, Sala y Lafuente observaron una correlación positiva entre el incremento en la actividad de la catalasa (CAT) y la resistencia al daño por frío en frutos de mandarinas Fortuna. Por otro lado, en mandarinas Satsuma, la exposición a tratamiento de curado no sólo inhibió el desarrollo de *P. italicum* sino que también redujo el daño por frío durante el almacenamiento (Yun y col., 2013).

1.8. SISTEMA ANTIOXIDANTE

1.8.1. ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO Y MECANISMOS DE DEFENSA

La reducción completa del oxígeno consiste en un proceso secuencial univalente donde se requiere un total de cuatro electrones para dar como producto final agua. La reducción parcial del oxígeno genera los intermediarios radical anión **superóxido** (O_2^-), la especie metaestable peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($OH\cdot$), altamente reactivo, mientras que la excitación física del O_2 puede llevar a la producción de oxígeno singlete (1O_2) (Hodges, 2003).

Estos intermediarios de reducción son denominados especies reactivas del oxígeno (ERO) y son generados principalmente por la fotosíntesis en cloroplastos y la respiración en mitocondrias (Tovar-Méndez y col., 2011). La mayoría de los frutos una vez que son cosechados acumulan ERO en la mitocondria debido a un aumento en su tasa de respiración (Tian y col., 2013). Un estudio realizado por Macarisin y col. (2010) postuló que el desbalance entre la producción de ERO y su degradación induciría el deterioro y senescencia de los frutos.

Los organismos aeróbicos, entre ellos las plantas, han desarrollado mecanismos de defensa antioxidante enzimáticos y no enzimáticos, los cuales reducen los efectos nocivos de las ERO y mantienen la homeostasis celular entre prooxidantes y antioxidantes.

Hay compuestos antioxidantes de bajo peso molecular, como el glutatión y el ascorbato, presentes en altas concentraciones en todos los compartimentos celulares, que son fundamentales para la defensa de la planta contra el estrés oxidativo, ayudando a eliminar el H_2O_2 directamente a través de una reacción química a expensas de NAD(P)H (Noctor y Foyer, 1998). Paralelamente, antioxidantes liposolubles como el α -tocoferol y la ubiquinona reducida, junto con el sistema enzimático acoplado que usa NADPH para mantenerlos reducidos, protegen a los lípidos de la peroxidación (Mittler, 2002).

Varias enzimas son capaces de llevar adelante la degradación de aquellas ERO que presenten una vida media lo suficientemente larga. En plantas, el principal mecanismo de defensa antioxidante incluye a la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), algunas peroxidasas como la glutatión peroxidasa (GPX) y las enzimas involucradas en el ciclo del ascorbato-glutatión: ascorbato peroxidasa (APX), monodehidroascorbato reductasa (MDHAR), dehidroascorbato reductasa (DHAR) y glutatión reductasa (GR). Existe una gran cantidad de isoenzimas para cada enzima antioxidante, cada una de las cuales puede estar actuando en un tejido específico o en un compartimento subcelular en particular. A su vez, cada isoenzima puede tener su propio patrón de expresión durante el desarrollo y responder a distintos estímulos ambientales (Bowler y col. 1992; Mittler 2002; Scandalios 1992, 1993; Sarvajeet y Narendra, 2010).

En síntesis, las principales vías de eliminación de las ERO en plantas involucran a la SOD, la cual se encuentra en casi todos los compartimentos celulares, el ciclo agua-agua en cloroplastos, el ciclo del ascorbato-glutatión en cloroplastos, citosol, apoplasto, peroxisomas y mitocondrias, la GPX en el citosol y la CAT en peroxisomas (Figura 1.4).

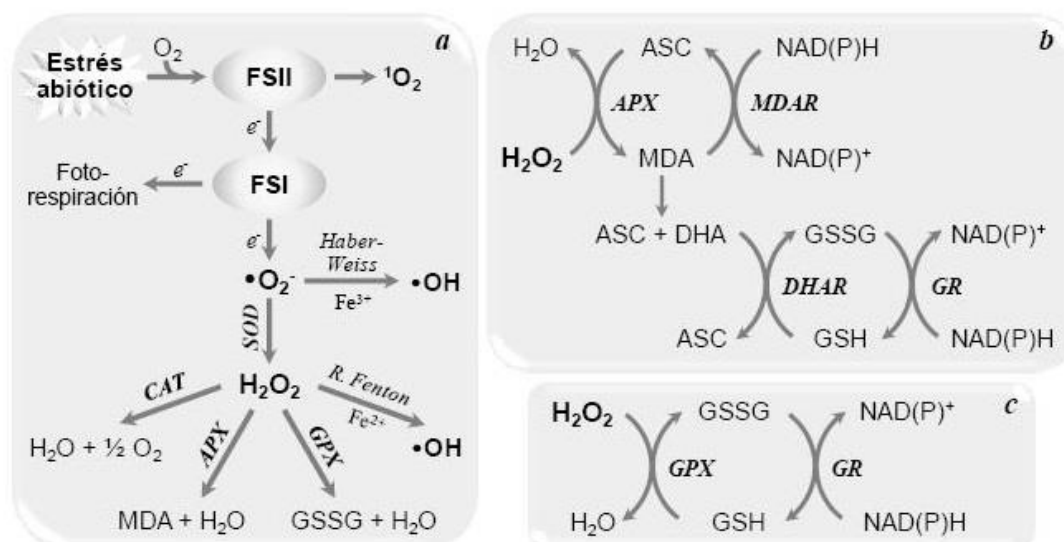


Figura 1. 4. Vías de eliminación de las ERO en plantas

En los cloroplastos el superóxido $O_2^{\bullet-}$ puede ser dismutado a H_2O_2 por la SOD o convertido a radical $\bullet OH$. (a). El H_2O_2 generado es eliminado por la CAT o, en presencia de agentes reductores como ascorbato (ASC) y/o glutatión (GSH), por la APX (b) o la GPX (c) dentro del ciclo ascorbato-glutatión. SOD, superóxido dismutasa; CAT, catalasa; GPX, glutatión peroxidasa; MDA, monodehidroascorbato; DHA, dehidroascorbato; GSSG, glutatión oxidado; MDAR, MDA reductasa; DHAR, DHA reductasa; GR, glutatión reductasa; FSI, fotosistema I, FSII, fotosistema II.

1.8.2. ERO Y RESPUESTA A DIFERENTES TIPOS DE ESTRÉS EN FRUTOS

El exceso en la producción de ERO no sólo se encuentra relacionado con la maduración y senescencia, sino que también está involucrado en la respuesta a diferentes tipos de estrés. Beno-Moualem y Prusky (2000) observaron una fuerte inducción en la producción de ERO en pericarpio de aguacate inmaduro, resistente al ataque de hongos, mientras que en frutos maduros y susceptibles, tal aumento no fue detectado. Por otro lado, estudios realizados en manzanas por Torres y col. (2003) revelaron que los frutos inmaduros presentaban una menor susceptibilidad a la infección por *P. expansum* debido a la inducción en la producción de H_2O_2 y en la actividad de SOD, mientras que los frutos maduros mostraban una mayor severidad de la enfermedad al ser inoculados con el hongo debido a que presentaron un incremento en la actividad de CAT y peroxidasa (POD).

Se ha descrito que el sistema antioxidante participa en la protección de cítricos contra estrés abiótico causante de daño en epicarpio. Los frutos de algunos cultivares de cítricos son menos proclives a desarrollar manchas poscosecha cuando son almacenados baja humedad relativa (HR) debido a que presentan un incremento en la actividad de SOD, CAT, APX y GR en comparación con frutos almacenados en condiciones de alta humedad relativa (Sala y Lafuente, 2004). Por

otro lado, Sala y Lafuente (2000) postularon que la CAT podría estar implicada en la tolerancia al frío en frutos de mandarinas 'Fortune' expuestos a tratamiento térmico, ya que el acondicionamiento de estos frutos indujo un aumento de 2,5 veces en la actividad de CAT, la cual se mantuvo elevada durante el almacenamiento en frío.

1.9. OMICAS

1.9.1. CONCEPTOS GENERALES DE METABOLÓMICA

En los últimos años la información generada por los distintos campos de las 'Omicas' como la genómica, transcriptómica, epigenómica, proteómica, metabolómica y fenómica ha permitido mejorar de manera notable la precisión y la velocidad en el desarrollo de programas relacionados con el mejoramiento de cultivos y la generación de germoplasmas (Parry y Hawkesford, 2012). Entre los enfoques ómicos, la metabolómica fue la disciplina que menor atención recibió por parte de la ciencia de los cultivos, en particular para el mapeo de rasgos y selección de plantas.

En los últimos años, la metabolómica ha permitido determinar perfiles precisos de metabolitos en microbios, plantas y animales, estableciéndose de esta manera como uno de los principales avances en tecnología de laboratorio (Heyman y Dubery, 2016; van Dam y Bouwmeester, 2016; Wuolikainen y col., 2016). En el caso particular de frutos, los estudios metabolómicos realizados hasta el momento, han permitido ampliar de manera notable el conocimiento sobre su biología durante la maduración, senescencia y la vida poscosecha. Más aún, también han sido fundamentales a la hora de definir metabolitos que determinen la calidad de los mismos. En poscosecha, los estudios de metabolómica comparada constituyen una herramienta de suma importancia ya que permiten evaluar los perfiles metabólicos de aquellos frutos que presenten el mejor comportamiento poscosecha en busca de marcadores moleculares que los caractericen.

El enfoque integrado entre la genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica permite a los investigadores seleccionar genes para mejorar rasgos de interés en diferentes especies de cultivos. Además, los estudios ómicos se han ampliado para explorar procesos regulatorios, como por ejemplo la regulación epigenética y las modificaciones postranscripcionales y postraduccionales.

Por último, la generación masiva de datos que se origina a partir de estas técnicas hace que la identificación de los compuestos y el análisis de los resultados sean un gran desafío (Lei y col., 2011; Matsuda y col., 2010). En este contexto, el mejoramiento de las herramientas bioinformáticas y estadísticas como el desarrollo de bases de datos de metabolitos generadas a partir del estudio en plantas modelos como *Arabidopsis thaliana* y en otras especies han sido fundamentales para el avance de la metabolómica (Afendi y col., 2012; Tohge y Fernie, 2009).

1.9.2. UNA VISIÓN GLOBAL A LA GENERACIÓN Y PROCESAMIENTO DE DATOS

La técnica de cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa (CG-EM) es ampliamente utilizada para análisis de perfiles metabólicos (Dutta y col., 2012). El enfoque CG-EM implica la derivatización de muestras que hace que los compuestos resultantes sean volátiles, ya que la asignación de masa se realiza mediante analizadores de tiempo de vuelo (TOF por las siglas en inglés de Time Of Flight) o de cuadrupolo o ambos en detectores híbridos. Aquellos compuestos que no sean derivatizados quedan fuera del análisis.

La cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa (CL-EM) ha sido ampliamente utilizada en metabolómica tanto para la detección de metabolitos primarios como secundarios (Turner y col., 2016). El gran volumen de datos generado puede ser procesado por medio de plataformas de procesamiento de datos como MET-COFEA, Met-Align, ChromaTOF, MET-XAlign, etc., (de Souza y col., 2017; Kessler y col., 2014; Lommen y col., 2012; Ma y col., 2016; Misra y van der Hoof, 2016; Pegasus, 2007; Zhang y col., 2014, 2015). Básicamente, esto incluye corrección basal, alineación, separación de picos que coeluyen (deconvolución) y normalización. Una vez realizadas estas correcciones, el paso subsiguiente es la identificación de metabolitos.

Existen diversas bases de datos de metabolitos como por ejemplo METLIN, NIST, GOLM etc., que son utilizadas para la identificación de los compuestos (Johnson y Lange, 2015). Finalmente, una vez que los metabolitos fueron identificados, el contenido relativo o absoluto de los mismos debe ser sometido a análisis estadísticos como mapa de correlación, análisis del componente principal (ACP), K-means clustering, boxplot, heatmap. Estos análisis son útiles para monitorear e identificar marcadores metabólicos asociados a diferentes rasgos agronómicos de interés (Figura 1.5).

organismo a nivel molecular, la mayoría de las preguntas sobre la función de un determinado gen no podían ser respondidas sólo por dicha técnica. De esta manera, la genética funcional comprendida por la transcriptómica, proteómica y metabolómica comenzó a tomar relevancia, permitiendo analizar los sistemas biológicos en sus múltiples niveles.

La transcriptómica ha permitido obtener perfiles de transcritos proporcionando de esta manera una enorme cantidad de datos fisiológicamente relevantes en una amplia gama de organismos y microorganismos (De Marco y col., 2017; Gou y col., 2017; Villani y col., 2017; Westermann y col., 2017). Sin embargo, es sabido que el control metabólico no sólo se ejerce a nivel de ARN mensajero sino también a nivel de proteínas, enzimas y metabolitos. En efecto, niveles alterados de metabolitos, proteínas y modificación postraduccionales son claves para la plasticidad fenotípica (Fíla y col., 2017; Larance y Lamond, 2015; Li y col., 2017; Tonutti y Bonchi, 2014).

El proteoma de una célula es complejo y puede llegar a estar constituido por más de 10^6 especies de proteínas con propiedades físicas y químicas diferentes. A pesar de los últimos avances realizados en la identificación de proteínas por espectrometría de masas, en la actualidad sólo se pueden identificar y cuantificar algunos miles de proteínas (Picotti y col., 2013; Schubert y col., 2013; Vidova y Spacil, 2017).

Una de las técnicas utilizadas en la proteómica es la electroforesis bidimensional o 2D-PAGE. La misma permite separar cientos de proteínas en un solo experimento. Está basada en una primera separación en función de la carga (primera dimensión), seguida de una separación en función de la masa molecular (segunda dimensión). La primera se realiza mediante isoelectroenfoque (IEF), mientras que en la segunda, las proteínas son separadas mediante electroforesis en presencia de SDS. Un avance de la 2D-PAGE es la técnica denominada DIGE (de las siglas en inglés Differential Gel Electrophoresis). Esta técnica está basada en el marcaje de proteínas con diferentes fluoróforos y la posterior separación por 2D-PAGE en un mismo gel. Dicha metodología minimiza la variabilidad entre los geles, disminuye el tiempo de análisis y permite una cuantificación del perfil de expresión muy precisa (Pitarch y col., 2003). La identificación de las proteínas se realiza por espectrometría de masas a partir de la escisión de cada punto (spot) proteico. La desventaja de esta técnica es que la cantidad de proteínas que se pueden identificar es baja. Por esta razón, en la actualidad esta técnica está siendo

reemplazada por la de shotgun ya que la misma permite identificar un número mayor de proteínas.

La técnica de shotgun se introdujo con el fin de intentar sobrepasar las limitaciones técnicas mencionadas en el párrafo anterior (Vidova y Spacil, 2017; Zhang y col., 2013). El proceso general de esta técnica se ejemplifica en la figura 1.6. Como se puede observar, en una primera etapa se obtiene el extracto proteico de la muestra. Posteriormente las proteínas son digeridas con tripsina y, en un tercer paso, los péptidos obtenidos son separados por cromatografía líquida de alta resolución HPLC (de las siglas en inglés High Performance Liquid Chromatography) para luego ser analizados por espectrometría de masas. La fragmentación e ionización de los péptidos es realizada mediante electrospray o ESI (de las siglas en inglés Electrospray Ionization). Una vez que los iones son generados ingresan al analizador de masa.

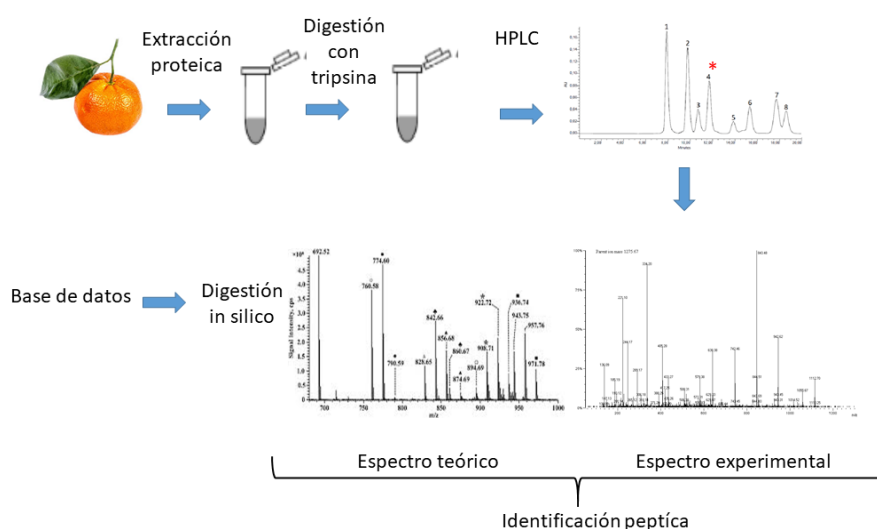


Figura 1. 6. Esquema de la secuencia de pasos de la técnica de shotgun

Existen tres tipos de analizadores que se utilizan actualmente. Uno de ellos es el del tiempo de vuelo o TOF (de las siglas en inglés Time Of Flight), otros son los cuadrupolos y finalmente se encuentran los de trampa de iones, más conocidos como Orbitrap. Estos últimos no sólo permiten realizar una detección sin destruir la muestra, sino que su ventaja principal es la alta capacidad de resolución. Finalmente, en todos los casos, la identificación se realiza mediante la comparación

entre un espectro teórico obtenido por la digestión *in silico* de las proteínas que conforman la base de datos respectiva y el espectro experimental (Figura 1.6).

Por último, es importante destacar que para poder analizar e integrar la gran cantidad de datos que se obtienen a partir de técnicas ómicas es fundamental la utilización de la estadística multivariada. Esta disciplina permite realizar una reducción de la dimensionalidad de los datos obtenidos. De esta manera se pueden detectar patrones e idealmente identificar biomarcadores de interés en las muestras analizadas.

1.10. ANTECEDENTES EN EL TEMA

En el trabajo experimental previo que condujo a esta Tesis, el tratamiento térmico utilizado fue optimizado por el grupo de poscosecha de la Estación Experimental Agropecuaria del INTA, Concordia, Entre Ríos, obteniéndose resultados exitosos en el control de *Penicillium digitatum*, el principal patógeno fúngico de las variedades evaluadas (Bello y col., 2008; Cocco, 2011). Para el caso de naranja Valencia (*Citrus sinensis* var. Valencia Late), el tratamiento aplicado consistió en incubar el fruto durante 48h a 37° y 90% de humedad, seguido un período de descanso de 24 h a 20°C; mientras que para mandarinas (*Citrus reticulata* var. Ellendale y var. Murcott) el período de curado fue más reducido (24 h a 37°C), manteniéndose idénticas las demás condiciones.

Estudios realizados en nuestro laboratorio por Perotti y col. (2011) en naranjas Valencia Late, mostraron que el tratamiento térmico indujo el mecanismo de defensa de los frutos en los distintos tiempos de almacenamiento poscosecha analizados. El análisis del proteoma de endocarpio de frutos curados reveló una expresión diferencial de 28 proteínas en 40 spots de los 61 analizados. La clasificación funcional mostró que las principales categorías afectadas eran las de Rescate celular, defensa y virulencia y Metabolismo. El estudio de la actividad de enzimas antioxidantes expuso que la superóxido dismutasa aumentó tanto en sacos de jugos como en flavedo, en tanto que la peroxidasa incrementó en flavedo pero disminuyó en sacos de jugo. En cuanto a los resultados del análisis metabólico, se observó un incremento en la concentración de azúcares mientras que el contenido de ácidos no se vio afectado notablemente. En conjunto, estos resultados mostraron que los frutos son menos susceptibles a hongos patógenos,

lo cual da sustento al método de curado como herramienta para aumentar la calidad poscosecha (Perotti y col., 2011).

1.11. OBJETIVOS

1.11.1. OBJETIVO GENERAL

El objetivo del trabajo de Tesis que se describe aquí es dilucidar las bases moleculares que determinan la calidad de los frutos cítricos durante el período poscosecha, mediante estudios de bioquímica, proteómica y metabolómica comparada en dos variedades de mandarina, Ellendale y Murcott, y en naranja Valencia Late. Se pretende caracterizar a nivel molecular las variaciones ocurridas durante la exposición a tratamiento térmico que le otorguen al fruto la capacidad para resistir al ataque de patógenos fúngicos, manteniendo las propiedades organolépticas durante la poscosecha. El hallazgo de los mecanismos activados en dicho contexto será de suma importancia para acelerar los tiempos de selección de variedades con mejores características en el comportamiento poscosecha y ayudar a optimizar los procedimientos de poscosecha utilizados actualmente.

1.11.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Sobre el objetivo general descrito precedentemente se plantearon los siguientes objetivos específicos:

En naranja var. Valencia Late

Profundizar el análisis de la bioquímica del metabolismo de hidratos de carbono durante la aplicación de tratamientos poscosecha mediante:

- La caracterización de la enzimología del metabolismo de hidratos de carbono en flavedo.
- La evaluación del contenido de HSP en frutos expuestos a tratamiento térmico poscosecha.
- La determinación de perfil de metabolitos secundarios en cada punto experimental.

En mandarinas var. Ellendale y Murcott

- Determinar los parámetros de calidad interna de frutos de mandarinas (*Citrus reticulata*) var. Ellendale y Murcott recoletados inmediatamente después de

la cosecha como en frutos expuestos a tratamiento térmico y almacenamiento a bajas temperaturas.

- Evaluar las variaciones en los niveles de los principales metabolitos primarios en epicarpio mandarinas var. Ellendale y Murcott en frutos recolectados inmediatamente después de la cosecha y en frutos expuestos a tratamientos poscosecha.

- Estudiar los posibles cambios en el perfil lipídico en epicarpio y endocarpio de frutos de mandarinas var. Ellendale y Murcott recolectados inmediatamente después de la cosecha como en frutos expuestos a tratamiento térmico y almacenamiento a bajas temperaturas.

- Analizar las variaciones en los niveles de los principales metabolitos secundarios en epicarpio de mandarinas (*Citrus reticulata*) var. Ellendale y Murcott en frutos recolectados inmediatamente después de la cosecha y en frutos expuestos a tratamientos poscosecha.

- Evaluar los niveles de actividad de las enzimas representativas del metabolismo antioxidante en epicarpio de mandarinas (*Citrus reticulata*) var. Ellendale y Murcott en frutos recolectados inmediatamente después de la cosecha como en frutos expuestos a tratamiento térmico y almacenamiento a bajas temperaturas.

- Evaluar los posibles cambios en el patrón proteico inducidos por el tratamiento de térmico a lo largo del período de almacenamiento poscosecha mediante el uso de la técnica de nanoHPLC-EM.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. MATERIAL VEGETAL

2.1.1. NARANJAS VAR. VALENCIA LATE

Los frutos de naranja (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck) var. Valencia Late fueron recolectados de árboles localizados en lotes seleccionados de la Estación Experimental Agropecuaria INTA de Concordia (EEAC), Entre Ríos. Los mismos fueron cosechados luego de su completa maduración *in planta* durante los meses de octubre de 2007 y noviembre de 2008. Las frutas fueron manualmente seleccionadas para uniformidad de color y tamaño. El tejido de flavedo (epicarpio) fue separado y congelado en nitrógeno líquido y almacenado a -80° C para la realización de los extractos correspondientes.

2.1.2. MANDARINAS VAR. ELLENDALE Y MURCOTT

Los frutos de mandarina (*Citrus reticulata*) var. Murcott y Ellendale fueron cosechados, luego de su completa maduración *in planta*, durante los meses de agosto de 2014 y septiembre de 2015. Todos los frutos provinieron de árboles localizados en lotes privados que fueron supervisados por la EEAC, Entre Ríos. El registro de temperatura durante los 45 días anteriores a la cosecha mostró valores de invierno típicos sin eventos de heladas meteorológicas (se puede acceder a los datos en www.frutic.org.ar). Después de la cosecha de los frutos fueron seleccionadas manualmente para uniformidad de color y tamaño. Se tomaron 10 frutos (E/M) (figura 2.1) y el resto fue utilizado para realizar los tratamientos térmicos. Los tejidos de flavedo (epicarpio) y de sacos de jugo (endocarpio) fueron separados y congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -80°C para la realización de los extractos correspondientes.

2.2. TRATAMIENTOS TÉRMICOS

2.2.1. APLICADOS A NARANJAS VAR. VALENCIA LATE

En el caso de naranja Valencia Late, se tomaron 10 frutos para cada grupo, según el siguiente esquema:

- **CONTROL (C):** frutos a los que no se les aplicó ningún tratamiento térmico ni pasaron por ningún período de almacenamiento.

- **CURADO (TT):** frutos a los que se les aplicó el tratamiento de curado. El mismo consistió en la exposición de los frutos a 37°C y 90% de humedad relativa durante 48 hs, seguida de la incubación a 20°C durante 24 hs.
- **CONTROL + 60 DÍAS (C+60d):** frutos que se mantuvieron en un período de almacenamiento de 60 días a 5°C.
- **CURADO + 60 DÍAS (TT+60d):** frutos que habiendo recibido el tratamiento de curado previamente, se mantuvieron en un período de almacenamiento de 60 días a 5°C.

Para la posterior realización de los experimentos, los grupos de frutos antes mencionados se analizarán de a "PARES", de acuerdo al siguiente diagrama:

C + TT → constituyen el denominado "**PRIMER PAR**" (**Par I**)

(C+60) + (TT+60) → constituyen el denominado "**SEGUNDO PAR**" (**Par II**)

2.2.2. APLICADOS A MANDARINAS VAR. ELLENDALE Y MURCOTT

En el caso de las mandarinas Ellendale y Murcott, se tomaron 10 frutos para cada grupo y el diseño experimental utilizado fue el siguiente (figura 2.1):

- **CONTROL (EC/MC):** frutos de Ellendale/Murcott a los que no se les aplicó ningún tratamiento térmico previo ni pasaron por ningún período de almacenamiento.
- **CURADO (ETT/MTT):** frutos de Ellendale/Murcott a los que se les aplicó el tratamiento de curado. El mismo consistió en la exposición de los frutos a 37°C y 90% de humedad relativa durante 24 hs, seguida de la incubación a 20°C durante 24 hs.
- **CONTROL + 7 DÍAS (EC + 7d/ MC + 7d):** frutos de Ellendale/Murcott que se mantuvieron en un período de almacenamiento de 7 días a 5°C.
- **CURADO + 7 DÍAS (ETT + 7d/ MTT + 7d):** frutos de Ellendale/ Murcott que habiendo recibido el tratamiento de curado previamente, se mantuvieron en un período de almacenamiento de 7 días a 5°C.
- **CONTROL + 30 DÍAS (EC + 30d/ MC + 30d):** frutos de Ellendale/Murcott que se mantuvieron en un período de almacenamiento de 30 días a 5°C.
- **CURADO + 30 DÍAS (ETT + 30d/ MTT + 30d):** frutos que habiendo recibido el tratamiento de curado previamente, se mantuvieron en un período de almacenamiento de 30 días a 5°C.

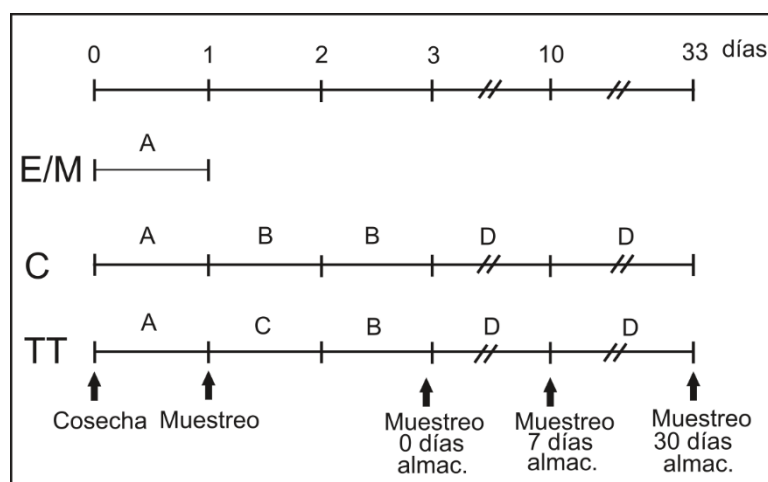


Figura 2. 1. Diseño experimental en mandarinas Ellendale y Murcott

A: Transporte a 20°C desde lote privado a la EEAC; B: 20°C, 90%HR; C: 37°C, 90%HR; D: almacenamiento a 5°C.

Los tratamientos de curado mencionados tanto para naranja Valencia Late como para las dos variedades de mandarina son de uso frecuente en la EEAC del INTA Concordia ya que la efectividad de los mismo en el control del *P. digitatum* ya ha sido demostrada (Cocco, 2011).

2.3. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS FISIOLÓGICOS DE FRUTOS de *C. RETICULATA* VAR. MURCOTT Y ELLENDALE

2.3.1. PARÁMETROS DE CALIDAD INTERNA DE FRUTOS

Las determinaciones de los parámetros de calidad interna fueron realizadas de acuerdo a las normas vigentes (IASCAV, 1993) en la EEAC, Entre Ríos. Para la determinación del porcentaje de jugo, el mismo fue extraído de al menos 20 mitades de frutos utilizando un exprimidor manual. Posteriormente, el jugo fue colado utilizando una malla metálica de aproximadamente un milímetro de poro. El volumen de jugo resultante fue medido y expresado como porcentaje respecto del peso fresco ($\text{ml de jugo gpf}^{-1} \times 100$).

El contenido de sólidos solubles totales (SST) en el jugo fue determinado utilizando un sacarímetro digital. Cuando fue necesario, las lecturas fueron corregidas según la temperatura registrada dado que los sacarímetros se gradúan a 20°C. Los datos fueron expresados en grados Brix.

Para la determinación de la acidez titulable (AT) se introdujeron 10 ml de jugo en un frasco de Erlenmeyer (250 ml) y se agregaron 100 ml de agua destilada y fenolftaleína 1% (p/v) como indicador. Posteriormente, se procedió a la titulación con NaOH 0,1 N hasta el viraje del indicador hacia un color rosado (pH 8,2). El

volumen de NaOH consumido fue multiplicado por un factor (0,064, normas IASCAV, 1993) obteniendo así un valor que representa la acidez expresada en porcentaje de ácido cítrico anhidro (ácido orgánico predominante) que hay en 10 ml de jugo.

El índice de madurez (IM) fue expresado como el cociente entre el contenido de sólidos solubles totales y la acidez determinada (SST/AT).

2.3.2. CONTENIDO DE COMPUESTOS VOLÁTILES EN EL JUGO

Las determinaciones de los compuestos volátiles, acetaldehído y etanol, fueron realizadas en las instalaciones de la EEAC, Entre Ríos, utilizando un exprimidor manual de acuerdo a las normas vigentes (IASCAV, Reglamentaciones de Frutas Frescas Cítricas para el Mercado Interno y la Exportación, Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación, 1993). Se denomina repetición al jugo extraído de varios frutos. En estas medidas se exprimieron 5 frutos por repetición y se realizaron 3 repeticiones. De cada muestra de jugo se conservaron 3 frascos con 5 ml de jugo cada uno. Los frascos fueron sellados y se congelaron a -20°C hasta el momento de realizar las determinaciones por triplicado.

Los compuestos volátiles fueron determinados por cromatografía gaseosa. Se utilizó una columna Supelco Omegawax 250 (30 x 0,25 mm, 0,25 µm de espesor de film) adaptada a un cromatógrafo de gases SHIMADZU GC17A. Se empleó el siguiente programa de temperatura: durante el análisis cromatográfico: temperatura inicial de 40°C durante 5 min, rampa de calentamiento hasta 180°C a una velocidad de 30°C/min. La presión de gas nitrógeno en la cabeza de la columna se fijó en 25 kPa. El rango del detector se fijó en su máxima sensibilidad y la temperatura en 250°C. El volumen de inyección de gas fue de 1 ml. Previo a la inyección de las muestras, las mismas fueron equilibradas a 80°C durante 30 min.

2.4. DETERMINACIÓN DE LA INCIDENCIA DE PODREDUMBRE

Se utilizaron 3 repeticiones de 30 frutos inoculados cada una, por tratamiento. La inoculación se realizó en la zona ecuatorial de cada fruto mediante una herida uniforme de 2 mm de profundidad y 1 mm de diámetro con elemento punzante sumergido en la suspensión de 10⁶ conidios por ml de *Penicillium digitatum* incubado previamente en agar papa glucosado (APG). Para la preparación de la suspensión se procedió a extraer los conidios de la placa con agua estéril con

Tween (0,05 % peso/vol), luego filtrarlos para extraer restos de medio y micelio y posteriormente diluirlo con agua estéril hasta obtener una absorbancia de 0,1 a una longitud de onda de 420 nm en un espectrofotómetro. Una vez inoculados, los frutos fueron almacenados a 20°C y 90% HR durante 18 hs previo a la aplicación de los tratamientos evaluados.

Se evaluó en cada fruto la presencia o ausencia de podredumbres alrededor de la zona de inoculación y se expresó como porcentaje de incidencia de podredumbres según la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Incidencia} = \frac{\text{frutos podridos} \times 100}{\text{frutos controles}}$$

P₀= Porcentaje de frutos en el testigo inoculado

P_T= Porcentaje de frutos en el tratamiento evaluado

2.5. ANÁLISIS DE METABOLITOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA GASEOSA-ESPECTROMETRÍA DE MASA (CG-EM)

2.5.1. ANÁLISIS DE METABOLITOS PRIMARIOS

2.5.1.1. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS A PARTIR DE FLAVEDO DE FRUTOS DE *C. RETICULATA* VAR ELLENDALE Y MURCOTT

Los extractos para el estudio de metabolitos primarios se realizaron según el protocolo descrito por Perotti y col. (2011) con algunas leves modificaciones.

Para la realización de los extractos se tomaron 6 muestras, correspondientes a cada variedad. Se utilizaron 600 mg totales de tejido (flavado) provenientes de al menos seis frutos independientes de cada variedad y se pulverizó en mortero con N₂ líquido. Luego fueron transferidos a un tubo de vidrio y se adicionaron 4,2 ml de metanol frío (-20°C). Dicho tubo fue agitado en vórtex, y se agregó a continuación 75 µl de ribitol (0,60 mg/ml). Este último se utilizó como estándar interno para la posterior cuantificación relativa de los metabolitos provenientes de las distintas muestras, lo que permite su comparación. El extracto así obtenido fue dividido en 2 tubos a los cuales se incubó durante 15 min a 70°C, agitándose periódicamente. A continuación, se añadió a cada tubo 1,5 ml de cloroformo, se agitó vigorosamente y se incubó nuevamente, durante 5 min a 37°C. Posteriormente, se incorporó 3 ml

de agua, y los extractos así obtenidos fueron centrifugados en una centrífuga refrigerada Sorvall RC-5B, durante 15 min a 2200xg para separar las fases.

A continuación, 450 µl de la fase polar (superior) se trasvasaron a tubos Eppendorf y fueron secados al vacío en una centrífuga CentriVap (Labconco), hasta la completa evaporación del líquido remanente, observándose finalmente un pellet coloreado.

Las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta el momento de su derivatización y consecuente análisis por CG-EM.

2.5.1.2. DERIVATIZACIÓN DE LAS MUESTRAS Y CORRIDA CROMATOGRÁFICA

Las muestras fueron descongeladas, secadas nuevamente en Centrivap durante alrededor de 30 minutos aproximadamente, para asegurar que no quedasen restos de material líquido en las mismas. Posteriormente, se agregaron 30 µl de metoxiamina 20 mg/mL disuelta en piridina. Se agitó vigorosamente y se incubaron las muestras a 37°C por 90 min en estufa.

Luego, se incorporaron 45 µl de N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida (MSTFA) a cada muestra, y se incubaron a 37 ° C durante 30 min. A continuación, fueron transferidas a tubos de vidrio, y se procedió a su análisis por CG-EM.

A partir de cada muestra, 2 µl de metabolitos derivatizados, se inyectaron mediante un sistema automático en una columna capilar VFS MS de 30 m por 0,25 mm (Varian Inc.) acoplada a un espectrómetro de masa ThermoQuest.

Los datos resultantes de los espectros recogidos fueron analizados mediante el programa informático Lab Solution (Shimadzu).

A partir de los espectros obtenidos de las corridas cromatográficas, se analizaron los picos individuales que produjeron un valor significativo. Las áreas debajo de cada pico fueron calculadas y expresadas como el área relativa al estándar interno, ribitol.

Seguidamente, las asignaciones de los picos realizadas por el servicio técnico fueron revisadas mediante la utilización del software online MSRI: Mass Spectra Search (The Comprehensive Systems Biology Project – CSB) del Instituto de Metabolómica Golm (Alemania)*. De este modo, se hicieron comparaciones de los espectros obtenidos con aquellos almacenados en esta base de datos, exclusiva de plantas, pudiéndose reajustar las asignaciones de cada tiempo de retención al metabolito apropiado.

* http://csbdb.mpimp-golm.mpg.de/csbdb/gmd/msri/gmd_sspq.html

2.5.2. ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS

2.5.2.1. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS A PARTIR DE SACOS Y FLAVEDO DE LOS FRUTOS

Para el estudio de ácidos grasos se tomaron 6 muestras correspondientes a cada variedad.

La extracción de lípidos totales se realizó teniendo en cuenta el protocolo de Bligh y Dyer, (1959). Se utilizaron 0,5 g de tejido de epicarpio al cual se le adicionó 300 µl de agua destilada y se pulverizó en mortero con N₂ líquido. En cuanto a los extractos realizados a partir de sacos de jugo, se homogeneizaron 0,8 g de tejido en mortero con N₂ líquido. Los extractos luego fueron transferidos a tubos de vidrio donde se adicionó 6 ml de una mezcla metanol: cloroformo (2:1). Cada tubo se agitó e incubó toda la noche a -20°C. A continuación, se centrifugó en una centrifuga de mesa a 3000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante fue trasvasado a otro tubo de vidrio al cual se le adicionó 1 ml de cloroformo y 1 ml de agua, se agitó y se centrifugó 5 minutos a 3000 rpm. Se descartó la fase superior y se tomó la fase inferior (clorofórmica) que es la que contiene los lípidos. Posteriormente se agregó 2 ml de KCl 2 M, se centrifugó, se descartó fase superior y se volvió a repetir lavado dos veces más. Finalmente se secó la fase clorofórmica (inferior) con N₂.

2.5.2.2. METILACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS ESTERIFICADOS A FOSFOLÍPIDOS Y CORRIDA CROMATOGRÁFICA

A cada uno de los residuos secos de lípidos totales se le adicionó 0,5 ml de metóxido de sodio el cual fue diluido en metanol anhidro en una proporción 1:8. Se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Luego se agregó 1 ml de hexano y 1 ml de HCl 2 M, se agitó bien hasta que se vea la fase inferior más traslúcida (los lípidos pasaron a la fase superior). Finalmente se trasvasó la fase superior (hexano) a tubos de vidrios, y se procedió a su análisis por CG-EM.

La composición de ácidos grasos metilados fue analizada inyectando 2µl de la muestra en una columna de polietilenglicol SUPELCOWAX-10 (Sigma) de 30 m por 0,25 mm acoplada a un espectrómetro de masa ThermoQuest con un rango de escaneo de 40–600 Da. La corrida se realizó isotérmicamente durante 30 minutos a 180°C. Luego la temperatura se incrementó a una velocidad de 12° C/ min, hasta llegar a 240°C.

El tiempo de retención y los picos obtenidos en el espectro de masa fueron comparados con estándares (Sigma) o con los que se encuentran disponibles en NBS75K (National Bureau of Standards database, Perkin Elmer). El área del pico fue normalizada usando el peso fresco de la muestra. Los niveles de los ácidos grasos analizados se expresaron como el porcentaje de área de cada pico con respecto a la superficie total.

2.6. ANÁLISIS DE METABOLITOS SECUNDARIOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA- ESPECTROMETRÍA DE MASAS (CL-EM)

2.6.1. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS A PARTIR DE FLAVEDO DE LOS FRUTOS

Los compuestos fenólicos en el flavedo de los frutos naranja Valencia Late y de mandarinas var. Murcott y Ellendale fueron analizados como los describió Ballester y col. (2013) con algunas ligeras modificaciones.

El tejido (aproximadamente 0,5 g de flavedo) fue homogeneizado en un mortero en presencia de N₂ líquido con 1 ml de metanol 80%. Los homogenados obtenidos fueron centrifugados a 4°C durante 15 min en una centrífuga Eppendorf a máxima velocidad. El sobrenadante fue filtrado utilizando filtros GE nylon de 0,22 µm.

2.6.2. CORRIDA CROMATROGRÁFICA

El análisis de HPLC-EM fue llevado a cabo en Agilent 1200 HPLC system acoplado a un detector G1314C VWD UV y a un espectrómetro de masa del tipo microTOF- Q II (Bruker- Daltonics). Las muestras fueron separadas por HPLC en fase reversa en una columna Zorbax XDB 1,8 µ C18 (50 mm x 30 mm, Agilent) utilizando un para la elución un gradiente binario de acetonitrilo y agua (pH 2,5). La velocidad del flujo fue de 0,2 ml min⁻¹ y el volumen inyectado fue de 5 µl. Las eluciones fueron monitoreadas a 280 nm. El ajuste del equipo para la MS fue el siguiente: tipo de fuente, ESI, polaridad del ion, positiva; nebulizador, 1 bar; calor seco, 200°C; gas seco, 4 l/min; capilaridad 4500V end plate offset 500V celda de colisión RF, 150 Vpp. El área del pico fue normalizada usando el peso fresco de la muestra. Los niveles de los metabolitos secundarios analizados se expresaron como el porcentaje de área de cada pico con respecto a la superficie total.

2.7. CUANTIFICACIÓN DE AMINOÁCIDOS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN

Se siguió el protocolo de Dahlan-Daud y col. (2010). Para la preparación de los extractos crudos se mortearon 200 mg de flavedo en N₂ líquido, luego se agregó 1,5 ml de HCl 0,1M. Los homogenados obtenidos fueron centrifugados a 4°C durante 6 min en una centrífuga Eppendorf a máxima velocidad. Se tomó el sobrenadante, se midió su volumen y se le adicionó 1/10 de ácido tricloroacético 100% (v/v) frío. Después de dejar precipitar por 20 min a 4°C, se centrifugó nuevamente 6 min a máxima velocidad en una centrífuga Eppendorf. Se volvió a medir el volumen del sobrenadante y se separó en dos tubos Eppendorf con 50 µl cada uno. A uno de ellos agregó 5 µl de una mezcla conocida de aminoácidos (2 µmol/ml) como control interno. Posteriormente a ambos tubos se le adicionó 50 µl de solución de secado (metanol: agua: trietilamina, 2:2:1). Las muestras fueron secadas en Centrivap.

