

**Departament de Medicina Preventiva i Salut Pública, Ciències
de l'Alimentació, Toxicologia i Medicina Legal**

MEMORIA

Trabajo de fin de máster

Título: “*Relación entre los carotenoides y la susceptibilidad a los daños por frío durante la conservación postcosecha de frutos cítricos*”

Máster Universitario en Calidad y Seguridad Alimentaria

8ª Edición · 2016-2017

Dña. Florencia Amelia Rey Robaina

Tutores: Dr. Lorenzo Zacarías García

Dra. M^a Jesús Rodrigo Esteve

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero expresar mi gratitud a mis padres, familia y amigos por acompañarme a la distancia en estos dos años, y por el cariño que me transmitieron.

A M^a Carmen, Inma, Jaime y Francisco les agradezco la ayuda durante la realización de este trabajo y, por sobre todo, la amistad y el compañerismo. A Joanna Lado por sus consejos y motivación, y por establecer el contacto con el grupo de investigación donde realicé el trabajo.

De manera muy especial, quiero agradecer a mis tutores, Lorenzo y M^a Jesús por el apoyo, los aportes, las sugerencias y la oportunidad de continuar mi formación en su grupo de trabajo. El conocimiento y el rigor académico que caracterizan su labor me permitieron ampliar mi formación y desarrollar esta investigación con solvencia.

También quiero dar gracias al Dr. Pablo Aleza del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA, Moncada) por darnos acceso a las colecciones de híbridos y proporcionar el material necesario para este trabajo. Así mismo agradecer al Banco de Germoplasma de Cítricos (IVIA, Moncada) y al Dr. José Luis Navarro (parcela comercial, Liria) la utilización de sus instalaciones para llevar a cabo algunos de los experimentos.

Por último, agradezco a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII, Uruguay) por la concesión de una beca para posgrados en el exterior, que me permitió realizar el Máster en Calidad y Seguridad Alimentaria (Universitat de València) y la estancia en el Instituto de Agroquímica y tecnología de Alimentos (IATA-CSIC).

Este trabajo ha sido realizado en el marco de los proyectos de investigación AGL-2015-70218 y AGL-2012-34573 (Ministerio Economía, Industria y Competitividad, España) y PROMETEO 2014/0027 (Generalitat Valenciana).

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1. Daño por frío durante el almacenamiento postcosecha de frutos.....	5
1.1.1. Factores que influyen en el daño por frío	6
1.1.2. Respuesta al daño por frío	7
1.2. Coloración de los frutos cítricos	9
1.2.1. Factores que afectan el contenido y composición de carotenoides	12
1.3. Relación entre el daño por frío y carotenoides en frutos	13
2. OBJETIVOS	15
2.1. Objetivo general.....	15
2.2. Objetivos específicos	15
3. METODOLOGÍA	17
3.1. Material vegetal y condiciones de conservación	17
3.2. Determinación del índice de color	18
3.3. Determinación del índice de maduración	18
3.4. Estimación del daño por frío	18
3.5. Determinación de la producción de etileno	19
3.6. Extracción y cuantificación de carotenoides.....	19
4. RESULTADOS	23
4.1. Conservación de frutos de los híbridos Nulpink a bajas temperaturas	23
4.1.1. Índice de madurez e índice de color	23
4.1.2. Evaluación del daño por frío	24
4.1.3. Producción de etileno.....	26
4.1.4. Contenido y composición de carotenoides	27
4.2. Conservación de frutos de los híbridos de Murcott x Kiyomi a bajas temperaturas.....	30
4.2.1. Índice de madurez e índice de color	30
4.2.2. Evaluación del daño por frío	31
4.2.3. Evaluación de la producción de etileno	32
4.2.4. Contenido y composición de carotenoides	33
4.3. Conservación de frutos de las variedades comerciales de mandarina Clementina de Nules, Fortune y Nadorcott a bajas temperaturas.....	36
4.3.1. Índice de madurez e índice de color	36
4.3.2. Evaluación del daño por frío	37

4.3.3. Evaluación de la producción de etileno	39
4.3.4. Contenido y composición de carotenoides	40
5. DISCUSIÓN.....	45
6. CONCLUSIONES	55
7. BIBLIOGRAFÍA.....	57
8. RESÚMENES BIBLIOGRÁFICOS	63
9. ANEXOS	67
9.1. Anexo 1: Características espectroscópicas de los carotenoides identificados.	67
9.2. Anexo 2: Ejemplo cromatograma (MaxPlot) y espectros de los principales carotenoides identificados.	68
9.3. Anexo 3: Distribución de los carotenoides.	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Gradiente de elución utilizado para la separación de carotenoides mediante HPLC.....	21
Tabla 2. Límites de detección (ng) y ecuaciones de las rectas de calibrado obtenidas para la cuantificación de distintos carotenoides.	22
Tabla 3. Acidez (%), Sólidos solubles (° Brix) e índice de madurez (S.S. / Acidez) en frutos de Nulpink N78 y N26 en el momento de cosecha (27 de enero).....	23
Tabla 4. Contenido ($\mu\text{g g}^{-1}$ PF) y composición de los principales carotenoides en frutos Nulpink N78 y N26, en el momento de la recolección, y después de 1 y 5 semanas de conservación a 2 °C.....	29
Tabla 5. Acidez (%), sólidos solubles (° Brix) e índice de madurez (S.S. / Acidez) en frutos de Murcott x Kiyomi al momento de cosecha (27 de enero).....	30
Tabla 6. Contenido ($\mu\text{g g}^{-1}$ PF) y composición de los principales carotenoides en frutos de MxK35 y MxK61, en el momento de la recolección, y a las 3 y 8 semanas de conservación a 2 °C.....	35
Tabla 7. Acidez (%), Sólidos solubles (° Brix) e índice de madurez (S.S. / Acidez) en frutos de Clementina de Nules (CMN), Fortune (FORT) y Nadorcott (NAD) en el momento de cosecha (13 de enero en CMN y 10 de febrero en FORT y NAD).	36
Tabla 8. Contenido ($\mu\text{g g}^{-1}$ PF). y composición de los principales carotenoides en frutos de Clementina de Nules (CMN), Fortune (FORT) y Nadorcott (NAD), en el momento de la recolección y a las 8 semanas de conservación a 2 °C.	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ejemplos de síntomas de daño por frío en frutos de la mandarina Fortune (A), Clementina de Nules (B) y naranja Navelate (C) durante la conservación postcosecha a 1-2 °C.....	6
Figura 2. Estructura de algunos carotenos y xantofilas de relevancia en los frutos.	10
Figura 3. Esquema de la biosíntesis de carotenoides en la que se indican los carotenoides y las enzimas que catalizan las principales etapas de la ruta..	11
Figura 4. Aspecto externo de los frutos Nulpink N78 y N26 en el momento de recolección (0) (A); y evolución del índice de color (relación Hunter <i>a/b</i>) durante el periodo de conservación a 2 °C (B).	24
Figura 5. Evolución del índice de daño por frío (IDF) durante la conservación a 2 °C en los frutos Nulpink N78 y N26 (A); aspecto externo de los frutos en la recolección (0), a las 3 semanas y 5 semanas de conservación (B).	25
Figura 6. Síntomas de DF observados en los frutos Nulpink N78 (A) y N26 (B).	25
Figura 7. Distribución de los porcentajes de frutos Nulpink afectados por daños de frío (DF) durante la conservación a 2 °C. Los números de cada categoría son; 1: ligeros, 2: medios y 3: severos.	26
Figura 8. Producción de etileno de los frutos Nulpink N78 y N26 durante la conservación a 2 °C (A); y durante 48 horas posteriores a la transferencia a 20 °C después de 5 semanas a 2 °C (B).	27
Figura 9. Aspecto externo de los frutos de MxK35 y MxK61 en el momento de recolección (0) (A); y evolución del índice de color (relación Hunter <i>a/b</i>) durante el periodo de conservación a 2 °C (B).	30
Figura 10. Evolución del índice de daño por frío (IDF) durante la conservación a 2 °C en los frutos MxK35 y MxK61 (A); aspecto externo de los frutos en la recolección (0) y a las 3, 5 y 8 semanas de conservación a 2 °C (B).	31
Figura 11. Distribución de los porcentajes de frutos de Murcott x Kiyomi afectados por daños de frío (DF) durante la conservación a 2 °C. Los números de cada categoría son; 1: ligeros, 2: medios y 3: severos.	32
Figura 12. Producción de etileno de los frutos MxK35 y MxK61 durante la conservación a 2 °C (A) y durante 48 horas posteriores a la transferencia a 20 °C después de 8 semanas a 2 °C (B).	33

Figura 13. Aspecto externo de los frutos de las mandarinas Clementina de Nules (CMN), Fortune (FORT), Nadorcott (NAD) en el momento de recolección (0) (A); y evolución del índice de color (relación Hunter <i>a/b</i>) durante el periodo de conservación a 2 °C (B).....	37
Figura 14. Evolución del índice de daño por frío (IDF) durante la conservación a 2 °C en los frutos de Clementina de Nules (CMN), Fortune (FORT) y Nadorcott (NAD) (A); aspecto externo de los frutos en la recolección (0) y a las 3, 5 y 8 semanas de conservación (B).....	38
Figura 15. Distribución de los porcentajes de frutos de Clementina de Nules (CMN), Fortune (FORT) y Nadorcott (NAD) afectados por daños de frío (DF) durante la conservación a 2 °C. Los números de cada categoría son; 1: ligeros, 2: medios y 3: severos.....	39
Figura 16. Producción de etileno de los frutos de Clementina de Nules (CMN), Fortune (FORT) y Nadorcott (NAD) durante la conservación a 2 °C (A); durante 48 horas posteriores a la transferencia a 20 °C después de 8 semanas en CMN y NAD (B); y a las 3 (3s) y 8 (8s) semanas en FORT (C).	40
Figura 17. Distribución de los carotenoides individuales, como porcentaje del contenido total en el momento de la cosecha y tras la conservación a 2 °C en el flavedo de los híbridos Nulpink N26 y N78.....	69
Figura 18. Distribución de los carotenoides individuales, como porcentaje del contenido total en el momento de la cosecha y tras la conservación a 2 °C en el flavedo de los híbridos MxK35 y MxK61.	69
Figura 19. Distribución de los carotenoides individuales, como porcentaje del contenido total en el momento de la cosecha y tras la conservación a 2 °C en el flavedo de Clementina de Nules (CMN), Fortune (FORT) y Nadorcott (NAD).	70

LISTA DE ABREVIATURAS

ABA: ácido abscísico
ACC: 1-aminociclopropano-1-carboxílico
ACO: ACC-oxidasa
ACS: ACS-sintasa
APX: ascorbato peroxidasa
CAT: catalasa
CCD: carotenoid cleavage dioxygenase (dioxigenasa de corte de carotenoides)
CHX: caroteno hidroxilasas
CMN: Clementina de Nules
CT: carotenoides totales
DF: Daño por frío
FORT: Fortune
GGPP: geranylgeranyl difosfato
GR: glutatión reductasa
HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución
IDF: índice de daño por frío
IM: índice de maduración
IPP: isopentenil difosfato
LCY: licopeno ciclasa
1-MCP: 1-metilciclopropeno
MDA: malonil-dialdehído
MxK: Murcott x Kiyomi
N: Nulpink
NAD: Nadorcott
NSY: neoxantina sintasa
PDS: fitoeno desaturasa
PF: peso fresco
PSY: fitoeno sintasa
ROS: especies reactivas de oxígeno
SAM: S-Adenosil metionina
SOAC: capacidad de secuestro del oxígeno singlete
SOD: superóxido dismutasa
VDE: violaxantina de-epoxidasa
ZDS: ζ-caroteno desaturasa
ZEP: zeaxantina epoxidasa

RESUMEN

La conservación a bajas temperaturas es una práctica ampliamente utilizada para mantener la calidad y prolongar la vida postcosecha de los frutos. Sin embargo, los frutos de diferentes especies y variedades de cítricos son sensibles a desarrollar daños por frío (DF) durante la conservación postcosecha a temperaturas inferiores a 5 °C. Los carotenoides son los pigmentos responsables de la coloración en los frutos cítricos y, además, se ha comprobado que la acumulación de algunos de ellos (licopeno) en frutos de pomelo induce tolerancia a los DF durante la conservación refrigerada. El objetivo de este trabajo ha sido utilizar la diversidad en la coloración del fruto entre las distintas especies de cítricos para estudiar la relación entre los carotenoides del flavedo y la sensibilidad a desarrollar DF durante la conservación a 2 °C. Para ello, se utilizaron frutos híbridos de piel amarilla y naranja procedentes del cruce entre Clementina de Nules x pomelo Pink (Nulpink), y del cruce entre mandarinas Murcott x Kiyomi (MxK), y frutos de 3 variedades de mandarinas comerciales (Clementina de Nules, Fortune y Nadorcott). Los frutos de los híbridos Nulpink presentaron lesiones en la piel durante la conservación en frío diferentes a los síntomas característicos de DF (picados), que no se correlacionaron con el contenido en carotenoides totales. Sin embargo, en los frutos de los híbridos de MxK y en las variedades comerciales la mayor severidad del DF se produjo en las que presentaban menor contenido en la piel de la xantofila β -criptoxantina. Además, en el inicio de los DF hubo un incremento de la producción de etileno, que se estimula notablemente en la simulación de vida comercial a 20 °C. El conjunto de resultados indica una relación entre la tolerancia a los DF durante la conservación postcosecha de frutos cítricos a bajas temperaturas y el contenido en β -criptoxantina.

Palabras claves: *Citrus*, daño por frío, carotenoides, color, etileno.

ABSTRACT

Cold storage of citrus fruit is extensively used to preserve fruit quality and prolong fruit shelf life. However, certain species and varieties of citrus fruit are prone to develop chilling injuries (CI) during postharvest storage at temperatures below 5 °C. Carotenoids are the pigments responsible for the coloration in citrus fruit, and it has been proven that the accumulation of some carotenoids (lycopene) in grapefruit induces CI tolerance during cold storage. The main objective of this study was to use the diversity in fruit coloration among different citrus species to study the relationship between flavedo carotenoids and fruit susceptibility to develop CI during storage at 2 °C. To that purpose, research was focused on hybrid fruits with yellow and orange peel color obtained from Clementina de Nules x pumelo Pink (Nulpink) cross and Murcott x Kiyomi (MxK) cross, and fruits from three varieties of commercial mandarin (Clementina de Nules, Fortune y Nadorcott). Peel damage observed in Nulpink fruits during cold storage was different from typical CI symptoms (pitting), and did not correlate to total carotenoid content. Nevertheless, in the hybrid fruits from MxK and the commercial varieties, higher susceptibility to CI was observed in fruits with lower β -cryptoxanthin content in the peel. Moreover, at the onset of CI an increment in ethylene production was observed, and was further stimulated during shelf life simulation at 20 °C. Results indicate a relationship between CI tolerance during postharvest storage at low temperatures and β -cryptoxanthin content in the peel.

Keywords: *Citrus*, *Citrus*, chilling injury, carotenoids, color, ethylene.

1. INTRODUCCIÓN

La producción de frutos cítricos ocupa el primer lugar dentro de los cultivos frutícolas, representando alrededor de 137 millones de toneladas en el año 2014 (FAOSTAT, 2015). España es el sexto productor mundial con 6,6 millones de toneladas principalmente de naranjas y mandarinas (FAOSTAT, 2015). A diferencia de los mayores productores mundiales, como USA o Brasil, el destino principal de los frutos cítricos en España es para el consumo en fresco (79%) y con más de la mitad de la producción destinada a la exportación, por lo que las exigencias en cuanto a calidad de fruta, tanto interna como externa, son muy elevadas.

A lo largo de la cadena productiva existen diversas causas que pueden deteriorar la calidad de fruta, con consiguientes pérdidas en su comercialización. Las alteraciones fisiológicas de los frutos (referidas a las de origen abiótico) son una de las causas que deprecian su calidad, y estas pueden darse tanto por factores pre-cosecha (deficiencias nutricionales, hídricas, factores climáticos o del cultivo), o durante la cadena de manejo postcosecha de los frutos (Lafuente y Zacarías, 2006).

En general, los desórdenes fisiológicos más comunes que ocurren en el manejo postcosecha de frutos cítricos pueden clasificarse en dos grupos: (1) los relacionados con el daño por frío (DF), provocados por bajas temperaturas de conservación por debajo de 5 °C y (2) los que se producen por diferentes causas pero en general a temperatura ambiente, o por encima de la de conservación.

1.1. DAÑO POR FRÍO DURANTE EL ALMACENAMIENTO POSTCOSECHA DE FRUTOS

El almacenamiento a bajas temperaturas es una de las tecnologías postcosecha más ampliamente utilizada en la comercialización y transporte de productos hortícolas para preservar su calidad, evitar deterioros y extender su vida postcosecha. Estas condiciones de conservación a temperaturas comprendidas entre 1 y 5 °C significan un reto en especies frutales de origen tropical o subtropical, como los cítricos, que presentan sensibilidad a desarrollar alteraciones de DF en la piel de los frutos. Además, en el caso de exportaciones de cítricos a determinados países libres de la mosca mediterránea (*Ceratitis capitata*), como EE.UU. o Japón, se requieren tratamientos cuarentenarios a temperaturas próximas a la congelación (1-2 °C) durante periodos de hasta 15 días. La exposición de los frutos a estas temperaturas extremas y/o por tiempos tan prolongados favorece aún más la aparición de DF.

La sintomatología de los DF en los frutos cítricos es diversa, sin embargo el síntoma más común es la aparición de depresiones en el flavedo (parte externa coloreada de la piel) de color marrón conocidos en Citricultura como picado en la piel o “peel pitting” (Figura 1), que con el tiempo van oscureciendo, pueden aumentar en extensión y se hacen más intensas y marcadas (Lafuente y Zacarías, 2006).

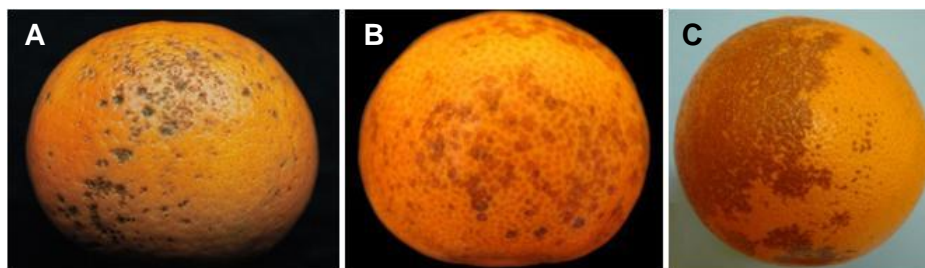


Figura 1. Ejemplos de síntomas de daño por frío en frutos de la mandarina Fortune **(A)**, Clementina de Nules **(B)** y naranja Navelate **(C)** durante la conservación postcosecha a 1-2 °C.