Para la derivatización, las muestras fueron resuspendidas en 20 µl de una solución de metanol: trietanolamina (TEA): agua: fenilisotiocianato en proporción 7:1:1:1 e incubadas a temperatura ambiente durante 20 min. Luego se secaron en Centrivap y se guardaron a -80°C hasta el día de la corrida.

Para la corrida las muestras fueron resuspendidas en 500 µl de fase móvil (**Buffer A**: 1g/l de NaAc.3H₂O o 9,6 g/l de NaAc anhidro, 0,05% (v/v) TEA, 6,4 (v/v), acetonitrilo, pH 6,0) y se centrifugaron a máxima velocidad a 4°C. Se inyectaron 100 µl en una columna Luna C18 acoplada a HPLC. El gradiente utilizado se realizó con el **Buffer A** y **Buffer B** (60 % (v/v) de acetonitrilo) de acuerdo al siguiente programa:

0 a 0,1 min	0 a 5% Buffer B
0,1 a 22 min	5 a 8,5% Buffer B
22 min a 24 min	8,5 a 31% Buffer B
24 a 46 min	31 a 37% Buffer B
46 a 47 min	37 a 100% Buffer B
47 a 57 min	100 a 5% Buffer B (reequilibrado)

2.8. REPARACIÓN DE EXTRACTOS CRUDOS PARA ENSAYOS DE MEDICIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y WESTERN BLOT

Para la preparación de los extractos crudos del epicarpio de los frutos, las muestras congeladas (aproximadamente entre 0,5 g de flavedo) fueron homogeneizadas en un mortero en presencia de N₂ líquido con 10 volúmenes del buffer de extracción correspondiente (100 mM KPi, 1 mM fenil metil sulfonil fluoruro PMSF, pH 7) (Sala, 1998). Los homogenados obtenidos fueron centrifugados a 4°C durante 15 min en una centrífuga Eppendorf a máxima velocidad.

El sobrenadante obtenido fue separado del precipitado y desalado en una columna de Sephadex G-25 (Sigma) previamente equilibrada con el buffer de extracción (dilución 1/10) y una concentración final de glicerol del 10% (Penefsky, 1997). El eluido fue utilizado como fuente enzimática para las medidas de actividad, electroforesis y ensayos de western blot.

2.9. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

La concentración de proteínas en extractos crudos utilizados para las medidas de actividad enzimática se determinó utilizando el kit comercial de ácido bicinconínico (BCA) de Pierce. Se utilizó una solución de albúmina sérica bovina como patrón para la construcción de la curva de calibración

2.10. ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRÍA

Todas las actividades enzimáticas fueron ensayadas a 30°C en un espectrofotómetro Hitachi 150-20 siguiendo espectrofotométricamente la oxidación de NAD(P)H a 340 nm en un volumen final de 0.5 ml. Todos los ensayos fueron optimizados en términos de pH y la concentración de los cofactores/sustratos y corregidos para la actividad NADH oxidasa cuando fuera necesario. Las medidas fueron lineales respecto del tiempo y la concentración del extracto crudo utilizado.

Las actividades enzimáticas informadas representan el promedio de al menos 4 determinaciones realizadas en al menos 3 frutos independientes de cada grupo (inicial y curado de cada par). Se define una unidad como la cantidad de enzima que cataliza el consumo de 1 μ mol de sustrato por minuto en las condiciones especificadas.

En cada experimento se efectuaron las pruebas de normalidad para todos los valores obtenidos. Los datos se analizaron a través de análisis de la variancia

(ANOVA) y las pruebas de comparación de medias siguientes de Tukey y de Bonferroni. En los casos de las comparaciones entre dos poblaciones, se empleó el test T-Student.

- 2.10.1. Alanina aminotransferasa (Ala-AT, EC 2.6.1.2):** 100 mM Tris-HCl, pH 8,0, 2,5 mM alanina, 10 mM α -cetoglutarato, 0,15 mM NADH y 0,2 U lactato deshidrogenasa (LDH) (Falcone Ferreyra y col., 2006).
- 2.10.2. Fosfofructokinasa dependiente de ATP (ATP-PFK, EC 2.7.1.11):** 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,15 mM NADH, 4 mM fructosa-6-fosfato (Fru-6-P), 0,5 mM ATP, 5 mM $MgCl_2$, 5% (W/V) polietilenglicol (PEG), 1 mM ditioneitol (DTT), 0,2 U aldolasa y 0,1 U glicerofosfato deshidrogenasa / triosa fosfato isomerasa (GDH/TPI) (Falcone Ferreyra y col., 2006).
- 2.10.3. Fosfofructokinasa dependiente de pirofosfato (PPi-PFK, EC 2.7.1.90):** 50 mM Tris- HCl, pH 7,5, 0,15 mM NADH, 4 mM Fru-6-P, 0,5 mM PPi, 5 mM $MgCl_2$, 5% (w/v) PEG, 1 mM DTT, 1 μ M fructosa-2,6-bisfosfato (Fru-2,6-P₂), 0,2 U de aldolasa, 0,1 U GDH/TPI (Falcone Ferreyra y col., 2006).
- 2.10.4. Fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC, EC .1.1.31):** 100 mM Hepes-NaOH, pH 8, 10 % (v/v) glicerol, 5 mM $MgCl_2$, 10 mM $NaHCO_3$, 4 mM fosfoenolpiruvato (PEP), 0,15 mM NADH, 0,6 U malato deshidrogenasa (MDH) (Falcone Ferreyra y col., 2006).
- 2.10.5. Fosfoenolpiruvato carboxikinasa (PCK, EC 4.1.1.49):** 50 mM Hepes-NaOH, pH 7,3, 2,5 mM $MgCl_2$, 2,5 $MnCl_2$, 10 mM $NaHCO_3$, 4 mM fosfoenolpiruvato (PEP), 0,15 mM NADH, 3 mM ADP, 2 U MDH (Lara y col., 2009). La actividad fue corregida por posible interferencia por PEPC omitiendo el agregado de ADP.
- 2.10.6. Fosfoglucosa isomerasa (PGI, EC 5.3.1.9):** 50 mM Tris-HCl, pH 8,1, 1 mM Fru-6-P, 0,24 mM $NADP^+$, 2 U glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Sangwan y Singh, 1989).
- 2.10.7. Fosfoglucomutasa (PGM, EC 2.7.5.1):** 20 mM imidazol, pH 7,85, 10 mM $MgCl_2$, 3 mM EDTA, 0,1 mM glucosa-1-fosfato (Glc-1-P), 0,5 mM $NADP^+$, 0,8 U glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Hattenbach y Heineke, 1999).
- 2.10.8. Fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa, EC 3.1.3.11):** 50 mM Hepes-NaOH, pH 7,5, 0,1mM Fru-1,6-P₂, 5 mM $MgCl_2$, 0,2 mM EGTA, 0,5 mM

NAD⁺, 1 U hexosa fosfato isomerasa, 1U de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Moorhead y col., 1994).

2.10.9. Fumarasa (EC 4.2.1.2): 100 mM KPi, pH 7,4 y 50 mM L- malato. La actividad fue medida en un espectrofotómetro Hitachi 150-20 siguiendo espectrofotométricamente la producción de fumarato a 240 nm (Falcone Ferreyra y col., 2006).

2.10.10. Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (Ga3DH, EC 1.2.1.12): 50 mM Tricina-NaOH, pH 8,5, 4 mM NAD⁺, 2 mM Fru-1,6-P₂, 10 mM arseniato de sodio, 1 U aldolasa (Falcone Ferreyra y col., 2006).

2.10.11. Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa no fosforilante (npGa3DH, EC 1.2.1.9): 50 mM Tricina-NaOH, pH 8,5, 0,4 mM NADP⁺, 2 mM Fru-1,6-P₂, 1 U aldolasa (Falcone Ferreyra y col., 2006).

2.10.12. Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH, EC 1.1.1.49): 100 mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,2 mM NADP⁺, 2 mM glucosa-6-fosfato (Glu-6-P) (Falcone Ferreyra y col., 2006).

2.10.13. Glutamato oxaloacetato transaminasa (GOT, EC 2.6.1.1): 80 mM Tris-Cl, pH 7,8, 20 mM L-aspartato, 15 mM α-cetoglutarato, 0,15 mM NADH, 0.8 U LDH, 0.6 U MDH (Bergmeyer y Bernt, 1974b).

2.10.14. Hexokinasa (HK, EC 2.7.1.1): 30 mM HEPES-NaOH, pH 7,5, 2 mM MgCl₂, 0,6 mM EDTA, 9 mM KCl, 1 mM NAD⁺, 1 mM ATP, 1 U glucosa-6-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD⁺ (Dai y col., 1999).

2.10.15. Invertasa neutral (IN, EC 3.2.1.26): 200 mM HEPES-NaOH, pH 7,5, 200 mM sacarosa. El medio de reacción fue incubado a 30 °C durante distintos tiempos. La reacción se cortó incubando 5 minutos a 100°C. La cantidad de glucosa generada se determinó utilizando el Kit Glicemia enzimática AA de Wiener (Vargas y col., 2007).

2.10.16. Invertasa ácida (IA, EC 3.2.1.26): fue medida e la misma bajo las condiciones descritas, excepto que el medio de reacción contiene 100 mM ácido acético/acetato de sodio, pH 5,0 y para determinar glucosa el medio fue neutralizado (Vargas y col., 2007).

2.10.17. Malato deshidrogenasa (MDH, EC 1.1.1.37): 50 mM imidazol, pH 6,9, 1 mM oxaloacetato, 0,15 mM NADH (Falcone Ferreyra y col., 2006).

- 2.10.18. Enzima málica dependiente de NAD (NAD-ME, EC 1.1.1.39):** 50 mM Hepes-NaOH, pH 7,3, 2 mM NAD⁺, 2 mM L-malato, 5 mM (DTT), 75 μM CoA, 5 mM MgCl₂, 5 mM MnCl₂, 2 U MDH (Lara y col., 2009).
- 2.10.19. Enzima málica dendiente de NADP (NADP-ME, EC 1.1.1.40):** 50 Mm Tris- HCl, pH 7,5, 0,5 mM NADP⁺, 10 mM L-malato, 10 mM MgCl₂ (Gerrard Wheeler y col., 2005).
- 2.10.20. Piruvato kinasa (PK, EC 2.7.1.40):** 25 mM Hepes pH 7,2, 20 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 2,5% (p/v) PEG, 2 mM PEP, 0,15 mM NADH, 1 mM ADP, 0,4 U LDH. La actividad enzimática fue corregida sustrayendo la actividad PEP-fosfatasa, que se determina omitiendo del medio de reacción el ADP (Falcone Ferreyra y col., 2006).
- 2.10.21. Sacarosa sintasa (SS, EC 2.4.1.13):** 100 mM MES, pH 6,5, 3 mM MgCl₂, 0,5 mM EDTA, 5 mM β-mercaptoetanol, 50 mM sacarosa, 0,02 mM glucosa-1,6-bisfosfato, 0,5 mM NAD⁺, 1 mM UDP, 1 mM PPI, 1 U PGM, 1 U G-6-PDH, 1 U UDP-glucosa pirofosforilasa (Sun y col., 1992).
- 2.10.22. Sacarosa fosfato sintasa (SPS, EC 2.4.1.14):** el medio de reacción contiene 200 μl de 100 mM Hepes-NaOH, pH 7,5, 15 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 5 mM Fru-6-P, 15 mM Glu-6-P, 10 mM UDP- glucosa-6-fosfato (UDPG). La reacción se inició con el agregado de 100 μl de extracto. Se incubó a 30°C a diferentes tiempos entre 0 y 20 minutos. Para cortar la reacción se agregó 200 μl de KOH al 30%. Luego se incubó a 100°C por 10 minutos para eliminar cualquier resto de fructosa o fru-6-P. Se enfriaron las muestras a temperatura ambiente para finalmente agregar 3,5 ml de antrona al 0,14% disuelta en H₂SO₄ al 80%. Se incubó 20 minutos a 40°C. El desarrollo de color se midió a 620 nm (Yanga y col., 2013)
- 2.10.23. Succinato deshidrogenasa (EC 1.3.5.1):** 500 mM Na₃PO₄, pH 7,4, 5% (v/v) Triton X 100, 500 mM succinato de sodio, 15 mM azul de nitrotetrazolio (NBT). La actividad se midió con homogenado sólo filtrado. El medio se incubó a 37°C durante 30 minutos. Se frenó la reacción por el agregado de 2 ml 2 % SDS. La absorbancia se leyó a 630 nm (Padh, 1992).

2.11. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS

2.11.1. ELECTROFORESIS EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES

Las electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) se realizaron utilizando un equipo Bio-Rad Mini-PROTEAN III de acuerdo al sistema discontinuo descrito por Laemmli, 1970. La concentración final de acrilamida en los geles de separación fue del 8% y 5% para los geles de concentración. Las muestras fueron desnaturalizadas mediante la adición de 1/4 volumen de buffer de siembra 5X y posterior incubación a 100°C durante 3 min antes de ser sembradas en el gel. El buffer de electrodo para las corridas electroforéticas contenía 25 mM Tris-HCl, 192 mM glicina y 0,1% (p/v) SDS, pH 8,3. Las corridas electroforéticas se realizaron a 12 mA hasta que las muestras entraron en el gel de separación, luego se subió el amperaje convenientemente (no superando los 40 mA).

El análisis de los geles se realizó por tinción con azul de Coomassie o por Western blot luego de ser electrotransferidos a membranas de nitrocelulosa, como se describe más adelante (Bollag y Edelstein, 1991).

Se utilizaron las siguientes proteínas marcadoras: 225 kDa, 150 kDa, 100 kDa, 75 kDa, 50 kDa, 35 kDa, 25 kDa, 15kDa y 10 kDa, en geles desnaturalizantes (SDS-PAGE), las cuales forman parte de un kit de marcadores de peso molecular de amplio rango (Promega), formado por nueve proteínas recombinantes con dichos pesos moleculares. Alternativamente, se utilizaron las siguientes proteínas: β -galactosidasa (116 kDa); BSA (66,2 kDa); ovoalbumina (45 kDa); lactato deshidrogenasa (35 kDa); RNasa Nsp98I (25 kDa); β -lactoglobulina (18,4 kDa) y lisozima (14,4 kDa) que forman parte de un kit comercial de marcadores de peso molecular (Fermentas).

Se comparó la movilidad de las proteínas de interés con la observada para las proteínas marcadoras, a través del gráfico que relaciona la distancia recorrida con el logaritmo de la masa molecular de los polipéptidos.

2.11.2. ELECTROFORESIS EN CONDICIONES NO DESNATURALIZANTES

Las electroforesis en condiciones no desnaturalizantes se realizaron de acuerdo al procedimiento descrito por Davis, 1964 modificado por el agregado de 20% (v/v) glicerol y 10% (v/v) etilenglicol en los geles de separación y concentración. Se utilizó una concentración de 8% para los geles de separación y 4% para los geles de concentración. La corrida electroforética se realizó a 12 mA y a 4°C hasta que el

frente de corrida salió del gel. Se utilizaron las siguientes proteínas marcadoras: tiroglobulina (669 kDa); ferritina (440 kDa); catalasa (232 kDa); alcohol deshidrogenasa (140 kDa) y BSA (66 kDa). El revelado de los geles fue realizado por tinción con azul de Coomassie o por las distintas actividades enzimáticas, como se indica a continuación. Finalmente, donde corresponde, la cuantificación relativa de las bandas obtenidas se llevó a cabo por densitometría utilizando el software LabWorks.

2.11.2.1. ACTIVIDAD SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD)

Para la detección de las isoformas de SOD, los geles fueron equilibrados en una solución que contenía 50 mM KPi y 1 mM EDTA pH 7,8 durante 30 min. Luego de este lapso de tiempo, los geles fueron incubados en la misma solución complementada con 120 μ M riboflavina, 28 mM TEMED y 2,5 mM de NBT durante 20 min en oscuridad. Finalmente, los geles fueron sumergidos en agua destilada y se expusieron a la luz proveniente de un transiluminador de luz blanca a temperatura ambiente hasta la visualización de bandas claras sobre un fondo violeta. Para la identificación de las isoenzimas sensibles a cianuro y/o a H₂O₂, los geles fueron incubados respectivamente en buffer 50 mM KPi conteniendo 3 mM KCN (inhibidor de las isoenzimas Cu/Zn-SOD) o 5 mM H₂O₂ (inhibidor de las isoenzimas Cu/Zn-SOD y Fe-SOD) durante 30 min anteriormente a la tinción por actividad SOD (Beauchman y Fridovich, 1971).

2.11.2.2. ACTIVIDAD PEROXIDASA (POD)

Para la detección de la actividad peroxidasa, los geles se incubaron con 50 mM acetato de sodio pH 4,5, 2 mM bencidina (disuelta en dimetil sulfóxido). La reacción se inició con el agregado de 3 mM H₂O₂. Las bandas reactivas fueron de color morado (Rao y col., 1996).

2.11.2.3. ACTIVIDAD CATALASA (CAT)

Para la detección de la actividad catalasa, los geles se incubaron con 50 mM Tris-HCl pH 8 por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agregó 5 mM H₂O₂. La reacción se inició con el agregado por separado de 60 mM de K₃Fe(CN) y 120 mM de FeCl₃.6H₂O. Las bandas reactivas fueron de color verde (Woodbury y col., 1971).

2.12. ENSAYOS DE WESTERN BLOT

Para realizar la electrotransferencia de proteínas se utilizó una celda Trans-Blot transfer semi dry cell (Bio-Rad) (Burnette, 1981). La electrotransferencia a la membrana de nitrocelulosa se realizó durante 20 min a 20V, previa incubación de la misma y del gel en buffer de transferencia (15,6 mM Tris, 120 mM glicina, 20% (v/v) metanol, pH 8,8). Una vez finalizada la transferencia se evaluó la eficiencia de este paso mediante la tinción reversible con una solución de rojo de Ponceau (0,5% (p/v) Ponceau S, 1%(v/v) ácido acético). Esta tinción fue utilizada también para detectar y marcar con lápiz las bandas correspondientes a los marcadores de masa molecular. Seguidamente la membrana se bloqueó con una solución 5% (p/v) de leche descremada en 2% (p/v) PVP durante un período no menor a 1 h. Luego de tres lavados exhaustivos de 10 min cada uno con TBS (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5), las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios durante al menos 1 h. Se realizaron luego tres lavados con TBS de 10 min cada uno y se incubó 1 h con una dilución 1/3000 de anti-IgG conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma). Finalmente, las membranas se lavaron tres veces con TBS (10 min cada lavado) y se revelaron por medio de una reacción de color desarrollada en un medio de revelado compuesto por buffer sustrato (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, pH 9,5) suplementado con 0,1 mg/ml NBT en dimetilformamida 70% y 0,05 mg/ml BCIP. La adición del medio de revelado se efectuó previa incubación de la membrana con el buffer sustrato durante 5 min, permitiéndose luego el desarrollo de la reacción en oscuridad hasta la aparición de bandas color púrpura. La reacción se detuvo por sucesivos lavados con agua destilada.

Se utilizaron anticuerpos primarios inmunopurificados contra la HSP70 recombinante de tabaco (*Nicotiana tabacum*) (Dra. Gabriela Müller, CEFODI, UNR), antisuero contra la HSP21 purificada de tomate (*Solanum lycopersicum*) (Ing. Gustavo Polenta, INTA Castelar). Se utilizó una dilución 1/200 de los anticuerpos y del antisuero en TBS y suero inmune contra PPI-PFK de *Solanum tuberosum* (obtenidos previamente en el laboratorio).

2.13. ANÁLISIS DEL PROTEOMA DIFERENCIAL MEDIANTE LA TÉCNICA DE SHOTGUN (nanoHPLC-EM)

2.13.1. PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS PROTEICOS

La extracción de proteínas se realizó utilizando el protocolo de Hurkman y Tanaka (1986). Se homogeneizaron 200 mg de flavedo en mortero, en presencia de N₂ líquido. Luego, se adicionó a cada muestra 2 ml de buffer de extracción (0,1 M Tris-HCl, 10 mM EDTA 0,4 % (v/v), 2-ME, 0,9 M sacarosa, 1mM PMSF, pH 8,8) y se homogeneizó en frío. Previamente, el buffer de extracción se había incubado con 6,25 mg/ml de polivinil poli pirrolidona insoluble (PVPP, Sigma). Se agregó 4 ml de fenol-Tris-HCl pH 8,8. El extracto crudo fue macerado en mortero frío hasta obtener una mezcla homogénea que luego fue transferida a un tubo Falcon, agitada a 4°C por 30 min y centrifugada a 5000 x g por 20 min a 4°C en una centrifuga refrigerada Sorvall ST 16 en un rotor SS34.

La fase superior (fenólica) recuperada fue medida y dividida en dos partes. El 80% de la misma fue destinada al análisis de proteómica diferencial, mientras que el 20% se utilizó para un control de calidad protéica mediante SDS-PAGE. Se agregó 5 volúmenes de 0,1 M acetato de amonio en 100 % (V/V) de metanol a ambas fracciones y se dejó precipitando toda la noche a -20°C. El precipitado fue recuperado mediante centrifugación a 5000 x g por 20 min a 4°C. El pellet obtenido fue lavado dos veces con 1 ml de 0,1 M acetato de amonio en 100 % (V/V) de metanol frío, una vez con metanol frío al 100 % (V/V) y finalmente una vez con acetona fría al 80 % (V/V). Los pellets fueron guardados a -20°C con 1 ml etanol al 70 % (V/V) hasta su procesamiento.

La fracción destinada a la identificación de proteínas se resuspendió con 300 µl de urea 8 M y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente. Luego se centrifugó a 4°C y se recuperó el sobrenadante. Se cuantificó proteínas por Bradford. Posteriormente se tomaron 100 µg de proteínas solubles en urea y se las redujo con 10 mM de DTT durante 45 minutos a 56°C. Luego se adicionó 20 mM iodoacetamida y se incubó en oscuridad por 40 minutos a temperatura ambiente. Para precipitar las proteínas se agregó 1/5 vol de TCA 100% (p/v) y se incubó durante 2 horas a -20°C. Transcurrido el tiempo se centrifugó a máxima velocidad por 10 minutos, el pellet se lavó 3 veces con acetona fría, y finalmente se evaporó al aire la acetona residual. Las muestras fueron conservadas a -20°C hasta su envío.

2.13.2. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Las muestras fueron enviadas al CEBIQUIEM, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. En una primera instancia los extractos proteicos fueron tratados con tripsina y luego se realizó una limpieza con Zip-Tip C18 para extraer las sales. Posteriormente, la mezcla de péptidos obtenida fue separada por un nanocromatógrafo líquido de alta resolución (nano-HPLC) acoplado a un espectrómetro de masa con tecnología Orbitrap.

Se utilizó un cromatógrafo Thermo Scientific, modelo EASY-nLC 1000 apto para separar complejos proteicos con un alto grado de resolución, con una columna de fase reversa C18, 2 μm , 100 Å, 50 μm x 150 mm, modelo Easy-Spray ColumnPepMap RSLC (P/N ES801) de marca Thermo Scientific; a una temperatura de 35°C. El gradiente fue realizado con dos soluciones: solución A: agua con 0,1% de ácido fórmico y solución B: acetonitrilo con 0,1 de ácido fórmico.

Para la ionización se utilizó un ionizador por Electro Spray marca Thermo Scientific, modelo EASY-SPRAY con un voltaje del spray de 3,5 kV.

Se utilizó un espectrómetro de masa Thermo Scientific, modelo Q-Exactive. El equipo cuenta con una celda de HCD (de las siglas en inglés High Collision Dissociation) y un analizador Orbitrap. La configuración del equipo permite que la identificación de los péptidos se realice al mismo tiempo que los mismos se separan por cromatografía. Primero se obtuvo un espectro de masa completo (Full MS) y luego, para la identificación de los péptidos, un espectro de masa en tándem (MSMS). La configuración seleccionada fue: polaridad positiva, una resolución de 70.000 para Full MS y de para 17.500 MSMS.

La identificación de cada proteína se realizó mediante el uso del programa Proteome Discoverer (Tyanova y col., 2016). Éste es un motor de búsqueda, en el cual el usuario debe seleccionar la base de datos y ciertas características que se vinculan con la forma en que fue tratada la muestra. En base a esta información y a los datos crudos obtenidos del espectrómetro de masa, el programa desarrolla un informe donde indica las proteínas que fueron identificadas y los péptidos que utilizó para esta identificación. El programa asigna un nivel de confianza a estos péptidos (High/Medium/Low) y el usuario decide el nivel de confianza para trabajar, siendo siempre preferible utilizar sólo los péptidos de nivel High. En este estudio los criterios de búsqueda utilizados fueron los descritos a continuación. Base de datos:

Citrus sinensis (Sweet orange) (*Citrus aurantium* var. *sinensis*) - UP000027120. Enzima: tripsina con un miscleavage de dos. La tolerancia de masa para precursor fue de 10 ppm y para el fragmento de 0,05 Da. Las modificaciones elegidas fueron Oxidación (M), la dinámica, y carbamidometilación (C), la estática. Nivel de confianza de los péptidos: Alto.

Como el genoma de *Citrus reticulata* no se encuentra secuenciado, para poder asignar las proteínas identificadas se utilizó el genoma de *Citrus sinensis* (Csi) de la base de datos Uniprot (<http://www.uniprot.org/>) debido a que presentan una alta homología. Luego se realizó la asignación de Uniprot a los ID de Csi con la base de datos Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>). Finalmente, se buscaron los ortólogos en *Arabidopsis thaliana* debido a que muchos genes se encuentran caracterizados en profundidad.

Finalizada la búsqueda con el Proteome Discoverer, los datos obtenidos fueron procesados con el programa Perseus (Tyanova y col., 2016). Este programa permitió realizar comparaciones entre las muestras mediante el análisis de los valores de las áreas normalizadas de cada uno de los polipéptidos detectados. El software cuenta con la posibilidad de la aplicación de un análisis estadístico más profundo sobre las comparaciones. En este estudio se realizaron comparaciones de a pares con el objetivo de identificar aquellas proteínas en las que el tratamiento térmico indujo un cambio relativo respecto al área total del cromatograma. Sólo se seleccionaron las proteínas que presentaron un cambio relativo mayor a 2 (en el gráfico menor a -1 o mayor a 1, escala logarítmica) y un valor de p menor a 0,05 (en el gráfico mayor a 1,3, escala logarítmica).

2.13.3. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LOS DATOS

Con las listas de proteínas obtenidas para cada comparación se realizó un análisis de enriquecimiento génico. Se utilizó el kit de herramientas bioinformáticas provistas por el servidor PlantGSEA (<http://systemsbiology.cau.edu.cn/PlantGSEA/>) (Yi y col., 2013) y la plataforma agriGO (<http://systemsbiology.cau.edu.cn/agriGOv2/index.php>). Esta última se enfoca en el análisis de enriquecimiento génico por ontología génica en plantas y especies agrícolas (Tian y col., 2017). En ambos casos los parámetros seleccionados fueron los siguientes. Test estadístico, Hipergométrico. Método de ajuste de multitest, Hochberg (FDR). Valor de p menor a 0,05.

El análisis de enriquecimiento génico es un método que permite calcular la superposición de un conjunto de genes con grupos de genes previamente definidos por el sistema de ontología génica (GO de las siglas en inglés Gen Ontology) (Yi y col., 2013). Este análisis es un método eficiente y rápido para determinar las funciones asociadas a grandes listas de genes, aumentando de esta manera la probabilidad de interpretar el significado biológico de las mismas. Dentro del sistema GO existen distintas categorías que describen un mismo gen, las más importantes son BP (de las siglas en inglés Biological Process) la cual da información sobre procesos biológicos, MF (de las siglas en inglés Molecular Functions) la misma describe la función biológica y finalmente se encuentra la CC (de las siglas en inglés Cell Components) que detalla la localización dentro de la célula (Tian y col., 2017).

Utilizando las herramientas bioinformáticas de la plataforma PlantGSEA y las bases de datos curada de KEGG y PlantCyc, se realizó un enriquecimiento para conocer los metabolismos involucrados.

2.14. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó por análisis de variancia a uno y dos factores (ANOVA). Las diferencias de significancia mínimas fueron calculadas mediante la utilización de los análisis de Holm-Sidak, Bonferroni y Tuckey ($\alpha=0,05$) utilizando el programa Sigma Plot 12.0 (Systat Software, Inc.).

Los datos obtenidos por GC-EM, expresados como relación \log_2 , se representaron en una escala de pseudocolor utilizando el programa MultiExperiment Viewer (MeVv5.1.1, <http://www.tm4.org/> , Saeed y col. 2003). También se utilizó este programa para realizar los agrupamientos jerárquicos. Los Análisis de Componentes Principales (ACP) fueron realizados con el programa XLSTAT (Microsoft Excel)

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**3.1. ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO
POSCOSECHA EN NARAJAS *CITRUS*
SINENSIS VAR. VALENCIA LATE**

3.1.1. INTRODUCCIÓN

La naranja dulce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) es uno de los frutos cítricos más apreciados en todo el mundo. Valencia Late es una de las variedades más cultivadas en Argentina y en muchos lugares del mundo. A pesar de su nombre, se cree que su origen estaría localizado en las regiones tropicales y subtropicales de Asia siendo transportada a Europa por los romanos. Su llegada a América habría ocurrido alrededor del año 1500 con el arribo de los exploradores Bernal-Díaz a México y Ponce de León a Florida. Brasil probablemente recibió sus primeras naranjas con la llegada de los portugueses a mediados del siglo XVI (Webber y col. 1989).

Valencia Late es una variedad tardía. En nuestro país su cosecha comienza en agosto, extendiéndose hasta octubre si los frutos van a ser exportados. En cambio, si su destino es el consumo interno el período de cosecha puede prolongarse hasta febrero-marzo del año siguiente; debido a la alta capacidad que tiene la planta de conservar fruta con muy buena calidad. Son naranjas de tamaño mediano, de forma redondeada, cáscara lista y color anaranjado uniforme. La pulpa tiene buen sabor y agradable color, con un alto contenido en zumo. Su contenido en semillas es prácticamente nulo, pues suele presentar de dos a cuatro semillas como máximo.

Siendo Valencia Late una variedad de exportación. Es de suma importancia la aplicación de tratamientos térmicos que preserven su calidad evitando el daño por frío y el ataque de patógenos fúngicos durante el almacenamiento prolongado. Estudios previos realizados por Perotti y col. (2011), han revelado que el tratamiento térmico aplicado a naranjas Valencia Late indujo numerosos cambios en el metabolismo general tanto en endocarpio como epicarpio. Las modificaciones en las actividades de las enzimas antioxidantes, la inducción de proteínas claves en la respuesta al ataque de patógeno y cambios en metabolitos implicados en las principales vías metabólicas explicaron la menor susceptibilidad de los frutos frente a los patógenos fúngicos, junto al sostenimiento de la calidad poscosecha. En este contexto y con el objetivo de ampliar la información existente, en este capítulo se describirán los resultados obtenidos luego de aplicar un tratamiento térmico y almacenamiento en naranja Valencia Late, haciendo foco, en este caso, en el flavedo de los frutos.

3.1.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1.2.1. ANÁLISIS DE LA ENZIMOLOGÍA DEL METABOLISMO DE HIDRATOS DE CARBONO

Con el fin de completar y ampliar la caracterización bioquímica de los cambios inducidos por el tratamiento térmico (TT) en frutos de naranja durante el almacenamiento poscosecha (Perotti y col., 2011), se realizaron mediciones de la actividad de las principales enzimas implicadas en el metabolismo de los hidratos de carbono en flavedo (Figuras 3.1 y 3.2).

3.1.2.1.1. METABOLISMO DE LA SACAROSA

La figura 3.1 muestra que las actividades de las enzimas sacarosa sintasa (SS) e invertasa ácida (IA) no mostraron variaciones significativas por tratamiento térmico. Sin embargo, ambas se vieron afectadas por el tiempo de almacenamiento: mientras SS mostró una disminución después de 60 días (en frutos tratados y no tratados), IA aumentó significativamente en el mismo punto de análisis en ambos tipos de fruto. Si se analiza la tasa de degradación de sacarosa durante el período de almacenamiento, se puede decir que hubo una reducción importante de la misma; ya que el aumento de la IA no fue suficiente para compensar la disminución de la actividad SS. A diferencia de la IA, la actividad de invertasa neutra (IN) sólo se redujo en las muestras que fueron curadas y almacenadas por 60 días (TT+ 60d). En base a estos resultados, no se puede concluir que el aumento de la concentración de sacarosa, observado previamente en epicarpio de frutos curados (TT) con respecto al control (C) (Perotti y col., 2011), sea consecuencia de una disminución en la tasa de degradación de este metabolito, ya que no hay diferencias significativas entre las actividades degradativas en frutos curados respecto a su control a 0 días de almacenamiento a 5°C. Sin embargo, el aumento de la actividad de la sacarosa fosfato sintasa (SPS) podría explicar este resultado (Figura 3.1). Los ácidos orgánicos podrían constituir la fuente de carbono para la síntesis de sacarosa, ya que los principales ácidos disminuyeron en muestras TT (Perotti y col., 2011). Sin embargo, no se puede descartar una importación simultánea de sacarosa desde el albedo.

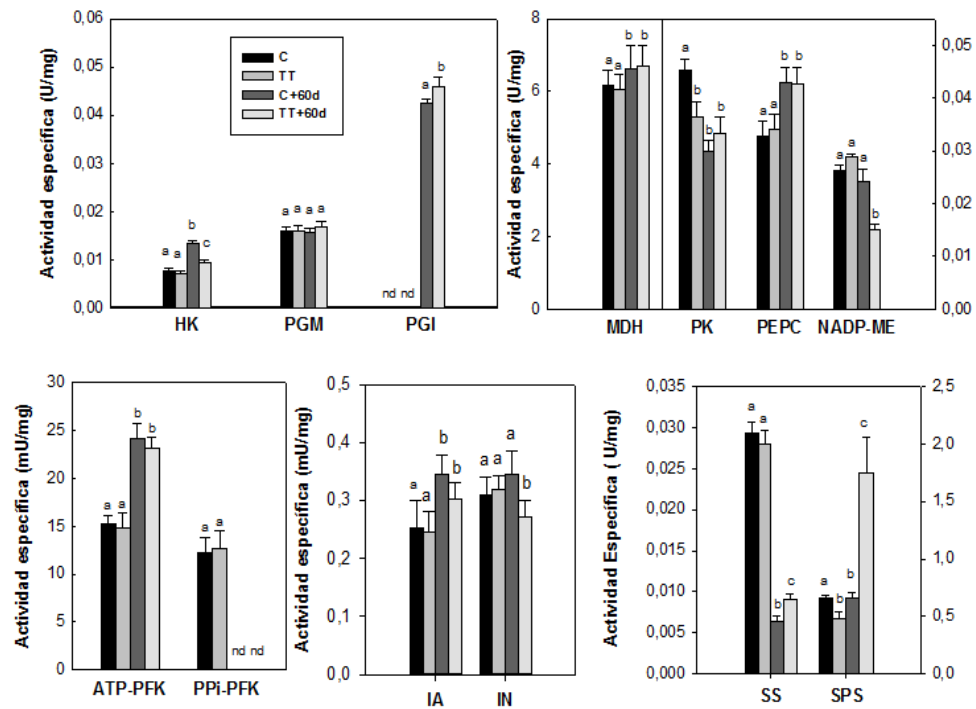


Figura 3. 1 Actividad de las enzimas en flavedo control y curado de naranja Valencia Late

Las actividades enzimáticas se expresan en U / mg de proteína, con la excepción de las actividades de invertasas, que se expresan en mU / mg de proteína. Para cada enzima, barras con diferentes letras son significativamente diferentes ($P < 0,05$).

HK, hexoquinasa; PGM, fosfoglucomutasa; PGI, fosfoglucoisomerasa; SS, la sacarosa sintasa; SPS, sacarosa fosfato sintasa; IA, invertasa ácida; IN, invertasa neutra; MDH, malato deshidrogenasa; PK, piruvato quinasa; PEPC, fosfoenolpiruvato carboxilasa; NADP-ME, enzima málica dependiente de NADP; ATP-PFK, fosfofructoquinasa dependiente de ATP; PPI-PFK, fosfofructoquinasa dependiente de pirofosfato.

3.1.2.1.2. METABOLISMO PRIMARIO: LA GLUCÓLISIS Y LA GLUCONEOGÉNESIS

La hexoquinasa (HK) mostró un comportamiento similar a la IA, mientras que la actividad de la fosfoglucoisomerasa (PGI) sólo fue detectada en frutos C y TT almacenados por 60 días. La enzima fosfoglucomutasa (PGM) no mostró cambios significativos en ninguno de los puntos analizados. La actividad de la fosfofructoquinasa dependiente de pirofosfato (PPI-PFK) no se detectó después de 60 días, mientras que la dependiente de ATP (ATP-PFK) aumentó notablemente en el mismo punto de almacenamiento. Este comportamiento significa una mayor dependencia de ATP en lugar de PPI para fosforilar fructosa y es ciertamente intrigante ya que aparece en momentos donde la demanda de energética es crítica (Plaxton y Podestá, 2006). Nielsen y col. (1991) observaron que la actividad de la PPI-PFK tendía a disminuir a lo largo del desarrollo en fruto de pimiento, aunque se mantenía un nivel bajo pero detectable en el fruto maduro. En naranja Valencia también se observó una disminución durante el desarrollo (Sansevich, 2013) y,

probablemente, esta tendencia se mantiene durante el almacenamiento poscosecha.

En cuanto a las actividades enzimáticas relacionadas con el metabolismo del fosfoenolpiruvato (PEP), el cambio más notable fue la disminución de la actividad piruvato quinasa (PK) inmediatamente después del tratamiento térmico a niveles que continuaron bajos durante el periodo poscosecha. Las actividades de la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) y la malato deshidrogenasa (MDH) (Figura 3.1) se incrementaron a lo largo del almacenamiento, tanto en el control como en el fruto tratado. La enzima mítica dependiente de NAD⁺ (NAD-ME) fue indetectable al inicio del experimento. Sin embargo, después de 60 días su actividad, si bien baja, pudo ser mensurable (Figura 3.2).

Todas estas variaciones se pueden resumir como un mayor flujo de carbono a través de PEPC, MDH y NAD-ME en lugar de a través de PK citosólica, como ocurre en condiciones específicas tales como la embriogénesis de semillas oleaginosas o prolongada inanición de fosfato (Pi) (Nagano y col., 1994; Schwender, 2004). También podría decirse que el almacenamiento en frío durante el periodo poscosecha estimula la producción de piruvato intramitocondrial a expensas de la producción de ATP citosólico. Cabe señalar que la tasa de respiración se mantuvo sin cambios durante los 60 días, independientemente del tratamiento (Perotti y col., 2011), por lo que estos hallazgos indican que la cantidad de ATP producido por la respiración mitocondrial es suficiente para satisfacer las necesidades de energía a lo largo del almacenamiento. Si bien la variación en las actividades de PK y PEPC es significativa pero pequeña, podría hipotetizarse que, lejos de reflejar una variación respiratoria, son ajustes a una nueva situación metabólica que requiere un metabolismo anaplerótico aumentado (como por ejemplo, la síntesis de lignina y/o aminoácidos). Esto tiene sentido si se considera que después de la cosecha, el fruto ya no recibe fotosintatos de la planta.

Si se analizan las variaciones opuestas a lo largo de la poscosecha de las duplas ATP-PFK/Pi-PFK y PK/PEPC, enzimas claves de la glucólisis en planta, se podría concluir que el flujo glucolítico neto permanece constante a lo largo de almacenamiento en frío, independientemente de la aplicación de tratamiento térmico. Aumentos paralelos en Pi-PFK y PEPC suelen aparecer como resultado de una situación de estrés que puede disminuir los niveles de adenilatos (Plaxton y Podestá, 2006). Si se tienen en cuenta los cambios en la ATP-PFK y Pi-PFK se

puede sugerir que ésta no sería la situación que se desarrolla en el flavedo almacenado. Por todo lo expuesto, no es posible asegurar cuál es la razón para la caída en los niveles de P_{Pi}-PFK, aunque se sugiere que puede deberse al proceso natural de senescencia, que provoca menores niveles de P_{Pi}, lo que conlleva a que dicha enzima se vuelva innecesaria.

También se midió la actividad de dos de las enzimas más importantes que intervienen en la gluconeogénesis, la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PCK) y la fosfofructosa-1,6-bifosfatasa (FPBasa) (Figura 3.2). La actividad PCK sólo se pudo detectar en muestras TT + 60d, lo que sugiere un aumento potencial de la actividad de la gluconeogénesis en este punto. Sin embargo, dado que las enzimas glicolíticas se mantuvieron en un nivel aproximadamente constante y que la suma de las actividades PK y PEPC es casi 8 veces mayor que la actividad PCK después de 60 días, se puede inferir claramente que el flujo glucolítico predomina en todo momento. También podría suceder, tal como lo ha sugerido el grupo de Leegood, que la PCK actuara como enzima anaplerótica produciendo además ATP (en la dirección $PEP + ADP \rightarrow OAA + ATP$) (Walker y Leegood, 1995).

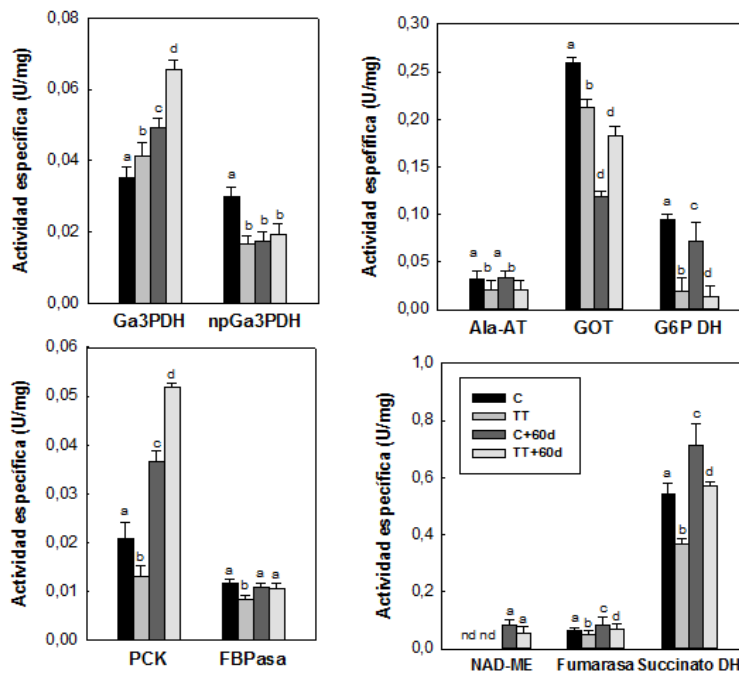


Figura 3. 2 Actividad de las enzimas en flavedo control y curado de naranja Valencia Late

Las actividades enzimáticas se expresan en U / mg de proteína. Para cada enzima, barras con diferentes letras son significativamente diferentes ($P < 0,05$).