1.1.1. Factores que influyen en el daño por frío

Uno de los problemas principales asociados a los DF es que no se conocen en profundidad los factores que inciden en el daño. Existen factores intrínsecos del fruto como su origen genético, estado de desarrollo en el momento de la recolección, el patrón o las características intrínsecas del tejido, que afectan la sensibilidad de los frutos al DF. A su vez, condiciones ambientales y prácticas de cultivo previas a la cosecha pueden afectar la tolerancia al frío durante la postcosecha (El-Otmani et al., 2011; Lafuente y Zacarías, 2006; Wang, 2010).

En los frutos cítricos, existen diferencias genéticas en la susceptibilidad a los DF, variando la tolerancia al frío según la especie y variedad. En general, los limones y pomelos son las especies más sensibles al DF, seguidas por las mandarinas, híbridos y naranjas (Lafuente et al., 2005; Lafuente y Zacarías, 2006). A su vez, dentro de una misma especie la susceptibilidad al DF difiere según la variedad. Así, los híbridos, como la mandarina Fortune, presentan una alta susceptibilidad al DF cuando se almacenan por debajo de 10 °C (El-Otmani et al., 2011), mientras que la mandarina Clementina o la mutación Clementina de Nules presentan mayor tolerancia a las bajas temperaturas (Sala, 1998). La susceptibilidad a las bajas temperaturas de otras variedades de comercialización más recientes, como Nadorcott, no ha sido todavía ampliamente evaluada, además de que pueden existir notables diferencias entre los distintos países de cultivo.

El momento de cosecha también es un factor que influye en la tolerancia de los frutos al DF, y su efecto varía según la especie y variedad. Mientras que los frutos de pomelo recolectados a principio y fin de la temporada son más susceptibles al DF (Purvis et al., 1979; Schirra et al., 2000), los de la mandarina Fortune lo son a mediados de estación (González-Aguilar et al., 2000). En el caso de la mandarina Fortune se ha observado una relación entre las temperaturas previas de campo en el momento de la cosecha y la sustentabilidad a los DF, de forma que los meses más frío, como enero y febrero, son en los que los frutos tiene una mayor sensibilidad a desarrollar DF en la postcosecha (González-Aguilar et al., 2000).

Otros trabajos han encontrado diferencias en cuanto a la susceptibilidad a alteraciones en el flavedo entre frutos del interior y fuera del árbol, de tal forma que los frutos provenientes del interior de la copa, expuestos a menor incidencia de luz, presentaron una menor coloración y mayor sensibilidad a desarrollar desórdenes postcosecha (Cronje et al., 2011, 2013). Sin embargo, los frutos de pomelo Star Ruby en los que se impidió la incidencia de luz desde las últimas etapas del desarrollo hasta la maduración fueron más resistentes a los DF que los expuestos a la luz, pero contrariamente a lo que ocurre en otros frutos, desarrollan menor coloración roja y menor contenido de carotenoides (Lado et al., 2015a, 2015b). Estos resultados podrían indicar que la luz, a través de su influencia en la pigmentación de los frutos, podría estar jugando un papel relevante en la susceptibilidad a desarrollar DF en los frutos cítricos.

1.1.2. Respuesta al daño por frío

En los tejidos vegetales una de las primeras respuestas a nivel molecular frente al daño por frío es la alteración en la conformación y estructura de la membrana celular, que disminuye su permeabilidad. Cambios en la composición lipídica de la membrana, como peroxidación lipídica, aumento en la saturación de ácidos grasos y/o degradación de fosfolípidos, disminuyen la estabilidad de la membrana y su funcionalidad (Sevillano, 2009). A su vez, como respuesta secundaria al DF aumentan las especies reactivas de oxígeno (ROS) y se genera un estrés oxidativo, que afecta negativamente la integridad de las membranas. Las ROS, como el oxígeno singlete, peróxido de hidrógeno, radicales libres de hidroxilo y anión superóxido, tienen la capacidad de oxidar los componentes celulares generando daños metabólicos y estructurales (Toivonen, 2004).

En las células vegetales existen un conjunto de enzimas con capacidad antioxidante para eliminar las ROS, entre las que se encuentran principalmente la

superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APX), catalasa (CAT) y glutatión reductasa (GR) (Hossain et al., 2012; Lafuente y Zacarías, 2006; Sevillano et al., 2009). En frutos de mandarina se ha observado que el estrés oxidativo causado por DF parece estar relacionado con la actividad de las enzimas responsables de eliminar ROS (Sala, 1998). Las enzimas CAT, peroxidasas y SOD parecen ser las que en mayor medida pueden estar implicadas en la tolerancia o sensibilidad al DF, y específicamente la catalasa juega un papel importante en los frutos de mandarina, ya que su inhibición elimina el efecto protector de los tratamientos del acondicionamiento (Sala y Lafuente, 2000).

En la piel de frutos de pomelo tolerantes al DF, se ha observado un menor nivel de peroxidación lipídica (contenido de MDA) (Lado et al., 2016). El análisis ultraestructural de las células de la epidermis de frutos de pomelo Star Ruby de coloración roja, que no desarrollaron durante 2 meses de conservación a 2 °C, reveló que tenían una estructura y morfología definida e intacta, con paredes celulares gruesas, membranas celulares intactas y vacuolas compactas llenas de contenido. Por el contrario, las células de zonas amarillas, tanto de los frutos Star Ruby como de Marsh (que es completamente amarillo), que presentaron DF, estaban colapsadas, tenían forma irregular, menor tamaño y las vacuolas estaban llenas de un material denso y oscuro (Lado et al., 2015b).

Por otro lado, una respuesta común en frutos cítricos durante el almacenamiento a bajas temperaturas es el aumento en la producción de etileno (McCollum y McDonald, 1991). El etileno es una hormona vegetal involucrada en un amplio número de procesos en las plantas, y está fuertemente asociada a procesos de maduración y senescencia de frutos, y como respuesta a situaciones de estrés. La hormona es sintetizada a partir de la S-adenosil-metionina (SAM) que primero se convierte en ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), por la acción de la enzima ACC-sintasa (ACS), y posteriormente se oxida formando etileno por la acción de la enzima ACC-oxidasa (ACO) (Giovannoni, 2007).

A pesar de la implicación del etileno en la respuesta de los frutos al estrés por bajas temperaturas, aún no está claramente elucidado si puede ser una respuesta protectora frente al DF o una causa del mismo (Lafuente y Zacarías, 2006; Sevillano, 2009). En diferentes variedades de cítricos sensibles al DF, se ha observado que el aumento en la producción de etileno coincide con la aparición de síntomas de DF (Lafuente et al., 2003; Ghasemnezhad et al., 2008; Lado et al., 2015b, 2015c). A su vez, este aumento en la producción de la hormona se ha asociado a un incremento en la expresión de los genes involucrados en la biosíntesis de etileno (ACS y ACO) en la piel de frutos con

DF (Maul et al., 2008, Lado et al., 2015b 2015c). La acumulación de ARN mensajeros de ACS y ACO durante la conservación en frío explicaría, por lo tanto, el rápido incremento en la producción de etileno cuando los frutos son reacondicionados a temperaturas óptimas para la actividad enzimática (Lado et al, 2015c).

Además, se ha comprobado que la aplicación exógena de etileno previa a la conservación en frío puede potenciar el DF en algunas variedades de cítricos, como la mandarina Fortune, lo que apoya la hipótesis del posible papel promotor del etileno en el desarrollo de DF (Lafuente et al., 2001). Sin embargo, aplicaciones continuas de bajas concentraciones durante el almacenamiento de frutos de la misma variedad reducen la incidencia de DF (Lafuente et al., 2004), lo que apoya la hipótesis de la respuesta protectora del etileno y que los bajos niveles de etileno en los frutos cítricos son necesarios para mantener la calidad de la fruta durante la postcosecha (Porat et al., 1999). Además, se ha demostrado que los tratamientos de frutos con 1-MCP (un inhibidor de la acción de etileno) aceleran el desarrollo de DF durante la conservación (Lafuente et al., 2001). Aunque cabe mencionar que esta respuesta al tratamiento con 1-MCP ha sido variable entre especies y variedades de cítricos (Lado et al, 2015c), el concepto general que se desprende de este conjunto de resultados es que el etileno parece ser una respuesta de defensa frente al estrés por bajas temperaturas durante la conservación postcosecha de frutos cítricos (El-Otmani et al., 2011).

1.2. COLORACIÓN DE LOS FRUTOS CÍTRICOS

La coloración de la piel de los frutos cítricos se debe principalmente a la acumulación de clorofilas y carotenoides. La acumulación de clorofilas predomina en los frutos inmaduros, resultando en colores verdosos, y su contenido comienza a disminuir con el cambio de color del fruto (Rodrigo et al., 2004). En los frutos maduros, predomina la acumulación de carotenoides, pigmentos responsables de las coloraciones amarillas, naranjas, y rojizas presentes en las variedades cítricas. La presencia de antocianinas, que brindan color rojo, ha sido identificada en algunas variedades de naranjas sanguíneas, y se acumulan principalmente en la pulpa (Lo Piero, 2015).

Los carotenoides son compuestos isoprenoides liposolubles con una estructura de cuarenta átomos de carbono (C₄₀). Su estructura básica puede sufrir diferentes tipos de modificaciones estructurales y, en general, se dividen en dos grandes grupos: los carotenos, moléculas hidrocarbonadas no oxigenadas; y las xantofilas, que contienen átomos de oxígeno en su estructura (Figura 2) (Rodrigo et al., 2013a).

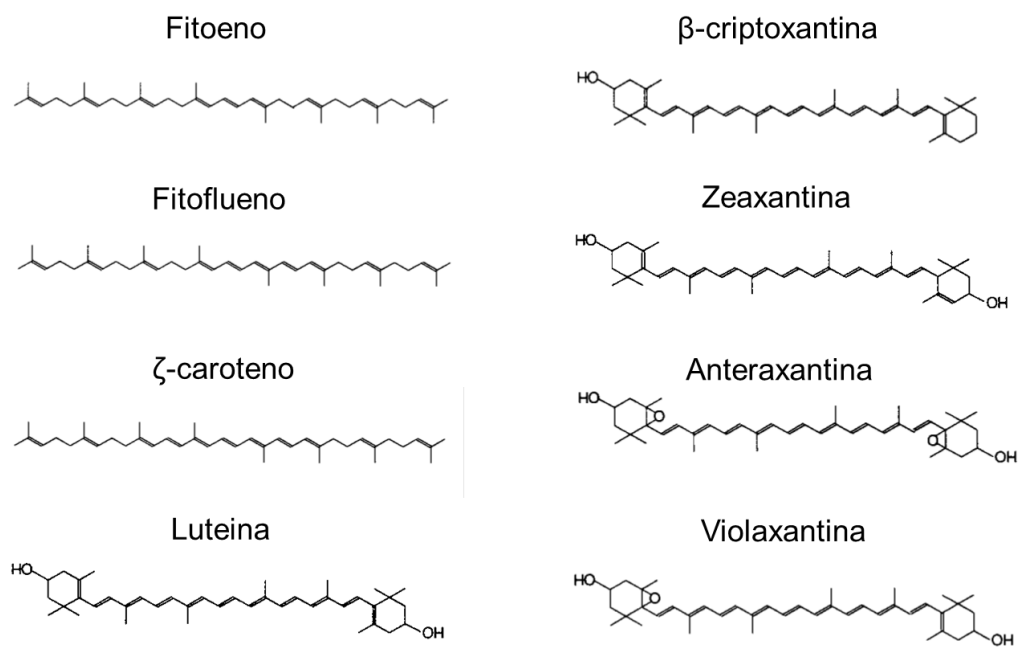


Figura 2. Estructura de algunos carotenos y xantofilas de relevancia en los frutos.

La biosíntesis de carotenoides (Figura 3) ocurre en los plástidos (generalmente en cromoplastos y cloroplastos), y las enzimas involucradas en la misma están reguladas a nivel transcripcional y han sido el objetivo de exhaustivas revisiones (Alquezar et al., 2008a; Kato, 2012; Rodrigo et al., 2013a). El sustrato inicial de la biosíntesis de carotenoides es el geranilgeranil difosfato (GGPP, C_{20}), que se forma por la condensación de cuatro moléculas de IPP (isopentenil difosfato). El primer paso específico de la ruta es la condensación de dos moléculas de GGPP para formar fitoeno (C_{40}) (carotenoide incoloro), y está regulado por la enzima fitoeno sintasa (PSY). Posteriormente el fitoeno es desaturado mediante la enzima fitoeno desaturasa (PDS), dando lugar al fitoflueno (incoloro) que mediante la acción de ζ -caroteno desaturasa (ZDS) resulta en la formación de licopeno (carotenoide rojo). La ciclación de la molécula de licopeno, por las enzimas licopeno β -ciclaza (β -LCY) y ϵ -ciclaza (ϵ -LCY), originan α -caroteno (naranja) por un lado y β -caroteno (naranja) por otro. Hidroxilaciones secuenciales del α -caroteno por la β - y ϵ -caroteno hidroxilasa (β -CHX y ϵ -CHX) dan lugar a la formación de luteína (amarillo). Mediante la hidroxilación de β -caroteno por β -CHX se forma β -criptoxantina, que posteriormente se hidroxila en zeaxantina. La zeaxantina epoxidasa (ZEP) es la enzima responsable de la conversión de zeaxantina en violaxantina, que a su vez y en ciertas condiciones, puede volver a convertirse en zeaxantina mediante una reacción reversible catalizada por la violaxantina de-epoxidasa (VDE). El último paso en la ruta es la formación de neoxantina a partir de la violaxantina, reacción catalizada por la neoxantina sintasa (NSY) (Rodrigo et al., 2013a; Ruiz-Sola y Rodríguez-Concepción, 2012).

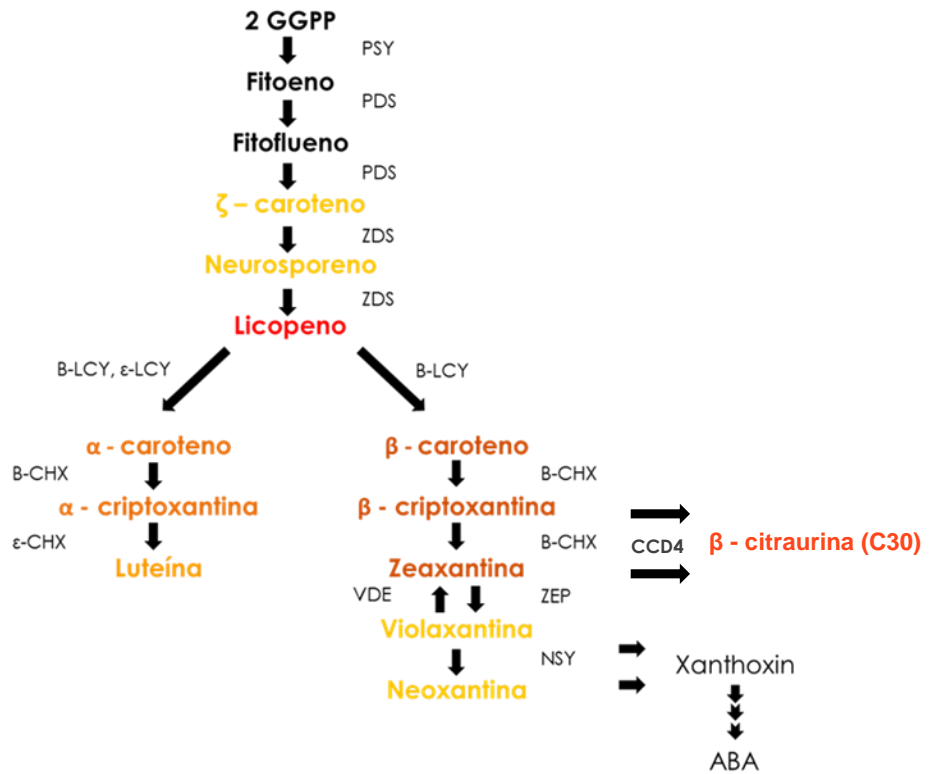


Figura 3. Esquema de la biosíntesis de carotenoides en la que se indican los carotenoides y las enzimas que catalizan las principales etapas de la ruta: *PSY*: fitoeno sintasa; *PDS*: fitoeno desaturasa; *ZDS*: caroteno desaturasa; *LCY*: licopeno ciclasa; *CHX*: caroteno hidroxilasa; *ZEP*: zeaxantina epoxidasa; *VDE*: violaxantina de-epoxidasa; *NSY*: neoxantina sintasa; *CCD4*: dioxigenasa de corte de carotenoides. *ABA*: fitohormona ácido abscísico.

A su vez existen derivados de los carotenoides de importancia biológica, denominados apocarotenoides, que se forman por degradación oxidativa a través de las enzimas de corte de carotenoides (CCDs: carotenoid cleavage dioxygenases). En el género *Citrus*, debido a la acción de la enzima *CCD4*, que divide asimétricamente a la β-criptoxantina y zeaxantina en las posiciones 7,8/7',8' se forman los apocarotenoides (C₃₀): β-citraurina y apo-8'-β-caroteno, que son específicos del género (Hou et al., 2016; Ma et al., 2013; Rodrigo et al., 2013b). La acumulación de β-citraurina, que imparte el color rojizo en la piel de los cítricos, se ha observado solo en el flavedo de algunas variedades y su acumulación coincide con un aumento de la expresión del gen *CCD4*, siendo un gen clave en la biosíntesis de β-citraurina. A su vez, su acumulación parece estar determinada por la disponibilidad de sus precursores β-criptoxantina y zeaxantina (Rodrigo et al., 2013b).

1.2.1. Factores que afectan al contenido y composición de carotenoides

Los carotenoides en los frutos cítricos se acumulan tanto en la piel como en la pulpa, y distintos factores influyen en su contenido y composición. El perfil de carotenoides en los frutos está determinado por el genotipo de las diferentes especies y variedades. Las condiciones ambientales (exposición a la luz, temperatura, etc.) y las prácticas de cultivo durante el desarrollo y maduración del fruto pueden tener un importante efecto en el contenido de carotenoides (Rodrigo et al., 2013a).

En general, los frutos cítricos presentan una composición de carotenoides muy compleja, y se han llegado a describir más de 20 carotenoides diferentes en las distintas variedades de naranjas y mandarinas. En estudios sobre el contenido y la diversidad de carotenoides en frutos cítricos, se ha observado que el contenido de violaxantina y β -criptoxantina son factores importantes para diferenciar entre genotipos tanto en el flavedo (Matsumoto et al., 2007) como en la pulpa (Fanciullino et al., 2006; Matsumoto et al., 2007). En general, los frutos maduros de mandarinas y naranjas son los que presentan mayor contenido de carotenoides y los perfiles más complejos. En estas especies, predomina la acumulación de β,β -xantofilas, siendo 9-*cis*-violaxantina el carotenoide más abundante. La coloración naranja intensa de la piel de estas especies parece deberse a una mayor acumulación de β -criptoxantina y de apocarotenoides C30, en particular β -citraurina y 8- β -apocarotenal, de color naranja-rojizo. En mandarinas y sus híbridos, el contenido de carotenoides totales es superior al de las naranjas y su composición más compleja (Rodrigo et al., 2013a).

Los limones, pumelos y algunos pomelos son especies que se caracterizan por tener contenidos bajos de carotenoides coloreados. En estas especies suele predominar la acumulación de carotenoides incoloros, como lo son los carotenoides lineales fitoeno y fitoflueno, y la concentración de β -criptoxantina o apocarotenoides C30 suele ser baja o nula (Alquezar et al., 2008b, 2013).

El contenido y composición de carotenoides varía a su vez durante el desarrollo del fruto, y su acumulación durante la maduración está altamente regulada por la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de carotenoides. En general, los frutos inmaduros de mandarina o naranja presentan una composición de carotenoides típica de tejidos cloroplásticos (Rodrigo et al., 2004). En esta etapa de desarrollo predominan los carotenoides luteína, α -caroteno, β -caroteno y *t*-violaxantina (Kato et al., 2004; Rodrigo et al., 2004). A medida que comienza el cambio de color en los frutos disminuye el contenido de estos carotenoides, y se acumulan principalmente

β,β -xantofilas, dentro de las cuales predomina 9-*cis*-violaxantina, β -criptoxantina y el apocarotenoide (C_{30}) β -citaurina (Agócs et al., 2007; Kato et al., 2004; Rodrigo et al., 2004, 2013a).

En estudios sobre la expresión de los genes involucrados en la biosíntesis de carotenoides, se ha observado una alta expresión génica de CitLCYe y baja expresión de CitPSY, CitZDS y CitHYb, durante el estado inmaduro de los frutos (tejido verde). La alta expresión de CitLCYe indicaría que prevalece el flujo hacia la rama β,ϵ de la ruta, predominando la acumulación de β,ϵ -carotenoides (α -caroteno y luteína). La acumulación masiva de β,β -xantofilas durante el cambio de color es resultado de un aumento en la expresión de los genes involucrados en la ruta (PSY, PDS, ZDS y LCYb) acompañado de un aumento de los transcritos CitLCYb y disminución de los de CitLCYe, lo que favorece el cambio hacia la rama β,β de la ruta (Alquezar et al., 2008a, 2013; Kato et al., 2004; Lado et al., 2015a; Rodrigo et al., 2004).

1.3. RELACIÓN ENTRE EL DAÑO POR FRÍO Y CAROTENOIDES EN FRUTOS

Además de ser los principales pigmentos responsables del color de muchos frutos y flores, los carotenoides presentan múltiples funciones en las plantas. Actúan como pigmentos accesorios en la fotosíntesis, juegan un papel importante en la fotoprotección y fotomorfogénesis, y son precursores de compuestos volátiles y de la fitohormona ácido abscísico (ABA), entre otras (Stange, 2016).

A su vez, dos de las funciones más relevantes de los carotenoides en las células es que, algunos de ellos son precursores de la vitamina A y su potente actividad antioxidante. Para ser precursores de la vitamina A, los carotenoides deben tener una serie de requerimientos estructurales, especialmente no deben tener grupos hidroxilos en los anillos β -, y por ello el β -caroteno es el que posee capacidad para ser precursor de dos moléculas de retinol, mientras que el α -caroteno o la β -criptoxantina lo son solo de una molécula (Stange, 2016). En cuanto a la capacidad como antioxidantes, los diferentes carotenoides tienen distintas capacidades para eliminar las especies reactivas al oxígeno (ROS) que se generan en diferentes condiciones de estrés (Pizarro and Stange, 2009). Ya que los animales no tiene capacidad de sintetizar carotenoides, deben ingerirlos por la dieta y en consecuencia una carencia o reducción de su consumo pueden conllevar un aumento del riesgo de padecer enfermedades crónicas y degenerativas en las que hay un componente oxidativo (Fiedor y Burda, 2014).

En cuanto a la relación de la coloración de los frutos y su mayor o menor tolerancia al frío, en pomelo Marsh (con flavedo de color blanco) se ha encontrado una mayor incidencia de DF que en pomelos coloreados, como Star Ruby (Dou, 2005; Lado et al., 2015b). Lado et al. (2015b) observaron también una mayor incidencia de DF en las zonas amarillas de frutos de Star Ruby, de forma que las zonas rojas de estos frutos, que tenían mayor contenido total de carotenoides y en específico de licopeno, estaban prácticamente intactas y sin lesiones por frío. Para caracterizar este efecto, se aplicó un inhibidor de la actividad de licopeno ciclasa a frutos de pomelo Marsh y se comprobó que se incrementaba el contenido en licopeno y reducía el DF en la posterior conservación a 2 °C. Además, en frutos de pomelo SR en los que se evitó la exposición a la luz (embolsados) durante su crecimiento, se inducía una coloración roja intensa y se incrementaba sustancialmente el contenido en licopeno, siendo estos frutos muy tolerantes a los DF durante la conservación a 2 °C (Lado et al, 2015a). Estos resultados demuestran que la presencia de licopeno puede inducir tolerancia al estrés por las bajas temperaturas de conservación. Aprovechando esta característica, en países exportadores de frutos de pomelo (como Sudáfrica) se han comenzado a seleccionar frutos por color y destinando a estas condiciones tan estrictas de transporte en frío solamente aquellos frutos de pomelo que presentan una coloración roja intensa en la piel, con el objetivo de aumentar la cantidad de frutos que superan la cuarentena por frío.

Dado que el licopeno es uno de los carotenoides con mayor capacidad antioxidante (Rao and Rao, 2007), una hipótesis para explicar la tolerancia a los DF en los frutos de pomelo es mediante un aumento de la capacidad antioxidante inducida por este caroteno. Lado et al. (2016) observaron que en las zonas rojas de pomelo con mayor tolerancia a los DF la actividad antioxidante total, determinada por diferentes métodos, era inferior a la que se determinó en las zonas que desarrollaron daños, lo que indica que la actividad antioxidante total no parece estar directamente relacionada con la tolerancia al DF. Sin embargo, al determinar la actividad antioxidante para secuestrar el radical oxígeno singlete (SOAC), se comprobó una mayor capacidad (2-3 veces superior) en las zonas rojas con alto contenido en licopeno, tanto en el momento de la cosecha como durante la conservación en frío. A su vez, en la piel roja de los frutos tolerantes al DF se detectó una mayor actividad CAT, aunque sin correlacionarse con una mayor expresión en los genes CAT1 y CAT2 (Lado et al., 2016). Este conjunto de resultados indican que el licopeno es capaz de secuestrar o reducir el oxígeno singlete en las células de la piel de los frutos de pomelo expuestos a bajas temperaturas y, por lo tanto, esta ROS podría estar directamente relacionada con la inducción de los DF.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este trabajo ha sido estudiar la relación entre el contenido y composición de carotenoides en el flavedo y la sensibilidad a desarrollar daños por frío durante la conservación postcosecha en frutos de diferentes variedades de mandarinas e híbridos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para alcanzar este objetivo se han seleccionado variedades de mandarinas comerciales (Clementina de Nules, Fortune y Nadorcott), híbridos de mandarinas (Murcott x Kiyomi), e híbridos de mandarina por pumelo (pumelo Pink x Clementina de Nules) con marcadas diferencias en la coloración del flavedo y se han abordado los siguientes objetivos específicos:

- Evaluación de los DF durante la conservación de los frutos a bajas temperaturas (2°C).
- Evaluación de la producción de etileno de los frutos durante la conservación refrigerada.
- Determinación del contenido y composición de carotenoides en el flavedo de los frutos en el momento de la cosecha y durante la conservación refrigerada.

3. METODOLOGÍA

3.1. MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CONSERVACIÓN

Con el objetivo de evaluar la posible influencia del contenido y composición de carotenoides en la sensibilidad a los DF se llevaron a cabo tres ensayos en paralelo. Para ello, se seleccionaron frutos que presentaban marcadas diferencias en la coloración de la piel de híbridos procedentes de dos cruces interespecíficos. Este material procede de los programas de mejora genética realizados en el Departamento de Biotecnología y Protección Vegetal del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), suministrados por el Dr. Pablo Aleza. En el primer caso, se utilizaron dos híbridos referidos como Nulpink 26 y 78 (N26 y N78), con color del flavedo amarillo y naranja, respectivamente (Figura 4A), procedentes del cruce entre la mandarina Clementina de Nules (*Citrus clementina*) como parental femenino y pumelo Pink (*Citrus maxima*) como masculino (Ollitrault et al., 2012). En el segundo caso se utilizaron dos híbridos del cruce entre las mandarinas Kiyomi (*Citrus unshiu* x *Citrus sinensis*) x Murcott (*Citrus reticulata* Blanco.), denominados MxK35 y MxK61, mostrando el flavedo del primero coloración naranja y el segundo amarilla (Figura 9A). En el tercer experimento se realizó una comparación entre frutos de tres variedades comerciales de mandarina: Clementina de Nules (*Citrus clementina* Hort. Ex Tan.), mandarina Nadorcott (*Citrus reticulada* Blanco) y mandarina Fortune (*Citrus clementina* Hort. Ex Tan. x *Citrus reticulata* Blanco), (Figura 13A), ya que además de presentar diferente intensidad de coloración en el flavedo, las referencias en la literatura indican diferente susceptibilidad a las bajas temperaturas (El-Otmani et al., 2011). Los frutos de Clementina de Nules fueron recolectados en una parcela comercial en Liria, mientras que los frutos de Fortune y Nadorcott se obtuvieron del banco de germoplasma de cítricos del IVIA (Moncada).

Para evaluar la sensibilidad a los DF, los frutos se cosecharon en el momento de madurez comercial y, posteriormente se almacenaron a 2 °C durante 8 semanas. Tras este periodo los frutos se transfirieron a 20 °C durante 48 horas para la simular la vida comercial. Los frutos se almacenaron en cámaras climáticas acondicionadas con sensores automáticos de temperatura y con una humedad relativa de 80-85%.

Todos los frutos híbridos como los de la mandarina Clementina de Nules se recolectaron en enero, mientras que los de las mandarinas Fortune y Nadorcott fueron recolectados en el mes de febrero. En el momento de la recolección, y a intervalos

periódicos hasta el final de la conservación en frío, se evaluaron los siguientes parámetros: color, calidad interna ($^{\circ}$ Brix, acidez, e índice de maduración como la relación entre ambos parámetros), incidencia e intensidad de DF, producción de etileno, y contenido y composición de carotenoides.

3.2. DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE COLOR

Para la determinación del color externo de los frutos se utilizó un colorímetro Minolta CR-400. Se determinaron las coordenadas de color Hunter L, a y b en tres localizaciones distintas alrededor del eje ecuatorial de los frutos. Se utilizaron al menos 6 frutos para cada variedad. La coordenada Hunter 'a' determina las tonalidades de color desde el verde (valor negativo) hasta rojo (positivo), mientras que la coordenada 'b' mide las variaciones en el color desde el azul (negativo) hasta el amarillo (positivo). Los valores de color se expresan como la relación a/b, que es uno de los parámetros más comunes y reconocidos internacionalmente para expresar el color de los frutos cítricos (Rodrigo et al., 2003). Cuando esta relación es negativa refleja color verde, y conforme aumenta el valor indica cambios hacia colores amarillos y anaranjados, así para frutos en el momento del cambio de color la relación a/b es alrededor de 0 y positiva para frutos de color naranja (Stewart y Wheaton, 1972).

3.3. DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE MADURACIÓN

Para determinar el índice de maduración de los frutos en el momento de su recolección se tomó una muestra de zumo realizada con un exprimidor eléctrico a partir de 10 frutos, aproximadamente, que se filtró y se conservó a -20°C hasta el momento del análisis. La acidez del zumo (mg de ácido cítrico / 100 ml de zumo) se evaluó realizando una valoración con NaOH 0.1N, y los sólidos solubles ($^{\circ}$ Brix) se determinaron con un refractómetro digital ATAGO (PR-32). El índice de maduración (IM) se expresó como la relación entre ambos parámetros.

3.4. ESTIMACIÓN DEL DAÑO POR FRÍO

El daño por frío en la piel de los frutos se determinó tal y como se describe en Lafuente et al. (1997). Para ello, los frutos se clasificaron en diferentes categorías utilizando una escala visual y a cada una de ellas se le asignó un valor según el siguiente criterio: 0= sin daño; 1= daños ligeros, hasta un 10% de la superficie dañada; 2= daños medios, entre 10 y 50% de la superficie con manchas y 3= daños severos, más del 50% de la superficie afectada con picados de mayor extensión.

Posteriormente el índice de daño por frío (IDF) se calculó mediante la fórmula: Σ (número de frutos de cada categoría x valor de cada categoría) / Número total de frutos examinados.

3.5. DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ETILENO

La producción de etileno se evaluó periódicamente durante la conservación de los frutos a 2 °C (0, 1, 3, 5, 8 semanas), y durante la transferencia de los frutos a 20 °C. Para ello, se incubaron 4 frutos en una jarra de vidrio de 4,5 L herméticamente cerrada durante 3 horas, utilizando al menos 2 jarras réplica por cada periodo evaluado. Para el análisis de etileno se extrajeron de cada jarra 3 réplicas de 1 ml de aire del espacio de cabeza con una jeringuilla hipodérmica. Las muestras de aire fueron inyectadas en un cromatógrafo de gases (Perkin-Elmer Autosystem, Norwalk, CT) equipado con una columna de alúmina activada de 1 m x 2 mm (80/100mesh), Supelco (Barcelona, España) y un detector de ionización de llama (FID), utilizando nitrógeno como gas transportador. Las condiciones del cromatógrafo en las que se analizaron las muestras fueron: temperatura del detector de 180 °C, temperatura del inyector de 180 °C, y temperatura del horno de 50 °C. Los resultados de producción de etileno se expresan en $\text{nl g}^{-1} \text{PF h}^{-1}$.

3.6. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CAROTENOIDES

En el momento de la recolección y a diferentes intervalos durante la conservación refrigerada se tomaron muestras de flavedo de aproximadamente 10 frutos, que se congelaron en nitrógeno líquido inmediatamente, se trituraron a un polvo fino y almacenaron a -80 °C hasta el momento del análisis.

Para estudiar el contenido y composición de carotenoides se realizó una extracción siguiendo el protocolo descrito por Rodrigo et al. (2003) con ligeras modificaciones. La extracción se realizó con muestras de aproximadamente 500 mg de flavedo. Las muestras se extrajeron en un mortero con arena de mar lavada (grano fino, PANREAC) y con 2 mL MeOH (calidad HPLC, Scharlau), y se agregó 1,5 mL solución 50 mM Tris-HCl (pH 7, con 1M NaCl) como tampón. Posteriormente se agregó 4 mL cloroformo (calidad HPLC, Scharlau), se agitó mediante vórtex (1 min) y se centrifugó a 4500 rpm a 4 °C durante 10 min. Luego se recuperó la fase orgánica y se repitió la extracción con cloroformo hasta que la fase orgánica recuperada fue incolora.

Las fases orgánicas recuperadas se combinaron y se concentraron a sequedad en rotavapor a vacío (Buchi) con temperatura del baño a 35 °C. Con el objetivo de

hidrolizar los ésteres de carotenoides con ácidos grasos, el extracto seco se disolvió con KOH-metanol (10% KOH p/v, entre 400-800 µL KOH y 3-7 mL metanol) y las muestras se saponificaron (hidrólisis alcalina) en atmósfera de nitrógeno, oscuridad y temperatura ambiente durante 16 h.

Posteriormente, los carotenoides se extrajeron repetidamente con mezcla de éter de petróleo y éter etílico (9:1; v/v). En el extracto orgánico se realizó una determinación del contenido de carotenoides totales mediante espectrofotometría, registrando el espectro de absorbancia (270 a 540 nm) del extracto y calculando la concentración de carotenoides totales como equivalentes de β-caroteno mediante la ecuación de Davies (1976).

$$\text{g de carotenoides (como equivalentes } \beta\text{-caroteno)} = (E.y)/(E1\%1\text{cm}.100)$$

E: absorbancia a 450 nm

y: mL de disolución

E1%1cm: 2500 (coeficiente de extinción del β-caroteno de una solución al 1%, medida en una cubeta con 1 cm de paso de luz).

Tras esta determinación, la fase orgánica recuperada se concentró en el rotavapor (35 °C) hasta la completa sequedad del extracto. Posteriormente el extracto seco se resuspendió en diclorometano y metanol, se trasvasó a tubos de vidrio, se llevó a sequedad con corriente de nitrógeno, y se almacenaron en condiciones de atmósfera inerte (nitrógeno) a –20 °C hasta su posterior análisis.

Durante todo el procedimiento se tuvo especial atención en evitar la exposición de las muestras a la luz directa para evitar la fotodegradación, isomerización y otros posibles efectos sobre los carotenoides. Todas las muestras fueron extraídas al menos por duplicado.