Ga3PDH, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; npGa3PDH, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa no fosforilante; Ala-AT, alanina aminotransferasa; GOT, glutamato oxaloacetato transaminasa; G-6-PDH, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; PCK, fosfoenolpiruvato carboxiquinasa; FBPasa, fructosa-1,6-bisfosfatasa; NAD-ME, enzima málica dependiente de NAD^+

A pesar de que varios informes describen el efecto de la infección por patógenos sobre el metabolismo de los hidratos de carbono, todavía hay una considerable falta de conocimiento sobre cómo estos cambios influyen en el resultado de las interacciones planta-patógeno (Berger y col., 2007). Por otra parte, en la actualidad no existe demasiada información acerca de cómo un aumento en los niveles de azúcares previo a la infección por patógenos, podría ayudar a la fruta a prevenir la proliferación de hongos. Varios factores contribuyen a la complejidad de la relación entre el estado de hidratos de carbono y el desarrollo de la enfermedad /resistencia. Los azúcares no sólo son nutrientes sino que también se comportan como señales que regulan la expresión de genes que promueven la respuesta de defensa en plantas (Arbona y col., 2013; Krasensky y Jonak, 2012; Tarkowski y Van den Ende, 2015; Yun y col., 2013) y probablemente contribuyen a la regulación de la expresión génica del patógeno. Para poder aclarar cómo las alteraciones en el metabolismo de carbohidratos del flavedo observadas en este trabajo podrían afectar a la interacción planta-patógeno es necesario desarrollar estudios con un enfoque

funcional, que incluyan, por ejemplo, el análisis del grado de crecimiento del hongo variando la fuente de carbono.

Finalmente, también se evaluó por inmunodetección el nivel de proteína de la PPI-PFK. Curiosamente, la disminución de la actividad de PPI-PFK se correlacionó con un menor nivel de proteínas (Figura 3.3). Aún más, un examen de la composición de la subunidades de PPI-PFK reveló una disminución en la cantidad relativa de la subunidad α a lo largo del almacenamiento. Se ha propuesto que esta subunidad confiere sensibilidad al activador frutosa-2,6-bifosfato, mientras que la subunidad β es catalítica (Podestá y Plaxton, 1994b). De esta manera, la actividad de PPI-PFK sería menor debido a una capacidad catalítica menor y a una menor respuesta al activador.

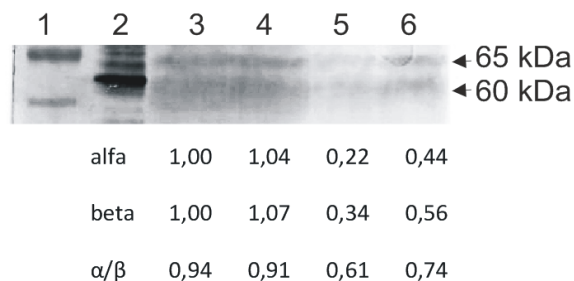


Figura 3. 3. La inmunodetección de PPI-PFK a partir de extractos de epicarpio de naranja Valencia Late
 Calle 1: marcadores estándar de peso molecular 75 y 50 kDa; calle 2: extracto crudo de tubérculo de papa; calle 3: extractos crudos de naranja control (C); calle 4: extractos crudos de naranja expuestos a tratamiento térmico (TT); calle 5: extractos crudos de muestras C después de 60 días de almacenamiento a 5 ° C (C + 60 d); calle 6: extractos crudos de muestras TT después de 60 días de almacenamiento a 5 ° C (TT + 60 d). Se sembraron 20 μ g de proteína total en cada calle. Los números debajo de la figura indican las intensidades relativas de las bandas reactivas de las subunidades alfa y beta determinadas por densitometría respecto a muestras de control (C) y la relación α / β para cada extracto. Los números en el lado de cada gel indican la masa de cada subunidad.

3.1.2.1.3. ESTADO REDOX

La enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa no fosforilante (npGa3PDH) constituye una fuente de NADPH en el citoplasma de células vegetales (Bustos y col., 2008). En los controles, su actividad disminuye casi a la mitad tras el tratamiento térmico y el tiempo de almacenamiento, mientras que en la fruta tratada se mantiene en los mismos niveles (Figura 3.2). Aunque la función de npGa3PDH en tejidos no fotosintéticos no está claramente resuelta, se postula que tendría un rol protector frente al estrés oxidativo (Bustos y col., 2008; Piattoni y col., 2013). Por otra parte, se ha propuesto que niveles elevados de H_2O_2 bajarían la actividad de la Ga3PDH y aumentarían la de npGa3PDH (Piattoni y col., 2013). Según esta

hipótesis, las observaciones reportadas aquí no sugieren un aumento significativo en los niveles de H₂O₂. En concordancia, Perotti y col. (2011) sugirieron que, de existir un aumento de H₂O₂ provocado por el tratamiento de curado, éste no sería lo suficientemente alto como para inducir una respuesta antioxidante total y / o que las actividades basales de ascorbato peroxidasa y glutatión reductasa son lo suficientemente altas como para hacer frente al H₂O₂ existente.

Por otro lado, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) presentó el mismo patrón en ambos pares: una caída evidente por tratamiento (Figura 3.2). Estos resultados sugieren que el tratamiento térmico modifica el catabolismo oxidativo de la glucosa hacia el predominio de la glucólisis sobre la vía de las pentosas- fosfato. Considerando estos resultados junto a los bajos niveles de actividad observados para npGa3PDH y NADP-EM se puede inferir que la producción de NADPH durante el período de poscosecha no sería crítica.

3.1.2.1.4. FUNCIÓN MITOCONDRIAL

La disminución en las actividades de la succinato dishidrogenasa y la fumarasa (ambas enzimas de localización intracelular) en muestras tratadas (figura 3.2) confirman una alteración de la función mitocondrial provocada por el tratamiento térmico, como se había sugerido en un trabajo previo (Perotti y col., 2011).

La alanina (Ala) es el metabolito que sirve como fuente de almacenamiento de piruvato en la vacuola y, por ende, constituye un control del suministro de sustrato para las enzimas lactato deshidrogenasa (LDH), piruvato decarboxilasa (PDC) y el complejo de la piruvato deshidrogenasa (Muench y col., 1998). Miyashita y col. 2007 sugirieron que la función principal de la alanina aminotransferasa (Ala-AT) se centra en la degradación de Ala. Por lo tanto, una menor demanda de piruvato de la mitocondria podría justificar el nivel inferior de Ala-AT observado tras el tratamiento térmico.

Por otra parte, el período de almacenamiento poscosecha afectó los valores de las enzimas mitocondriales mencionadas y de la NAD-ME. Se observó un aumento en la actividad total de las tres enzimas, siendo más notable el de NAD-ME; la cual no fue detectada al inicio del experimento. Esto sugiere que hay un aumento en la capacidad mitocondrial a lo largo del período de almacenamiento; ya sea en el número de estas organelas o en el contenido enzimático. El tratamiento térmico no impide este aumento, aunque el flavedo curado presente valores inferiores al

respectivo control en todos los casos. Si bien estas variaciones probablemente reflejan una alteración de la función mitocondrial en células del flavedo curado, no fueron acompañadas con una modificación en la tasa respiratoria de los frutos tratados y / o almacenados (Perotti y col., 2011). No obstante, cabe destacar que las medidas de respiración, a diferencia de estos ensayos, fueron realizadas sobre el fruto entero.

3.1.2.2. INDUCCIÓN DE HSP

La respuesta al estrés por calor se caracteriza por la inducción de proteínas que constituyen una mezcla compleja de polipéptidos con peso molecular alto y bajo, conocidas como proteínas de choque térmico (HSP, por sus siglas del inglés heat shock protein). Mediante inmunotransferencia se evaluó la abundancia de estas proteínas en muestras de flavedo. Este estudio confirmó la inducción de proteínas HSP pequeñas (HSP21) y proteínas de la familia HSP70 en epicarpio curado (Figura 3.4). Curiosamente, las muestras de endocarpio no mostraron variación significativa de estas proteínas inmunorreactivas (Perotti y col. 2011), reafirmando que el epicarpio es el tejido más afectado por el tratamiento de térmico.

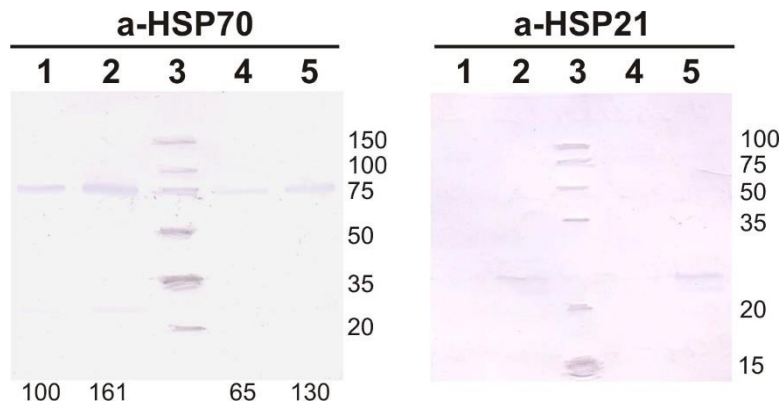


Figura 3. 4. Inmunodetección de HSP70 y de HSP de bajo peso molecular a partir de extractos de epicarpio de naranja Valencia Late

Calle 1: extractos crudos control de naranja Valencia (C); calle 2: extractos crudos de naranjas Valencia expuestas a tratamiento térmico (TT); calle 3: marcadores estándar de peso molecular; calle 4: extractos crudos de muestras control después de 60 días de almacenamiento a 4 ° C (C+60d); calle 5: extractos crudos de muestras curadas después de 60 días de almacenamiento a 4 ° C (TT+ 60d). Se cargó 20 µg de proteína total en cada calle. Los números debajo de la figura indican las intensidades relativas de las bandas de reactivos determinados por densitometría respecto a muestras de control (100%). Los números en el lado de cada gel indican la masa de los marcadores de peso molecular estándar.

3.1.2.3. EFECTO DEL TRATAMIENTO TÉRMICO Y ALMACENAMIENTO EN FRÍO SOBRE LOS FENILPROPANOIDES

Los fenilpropanoides juegan un papel vital en la resistencia de los frutos frente a patógenos debido a que están involucrados en la señalización local y sistémica para la inducción de genes de defensa (Dixon y col., 2002). Curiosamente, en este estudio se reveló que la mayor parte de los compuestos fenólicos identificados no mostraron cambios importantes en respuesta al tratamiento térmico (Figura 3.5). Por el contrario, muchos de ellos revelaron un marcado descenso a lo largo del almacenamiento en frío (Figura 3.6). Del mismo modo, Ballester y col. (2010) observaron pequeños cambios inducidos por el curado en los flavonoides más abundantes de naranjas Navelate. Más aún, investigaciones realizadas en mandarinas Satsuma también indicaron una reducción en el nivel de algunos fenilpropanoides de frutos expuestos a tratamiento térmico (Yun y col., 2013). Hay muy poca información disponible para poder relacionar una clase particular de fenilpropanoide con funciones defensivas, ya que su detección suele ser difícil debido, probablemente, a la naturaleza transitoria de su apariencia.

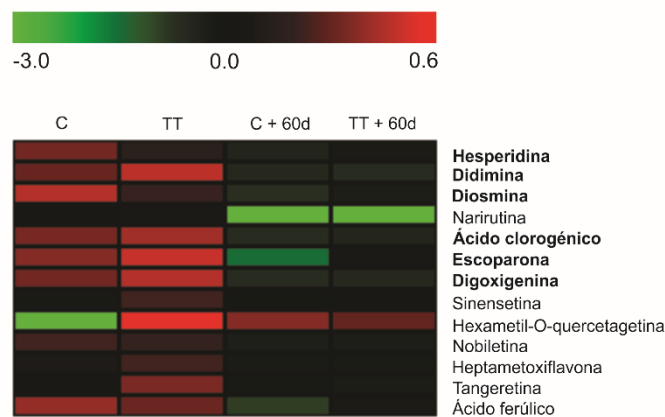


Figura 3. 5 Cuantificación relativa de flavonoides en extractos epicarpio de naranja Valencia Late

Los valores normalizados de los datos se muestran en una escala de colores (que se describe en la parte superior de la figura), que es proporcional al contenido relativo de cada metabolito. Los valores de 3 determinaciones independientes se analizaron en el software Multi Experiment Viewer (MeV v4.4.1). Los metabolitos que variaron significativamente ($P < 0,05$) se resaltan en negrita.

Así, los resultados presentados en esta sección muestran una disminución después de 60 días en 6 de los 12 compuestos evaluados, lo que sugiere que la capacidad defensiva asociada a fenilpropanoides se reduce durante período poscosecha. Finalmente, la imposibilidad de detectar compuestos fenólicos

involucrados en la respuesta defensiva inducida por el tratamiento térmico nos conduce a postular que dicha respuesta sería dependiente de la presencia del patógeno.

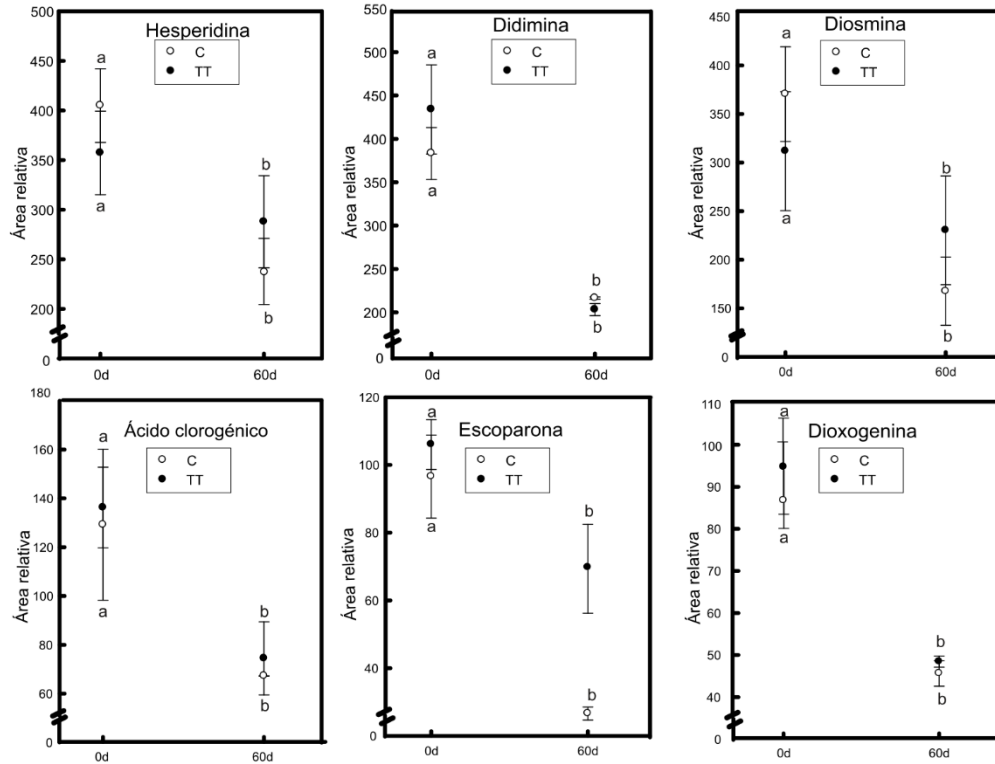


Figura 3. 6. Cuantificación relativa de metabolitos secundarios en extractos de epicarpio de naranja Valencia Late

Los niveles de los metabolitos analizados se expresaron como el área relativa. Las diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

3.1.3. CONCLUSIÓN

Las principales modificaciones observadas en el metabolismo de los hidratos de carbono y en el contenido de fenilpropanoides parecen ser causadas por el almacenamiento en frío en lugar de la exposición al tratamiento térmico. El almacenamiento a 5°C favoreció la producción de piruvato intramitocondrial, mientras que reforzó el uso de PEP por PEPC en lugar de PK. En este contexto, se podría inferir que el flujo de carbono estaría siendo dirigido hacia la obtención de intermediarios del ciclo de Krebs en lugar de la generación de energía. Simultáneamente, el contenido de varios fenilpropanoides mostró un descenso marcado a lo largo del almacenamiento en frío, en concordancia con observaciones previas. Paralelamente, el incremento en el contenido de sacarosa en epicarpio,

observado por Perotti y col. (2011) en respuesta al tratamiento térmico, estaría relacionado con una mayor síntesis de este azúcar a partir de ácidos orgánicos. Los resultados obtenidos revelaron que la enzima sacarosafostato sintasa sería en parte responsable de este incremento, ya que no se puede descartar un posible movimiento de este metabolito desde el albedo hacia el flavedo.

**3.2. CARACTERIZACIÓN Y ESTUDIO DEL
COMPORTAMIENTO POSCOSECHA EN
MANDARINAS *CITRUS RETICULATA* VAR.
ELLENDALE Y MURCOTT**

3.2.1. INTRODUCCIÓN

Dentro de la familia de los cítricos las mandarinas son sin lugar a dudas el grupo de mayor diversidad. Las mandarinas tienen un alto grado de adaptación a un amplio rango climático, desde zonas desérticas hasta semitropicales. A pesar de ello, estos frutos poseen requerimientos climáticos muy específicos para producir frutos de alta calidad.

Las mandarinas son muy apreciadas por el consumidor de cítricos por diversas razones, pero en especial por su delicado sabor y fácil pelado. Dentro de las variedades cultivadas en Argentina producidas en la región de NEA se encuentran las mandarinas (*Citrus reticulata*) var. Ellendale y Murcott. Ambas fueron originadas por cruzamiento natural entre mandarinas y naranjas, razón por la cual se denominan tangor, palabra compuesta por “tang” proveniente del inglés tangerine por mandarina y “or”, de orange, por naranja.

Ellendale es una variedad que tiene su origen cerca del río Burrum, Queensland, en Australia, hacia 1878 (Ross, 1949). Es de maduración tardía, por lo cual el mejor período para cosechar en el NEA es a fines de julio y principios de agosto. La planta es de tamaño mediano a grande, de copa amplia y con algunas ramas de crecimiento vigoroso, en especial cuando es joven. Las podas sucesivas de la copa desde temprana edad favorecen la distribución de la fuerza para soportar ramas con frutos grandes y pesados. La fruta es de tamaño mediano a grande (70-80 mm), de color anaranjado a rojizo intenso y de fácil pelado (Figura 3.7). La pulpa y el jugo son de excelente color y sabor, con una relación sólidos solubles/acidez alta y equilibrada. El contenido de semillas en la fruta es bajo o nulo en plantaciones puras y aisladas de otras variedades.

Murcott es una variedad conocida desde hace mucho tiempo. No se conoce con certeza su origen, pero se especula que surgió en una de las plantaciones del departamento de agricultura de los Estados Unidos (USDA) en 1916. El nombre de esta variedad se debe a Charles Murcott Smith, quien en 1922 comenzó a cultivarlas en el estado de Florida (EEUU). Por esta razón en Argentina esta variedad también es conocida como Smith (Hodgson, 1967). La planta es vigorosa, de copa compacta y densa. Es muy productiva pero tiene tendencia a producción alternada. La producción excesiva no sólo tiene como consecuencia frutos más pequeños, sino que también tiene efectos nefastos en la planta. Este fenómeno se

conoce como colapso de Murcott y se cree que ocurre por un desbalance en las reservas de la planta. Este problema puede ser solucionado con podas y raleos de fruta. La planta es sensible al frío, en especial en años de mayor producción. La fruta es de tamaño mediano, firme, achatada, de color amarillo-anaranjado el cual se acentúa con la maduración. La cascara es fina, bastante pegada a los gajos (Figura 3.7). Sin embargo, se puede extraer con facilidad. Tiene un alto contenido de jugo, baja acidez y es muy dulce. Es una variedad de maduración tardía y alcanza su madurez comercial en julio-agosto (Ragone, 1996).



Figura 3. 7. Características externas de frutos de *Citrus reticulata* var. Ellendale y Murcott
Frutos de mandarinas *C. reticulata* var Murcott (izquierda) y var. Ellendale (derecha).

Estudios realizados por Cocco y col. (2010) mostraron que la exposición de frutos de las variedades Ellendale y Murcott a tratamientos cuarentenarios (15 días a 1°C y 7 días a 20°C) generaba un incremento en el contenido de etanol y acetaldehído en ambos cultivares, siendo significativamente superior en mandarinas Murcott.

3.2.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.2.2.1. ANÁLISIS DE LOS PARÁMETROS QUE DETERMINAN LA CALIDAD INTERNA DE FRUTOS DE MANDARINA VAR. ELLENDALE Y MURCOTT

En una primera instancia de este estudio se evaluaron los parámetros que determinan la calidad interna en mandarinas de las variedades Ellendale y Murcott, en especial aquellos que afectan el gusto. Para ello se midió el contenido de sólidos solubles totales, la acidez titulable y a partir de ellos se calculó el índice de madurez.

Como se observa en la figura 3.8, el SST, la AT y el IM no presentaron diferencias significativas entre las variedades estudiadas. Los valores de SST determinados fueron de 13,60 %P/V para Ellendale y 13,63 %P/V en el caso de Murcott. En cuanto a la AT, Ellendale presentó un valor de 1,42 %P/V mientras que en Murcott fue de 1,27 %P/V. Finalmente el IM calculado para Ellendale fue 9,57 y 10,71 para Murcott.

En segunda instancia se evaluó el contenido de etanol y acetaldehído. La figura 3.8 muestra los resultados obtenidos. Ellendale presentó un contenido significativamente mayor de acetaldehído y etanol que Murcott. Sin embargo, el nivel de etanol detectado en Ellendale no superó las 1000 ppm, límite a partir del cual se genera sabor desagradable (Hagenmaier, 2002).

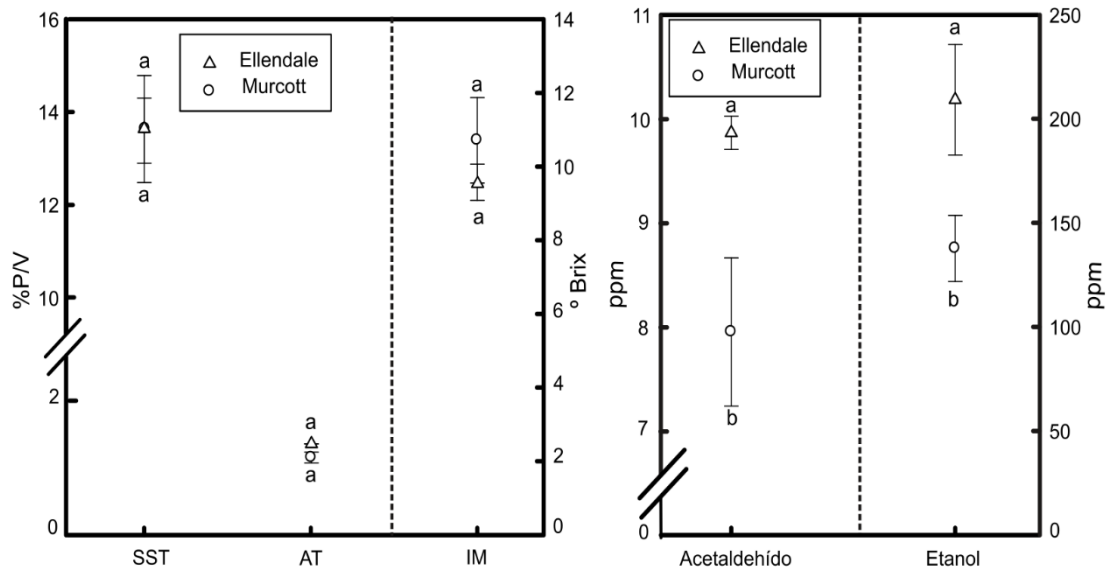


Figura 3. 8. Determinación de los parámetros de calidad interna en frutos de Ellendale y Murcott

Las barras representan los desvíos estándares de todas las medidas realizadas en 20 frutos. Las diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

En los últimos años se ha registrado un incremento mundial en el consumo de mandarinas como fruto fresco. Esta situación impulsó diversas investigaciones con el fin de caracterizar los parámetros que definen tanto la calidad externa como la interna en distintas variedades de mandarinas (Goldenberg y col., 2014; 2015; 2016).

Las mandarinas son apreciadas por el consumidor debido su sabor único, delicado y atractivo que deriva de notas dulces, agrias, frutadas, frescas y terrosas. De hecho, como ya fue mencionado, el sabor es consecuencia de la combinación entre el gusto, aroma y palatabilidad, los cuales son percibidos de manera simultánea por el cerebro mientras el fruto es comido.

El gusto es un parámetro que se encuentra gobernado principalmente por los niveles de azúcares y ácidos presentes en los sacos de jugos y por la relación que existe entre ellos, parámetro conocido como índice de madurez. Como en otras especies de cítricos, los principales azúcares presentes en la pulpa de las mandarinas son glucosa, fructosa y sacarosa. En cuanto a los ácidos, se puede mencionar al ácido cítrico el cual representa aproximadamente entre un 85-90% del contenido de ácidos orgánicos totales seguido por el málico y succínico (Ting y Attaway, 1971). Un estudio realizado por Goldenberg y col. (2015), reveló que las

variedades preferidas por el consumidor fueron aquellas cuyos valores de SST era de 13,1%P/V y 1,1 %P/V para la AT. Teniendo en cuenta que el valor de SST y AT para Ellendale fue de 13,60% P/V y 1,42%P/V mientras que para Murcott fue de 13,63%P/V y 1,27%, respectivamente, es posible inferir que las variedades estudiadas estarían dentro de las preferidas por el consumidor.

El aroma constituye otro de los factores que determinan el sabor. Un estudio realizado por Tietel y col. (2011) en pulpa de 13 variedades de mandarinas reveló nueve compuestos volátiles, los cuales fueron detectados en casi todos los experimentos, y por lo tanto podrían ser considerados como volátiles aromáticos centrales en jugo de mandarina. Estos compuestos fueron linalool (floral, cítrico), α -terpineol (floral), terpinen-4-ol (amaderado, terroso), nonanal (piney parecido a pino, floral, cítrico), decanal (graso, mohoso), carvona (menta verde, alcaravea), limoneno (parecido a los cítricos), α -pineno (tipo pino) y β -mirceno (mohoso, suelo húmedo). Por otro lado, es de gran importancia tener en cuenta el contenido de acetaldehído y etanol, ya que niveles elevados de estos compuestos pueden generar sabor desagradable (Obenland y col., 2011). En nuestro estudio, si bien Ellendale presentó un contenido significativamente superior de estos metabolitos al detectado en Murcott, esta situación no sería significativa desde el punto de vista de la calidad debido a que los valores determinados se encuentran por debajo de los límites tolerables (1000 ppm) (Hagenmaier, 2002).

3.2.2.2. OBTENCIÓN DEL PERFIL METABÓLICO UTILIZANDO DIVERSAS ESTRATEGIAS CROMATOGRÁFICAS

Diferentes investigaciones han revelado que el consumidor basa su elección por un fruto fresco principalmente en el aspecto externo del mismo. Con el objetivo de caracterizar el perfil metabólico de flavedo en las variedades Ellendale y Murcott, se utilizó cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa (CG-EM) para identificar metabolitos primarios y ácidos grasos (AG) totales esterificados a fosfolípidos de membrana, mono, di o triacilgliceroles. Por otro lado, mediante el uso de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se identificaron y cuantificaron de manera absoluta aminoácidos (AA). Finalmente, la determinación de metabolitos secundarios se realizó por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa (CL-EM). Como se puede observar en la Tabla 3.1, en total se identificaron 63 metabolitos.

METABOLITOS						
CG-EM					HPLC	CL-EM
Azúcares	Ácidos orgánicos	Polialcoholes	Otros	AG	AA	Secundarios
Melibiosa	Ribónico	Glicerol	GABA	14.0	Asp	Eriocitrina
Turanosa	Treónico	Mio-inositol	Putrescina	14.1	Glu	Didimina
Maltosa	Propanoico			15.0	OH-Pro	Narirutina
Fructosa	Cítrico			16.0	Ser	Diosmina
Glucosa	Málico			16.1*	Gln	Hesperidina
Galactosa	Cinámico			16.2	Cit	Isorhoifolina
Sacarosa				17.0	Thr	Escoparona
				17.1	Ala	Isosinensetina
				18.0	Pro	Sinensetina
				18.1*	Leu	Nobiletina
				18.2 $\Delta^{9,12}$	Val	Heptametoxiflavona
				18.3 $\Delta^{9,12,15}$	Cys	Tangeretina
				20.0	Orn	
				20.1	Trp	
				21.0	Lys	
				22.0		
				23.0		
				24.0		
				25.0		

Tabla 3. 1. Metabolitos determinados por CG-EM, HPLC y CL-EM

Utilizando valores normalizados (expresados como \log_2) de los resultados obtenidos a partir de la cuantificación absoluta de AA y relativa para resto de los metabolitos, se realizó un agrupamiento jerárquico. Para cada metabolito en cada muestra la escala de color es proporcional al contenido de cada compuesto identificado. Como se puede observar en la figura 3.9, Ellendale y Murcott presentaron perfiles metabólicos diferentes. Aquellos metabolitos cuyo contenido fue similar en ambas variedades se aglomeraron en el grupo I, mientras que el grupo II se constituyó por metabolitos cuyo nivel fue superior en Ellendale (Figura 3.9). Finalmente, el grupo III quedó conformado por aquellos compuestos cuyo contenido fue mayor en Murcott. Para ambas variedades los metabolitos que presentaron un nivel significativamente superior se detallaron en negrita en la figura 3.9.

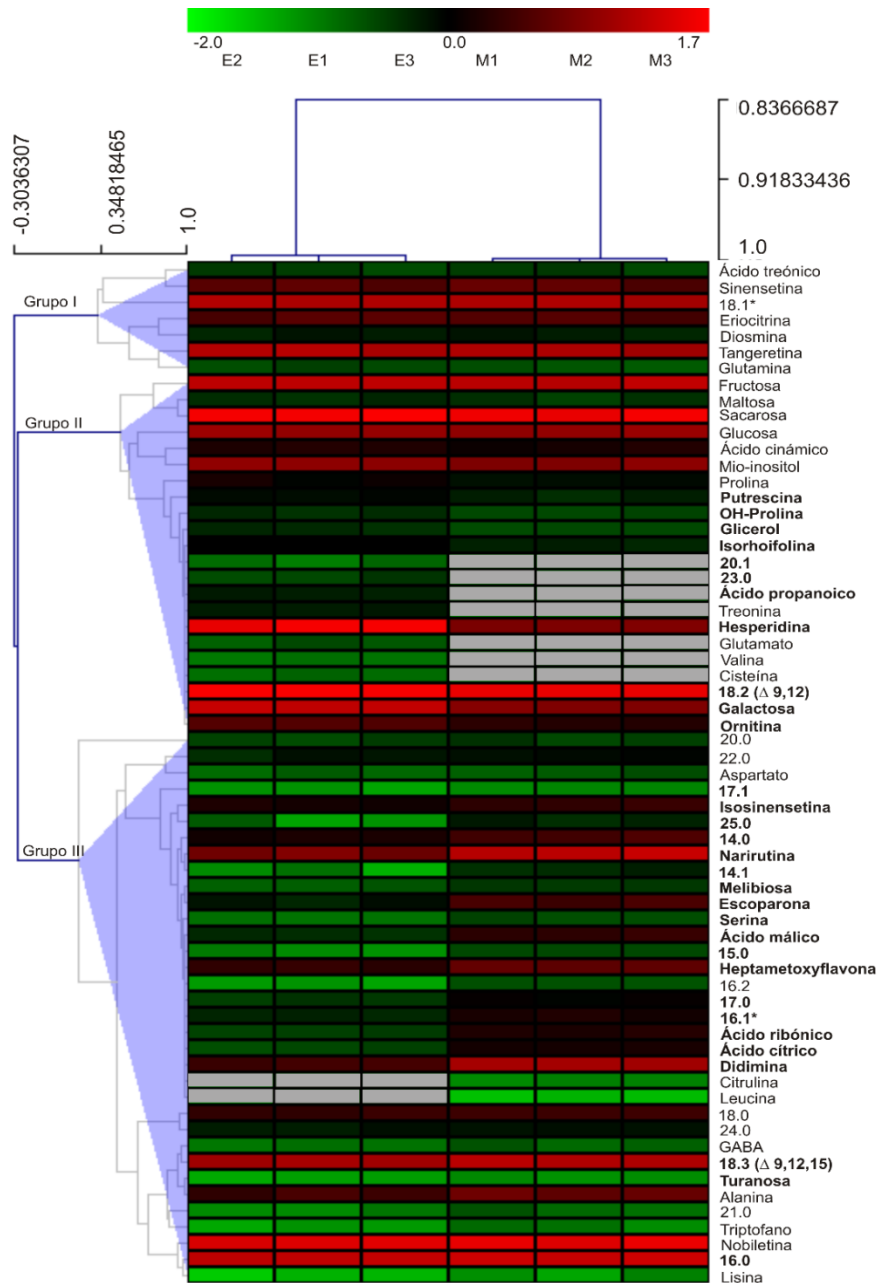


Figura 3. 9. Agrupamiento jerárquico de metabolitos primarios, secundarios, aminoácidos, ácidos grasos esterificados a fosfolípidos de membrana en extractos de epicarpio de frutos var. Ellendale (E) y Murcott (M)

El contenido relativo de cada metabolito en una muestra determinada o el contenido absoluto, para el caso de AA, fue dividido por el contenido promedio total de ese mismo compuesto detectado en todas las muestras evaluadas. Los valores normalizados expresados como \log_2 se analizaron en el software Multi Experiment Viewer (MeV v4.4.1) y se muestran en una escala de colores (que se describe en la parte superior de la figura). Se definieron tres grupos principales. Los metabolitos que variaron significativamente ($P < 0,05$) se resaltan en negra. Los metabolitos que no pudieron ser identificados se detallan en color gris.

3.2.2.2.1. CONTENIDO RELATIVO DE METABOLITOS PRIMARIOS EN EPICARPIO DE MANDARINA VAR. ELLENDALE Y MURCOTT

Mediante la utilización de la técnica CG-EM se pudieron detectar 17 metabolitos primarios. Los valores asociados a cada compuesto, fueron referidos al control interno (ribitol) y sólo se graficaron aquellos cuyo contenido varió significativamente entre las dos variedades (Figura 3.10).

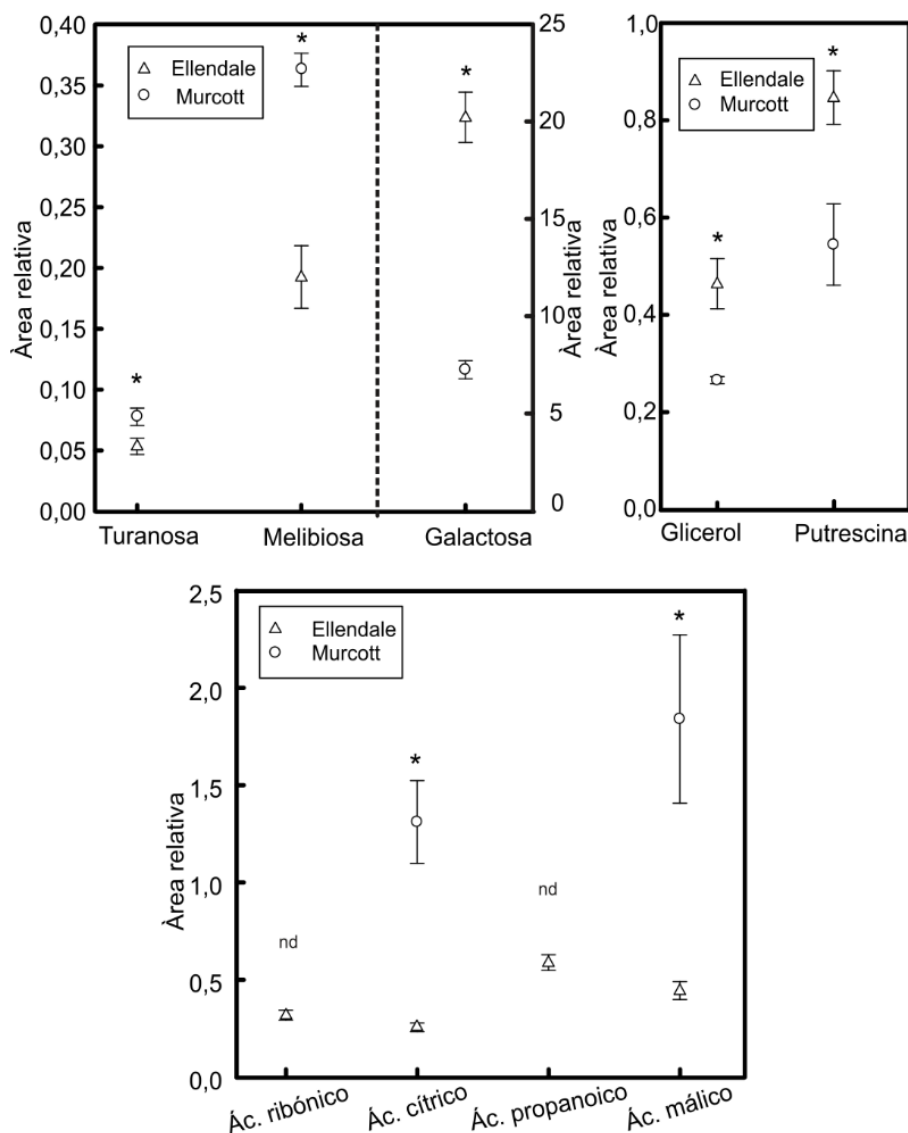


Figura 3. 10. Cuantificación relativa de metabolitos primarios en extractos de epicarpio de Ellendale y Murcott

Los niveles de los metabolitos analizados se expresaron como el área del pico del ión elegido para su cuantificación relativizada al ión del ribitol. Los asteriscos indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Los resultados de este estudio muestran que el contenido de maltosa, sacarosa, fructosa y glucosa no presentó diferencias significativas en las variedades estudiadas (Figura 3.9). Sin embargo, se detectaron variaciones en el nivel de

turanosa, melibiosa y galactosa. En la figura 3.10 se puede observar que el contenido de los dos primeros azúcares fue significativamente mayor en Murcott mientras que el nivel del tercero fue significativamente superior en Ellendale.

Los azúcares poseen diversos roles importantes durante la vida de las plantas. Durante la exposición a bajas temperaturas estos metabolitos pueden actuar como osmoprotectores, estabilizadores de membranas y proteínas, reguladores de la expresión de genes involucrados en la respuesta a estrés por frío y reaccionar con ERO (Tarkowski y Van der Enden, 2015).

En plantas superiores, durante mucho tiempo, el disacárido turanosa (3-O-alfa-D-glucopiranosil-D-fructosa) fue considerado como un análogo no metabolizable de la sacarosa. Un estudio realizado en tomate por Sinha y col. (2002) propuso que este metabolito podía actuar como molécula señal ya que observaron una fuerte activación de la vía de señalización de MAP quinasa (MAPK) por turanosa y no en presencia de su análogo sacarosa. Sin embargo, la degradación de un compuesto es condición indispensable para que pueda actuar como metabolito señal. Así, este rol comenzó a ser considerado cuando Wu y Birch (2011) observaron un elevado nivel de hidrólisis de turanosa en nectarinas y en los internodos de caña de azúcar. Tiempo más tarde, Krasensky y Jonak (2012) detectaron que esta vía de señalización era inducida por estrés salino y por frío. Así, el alto nivel de turanosa detectado en Murcott podría estar dado por la exposición a bajas temperaturas durante la maduración *in planta* y/o por un desbalance en el equilibrio síntesis/degradación. En caso de que la primera hipótesis tuviese más relevancia, se podría inferir que la variación observada en el contenido de turanosa estaría indicado una diferencia en la susceptibilidad frente al frío de las variedades en estudio. Cuando se evaluó el registro de temperatura, no se detectaron heladas al menos 45 días antes de la cosecha, aunque la temperatura mínima alcanzó los 0°C por lo que no puede descartarse la incidencia de este factor en los niveles de este metabolito.

La familia de oligosacáridos de la rafinosa está constituida por rafinosa, estaquiosa y melibiosa, entre otros. Estos metabolitos se acumulan en las plantas bajo condición de estrés por frío pero su rol en la adquisición de tolerancia no se conoce (Krasensky y Jonak, 2012). La melibiosa es generada a partir de degradación de rafinosa. Esta reacción es catalizada por una invertasa. A su vez este metabolito, por acción de una melibiasa, genera galactosa y glucosa (Cook y

col., 2004). En este trabajo el contenido de melibiosa (D-galactopiranosil- α -1-6-D-glucopiranososa) detectado en Murcott fue de casi dos veces mayor al observado en Ellendale. En este contexto, el incremento en el contenido de melibiosa podría ser consecuencia de un aumento en la ruta de síntesis a partir de galactosa y glucosa, considerando que el contenido en Murcott de galactosa fue menor. Sin embargo, no se puede descartar la contribución de la ruta de degradación de la rafinosa y que el bajo contenido de galactosa implique una menor degradación de pectinas como se comentará en el párrafo siguiente. Estos resultados refuerzan nuevamente la propuesta de que las variedades en estudio podrían poseer diferente susceptibilidad al frío.