La identificación y cuantificación de los carotenoides individuales en los extractos se realizó por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a detector de fotodiodos (HPLC-PDA). La cromatografía se llevó a cabo en un sistema de cromatografía líquida Waters™, equipada con una bomba cuaternaria 600E y un detector de fotodiodos modelo 2998, utilizando una precolumna C18 (10 mm x 4.6 mm x 3 µm) y una columna C30 (250 mm x 4.6 mm x 5 µm) (YMC Europa). Los datos se adquirieron y procesaron con el paquete informático Empower (Waters™). La separación de los carotenoides se realizó utilizando un gradiente ternario de elución compuesto por metanol (MeOH, Scharlau), agua bidestilada filtrada y metil t-butil éter (MTBE, Merck) en combinaciones detalladas en la Tabla 1. El flujo se mantuvo a 1 mL/min durante toda la cromatografía y la columna a temperatura ambiente.

Tabla 1. Gradiente de elución utilizado para la separación de carotenoides mediante HPLC.

Tiempo (min)	0	12	20	30	50	52	60
MTBE	5	5	14	25	50	5	5
H₂O	5	0	0	0	0	5	5
MeOH	90	95	86	75	50	90	90

El detector de fotodiodos se programó para registrar las absorbancias cada 1 nm entre 250 nm y 540 nm a lo largo de toda la elución. Para cada muestra se obtuvo un cromatograma MaxPlot en el que se representa el tiempo frente a la absorbancia máxima en el rango de longitudes de onda registradas. Las muestras a analizar se prepararon mediante disolución del extracto seco de carotenoides obtenido previamente en un volumen variable (entre 40 y 500 μL , dependiendo de contenido en carotenoides totales previamente estimado) de cloroformo:metanol:acetona (pureza HPLC) en una proporción 3:2:1. El volumen de muestra inyectado fue de 20 μL .

Los carotenoides se identificaron por comparación del espectro obtenido y el tiempo de retención con los estándares disponibles o con los datos de espectros obtenidos en condiciones cromatográficas similares (Anexo 9.1 y 9.2). En los cromatogramas los picos cromatográficos correspondientes a cada carotenoide se integraron en su longitud de onda máxima y la cuantificación se realizó interpolando el área de dichos picos sobre las curvas de calibrado disponibles: luteína (Sigma), β -caroteno (Sigma), β -criptoxantina (Extrasynthese), β -apo-8'-carotenal (Hoffman-LaRoche), zeaxantina (Extrasynthese), anteraxantina (CaroteNatur) y violaxantina (CaroteNatur) (Tabla 2). El fitoeno y el fitoflueno fueron purificados previamente en nuestro laboratorio a partir de muestras enriquecidas en estos carotenos y posteriormente se realizaron sus respectivas curvas de calibrado. La cuantificación de la mutatoxantina se llevó a cabo utilizando la curva de calibrado de la luteína, y la curva del β -apo-8'-carotenal para cuantificar el apocarotenoide C₃₀ β -citraurina. El contenido de carotenoides totales se expresa como la suma de los carotenoides individuales, y todas las concentraciones de carotenoides están referidas a microgramos por gramo de peso fresco ($\mu\text{g g}^{-1}$ PF).

Tabla 2. Límites de detección (ng) y ecuaciones de las rectas de calibrado obtenidas para la cuantificación de distintos carotenoides.

Carotenoide	Límite de detección (ng)	Recta de calibrado
Luteína	7	$\mu\text{g}=8.24810 \cdot 10^{-8} \text{ Area}$ $r^2=0.9900$
β -apo-8'carotenal	32	$\mu\text{g}=3.24695 \cdot 10^{-8} \text{ Area}$ $r^2=0.9370$
Zeaxantina	10	$\mu\text{g}=1.13798 \cdot 10^{-7} \text{ Area}$ $r^2=0.9811$
Fitoeno	20	$\mu\text{g}=3.73158 \cdot 10^{-7} \text{ Area}$ $r^2=0.9944$
Fitoflueno	8	$\mu\text{g}=1.79116 \cdot 10^{-7} \text{ Area}$ $r^2=0.9944$
β -criptoxantina	10	$\mu\text{g}=1,36774 \cdot 10^{-7} \text{ Area}$ $r^2=0.9231$
Anteraxantina	5	$\mu\text{g}=7,97615 \cdot 10^{-8} \text{ Area}$ $r^2=0.9948$
Violaxantina	4	$\mu\text{g}=7,72631 \cdot 10^{-8} \text{ Area}$ $r^2=0.9899$
β -caroteno	9	$\mu\text{g}=8.34097 \cdot 10^{-8} \text{ Area}$ $r^2=0.9922$

4. RESULTADOS

4.1. CONSERVACIÓN DE FRUTOS DE LOS HÍBRIDOS NULPINK A BAJAS TEMPERATURAS

4.1.1. Índice de madurez e índice de color

En el momento de la recolección de los frutos Nulpink, los frutos N78 presentaron un mayor índice de madurez que los N26, debido a un mayor contenido de sólidos solubles y menor nivel de acidez (Tabla 3).

Tabla 3. Acidez (%), Sólidos solubles (° Brix) e índice de madurez (S.S. / Acidez) en frutos de Nulpink N78 y N26 en el momento de cosecha (27 de enero).

Variedad	Acidez (%)	S.S. (° Brix)	IM (S.S. / Acidez)
N 78	2,48 ± 0,01	11,40 ± 0,14	4,60 ± 0,07
N 26	4,47 ± 0,01	9,95 ± 0,07	2,23 ± 0,02

El aspecto de los frutos y su color en el momento de la recolección se observan en la Figura 4A. El índice de color, expresado como la relación entre los parámetros Hunter 'a' y 'b' (a/b), refleja colores verdes cuando la relación es negativa y colores amarillos y anaranjados cuando es positiva. En el momento de la recolección, los frutos N78 presentaban una coloración naranja intensa, acorde con el índice a/b de $1,01 \pm 0,03$, mientras que los frutos N26 presentaban color amarillo con un índice a/b de $0,28 \pm 0,02$. Esta relación a/b aumentó ligeramente en la primera semana de conservación en ambas variedades y posteriormente se mantuvo constante (Figura 4 B). A lo largo de todo el periodo de conservación la relación a/b fue siempre mayor en los frutos N78.

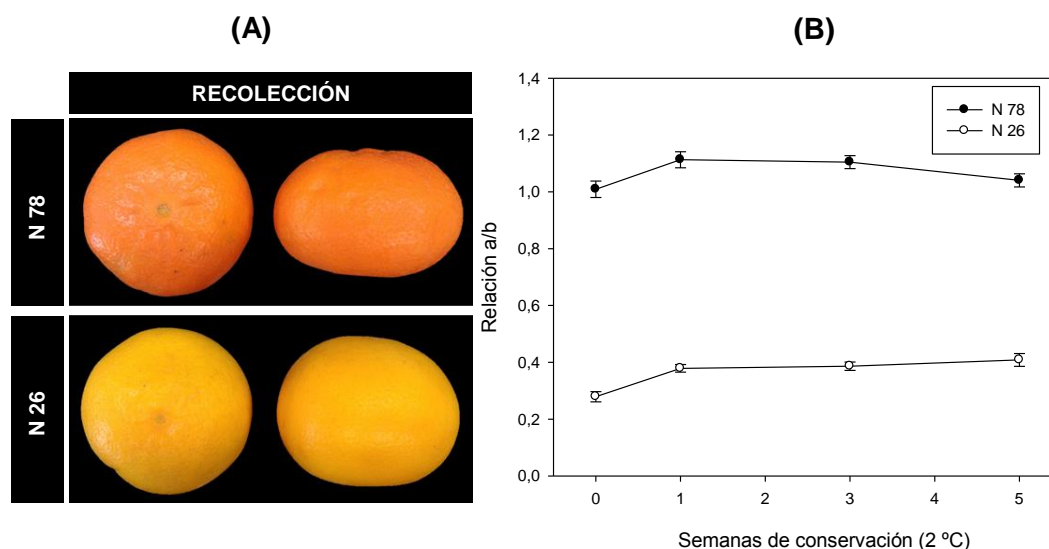


Figura 4. Aspecto externo de los frutos Nulpink N78 y N26 en el momento de recolección (0) **(A)**; y evolución del índice de color (relación Hunter a/b) durante el periodo de conservación a 2 °C **(B)**.

4.1.2. Evaluación del daño por frío

Los síntomas de DF comenzaron a observarse a partir de la tercera semana de conservación a 2 °C en ambos híbridos, y continuaron aumentando hasta el final de la conservación (Figura 5A y B).

El índice de daño por frío (IDF) fue siempre mayor en los frutos N78, de color naranja, que en los frutos de N26 de color de amarillo (Figura 5A). Después de 5 semanas de conservación el IDF era 1,5 veces superior en los frutos N78 que en los N26 (2,74 y 1,69, respectivamente). Cabe mencionar que los síntomas observados en estos frutos no fueron el característico 'picado' por frío que se observa en el flavedo de los frutos de otras variedades de cítricos. Los síntomas en los frutos N78 tuvieron una morfología más típica de manchados o pardeamientos relativamente extendidos por la superficie del fruto (Figura 6), muy distintos de las hendiduras necróticas características de los DF, con un apariencia más similar a la que se produce por deshidratación (El-Otmani et al., 2011). Además, los frutos de Nulpink tienen un albedo relativamente grueso, y durante la conservación perdieron consistencia, estaban más blandos y se deterioraron más rápidamente, lo que indica que puede haber un componente de deshidratación durante la conservación en frío de estos frutos. Por ello, la conservación refrigerada en estos frutos se finalizó a las 5 semanas.

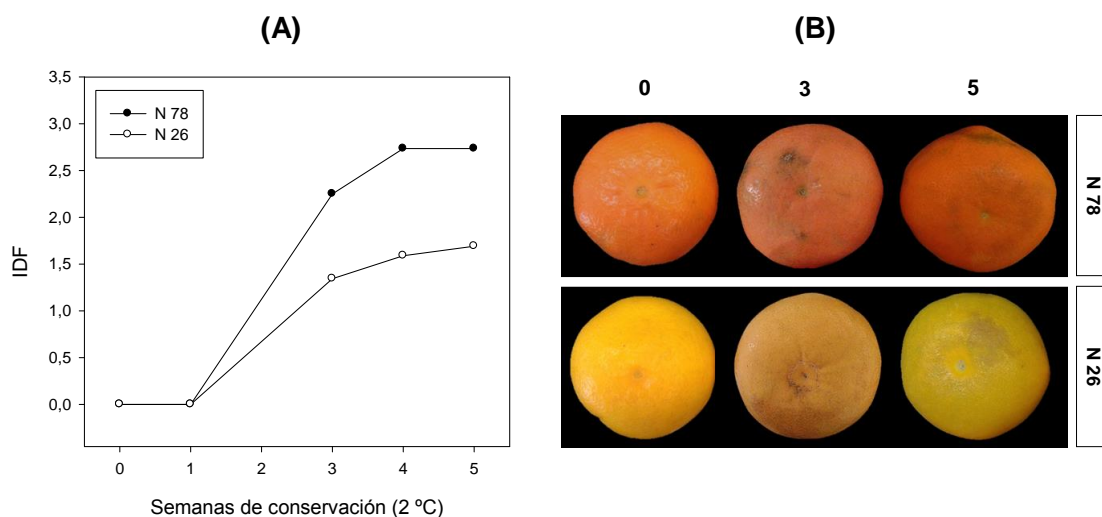


Figura 5. Evolución del índice de daño por frío (IDF) durante la conservación a 2 °C en los frutos Nulpink N78 y N26 **(A)**; aspecto externo de los frutos en la recolección (0), a las 3 semanas y 5 semanas de conservación **(B)**.

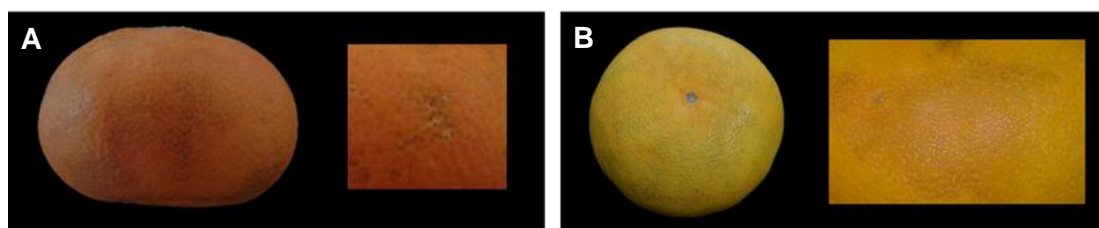


Figura 6. Síntomas de DF observados en los frutos Nulpink N78 **(A)** y N26 **(B)**.

En la Figura 7 se representa el porcentaje de frutos sin y con DF según la severidad de los síntomas (1: ligeros, 2: medios, 3: severos) a lo largo de la conservación a 2 °C. Los síntomas de DF se detectaron a partir de la tercera semana, donde el 100% de los frutos N78 presentaban DF, mientras que en N26 estuvieron afectados el 79% de los frutos. En la tercera semana de conservación el 50% de los frutos N78 presentaban síntomas severos, 25% medios y el otro 25% ligeros. El porcentaje de frutos con síntomas severos aumentó a 74% en la cuarta semana. En el caso de N26, el porcentaje de frutos con síntomas severos fue menor, y en la tercera semana de conservación la mayoría de los frutos presentaban síntomas ligeros (38%) y medios (28%), y solo un 14% tenía síntomas severos. Al final de la conservación, la mayoría de los frutos N26 presentaban síntomas ligeros y medios (33% y 33%, respectivamente) y solo un 23% síntomas severos.

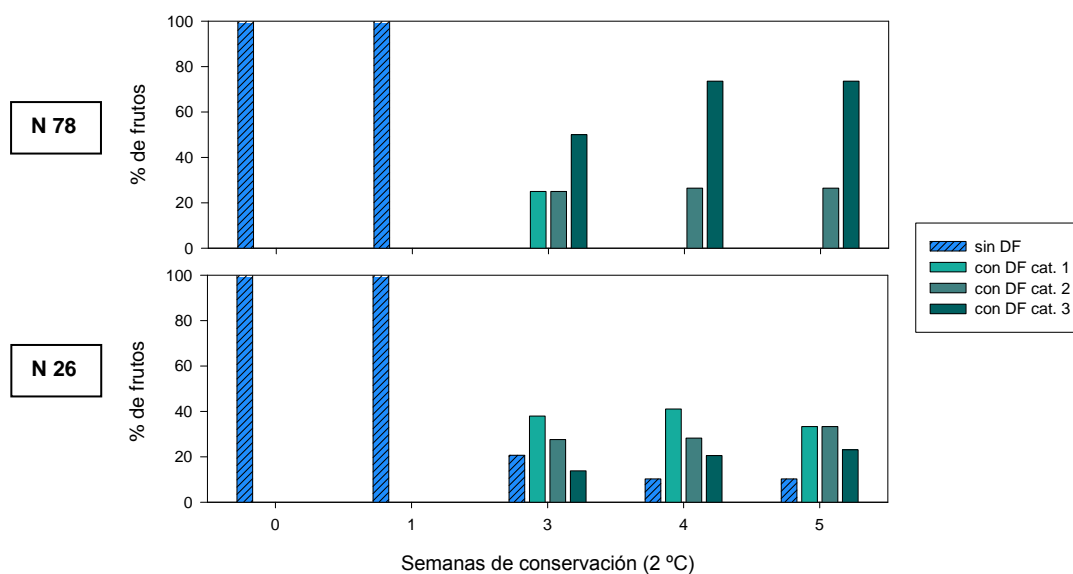


Figura 7. Distribución de los porcentajes de frutos Nulpink afectados por daños de frío (DF) durante la conservación a 2 °C. Los números de cada categoría son; 1: ligeros, 2: medios y 3: severos.

4.1.3. Producción de etileno

La producción de etileno en los frutos de Nulpink N78 y N26 durante las 5 semanas de conservación a 2 °C y durante 48 horas de transferencia a 20 °C se muestra en la Figura 8. La producción de etileno fue muy baja en los frutos N26 ($0,03 \pm 0,02$ nl g⁻¹ PF h⁻¹) y no se modificó sustancialmente durante la conservación a 2 °C (Figura 8A). En los frutos N78 se observó un aumento en la producción de etileno a partir de la tercera semana, concomitante con el aumento del DF en esta variedad, y alcanzó valores 4 veces superior a los de N26 a las 5 semanas de conservación ($0,13 \pm 0,02$ nl g⁻¹ PF h⁻¹).

La transferencia de los frutos de ambas variedades a 20 °C (simulación de vida comercial) provocó un incremento de la producción de etileno de distinta magnitud en cada variedad. Así, en los frutos N78 se observó un rápido aumento en la producción de etileno a las 8 h tras la transferencia a 20 °C ($0,59 \pm 0,16$ nl g⁻¹ PF h⁻¹), que fue transitorio, ya que disminuyó posteriormente a valores próximos a los de antes de la transferencia. En los frutos N26, sin embargo, la producción de etileno aumentó ligera y progresivamente durante las 48h de transferencia, alcanzando valores unas tres veces inferiores ($0,20$ nl g⁻¹ PF h⁻¹) al máximo observado en los frutos N78 (Figura 8B).

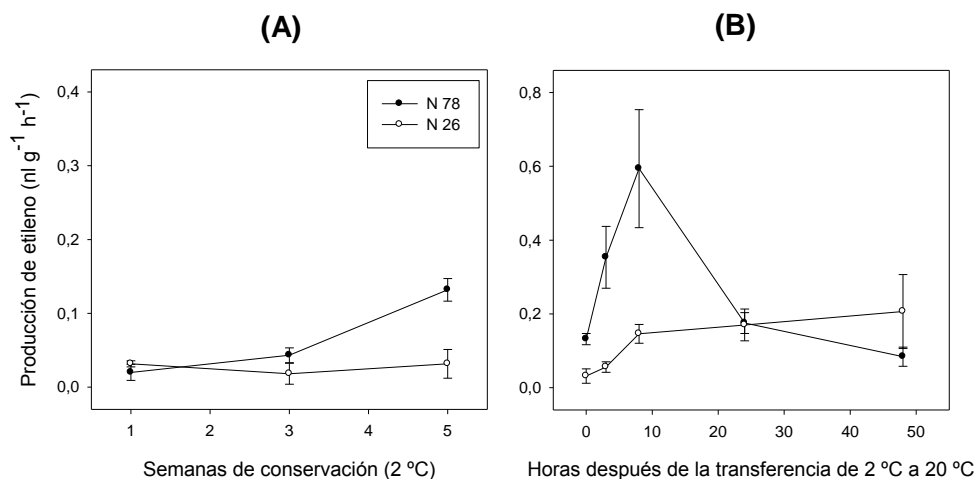


Figura 8. Producción de etileno de los frutos Nulpink N78 y N26 durante la conservación a 2 °C **(A)**; y durante 48 horas posteriores a la transferencia a 20 °C después de 5 semanas a 2 °C **(B)**.