Finalmente, en la figura 3.10 se puede observar que el contenido de galactosa detectado en Ellendale fue significativamente mayor que en Murcott. La pared celular de las plantas se encuentra formada por tres polisacáridos principales, microfibras de celulosa embebidas en una matriz de hemicelulosa y pectina. En particular, la pectina está constituida por residuos de ácido galacturónico, los cuales dan origen a cuatro tipos de polisacáridos: homogalacturonanos (HGA), ramnogalacturonanos I (RGI), ramnogalacturonanos II (RGII), y xilogalacturonanos (XGA) (Mohnen, 2008; Ridley y col., 2001). La galactosa es un producto de degradación de las pectinas. Estudios realizados por Almeida y Huber (2008) revelaron un incremento en el contenido de este metabolito en el fluido apoplástico de pericarpio de frutos de tomate durante la maduración. El incremento en la concentración libre de galactosa podría ser consecuencia de una combinación entre un aumento en la hidrólisis de la pared (Kim y col., 1991) y una disminución en la capacidad de metabolizarla (Gross y Saltveit, 1982). Pressey (1983) observó que la β -galactosidasa II, una β -galactasa presente en pared celular de frutos de tomates, presentaba un incremento en su actividad durante la maduración del fruto. En base a los resultados obtenidos se puede inferir que en Ellendale el incremento en el contenido de galactosa podría estar correlacionado con una mayor degradación de la pared celular y/o una menor capacidad para metabolizarla durante la maduración de fruto.

Por otro lado, se identificaron distintos ácidos orgánicos como el ácido ribónico, treónico, cítrico, málico, cinámico y propanoico (Figura 3.9). El nivel de los ácidos treónico y cinámico no presentó diferencias significativas. En cambio, como se puede observar en la figura 3.10 el nivel de ácido cítrico, málico fue

significativamente superior en Murcott mientras que el ácido ribónico y propanoico sólo fueron detectados en Ellendale.

Una investigación llevada a cabo por Roongruangsri y col. (2012) reveló que el contenido de ácido cítrico en mandarinas Sai Num Phueng fue significativamente superior al detectado en la variedad See Thong. La determinación de la actividad de la enzima citoplasmática aconitasa en ambas variedades mostró una disminución marcada en la primera. Estos resultados llevaron a la conclusión de que el aumento detectado en el nivel de ácido cítrico estaría relacionado con una disminución en la actividad de la aconitasa citoplasmática. No obstante, para poder inferir que el contenido superior de ácido cítrico en Murcott esté relacionado a una disminución en la actividad de la aconitasa sería fundamental medir la actividad de esta enzima.

En plantas, considerando el mismo estadio de desarrollo, el contenido de malato está regulado por varias rutas biosintéticas y degradativas como así también por el almacenamiento vacuolar, siendo altamente dependiente del tejido. También se informó que la temperatura, la disponibilidad de agua y los efectos de fertilización afectan el contenido de este metabolito (Lin y col., 2016; Lipton y col., 1987). La cantidad de ácido málico fluctúa debido al nivel de actividad de diferentes isoformas de malato deshidrogenasas para dar OAA, o de enzimas málicas que producen piruvato, y el reclutamiento de este ácido dicarboxílico para anabolismo. Como el NAD(P) es el cofactor implicado en estas reacciones, el estado redox de las células también es asociado con este metabolito. Sin embargo, Etienne y col. (2013) señalaron que el malato estaría involucrado en la regulación del pH citosólico, por ende, su acumulación en las células de los frutos dependería del almacenamiento vacuolar más que de su metabolismo. Consideraciones termodinámicas sobre transportadores tonoplásticos de protón y malato modeladas sobre durazno reforzaron esta hipótesis (Lobit y col., 2006).

La expresión y/o regulación diferencial de diversos transportadores vacuolares y el contenido de potasio citosólico, el cual está regulado por el antiporte K^+/H^+ , podrían estar involucrados en la variación del pH vacuolar. La acumulación de ácidos dentro del tonoplasto actuaría como una “trampa ácida”, es decir, las bases conjugadas entrarían al lumen ácido vacuolar donde al protonarse quedan atrapadas. Consecuentemente, cuanto más bajo es el pH de la vacuola mayor es su capacidad para almacenar ácidos. En este estudio se observó un mayor

contenido de ácido málico para Murcott. Esto podría indicar una actividad diferencial de los transportadores de malato y cationes y/o bombas ATP. Sin embargo, no es posible excluir que una diferencia en el metabolismo de malato pueda ser la causa de la diferencia observada en las distintas variedades. Para esto es necesario medir la actividad de enzimas involucradas en la síntesis y degradación de este metabolito. Un estudio de proteómica realizado en Murcott postuló que las enzimas involucradas en la glucólisis y en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) no estarían completamente involucradas en el contenido diferencial de ácidos orgánicos. (Yu, Q. y col., 2015).

El ácido ribónico sólo fue detectado en Ellendale y su contenido relativo fue comparable con los otros ácidos detectados en esta variedad. Li y col. (2017) reportaron que el incremento en el contenido de GABA, en respuesta a sequía, se correlacionaba con un aumento en el nivel de diversos metabolitos dentro de los cuales se encontraba el ácido ribónico. En este contexto, si bien las diferencias observadas no pueden ser explicadas ya que, hasta el momento, su rol en el metabolismo de las plantas no pudo ser definido con precisión, la realización de estudios adicionales sobre la respuesta del flavedo a diferentes tipos estrés bióticos y abióticos y sus efectos sobre los contenidos de ácidos orgánicos, podría aclarar el panorama.

En cuanto al ácido propanoico, este sólo se detectó en Ellendale (Figura 3.10). Un estudio realizado por Lucas y col. (2007) propuso que este último estaría principalmente relacionado con la degradación de ácidos grasos de cadena impar y ramificada a través de una ruta de β -oxidación modificada llevada a cabo por enzimas localizadas en peroxisomas. Por lo tanto, la diferencia en el contenido de ácido propanoico detectado podría indicar una variación en la capacidad de Ellendale y Murcott para metabolizar AG de cadena ramificada e impar.

La técnica utilizada también permitió detectar otros compuestos como putrescina, GABA, mio-inositol y glicerol (Figura 3.9). Mientras que el contenido de GABA y mio-inositol no presentó diferencias, los niveles de putrescina y glicerol fueron significativamente mayores en Ellendale (Figura 3.10).

Las poliaminas (PA), como putrescina, espermina y espermidina, son metabolitos involucrados en la tolerancia a estrés biótico y abiótico. La función biológica de estos policationes en un principio fue relacionada a su capacidad de unirse a macromoléculas cargadas negativamente, como ácidos nucleicos y

proteínas. De esta manera podían ejercer un rol en la regulación de la transcripción y traducción (Gill y Tuteja, 2010; Hatmi y col., 2014). También se ha sugerido que podrían estabilizar la membrana en condiciones de estrés y estar involucrados con los sistemas antioxidantes (Bachrach, 2010; Gill y Tuteja, 2010; Igarashi y Kashiwagi, 2010; Liu y col., 2015).

En líneas generales distintos tipos de estrés abióticos activan la transcripción de la arginina decarboxilasa, la primera enzima de la ruta de biosíntesis de la poliaminas. El tamaño del pool de poliaminas podría estar correlacionado con la capacidad de tolerancia a estrés; genotipos tolerantes acumulan más estos metabolitos que los genotipos sensibles (Liu y col., 2015). Como se mencionó con anterioridad, en este estudio el contenido de putrescina detectado fue significativamente superior en Ellendale. Esto podría estar indicado una mayor tolerancia a diferentes tipos de estrés abiótico de esta variedad.

Otra de las diferencias encontradas en el contenido de metabolitos primarios fue en el nivel de glicerol, siendo significativamente mayor en Ellendale. Un incremento de este metabolito podría ser el resultado de catabolismo más activo de triacilgliceroles o de cambios en la dinámica de los fosfolípidos. Los ácidos grasos libres están implicados en las cascadas de señalización provocadas por diferentes tipos de estrés abióticos como por ejemplo déficit de agua y estrés por temperatura. Los lípidos señales pueden reclutar transitoriamente proteínas diana en la membrana y, por lo tanto, afectar la actividad de proteínas intracelulares y niveles de metabolitos (Hou y col., 2016).

3.2.2.2.2. CONTENIDO DE AMINOÁCIDOS EN EPICARPIO DE MANDARINA VAR. ELLENDALE Y MURCOTT

La determinación de aminoácidos (AA) se realizó utilizando la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Dahlan-Daud y col., 2010). Como muestra la figura 3.9 se pudo detectar 15 AA diferentes. Ellendale presentó un nivel superior de ornitina y de OH-prolina. Por su parte, Murcott mostró un contenido significativamente superior de serina (Figura 3.11). Resultó interesante que los aminoácidos glutamina, treonina, valina y cisteína, por un lado; y citrulina y leucina, por otro, fueron exclusivamente detectados en Ellendale y Murcott, respectivamente (Figura 3.11).

En un estudio realizado en mandarinas Satsuma por Matsumoto e Ikoma (2012), se reveló que la exposición de frutos a temperaturas de 5°C inducía una acumulación de ornitina y glutamina. Por otro lado, Cook y col. (2004) observaron en plantas de *Arabidopsis thaliana* un incremento en el contenido de ornitina, glutamina y citrulina cuando eran expuestas a bajas temperaturas. También, se ha informado que plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que acumulaban ornitina son tolerantes a estrés por sequía y salinidad (Kalamki y col., 2009). La ornitina es una AA requerido en la síntesis de PA. Como se mencionó en la sección precedente, las PA están relacionadas con la tolerancia frente a distintos tipos de estrés abióticos. Si bien el registro de temperatura durante 45 días antes de la cosecha no presentó heladas, la temperatura mínima que se alcanzó fue de 0°C. Teniendo en cuenta que el contenido de putrescina y de ornitina fue significativamente superior en Ellendale esto podría estar indicando una respuesta metabólica por parte de esta variedad a la baja temperatura durante su maduración *in planta*.

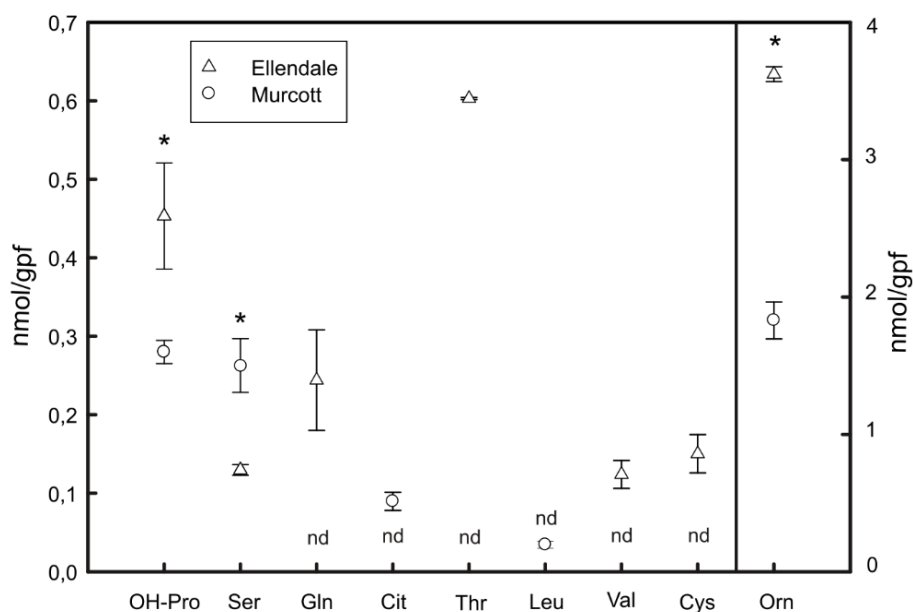


Figura 3. 11. Cuantificación absoluta de aminoácidos en extractos de epicarpio de Ellendale y Murcott
Los niveles de los metabolitos analizados se expresaron como mmol/gpf. Los asteriscos indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

La figura 3.11 muestra que el contenido de serina fue significativamente diferente entre variedades, siendo mayor en Murcott. En plantas este aminoácido es sintetizado mediante tres vías diferentes: a través de la ruta del glicolato,

asociada con la fotorrespiración; la del glicerato y la de las vías fosforiladas (Ros, y col., 2014). Ho y Saito (2001) observaron que esta última ruta de biosíntesis se encontraba inducida en plantas de *Arabidopsis thaliana* expuestas a diferentes tipos de estrés abióticos como estrés salino y por frío.

Finalmente, también se detectó citrulina en Murcott (Figura 3.11). Como se mencionó anteriormente, este AA se encuentra relacionado con la respuesta al frío. Cabe destacar que ambas variedades estuvieron expuestas a bajas temperaturas durante la maduración *in planta*. Por lo tanto, la presencia de citrulina y serina en el perfil de AA de Murcott podría estar indicando una respuesta metabólica diferencial por parte de esta variedad en comparación a la observada en Ellendale frente al mismo tipo de estrés abiótico.

3.2.2.2.3. ÁCIDOS GRASOS

En el siguiente apartado se describirán los resultados obtenidos a través del análisis de la composición de ácidos grasos (AG) totales esterificados a fosfolípidos de membrana, mono, di o triacilgliceroles. En este estudio se utilizaron muestras de epicarpio (flavedo) y endocarpio (sacos de jugos) de las variedades Murcott y Ellendale.

El análisis de la composición de AG de epicarpio reveló que, si bien se observaron algunas diferencias significativas, en general no hubo grandes cambios entre los cultivares estudiados. Dentro de los AG más abundantes que se observaron se destaca el ácido linoleico (18:2($\Delta^{9,12}$)), el cual presentó un contenido relativo del 45% y el 35% en Ellendale y Murcott respectivamente, siendo significativamente mayor en la primera variedad (Figura 3.12). El segundo AG más abundante fue el ácido palmítico (16:0). El mismo representó el 19,5% y 23,0% de los ácidos grasos totales en Ellendale y Murcott, respectivamente. En Murcott los niveles observados de ácido oleico (18:1(Δ^9)) y linolénico (18:3($\Delta^{9,12,15}$)) fueron de 12% y 15% respectivamente, siendo este último significativamente mayor en esta variedad (Figura 3.12). También se detectó ácido esteárico (18:0) y mirístico (14:0) aunque con niveles bajos, de alrededor de 2-3% en cada tipo de fruta. El contenido de 14:0 fue significativamente superior en Murcott. Los ácidos grasos con números impares de carbono (15 a 25 carbonos) fueron los menos abundantes, con niveles por debajo 1% AG totales (Figura 3.12). El índice de doble enlace (DBI, por las siglas en inglés Double Bond Index) es una medida del grado de insaturación de

las membranas lipídicas (ver *Materiales y Métodos*). El DBI calculado fue de 144 ± 3 para Ellendale y 132 ± 4 para Murcott, siendo significativamente superior en la Ellendale.

En cuanto al perfil lipídico determinado en endocarpio (figura 3.12) se puede observar que el orden de abundancia de ácidos grasos detectados en las dos variedades estudiadas fue: 18:1(Δ^9) (más del 30 %) siendo el AG más abundante seguido de 18:2($\Delta^{9,12}$) y 18:3($\Delta^{9,12,15}$). Las diferencias más importantes entre las variedades estudiadas fueron en el contenido de 18:2($\Delta^{9,12}$) con un 22% en Ellendale y un 30% en Murcott y en el nivel de 18:3($\Delta^{9,12,15}$) el cual presentó una tendencia opuesta. Tanto en Ellendale como en Murcott el contenido de ácido palmítico y esteárico fue del 2% y 15% respectivamente. Cabe destacar que el 16:2 si bien fue detectado en epicarpio de ambas variedades, en sacos, sólo fue determinado en Ellendale. Por otro lado, el 14:1 sólo se detectado en epicarpio de Murcott y Ellendale. En endocarpio, el DBI para Ellendale fue 128 ± 4 mientras que para Murcott fue de 134 ± 5 , no siendo esta diferencia significativa.

La diferencia observada en el DBI entre los tejidos de la variedad Ellendale podría atribuirse mayormente al mayor contenido de 18:2($\Delta^{9,12}$) detectado en epicarpio de esta variedad.

Es importante resaltar que un nivel alto de ácido grasos insaturados (AGI) se encuentra relacionado a una mayor tolerancia al estrés por frío, si bien no es el único factor implicado, obviamente. Estudios realizados en duraznos mostraron que el incremento en el contenido de AGI en frutos almacenados a 0°C comparado con controles que permanecían a 5°C fue unos de los factores que contribuyó a evitar el daño por frío. Lurie y col. (1997) observaron que en tomate la aplicación de tratamiento térmico aumentaba la tolerancia al frío y estaba correlacionada con el aumento de AGI.

Existen investigaciones que han revelado que los ácidos grasos triénicos (AT) son de gran importancia frente al estrés por temperatura y estrés biótico (Yaeno y col., 2004). Específicamente en cloroplasto el ácido linoleico (18:3($\Delta^{9,12,15}$)) es un activador de la NADPH oxidasa induciendo la acumulación de ROS durante la respuesta hipersensitiva. Se conoce que el contenido de AT es producto de las $\omega 3$ y $\omega 6$ ácido graso desaturasas. En plantas estas enzimas se localizan en el cloroplasto o retículo endoplasmático (RE).

En resumen, en base a los resultados obtenidos en este trabajo se podría inferir que Ellendale posee membranas más fluidas lo cual le podría otorgar una ventaja en condiciones de bajas temperaturas o durante caídas abruptas de temperatura. En consecuencia, el estudio de la expresión y regulación de $\omega 3$ ácido graso desaturasas es de gran importancia ya que en citrus es escaso el conocimiento sobre esta enzima

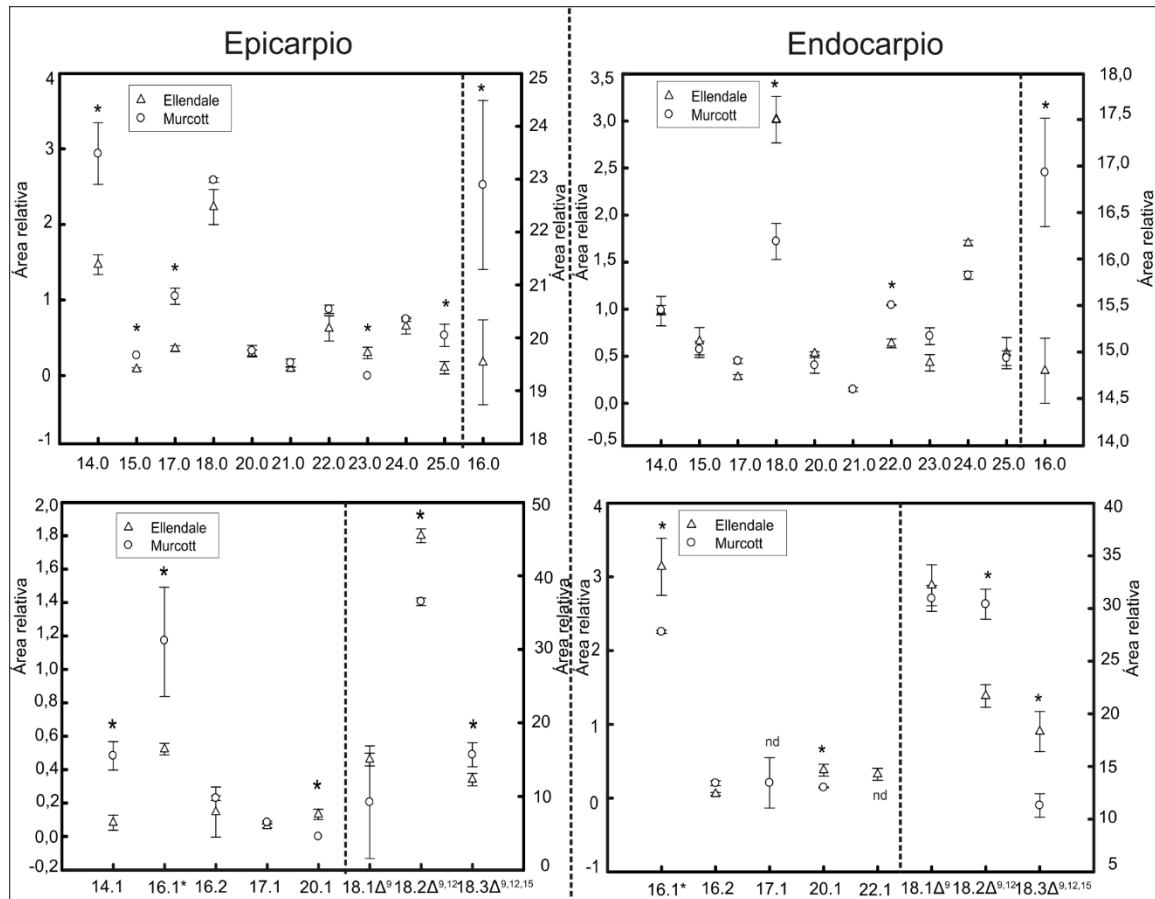


Figura 3. 12. Cuantificación relativa de ácidos grasos totales esterificados a fosfolípidos de membrana mono, di o triacilgliceroles en extractos de epicarpio y endocarpio de Ellendale y Murcott

Los niveles de los metabolitos analizados se expresaron como el área relativa. Los asteriscos indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

3.2.2.2.4. CONTENIDO RELATIVO DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN EPICARPIO DE ELLENDALE Y MURCOTT

El flavedo de cítricos constituye la primera barrera física frente a patógenos. Por esta razón no es sorprendente que este el tejido posea un alto contenido de flavonoides, compuestos fenólicos y fitoalexinas implicadas en los mecanismos de defensa de la planta (Horowitz, 1961). Además, los flavonoides son apreciados porque confieren beneficios para la salud humana debido a sus propiedades

antioxidantes y antiinflamatorias (Chen y col., 1990; 1997). Los flavonoides pueden ser clasificados como flavanonas (como hesperidina, narirutina, eriocitrina) o polimetoxiflavonas (como nobiletina, tangeretina, sinensetina).

En la figura 3.13 se puede observar el contenido relativo de los metabolitos secundarios que fueron detectados en Ellendale y en Murcott. El flavonoide más abundante detectado en Ellendale fue la hesperidina, siendo cinco veces superior a los niveles detectados en Murcott. Por su parte, esta última presentó el nivel más alto de nobiletina (Figura 3.13). También se observaron diferencias significativas en el contenido de narirutina, didimina, isorhoifolina, heptametoxiflavona, isosinensentina, y escoparona, siendo las tres primeras más abundantes en Ellendale, mientras que los niveles de las tres últimas fueron mayores en Murcott (Figura 3.13). El contenido total de metabolitos secundarios, que se obtuvo por sumatoria de las áreas relativas, fue de 110 ± 9 para Ellendale y de 105 ± 8 para Murcott. El mismo no presentó diferencias significativas entre las variedades estudiadas.

Estudios realizados en *C. sinensis* and *C. paradisi* mostraron que la nobiletina y hesperidina fueron los flavonoides más efectivos en la defensa contra *P. digitatum* (Ortuño y col., 2006). Investigaciones más recientes correlacionaron el contenido de metabolitos secundarios en diferentes variedades de limones, naranjas, tangerinas y pomelos con la velocidad inicial de infección *P. digitatum*. La correlación observada entre los factores en estudio fue negativa; cuanto mayor era el contenido de las flavanonas hesperidina, naringinina y de la flavona diosmina, menor era la susceptibilidad a la infección (Ortuño y col., 2011).

En resumen, se podría inferir que las variedades analizadas en este trabajo tienen la misma habilidad de responder ante una posible infección, al menos en lo que a contenido total de metabolitos secundarios se refiere. El alto contenido de hesperidina y de nobiletina detectado en Ellendale estaría indicando una ventaja de esta variedad frente al ataque del patógeno *P. digitatum* (Ortuño y col., 2006; 2011). Sin embargo, para poder dilucidar la contribución de cada compuesto a la resistencia frente a patógeno es necesario realizar estudios más específicos.

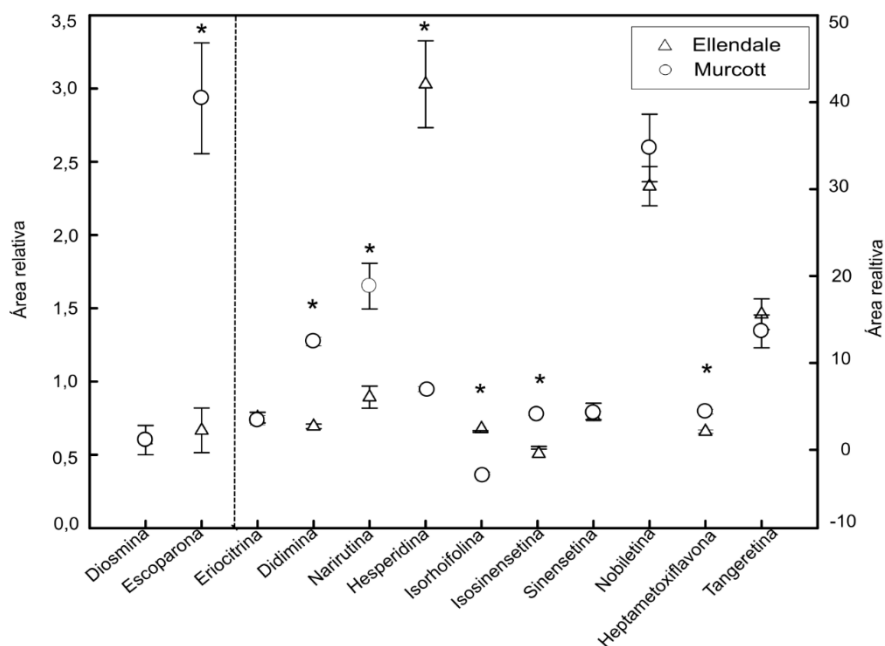


Figura 3. 13. Cuantificación relativa de metabolitos secundarios en extractos de epicarpio de mandarinas var. Ellendale y Murcott

Los niveles de los metabolitos secundarios analizados se expresaron como el área relativa. Los asteriscos indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

3.2.2.3. ENZIMAS DEL METABOLISMO ANTIOXIDANTE

En esta sección se describirán los resultados obtenidos a partir de las actividades de las enzimas SOD, POD y CAT. Las mismas se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes revelados por actividad enzimática (Figura 3.14)

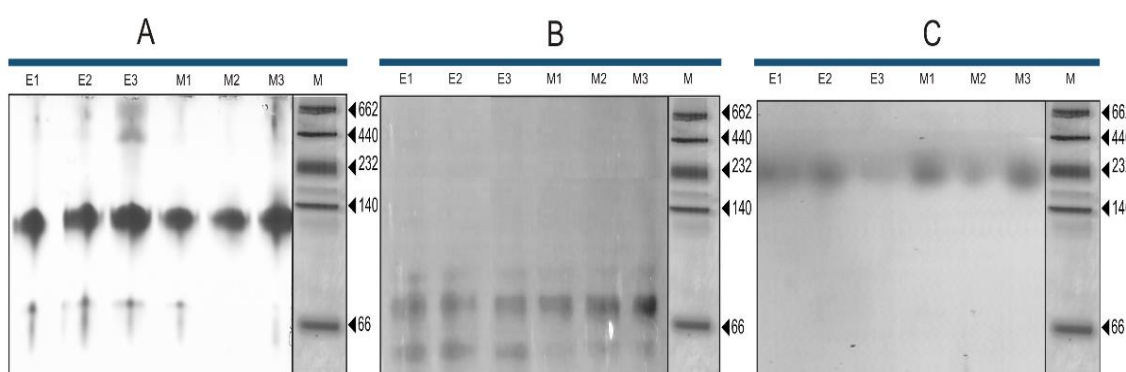


Figura 3. 14. Análisis de las enzimas POD (A), SOD (B), y CAT (C) en extractos de epicarpio de mandarinas var. Ellendale y Murcott mediante electroforesis en condiciones no desnaturizantes revelados por actividad enzimática

En todos los casos el esquema de siembra fue el siguiente: extractos crudos de tres réplicas biológicas independientes de Ellendale (E1, E2, E3), seguidas de tres réplicas biológicas independientes de Murcott (M1, M2, M3) y finalmente el marcador de peso molecular M. En todas las calles se sembraron 20 μ g de proteína total.

Para el análisis comparativo, las bandas fueron cuantificadas por densitometría, graficándose la de densidad óptica (DO) para cada enzima (Figura 3.15).

En el caso de las enzimas POD y CAT, no se observaron diferencias significativas entre las variedades estudiadas. Mientras que la actividad enzimática de SOD fue significativamente mayor en Ellendale (Figuras 3.14 y 3.15).

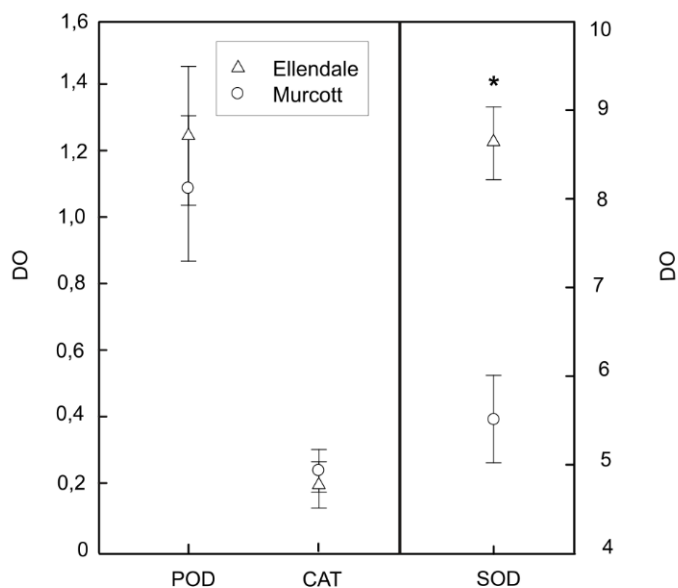


Figura 3. 15. Densitometría de la actividad de POD, SOD y CAT en extractos de epicarpio de mandarinas var. Ellendale y Murcott

Las bandas fueron cuantificadas mediante la determinación de la intensidad de densidad óptica (DO). Los asteriscos indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Con el propósito de profundizar la caracterización de las potenciales isoformas de SOD de flavedo, se realizaron estudios de inhibición selectiva con cianuro (inhibidor de las isoformas Cu/Zn-SOD) o H_2O_2 (inhibidor de las isoformas Fe-SOD y Cu/Zn-SOD) previamente a ser revelados por actividad, como se describe en *Materiales y Métodos*. Los resultados obtenidos mostraron que la banda de mayor movilidad electroforética en ambas variedades se inhibió en presencia de cianuro. La incubación con H_2O_2 provocó la inhibición de las bandas de menor y mayor movilidad electroforética sin afectar a la banda intermedia tanto en Ellendale como Murcott (Figura 3.16). De este modo es posible corroborar que las isoformas presentes en ambas variedades son Fe-SOD, Mn-SOD, Cu/Zn-SOD, que se corresponden con las bandas de movilidad electroforética menor, intermedia y mayor, respectivamente.

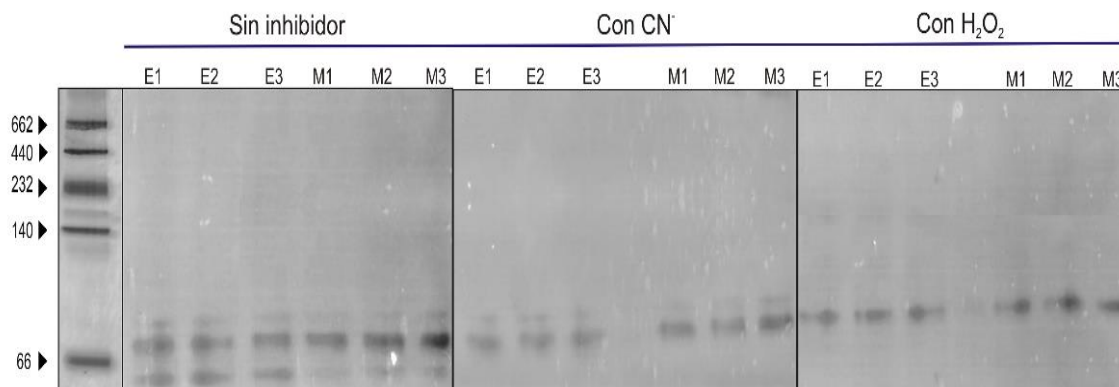


Figura 3. 16. Enzayos de inhibición de la actividad de SOD en flavedo mandarinas var. Ellendale y Murcott mediante electroforesis en condiciones no desnaturalizantes revelados por actividad enzimática

En todos los casos el esquema de siembra fue el siguiente: extractos crudos de tres replicas biológicas independientes de Ellendale (E1, E2, E3) seguidas de tres réplicas biológicas independientes de Murcott (M1, M2, M3) y finalmente el marcado de peso molecular M. En todas las calles se sembraron 20 µg de proteína total

Distintas investigaciones mostraron que en mandarinas tolerantes al daño por frío como Clementina y Clemenules el sistema antioxidante era más eficiente en comparación con Fortuna, una variedad sensible (Sala, 1998; Sala y Lafuente, 1999; 2000). Por otro lado, las ERO están involucradas en mecanismos de defensa intrínsecos del fruto y actuarían como una primera barrera contra el ataque de patógenos (Prusky y Lichter, 2007) ya que las ERO se hallan vinculadas con la respuesta hipersensitiva, típica de las interacciones de incompatibilidad planta-patógeno (Mehdy, 1994; Wojtaszek, 1997). A su vez, pueden evitar la expansión de la infección aumentando la resistencia de las paredes celulares y/o provocando la muerte del patógeno en forma directa. Adicionalmente, son capaces de actuar como moléculas señalizadoras de las vías de defensa del hospedador frente al ataque del patógeno (Dat y col., 2000).

Resulta claro que la respuesta de las plantas a las ERO debe recaer en un equilibrio entre los efectos favorables de dicho metabolismo y su contraparte nociva. Frente a este escenario, resultó interesante evaluar el comportamiento de las principales enzimas antioxidantes, observándose que la actividad CAT y POD no presentaron diferencias significativas en los cultivares estudiados. Por otro lado, la actividad de SOD fue significativamente mayor en Ellendale, probablemente debido al incremento detectado en la actividad de la isoforma Zn/Cu-SOD (Figura 3.16). SOD es una metaloenzima y constituye uno de los componentes más eficientes del sistema de defensa frente al efecto tóxico de ERO. Debido a que las

membranas son impermeables al radical superóxido las isoformas de SOD se encuentran presentes en distintos compartimentos celulares (Sarvajeet y col., 2015). La isoforma Mn-SOD se encuentra localizada en mitocondrias y peroxisomas, la Fe-SOD en cloroplastos y la Zn/Cu-SOD es la más abundante ya que no sólo se localiza en cloroplastos y peroxisomas sino que también se encuentra en el citosol, apoplastos y núcleo. Estudios realizados por Faize y col. (2011) revelaron que la sobreexpresión la Zn/Cu-SOD en plantas transgénicas de *Nicotiana tabacum* cv. *Xanthi* aumentaba la tolerancia frente al estrés hídrico; mientras que Gupta y col. (1993) reportaron que un incremento en la expresión de esta isoforma se correlacionaba con un aumento en la tolerancia a frío y calor. En este contexto, se podría inferir que Ellendale presenta una mayor capacidad para eliminar el radical superóxido que Murcott, situación que otorgaría una ventaja en condiciones que produzcan incremento de las ERO.

3.2.2.4. EFECTO DEL TRATAMIENTO TÉRMICO POSCOSECHA Y DEL ALMACENAMIENTO A BAJA TEMPERATURA EN LA CALIDAD INTERNA DE MANDARINAS ELLENDALE Y MURCOTT

El almacenamiento a baja temperatura es una estrategia ampliamente utilizada para extender la vida poscosecha. En determinados cultivares, como por ejemplo las mandarinas, el período de almacenamiento es importante ya que la calidad interna de las mismas tiende disminuir de manera más rápida que otros, por ejemplo las naranjas. Kader y Arpaia (2002), recomiendan no exceder las 4 semanas de almacenamiento en frío para evitar la pérdida del sabor.

En una primera instancia se evaluó la capacidad del tratamiento térmico para prevenir la infección por *P. digitatum*. Para esto, se evaluó la incidencia de podredumbre en ambas variedades, 30 días después de haber realizado la inoculación del patógeno; tanto en fruta control como fruta sometida a tratamiento térmico (véase en *Materiales y Métodos*).

La figura 3.17, muestra que el tratamiento térmico redujo significativamente la incidencia de podredumbre en ambas variedades, de 76,2 a 18,9% en Ellendale y de un 97,5 a 54,8% para Murcott. En este contexto cabe destacar que estos resultados concuerdan con los descritos en la sección 3.2.2.2, en la cual se sugirió que el perfil de metabolitos secundarios detectado en Ellendale le otorgaría una

ventaja a la hora de enfrentar este tipo de estrés biótico. Es más, como se describió en la introducción de esta Tesis, los tratamientos térmicos pueden actuar directamente sobre el hongo o de manera indirecta sobre el fruto. En este trabajo el curado se aplicó después de realizar la inoculación con *P. digitatum*, por lo tanto, el efecto directo sobre el hongo debería ser el mismo en ambas variedades. Así, la comparación de los resultados obtenidos en ambas variedades indicaría que el calor produce cambios en la capacidad de los frutos para frenar el desarrollo de la enfermedad.

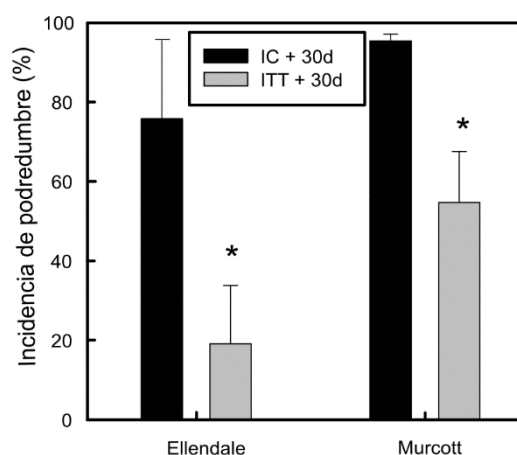


Figura 3. 17. Efecto del tratamiento térmico sobre la incidencia de podredumbre en las variedades Ellendale y Murcott después de 30 días de realizar la inoculación con *P. digitatum*

Se inocularon con *P. digitatum* frutos de mandarinas Ellendale y Murcott. Posteriormente se expusieron a tratamiento térmico. El asterisco indica diferencia significativa ($P < 0,05$).

El segundo objetivo de esta sección fue evaluar el efecto del tratamiento térmico y almacenamiento en frío en la calidad interna de la fruta en ambas variedades. Para ello se determinó contenido de sólidos soluble totales (SST), la acidez titulable (AT) y con estos parámetros se calculó el índice de madurez ($IM = SST / AT$). Además de la pérdida de agua que sufren los frutos cosechados por transpiración, cabe recordar que el calor es un tipo de estrés abiótico que tiene una componente de deshidratación (Pedreschi y Lurie, 2015). Por esta razón, se evaluó la pérdida de peso de los frutos. Por último, también se determinó el contenido de acetaldehído y etanol; debido a que estos compuestos en altos niveles afectan de manera negativa el sabor de los frutos (Hagenmaier, 2002).

Como se puede observar en la figura 3.18, el curado y el período de almacenamiento no generaron diferencias significativas en los parámetros de SST (panel A), AT (panel B); y por ende el IM tampoco se vio afectado (panel C). La determinación del porcentaje de pérdida de peso reveló que tanto el curado como el tiempo de almacenamiento provocaron un incremento significativo en la deshidratación de ambos cultivares (Figura 3.18, panel D). A pesar de esto, los valores determinados se encuentran dentro de los límites tolerables. Finalmente, tanto el curado como el almacenamiento en frío aumentaron el contenido de etanol y acetaldehído tanto en Ellendale como en Murcott (Figura 3.18 paneles E y F).

El gusto y el aroma son dos factores que determinan el sabor de las frutas. El primero depende de SST, AT y la relación SST / AT, mientras que el segundo está definido por un conjunto complejo de compuestos volátiles y es afectado de manera negativa por acetaldehído y etanol (Hagenmaier, 2002). Por otro lado, es fundamental tener en cuenta que un tratamiento poscosecha no sólo es efectivo si evita el crecimiento de patógenos, sino que también debe preservar tanto la calidad interna como externa del fruto (Pedreschi y Lurie, 2015). Los niveles detectados de compuestos volátiles que alteran el aroma fueron significativamente superiores en frutas tratadas; no obstante, en ningún caso alcanzaron niveles asociados con mal sabor (> 1000 ppm) (Hagenmaier, 2002).

En conjunto, los resultados obtenidos sugieren que el tratamiento térmico aplicado no modificó de manera significativa ninguno de los factores relacionados con el gusto durante el almacenamiento en frío en ninguna de las variedades estudiadas.

En conclusión, tanto el tratamiento térmico como el período de almacenamiento seleccionados cumplen con el objetivo de disminuir la incidencia de podredumbre causada por *P. digitatum* sin afectar de manera significativa la calidad interna y externa tanto en mandarinas Ellendale como Murcott.