4.1.4. Contenido y composición de carotenoides

El contenido y composición de carotenoides en el flavedo de los frutos de Nulpink en el momento de la cosecha y durante la conservación a 2 °C se detalla en la Tabla 4. El contenido de carotenoides totales (CT), calculado como la suma de los carotenoides individuales, fue siempre mayor en los frutos de N78 que en los N26. En el momento de la recolección el contenido de CT fue casi el doble en el flavedo de N78 que en N26 ($161,17 \pm 3,00$ frente a $85,74 \pm 1,01 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, respectivamente). Durante la conservación a 2 °C la concentración de CT aumentó en ambas variedades con respecto al inicio. Mientras que los frutos N26 duplicaron su contenido a las 5 semanas en los frutos N78 aumentó solo 1,4 veces, por lo que al final de la conservación la diferencia en el contenido de CT entre ambos híbridos disminuyó, y los frutos de N78 contenían 1,2 veces más CT que los N26.

La composición cualitativa de carotenoides individuales fue muy similar en el flavedo de N78 y N26, sin embargo, la concentración y su proporción respecto a los CT (Figura 17, Anexo 9.3), difirió entre ambos híbridos Nulpink. En el momento de la recolección, en los frutos de N78 el contenido de carotenos lineales (fitoeno, fitoflueno y ζ -caroteno) representó el 33% del total y las β,β -xantofilas⁽¹⁾ el 43%, siendo 9-*cis*-violaxantina la xantofila más abundante (27% de la los CT). En los frutos de N26, se observó una menor proporción de los carotenoides lineales (21%) mientras que las

⁽¹⁾ β,β -xantofilas: suma del contenido de β -criptoxantina, zeaxantina, mutatoxantina, *trans*-violaxantina, 9-*cis*-violaxantina y otras xantofilas minoritarias.

β,β -xantofilas representaron el 76% del total, siendo también la 9-*cis*-violaxantina la más abundante (53%).

Tanto en los frutos N78 como N26 el incremento en los CT observado a las 5 semanas fue principalmente debido al aumento en el contenido de carotenoides lineales (fitoeno, fitoflueno y ζ -caroteno). A su vez, el contenido de β -criptoxantina aumentó aproximadamente 3 veces en el flavedo de ambos híbridos, y el de anteraxantina se duplicó en N78 y aumentó 4 veces en N26. El contenido de 9-*cis*-violaxantina no cambió significativamente durante la conservación, aunque su proporción con respecto al total disminuyó debido al incremento de carotenos lineales.

En el momento de la recolección se observaron diferencias importantes en el contenido de carotenoides lineales entre N26 y N78, siendo aproximadamente 2,5 veces superior en N78. Sin embargo, la diferencia más importante entre ambos híbridos fue en el contenido del apocarotenoide β -citraurina, que imparte color rojizo-anaranjado al flavedo de los cítricos, ya que en el momento de la recolección la concentración fue 18 veces mayor en N78 respecto a N26 (35,02 y 2,19 $\mu\text{g g}^{-1}$ PF, respectivamente). A las 5 semanas de conservación el contenido de β -citraurina no varió de forma importante en el flavedo de N78, sin embargo, descendió a niveles no cuantificables en los frutos N26. Otra diferencia remarcable entre los dos híbridos fue el contenido de β -criptoxantina que, salvo en la primera semana de conservación, fue casi el doble en los frutos N26 respecto a N78.

Tabla 4. Contenido ($\mu\text{g g}^{-1}$ PF) y composición de los principales carotenoides en frutos Nulpink N78 y N26, en el momento de la recolección, y después de 1 y 5 semanas de conservación a 2 °C.

CAROTENOIDES	N 78			N 26		
	recolección	1 semana	5 semanas	recolección	1 semana	5 semanas
Fitoeno+Fitoflueno+ ζ -caroteno	52,76 \pm 1,81	111,81 \pm 7,91	98,37 \pm 1,12	17,97 \pm 0,45	41,33 \pm 1,12	90,93 \pm 12,25
Luteína	0,23 \pm 0,07	0,89 \pm 0,42	0,83 \pm 0,55	0,16 \pm 0,21	nd	0,52 \pm 0,04
β -Criptoxantina	2,45 \pm 1,05	9,20 \pm 2,28	7,63 \pm 1,47	5,33 \pm 0,77	6,19 \pm 0,61	15,05 \pm 2,66
Zeaxantina	nd	0,27 \pm 0,01	nd	nd	nd	nd
Mutatoxantina	0,50 \pm 0,11	1,22 \pm 1,15	1,81 \pm 0,23	nd	nd	nd
Anteraxantina	7,55 \pm 0,80	12,87 \pm 1,03	14,48 \pm 3,22	4,35 \pm 1,24	3,70 \pm 0,02	15,67 \pm 3,57
<i>trans</i> -Violaxantina	6,38 \pm 0,35	9,30 \pm 0,31	7,40 \pm 0,52	3,86 \pm 0,50	3,13 \pm 0,29	3,81 \pm 0,06
9- <i>cis</i> -Violaxantina	43,06 \pm 1,63	57,40 \pm 2,35	45,36 \pm 0,35	45,49 \pm 3,11	43,36 \pm 2,42	47,42 \pm 1,09
Otras β,β -xantofilas ⁽¹⁾	8,78 \pm 1,96	10,72 \pm 0,44	11,59 \pm 0,41	6,46 \pm 1,35	5,87 \pm 0,67	6,48 \pm 0,06
β -citraurina	35,02 \pm 4,19	49,47 \pm 4,37	30,71 \pm 3,40	2,12 \pm 0,39	1,26 \pm 0,84	nd
Otros apocarotenoides	4,43 \pm 0,52	7,40 \pm 1,15	4,81 \pm 0,83	nd	nd	nd
TOTAL	161,17 \pm 3,00	270,42 \pm 21,61	223,00 \pm 1,08	85,74 \pm 1,01	104,85 \pm 5,92	179,87 \pm 6,95

nd: no detectado

(1) Suma de β,β -xantofilas no identificadas.

4.2. CONSERVACIÓN DE FRUTOS DE LOS HÍBRIDOS DE MURCOTT X KIYOMI A BAJAS TEMPERATURAS

4.2.1. Índice de madurez e índice de color

En el momento de la recolección de los frutos de los dos híbridos Murcott x Kiyomi utilizados en este trabajo (MxK35 y MxK61), los de MxK35 presentaron un mayor índice de madurez que los MxK61, debido principalmente al menor valor de acidez, ya que los sólidos solubles fueron similares en ambas variedades (Tabla 5).

Tabla 5. Acidez (%), sólidos solubles (° Brix) e índice de madurez (S.S. / Acidez) en frutos de Murcott x Kiyomi al momento de cosecha (27 de enero).

Variedad	Acidez (%)	S.S. (° Brix)	IM (S.S. / Acidez)
MxK 35	0,61 ± 0,01	9,00 ± 0,01	14,80 ± 0,22
MxK 61	1,40 ± 0,01	10,65 ± 0,07	7,60 ± 0,10

El índice de color a/b en el momento de la recolección fue de $0,78 \pm 0,03$ en los frutos MxK35 y $0,18 \pm 0,02$ en los frutos MxK61 (Figura 9A), correspondientes a la coloración anaranjada y amarilla, respectivamente, de cada uno de los híbridos. Durante la conservación a 2 °C la relación a/b se mantuvo constante en ambos genotipos (Figura 9B).

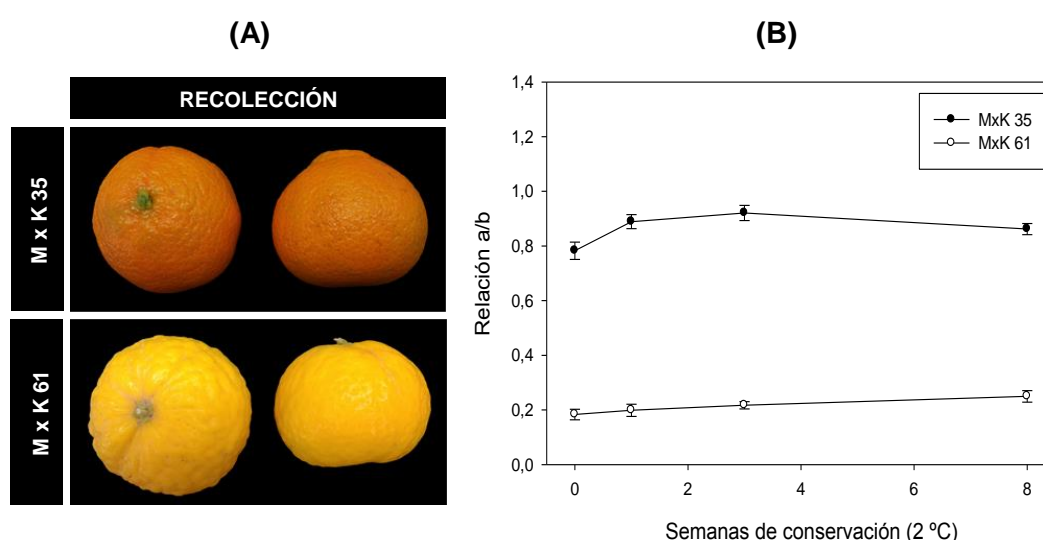


Figura 9. Aspecto externo de los frutos de MxK35 y MxK61 en el momento de recolección (0) (A); y evolución del índice de color (relación Hunter a/b) durante el periodo de conservación a 2 °C (B).

4.2.2. Evaluación del daño por frío

En los frutos de los 2 genotipos evaluados se apreciaron DF a partir de las 3 semana de conservación a 2 °C, pero la intensidad y severidad de los mismos fueron distintas entre ambos (Figura 10A y B). El IDF fue siempre mayor en los frutos MxK61 que en MxK35, llegando a las 8 semanas de conservación a ser casi 4 veces superior (2,31 frente a 0,59).

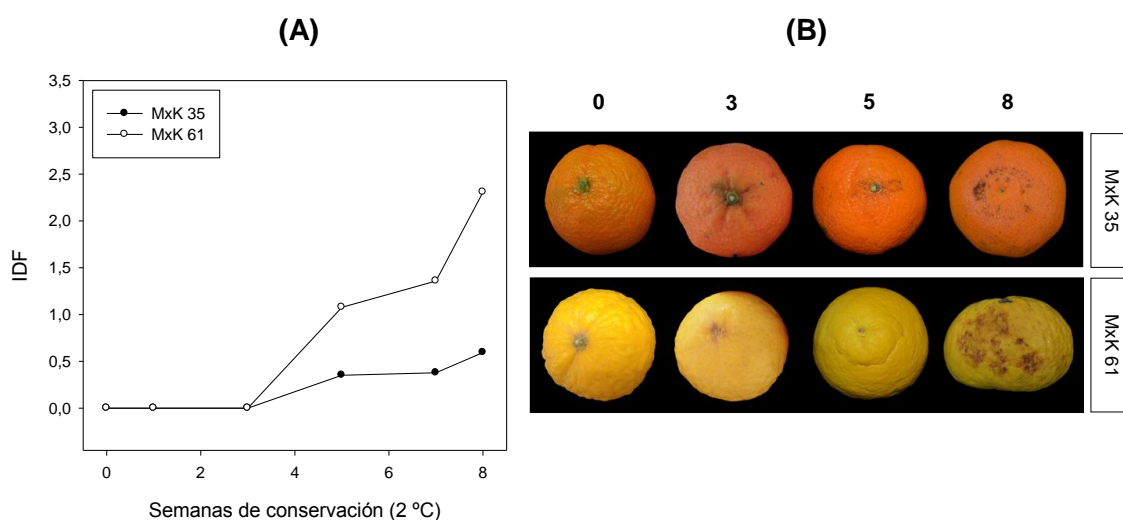


Figura 10. Evolución del índice de daño por frío (IDF) durante la conservación a 2 °C en los frutos MxK35 y MxK61 (A); aspecto externo de los frutos en la recolección (0) y a las 3, 5 y 8 semanas de conservación a 2 °C (B).

Hasta la tercera semana de conservación no se observaron DF en ninguna de las dos variedades evaluadas (100% de los frutos sin DF) (Figura 11). A partir de la 3ª semana se observaron los primeros síntomas de 'picado' en la piel y marcaron las diferencias entre ambos genotipos. En dicha fecha, el 69% de los frutos MxK61 presentaban DF, mientras que solo el 27% de los frutos MxK35 mostraban síntomas (73% sin daños). Al finalizar la conservación (8 semanas) el porcentaje de frutos MxK61 afectados fue del 96% y del 49% en MxK35. En la Figura 11 se observa que el mayor IDF en los frutos de MxK61 se debe a un mayor número de frutos afectados y con mayor severidad de síntomas, especialmente frutos con síntomas severos y medios. A las 8 semanas de conservación, el porcentaje de frutos con síntomas severos y medios era del 42% y 50%, respectivamente, en MxK61, mientras que en los frutos MxK35 no se observaron síntomas severos y alrededor del 10% de medios (38% de fruto sin daños).

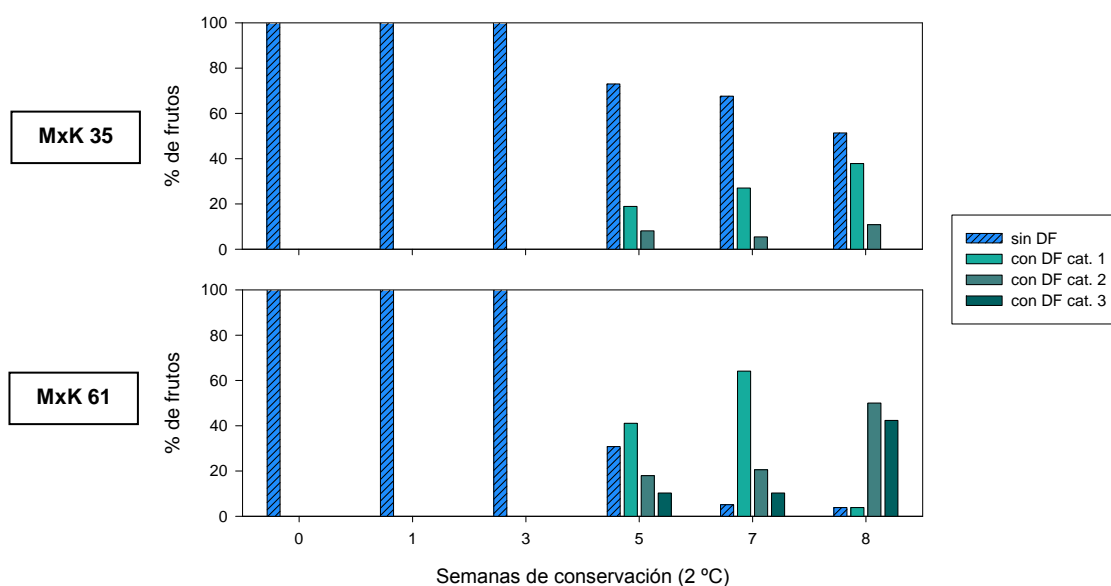


Figura 11. Distribución de los porcentajes de frutos de Murcott x Kiyomi afectados por daños de frío (DF) durante la conservación a 2 °C. Los números de cada categoría son; 1: ligeros, 2: medios y 3: severos.

4.2.3. Evaluación de la producción de etileno

En la Figura 12A se representa la producción de etileno en los frutos híbridos MxK61 y MxK35 durante las 8 semanas de conservación a 2 °C. Hasta la tercera semana de conservación la producción de etileno fue muy baja en ambos genotipos, sin embargo, a partir de la 5ª semana se observó un leve aumento en los frutos MxK35 y más acusado en MxK61, que coincidió en esta última con la aparición de DF (69% de frutos con DF). Al finalizar la conservación la producción de etileno fue 3,5 veces superior en los frutos MxK61 ($0,50 \pm 0,05 \text{ nl g}^{-1} \text{ PF h}^{-1}$) que en los MxK35 ($0,14 \pm 0,05 \text{ nl g}^{-1} \text{ PF h}^{-1}$), acorde a la mayor incidencia y severidad de DF observada en esa variedad.

Durante la transferencia a 20 °C la producción de etileno continuó siendo superior en los frutos MxK61, y a las 8 horas se observó un aumento transitorio en la producción de etileno en ambos híbridos que fue 6 veces superior a la del momento de la transferencia ($23,15 \pm 0,42$ en MxK61 y $0,87 \pm 0,33 \text{ nl g}^{-1} \text{ PF h}^{-1}$ en MxK35 (Figura 12B)). La producción de etileno disminuyó ligeramente a las 24h y, posteriormente, se mantuvo estable pero a niveles superiores en los frutos que desarrollaron más DF.

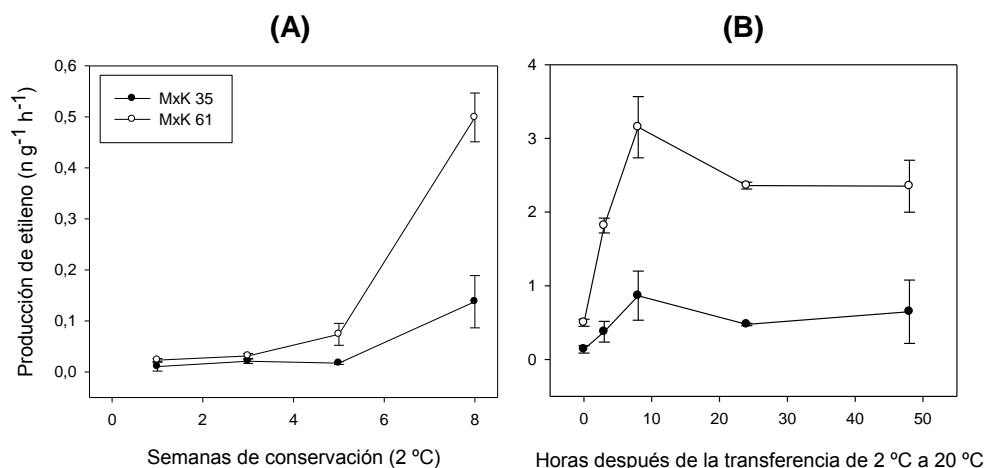


Figura 12. Producción de etileno de los frutos MxK35 y MxK61 durante la conservación a 2 °C **(A)** y durante 48 horas posteriores a la transferencia a 20 °C después de 8 semanas a 2 °C **(B)**.

4.2.4. Contenido y composición de carotenoides

El contenido de CT fue aproximadamente 5 veces superior en el flavedo de los frutos de MxK35 en comparación con los de MxK61. En el momento de la recolección el contenido de CT en los frutos MxK35 fue de $255,63 \pm 7,66 \mu\text{g g}^{-1}$ PF y en MxK61 de $51,68 \pm 1,31 \mu\text{g g}^{-1}$ PF. Al finalizar la conservación (8 semanas a 2 °C) el contenido de CT aumentó un 10% en los frutos MxK35 y un 25% en los MxK61, manteniéndose, por tanto, la diferencia en el contenido en CT entre ambos genotipos.

En la Tabla 6 se muestran las concentraciones de los carotenoides individuales en el flavedo de los frutos en el momento de la cosecha y durante la conservación a 2 °C. En ambos híbridos, tanto en el momento de la recolección como al final de la conservación, los carotenoides mayoritarios fueron las β,β -xantofilas, siendo la 9-*cis*-violaxantina la más abundante, representando entre el 40-45% de los CT, y siempre en concentraciones muy superiores en MxK35. Es interesante destacar las marcadas diferencias en la concentración de β -citraurina y β -criptoxantina entre MxK61 y MxK35. En MxK61 el contenido de estos dos carotenoides fue prácticamente nulo, mientras que en MxK35 la concentración de β -citraurina fue de $12,78 \pm 2,63 \mu\text{g g}^{-1}$ PF y la de β -criptoxantina de aproximadamente $35 \mu\text{g g}^{-1}$ PF, lo que representa el 14% de los CT en la recolección. Otra diferencia entre ambos híbridos fue el contenido de los carotenoides iniciales de la ruta (fitoeno, fitoflueno y ζ -caroteno), ya que tanto al inicio como al final del almacenamiento su concentración fue superior en el híbrido MxK61.

En los frutos MxK35 el aumento en los CT durante la conservación fue principalmente debido a un incremento de violaxantina (isómeros trans y 9-cis) y β -criptoxantina, donde esta última experimentó un aumento del 45% a las 8 semanas de conservación, respecto a los valores iniciales. Sin embargo, los valores de β -citraurina a las 3 y 8 semanas fueron la mitad de los iniciales. En los frutos MxK61 no se observaron cambios importantes en la concentración de los carotenoides individuales durante el almacenamiento y solo el contenido de violaxantina y los carotenos lineales aumentaron ligeramente durante la conservación.

Tabla 6. Contenido ($\mu\text{g g}^{-1}$ PF) y composición de los principales carotenoides en frutos de MxK35 y MxK61, en el momento de la recolección, y a las 3 y 8 semanas de conservación a 2 °C.

CAROTENOIDES	MxK35			MxK61		
	recolección	3 semanas	8 semanas	recolección	3 semanas	8 semanas
Fitoeno+Fitoflueno+ ζ -caroteno	5,03 \pm 0,35	15,29 \pm 1,86	2,48 \pm 1,39	8,49 \pm 0,90	13,26 \pm 0,07	12,99 \pm 1,08
Luteína	8,41 \pm 0,44	6,38 \pm 1,56	4,41 \pm 0,41	1,29 \pm 0,21	1,20 \pm 0,05	0,93 \pm 0,11
β -criptoxantina	35,99 \pm 1,19	38,40 \pm 0,35	52,31 \pm 0,99	0,32 \pm 0,03	0,67 \pm 0,20	0,86 \pm 0,21
Zeaxantina	1,52 \pm 0,20	nd	nd	nd	nd	nd
Mutatoxantina	4,80 \pm 0,68	5,13 \pm 0,25	4,37 \pm 0,62	nd	nd	nd
Anteraxantina	19,42 \pm 1,25	26,41 \pm 1,85	23,73 \pm 3,07	0,68 \pm 0,42	0,49 \pm 0,06	0,64 \pm 0,03
<i>trans</i> -Violaxantina	33,84 \pm 1,52	42,21 \pm 3,58	42,13 \pm 0,30	11,73 \pm 0,55	9,97 \pm 0,46	11,32 \pm 0,93
9- <i>cis</i> -Violaxantina	112,43 \pm 3,49	120,22 \pm 15,35	120,59 \pm 1,23	23,08 \pm 0,61	20,02 \pm 0,45	27,26 \pm 1,60
Otras β,β -xantofilas ⁽¹⁾	19,85 \pm 2,87	35,03 \pm 1,25	27,02 \pm 1,40	6,10 \pm 0,39	8,04 \pm 3,45	10,45 \pm 4,31
β -citraurina	12,78 \pm 2,63	6,81 \pm 1,67	6,03 \pm 3,62	nd	nd	nd
Otros apocarotenoides	1,55 \pm 0,10	1,34 \pm 0,11	nd	nd	nd	nd
TOTAL	255,63 \pm 7,66	297,23 \pm 24,22	283,06 \pm 5,79	51,68 \pm 1,31	53,65 \pm 3,20	64,46 \pm 0,42

nd: no detectado

(1) Suma de β,β -xantofilas no identificadas

4.3. CONSERVACIÓN DE FRUTOS DE LAS VARIETADES COMERCIALES DE MANDARINA CLEMENTINA DE NULES, FORTUNE Y NADORCOTT A BAJAS TEMPERATURAS

4.3.1. Índice de madurez e índice de color

Los frutos de las tres variedades se recolectaron en la época próxima a su maduración comercial, a mediados de enero en la Clementina de Nules, y a mitad de febrero los de Fortune y Nadorcott. El índice de maduración, contenido de sólidos solubles, y nivel de acidez en el momento de la recolección se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Acidez (%), Sólidos solubles (° Brix) e índice de madurez (S.S. / Acidez) en frutos de Clementina de Nules (CMN), Fortune (FORT) y Nadorcott (NAD) en el momento de cosecha (13 de enero en CMN y 10 de febrero en FORT y NAD).

Variedad	Acidez (%)	S.S. (° Brix)	IM (S.S / Acidez)
CMN	0,49 ± 0,01	11,50 ± 0,14	23,34 ± 0,14
FORT	1,72 ± 0,03	14,00 ± 0,01	8,13 ± 0,13
NAD	0,70 ± 0,04	10,90 ± 0,14	15,95 ± 0,85

Los frutos de Clementina tuvieron un IM superior a los otros dos, especialmente por la baja acidez. Los frutos de Fortune fueron los de menor IM y con valores de acidez muy superiores, mientras que los de la mandarina Nadorcott presentaron valores intermedios a los otros dos (Tabla 7).

En la Figura 13 se muestra el aspecto externo de las tres variedades de mandarina en el momento de su recolección (**A**) y la evolución del índice de color durante la conservación a 2 °C (**B**). En todo momento los frutos de Nadorcott presentaron una mayor relación a/b (entre 1,20 y 1,31) que los de Fortune (entre 0,95 y 1,08) y los de Clementina de Nules (entre 0,85 y 1,01). En ninguna de las 3 variedades se observaron cambios importantes en la relación a/b durante la conservación a 2°C (Figura 13B).

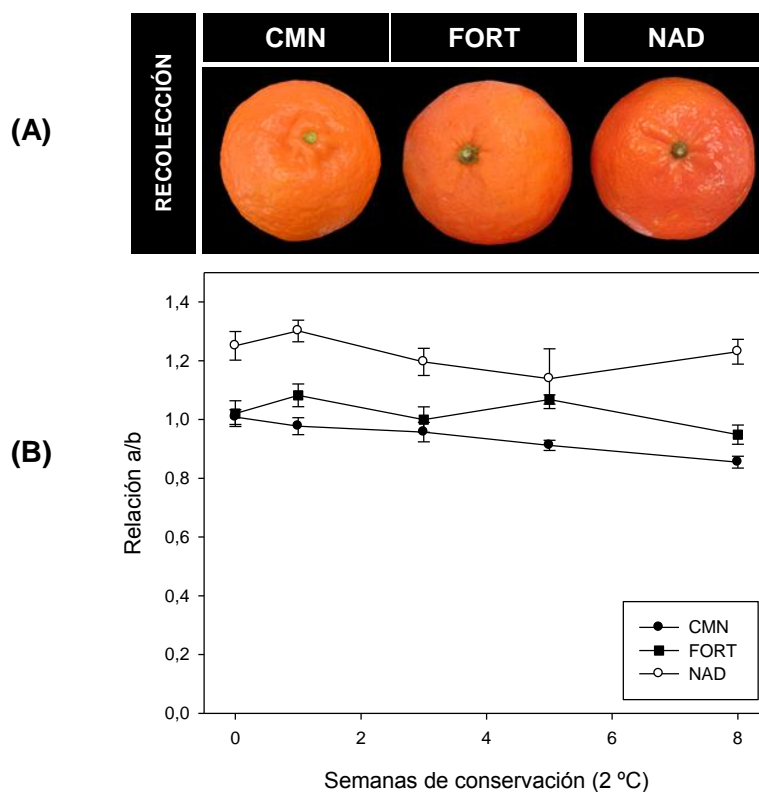


Figura 13. Aspecto externo de los frutos de las mandarinas Clementina de Nules (CMN), Fortune (FORT), Nadorcott (NAD) en el momento de recolección (0) **(A)**; y evolución del índice de color (relación Hunter *a/b*) durante el periodo de conservación a 2 °C **(B)**.

4.3.2. Evaluación del daño por frío

Los frutos de las tres variedades de mandarina comerciales seleccionadas presentaron diferencias en la sensibilidad a los DF en el siguiente orden Fortune > Clementina de Nules > Nadorcott (Figura 14A y B).

El DF comenzó a manifestarse en los frutos de Fortune a partir de la segunda semana de conservación, incrementando con el tiempo de exposición a 2 °C hasta alcanzar daños severos a las 6 semanas. En las variedades Clementina de Nules y Nadorcott comenzaron a observarse síntomas de DF a partir de la quinta semana de conservación, aunque en Nadorcott la incidencia y severidad de los mismos fue mucho menor. Al finalizar la conservación, el IDF era de 2,9 en los frutos de Fortune, 1,6 en Clementina de Nules y 0,26 en Nadorcott (Figura 14B).

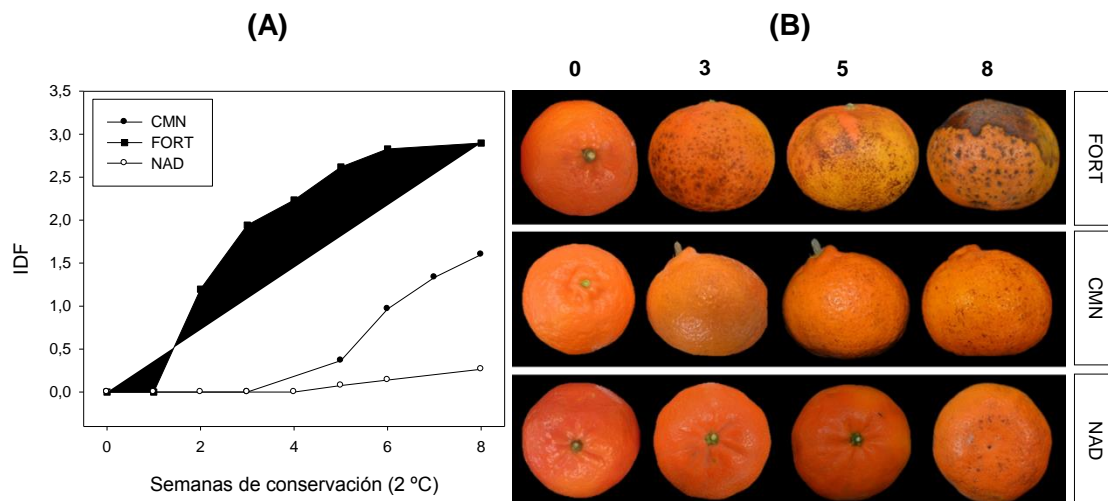


Figura 14. Evolución del índice de daño por frío (IDF) durante la conservación a 2 °C en los frutos de Clementina de Nules (CMN), Fortune (FORT) y Nadorcott (NAD) **(A)**; aspecto externo de los frutos en la recolección (0) y a las 3, 5 y 8 semanas de conservación **(B)**.

En la Figura 15 se observa la distribución de los frutos de las tres variedades afectados por diferente intensidad de DF. En la mandarina Fortune a las 2 semanas de conservación el 63% de los frutos presentaban DF y a las 5 semanas todos los frutos estaban dañados, 29% con síntomas medios y 67% severos. La severidad y el porcentaje de DF aumentaron con el tiempo de conservación, alcanzando finalmente a la totalidad de los frutos, 90% con síntomas severos y 10% medios. Los frutos de Clementina de Nules y Nadorcott no presentaron DF hasta la 3ª semana de conservación, y a la 5ª semana el porcentaje de frutos de Clementina de Nules con daños era del 27% y del 8% en Nadorcott. Después de 8 semanas a 2 °C el 83% de los frutos de Clementina de Nules presentaban DF, 30% con síntomas severos y 17% medios. En Nadorcott el porcentaje de frutos con DF aumentó ligeramente con el tiempo de exposición a bajas temperaturas, pero durante todo el periodo el porcentaje de frutos sin DF era superior al de frutos afectados. Así, después de 8 semanas solo el 24% de los frutos presentaron DF, y la mayor parte con síntomas ligeros (21%).

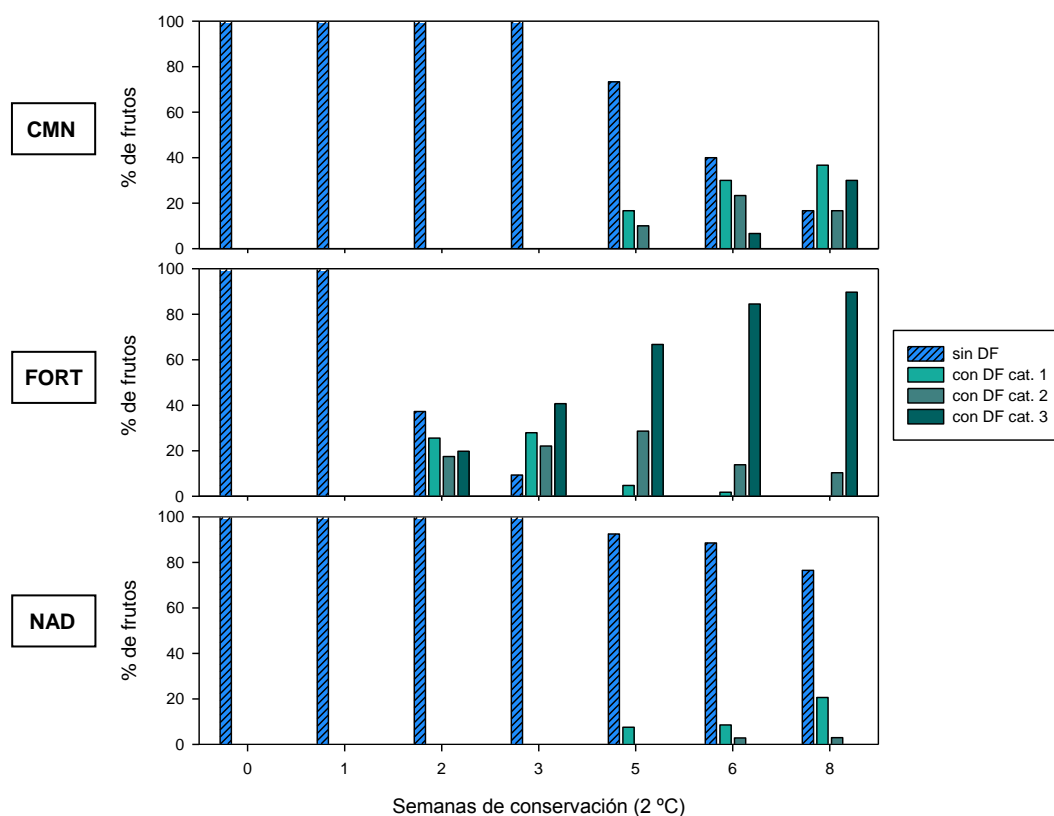


Figura 15. Distribución de los porcentajes de frutos de Clementina de Nules (CMN), Fortune (FORT) y Nadorcott (NAD) afectados por daños de frío (DF) durante la conservación a 2 °C. Los números de cada categoría son; 1: ligeros, 2: medios y 3: severos.

4.3.3. Evaluación de la producción de etileno

De las tres variedades estudiadas, los frutos de Clementina de Nules fueron los que presentaron una mayor producción de etileno durante la conservación refrigerada (Figura 16A). En Clementina de Nules y Fortune se observó un máximo en la emisión de etileno a las 3 semanas de conservación ($0,21 \pm 0,02$ y $0,12 \pm 0,02$ nl g^{-1} PF h^{-1} , respectivamente), que descendió posteriormente. En el caso de la mandarina Nadorcott, la producción de etileno fue muy baja y solo aumentó levemente con el tiempo de conservación hasta un máximo a las 8 semanas $0,09 \pm 0,04$ nl g^{-1} PF h^{-1} , pero de menor magnitud que en las otras 2 variedades.

La simulación de la vida comercial (48h a 20 °C) se realizó a las 8 semanas de conservación en las tres variedades (Figura 16B y C), pero dado que a este tiempo los frutos de Fortune estaban muy deteriorados por la intensidad de los DF, también se

realizó una transferencia a las 3 semanas de conservación a 2 °C (Figura 16C). Durante la transferencia a las 8 semanas (Figura 16B) se observó un aumento transitorio en la producción a las 8 horas en los frutos de Clementina de Nules (0,84 ± 0,05 nl g⁻¹ PF h⁻¹) y a las 3 horas en Nadorcott pero de menor magnitud (0,37 ± 0,01 nl g⁻¹ PF h⁻¹). La producción durante la transferencia fue 4 veces superior al valor máximo detectado durante la conservación a 2 °C. En el caso de mandarina Fortune (Figura 16C), se observó un aumento a las 3 horas de transferencia los dos momentos evaluados (3 y 8 semanas), pero la producción de etileno a las 3 semanas fue 8 veces superior a la inicial (1,02 ± 0,19 nl g⁻¹ PF h⁻¹) mientras que a las 8 semanas, en frutos con síntomas severos de DF, el aumento en la producción de etileno fue muy reducido (0,21 ± 0,02 nl g⁻¹ PF h⁻¹), y unas 5 veces inferior al que se produjo en los frutos conservados a 2 °C durante 3 semanas.