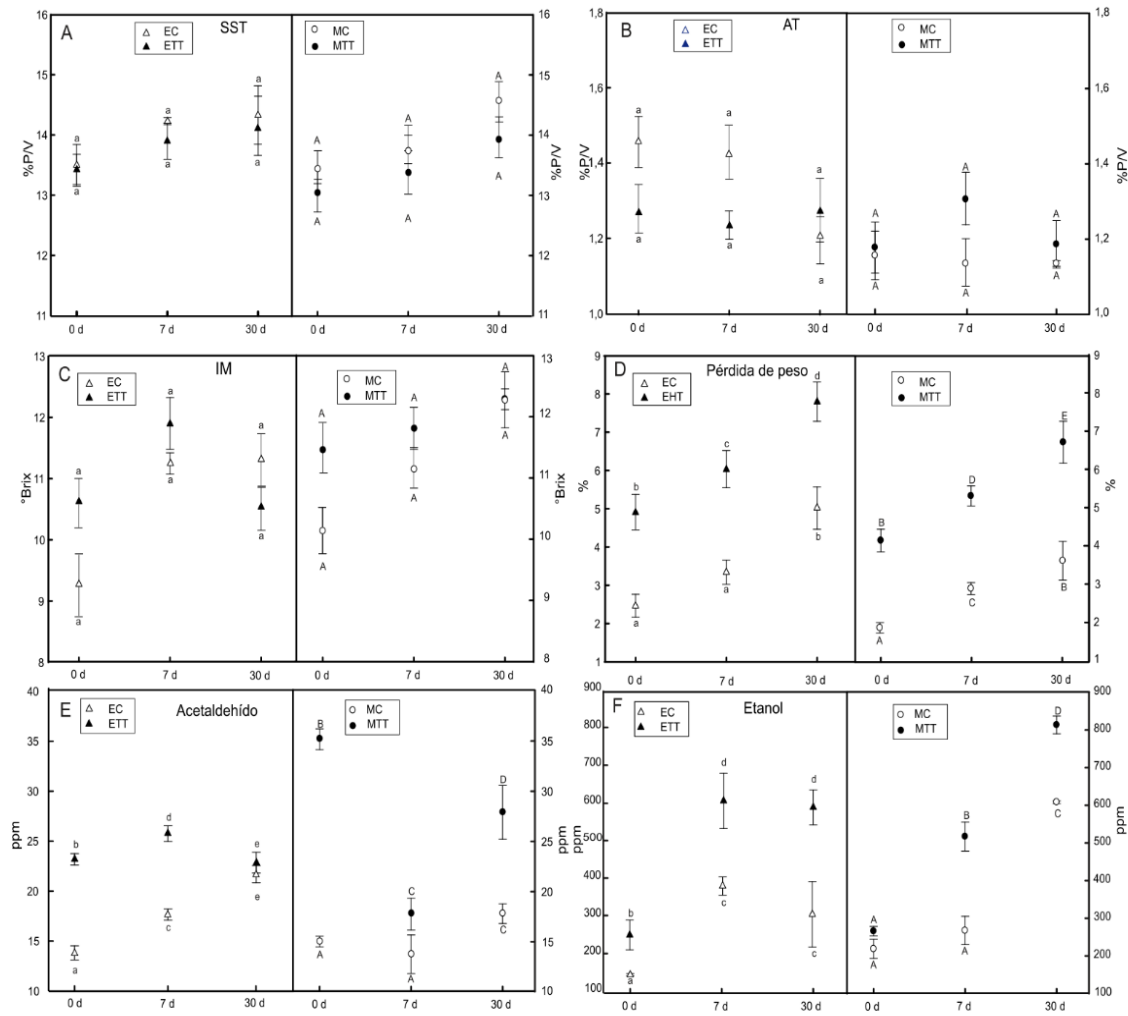


Figura 3. 18 Parámetros de calidad interna de frutos de mandarina var. Ellendale y Murcott expuestos tratamiento térmico y almacenamiento a 5°C
 Sólidos solubles totales (A), acidez titulable (B), índice de madurez calculado como proporción de SST / AT (C). Porcentaje de la pérdida de peso fresco (D). El contenido de acetaldehído y de etanol se muestran en los paneles E y F, respectivamente. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) causadas por el tratamiento térmico y el periodo de almacenamiento en Ellendale (minúsculas) y en Murcott (mayúsculas).

3.2.2.5. ANÁLISIS DE PERFILES METABÓLICOS DE EPICARPIO DE FRUTOS EXPUESTOS A TRATAMIENTO TÉRMICO Y ALMACENAMIENTO POSCOSECHA

Con el objetivo de estudiar el efecto del tratamiento térmico y del almacenamiento a 5°C sobre el metaboloma de epicarpio se realizó un estudio de metabolómica. Mediante ensayos de CG-EM y CL-EM se pudieron identificar 49 metabolitos cuyo contenido relativo, en Ellendale y Murcott, se muestra en la figura 3.19.

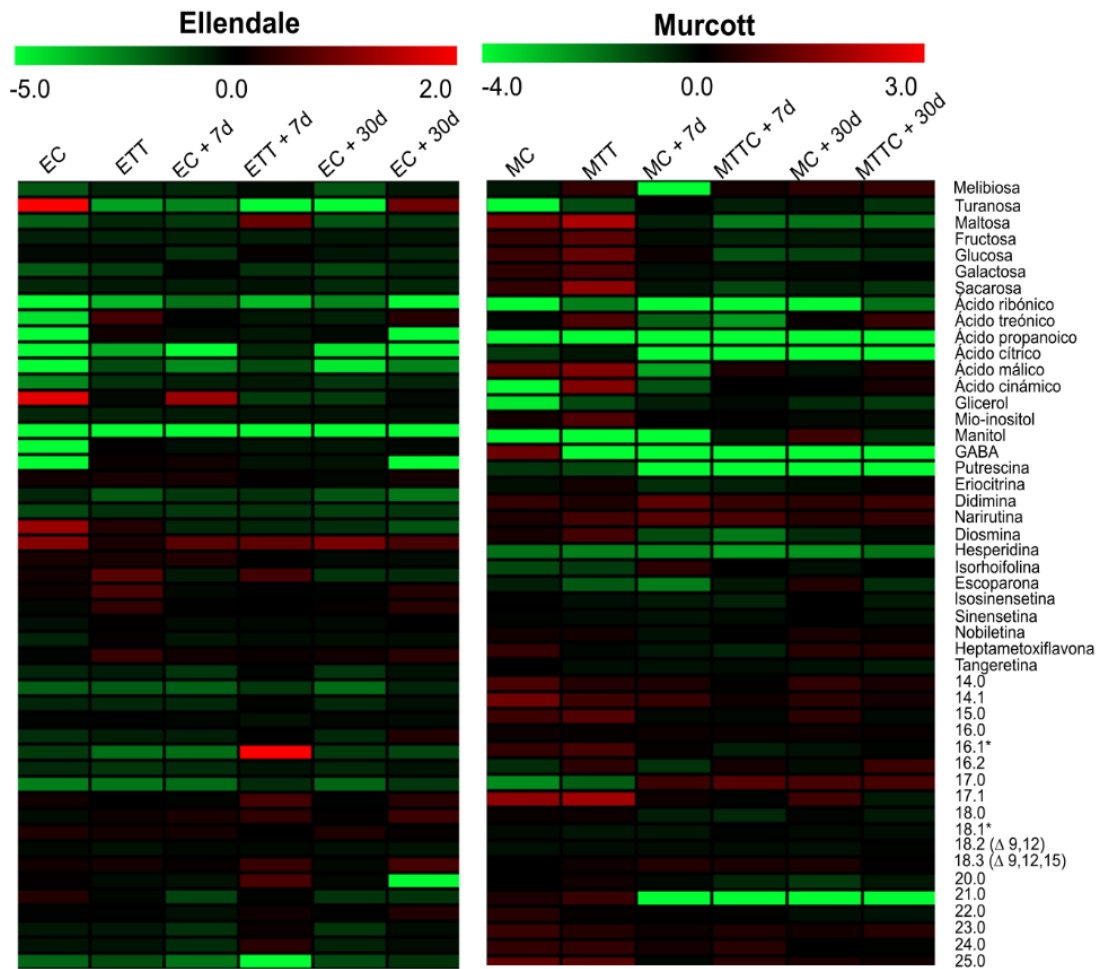


Figura 3. 19. Contenido relativo de metabolitos en flavedos de mandarinas Ellendale y Murcott expuestos tratamiento térmico y posterior almacenamiento a 5°C

El contenido relativo de cada metabolito en una muestra determinada fue dividido por el contenido promedio total de ese mismo compuesto detectado en todas las muestras evaluadas. Los valores normalizados expresados como \log_2 se analizaron en el software Multi Experiment Viewer (MeV v4.4.1) y se muestran en una escala de colores (que se describe en la parte superior de la figura). EC: epicarpio control de Ellendale a 0 días de almacenamiento; ETT: epicarpio curado de Ellendale a 0 días de almacenamiento; EC + 7d: epicarpio control de Ellendale a 7 días de almacenamiento; ETT + 7d: epicarpio curado de Ellendale a 7 días de almacenamiento; EC + 30d: epicarpio control de Ellendale a 30 días de almacenamiento; ETT + 30d: epicarpio curado de Ellendale a 30 días de almacenamiento; MC: epicarpio control de Murcott a 0 días de almacenamiento; MTT: epicarpio curado de Murcott a 0 días de almacenamiento; MC + 7d: epicarpio control de Murcott a 7 días de almacenamiento; MTT + 7d: epicarpio curado de Murcott a 7 días de almacenamiento; MC + 30d: epicarpio control de Murcott a 30 días de almacenamiento; MTT + 30d: epicarpio curado de Murcott a 30 días de almacenamiento.

Los resultados obtenidos por CG-EM y CL-EM junto a los datos de SST, AT, IM, contenido de acetaldehído y etanol fueron utilizados para realizar un estudio exploratorio de ACP (Análisis de Componentes Principales). Dos componentes principales pudieron explicar el 59,14% de la varianza total observada (39,47% y 19,67% para CP1 y CP2, respectivamente) (Figura 3.20). La gráfica de ACP muestra que ambas variedades se separaron en dos grupos en base a la CP1. Se comprobó previamente que todos los metabolitos que contribuyeron a la CP1 caracterizaban a cada una de las variedades en estudio (sección 3.2.2.2). Los compuestos que contribuyeron principalmente a CP1 fueron: hesperidina (4,0%) y 18:2($\Delta^{9,12}$) (3,9%), nuevamente más altos en Ellendale; manitol (3,5%), narirutina (4,0%), 14:0 (3,6%), 14:1 (Δ^9) (4,1%), 17:1 (3,7%) mayor en Murcott. Por otro lado, la maltosa (6,6%), glucosa (5,3%), sacarosa (5,2%), ácido cítrico (6,9%), isorhoifolina (4,8%) y 17:0 (6,3%) fueron las principales variables que contribuyeron a CP2. La lista completa de contribución de cada una de las variables en estudio se informa en la tabla 3.2.

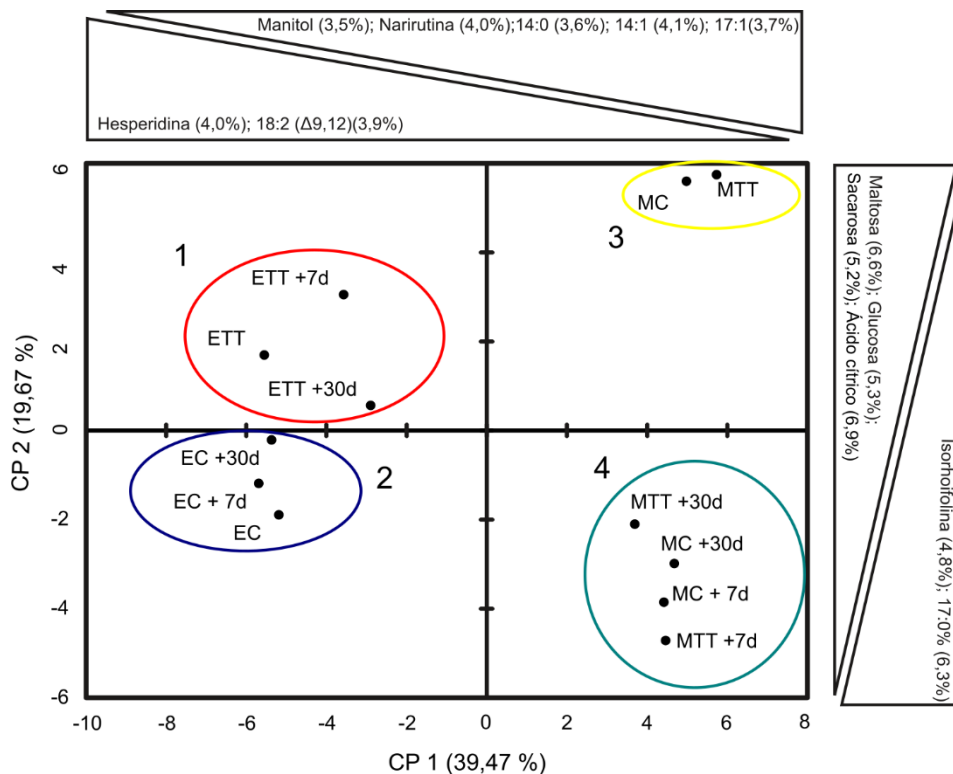


Figura 3. 20. Análisis de componentes principales en flavedo de Ellendale y Murcott expuestos a tratamiento térmico y almacenamiento a 5°C

El primer componente (39,47%) separa cada variedad en base a los metabolitos que más las diferencian y el segundo componente (19,67%) separa los grupos en base al comportamiento después de los tratamientos.

	CP1	CP2
Melibiosa	0,0160	1,0344
Turanosa	0,1448	2,6037
Maltosa	0,3901	6,5628
Fructosa	1,8236	3,8761
Glucosa	0,2815	5,3275
Galactosa	2,7658	0,8128
Sucrosa	0,9312	5,1763
Ácido ribónico	0,0066	0,0094
Ácido treónico	0,1254	2,0561
Ácido propanoico	2,4286	0,2622
Ácido cítrico	0,0000	6,8770
Ácido málico	2,0018	0,9168
Ácido cinámico	0,0379	1,2135
Glicerol	2,4364	0,4712
Mio-inositol	2,9462	1,4031
Manitol	3,5065	0,8480
GABA	2,5020	0,0328
Putrescina	0,7876	0,8394
Acetaldehído	0,0081	1,8520
Etanol	0,2566	0,7087
SST	0,4048	1,4065
AT	2,0132	0,2881
IM	1,2585	0,0062
Pérdida de peso	0,1352	0,0912
Eriocitrina	1,0540	2,1404
Didimina	3,3706	0,3319
Narirutina	4,0499	0,1656
Diosmina	0,0133	2,1549
Hesperidina	4,0610	0,2125
Isorhoifolina	0,8856	4,7738
Escoparona	0,6865	0,0207
Isosinensetina	1,5830	1,0982
Sinensetina	1,5139	0,8157
Nobiletina	1,7477	1,3128
Heptamethoxiflavona	0,9749	1,0257
Tangeretina	2,5063	0,9816
14:0	3,6411	0,3452
14:1	4,1001	0,1523
15:0	3,0723	1,8203
16:0	3,2579	0,4198
16:1*	1,8331	3,2120
16:2	0,9766	0,1673
17:0	0,3540	6,2818
17:1	3,7036	1,0201
18:0	0,7595	4,4304
18.1*	1,8483	0,1702
18:2 (Δ 9,12)	3,9555	0,0404
18:3 (Δ 9,12,15)	3,2476	1,0252
20:0	1,1705	3,2541
20:1	3,4551	0,0558
21:0	1,4416	5,1166
22:0	0,1363	3,4948
23:0	3,3377	0,3116
24:0	2,8036	0,8389
25:0	1,4058	0,2090

Tabla 3. 2. Porcentaje de contribución de cada uno de los metabolitos a las componentes principales 1 (CP1) y 2 (CP2)

En las figuras 3.21 y 3.22 se muestran los resultados obtenidos a partir del análisis estadístico de los metabolitos que contribuyeron a las CP1 y CP2 respectivamente.

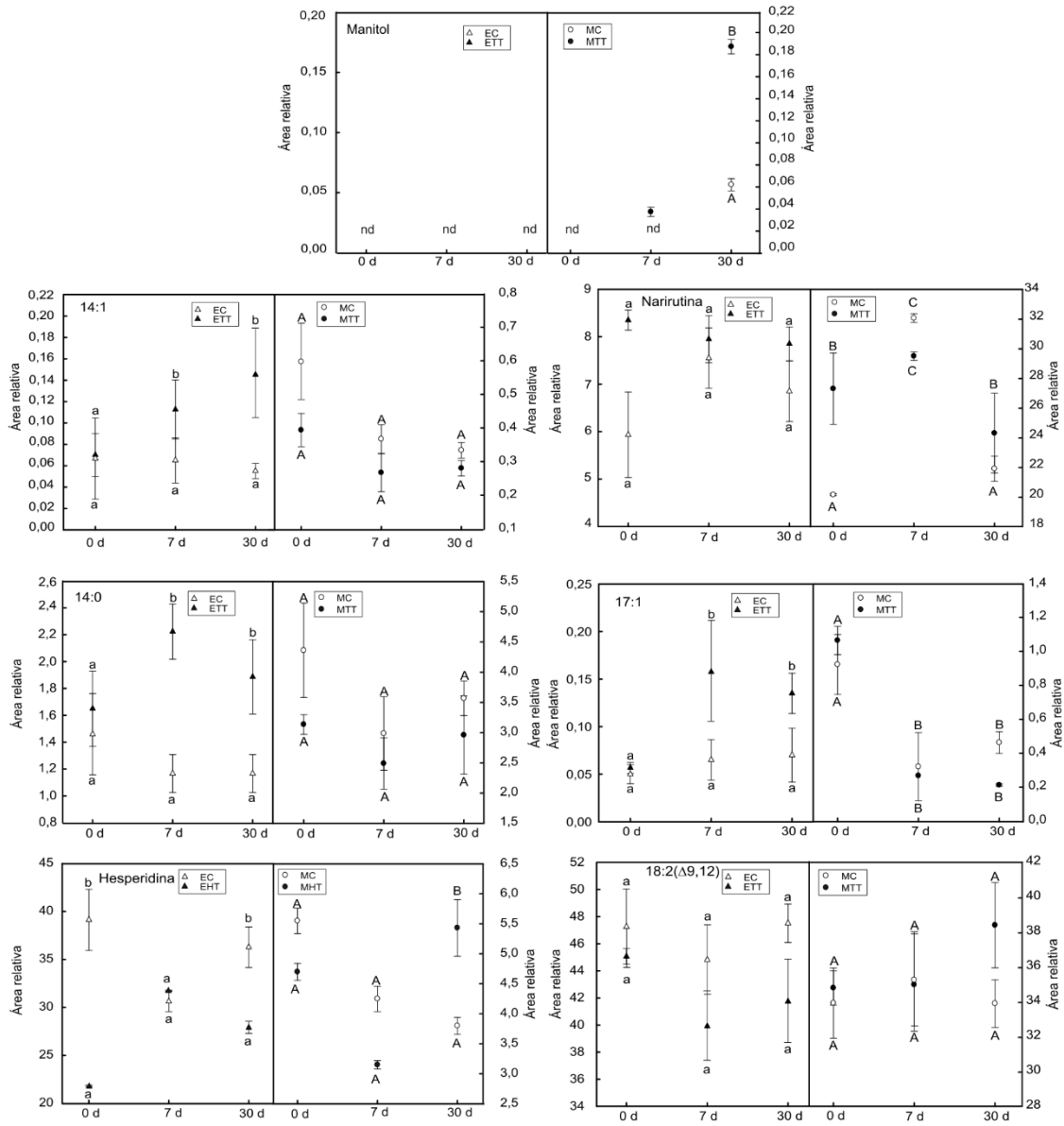


Figura 3. 21. Análisis estadístico de metabolitos que contribuyen a la componente principal 1 (CP1) Metabolitos que contribuyeron a la CP1. Las diferentes letras indican variación significativa (P < 0,05)

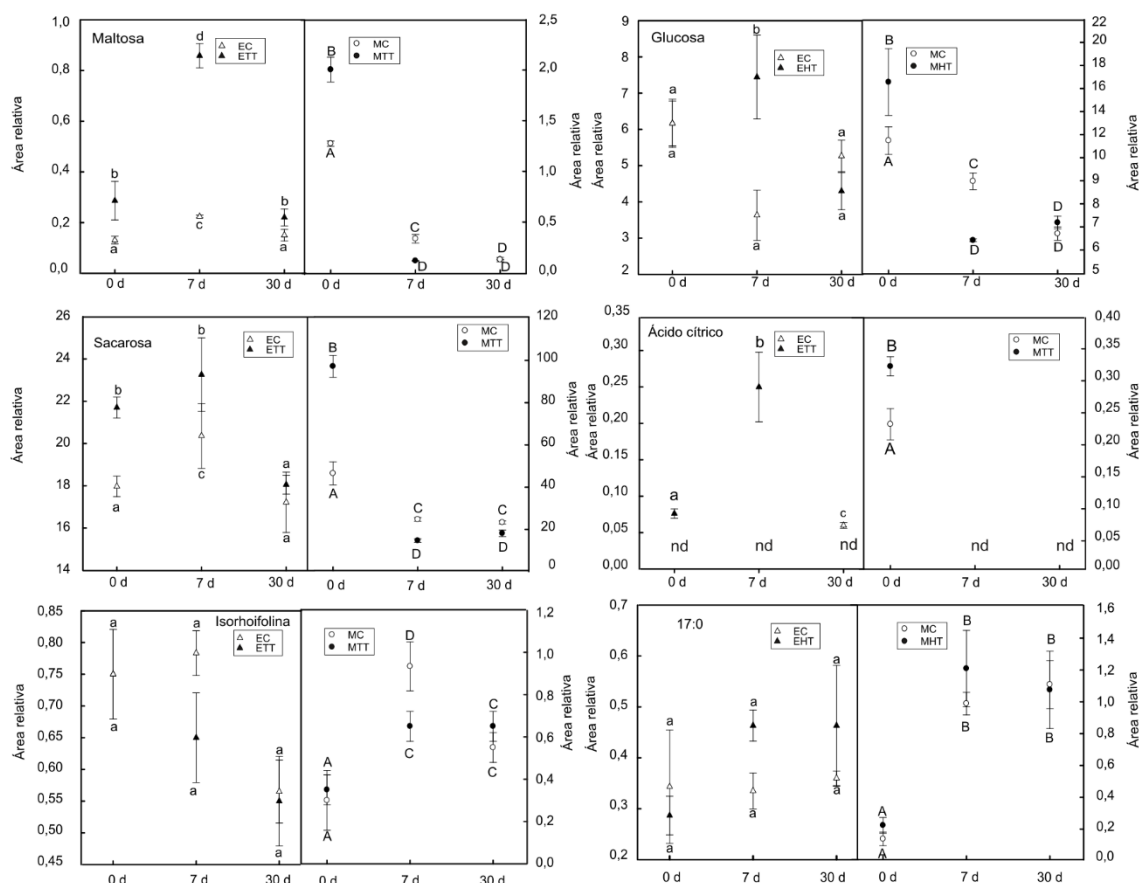


Figura 3. 22. Análisis estadístico de metabolitos que contribuyen a la componente principal 2 (CP2) Metabolitos que contribuyeron a la CP2. Las diferentes letras indican variación significativa ($P < 0,05$)

Como se puede observar en la figura 3.20, la componente principal 2 reveló una respuesta metabólica diferencial de cada una de las variedades frente al tratamiento térmico y al período almacenamiento. De hecho, las muestras de Murcott almacenadas a 7 y 30 días se agruparon juntas, independientemente del curado; y se separaron de las muestras de control y tratadas de 0 días. Por el contrario, el metaboloma de las muestras de Ellendale cambió en respuesta al tratamiento térmico, pero no con el tiempo de almacenamiento. Los flavedos curados y almacenados a 0, 7 o 30 días, formaron un grupo separado de controles en los mismos períodos.

Como se puede observar en la figura 3.21 se detectó un incremento en el contenido de manitol durante el almacenamiento en epicarpio de Murcott; mientras que en Ellendale este metabolito no pudo ser determinado. El manitol es compuesto que se encuentra fuertemente relacionado con la respuesta a diferentes tipos de estrés abióticos y bióticos y puede actuar como protector osmótico, molécula señal y/o antioxidante (Meena y col., 2015; Patel y Williamson, 2016; Stoop y col., 1996).

Este polialcohol es sintetizado principalmente en las hojas y es traslocado a tejido y órganos heterotróficos, como las frutas, donde puede ser almacenado o consumido como fuente de energía (Meena y col., 2015; Stoop y col., 1996). De esta manera, la acumulación de manitol en Murcott estaría generada por el efecto combinado entre el incremento en el transporte a partir de tejidos fuentes y una disminución en la degradación en tejidos sumideros, como el epicarpio del fruto. Esta situación podría ser responsable de la respuesta diferencial en la acumulación de manitol detectada en Murcott durante la poscosecha. Como se observa en la figura 3.18, panel D, el tratamiento térmico y el período de almacenamiento indujeron la pérdida de peso en ambas variedades. Sin bien el porcentaje de pérdida determinado fue similar en Ellendale y Murcott, la deshidratación generada podría haber sido suficiente para disparar la acumulación de manitol en epicarpio de Murcott. Otra posibilidad podría radicar en la acumulación diferencial de azúcares, que se observó en respuesta a la aplicación del tratamiento térmico (Figura 3.21). Los hidratos de carbono son metabolitos osmoprotectores, por lo tanto, el aumento inducido por curado en Ellendale podría estar reduciendo el estrés osmótico generado por la deshidratación e inhibiendo en la producción de manitol en Ellendale.

Debido a que las plantas no pueden escapar de condiciones adversas, han desarrollado una serie de mecanismos complejos para poder evitar el daño causado por estas. En este contexto, las fluctuaciones en la temperatura inducen modificaciones en diferentes componentes celulares dentro de los cuales se pueden mencionar cambios en el grado de insaturación de los ácidos grasos, en la composición de glicerolípidos y en la redistribución de AG entre otros (Murata y Los, 1997). Bitá y Gerats (2013) postularon que una de las primeras señales detectadas es el cambio en la fluidez de las membranas. En este trabajo se detectó un alto contenido de AG de cadena larga como el 14:0, 14:1(Δ^9) y 17:1 en epicarpio de Murcott, mientras que en Ellendale el nivel de AG 18:2 ($\Delta^{9,12}$) fue superior. Además, en ambas variedades el contenido relativo de 18:2 ($\Delta^{9,12}$) fue mayor que el de los 14:0, 14:1(Δ^9) y 17:1, por lo tanto, este AG podría ser responsable de incrementar la fluidez de la membrana. Como se mencionó previamente, un buen indicador del grado de insaturación de los AG de membrana es el índice de doble enlace DBI (de las siglas en inglés Doble Bond Index) (Figura 3.23).

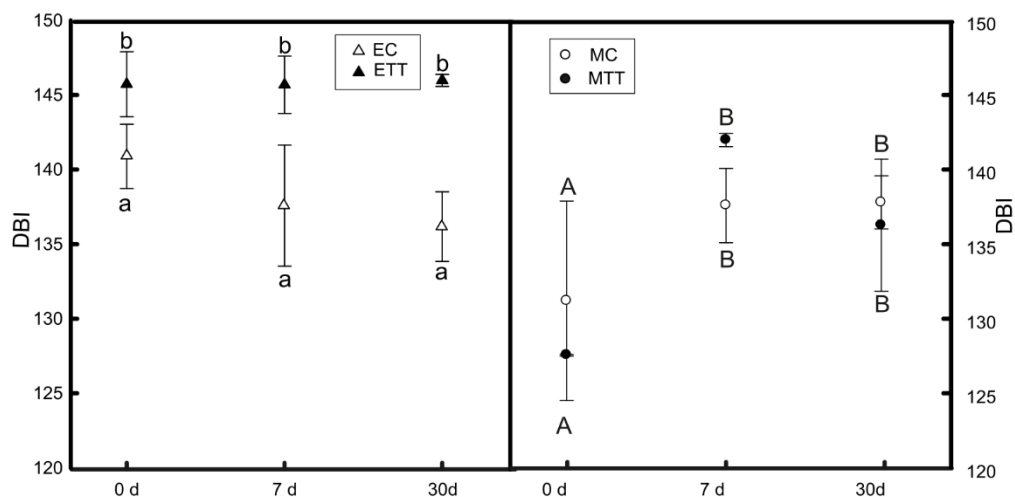


Figura 3. 23. Variación del Índice de doble enlace (DBI) en epicarpio de Ellendale y Murcott
 Determinación del DBI en epicarpio de mandarinas Ellendale y Murcott expuestos a tratamiento térmico y almacenamiento a 5°C durante 30 días. Las diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Según se desprende de la figura 3.23, el análisis del DBI mostró que las variedades estudiadas presentaron una respuesta diferencial frente a los dos factores en estudio. En Ellendale, el tratamiento térmico incrementó el DBI en todos los puntos de almacenamiento evaluados. Por otro lado, en Murcott el DBI aumentó a los 7 días de almacenamiento, permaneciendo estable a los 30 días. Estos resultados refuerzan los obtenidos en el ACP, donde se observó que el tratamiento térmico en Ellendale tiene un efecto más fuerte que el tiempo de almacenamiento mientras que en Murcott fue este último factor el que tuvo mayor preponderancia. Estos hallazgos se contraponen con los descritos por Schirra y Cohen (1999), donde se reportó que el calentamiento intermitente afectaba el grado de insaturación de los lípidos de membrana en naranjas durante el almacenamiento poscosecha. Por otro lado, en mandarinas Fortuna se observó que el almacenamiento a 2,5°C aumentaba el DBI durante los primeros 20 días, volviendo a valores basales a los 40 días (Mulas y col., 1995). Estos autores también señalaron que el almacenamiento en frío afectaba el DBI, en particular el de AG grasos polares, de tal manera que prevenía cambios relacionados con la senescencia de los frutos. En el año 2017, Lafuente y col. informaron que la expresión de genes que codificaban para dos desaturasas de AG ($\omega 6$ y acil desaturasa) y una fosfolipasa D disminuía durante el almacenamiento en frío en frutos que previamente habían sido expuestos a tratamiento térmico por 3 días a

37°C. Sin embargo, también reportaron que el incremento en la expresión de genes que codificaban para una $\omega 3$ ácido graso desaturasa y una esfingolípido desaturasa, podría estar relacionado con un incremento en el contenido de AG triénicos en respuesta al curado. Es importante tener en cuenta que los resultados obtenidos en este trabajo representan el pool completo AG esterificados presentes en las muestras por lo tanto el efecto del tratamiento térmico en las distintas membranas celulares no puede ser descrito.

La figura 3.20 muestra que los metabolitos que más contribuyeron a la CP2, en epicarpio de Murcott control y curado a 0 días de almacenamiento y en epicarpio curado de Ellendale a 0, 7 y 30 días de almacenamiento, fueron la maltosa, la glucosa, la sacarosa y el ácido cítrico. El contenido de los tres azúcares permaneció relativamente constante durante el período de almacenamiento en Ellendale, mientras que en Murcott cayó (Figura 3.22). Como se describió en la sección 3.2.2.2.1, tanto el nivel de azúcares como el de ácido cítrico no sólo influyen en la calidad de la fruta sino que también forman parte de la respuesta de las plantas frente a distintos tipos de estrés (Li y col., 2016).

3.2.2.6. ESTUDIO DEL PROTEMOMA DE EPICAPIO DE FRUTOS EXPUESTOS A TRATAMIENTO TÉRMICO DURANTE EL ALMACENAMIENTO EN FRÍO

3.2.2.6.1. ANÁLISIS PRELIMINAR DEL PROTEOMA DIFERENCIAL

En el siguiente apartado, se discutirán los resultados obtenidos a partir del estudio de proteómica realizado en muestras de epicarpios heridos controles y curados, de mandarinas Ellendale y Murcott, almacenados a 0 y 7 días. La elección de los períodos se hizo en base a los resultados de metabolómica, dado que, como se observó en el análisis de componentes principales (Figura 3.20), los cambios más interesantes para analizar ocurrieron entre los 0 y 7 días de almacenamiento. En estos puntos, las variedades presentaron una respuesta metabólica diferente frente al tratamiento térmico, la cual se mantuvo a los 30 días.

Los resultados obtenidos con el software Proteome Discoverer revelaron que, para el total de las muestras analizadas, se pudieron detectar 1847 proteínas diferentes. Estos datos fueron procesados con el software Perseus y la tabla 3.3 muestra el número promedio total de proteínas que han sido identificadas para cada una de las muestras analizadas y la cantidad de proteínas que aumentaron o

disminuyeron de manera significativa dos o más veces su expresión en respuesta a al tratamiento térmico.

MUESTRAS	NÚMERO PROMEDIO DEL TOTAL DE PROTEÍNAS IDENTIFICADAS	NÚMERO PROTEÍNAS QUE INCREMENTARON DOS O MÁS VECES SU EXPRESIÓN (P<0.05)	NÚMERO PROTEÍNAS QUE DISMINUYERON DOS O MÁS VECES SU EXPRESIÓN (P<0.05)
ETT-EC	1423	172	115
ETT- EC 7d	1392	119	128
MTT-MC	1341	40	55
MTT-MC 7d	1383	52	35

Tabla 3. 3. Proteínas identificadas a partir de los programas Proteome Discoverer y Perseus

EC: epicarpio control de Ellendale a 0 días de almacenamiento; ETT: epicarpio curado de Ellendale a 0 días de almacenamiento; EC + 7d: epicarpio control de Ellendale a 7 días de almacenamiento; ETT + 7d: epicarpio curado de Ellendale a 7 días de almacenamiento; MC: epicarpio control de Murcott a 0 días de almacenamiento; MTT: epicarpio curado de Murcott a 0 días de almacenamiento; MC + 7d: epicarpio control de Murcott a 7 días de almacenamiento; MTT + 7d: epicarpio curado de Murcott a 7 días de almacenamiento.

Como muestra la tabla 3.3, el número de proteínas que incrementaron o decrecieron su cantidad en respuesta al tratamiento térmico en flavedo de Ellendale fue mayor que el detectado en Murcott. Con el objetivo de identificar las proteínas involucradas en la respuesta al curado, en las variedades estudiadas, a cada una de ellas se le asignó su gen ortólogo en *Arabidopsis thaliana* como se describe a continuación.

Como el genoma de *Citrus reticulata* no se encuentra secuenciado, para poder conocer la identidad de las proteínas detectadas, se utilizó el genoma de *Citrus sinensis* (Csi) de la base de datos Uniprot (<http://www.uniprot.org/>) debido a que presentan una alta homología. Posteriormente, para cada gen de *Citrus Sinensis* se buscó su ortólogo en *A. thaliana* utilizando la base de datos de Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>). Con el fin de hacer un análisis preliminar de las proteínas que incrementaron y disminuyeron en respuesta al tratamiento térmico en Ellendale y Murcott, se realizaron los siguientes diagramas de Venn para cada período de almacenamiento (Figura 3.24 y 3.25).

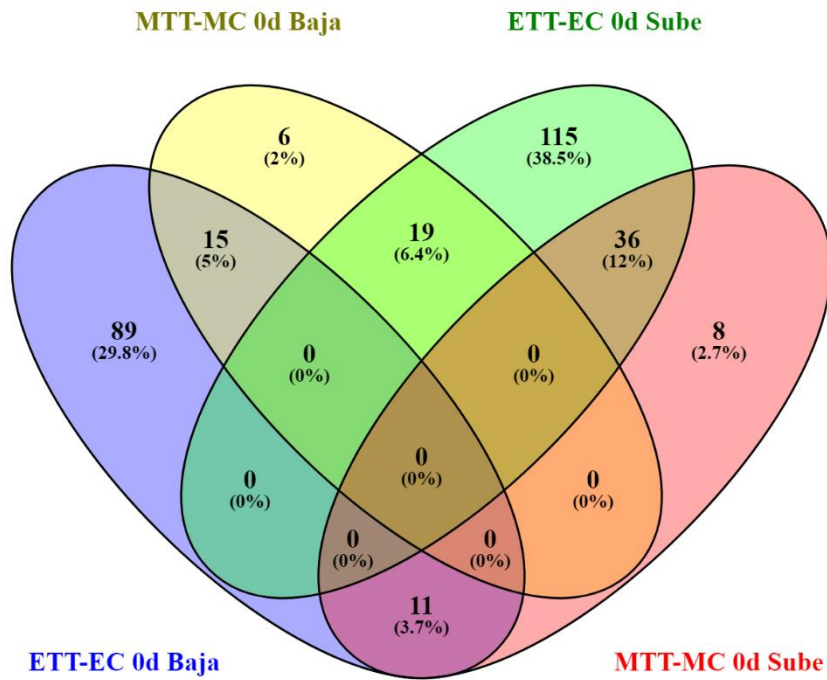


Figura 3. 24. Diagrama de Venn para las proteínas que incrementaron y disminuyeron de manera significativa en epicarpios heridos de mandarinas Ellendale y Murcott, expuestos a tratamiento térmico y 0 días de almacenamiento

ETT-EC 0d Baja: disminuyeron por curado en epicarpio de Ellendale a 0 días de almacenamiento; ETT-EC 0d Sube: aumentaron por curado en epicarpio de Ellendale a 0 días de almacenamiento; MTT-MC 0d Baja: disminuyeron por curado en epicarpio de Murcott a 0 días de almacenamiento; MTT-MC 0d Sube: aumentaron por curado en epicarpio de Murcott a 0 días de almacenamiento.

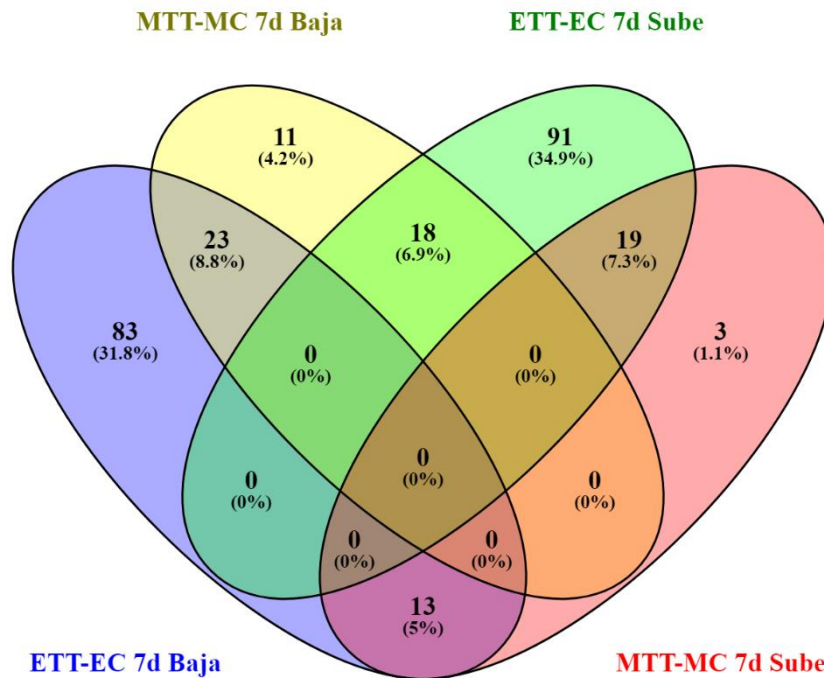


Figura 3. 25. Diagrama de Venn para las proteínas que incrementaron y disminuyeron de manera significativa en epicarpios heridos expuestos de mandarinas Ellendale y Murcott, a tratamiento térmico y 7 días de almacenamiento

ETT-EC 7d Baja: disminuyeron por curado en epicarpio de Ellendale a 7 días de almacenamiento; ETT-EC 7d Sube: aumentaron por curado en epicarpio de Ellendale a 7 días de almacenamiento; MTT-MC 7d Baja: disminuyeron por curado en epicarpio de Murcott a 7 días de almacenamiento; MTT-MC 7d Sube: aumentaron por curado en epicarpio de Murcott a 7 días de almacenamiento.

Como se puede observar en la figura 3.24, de las 172 proteínas que aumentaron su cantidad en epicarpio de Ellendale, en respuesta al tratamiento térmico a los 0 días de almacenamiento (Tabla 3.3), 115 sólo lo hicieron en esta variedad; mientras que 36 también registraron un incremento en flavedo de Murcott. Por otro lado, 19 de las proteínas que aumentaron en Ellendale decrecieron su nivel en epicarpio de Murcott. Finalmente, de las 115 proteínas que disminuyeron su cantidad en respuesta al curado en flavedo de Ellendale (Tabla 3.3), 89 lo hicieron sólo en esta variedad mientras que 15 también decrecieron en epicarpio de Murcott (Figura 3.24).

La figura 3.25 muestra el diagrama de Venn obtenido para proteínas cuyo nivel aumentó y disminuyó en flavedo de Ellendale y Murcott, en respuesta al tratamiento térmico a los 7 días de almacenamiento poscosecha a 5°C. De las 119 proteínas que incrementaron en Ellendale y de las 52 que lo hicieron en Murcott (Tabla 3.3),

19 aumentaron en ambas variedades. Por otro lado, de las 128 y 35 proteínas que disminuyeron su contenido en Ellendale y Murcott, respectivamente (Tabla 3.3), 23 decrecieron en ambas variedades (Figura 3.25).

3.2.2.6.2. ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO DE PROTEÍNAS Y EVALUACIÓN DE LOS METABOLISMOS AFECTADOS POR EL TRATAMIENTO TÉRMICO A 0 DÍAS DE ALMACENAMIENTO

El análisis de enriquecimiento génico es un método que permite calcular la superposición de un conjunto de genes con grupos de genes previamente definidos por el sistema de Ontología génica (GO de las siglas en inglés Gen Ontology) (Yi y col., 2013). Este análisis es un método eficiente y rápido para determinar las funciones asociadas a grandes listas de genes, aumentando de esta manera la probabilidad de interpretar el significado biológico de las mismas. Dentro del sistema GO existen distintas categorías que describen un mismo gen; las más importantes son BP (de las siglas en inglés Biological Process), la cual da información sobre procesos biológicos; MF (de las siglas en inglés Molecular Functions), la cual describe la función biológica; y la CC (de las siglas en inglés Cell Components), que detalla la localización dentro de la célula (Tian y col., 2017).

En este trabajo se utilizó el kit de herramientas bioinformáticas provistas por el servidor PlanGSEA (<http://systemsbiology.cau.edu.cn/PlantGSEA/>) y la plataforma agriGO(http://systemsbiology.cau.edu.cn/agriGOv2/specises_analysis.php?SpeciseID=1&latin=Arabidopsis_thaliana), la cual se enfoca en el análisis de enriquecimiento génico por ontología génica en plantas y especies agrícolas (Tian y col., 2017).

En una primera instancia, utilizando las herramientas de agriGO, se realizó un enriquecimiento génico con la meta de obtener un panorama global de los procesos biológicos que se encontraban involucrados en cada uno de los grupos experimentales estudiados. Posteriormente, se usó la base de datos curada de KEGG y PlantCyc, del servidor PlantGsea, para conocer los metabolismos en los que estaban involucrados. Finalmente, para cada uno de los genes de interés se determinó la proteína que codificaban utilizando la base de datos Phytozome. Es importante resaltar que, si bien todos los análisis fueron realizados utilizando los ortólogos en *Arabidopsis thaliana* y las funciones de las proteínas pueden ser diferentes en flavedo de mandarinas, los mismos fueron muy valiosos para el

estudio exploratorio preliminar de la respuesta de este tejido frente al tratamiento térmico y almacenamiento en frío.

3.2.2.6.2.1. RESPUESTA DIFERENCIAL INMEDIATA DE ELLENDALE Y MURCOTT

Mediante el uso de plataforma agriGO se realizó un estudio de las proteínas diferencialmente enriquecidas en ambas variedades. Cabe mencionar que, en el caso de Murcott, la escasa cantidad de proteínas que modificaron su contenido no permitió realizar el análisis ya que la plataforma utilizada requiere un mínimo de 10 proteínas para realizar el agrupamiento con una estadística confiable. Sin embargo, cabe destacar que estos grupos de proteínas sí pudieron ser analizados mediante la plataforma PlantGsea como se describirá en la sección 3.2.2.6.2.3. Los resultados más interesantes se obtuvieron con el grupo de proteínas que incrementaron su nivel en Ellendale; debido a que algunas de ellas entraron en la categoría de Respuesta a estímulo. Los mismos se discuten en profundidad a continuación.