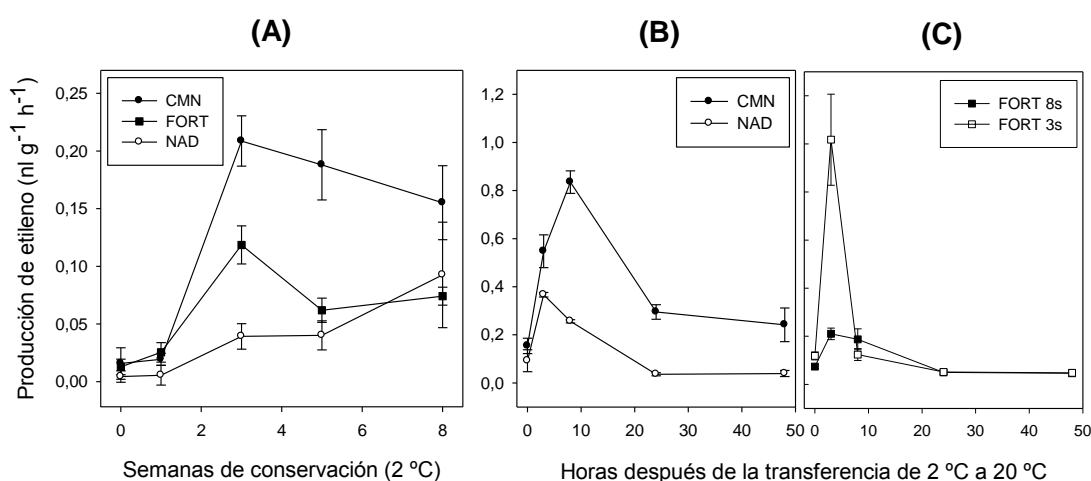


Figura 16. Producción de etileno de los frutos de Clementina de Nules (CMN), Fortune (FORT) y Nadorcott (NAD) durante la conservación a 2 °C (A); durante 48 horas posteriores a la transferencia a 20 °C después de las 8 semanas en CMN y NAD (B); y a las 3 (3s) y 8 (8s) semanas en FORT (C).

4.3.4. Contenido y composición de carotenoides

El contenido y composición de carotenoides en el flavedo de los frutos de Clementina de Nules, Fortune y Nadorcott en el momento de la recolección y durante la conservación a 2 °C se presentan en la Tabla 8. En la Figura 19 (Anexo 9.3) pueden observarse la proporción de carotenoides con respecto al contenido total en cada variedad.

En los frutos de Clementina de Nules, el contenido de CT en el momento de la cosecha era próximo a 120 µg g⁻¹ PF, siendo la 9-*cis*-violaxantina y la β-citraurina los

más abundantes (35% y 20% del total, respectivamente). A las 8 semanas de conservación los CT aumentaron cerca de un 40% hasta valores de $165 \pm 2,21 \mu\text{g g}^{-1}$ PF. El incremento en los CT se debió al aumento de la mayoría de carotenoides, principalmente las β,β -xantofilas, que pasaron de representar el 63% en la recolección al 81% a las 8 semanas. Es especialmente destacable el incremento de 4 veces en el contenido en la β,β -xantofila β -criptoxantina, pasando de representar el 5% de los CT en la recolección al 14% al final de la conservación. Por el contrario, los carotenoides lineales y la β -citraurina disminuyeron un 27% y 33%, respectivamente, durante la conservación.

El contenido de CT en los frutos de Fortune fue cerca de un 50% superior al de Clementina de Nules ($185,90 \pm 17,86 \mu\text{g g}^{-1}$ PF) en el momento de la recolección y la 9-*cis*-violaxantina y la β -citraurina fueron los más abundantes, representando un 44% y 22% del contenido total, respectivamente. A las 8 semanas de conservación los CT aumentaron casi un 40% ($256,32 \pm 9,12 \mu\text{g g}^{-1}$ PF) debido principalmente a un aumento de la *trans*-violaxantina, mutatoxantina (derivado de anteraxantina) y carotenos lineales. En los frutos de Fortune la concentración de β -criptoxantina en el momento de recolección fue baja y disminuyó un 40% durante la conservación. No se observaron variaciones en el contenido de 9-*cis*-violaxantina y β -citraurina durante la conservación.

El contenido de CT en los frutos de Nadorcott en el momento de la cosecha fue de $582,20 \pm 22,85 \mu\text{g g}^{-1}$ PF, muy superior al de los frutos de las otras 2 variedades de mandarina. La 9-*cis*-violaxantina (33% del total) fue la xantofila principal y, a su vez, se detectaron concentraciones importantes de carotenos lineales (13%), *trans*-violaxantina (11%), β -criptoxantina (10%) y del apocarotenoide β -citraurina (aproximadamente un 10%). A las 8 semanas de conservación, los CT disminuyeron un 30% con respecto a los valores iniciales, debido principalmente a un descenso de los carotenos incoloros y la 9-*cis*-violaxantina, que disminuyeron un 40% aproximadamente, y de la β -citraurina, que experimentó una reducción del 74%. El contenido de β -criptoxantina era muy alto ($61,46 \pm 8,05 \mu\text{g g}^{-1}$ PF) en la recolección y aumentó durante la conservación, alcanzando valores de $72,32 \pm 5,40 \mu\text{g g}^{-1}$ PF a las 8 semanas.

Al comparar las tres variedades evaluadas, los frutos de Nadorcott presentaron 3 veces más CT que los frutos de Fortune, y casi 5 veces más que los de Clementina de Nules en el momento de la recolección. Las diferencias en contenido más importantes fueron en la violaxantina (isómeros *trans* y 9-*cis*), carotenos lineales del inicio de la ruta y la β -criptoxantina. Es importante destacar que, en el momento de la recolección,

el contenido de β -criptoxantina en Nadorcott fue 10 veces mayor al de Clementina de Nules y 17 veces más que en Fortune. Además, las diferencias en los niveles de esta xantofila se mantuvieron durante la conservación refrigerada.

Tabla 8. Contenido ($\mu\text{g g}^{-1}$ PF). y composición de los principales carotenoides en frutos de Clementina de Nules (CMN), Fortune (FORT) y Nadorcott (NAD), en el momento de la recolección y a las 8 semanas de conservación a 2 °C.

CAROTENOIDES	CMN		FORT		NAD	
	recolección	8 semanas	recolección	8 semanas	recolección	8 semanas
Fitoeno+Fitoflueno+ ζ -caroteno	14,20 \pm 2,24	10,34 \pm 0,83	8,29 \pm 0,12	22,21 \pm 2,10	79,48 \pm 5,02	46,33 \pm 0,42
Luteina	0,66 \pm 0,17	3,12 \pm 0,16	0,58 \pm 0,34	2,07 \pm 0,57	9,82 \pm 1,82	11,78 \pm 0,69
β -caroteno	nd	0,67 \pm 0,01	nd	nd	nd	4,57 \pm 0,23
β -criptoxantina	5,88 \pm 0,37	23,14 \pm 2,13	3,44 \pm 1,02	1,96 \pm 0,43	61,46 \pm 8,05	72,32 \pm 5,40
Zeaxantina	nd	0,60 \pm 0,01	nd	nd	nd	2,44 \pm 0,27
Mutatoxantina	1,72 \pm 0,17	6,77 \pm 2,21	11,97 \pm 2,28	26,16 \pm 2,48	11,05 \pm 2,26	11,64 \pm 1,08
Anteraxantina	4,24 \pm 2,08	12,99 \pm 2,91	2,48 \pm 0,94	4,98 \pm 0,14	31,70 \pm 0,11	28,22 \pm 1,86
<i>trans</i> -Violaxantina	11,13 \pm 3,61	21,02 \pm 0,58	16,19 \pm 0,59	37,33 \pm 0,45	68,00 \pm 13,08	67,17 \pm 5,48
9- <i>cis</i> -Violaxantina	42,39 \pm 10,64	55,74 \pm 1,77	83,17 \pm 2,01	81,94 \pm 3,72	196,06 \pm 3,43	116,60 \pm 6,18
Otras β , β -xantofilas ⁽¹⁾	9,82 \pm 1,95	14,39 \pm 3,73	15,74 \pm 3,26	34,28 \pm 0,86	58,63 \pm 9,19	26,17 \pm 4,39
β -citraurina	24,48 \pm 0,27	16,26 \pm 2,71	41,83 \pm 8,39	39,89 \pm 0,50	56,75 \pm 9,55	14,75 \pm 2,19
Otros apocarotenoides	4,54 \pm 1,20	2,39 \pm 0,01	2,20 \pm 1,02	5,50 \pm 2,13	9,26 \pm 1,03	nd
TOTAL	119,07 \pm 22,36	165,60 \pm 2,21	185,90 \pm 17,86	256,32 \pm 9,12	582,20 \pm 22,85	401,99 \pm 28,19

nd: no detectado

(1) Suma de β , β -xantofilas no identificadas

5. DISCUSIÓN

La exposición prolongada a temperaturas próximas a la congelación durante el almacenamiento y transporte de frutos cítricos es un reto en especies y variedades que presentan sensibilidad al frío y desarrollan lesiones en la piel, al depreciar su calidad comercial. Debido a la repercusión económica de los frutos cítricos, y a que existen numerosos factores que influyen en su tolerancia a los DF, muchos de ellos impredecibles, existe un gran interés en profundizar en el conocimiento de las diferentes respuestas y la sensibilidad al frío en los frutos de las diferentes especies y variedades de cítricos. Por tanto, en este trabajo se ha abordado el estudio de la relación entre la coloración y composición de pigmentos carotenoides en diferentes frutos cítricos, y su relación con la sensibilidad a desarrollar DF durante la conservación postcosecha a bajas temperaturas.

La influencia de la coloración del flavedo sobre la susceptibilidad al DF ha sido previamente estudiada en frutos de pomelos con diferente pigmentación. En frutos de pomelo rojo se ha observado una mayor tolerancia al DF que en pomelos blancos (Dou, 2005; Lado et al., 2015b), y ésta se ha asociado a un mayor contenido total de carotenoides, y en concreto a la acumulación de licopeno (Lado et al., 2015b). Por otro lado, Cronje et al. (2011) observaron que los frutos de Clementina de Nules recolectados del interior del árbol y con una menor coloración, presentaron mayor susceptibilidad a desarrollar desórdenes postcosecha durante el almacenamiento. Por tanto, estos resultados previos sugieren una relación entre el contenido y composición de carotenoides en el flavedo y la susceptibilidad a desarrollar DF. Para llevar a cabo este TFM se seleccionaron frutos híbridos de dos cruces interespecíficos con coloración de la piel muy diferente (amarilla y naranja) y que, por tanto, era de esperar que presentasen una composición de pigmentos diferente y, además, frutos de tres variedades de mandarinas comerciales con diferente pigmentación en el flavedo y distinta sensibilidad a los DF.

En una primera aproximación experimental se utilizaron dos híbridos provenientes del cruce interespecífico entre pumelo Pink (*Citrus maxima*) y mandarina Clementina de Nules (*Citrus clementina*): N78 con flavedo color naranja y N26 de color amarillo. El análisis de carotenoides mostró que las diferencias en la coloración entre estos dos híbridos se explican por su distinta composición y contenido en carotenoides (Tabla 4). Así, el contenido de carotenoides totales (CT) fue siempre mayor en los frutos de coloración naranja N78 que en los de piel amarilla N26, y en el momento de la recolección los frutos N78 tuvieron casi el doble de CT que los N26. En comparación a los parentales (pumelo Pink y mandarina Clementina de Nules), la concentración de

CT en los híbridos N78 y N26 (~160-220 y ~85-180 $\mu\text{g g}^{-1}$ PF, respectivamente) fue superior a lo descrito en pumelos, que presentan contenidos bajos de carotenoides totales (entre 5-15 $\mu\text{g g}^{-1}$ PF, Alquezar et al., 2008b), y más próximos a los niveles en mandarinas (entre 25-300 $\mu\text{g g}^{-1}$ PF, Rodrigo et al., 2013a). La composición de carotenoides también fue más similar a la descrita en mandarinas, ya que en ambos híbridos predominó la acumulación de β,β -xantofilas (principalmente 9-*cis*-violaxantina), mientras que el flavedo de frutos de pumelo se acumulan principalmente carotenoides incoloros (Rodrigo et al., 2013a). Aunque en ambos híbridos predominó la acumulación de β,β -xantofilas, la proporción de éstas respecto al total en el momento de la cosecha fue superior en los frutos amarillos N26 (76%) que en los N78 (43%). Es interesante mencionar que en los dos híbridos también hubo una acumulación importante de los carotenos incoloros del inicio de la ruta, una peculiaridad característica del parental pumelo Pink. En el momento de la recolección, el contenido y proporción de carotenos incoloros con respecto al total fue mayor en los frutos N78 que en los N26, y se incrementó durante la conservación en ambos híbridos, representando casi la mitad de los CT al final de conservación (Tabla 4).

La principal diferencia en el perfil de carotenoides entre ambos híbridos, y que explica las diferencias de coloración, fue la mayor concentración de β -citraurina en los frutos N78. La β -citraurina es un apocarotenoide derivado del corte asimétrico de la β -criptoxantina y zeaxantina, que se acumula en el flavedo de frutos maduros de mandarinas y naranjas impartiendo un color naranja-rojizo intenso (Ma et al., 2013; Rodrigo et al., 2013a, 2013b). En el momento de la recolección, el contenido de β -citraurina en N78 fue alrededor de 35 $\mu\text{g g}^{-1}$ PF (22% de los CT), mientras que en N26 fue 14 veces menor (~2 $\mu\text{g g}^{-1}$ PF) y no se detectó a las 5 semanas de conservación. Esto indica que el híbrido N78 ha heredado la capacidad biosintética de este apocarotenoide del parental Clementina de Nules, ya que no se ha descrito su presencia en frutos de pumelo. Otra diferencia importante fue la distinta concentración de β -criptoxantina, ya que en la fecha de recolección y al finalizar la conservación fue el doble en los frutos N26 en comparación con N78. Sin embargo, la proporción de β -criptoxantina en N26 representó menos del 10% del total de carotenoides debido a la mayor proporción de xantofilas de color amarillo y carotenoides incoloros. La mayor concentración de β -criptoxantina asociada a una reducción muy significativa o ausencia de β -citraurina en frutos de N26, se podría explicar por una menor actividad de la enzima CCD4b que cataliza la fragmentación de β -criptoxantina para dar lugar a β -citraurina. Se ha descrito que la expresión de este gen es baja o nula en el flavedo de frutos cítricos que no acumulan β -citraurina y que presentan poca intensidad de

color o coloración amarillenta (Ma et al., 2013; Rodrigo et al., 2013b), lo que está en concordancia con el color de los frutos N26.

En ambos híbridos Nulpink la conservación a 2 °C provocó un deterioro acelerado del fruto a partir de la tercera semana de almacenamiento (Figura 5). Los frutos de color naranja N78, y con un mayor contenido de CT, presentaron una mayor incidencia y severidad de DF que los frutos amarillos N26, aunque estos últimos también presentaron síntomas de daño importantes, ya que al finalizar la conservación el 90% de los frutos tenían DF y el IDF fue alrededor de 1,5 (Figura 6 y Figura 7).

El efecto protector de determinados carotenoides frente al DF parece estar asociado a la capacidad antioxidante de estos, siendo capaces de eliminar especies reactivas al oxígeno (ROS). El aumento de ROS es una respuesta secundaria al DF en los tejidos vegetales, que generan un estrés oxidativo y provocan daños metabólicos y estructurales (Lafuente y Zacarías, 2006; Sevillano et al., 2009; Toivonen, 2004). En frutos de pomelo Star Ruby se ha observado que la mayor tolerancia al frío está asociada a la acumulación de licopeno, y que este carotenoide confiere una mayor capacidad para secuestrar el radical oxígeno singlete, en comparación con los frutos de piel amarilla y mayor susceptibilidad al DF (Lado et al., 2016). Stinco et al. (2016) evaluaron la relación entre el contenido de carotenoides y la capacidad antioxidante en distintas variedades de naranja y observaron una menor capacidad antioxidante en variedades que presentaron bajo contenido de carotenoides totales. Sin embargo, también detectaron una alta capacidad antioxidante en una variedad sin altos contenidos de carotenoides totales (Rhode Late), pero con un alto contenido de β -criptoxantina. En algunos casos también se ha encontrado que la β -criptoxantina, un carotenoide oxigenado de color naranja intenso, se correlaciona positivamente con la actividad antioxidante (Sanchez-Moreno et al., 2003). En este sentido, es interesante destacar que los frutos N26 presentaron menor contenido de CT que los frutos N78 pero casi el doble de β -criptoxantina, por lo que su mayor tolerancia al DF podría estar relacionada al contenido específico de esta xantofila y su capacidad antioxidante previamente descrita.

En este TFM se seleccionaron frutos híbridos resultantes del cruce entre mandarina Murcott y mandarina Kiyomi (MxK). La mandarina Kiyomi es un híbrido procedente del cruce entre naranja (*Citrus sinensis*) y mandarina Satsuma (*Citrus unshiu*), mientras que Murcott se originó de un cruce entre *Citrus sinensis* y *Citrus reticulata* (Futch y Jackson, 2003). Al igual que en los experimentos con Nulpink, se seleccionaron dos híbridos con diferencias marcadas en la coloración, MxK35 de flavedo naranja y MxK61 de color amarillo (Figura 9). La concentración de CT en los frutos de coloración

naranja osciló entre 250-300 $\mu\text{g g}^{-1}$ PF, y fue aproximadamente 5 veces mayor que en MxK61 (Tabla 6). El perfil de carotenoides observado en ambos híbridos fue el característico de frutos de mandarina, predominando la acumulación de β,β -xantofilas, y siendo la 9-*cis*-violaxantina la más abundante. Los frutos de MxK35 presentaron un mayor contenido en todos los carotenoides, excepto en los carotenos lineales fitoeno, fitoflueno y ζ -caroteno. El contenido de estos últimos representó entre el 16-20% del contenido de CT en los frutos MxK61 (dependiendo del momento de evaluación), mientras que en MxK35 la proporción fue siempre menor al 2%. Además de las diferencias en el contenido total de carotenoides, en los frutos de MxK35 se detectaron concentraciones significativas β -citraurina (6-12 $\mu\text{g g}^{-1}$ PF) y muy elevadas de β -criptoxantina (35-52 $\mu\text{g g}^{-1}$ PF), mientras que en MxK61 la concentración de β -criptoxantina fue menor a 1 $\mu\text{g g}^{-1}$ PF y no se detectó β -citraurina (Tabla 6). Esta diferencia en la composición de carotenoides explicaría las diferencias en coloración entre los dos híbridos debido al color que proporciona tanto la β -citraurina como la β -criptoxantina en concentraciones elevadas.