La figura 3.26 muestra los resultados obtenidos para este grupo experimental. Las principales categorías que se enriquecieron, dentro de la de Procesos biológicos, fueron Respuesta a estímulo con 52 proteínas de las 115 analizadas; Procesos celulares con 77 y Procesos Metabólicos con 73 (Figura 3.26). De estas tres categorías, la que presentó mayor significancia estadística fue la de Respuesta a estímulo con un $p = 2.16e^{-06}$.

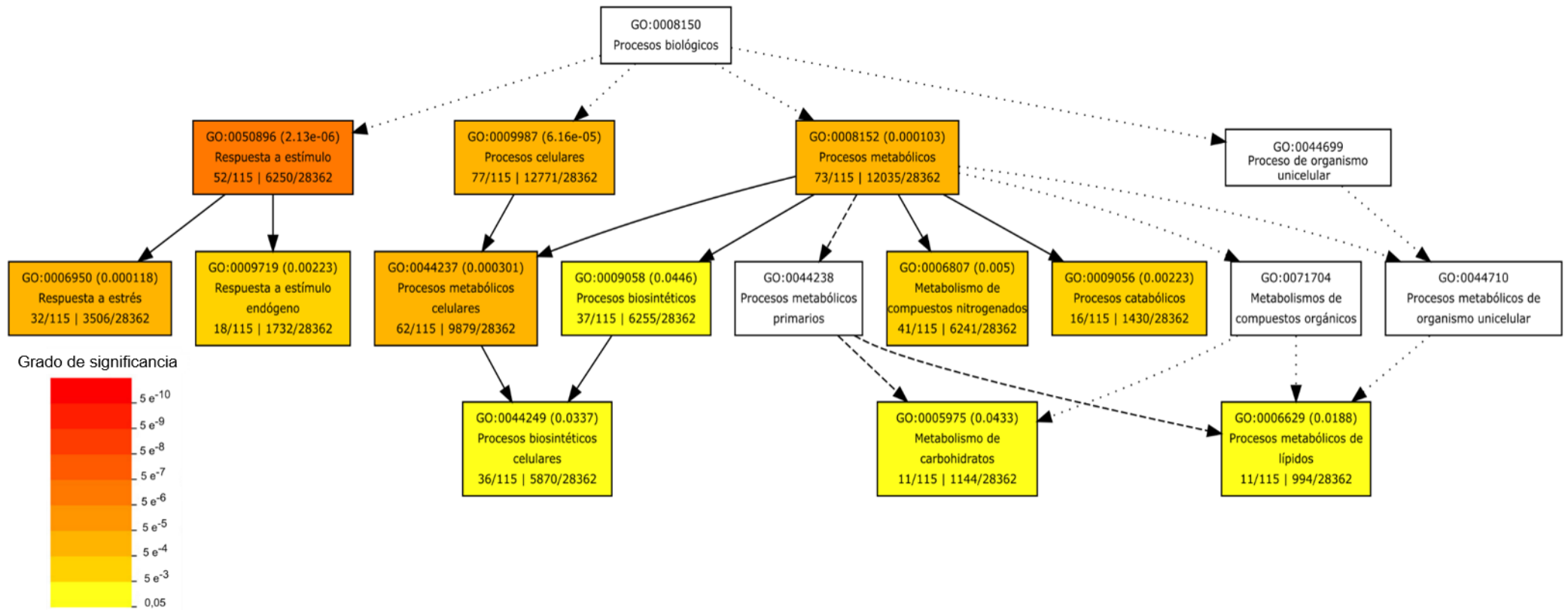


Figura 3. 26. Enriquecimiento de las 115 proteínas que incrementaron en respuesta a tratamiento térmico a 0 días almacenamiento en flavedo de mandarinas Ellendale

Con el objetivo de investigar los tipos de respuestas a estímulo que indujo el tratamiento térmico en epicarpio de Ellendale, se analizaron cada una de las 52 proteínas que estaban en esta categoría. La tabla 3.4 detalla las más relevantes, junto a su descripción, y el tipo de respuesta en el que se encuentran involucradas.

La superfamilia de HSP está conformada por una amplia gama de proteínas que poseen pesos moleculares que varían entre 15 y 115 KDa. Dentro de la misma se han identificado cinco familias: HSP 70, chaperoninas (HSP 60), HSP 90, HSP 100 y HSP de bajo peso molecular llamadas sHSP (de las siglas en inglés Small Heat Shock Proteins). Las sHSP se encuentran principalmente en el citoplasma y en el núcleo de las células pero también en distintos compartimentos celulares como cloroplastos, retículo endoplasmático y mitocondrias (Timperio y col., 2008; Wang, 2004). En general, las HSP poseen un rol crucial en la protección de las plantas frente a estrés, principalmente debido a su actividad chaperona, la cual consiste en reconocer y unirse a proteínas que han perdido su conformación nativa permitiéndoles plegarse de manera correcta evitando su agregación. Las small HSP, a diferencia de las de alto peso molecular, poseen actividad chaperona independiente de ATP (Gusev y col., 2002). Estas chaperonas también se encuentran involucradas en la estabilidad de las membranas. Horváth y col. (2008) observaron que las sHSP contribuían, parcialmente, a la permeabilidad y fluidez de la membrana de frutos y vegetales sometidos a estrés por frío durante el almacenamiento poscosecha. En este trabajo se observó que el tratamiento térmico indujo la expresión de las HSP de bajo peso molecular mitocondrial HSP 23.6 y una perteneciente a la superfamilia de la HSP 20. Este escenario podría estar relacionado con un incremento en la tolerancia al daño por frío en Ellendale durante el almacenamiento poscosecha a 5°C. Cabe recordar en este punto que el incremento a la tolerancia al frío es una de las respuestas inducidas por los tratamientos térmicos (Lurie y Pedreschi, 2014; Morteza y Samad, 2014). En apoyo a esta hipótesis, He y col. (2012) observaron que la exposición a aire caliente (38°C) por tres días en bananas, incrementaba la expresión de sHSP disminuyendo el daño por frío en estos frutos durante el almacenamiento poscosecha. Por otro lado, la acumulación de HSP frente a la exposición de tratamientos térmicos con distinta intensidad (24 y 48 hr) en tomates y pomelos constituyó una herramienta importante

Descripción	Nombre del gen	Respuesta a estímulo					
		Hongo	Ácido jasmónico	Herida	Calor	Estrés oxidativo	Defensa
HSP 23.6 mitocondrial	AT4G25200						
Proteína de la superfamilia de chaperonas HSP20	AT5G51440						
Proteína de la familia de glicoproteínas ricas en hidroxiprolina	AT4G26750						
Metacaspasa tipo 1	AT1G02170						
Proteína de la familia de desaturasas esteroil-acil transferasas	AT2G43710						
Ceramidasa neutra/alcalina no lisosomal	AT1G07380						
Glutación peroxidasa 2	AT2G31570						
OPC-8:0 CoA ligasa1	AT1G20510						
12-Oxofitodienoato reductasa 2	AT1G76690						
Estrictosidina sintasa tipo 4	AT3G51420						
Proteínas de la superfamilia de las fosfotrasferasas dependiente del calcio	AT3G51430						
	AT3G51440						
	AT3G51450						
Mio-inositol-1-fosfato sintasa 2	AT2G22240						
Proteínas de la superfamilia de aminohidrolasas N-terminal	AT3G60820						
Tocoferol ciclasa	AT4G32770						

Tabla 3. 4. Descripción de los principales proteínas involucradas en la categoría de ontología génica: Respuesta estímulo, que incrementaron en epicarpio de Ellendale en respuesta al tratamiento térmico a los 0 días de almacenamiento

a la hora de evaluar la intensidad y eficacia del tratamiento y poder predecir la tolerancia inducida al daño por frío (Polenta y col., 2007).

3.2.2.6.2.2. RESPUESTA INMEDIATA COMÚN A AMBAS VARIETADES

Finalmente se analizaron las 15 proteínas que disminuyeron y las 36 que incrementaron en respuesta al tratamiento térmico, en ambas variedades. El primer grupo no arrojó resultados dentro de la categoría Procesos biológicos. Por otro lado, como se puede observar en la figura 3.27, 19 de las 36 proteínas que incrementaron en respuesta al curado, se agruparon en la categoría de Procesos metabólicos. A su vez, 5 de las 36 lo hicieron en Procesos metabólicos secundarios. Cuando se evaluaron las 36 proteínas utilizando la plataforma PlantGsea, utilizando como base de datos KEGG y PlantCyc para ver los metabolismos que se veían alterados, se encontró que las proteínas de la categoría Procesos metabólicos secundarios pertenecían a la superfamilia de las enzimas 2 oxoglutarato dioxigenasa dependientes de Fe (II), ODD (de las siglas en inglés 2-oxoglutarate/Fe(II)-dependent dioxigenase).

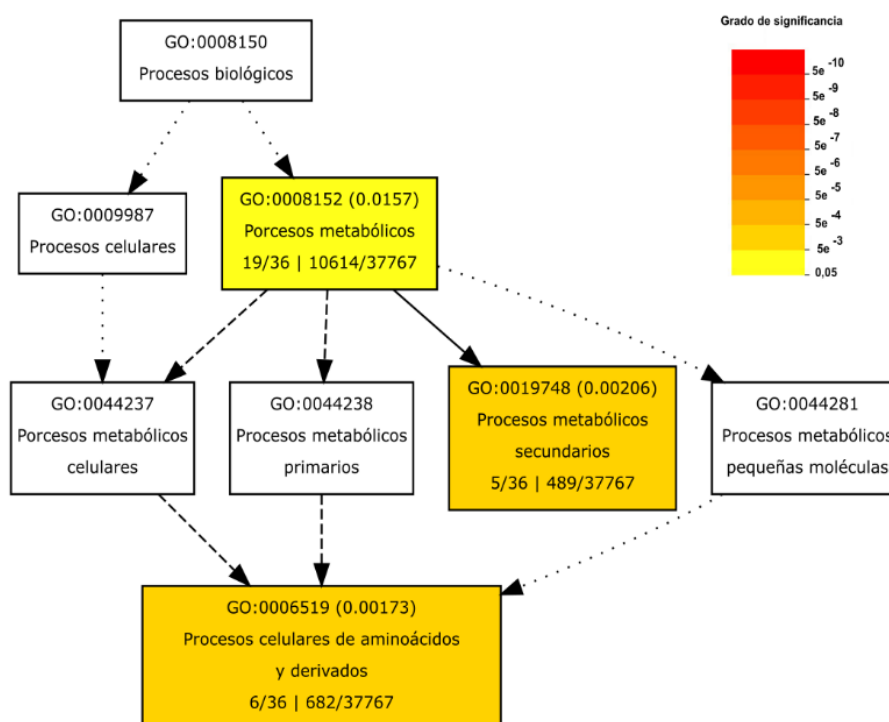


Figura 3. 27. Enriquecimiento de las 19 proteínas que incrementaron en respuesta a tratamiento térmico a 0 días almacenamiento en flavedo de mandarinas Ellendale y Murcott

La superfamilia de las ODD se encuentra constituida por una amplia gama de enzimas que catalizan diversas reacciones como hidroxilaciones, desmetilaciones, desaturaciones, epimerizaciones, halogenaciones, entre otras (Clifton y col., 2006; Flashman y Schofield, 2007; Loenarz y Schofield, 2008; Tarhonskaya y col., 2014). Las ODD se encuentran involucradas tanto en el metabolismo primario como el secundario. Dentro de este último, las ODD catalizan reacciones en la biosíntesis y metabolismo de flavonoides, biosíntesis de alcaloides como la bencilisoquinolina y tropano, biosíntesis de glucosinolato y de fitoalexinas como DIMBOA (2,4-dihidroxi-7-metoxi-1,4-benzoxazin-3-ona) y biosíntesis de coumarinas, entre otras (Farrow y Facchini, 2014). En este trabajo se observó que, tanto en Ellendale como en Murcott, el tratamiento térmico incrementó el nivel de cinco 2 oxoglutarato dioxigenasa dependientes de Fe (II) cuya actividad se encontraba relacionada con la biosíntesis de flavonoides (Figura 3.27). Estos resultados, junto a los descritos previamente en esta sección, indicarían que si bien el curado induce una respuesta de defensa en ambas variedades, la respuesta de Ellendale sería más pronunciada que la detectada en Murcott. El mismo patrón se observó cuando se analizó el metaboloma (Figura 3.20).

3.2.2.6.2.3. METABOLISMOS AFECTADOS POR EL TRATAMIENTO TÉRMICO EN ELLENDALE Y MURCOTT EN LA RESPUESTA INMEDIATA

Con la meta de realizar un estudio más detallado de los metabolismos que fueron alterados por el tratamiento térmico, en cada uno de los grupos experimentales, se efectuó un enriquecimiento en PlantGsea utilizando las bases de datos KEGG y PlantCyc. En la tabla 3.5 se detallan los resultados obtenidos. De manera preliminar los resultados refuerzan las observaciones realizadas previamente en este trabajo; los principales cambios que indujo el curado se observaron en epicarpio de Ellendale. En Murcott, el tratamiento térmico incrementó los niveles de 8 proteínas (figura 3.24) que se encontraban relacionadas con el metabolismo del espliceosoma y del ribosoma (Tabla 3.5); mientras que las 6 que disminuyeron (Figura 3.24) pertenecían al metabolismo de biosíntesis de fenilpropanoides (Tabla 3.5). En conjunto, los resultados indicarían que el curado afecta el metabolismo de epicarpio de Ellendale de manera más notoria que en Murcott.

En Ellendale, el análisis de las 115 proteínas que incrementaron en respuesta al tratamiento térmico reveló que se enriquecieron los siguientes metabolismos:

glucólisis IV (citosólica), glucólisis/gluconeogénesis, ciclo de los ácidos tricarboxílicos, fermentación de piruvato, β -oxidación de ácidos grasos III (AG insaturados de cadena impar) y IV (AG insaturados de cadena par), metabolismo de ácido alfa linoleico, biosíntesis de fenilpropanoides y de fenilpropanoides libres, biosíntesis de alcaloides a través de la ruta del ácido shikímico y biosíntesis de terpenoides y esteroides. En cuanto a las 89 proteínas que disminuyeron en respuesta al curado, los metabolismos afectados fueron los de ribosoma y de carga de tRNA (Tabla 3.5).

El ácido jasmónico (AJ) y sus precursores cíclicos, conocidos como jasmonatos, constituyen una familia de compuestos bioactivos que poseen múltiples funciones en las plantas. En un principio se los describió como reguladores de crecimiento involucrados en procesos de desarrollo. Sin embargo, posteriormente, el ácido jasmónico fue reconocido como una molécula señal inducida por diferentes tipos de estrés. Diversos autores han descrito el rol del AJ en respuestas de defensa contra herbívoros y patógenos (Schilmiller y Howe, 2005; Turner y col., 2002). Este metabolito y su precursor biosintético, el ácido 12-oxofitodienoico (OPDA de las siglas en inglés 12-Oxophytodienoic acid), inducen un número de genes que codifican proteínas involucradas en la respuesta de defensa en plantas como por ejemplo inhibidores de proteasas, enzimas involucradas en la biosíntesis de flavonoides, osmotinas y lipoxigenasas, y diferentes proteínas relacionadas con la patogénesis (Farmer y col., 2003; Sasaki-Sekimoto y col., 2005; Taki y col., 2005).

Por otro lado, un estudio realizado por Kienow y col. (2008), en *Arabidopsis thaliana* reveló que la expresión del transcripto *At1g20510*, el cual codifica para la enzima OPC-8: CoA ligasa, incrementó frente a herida o infección. Además, se observó que esta enzima se encontraba involucrada en un paso esencial de la biosíntesis de ácido jasmónico ya que cataliza la formación de 3-oxo-2-(2'-[Z]-pentenil) ciclopentano-1-octanoil-CoA, que posteriormente es convertido en ácido jasmónico mediante β -oxidación. En el año 2008 Kienow y col. detectaron un incremento en la expresión de la enzima 12-oxofitodienoato reductasa 2, la cual también se encuentra vinculada a la síntesis de ácido jasmónico. Esta enzima cataliza la reducción del ácido 12-oxofitodienoico para producir el ácido oxo-2-(2'-pentenil) -ciclopentano-1-octanoico (OPC-8: 0). En el año 2008, Tomoyuki y col. (año) observaron, en arroz, que la expresión del transcripto que codifica para la

INCREMENTA EN ELLENDALE POR TRATAMIENTO TÉRMICO A 0 DÍAS DE ALMACENAMIENTO						
Nombre del grupo de genes	Descripción	Categoría	p value	FDR	Gen	Nombre de la proteína
GLUCÓLISIS IV (54)	Glicólisis IV (citosólica)	PlantCyc	0.021	0.0442	AT2G22480	Fosfofructoquinasa 5
					AT2G24270	Aldehído deshidrogenasa 11A3
KEGG GUICÓLISIS/GLUCONEOGÉNESIS(87)	Glicólisis/Gluconeogénesis	KEGG	5.61e-3	0.0183	AT1G01090	Piruvato deshidrogenasa E1 alfa
					AT2G22480	Fosfofructoquinasa 5
					AT4G17260	Proteína de la familia lactato/malato deshidrogenasa
KEGG_CICLO DE ÁCIDOS TRICARBOXÍLICOS (61)	Ciclo de ácido tricarboxílicos	KEGG	2.15e-3	0.0113	AT1G01090	Piruvato deshidrogenasa E1 alfa
					AT3G06650	ATP-citrato liasa B-1
					AT5G49460	ATP citrato liasa subunidad B 2
FERMENTACION DE PIRUVATO A LACTATO (1)	Fermentación de piruvato a lactato	PlantCyc	7.95e-3	0.0278	AT4G17260	Proteína de la familia lactato/malato deshidrogenasa
BETA OXIDACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS III (3) Y IV (9)	Beta oxidación de ácidos grasos III (insaturados de cadena impar) y IV (insaturados de cadena par)	PlantCyc	1.56e-4	2.28e-3	AT4G14430	Proteína de respuesta al ácido indol-3-butírico 10
					AT4G14440	3-hidroxiacil-CoA deshidratasa 1
KEGG METABOLISMO DEL ÁCIDO ALFA LINOLEICO(28)	Metabolismo de ácido alfa linoleico	KEGG	6.35e-3	0.0191	AT1G20510	OPC-8:0 CoA ligasa1
					AT1G76690	12-oxofitodienoato reductasa 2
BOSÍNTESIS DE FENILPROPANOIDES LIBRES(4)	Biosíntesis de fenilpropanoides libres	PlantCyc	0.0197	0.0437	AT5G54160	O-metiltransferasa 1
KEGG BIOSÍTESIS DE FENILPROPANOIDES(247)	Biosíntesis de fenilpropanoides	KEGG	0.0182	0.0449	AT1G01090	Piruvato deshidrogenasa E1 alfa
					AT2G22480	Fosfofructoquinasa 5
					AT3G06650	ATP-citrato liasa B-1
					AT5G49460	ATP citrato liasa subunidad B 2
KEGG BIOSÍNTESIS DE ALCALOIDES RUTA DEL ÁCIDO SHIKÍMICO (164)	Biosíntesis de alcaloides ruta del ácido shikímico	KEGG	5.66e-3	0.0183	AT1G01090	Piruvato deshidrogenasa E1 alfa
					AT2G22480	Fosfofructoquinasa 5
					AT3G06650	ATP-citrato liasa B-1
					AT5G49460	ATP citrato liasa subunidad B 2
KEGG BIOSÍNTESIS DE TERPENOIDES Y ESTEROIDES (194)	Biosíntesis de terpenoides y esteroides	KEGG	8.19e-3	0.0229	AT1G01090	Piruvato deshidrogenasa E1 alfa
					AT2G22480	Fosfofructoquinasa 5
					AT3G06650	ATP-citrato liasa B-1
					AT5G49460	ATP citrato liasa subunidad B 2

INCREMENTA EN MURCOTT POR TRATAMIENTO TÉRMICO A 0 DÍAS DE ALMACENAMIENTO						
KEGG ESPLICEOSOMA (107)	Espliceosoma	KEGG	3.92e-4	7.84e-4	AT2G36130	Proteína de la familia peptidil-prolil cis-trans isomerasa tipo ciclofilina
					AT5G37720	ALWAYS EARLY 4
KEGG RIBOSOMA(233)	Ribosoma	KEGG	1.8e-3	1.8e-3	AT1G23290	Proteína de la superfamilia de proteínas ribosómica L18e / L15
					AT1G70600	Proteína de la superfamilia de proteínas ribosómica L18e / L16
DISMINUYE EN ELLENDALE POR TRATAMIENTO TÉRMICO A 0 DÍAS DE ALMACENAMIENTO						
KEGG RIBOSOMA(233)	Ribosome	KEGG	6.26e-08	1.25e-06	AT1G22780	Proteína de la familia de proteínas ribosómicas S13 / S18
					AT2G01250	Proteína de la familia de proteínas ribosómicas L30 / L7
					AT2G39460	Proteína ribosomal L23AA
					AT3G13580	Proteína de la familia de proteínas ribosómicas L30 / L7
					AT3G55280	Proteína ribosomal L23AB
					AT4G31700	Proteína ribosomal S6
					AT5G09510	Proteína de la familia de proteínas ribosómicas S19
					AT5G10360	Proteína ribosomal S6e
RUTA DE CARGA DE TRNA (45)	Ruta de carga de tRNA	PlantCyc	9.29e-3	0.031	AT5G23900	Proteína de la familia de proteínas ribosómicas L13e
					AT4G26870	Proteína de la superfamilia de aminoacil-tRNA y biotina sintetetasas de clase II
DISMINUYE EN MURCOTT POR TRATAMIENTO TÉRMICO A 0 DÍAS DE ALMACENAMIENTO						
KEGG BIOSÍNTESIS DE FENILPROPANOIDES (104)	Biosíntesis de fenilpropanoides	KEGG	0.0217	0.0217	AT5G09640	Serin-carboxipeptidasa del tipo 19

Tabla 3. 5. Descripción de los principales metabolismos afectados por tratamiento térmico en flavedo mandarinas Ellendale y Murcott almacenadas a 0 días

enzima 12-oxofitodienoato reductasa se incrementaba frente a la exposición de una herida mecánica.

En resumen, en este trabajo se observó que el tratamiento térmico produjo un incremento en el nivel de las enzimas OPC-8:0 CoA ligasa1 y 12-oxofitodienoato reductasa 2 (Tabla 3.5), en flavedo de Ellendale. Este escenario indicaría que el curado estaría induciendo una respuesta de defensa en flavedo de mandarinas Ellendale.

Las proteínas fosfofructoquinasa 5, subunidad E1 alfa del complejo piruvato deshidrogenasa, ATP- citrato liasa B-1 y la subunidad B2 de la ATP-citrato liasa incrementaron en respuesta al tratamiento térmico y estuvieron involucradas en el metabolismo de glucólisis, ciclo de ácido tricarboxílico y biosíntesis de fenilpropanoides. En conjunto se puede hipotetizar que el curado estaría aumentando las vías catalíticas probablemente para generar energía y precursores para la síntesis de fenilpropanoides induciendo de esta manera la respuesta para poder sobreponerse al estrés abiótico. Diversas investigaciones han revelado que el tratamiento térmico induce el metabolismo de azúcares y de los ácidos tricarboxílicos. Yun y col. (2013) observaron que en pericarpio de mandarinas Satsuma expuestas a tratamiento hay un incremento en la expresión de la piruvato deshidrogenasa E1 beta.

Finalmente, el tratamiento térmico no indujo cambios relevantes en el proteoma de flavedo de mandarinas Murcott (Figura 3.24, Tabla 3.5). Es importante resaltar que, a diferencia de lo observado en Ellendale (Tabla 3.4), el tratamiento térmico en esta variedad no produjo un incremento de la expresión de proteínas involucradas en respuestas de defensa. En síntesis, podría ocurrir que las condiciones del tratamiento térmico utilizado no hayan sido las adecuadas para inducir una respuesta de defensa lo suficientemente fuerte como para ser detectada por las técnicas utilizadas y/o que Murcott posea una respuesta diferencial de menor intensidad respecto a la respuesta de Ellendale.

3.2.2.6.3. ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO DE PROTEÍNAS Y EVALUACIÓN DE METABOLISMOS AFECTADOS POR EL TRATAMIENTO TÉRMICO A 7 DÍAS DE ALMACENAMIENTO

3.2.2.6.3.1. RESPUESTA DIFERENCIAL TARDÍA DE ELLENDALE Y MURCOTT

Los estudios de enriquecimiento realizados con las 91 proteínas cuyo nivel incrementó por tratamiento térmico en epicarpio de Ellendale a 7 días de

almacenamiento (figura 3.28), mostraron que la categoría más enriquecida dentro de Procesos biológicos fue la de Respuesta a estímulo abiótico, la cual contuvo 25 proteínas de las 91 analizadas. La tabla 3.6 muestra la descripción de las principales proteínas analizadas dentro de esta categoría. Por otro lado, el análisis realizado con las 3 proteínas que incrementaron en flavado en Murcott, no arrojó ningún resultado debido a que la plataforma utilizada requiere un mínimo de 10 proteínas para poder realizar un enriquecimiento con una estadística confiable.

En la sección 3.2.2.6.2.3 se postuló que el tratamiento térmico estaría siendo induciendo una respuesta de defensa ya que se registró un incremento en enzimas que se encontraban involucradas en la síntesis de la molécula señal ácido 12-oxofitodienoico. En este contexto, se podría hipotetizar que el incremento en el contenido de HSP y GST observado en flavado curado de mandarinas Ellendale almacenado durante 7 días (tabla 3.6), podría estar relacionado con una respuesta de defensa tardía inducida por el OPDA.

Por otro lado, en cítricos Lafuente y col. (2017) observaron que el tratamiento térmico, aplicado a mandarinas Fortuna, aumentaría la tolerancia a las bajas temperaturas ya que indujo la expresión de diferentes genes entre ellos el de la GST. De esta manera, teniendo en cuenta que HSP 20 y GST se encuentran relacionadas con la tolerancia a frío, el tratamiento térmico estaría protegiendo a los frutos frente al daño por frío durante el almacenamiento.

La tabla 3.6 muestra que el contenido del proteosoma 26S y de su subunidad β C1 incrementó en respuesta al tratamiento térmico. El proteosoma es un complejo proteolítico, ubiquitina dependiente, que se encuentra conformado por distintas subunidades con distintas funciones catalíticas. Su núcleo 20S se encuentra conformado por 4 anillos heptagonales apilados, compuestos por dos tipos distintos de subunidades; subunidades α , de naturaleza estructural y subunidades β , generalmente de naturaleza catalítica (Kurepa y Smalle, 2008a). Los dos anillos exteriores están compuestos de subunidades α , que sirven de anclaje a las partículas reguladoras y sirven de puerta evitando la entrada arbitraria de proteínas a la cavidad interior. Los dos anillos internos, compuestos de subunidades β tienen distintas subunidades con actividades catalíticas diferentes: β_1 con actividad tipo caspasa; β_2 con actividad tipo tripsina y β_5 con actividad tipo quimiotripsina (Dick y

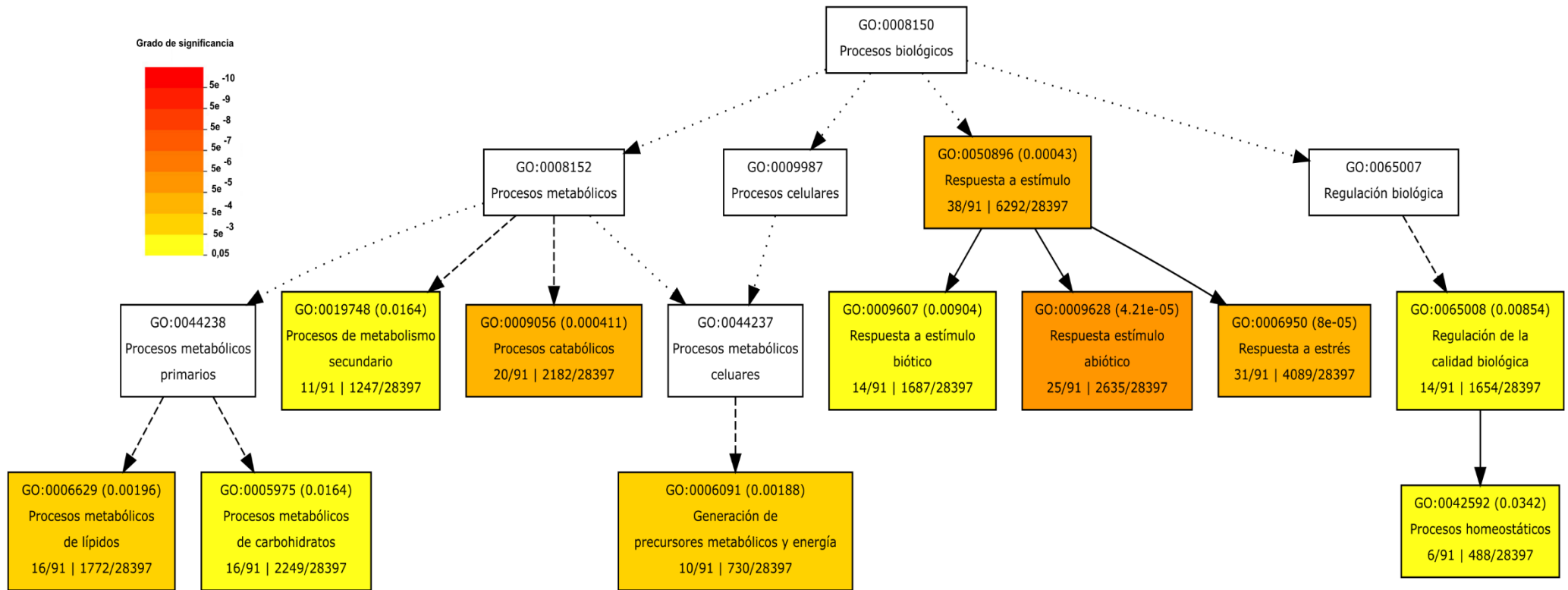


Figura 3. 28. Enriquecimiento de las 91 proteínas que aumentaron en respuesta a tratamiento térmico a 7 días almacenamiento en flavedo de mandarinas Ellendale

Descripción	Nombre del gen	Respuesta a estímulo			
		Frío	Hongo	Calor	Mal plegamiento proteico
Subunidad β C1 del proteosoma	AT1G21720				
Protoseoma 26s	AT4G24820				
β -cetoacil-ACP sintetasa 2	AT1G74960				
Glutación S-transferasa	AT2G47730				
Proteína ribosomal L23AA	AT2G39460				
Proteína ribosomal L23AB	AT3G55280				
Proteína de la superfamilia de la aminohidrolasa N-terminal	AT3G60820				
Proteína de la superfamilia de las HSP20	AT4G10250				
Proteína de la superfamilia de las HSP70	AT4G16660				

Tabla 3. 6. Descripción de las principales proteínas involucradas en la categoría de ontología génica: Respuesta estímulo abiótico, que aumentaron en epicarpio de Ellendale en respuesta al tratamiento térmico a los 7 días de almacenamien

col, 1998). El sistema ubiquitina-proteosoma es el encargado de la degradación de proteínas ribosomales que están siendo producidas en exceso (Sung y col., 2016b) y/o se encuentran mal plegadas (Sung y col., 2016 a). En plantas, la plasticidad en la síntesis y degradación de proteínas, como factores de transcripción, le brinda la habilidad de poder sobrevivir a distintos tipos estrés abióticos (Stone, 2014). En base a los resultados obtenidos se podría hipotetizar que el incremento detectado en el contenido de proteínas ribosomales, en respuesta al tratamiento térmico, estaría induciendo la síntesis de subunidad β C1 del proteosoma y el proteosoma 26S. Por otro lado, el incremento en el nivel de HSP 20 y HSP 70 indicaría un aumento en contenido de proteínas mal plegadas. En conclusión, el curado no sólo incrementa en contenido de proteínas ribosomales sino que también estaría aumentando los niveles de proteínas mal plegadas, señales que en conjunto dispararían la síntesis del proteosoma 26S.

En cuanto a las proteínas que disminuyeron en flavedo de Ellendale en respuesta al curado después de 7 días de almacenamiento, la figura 3.29 muestra que la categoría que resultó más enriquecida fue la de Respuesta a estímulo abiótico. Dentro de las 30 proteínas que se enriquecieron en esta categoría, la tabla 3.7 muestra las más relevantes.

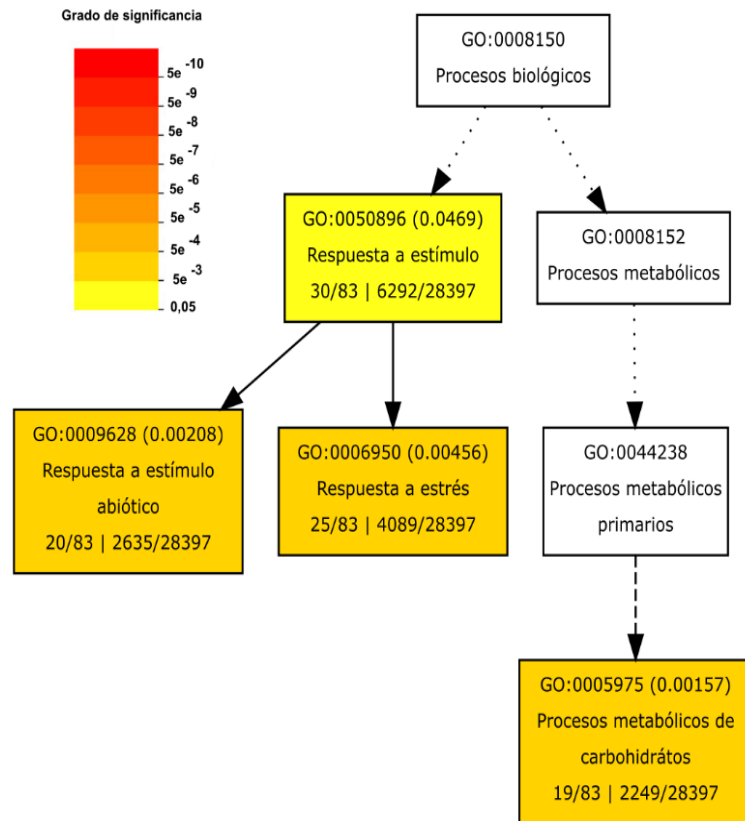


Figura 3. 29 Enriquecimiento de las 83 proteínas que disminuyeron en respuesta a tratamiento térmico a 7 días almacenamiento en flavedo de mandarinas Ellendale

Descripción	Nombre del gen	Respuesta a estímulo			
		Frío	Hongo	Calor	Estrés oxidativo
3-cetoacil sintasa III	AT1G62640				
D-aminoacil-tRNA deacilasa	AT2G03800				
Mio-inositol fosfato sintasa 2	AT2G22240				
Proteína relacionada a patógeno 4	AT3G04720				
Proteína de la familia de la lactato/malato deshidrogenasa	AT4G17260				
Pequeña proteína modificadora tipo ubiquitina 1	AT4G26840				
Cistein-proteasa de la familia de la papaína	AT4G39090				
Proteína CAP160	AT5G52300				
Xiloglucano endotransglucosilasa/hidrolasa	AT5G65730				

Tabla 3. 7. Descripción de las principales proteínas involucradas en la categoría de ontología génica: Respuesta estímulo abiótico, que disminuyeron en epicarpio de Ellendale en respuesta al tratamiento térmico a los 7 días de almacenamiento

La pared celular es una estructura dinámica que se compone de polisacáridos como celulosa y hemicelulosa (dentro de la cual se encuentra los xiloglucanos); y no polisacáridos como ligninas y proteínas. La enzima xiloglucano endotransglicosilasa/hidrolasa es una de las enzimas asociadas a la biosíntesis y reorganización de la pared celular; su acción afectaría la composición de las cadenas de xiloglucanos que entrecruzan las microfibrillas de celulosa (Hayashi, 1989). Dong y col. (2011) reportaron un incremento en la expresión de la xiloglucano endotransglicosilasa/hidrolasa en plantas de arroz expuestas a diferentes tipos de estrés abióticos como calor, frío y sequía. En contraposición, en esta tesis se observó que después de 7 días de almacenamiento a 5°C, el tratamiento térmico provocó una disminución en la expresión de esta enzima, lo cual podría estar indicando un metabolismo de la pared celular menos activo.

Las proteínas pequeñas modificadoras tipo ubiquitina (SUMO de las siglas en inglés Small Ubiquitin-like MOdifier) regulan una amplia gama de procesos celulares. Por otro lado, el factor de transcripción HsfA2 es esencial para la adquisición de termotolerancia (Charng y col. 2007). Cohen-Peer y col. (2010) observaron que la interacción entre el factor de transcripción AtHsfA2 y AtSUMO1 se encontraba relacionada con una disminución en la adquisición de termotolerancia en plantas de *Arabidopsis thaliana*. La sobreexpresión de AtSUMO1 en estas plantas reprimió la actividad transcripcional de AtHsfA2 y disminuyó la inducción de las sHSP. En este trabajo de tesis se observó que el tratamiento térmico disminuyó el contenido de SUMO1 y aumentó el de sHSP en flavedo de mandarinas Ellendale almacenados a 5°C durante 7 días (Tablas 3.6 y 3.7). Este escenario podría estar indicando la adquisición de termotolerancia en este grupo experimental.

La figura 3.30 muestra el agrupamiento obtenido a partir del análisis de enriquecimiento para las 11 proteínas que disminuyeron (figura 3.25) en respuesta a tratamiento térmico en epicarpio de mandarinas Murcott almacenados durante 7 días a 5°C. Dentro Procesos biológicos la categoría que se vio más enriquecida fue la de Procesos metabólicos primarios (Figura 3.30).

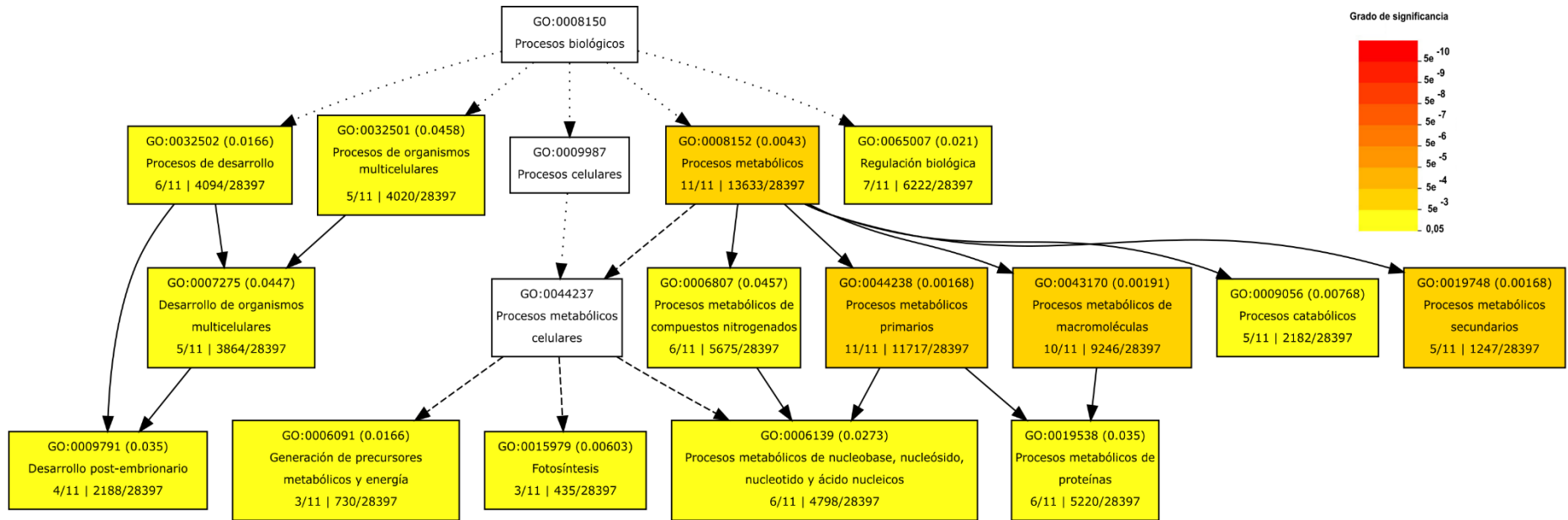


Figura 3. 30 Enriquecimiento de las 11 proteínas que disminuyeron en respuesta a tratamiento térmico a 7 días almacenamiento en flavedo de mandarinas Murcott

La tabla 3.8 muestra la descripción de las 11 proteínas que disminuyeron en epicarpio curado de mandarinas Murcott después de 7 días de almacenamiento. La ascorbato peroxidasa es una enzima que se encuentra involucrada en la eliminación de ERO. La misma utiliza como sustrato ascorbato para reducir el H_2O_2 producido por la SOD. En mandarinas Fortuna la exposición durante 3 días a 37°C protegió a los frutos frente al daño por frío ya que indujo un incremento en la actividad de las enzimas SOD, CAT y APX (Sala y Lafuente, 1999). Por otro lado, Yun y col. (2013) observaron que el tratamiento térmico en epicarpio de mandarinas Satsuma inducía un incremento en el contenido de APX el cual podría estar involucrado con un aumento en la respuesta del fruto frente al estrés. En epicarpio de mandarinas Murcott almacenadas durante 7 días a 5°C, el tratamiento térmico utilizado provocó una disminución en el contenido de APX. En contraposición a lo observado por Sala y Lafuente (1999) y Yun y col. (2013) el tratamiento térmico aplicado no induciría una respuesta de protección frente al daño por frío que involucra a la APX en epicarpio de mandarinas Murcott.

Se ha demostrado que las enzimas proteolíticas poseen funciones reguladoras y de mantenimiento celular que son cruciales tanto para las células de tejidos de plantas intactos como para aquellos que han sido expuestos a patógenos. La proteólisis es realizada por un grupo extremadamente diverso de enzimas. En el genoma de *Arabidopsis thaliana*, el número de genes que codifican proteasas y sus homólogos se encuentra entre 800 y 900, lo que representa aproximadamente el 2,5% de todos los genes que codifican proteínas (Rawlings y col. 2014). Las proteasas rompen los enlaces peptídicos de los oligopéptidos y de las proteínas. Las aminopeptidasas degradan proteínas a partir de su extremo amino terminal, las carboxipeptidasas lo hacen a partir de carboxilo terminal y las endopeptidasas rompen enlaces internos. En *Arabidopsis thaliana* las proteasas degradan enlaces péptidos de cinco maneras diferentes lo cual da origen a cinco clases de enzimas: aspartil proteasas, cisteína proteasas, serina proteasas, metaloproteasas y treonina proteasas (Dunn, 2001; Rawlings y col. 2014). Un estudio realizado por Fun y col. (2009) en epicarpio de naranjas *Citrus sinensis* L. Osbeck reveló que la expresión de un gen asociado con la senescencia, el cual codificaba para una cisteína proteasa, se vio incrementada en frutos que durante la poscosecha desarrollaban picado o pitting en sus cáscaras. La tabla 3.8 muestra que el tratamiento térmico en epicarpio de mandarinas Murcott

almacenando durante 7 días a 5°C provocó una disminución en el contenido de proteínas de la superfamilia de las cisteína proteinasas y de una serina carboxipeptidasa tipo 19 estos cambios podrían estar indicando que el tratamiento térmico previene el picado en epicarpio de frutos de mandarinas Murcott ya que no se observó pitting en este grupo experimental.

Nombre del gen	Descripción
AT1G02300	Proteínas de la superfamilia de las cisteína proteinasas
AT1G02305	Proteínas de la superfamilia de las cisteína proteinasas
AT2G18330	Proteína de la familia de las ATPasa tipo AAA
AT2G37970	Proteína de la familia de proteínas que unen grupos hemo
AT2G39780	Ribonucleasa 2
AT3G55330	Proteína 1 tipo PsbP
AT4G01610	Proteínas de la superfamilia de las cisteína proteinasas
AT4G09010	Ascorbate peroxidasa 4
AT4G36580	Proteína de la familia de las ATPasa tipo AAA
AT5G09640	Serina carboxipeptidasa tipo 19
AT5G30510	Proteína ribosomal S1

Tabla 3. 8 Descripción de las principales proteínas involucradas en la categoría de ontología génica: Procesos metabólicos primarios, que disminuyeron en epicarpio de Murcott en respuesta al tratamiento térmico a los 7 días de almacenamiento

3.2.2.6.3.2. RESPUESTA TARDÍA COMÚN A AMBAS VARIEDADES

Finalmente, se analizaron las 19 proteínas que incrementaron y las 23 que disminuyeron en respuesta al curado a los 7 días de almacenamiento (Figura 3.25). Los resultados obtenidos, a partir de la plataforma agriGO, mostraron que 7 de las 19 proteínas analizadas se agruparon dentro de la categoría Respuesta a estímulo abiótico (Figura 3.31). La identificación de las mismas reveló que se trataba de una HSP70, una HSP20 y una 23.6 de localización mitocondrial. Cabe recordar que el curado a 0 días de almacenamiento aumentó el contenido HSP 20 y 23.6 en Ellendale mientras que en Murcott éstas no fueron detectadas (Tabla 3.4). Como fue previamente discutido, estas pequeñas HSP se encuentran relacionadas con el incremento a la tolerancia a frío. Por lo tanto, los resultados obtenidos indicarían que la inducción de la respuesta a tolerancia a frío por curado en Murcott ocurre de manera tardía en comparación con Ellendale ya que en esta variedad el aumento

de estas chaperonas se dio a los 0 días de almacenamiento (Tabla 3.4.) y se mantuvo a los 7 días.

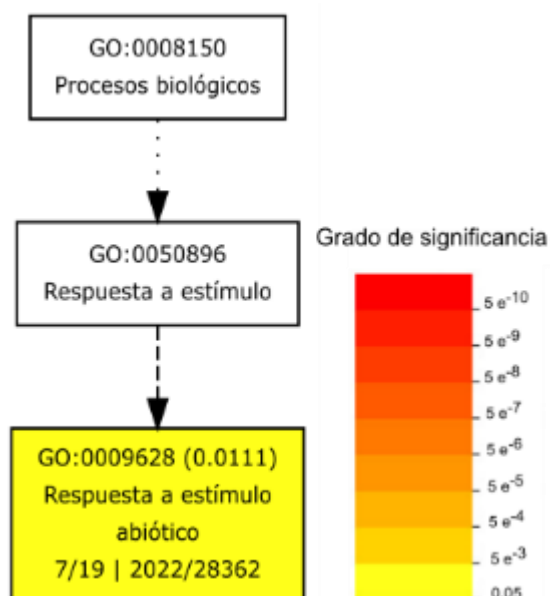


Figura 3. 31 Enriquecimiento de las 19 proteínas que incrementaron su nivel en respuesta a tratamiento térmico a 7 días almacenamiento en flavedo de mandarinas Ellendale y Murcott

El análisis de las 23 proteínas cuyo nivel decreció en respuesta al tratamiento térmico reveló que distintos Procesos biológicos se vieron enriquecidos. A pesar de esto, el que resultó más interesante para analizar fue el de Respuesta a estímulo (Figura 3.32). Los resultados obtenidos mostraron que esta categoría estuvo conformada principalmente por un grupo de proteínas que pertenecían a la superfamilia de las peroxidasas involucradas en la biosíntesis de lignina. Yun y col. reportaron que después de 12 días de haber aplicado el tratamiento térmico en mandarinas Satsumas el contenido de precursores para la síntesis de lignina disminuía. La lignina constituye una barrera de defensa frente a patógenos (Dannesse y col., 2011). En este sentido, se podría inferir que el tratamiento térmico induce alteraciones que afectan la síntesis de lignina y que se manifiestan en ambas variedades en la respuesta tardía (7 días después del tratamiento).

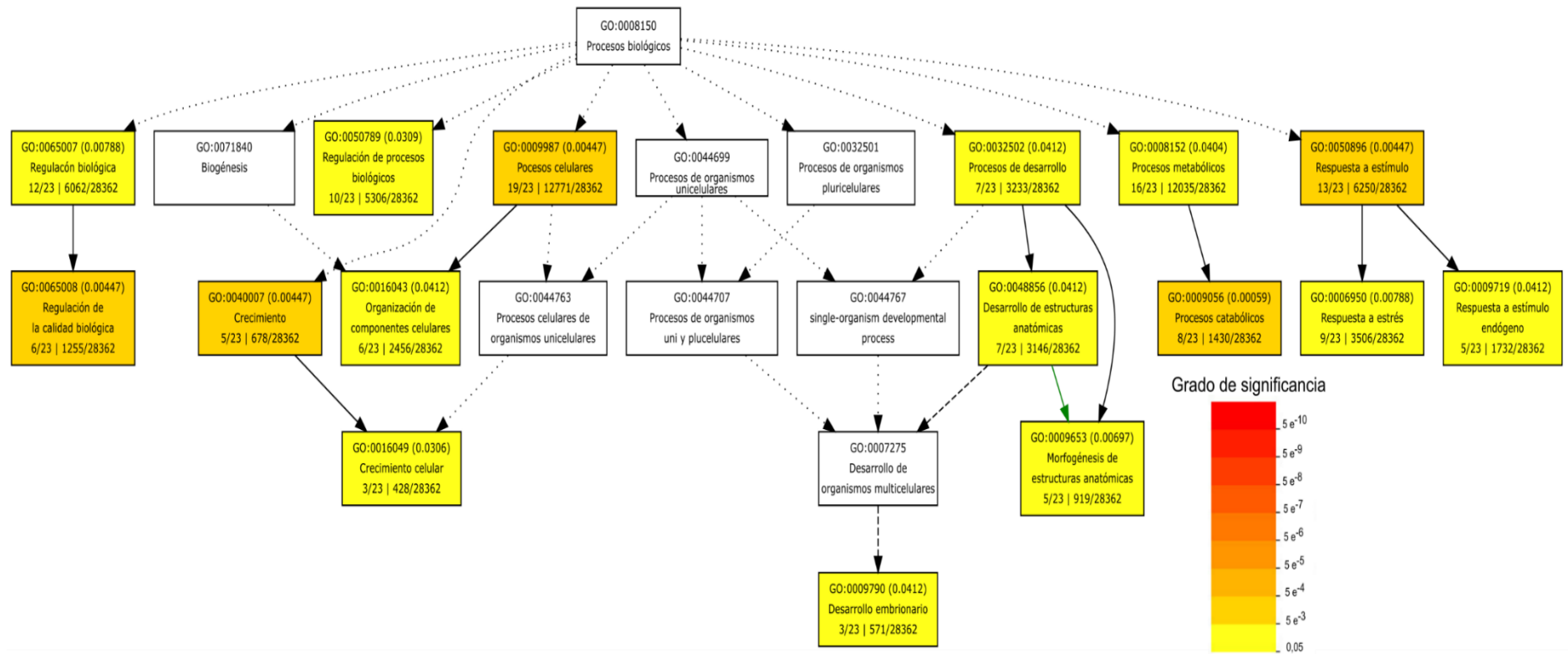


Figura 3. 32 Enriquecimiento de las 23 proteínas que disminuyeron en respuesta a tratamiento térmico a 7 días almacenamiento en flavedo de mandarinas Ellendale y Murcott

3.2.2.6.3.3. METABOLISMOS AFECTADOS POR EL TRATAMIENTO TÉRMICO EN ELLENDALE Y MURCOTT EN LA RESPUESTA TARDÍA

El enriquecimiento de proteínas utilizando las bases de datos de KEGG y PlantCyc reveló que el tratamiento térmico no generó grandes cambios en el metabolismo del flavedo en ninguna de las variedades estudiadas. En Ellendale la degradación de sacarosa junto a la glucólisis incrementaron; mientras que la biosíntesis de ácidos grasos disminuyó. Debido a la poca cantidad de proteínas que se vieron afectadas por el tratamiento térmico en Murcott el análisis realizado no permitió detectar modificaciones en sus metabolismos (Tabla 3.9).

En la sección 3.2.2.6.2.3 se postuló que el tratamiento térmico induciría rutas catabólicas, como la glucólisis y degradación de ácidos grasos, con el fin de incrementar el contenido energético para impulsar la respuesta de defensa mediante el incremento de la biosíntesis de fenilpropanoides. A diferencia de lo observado en este grupo experimental, en flavedo de mandarinas Ellendale almacenadas 7 días a 5°C los metabolismos afectados parecerían estar relacionados más con un requerimiento energético para la homeostasis celular que con una respuesta de defensa o de tolerancia a frío. Un estudio realizado en naranjas Navalate por Holland y col. (2005) reveló que el curado inducía la tolerancia a bajas temperaturas durante el almacenamiento mediante el aumento en el contenido de sacarosa. En este trabajo de tesis, el contenido detectado de este metabolito en flavedo curado almacenado fue significativamente superior al del control en el mismo punto muestral. Estos resultados se contraponen a los obtenidos por proteómica. En resumen para poder tener una visión más clara de lo que está ocurriendo en este grupo experimental y poder dilucidar si el tratamiento térmico induce o no un incremento en la tolerancia al daño por frío es necesario medir las actividades de las enzimas involucradas en el metabolismo de sacarosa como la sacarosa sintasa, sacrosa fostafo sintasa y las invertasas.

INCREMENTA EN ELLENDALE POR TRATAMIENTO TÉRMICO A 7 DÍAS DE ALMACENAMIENTO						
Nombre del grupo de genes	Descripción	Categoría	p value	FDR	Gen	Nombre de la proteína
DEGRADACION DE SACAROSA III(44)	degradación de sacarosa III	PlantCyc	9.3e-3	0.0291	AT5G42740	Proteína de la familia de las glicoisomerasas
					AT5G52560	UDP-glicopirofosforilasa
GLUCÓLISIS IV (54)	glucólisis IV (citósólica)	PlantCyc	0.0136	0.0307	AT1G20950	Proteína de la familia de las fosfofructoquinasas
INCREMENTA EN MURCOTT POR TRATAMIENTO TÉRMICO A 7 DÍAS DE ALMACENAMIENTO						
DISMINUYE EN ELLENDALE POR TRATAMIENTO TÉRMICO A 7 DÍAS DE ALMACENAMIENTO						
KEGG BIOSÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS(25)	Biosíntesis de ácidos grasos	KEGG	7.14e-05	1.43e-3	AT1G62640	Proteína sintasa III
					AT2G38040	AcetilCoA carboxilasa subunidad alfa
					AT2G43710	Proteína de la familia de la proteína estearoil ACP desaturasa
KEGG METABOLISMO DE PROPIONATO(19)	Metabolismo de propionato	KEGG	1.66e-3	0.011	AT2G38040	AcetilCoA carboxilasa subunidad alfa
					AT4G17260	Proteína de la familia lactato / malato deshidrogenasa
DISMINUYE EN MURCOTT POR TRATAMIENTO TÉRMICO A 7 DÍAS DE ALMACENAMIENTO						

Tabla 3. 9. Descripción de los principales metabolismos afectados por tratamiento térmico en flavedo mandarinas Ellendale y Murcott almacenadas a 7 días

3.2.2.7. ESTUDIO DEL SISTEMA ANTIOXIDANTE EN EPICARPIO DE FRUTOS TRATADOS Y CONTROLES DURANTE EL ALMACENAMIENTO EN FRÍO

Las actividades enzimáticas de las superóxido dismutasa (SOD), la peroxidasa (POD) y catalasa (CAT) en epicarpio de frutos heridos controles y tratados a lo largo del período poscosecha fueron evaluadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturizante revelados por actividad enzimática. Se realizaron al menos 3 repeticiones por ensayo, a partir de extractos independientes (Figura 3.33).

Para el análisis comparativo, las bandas reactivas fueron cuantificadas por densitometría. La figura 3.34 muestra los resultados obtenidos para Ellendale (superiores) y para Murcott (inferiores).

Los datos obtenidos para SOD revelaron una marcada disminución en la actividad de esta enzima en epicarpio de Ellendale curado. Este patrón se observó a lo largo del periodo de almacenamiento a 5°C. En contraparte, en flavedo de Murcott tanto el tratamiento térmico como el periodo de almacenamiento generaron cambios en la actividad de esta enzima. El tiempo incrementó la actividad SOD a los 7 días tanto en controles como curados mientras que a los 30 se registró una caída sólo en frutos controles. Por otro lado, el curado aumentó la actividad SOD sólo a los 7 días. Cabe señalar que el análisis de esta actividad se realizó sumando las intensidades de cada isoforma detectada, dado que no hubo comportamientos diferenciales entre las mismas.

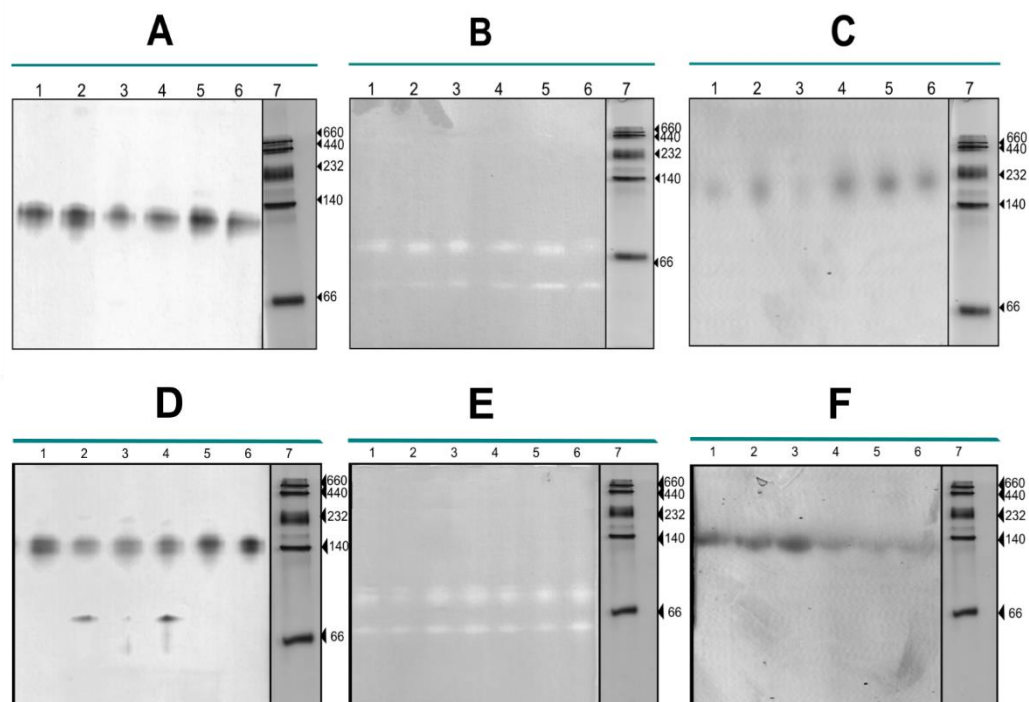


Figura 3. 33. Análisis de las enzimas POD (A, D), SOD (B, E) y CAT (C, F) en extractos de epicarpio herido mandarinas var. Ellendale y Murcott expuestos a tratamiento térmico y almacenamiento a 5°C mediante electroforesis en condiciones no desnaturizantes revelados por actividad enzimática

Los geles superiores de la imagen corresponden a extractos de flavedo de mandarinas Ellendale, mientras que los inferiores corresponden a extractos de flavedo de mandarinas Murcott. En todos los casos el esquema de siembra fue el siguiente: calle 1, extractos crudos de fruto control a 0 días de almacenamiento; calle 2: extracto crudo de fruto curado 0 días de almacenamiento; calle 3 extractos crudos de fruto control a 7 días de almacenamiento; calle 4: extracto crudo de fruto curado 7 días de almacenamiento; calle 5 extractos crudos de fruto control a 30 días de almacenamiento; calle 6: extracto crudo de fruto curado 30 días de almacenamiento, calle 7, marcados de peso molecular. Los números a la derecha representan las masas moleculares. En todas las calles se sembró 20 µg de proteínas totales.

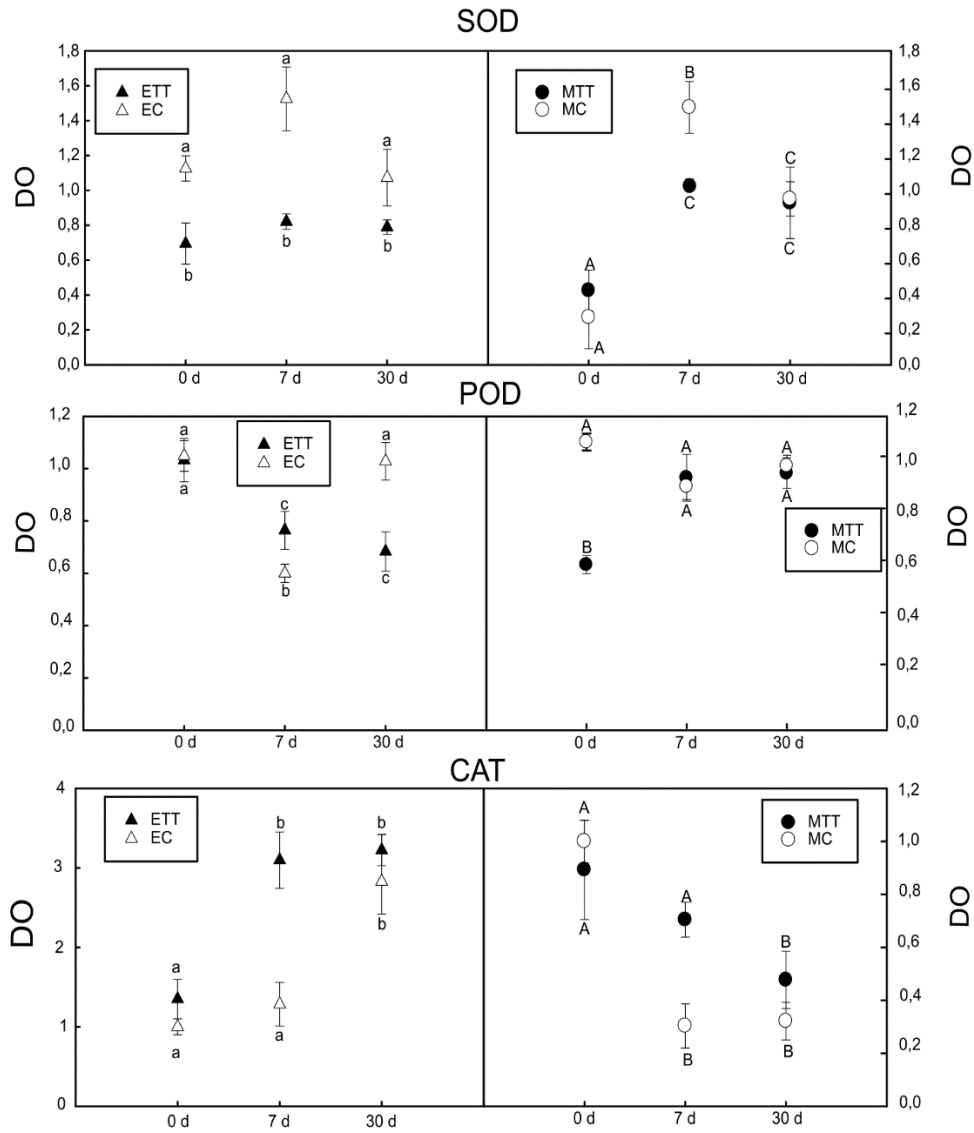


Figura 3. 34. Densitometría de la actividad de POD, SOD y CAT en extractos de epicarpio heridos de mandarinas var. Ellendale y Murcott expuestas a tratamiento térmico y almacenamiento a 5°C.

Los gráficos en la parte izquierda de la imagen corresponden a la densitometría realizada para Ellendale en flavedo control (EC) y tratado (ETT) a lo largo del periodo de almacenamiento de 0, 7 y 30 días mientras que los de la derecha corresponden a la densitometría realizada para Murcott en flavedo control (MC) y tratado (MTT) a lo largo del periodo de almacenamiento de 0, 7 y 30 días. Los niveles de intensidad de densidad óptica fueron analizados. Las diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Como se puede observar en las figuras 3.33 y 3.34, en Ellendale el tiempo de almacenamiento generó un decremento en la actividad POD en los frutos controles sólo a los 7 días mientras que en curados la disminución generada en este punto se mantuvo a los 30 días (figura 3.34). En cuanto al tratamiento térmico se puede mencionar que el mismo provocó un aumento en la actividad POD a los 7 días y generó un comportamiento inverso a los 30 días. Por otro lado, en Murcott sólo el tratamiento térmico indujo una disminución en la actividad POD a los 0 días de almacenamiento.

Por último, en Ellendale el tiempo de almacenamiento indujo un incremento en la actividad CAT a los 7 días para flavedos tratados y a los 30 días para los controles. En Murcott el tiempo de almacenamiento disminuyó la actividad de esta enzima a 7 días en el control; el cual se mantuvo a los 30 días. El tratamiento térmico generó un incremento de CAT sólo a los 7 días de almacenamiento a 5°C.

En conclusión, en Ellendale el tratamiento de curado procaría una disminución en el contenido de H₂O₂ ya que la actividad SOD disminuyó en respuesta al curado y se mantuvo baja a lo largo del almacenamiento. Por otro lado, si bien la actividad POD disminuyó con el tiempo, la actividad CAT incrementó por tratamiento térmico a los 7 días, permaneciendo alta a los 30 días. En conjunto el comportamiento de estas enzimas podría estar indicando un incremento en la tolerancia al frío inducido por el tratamiento térmico. En contraparte, en Murcott el patrón de comportamiento observado para SOD, POD, CAT estaría relacionado con una acumulación en el contenido de H₂O₂ a lo largo del almacenamiento ya que no sólo se registró un incremento en la actividad SOD, enzima generadora de este compuesto, sino que también se determinó una disminución en la enzima detoxificadora CAT y en el contenido de APX, detectado por proteómica (tabla 3.8). En resumen, el tratamiento térmico aplicado no protegería a esta variedad frente al daño por frío.

3.2.3. CONCLUSIONES

Los datos como expuestos aquí pueden ser útiles para correlacionar el contenido metabólico de una fruta con sus atributos como cultivo, es decir palatabilidad, resistencia al estrés, comportamiento poscosecha. Por ejemplo, niveles altos de putrescina, ácido graso insaturados en los lípidos de la membrana, junto a un alto nivel de hesperidina, podrían señalar una ventaja, en favor de Ellendale, a la hora de enfrentar distintos tipos de estres.

Por otro lado, los resultados obtenidos por metabolómica revelaron que el tratamiento térmico aplicado provocó un cambio en el perfil metabólico de Ellendale mucho más pronunciado que el observado en Murcott. En esta última variedad el tiempo de almacenamiento fue el factor que más impacto tuvo sobre su metaboloma.

Notablemente, el análisis de los perfiles de expresión diferencial de proteínas dio apoyo los resultados obtenidos por metabolómica. Es decir, los datos que arrojó el estudio proteómico reveló que la respuesta del flavedo de mandarinas Ellendale al curado es más fuerte que la detectada en Murcott. Es fundamental resaltar que el tratamiento térmico no sólo indujo la respuesta en Ellendale sino que éstas estuvieron relacionadas con la defensa del fruto, la tolerancia al daño por frío y la termotolerancia.

Finalmente la evaluación de las enzimas antioxidantes reveló que el curado generó una respuesta de protección frente al daño por frío en mandarinas Ellendale inducido por el estrés oxidativo.

4. CONCLUSIONES

4.1. CONCLUSIONES

En conclusión, estos estudios refuerzan la importancia que tiene el enfoque ómico a la hora de estudiar la fisiología de la fruta (Katz y col., 2007, Perotti y col., 2015, Yun y col., 2013). En particular, la metabolómica ha proporcionado una mayor comprensión de la biología de los frutos, especialmente la relacionada con la maduración y la calidad de los mismos. En este contexto, el presente trabajo demuestra que el perfil metabólico es una herramienta útil que permite la caracterización de dos variedades cercanas de mandarinas ampliamente cultivadas en Argentina. Los datos expuestos aquí pueden ser útiles para correlacionar la huella metabólica de una fruta con sus atributos de calidad, es decir, palatabilidad, resistencia al estrés, comportamiento poscosecha.

En este trabajo de Tesis la aplicación de diferentes técnicas como metabolómica, proteómica, y bioquímicas; permitió realizar un análisis comparativo y caracterizar el fenotipo poscosecha en distintas variedades de frutos cítricos. Los resultados revelaron que la aplicación del tratamiento térmico analizado en este trabajo produjo diferentes respuestas metabólicas en el epicarpio de las distintas variedades de cítricos evaluadas. Para el caso de las variedades de mandarinas estudiadas, la respuesta del flavedo de Ellendale al curado fue más fuerte que la detectada en Murcott. Es importante resaltar que la respuesta inducida en Ellendale estaría relacionada con una menor susceptibilidad de esta variedad frente al ataque de patógenos fúngicos y daño por frío en comparación con Murcott. La determinación de la incidencia de podredumbre reforzó los resultados de metabolómica y proteómica obtenidos los cuales daban indicios de que el tratamiento térmico estimulaba la respuesta de defensa en flavedo de mandarinas Ellendale.

La aplicación de tratamientos térmicos durante la poscosecha tiene como objetivo reducir la velocidad de respiración, retardar la maduración y senescencia y detener el desarrollo de patógenos, extendiendo de esta manera la vida poscosecha sin afectar de manera significativa la calidad de las frutas. En este contexto, lo relevante de este trabajo de Tesis fue que permitió hallar las bases moleculares de la respuesta diferencial de dos variedades de *Citrus reticulata* frente a un mismo tratamiento térmico. La identificación de características

moleculares realizada será de suma importancia para la tecnología poscosecha no sólo para optimizar las estrategias utilizadas sino también para saber qué cultivar responderá de manera favorable, lo cual se traducirá en un ahorro de tiempo y dinero para los productores. Por otro lado, teniendo en cuenta que los cítricos son árboles que tardan su tiempo en crecer y dar frutos la identificación de marcadores moleculares es imprescindible para acelerar la evaluación de nuevas variedades.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

5.1. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Afendi, F. M., Okada, T., Yamazaki, M., Hirai-Morita, A., Nakamura, Y., Nakamura, K. y col., **2012**. KNAPSAcK family databases: integrate metabolite-plant species databases for multifaceted plant research. *Plant Cell Physiol.* 53: 1-12.

Agrios, G.N., **1997**. *Plant Pathology*. Academic Press, New York, pp. 635.

Ajinath S. D., Sangeeta, P., V. Eyarkai N., Ram, K. G., Rajbir S., Kalyani S., Rajesh K., **2017**. Exploitation of microbial antagonists for the control of postharvest diseases of fruits: a review. *Crit Rev Food Sci. Nutr.* Vol 0: 1-16.

Almeida, D., Huber, D. **2008**. In vivo pectin solubility in ripening and chill-injured tomato fruit. *Plant Sci.* 174: 174-182.

Arbona, V., Manzi, M., Ollas, C., Gómez- Cadenas, A., **2013**. Metabolomics as a tool to investigate abiotic stress tolerance in plants. *Int. J. Mol. Sci.* 14: 4885-4911.

Bachrach, U., **2010**. The early history of polyamine research. *Plant Physiol. Biochem.* 48(7): 490-495.

Ballester, A.R., Izquierdo, A., Lafuente, M.T., González-Candelas, L., **2010**. Biochemical and molecular characterization of induced resistance against *Penicillium digitatum* in citrus fruit. *Postharv. Biol. Technol.* 56, 31-38.

Ballester, A.R., Lafuente, M.T., González-Candelas L., **2006**. Spatial study of antioxidant enzymes, peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase in the citrus fruit–*Penicillium digitatum* interaction. *Postharv. Biol. Technol.* 39: 115-124.

Ballester, A.R., Lafuente, M.T., Vos, R., Bovy, A.G., González-Candelas, L., **2013**. Citrus phenylpropanoids and defence against pathogens. Part I: Metabolic profiling in elicited fruits. *Food Chem.* 136, 178-185.

Ballester, A.R., Lafuente, M.T., Vos, R., Bovy, A.G., González-Candelas, L., **2013**. Citrus phenylpropanoids and defence against pathogens. Part II: Metabolic profiling in elicited fruits. *Food Chem.* 136, 285-291.

Barboni, T., Luro, F., Chiaramonti, N., Desjobert, JM., Muselli, A., Costa J., **2009**. Volatile composition of hybrids Citrus juices by headspace solid phase microextraction/gas chromatography/mass spectrometry. *Food Chem.* 116:382–390.

Barkai-Golan R., P.D., **1991**. Postharvest heat treatment of fresh fruits and vegetables for decay control. *Plant Disease.* 75, 1085-1089.

Beauchamp, C. y Fridovich, I., 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 44: 276-287.

Bello, F., Cocco, M., Meier, G.E., **2008**. Evaluación de la calidad de naranja Valencia a dos temperaturas de conservación y con distintos recubrimientos, XXXI Congreso Argentino de Horticultura, Mar del Plata.

Beno-Moualem, D., Prusky, D., **2000**. Early events during quiescent infection development by *Colletotrichum gloeosporioides* in unripe avocado fruits. *Phytopathology* 90, 553–559.

Ben-Yehoshua, S., Rodov, V., Kim, J.J., Carmeli, S., **1992**. Preformed and induced antifungal materials of citrus fruits in relation to the enhancement of decay resistance by heat and ultraviolet treatments. *J. Agric. Food Chem.* 40, 1217-1221

Berger, S., Sinha, A.K., Roitsch, T., **2007**. Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant–pathogen interactions. *J. Exp. Bot.* 58, 4019-4026.

Bergmeyer, H.U y Bernt, E., **1974 b**. Glutamate-oxaloacetate transaminase, UV-assay, manual method. Academic Press, New York 2, 727-733.

Bitá, C.E. y Gerats, T., **2013**. Plant tolerance to high temperature in a changing environment: scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops. *Front. Plant Sci.* 4, 273.

Bligh, E.G., Dyer, W.J., **1959**. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911-917.

Bouche, N. y Fromm, H., 2004. GABA in plants: just a metabolite? *Trends in Plant Sci.* 9(3): p. 110-115.

Bowler, C., Van Montagu, M., Inés, D., **1992**. Superoxide dismutases and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43: 83-116.

Brown, G.E., **1989**. Host defenses at the wound site on harvested crops. *Phytopathology* 79: 1381–1384.

Bruemmer, J.H. y Roe, B., 1985. Pyruvate dehydrogenase activity during ripening of “Hamlin” oranges. *Phytochemistry* 24: 2105-2106.

Burnette, W.N., **1981**. “Western Blotting”. Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein. *Anal. Biochem.* 112, 195-203.

Bustos, D.M., Bustamante, C.A., Iglesias, A.A., **2008**. Involvement of non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in response to oxidative stress. *J. Plant Physiol.* 165, 456-461.

Castro-Mercado, E., Martinez-Diaz, Y., Roman-Tehandon, N., Garcia-Pineda, E., **2009**. Biochemical analysis of reactive oxygen species production and antioxidative response in unripe avocado (*Persea americana* Mill var Hass) fruits in response to wounding. *Protoplasma* 235, 67–76.

Charng, Y.Y., Liu, H.C., Liu, N.Y., Chi, W.T., Wang, C.N., Chang, S.H., Wang, T.T., **2007**. A heat-inducible transcription factor, HsfA2, is required for extension of acquired thermotolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 143:251–262

Chen, J., Montanari, A.M., Widmer, W.W., **1997**. Two New Polymethoxylated Flavones, a Class of Compounds with Potential Anticancer Activity, Isolated from Cold Pressed Dancy Tangerine Peel Oil Solids. *J Agric. Food Chem.* 45, 364-368.

Chen, M., Jiang, Q., Yin, X., Lin, Q., Chen, J., Allan, A., Xu, C., Chen, K., **2012**. Effect of hot air treatment on organic acid- and sugar-metabolism in Ponkan (*Citrus reticulata*) fruit. *Postharv. Biol. Techn.*, 147 :118-125.

Chen, Y.T., Zheng, R.L., Jia, Z.J., Ju, Y., **1990**. Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. *Free Rad. Biol. Med.* 9, 19-21.

Cheong, Y.H., Chang, H.S., Gupta, R., Wang, X., Zhu, T., Luan, S., **2002**. Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 129, 661–677.

Civello, P.M., Martínez, G.A, Alicia Raquel Chaves, A.R., Añón, M.C., **1997**. Heat Treatments Delay Ripening and Postharvest Decay of Strawberry Fruit. *J. Agric. Food Chem.*, 45 (12), pp 4589–4594.

Clifton, I. J., McDonough, M. A., Ehrismann, D., Kershaw, N. J., Granatino, N. y Schofield, C. J., **2006**. Structural studies on 2-oxoglutarate oxygenases and related double-stranded beta-helix fold proteins. *J. Inorg. Biochem.* 100, 644–669.

Cocco, M., **2011**. Control de moho verde (*P. digitatum*) en poscosecha de naranjas y mandarinas, mediante la combinación de curado, luz ultravioleta y bicarbonato de sodio, matenimiento de su calidad. Tesis de posgrado: Doctorado en Ciencia, Tecnología y Gestión alimentaria. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional del Nordeste, Argentina, pp: 1-75.

Cocco, M., Meier, G.E., Vázquez D.E., **2010**. Cold treatment of Argentinean mandarins against mediterranean fruit fly. *ISHS Acta Horti.* 934.

Cocco, M., Vázquez, D. E., Albors, A., Cháfer, M., Meir, G. E., Bello, F., **2008**. Combinación de tratamientos térmicos y bicarbonato de sodio para el control de *Penicillium digitatum* en frutos cítricos. *Rev. Iber. Tecnología Poscosecha* 9, 55-62.

Cohen, E., Shalom, Y., Rosenberg, I., **1990**. Postharvest ethanol buildup and off-flavor in Murcott tangerine fruits. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 115(5) 775-778.

Cohen-Peer, R., Schuster, S., David, M., Breiman, A., Avni, A., **2010**. Sumoylation of Arabidopsis heat shock factor A2 (HsfA2) modifies its activity during acquired thermotolerance. *Plant Mol Biol* 74:33–45.

Cook, D., Fowler, S., Fiehn, O., Thomashow, M. F., **2004**. A prominent role for the CBF cold response pathway in configuring the low-temperature metabolome of Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 101 (42), 15243–15248.

Dahlan-Daud C. K., Mat Jais A. M., Ahmad Z., Md Akim A., Adam, A., **2010**. Amino and fatty acid compositions in Haruan traditional extract (HTE). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, vol. 9, no. 5, 414–429, 201

Dai, N., Schaffer, A., Petreikov, M., Shahak, Y., Giller, Y., Ratner, K., Levine, A., Granota, D., **1999**. Overexpression of Arabidopsis Hexokinase in Tomato Plants Inhibits Growth, Reduces Photosynthesis, and Induces Rapid Senescence. *The Plant Cell* 11, 1253-1266.

Dat, J., Vandenabeele, S., Vranová, E., Van Montagu, M., Inzé, E., Van Breusegem, F., **2000**. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell. Mol. Life Sci.* 57: 779-775.

Dave, B., Sales, M., Walia, M., **1989**. Resistance of different strains of *Penicillium digitatum* to imazalil treatment in California citrus packinghouses. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 102: 178-179.

Davies, F.S. y Albrigo, L. G., **1994**. *Citrus*. CAB International. Great Britain

Davis, B.J., **1964**. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Annu. NY. Acad. Sci.* 121: 404-427.

De Gara, L., de Pinto, M.C., Tommasi, F., **2003**. The antioxidant systems vis-à-vis reactive oxygen species during plant-pathogen interaction. *Plant Physiol. Biochem.* 41, 863–870.

Denness, L., McKenna, J.F., Segonzac, C., Wormit, A., Madhou, P., Bennett, M., Mansfield, J., Zipfel, C., Hamann, T., **2011**. Cell wall damage-induced lignin

biosynthesis is regulated by a reactive oxygen species- and jasmonic acid-dependent process in arabidopsis. *Plant Physiol*, 156:1364–1374.

De Marco, L., Sasser, D., Epis, S., Mastrantonio, V., Ferrari, M., Ricci, I., Comandatore, F., Bandi, C., Porretta, D., Urbanelli, S., **2017**. The choreography of the chemical defensive response to insecticide stress: insights into the *Anopheles stephensi* transcriptome using RNA-Seq. *Sci. Reports* 7:41312: 1-12.

de Souza, L. P., Naake, T., Tohge, T. y Fernie, A. R., **2017**. From chromatogram to analyte to metabolite. How to pick horses for courses from the massive web-resources for mass spectral plant metabolomics. *Gigascience* doi: 10.1093/gigascience/gix037 [Epub ahead of print].

Dharmawan, J., Kasapis, S., Curran, P., Johnson, JR., **2007**. Characterization of volatile compounds in selected citrus fruits from Asia. Part I. Freshly-squeezed juice. *Flav. Frag. J.* 22:228–232.

Dianz F., Santos M., Blanco R., Tello J.C., **2002**. Fungicides resistance in *Botrytis cinerea* isolate from strawberry crops in Huelva (southwestern Spain). *Phytoparasitica* 30: 529-534.

Dick, T.P., Nussbaum, A.K., Deeg, M. y col., **1998**. Contribution of proteasomal β -subunits to the cleavage of peptide substrates analyzed with yeast mutants. *J. Biol. Chem.* 273, 25637–25646

Dirlewanger, E., A. Moing, C. Rothan, L. Svanella, V. Pronier, A. Guye, C. Plomion, R. Monet., **1999**. Mapping QTLs controlling fruit quality in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. *Theor. Appl. Genet.* 98:18–31.

Dixon, R.A., Achnine, L., Kota, P., Liu, C.J., Reddy, M.S.S., Wang, L.J., **2002**. The phenylpropanoid pathway and plant defence - a genomics perspective *Mol. Plant Pathol.* 3, 371–390.

Doligez, A., E. Audiot, R. Baumes, This. P., **2006**. QTLs for muscat flavor and monoterpenic odorant content in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Mol. Breed.* 18:109–125.

Dong, J., Jiang, Y., Chen, R., Xu, Z., Gao, X. **2011**. Isolation of a novel xyloglucan endotransglucosylase (OsXET9) gene from rice and analysis of the response of this gene to abiotic stresses. *Afr. J. Biotechnol.* 10, 17424–17434.

Dunemann, F., Ulrich, D., Boudichevskaia, A., Grafe, C., Weber. W.E., **2009**. QTL mapping of aroma compounds analysed by headspace solid-phase microextraction

gas chromatography in the apple progeny 'Discovery' x 'Prima'. *Mol. Breed.* 23:501–521.

Dunn, B.M., **2001**. Determination of protease mechanism. In: Beynon R., Bond J.S., editors. *Proteolytic Enzymes: A Practical Approach*. 2nd ed. Oxford University Press; Oxford, UK. pp. 77–104

Durrant, W.E., Rowland, O., Piedras, P., Hammond-Kosack, K.E., Jones, J.D.G., **2000**. cDNA-AFLP reveals a striking overlap in race-specific resistance and wound response gene expression profiles. *Plant Cell* 12, 963–977.

Dutta, A., Shetty, P., Bhat, S., Ramachandra, Y., and Hegde, S., **2012**. A mass spectrometric study for comparative analysis and evaluation of metabolite recovery from plasma by various solvent systems. *J. Biomol. Tech.* 23, 128–135.

Echeverria, E. y Burns, J.K., **1989**. Vacuolar acid hydrolysis as a physiological mechanism for sucrose breakdown. *Plant Physiol.* 90: 530-533.

Elmaci, Y. and Altug, T., **2005**. Flavor characterization of three mandarin cultivars (Satsuma, Bodrum, Clementine) by using GC/MS and flavor profile analysis techniques. *J. Food Qual.* 28:163–170.

Etienne, A., Génard, M., Lobit, P., Mbéguié-A, Mbéguié, D., Bugaud, C., **2013**. What controls fleshy fruit acidity? A review of malate and citrate accumulation in fruit cells. *J. Exp. Bot.* 64, 1451-1469.

Falcone Ferreyra, M.L., Perotti, V., Figueroa, C., Garrán, S., Anderson, P., Vázquez, D., Iglesias, A., Podestá, F., **2006**. Carbohydrate metabolism and fruit quality are affected in frost-exposed Valencia orange fruit. *Physiologia Plantarum* 128, 224-236.

Fan, J., Yang, Y., Gao, X., Deng, W., Falara, V., Kanellis, K.A., Li, Z., **2009**. Expression of a senescence-associated cysteine protease gene related to peel pitting of navel orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Plant Cell, Tiss. and org. cult.* 98 (3): 281-289.

Farmer, E.E., Almeras, E., Krishnamurthy, V., **2003**. Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. *Curr Opin Plant Biol* 6:372–378.

Farrow, S. y Facchini, P., **2014**. Functional diversity of 2-oxoglutarate/Fe(II)-dependent dioxygenases in plant metabolism. *Front. Plant Sci.* (5) 524:1-15.

Fernie, A. R., **2003**. Metabolome characterisation in plant system analysis. *Funct. Plant Biol.* 30, 111–120.

Fíla, J., Závěská Drábková, L., Gíbalová, A., Honys, D., **2017**. When Simple Meets Complex: Pollen and the Omics. Obermeyer G., Feijó J. (eds) Pollen Tip Growth. Springer, Cham: 247-292.

Flashman, E. y Schofield, C. J. **2007**. The most versatile of all reactive intermediates? Nat. Chem. Biol. 3: 86–87.

Gao, Z., House, L.O., Gmitter, F.G.J., Valim, M.F., Plotto, A., Baldwin, E.A., **2011**. Consumer preferences for fresh citrus: Impacts of demographic and behavioral characteristics. Int. Food Agribus. Manag. Rev. 14, 23-40.

Gerrard Wheeler, M.C., Tronconi, M.A., Drincovich, M.F., Andreo, C.S., Flugge, U., Maurino, V.G., **2005**. A Comprehensive Analysis of the NADP-Malic Enzyme Gene Family of Arabidopsis. Plant Physiol. 139, 139-151.

Gill, S.S. y Tuteja, N., **2010**. Polyamines and abiotic stress tolerance in plants. Plant Signaling & Behavior 5(1): p. 26-33.

Goldenberg, L., Yaniv, Y., Doron-Faigenboim, A., Carmic, N., Porata, R., **2016**. Diversity among mandarin varieties and natural sub-groups in aroma volatiles compositions. J. Sci. Food Agric. 96: 57-65.

Goldenberg, L., Yaniv, Y., Kaplunov, T., Adi-Faigenboim, A., Carmi, N., Porat, R., **2015**. Diversity in sensory quality and determining factors influencing mandarin flavor liking. J Food Sci 80: S418–S425.

Goldenberg, L., Yaniv, Y., Kaplunov, T., Doron-Faigenboim, A., Porat, R., Carmi, N., **2014**. Genetic Diversity among Mandarins in Fruit-Quality Traits. Agric. Food Chem. 62:4938–4946.

Goldenberg, L., Yaniv, Y., Porata, R., Carmic, N., **2017**. Mandarin fruit quality: a review. J. Sci. Food Agric. J Sci Food Agric. doi: 10.1002/jsfa.8495. [Epub en prensa] Revisión.

Gross, K. y Saltveit, M., **1982**. Galactose concentration and metabolism in pericarp tissue from normal and non-ripening tomato fruit. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 107 328–330.

Guo, P., Qi, Y.P., Yang, L.T., Lai, N.W., Ye, X., Yang, Y., Chen, L.S., **2017**. Root adaptative responses to aluminum-treatment revealed by RNA-Seq in two Citrus species with different aluminum-tolerance. Front.Plant Sci. 8:330: 1-18.

Gupta, A.S., Heinen, J.L., Holaday, A.S., Burke, J.J., Allen, R.D., **1993**. Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that overexpress chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase. Proc Natl Acad Sci USA 90:1629–1933

Gusev, N., Bogatcheva, N., Marston, S., **2002**. Structure and properties of small heat shock proteins (sHsp) and their interaction with cytoskeleton proteins. *Biochem. (Moscow)*, 67, 511–519.

Hagenmaier, R.D., **2002**. The flavor of mandarin hybrids with different coatings. *Postharv. Biol. Technol.* 24, 79-87.

Hatmi, S., Gruau, C., Trotel-Aziz, P., Villaume, S., Rabenoelina, F., Baillieul, F., Eullaffroy, P., Clément, C., Ferchichi, A., Aziz, A., **2014**. Drought stress tolerance in grapevine involves activation of polyamine oxidation contributing to improved immune response and low susceptibility to *Botrytis cinerea*. *J. Exper Bot.* 66(3):775-87.

Hattenbach, A. y Heineke, D., **1999**. On the role of chloroplastic phosphoglucomutase in the regulation of starch turn over. *Planta* 207, 527–532.

Hayashi, T. **1989**. Xyloglucans in the primary-cell wall. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40, 139–168.

He, L. H., Chen, J. Y., Kuang, J. F., Lu, W. J. **2012**. Expression of three sHSP genes involved in heat pretreatment-induced chilling tolerance in banana fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92, 1924–1930.

Heyman, H. M. y Dubery, I. A. **2016**. The potential of mass spectrometry imaging in plant metabolomics: a review. *Phytochem. Rev.* 15, 297–316.

Hirai, M. y Ueno, I., **1977**. Development of citrus fruits: Fruit development and enzymatic changes in juice vesicle tissue. *Plant Cell Physiol.* 18: 791-799.

Hodges, D.M., **2003**. Postharvest oxidative stress in horticultural crops. En: *Food products press. The Harworth Press, Inc. New York*, pp. 1-7.

Hodgson, R.W., **1967**. Horticultural varieties of citrus. *The Citrus Industry. University of California, Berkeley* 1: p. 431–591.

Holland, N., Sala, J.M., Menezes, H.C., Lafuente, M.T., **1999**. Carbohydrate content and metabolism as related to maturity and chilling sensitivity of Cv. Fortune mandarins. *J. Agric. Food Chem.* 47: 2513-2518.

Hong, J., Yang, L., Zhang, D., and Shi, J. **2016**. Plant metabolomics: an indispensable system biology tool for plant science. *Int. J. Mol. Sci.* 17 (6): 1-16.

Horowitz, R.M., **1961**. Its biochemistry and physiology. *The citrus flavonoids*, W.B.S. (Ed.), University of California, Division of Agricultural Science, Los Angeles, CA In the orange. p. 334–372.

Horváth, I., Multhoff, G., Sonnleitner, A., Vigh, L. **2008**. Membrane associated stress proteins: more than simply chaperones. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)—Biomembranes*, 1778, 1653–1664.

Hou, Q., Ufer, G., Bartels, D., **2016**. Lipid signalling in plant responses to abiotic stress. *Plant Cell Environ.* 39, 1029-1048.

Howard, F.S., 1936. *Citrus diseases and their control*. McGraw-Gill Inc., New York.

Huckelhoven, R. y Kogel, K.H., 2003. Reactive oxygen intermediates in plant-microbe interactions: who is who in powdery mildew resistance? *Planta* 216: 891–902.

Hurkman W. y Tanaka C., **1986**. Solubilization of Plant Membrane Proteins for Analysis by Two-Dimensional Gel Electrophoresis. *Plant Physiol.* 81: 802-806.

Igarashi, K. y Kashiwagi, K., **2010**. Modulation of cellular function by polyamines. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2010. 42(1): p. 39-51.

Iglesias, A.A., Podestá, F.E., **2005**. Photosynthate formation and partitioning in crop plants, In: Pessaraki, M. (Ed.), *Handbook of Photosynthesis*, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 525-545.

Johnson, S. R. y Lange, B. M. **2015**. Open-access metabolomics databases for natural product research: present capabilities and future potential. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 3:22.

Kalamaki, M. S., Alexandrou, D., Lazari, D., Merkouropoulos, G., Fotopoulos, V., Pateraki, I., Aggelis, A., Carrillo-Lopez, A., RubioCabetas, M. J., Kanellis, A. K., **2009**. Over-expression of a tomato N-acetyl-L-glutamate synthase gene (SINAGS1) in *Arabidopsis thaliana* results in high ornithine levels and increased tolerance in salt and drought stresses. *J. Exp. Bot.* 60 (6): 1859–1871.

Katz, E., Fon, M., Lee, Y., Phinney, B., Sadka, A., Blumwald, E., **2007**. The citrus fruit proteome: insights into citrus fruit metabolism. *Planta* 226, 989-1005. Knee, M., Hatfield, S.G.S., 1981. The metabolism of alcohols by apple fruit tissue. *J. Sci. Food Agric.* 32, 593-600.

Kessler, N., Walter, F., Persicke, M., Albaum, S. P., Kalinowski, J., Goesmann, A., y col., **2014**. Allocator: an interactive web platform for the analysis of metabolomic LC-ESI-MS datasets, enabling semi-automated, user-revised compound annotation and mass isotopomer ratio analysis. *PLoS ONE* 9: (11): 1-21.

Kienow, L., Schneider, K., Bartsch, M., Stuible, H.P., Weng, H., Miersch, O., Wasternack, C., Kombrink, E., **2008**. Jasmonates meet fatty acids: functional analysis of a new acyl-coenzyme A synthetase family from *Arabidopsis thaliana*. *J. of Exp. Bot.*, Vol. 59, No. 2, pp. 403–419.

Kim, J.J., Ben-Yehoshua, S., Shapiro, B., Henis, Y., Carmeli, S., **1991**. Accumulation of scoparone in heat-treated lemon fruit inoculated with *Penicillium digitatum* Sacc. *Plant Physiol.* 97, 880-885.

Kim, K., Gross, T., Solomos, T. **1991**. Galactose metabolism and ethylene production during development and ripening of tomato fruit. *Postharv. Biol. Technol.* 1 67–80.

Koch, K.E., **1996**. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 509–540.

Krasensky, J. y Jonak, C., **2012**. Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *J. Exp. Bot.* 63(4): 1593-1608.

Kurepa, J. y Smalle, J.A., **2008a**. Structure, function and regulation of plant proteasomes. *Biochimie*, 90, 324–335.

Lafuente M.T., Establez-Ortiz, B., Candelas, L., **2017**. Insight into the molecular events that regulate heat- induce chilling tolerance in citrus fruits. *Front. Plant Sci.*, 8: 1113: 1-14.

Lara, M.V., Borsani, J., Budde, C., Lauxmann, M. A., Lombardo, V. A., Murray, R., Andreo, C. S., Drincovich, M. F., **2009**. Biochemical and proteomic analysis of ‘Dixiland’ peach fruit (*Prunus persica*) upon heat treatment. *Journal of Experimental Botany* 60, 4315–4333

Larance M. y Lamond, A., **2017**. Multidimensional proteomics for cell biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16:269-280.

Lee, S. C. y Park, M., **2010**. Modulation of reactive oxygen species by salicylic acid in *Arabidopsis* seed germination under high salinity. *Plant Signal Behav.* 5 (12), p. 345-357.

Lei, Z., Huhman, D. V., and Sumner, L. W., **2011**. Mass spectrometry strategies in metabolomics. *J. Biol. Chem.* 286, 25435–25442.

Leon, J., Rojo, E., Sanchez-Serrano, J.J., **2001**. Wound signalling in plants. *J. Exp. Bot.* 52, 1–9.

Li, X., Pang, W., Piao, Z., **2017**. Omics Meets Phytonutrients in Vegetable Brassicas: For Nutritional Quality Breeding. *J. Hort. Plant* 3 (6): 247-254.

Li, Z., Yu, J., Peng, Y., Huang, B., **2017**. Metabolic pathways regulated by abscisic acid, salicylic acid and γ -aminobutyric acid in association with improved drought tolerance in creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera*). *Physiol. Plant.* 159, 42-58.

Lin, Q., Qian, J., Zhao, C., Wang, D., Liu, C., Wang, Z., Sun, C., Chen, K., **2016**. Low Temperature Induced Changes in Citrate Metabolism in Ponkan (*Citrus reticulata* Blanco cv. Ponkan) Fruit during Maturation. *PLoS ONE* 11, e0156703.

Link, A.J., Eng, J., Schieltz, D.M., Carmack, E., Mize, G.J., Morris, D.R., Garvik, B.M., Yates, J.R., **1999**. Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nat Biotechnol* 17: 676–682

Lipton, D.S., Blanchar, R.W., Blevins, D.G., **1987**. Citrate, malate, and succinate concentration in exudates from P-sufficient and P-stressed *Medicago sativa* L. seedlings. *Plant. Physiol.* 85, 315-317.

Liu, J., Wang, W., Wu, H., Gong, X., Moriguchi, T., **2015**. Polyamines function in stress tolerance: from synthesis to regulation. *Front. Plant Sci.* 6: p. 827

Liu, Q., Xu, J., Liu, Y., Zhao, X., Deng, X., Guo, L. y col., **2007**. A novel bud mutation that confers abnormal patterns of lycopene accumulation in sweet orange fruit (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *J. Exp. Bot.* 58, 4161–4171.

Liu, Y.S., Gur, G., Ronen, M. Causse, R., Damidaux, M. Buret, J. Hirschberg, D. Zamir., **2003**. There is more to tomato fruit colour than candidate carotenoid genes. *Plant Biotechnol. J.* 1:195–207.

Lobit, P., Genard, M., Soing, P., Habib, R., **2006**. Modelling malic acid accumulation in fruits: relationships with organic acids, potassium, and temperature. *J. Exp. Bot.* 57, 1471-23 1483.

Loenarz, C. y Schofield, C. J., **2008**. Expanding chemical biology of 2-oxoglutarate oxygenases. *Nat. Chem. Biol.* 4, 152–156.

Lommen, A., van der Kamp, H. J., Kools, H. J., van der Lee, M. K., van der Weg, G., and Mol, H. G., **2012**. metAlignID: a high-throughput software tool set for automated detection of trace level contaminants in comprehensive LECO two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry data. *J. Chromatogr. A* 1263, 169–178.

Lowell, C.A., Tomlinson, P.T., Koch, K.E., **1989**. Sucrose-metabolizing enzymes in transport tissues and adjacent sink structure in developing citrus fruit. *Plant Physiol.* 90: 1394-1402.

Lucas, K.A., Filley, J.R., Erb, J.M., Graybill, E.R., Hawes, J.W., **2007**. Peroxisomal Metabolism of Propionic Acid and Isobutyric Acid in Plants. *J. Biol. Chem.* 282, 24980-24989.

Lurie, S., Laamin, M., Lapsker, Z., Fallik, E., **1997**. Heat treatment to decrease chilling injury in tomato fruit. Effects on lipids, pericarp lesions and fungal growth. *Physiologia Plantarum*, 100(2): p. 297-302.

Ma, P., Zhang, Z., Zhou, X., Yun, Y., Liang, Y., and Lu, H., **2016**. Feature extraction from resolution perspective for gas chromatography-mass spectrometry datasets. *RSC Adv.* 6, 113997–114004.

Macarasin, D., Droby, S., Bauchan, G., and Wisniewski, M., **2010**. Superoxide anion and hydrogen peroxide in the yeast antagonist-fruit interaction: a new role for reactive oxygen species in postharvest biocontrol? *Postharvest Biol. Technol.* 58, 194–202.

Maleck, K., Dietrich, R.A., **1999**. Defense on multiple fronts: how do plants cope with diverse enemies? *Trends Plant Sci.* 4, 215–219.

Marsh, K., González, P., Echeverría, E., **2000**. PPI formation by reversal of the tonoplast-bound H⁺-pyrophosphatase from "Valencia" orange juice cells. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 125: 420-424.

Matsuda, F., Hirai, M. Y., Sasaki, E., Akiyama, K., Yonekura-Sakakibara, K., Provart, N. J. y col., **2010**. AtMetExpress development: a phytochemical atlas of Arabidopsis development. *Plant Physiol.* 152, 566–578.

Meena, M., Prasad, V., Zehra, A., Gupta, V. K. and Upadhyay, R. S., **2015**. Mannitol metabolism during pathogenic fungal–host interactions under stressed conditions. *Frontiers Microbiol.* 6.

Mehdy, M., **1994**. Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiol.* 105: 467-472.

Mehdy, M.C., Sharma, Y.K., Sathasivan, K., Bays, N.W., **1996**. The role of activated oxygen species in plant disease resistance. *Physiol. Plant.* 98, 365–374

Misra, B. B. y van der Hooft, J. J. **2016**. Updates in metabolomics tools and resources: 2014–2015. *Electrophoresis* 37, 86–110.

Mittler, R. y Zilinskas, B.A., **1993**. Detection of ascorbate peroxidase activity in native gels by inhibition of ascorbate-dependent reduction of nitroblue tetrazolium. *Anal. Biochem.* 212: 540-546.

Mittler, R., **2002**. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7: 405-410.

Miyashita, Y., Dolferus, R., Ismond, K.P., Good, A.G., **2007**. Alanine aminotransferase catalyses the breakdown of alanine after hypoxia in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 49, 1108–1121.

Mohnen, D. **2008**. Pectin structure and biosynthesis. *Curr. Opin Plant. Biol.* 11:266–277.

Moorhead, G.B.G., Hodgson, R.J., Plaxton, W.C., **1994**. Copurification of cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase and cytosolic aldolase from endosperm of germinating castor oil. *Arch. Biochem. Biophys.* 312, 326-335.

Morteza S.A y Samad, B., **2014**. Postharvest heat treatment for mitigation of chilling injury in fruits and vegetables. *Food Bio. Technol.* 7: 37-53.

Moshonas, M.G. and Shaw, P.E., **1997**. Quantification of volatile constituents in mandarin juices and its use for comparison with orange juices by multivariate analysis. *J. Agric. Food Chem.* 45:3968–3972.

Muench, D.G., Christopher, M.E., Good, A.G., **1998**. Cloning and expression of a hypoxic and nitrogen inducible maize alanine aminotransferase gene. *Physiol. Plant.* 103, 503-512.

Murata, N., Los, D.A., **1997**. Membrane Fluidity and Temperature Perception. *PlantPhysiol.* 115, 875.

Nagano, M., Hachiya, A., Ashihara, H., **1994**. Phosphate starvation and a glycolytic bypass catalyzed by phosphoenolpyruvate carboxylase in suspension cultured *Catharanthus roseus* cells. *Z. Naturforsch.* 49, 742–750.

Nielsen, T.H., Skjærbæ, H.C., Karlsen, P., **1991**. Carbohydrate metabolism during fruit development in sweet pepper (*Capsicum annuum*) plants. *Physiol. Plant.* 82, 311-319.

Noctor, G. y Foyer, C., **1998**. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 249-279.

Obenland, D., Collin, S., Mackey, B., Sivevert, J., Arpaia, M.L., **2011**. Storage temperature and time influences sensory quality of mandarins by altering soluble solids, acidity and aroma volatile composition. *Postharv. Biol. and Technol.* 59: 187-193.

Ortuño, A., Báidez, A., Gómez, P., Arcas, M., Porras, I., García-Lidón, A., Del Río, J., **2006**. Citrus paradisi and Citrus sinensis flavonoids: Their influence in the defence mechanism against Penicillium digitatum. Food Chem. 98, 351-358.

Ortuño, A., Díaz, L., Alvarez, N., Porras, I., García-Lidón, A., Del Río, J., **2011**. Comparative study of flavonoid and scoparone accumulation in different Citrus species and their susceptibility to Penicillium digitatum. Food Chem. 125, 232-239.

Padh, H., **1992**. Organelle isolation and marker enzyme assay Tested studies for laboratory teaching 13, 129–146.

Palau L., Smilanick J.L. y Droby, S., **2008**. Alternatives to conventional fungicides for the control of citrus postharvest green and blue moulds. Stewart Postharv. Review 2:2.

Pan, Z., Li, Y., Deng, X., and Xiao, S. **2014**. Non-targeted metabolomic analysis of orange (Citrus sinensis [L.] Osbeck) wild type and bud mutant fruits by direct analysis in real-time and HPLC-electrospray mass spectrometry. Metabolomics 10, 508–523.

Parry, M. A. y Hawkesford, M. J., **2012**. An integrated approach to crop genetic improvement. J. Integr. Plant Biol. 54, 250–259.

Patel, T. K. y Williamson, J. D., **2016**. Mannitol in plants, fungi, and plant–fungal interactions. Trends Plant Sci, 21, 486-497.

Pedreschi, R. y Lurie, S., **2015**. Advances and current challenge in understanding postharvest abiotic stress in perishables. Postharvest Biol. Technol. 107, 77-89.

Pegasus, H. T. **2007**. ChromaTOF Software Instruction Manual, Version 3.3. Available at: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000133&pid=S0100-4042201100060000900032&lng=en

Pego, J.V., Kortstee, A.J., Huijser, C., Smeekens, S.C.M., **2000**. Photosynthesis, sugars and the regulation of gene expression. J. Exp. Bot. 51, 407-416.

Perez, AG., Luaces, P., Oliva, J., Rios, JJ., Sanz, C., **2005**. Changes in vitamin C and flavour components of mandarin juice due to curing of fruits. Food Chem. 91:19–24.

Perotti, V.E., Del Vecchio, H., Sansevich, A., Meier, G. E., Bello, F., Cocco, M., Podesta, F. E., **2011**. Proteomic, Metabolomic, and Biochemical Analysis of Heat treated Valencia oranges during storage. Postharv Biol Technol. 62, 97-114.

Perotti, V.E., Moreno, A.S., Trípodí, K.E.J., Del Vecchio, H.A., Meier, G., Bello, F., Cocco, M., Vázquez, D.E., Podestá, F.E., **2015**. Biochemical characterization of

the flavado of heat- treated Valencia orange during postharvest cold storage. *Postharv. Biol. Technol.* 99, 80-87.

Piattoni, C., Guerrero, S., Iglesias, A., **2013**. A differential redox regulation of the pathways metabolizing glyceraldehyde-3-phosphate tunes the production of reducing power in the cytosol of plant cells *Int. J. Molec. Sci.* 14, 8073-8092.

Picotti, P., Clément-Ziza, M., Lam, H., Campbell, D.S., Schmidt, A., E.W. Deutsch, E.W., y col., **2013**. A complete mass-spectrometric map of the yeast proteome applied to quantitative trait analysis. *Nat.* 494: 266-270.

Pitarch, A., Sánchez, M., Nombella, C., Gil, C., **2003**. Analysis of the *Candida albicans* proteome. I. Strategies and applications. *J. Chromatogr. B* 787: 101-128

Plaxton, W.C. y Podestá, F.E., **2006**. The functional organization and control of plant respiration. *Crit. Rev. Plant Sci.* 25: 159-198.

Podestá, F.E. y Plaxton, W.C., **1994b**. Regulation of cytosolic carbon metabolism in germinating *Ricinus communis* cotyledons. II. Properties of phosphoenolpyruvate carboxylase and cytosolic pyruvate kinase associated with the regulation of glycolysis and nitrogen assimilation. *Planta* 194, 381-387.

Polenta, G. A., Calvete, J. J., Gonzalez, C. B., **2007**. Isolation and characterization of the main small heat shock proteins induced in tomato pericarp by thermal treatment. *FEBS Journal*, 274, 6447– 6455.

Porat, R., Vinokur, V., Holland, D., McCollum, T.G., Droby, S., **2001**. Isolation of citrus chitinase cDNA and characterization of its expression in response to elicitation of fruit pathogen resistance. *J. Plant Physiol.* 158: 1585-1590.

Pressey, R. **1983**. β -Galactosidases in ripening tomatoes. *Plant Physiol.* 71

Prusky, D. y Lichter, A., **2007**. Mechanisms modulating fungal attack in postharvest pathogen interactions and their control. *Eur. J. Plant Pathol.* 121: 281-289.

Qiao, Y., Xie, B.J., Zhang, Y., Zhou, H.Y., Pan, S.Y., **2007**. Study on aroma components in fruit from three different Satsuma mandarin varieties. *Agric. Sci. China* 6:1487–1493.

Ragone, M.L. **1996**. Daños por heladas. En: Manual para productores de naranja y mandarina de la región del río Uruguay. Editado por S- INTA, pp. 238.

Rao, M.V., Paliyath, G., Osmrod, D.P., **1996**. UV-B and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 110: 125-136.

Rawlings, N.D., Waller, M., Barrett, A.J., Bateman, A., **2014**. *Merops*: The database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res*, 42:D503–D509.

Reymond, P., Weber, H., Damond, M., Farmer, E.E., **2000**. Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12, 707–719.

Ridley, B.L., O'Neill, M.A., Mohnen, D., **2001**. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochem.* 57: 929–967

Roe, B., Davis, P.L., Bruemmer, J.H., **1984**. Pyruvate metabolism during maturation of Hamlin oranges. *Phytochemistry*. 23: 713-717.

Roongruangsri, W., Rattanapanone, N., Leksawasdi, N., Boonyakiat, D., **2012** Changes in Organic Acid Contents and Related Metabolic Enzyme Activities at Different Stages of Growth of Two Tangerine Cultivars. *J. Agricul. Sci.* 4 (12): 276-284.

Ros, R., Muñoz-Bertomeu, J., & Krueger, S., **2014**. Serine in plants: biosynthesis, metabolism, and functions. *Trends in Plant Science*, 19(9), 564-569

Ross, A.A., 1949. The origin of the Ellendale mandarin and its relatives. *Qld. Agric. J*, 69: p. 222–224.

Rudell, D., **2010**. Standardizing postharvest quality and biochemical phenotyping for precise population comparison. *HortScience* 45, 1307–1309.

Sala, M.J., **1998**. Involvement of oxidative stress in chilling injury in cold-stored mandarin fruits. *Postharv. Biol. Technol.* 13, 255-261.

Sala, M.J. y Lafuente, M.T., **1999**. Catalase in the heat-induced chilling tolerance of cold-stored hybrid Fortune mandarin fruits. *J. Agric. Food Chem.* 47: 2410-2414.

Sala, J.M. y Lafuente, M.T., **2000**. Catalase enzyme activity is related to tolerance of mandarin fruits to chilling. *Postharv. Biol. Technol.* 20, 81–89.

Sala, J.M. y Lafuente, M.T., **2004**. Antioxidant enzymes activities and rindstainin in 'Navelina' oranges as affected by storage relative humidity and ethylene conditioning. *Postharv. Biol. Technol.* 31, 277–285.

Saliba-Colombani, V., M. Causse, D. Langlois, J. Philouze, M. Buret. **2001**. Genetic analysis of organoleptic quality in fresh market tomato. 1. Mapping QTLs for physical and chemical traits. *Theor.Appl. Genet.* 102 :259–272.

Sanchez, M., Luch, Y., Gosalbes, M., Zacarías, L., Granell, A., Lafuente, M.T., **2003**. A survey of genes differentially expressed during long-term heat induced chilling tolerance in citrus fruit. *Planta* 218: 65-70.

Sansevich, A., **2013**. Metabolismo de hidratos de carbon en cítricos. Características de las enzimas involucradas. Tesis de posgrado: Doctorado en Ciencias biológicas. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario, Argentina, pp: 1-185.

Sangwan, R.S y Singh, R., **1989**. Characterization of cytosolic phosphoglucoisomerase from immature wheat (*Triticum aestivum* L.) endosperm. *J. Biosci.* 14, 47-54.

Sarvajeet S.G. y Narendra, T., **2010**. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. and Biochem.* 48 909-930.

Sarvajeet, S. G., Anjum, N.A., Ritu, G., Sandeep, Y., Mirza, H., Masayuki, F., Panchanand, M., Surendra, C.S., Narendra, T., **2015**. Superoxide dismutase—mentor of abiotic stress tolerance in crop plants. *Environ Sci Pollut Res.* 1-20.

Sasaki-Sekimoto, Y., Taki, N., Obayashi, T., Aono, M., Matsumoto, F., Sakurai, N., Suzuki, H., Hirai, M.Y., Noji, M., Saito, K., Masuda, T., Takamiya, K., Shibata, D., Ohta, H., **2005**. Coordinated activation of metabolic pathways for antioxidants and defence compounds by jasmonates and their roles in stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant J* 44:653–668

Scandalios, J.G., **1992**. Regulation of the antioxidant defense genes *cat* and *sod* of maize. En: *Molecular biology of free radical scavenging systems* (Scandalios, J.G., ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, pp. 117-152.

Scandalios, J.G., **1993**. Oxygen stress and superoxide dismutase. *Plant Physiol.* 101: 7-12.

Schillmiller, A.L., Howe, G.A., **2005**. Systemic signaling in the wound response. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8, 369–377

Schirra, M. y Cohen, E., **1999**. Long-term storage of 'Olinda' oranges under chilling and intermittent warming temperatures. *Postharvest Biology and Technology*, 1, 63-69.

Schirra M., D.h.G., Ben-Yehoshua S., Fallik E., **2000**. Host-pathogen interactions modulated by heat treatment. *Postharv. Biol. and Technol.* 21, 71-85.

Schwender, J., Ohlrogge, J., Shachar-Hill, Y., **2004**. Understanding flux in plant metabolic networks. *Curr. Op. Plant Biol.* 7, 309-317.

Shelp, B.J., Bozzo, G.G., Trobacher, C.P., Zarei, A., Deyman, K.L., Brikis, C.J., **2012**. Hypothesis/review: contribution of putrescine to 4-aminobutyrate (GABA) production in response to abiotic stress. *Plant Sci.* 193: p. 130-135.

Schubert, O.T., Mouritsen, J., Ludwig, C., R€ost, H.L., Rosenberger, G., Arthur, P.K., y col., **2013**. The Mtb proteome library: a resource of assays to quantify the complete proteome of *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell Host Micro.* 13 :602-612.

Sinha, A.K.H., R€omer, M.G., K€ockenberger, U., Lothar, W.E., Roitsch, T., **2002**. Metabolizable and non-metabolizable sugars activate different signal transduction pathways in Tomato. *Plant Physiol.* 128(4): p. 1480-1489.

Slisz, A. M., Breksa, A. P., Mishchuk, D. O., McCollum, G. y Slupsky, C. M. **2012**. Metabolomic analysis of citrus infection by “*Candidatus Liberibacter*” reveals insight into pathogenicity. *J. Proteome Res.* 11, 4223–4230.

Snedden, W.A. y Fromm, H. **1999**. Regulation of the γ -aminobutyrate synthesizing enzyme, glutamate decarboxylase, by calcium–calmodulin: a mechanism for rapid activation in response to stress. In *Plant Responses to Environmental Stresses: From Phytohormones to Genome Reorganization* (Lerner, H.R., ed.), pp. 549–574.

Stone, S., **2014**. Role of ubiquitin and the 26S proteasome in plant abiotic stress signaling. *Front. Sci. Plant.* 5, 1-10.

Stoop, J.M.H., Williamson, J.D., Mason Pharr, D., 1996. Mannitol metabolism in plants: a method for coping with stress. *Trends Plant Sci.* 1, 139-144.

Sun, J., Loboda, T., Sung, S., Black, C., **1992**. Sucrose Synthase in Wild Tomato, *Lycopersicon chmielewskii*, and Tomato Fruit Sink Strength. *Plant Physiol.* 98, 1163-1169.

Sung, M. K., Porras-Yakushi, T. R., Reitsma, J. M., Huber, F. M., Sweredoski, M. J., Hoelz, A., y col., **2016a**. A conserved quality-control pathway that mediates degradation of unassembled ribosomal proteins. *Elife* 5:e19105

Sung, M. K., Reitsma, J. M., Sweredoski, M. J., Hess, S., Deshaies, R. J., **2016b**. Ribosomal proteins produced in excess are degraded by the ubiquitin-proteasome system. *Mol. Biol. Cell* 27, 2642–2652.

Tadmor, Y., Fridman, E., Gur, A., Larkov, O., Lastochkin, E., Ravid, U., Zamir, D., Lewinsohn, E., **2002**. Identification of malodorous, a wild species allele affecting tomato aroma that was selected against during domestication. *J. Agr. Food Chem.* 50:2005–2009.

Taki, N., Sasaki-Sekimoto, Y., Obayashi, T., Kikuta, A., Kobayashi, K., Aina, T., Yagi, K., Sakurai, N., Suzuki, H., Masuda, T., Takamiya, K., Shibata, D., Kobayashi, Y., Ohta, H. **2005**. 12-oxo-phytodienoic acid triggers expression of a distinct set of genes and plays a role in wound-induced gene expression in Arabidopsis. *Plant Physiol* 139:1268–1283

Tao, Y., Xie, Z., Chen, W., Glazebrook, J., Chang, H.S., Han, B., Zhu, T., Zou, G., Katagiri, F., **2003**. Quantitative nature of Arabidopsis responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell* 15, 317–330.

Tarhonskaya, H., Szöllösi, A., Leung, I. K. H., Bush, J. T., Henry, L., Chowdhury, R. y col., **2014**. Studies on deacetoxycephalosporin C synthase support a consensus mechanism for 2-oxoglutarate dependent oxygenases. *Biochemistry* 53, 2483–2493.

Tarkowski, L.P. y Van den Ende, W., **2015**. Cold tolerance triggered by soluble sugars: a multifaceted countermeasure. *Front. Plant Sci.*, 6: p. 203.

Tian, S., Qin, G., Li, B., **2013**. Reactive oxygen species involved in regulating fruit senescence and fungal pathogenicity. *Plant Mol. Biol.* 82, 593–602.

Tian, T., Liu, Y., Yan, H., You, Q., Yi, X., Du, Z., Xu, W., Su, Z., **2017**. agriGO v2.0: a GO analysis toolkit for the agricultural community, 2017 update. *Nucleic Acids Research.* 45:122-129.

Tietel, Z., Bar, E., Lewinsohn, E., Feldmesser, E., Fallik, E., Porat, R., **2010**. Effects of wax coatings and postharvest storage on sensory quality and aroma volatiles composition of 'Mor' mandarins. *J. Sci. Food Agric.* 90:995–1007.

Tietel, Z., Feldmesser, E., Lewinsohn, E., Fallik, E., Porat, R., **2011a**. Changes in the transcriptome of 'Mor' mandarin flesh during storage: emphasis on molecular regulation of fruit flavor deterioration. *J. Agric. Food Chem.* 59, 3819–3827.

Tietel, Z., Plotto, A., Fallik, E., Lewinsohn, E., Porat, R., **2011b**. Taste and aroma of fresh and stored mandarins. *J Sci Food Agric* 91:14–23.

Timperio, A. M., Egidi, M. G., & Zolla, L. **2008**. Proteomics applied on plant abiotic stresses: role of heat shock proteins (HSP). *Journal of Proteomics*, 71, 391–411.

Ting, SV and Attaway, JA., **1971**. Citrus fruits, in *The Biochemistry of Fruits and Their Products*, vol. 2, ed. by Hulme AC. Academic Press, London, pp.107–171.

Tohge, T., y Fernie, A. R. **2009**. Web-based resources for mass spectrometrybased metabolomics: a user's guide. *Phytochemistry.* 70, 450–456.

Tomoyuki, T., Hiroyuki, S., Kazunori, O., Tetsuya, C., Shin-ichi, A., Nobuhiro, T., Mikio, M., Hideharu, S., · Hideaki, N., Hisakazu, Y., **2008**. Identification of the *OsOPR7* gene encoding 12-oxophytodienoate reductase involved in the biosynthesis of jasmonic acid in rice. *Planta*. 227:517–526.

Tonutti, P. y Bonghi, C., **2014**. Innovative and Integrated Approaches to Investigating Postharvest Stress Physiology and the Biological Basis of Fruit Quality During Storage. *Postharv. Hand. Cap.* 19: 519-541.

Torres, R., Teixidó, N., Usall, J., Abadisa, M., Mira, N., Larrigaudiere, C., Viñas, I., **2011**. Anti-oxidant activity of oranges after infection with the pathogen *Penicillium digitatum* or treatment with the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2. *Biol. Control*. 57: 103-109.

Torres, R., Valentines, M.C., Usall, J., Viñas, I., Larrigaudiere, C., **2003**. Possible involvement of hydrogen peroxide in the development of resistance mechanisms in ‘Golden Delicious’ apple fruit. *Postharv. Biol. Technol.* 27, 235–242.

Tovar-Mendez, A., Matamoros, M. A., Bustos-Sanmamed, P., Dietz, K. J., Cejudo, F. J., Rouhier, N. y col., **2011**. Peroxiredoxins and NADPH-dependent thioredoxin systems in the model legume *Lotus japonicus*. *Plant Physiol.* 156, 1535–1547.

Turner, J.G., Ellis, C., Devoto, A., **2002**. The jasmonate signal pathway. *Plant Cell* 14 Suppl: S153–S164

Turner, M. F., Heuberger, A. L., Kirkwood, J. S., Collins, C. C., Wolfrum, E. J., Broeckling, C. D., y col., **2016**. Non-targeted metabolomics in diverse Sorghum breeding lines indicates primary and secondary metabolite profiles are associated with plant biomass accumulation and photosynthesis. *Front. Plant Sci.* 7:953.

Tyanova, S., Temu, T., Sinitcyn, P., Carlson, A., Hein, M.Y., Geiger, T., Mann, M., Cox, J., **2016**. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote) omics data. *Nat Methods*. 13(9):731-40.

Vadivel, A. K. **2015**. Gel-based proteomics in plants: time to move on from the tradition. *Front. Plant Sci.* 6:369

van Dam, N. M. y Bouwmeester, H. J. **2016**. Metabolomics in the rhizosphere: tapping into belowground chemical communication. *Trends Plant Sci.* 21, 256–265.

Van der Hoorn R.A.L., **2008**. Plant proteases: From phenotypes to molecular mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 191–223

Vargas, W.A., Pontis, H.G., Salerno, G.L. **2007**. Differential expression of alkaline and neutral invertases in response to environmental stresses: characterization of an alkaline isoform as a stress-response enzyme in wheat leaves. *Planta* 226, 1535–1545.

Vidal, M., Cusick, M. E. y Barabasi, A. L. **2011**. Interactome networks and human disease. *Cell* 144, 986–998

Vidova, V. Zdenek Spacil, Z., **2017**. A review on mass spectrometry-based quantitative proteomics: Targeted and data independent acquisition. *Anal. Chim. Acta* 964: 7-23

Vilanova, L., Torres, R., Viñas, I., González-Candela, L., Usall, J., Fiori, S., Solsona, C., Teixidó, N., **2013**. Wound response in orange as a resistance mechanism against *Penicillium digitatum* (pathogen) and *P. expansum* (non-host pathogen). *Posharv. Biol. Technol.* 78: 133-122.

Villani, A., Satija, R., Reynolds, G., Sarkizova, S., Shekhar, K., Fletcher, J., Griesbeck, M., Andrew Butler, Zheng, S., Lazo, S., Jardine, L., Dixon, D., Stephenson, E. y col., **2017**. Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. *Sci.* 356, 283. 1-12.

Walker, R.P. y Leegood, R.C., 1995. Purification, and phosphorylation in vivo and in vitro, of phosphoenolpyruvate carboxykinase from cucumber cotyledons. *FEBS Letters* 362: 70-74.

Wang, W.X., Vinocur, B., Shoseyov, O., Altman, A., **2004**. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends Plant Sci.* 9: 244-252.

Washburn, M.P., Wolters, D., Yates, J.R., **2001**. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat Biotechnol* 19: 242–247.

Webber, H., Reuther, W., Lawton, H., **1989**. CHAPTER 1- History and Development of Citrus Industry. En: *The Citrus Industry-Revised Edition*; Editor: W. Reuther; University of California, Division of Agricultural Sciences, disponible online: <http://website.lib.ucr.edu/agric/webber/Vol1/Vol1TOC.html>.

Westermann, A.J., Barquist, L., Vogel, J., **2017**. Resolving host–pathogen interactions by dual RNA-seq. *Plos. Pathog.* Doi: 10.1371/journal.ppat.1006033.

Whiteside, J.O., Garnsey, S.M., Trimmer, L.W., **1988**. Compendium of citrus diseases. American Phytopathological Society Press, MN, USA.

Wilson, C.L.W., M.E., **1989**. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: An emerging technology. *Annu. Rev. Phytopatol.* 27, 425-441.

Wojtasze, P., 1997. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem. J.* 322: 681-692.

Wolters, D.A., Washburn, M.P., Yates, J.R., **2001**. An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics. *Anal Chem* 73: 5683–5690

Woodbury, W., Spencer, A.K., Stahmann, M.A., **1971**. An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes. *Analytical Biochemistry* 443: 301–305.

Wu, L. y. Birch, R.G., **2011**. Isomaltulose is actively metabolized in plant cells. *Plant Physiol.* 157(4): p. 2094-2101.

Wuolikainen, A., Jonsson, P., Ahnlund, M., Antti, H., Marklund, S. L., Moritz, T. y col., **2016**. Multi-platform mass spectrometry analysis of the CSF and plasma metabolomes of rigorously matched amyotrophic lateral sclerosis, Parkinson's disease and control subjects. *Mol. BioSyst.* 12, 1287–1298.

Yamaki, Y., 1990. Seasonal changes in the organic acids in juice of citrus fruits. *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.* 58: 895-898.

Yanga, Z., Wangb, T., Wang, H., Huang, X., Qina, Y., Hua, G., **2013**. Patterns of enzyme activities and gene expressions in sucrose metabolism in relation to sugar accumulation and composition in the aril of *Litchi chinensis* Sonn. *Plant Physiol.* 170, 731-740.

Yi, X., Du, Z., Su, Z., **2013**. PlantGSEA: a gene set enrichment analysis toolkit for plant community. *Nucleic Acids Research.* 41:98-103.

Yonekura-Sakakibara, K., Tohge, T., Niida, R., y Saito, K., **2007**. Identification of a flavonol 7-O-rhamnosyltransferase gene determining flavonoid pattern in *Arabidopsis* by transcriptome coexpression analysis and reverse genetics. *J. Biol. Chem.* 282, 14932–14941.

Yu, Q., y col., **2015**. Proteomic and metabolomic analyses provide insight into production of volatile and non-volatile flavor components in mandarin hybrid fruit. *BMC Plant Biol.* 15(1): p. 1-16.

Yun, Z., Gao, H., Liu, P., Liu, S., Luo, T., Jin, S., y col. **2013**. Comparative proteomic and metabolomic profiling of citrus fruit with enhancement of disease resistance by post-harvest heat treatment. *BMC Plant Biol.* 13:44.

Zanor, M.I., Rambla, J.L, Chaib, J., Steppa, A., Medina, A., Granell, Fernie, A.R., Causse, M., **2009**. Metabolic characterization of loci affecting sensory attributes in tomato allows an assessment of the influence of the levels of primary metabolites and volatile organic contents. *J. Expt. Bot.* 60:2139–2154.

Zhang, C.F., Tian, S.P., **2009**. Crucial contribution of membrane lipids' unsaturation to acquisition of chilling-tolerance in peach fruit stored at 0°C. *Food Chem.* 115, 405-411.

Zhang, W., Chang, J., Lei, Z., Huhman, D., Sumner, L. W., Zhao, P. X., y col. **2014**. MET-COFEA: a liquid chromatography/mass spectrometry data processing platform for metabolite compound feature extraction and annotation. *Anal. Chem.* 86, 6245–6253.

Zhang, W., Lei, Z., Huhman, D., Sumner, L. W., and Zhao, P. X., **2015**. MET-XAlign: a metabolite cross-alignment tool for LC/MS-based comparative metabolomics. *Anal. Chem.* 87, 9114–9119.

Zhang, Y, Fonslow, B.R., Shan, B., Baek, M., Yates, J.R., **2013**. Protein Analysis by Shotgun/Bottom-up Proteomics. *Chem Rev.* 2013. 113(4): 2343–2394.