Durante el almacenamiento a 2 °C, los frutos amarillos MxK61 presentaron mayor DF que MxK35 (Figura 10). En ambos híbridos los síntomas de DF comenzaron a detectarse a la quinta semana de conservación, aunque en el caso de los frutos MxK35, la incidencia del DF fue menor y los daños fueron principalmente ligeros. Por tanto, MxK35, con mayor contenido en CT y específicamente mayor concentración de β -criptoxantina (representando entre el 14-18% de los CT), presentaron una mayor tolerancia al frío durante el almacenamiento postcosecha. Este resultado corrobora la observación anterior y añade una nueva evidencia hacia el posible papel de la β -criptoxantina en la tolerancia de los frutos de cítricos a los DF durante la conservación a las bajas temperaturas.

En un tercer bloque de experimentos se seleccionaron tres variedades comerciales de mandarina (Clementina de Nules, Fortune y Nadorcott), con diferente susceptibilidad a desarrollar DF y diferencias en la coloración. La mandarina Fortune presenta una alta susceptibilidad al DF durante la conservación a bajas temperaturas (Martínez-Téllez y Lafuente, 1997; Lafuente et al., 2003), mientras que la mandarina Clementina de Nules se ha descrito con baja o nula sensibilidad al frío (Herrera, 2007; Sala, 1998), y la variedad Nadorcott se considera como resistente a los DF, a pesar de que por su reciente introducción en el sistema productivo no existen datos tan sólidos como en los dos casos anteriores (El-Otmani et al., 2011). La comparación de los frutos maduros de las tres variedades evaluadas mostró una mayor coloración (relación a/b) y acumulación de CT en los frutos de Nadorcott (Tabla 8). Aunque no se

detectaron diferencias importantes en la relación a/b entre los frutos de Fortune y Clementina de Nules, el contenido de CT fue mayor en la mandarina Fortune.

Como ya se ha discutido previamente, la coloración de los frutos no solo está directamente relacionada al contenido total de carotenoides, sino también con el perfil y proporción de los carotenoides individuales (Rodrigo et al., 2013a). En el flavedo de las tres variedades de mandarina se identificaron los mismos carotenoides, siendo la 9-*cis*-violaxantina el carotenoide mayoritario. Sin embargo, la proporción de los distintos carotenoides individuales con respecto al total difirió entre ellas (Tabla 4Tabla 6Tabla 8). En el momento de la cosecha la β -citaurina fue el segundo carotenoide más abundante en los frutos de Fortune ($\sim 40 \mu\text{g g}^{-1}$ PF) y Clementina de Nules ($\sim 25 \mu\text{g g}^{-1}$ PF), pero el porcentaje de este apocarotenoide respecto al total fue en ambas variedades del 20%, lo que podría explicar que no se encontraran diferencias en el índice de color a/b entre ellas. Cabe mencionar que la concentración de β -citaurina determinada en este trabajo fue superior a la descrita previamente para estas variedades: $\sim 17 \mu\text{g g}^{-1}$ PF en Fortune (Rodrigo et al., 2013b) y entre 4-7 $\mu\text{g g}^{-1}$ PF en Clementina (Ríos et al., 2010; Rodrigo et al., 2013b). Esta discrepancia podría ser debida a que los frutos proceden de zonas de cultivo diferentes y a diferencias en el estado/momento de maduración y entre campañas. Además, los frutos de Clementina de Nules presentaron una mayor acumulación de β -criptoxantina, que representó entre el 5-14% de los CT, mientras que en Fortune fueron menos del 2%. Los valores de β -citaurina en Nadorcott fueron similares a los detectados en Fortune, sin embargo, la proporción del apocarotenoide respecto al total fue alrededor del 10% (en la recolección) e inferior a lo detectado en las otras variedades. Es de destacar la concentración extremadamente elevada de CT en el flavedo de Nadorcott, superior a $500 \mu\text{g g}^{-1}$ PF en el momento de la cosecha, situando al flavedo de esta variedad entre los tejidos de fruto más ricos en carotenoides descritos hasta el momento, no solo en cítricos sino también en otros frutos (Lado et al., 2016). Además, en el flavedo de Nadorcott no solo fueron muy altos los contenidos de β -citaurina y de β -criptoxantina, sino también los carotenos iniciales de la ruta, sugiriendo que en esta variedad existe un alto flujo de entrada de precursores en la ruta de carotenoides y elevada capacidad carotenogénica (biosintética) en etapas posteriores.

El comportamiento de las tres variedades de mandarina durante la conservación a 2 °C fue diferente (Figura 14). Así, en Fortune, la aparición de síntomas de DF comenzó a las 2 semanas de conservación y al final del periodo de almacenamiento la práctica totalidad de los frutos estuvieron afectados por síntoma severos (IDF próximo a 3), coincidiendo con lo descrito anteriormente para esta variedad (Martínez-Téllez y

Lafuente, 1997; Lafuente et al., 2003; Lafuente y Zacarias, 2006). En los frutos de Clementina de Nules, se identificaron los primeros síntomas de DF a las 5 semanas, y la incidencia y severidad fue menor que en Fortune pero mayor que en Nadorcott, y al final de la conservación más de la mitad de los frutos presentaban DF. La mandarina Nadorcott tuvo un buen comportamiento postcosecha, ya que las lesiones de DF fueron visibles a partir de las 5 semanas, con una progresión muy lenta y solo un 27% de los frutos presentaban DF al final de la conservación.

Estos resultados indican que los DF no parecieron estar directamente relacionados con la concentración de CT en las variedades comerciales estudiadas, ya que el contenido de CT entre las tres variedades fue en el siguiente orden: Nadorcott > Fortune > Clementina de Nules, tanto en el momento de la cosecha como después de 8 semanas de conservación a 2 °C (Tabla 8). Sin embargo, sí se observó que tanto en Clementina de Nules como en Nadorcott, con una menor incidencia y severidad de DF, presentaban una mayor acumulación de β -criptoxantina en el flavedo respecto a los frutos de la mandarina Fortune. Así, en el momento de la cosecha, el contenido en esta xantofila en los frutos de Nadorcott, más resistentes a los DF, fue 10 y 18 veces superior a los de los frutos de Clementina de Nules y Fortune, y después de 8 semanas de conservación, cuando ya se habían desarrollado los DF, las diferencias de β -criptoxantina fueron 3 y 37 veces superiores respecto a estas mismas mandarinas, respectivamente (Tabla 8). Estos resultados parecen indicar una relación entre el contenido en β -criptoxantina y la tolerancia a los DF durante la conservación de los frutos de mandarina en frío, de tal forma que los frutos de la mandarina más sensible son los que contienen menores contenidos en esta xantofila. Es indicativo, además, que la β -criptoxantina incrementó su contenido o se mantuvo en niveles muy elevados durante el periodo de conservación en los frutos más tolerantes a los DF, mientras que en la mandarina Fortune, más sensible al DF, la concentración fue muy baja. Esta evolución de la β -criptoxantina durante la conservación es concordante con la del contenido en β -citraurina, producto del corte de la β -criptoxantina, ya que los frutos de Fortune se mantuvieron en niveles muy altos durante la conservación, mientras que en Clementina de Nules y Nadorcott descendieron (Tabla 8). Este conjunto de resultados sugiere una posible mayor capacidad de la enzima CCD4b para fragmentar β -criptoxantina en β -citraurina en los frutos de la mandarina Fortune respecto a los de las otras dos mandarinas que, como consecuencia, mantendría los niveles de β -criptoxantina bajos y posiblemente una mayor sensibilidad a los DF. Estudios futuros de los cambios en la expresión del gen CCD4b en la piel de los frutos de las tres variedades, a la vez que comprobar si esta posible relación puede existir también en otras variedades de

mandarinas con distinto complemento de carotenoides y de β -criptoxantina, ayudará a caracterizar con más detalle y confirmar el papel de la β -criptoxantina en la tolerancia a los DF.

A pesar de que bajas temperaturas ralentizan la mayoría de procesos metabólicos, en todas las variedades e híbridos evaluados, con la excepción de la mandarina Nadorcott, se observó un aumento en el contenido de carotenoides durante la conservación a 2 °C. Matsumoto et al. (2009) evaluaron los cambios en el contenido de carotenoides en el flavedo de Satsuma durante el almacenamiento a 5, 20 y 30 °C, y observaron un aumento a las tres temperaturas después de 3 semanas, aunque de mayor magnitud en los frutos conservados a 20 °C. La coloración y contenido y/o composición de carotenoides en frutos de naranja Navelina no se vio alterada durante la conservación a 2 °C, mientras que a 12 °C se observó un incremento sustancial (Carmona et al., 2012). Otros autores evaluaron la coloración en frutos de mandarina conservados a 2 y 5 °C, y observaron una disminución de los mismos, aunque no determinaron el contenido de pigmentos (Tietel et al. 2011). En general, el flavedo de mandarinas e híbridos, es un tejido altamente carotenogénico en comparación con otras especies de frutos cítricos como naranjas o pomelos (Kato, 2012; Rodrigo et al., 2013a) y, por tanto, al igual que lo observado en mandarina Satsuma, es probable que en mandarinas se mantenga, incluso a bajas temperaturas, la capacidad de seguir sintetizando y acumulando carotenoides, lo que explicaría el diferente comportamiento de naranjas y mandarinas frente a esta condición postcosecha.

Por último, en frutos cítricos se ha observado que el almacenamiento a bajas temperaturas estimula la producción de etileno (McCollum y McDonald, 1991), y que el incremento en la producción es concomitante con el desarrollo de DF (Martínez-Téllez y Lafuente, 1997; Lafuente et al., 2003; Lado et al., 2015b). En este trabajo, se observó una mayor producción de etileno en los frutos híbridos que presentaron mayor DF (N78 en el caso de Nulpink, y MxK61 en el caso de Murcott x Kiyomi), y el aumento en la emisión de etileno coincidió con la aparición y evolución de los síntomas de DF (Figura 8 y Figura 12). Sin embargo, en las variedades comerciales no se observó una mayor producción de etileno en Fortune, que fue la variedad con mayor DF. En Clementina de Nules la producción de etileno fue mayor que en las otras dos mandarinas, y tuvo un aumento a las 3 semanas de conservación aun cuando no se observaban síntomas visibles de DF. McCollum y McDonald (1991) detectaron un incremento en la producción de etileno en frutos de pomelo conservados a 5 °C cuando todavía no se observaban síntomas en la piel de los frutos. Esto podría indicar que, aunque aún no se manifiesta el DF visualmente, a nivel celular ya comenzó el

daño. En el caso de mandarina Fortune, se observó un máximo en la producción a las 3 semanas de conservación que coincidió con la aparición de los síntomas de DF. En los frutos de Nadorcott, donde el DF fue muy bajo, la producción de etileno fue muy baja. Por lo tanto, estos resultados parecen indicar que la producción de etileno, en las condiciones evaluadas, es una respuesta al DF y no una causa o una respuesta a las bajas temperaturas, ya que en la mayoría de frutos evaluados se observó mayor producción en los más susceptibles al DF, y los aumentos en la producción coincidieron con la aparición de síntomas de DF.

La mayor producción de etileno en frutos con DF durante el almacenamiento a bajas temperaturas ha sido asociada a una mayor acumulación de transcritos de los genes de las enzimas ACS y ACO, que regulan los pasos claves en la síntesis de etileno (Lado et al., 2015b, 2015c; Maul et al., 2008). En frutos de varias especies se ha observado una estimulación de la producción de etileno al reacondicionar los frutos a temperatura ambiente tras un periodo de conservación a bajas temperaturas (Sevillano, 2009). A pesar que durante la conservación refrigerada se induce la transcripción de ACS y ACO, la actividad de las enzimas se ve disminuida a bajas temperaturas y aumenta rápidamente una vez que los frutos son transferidos a temperatura ambiente y se alcanzan temperaturas próximas a las óptimas de la actividad enzimática, explicando así el aumento rápido y marcado en la producción de etileno (Lado et al., 2015c, Sevillano, 2009).

Durante la transferencia a 20 °C de los frutos híbridos de los dos cruces seleccionados (al finalizar el periodo de conservación a 2 °C) se observó un máximo de producción a las 8 horas, siendo superior la producción en los frutos con mayor DF (Figura 8B y Figura 12B). En los frutos de Clementina de Nules y Nadorcott se observó un aumento en la producción de etileno entre 3 y 8 horas de transferencia a 20 °C, tras 8 semanas de conservación a 2 °C, y los valores detectados fueron 4 veces superiores a los observados durante la conservación. En Fortune, se realizó una primera transferencia a las 3 semanas de conservación y otra a las 8 semanas. En ambas transferencias se observó un máximo de producción a las 3 horas a 20 °C, pero fue 5 veces mayor a las 3 que a las 8 semanas. La baja producción de etileno en esta variedad durante la transferencia a las 8 semanas podría ser debida a que el tejido estaba tan severamente dañado por el frío, y con alto porcentaje de tejido necrosado, que la actividad celular podría estar muy afectada y reducida, mientras que cuando la transferencia se hizo (3 semanas) en la que los frutos estaban desarrollando los DF, la emisión de etileno fue muy alta e incluso de una magnitud similar a la que se observó en los frutos de Clemenules con síntomas de DF similar (a las 8 semanas).

Estos resultados corroboran observaciones previas, e indican que el aumento en la producción de etileno durante la exposición a bajas temperaturas parece estar relacionado o deberse a la inducción de los daños por frío, y que el aumento masivo de etileno durante la simulación de la vida comercial parece estar relacionado a la intensidad de los síntomas provocados durante la exposición, pero hasta un determinado nivel en el que no se produzcan lesiones severas que afecten y reduzcan el metabolismo celular y, en este caso, la posterior capacidad de síntesis de etileno.

6. CONCLUSIONES

1. Los frutos con diferente pigmentación de la piel de las variedades de mandarinas e híbridos seleccionados en este trabajo presentan un contenido y composición de carotenoides diferencial, y, en general, la intensidad de la coloración (índice a/b) se asoció a una mayor concentración del apocarotenoide β -citraurina más que con el contenido total de carotenoides.
2. Los híbridos Nulpink sufrieron un deterioro muy marcado durante la conservación postcosecha a 2 °C, aunque los síntomas no fueron el característico picado por frío, sino manchados o pardeamientos, de una apariencia similar a los que se produce por deshidratación. La intensidad de estos daños no se correlacionó con el contenido total de carotenoides.
3. En los frutos de los híbridos de mandarina Murcott x Kiyomi, la conservación a bajas temperaturas provocó mayor DF (manifestado como picado) y producción de etileno en la mandarina de color amarillo que en la de color naranja, que presentaba a su vez menor concentración de carotenoides totales y de β -criptoxantina.
4. Los frutos de las tres variedades de mandarinas comerciales utilizadas para este trabajo presentaron distinto contenido y evolución de carotenoides, así como sensibilidad a las bajas temperaturas de conservación, en el siguiente orden: Nadorcott (baja) < Clementina de Nules (media) < Fortune (alta).
5. El contenido en carotenoides en el flavedo de la mandarina Nadorcott es extremadamente elevado, representando uno de los tejidos de fruto más ricos en carotenoides descritos hasta el momento.
6. La mayor tolerancia a desarrollar DF (picado en la piel) en los frutos de las mandarinas e híbridos estudiados estuvo asociada a un mayor contenido de la xantofila β -criptoxantina en el momento de la cosecha, y no con el contenido total de carotenoides o el índice de color del fruto.
7. El aumento en la producción de etileno durante la conservación en frío coincidió con la aparición y el desarrollo de síntomas de DF. La transferencia de los frutos a 20 °C, en la simulación de vida comercial, estimuló la producción de etileno con un máximo entre las 3 y 8 horas.

7. BIBLIOGRAFÍA

Agócs, A., Nagy, V., Szabó, Z., Márk, L., Ohmacht, R. & Deli, J. (2007) Comparative study on the carotenoid composition of the peel and the pulp of different citrus species. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 8, 390-394.

Alquezar, B., Rodrigo, M. J., Lado, J. & Zacarías, L. (2013) A comparative physiological and transcriptional study of carotenoid biosynthesis in white and red grapefruit (*Citrus paradise* Macf.) *Tree Genetics & Genomes*, 9, 1257-1269.

Alquezar, B., Rodrigo, M.J. y Zacarías, L. (2008a) Regulation of carotenoid biosynthesis during fruit maturation. *Phytochemistry*, 69, 1997-2007.

Alquezar, B., Rodrigo, M.J. y Zacarías, L. (2008b) Carotenoid biosynthesis and their regulation in Citrus fruits. *Tree and Forestry Science and Biotechnology*, 2, 23-35.

Carmona, L., Zacarías, L. & Rodrigo, M. J. (2012) Stimulation of coloration and carotenoid biosynthesis during postharvest storage of 'Navelina' orange fruit at 12 °C. *Postharvest Biology and Technology*, 74, 108-117.

Cronje, P.J.R. & Barry, G.H. (2013) Canopy position affects pigment expression and accumulation of flavonoid carbohydrates of 'Nules Clementine' mandarin fruit, thereby affecting rind condition. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 138 (3), 217-224.

Cronje, P.J.R., Barry, G.H. & Huysamer, M. (2011) Postharvest rind breakdown of 'Nules Clementine' mandarin is influenced by ethylene application, storage temperature and storage duration. *Postharvest Biology and Technology*, 60, 192-201.

Davies, B.H. (1976) Carotenoids. New York: Academic Press.

Dou, H. (2005) The influence of harvesting time and geographical location on susceptibility to physiological peel disorders associated with four Florida grapefruit cultivars. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 80 (4), 399-402.

El-Otmani, M., Ait-Oubahouand, A. & Zacarías, L. (2011) Citrus spp.: Orange, mandarin, tangerine, clementine, grapefruit, pomelo, lemon and lime. In: Yahia EM (ed.) *Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits*. Vol. 2, Cambridge, UK: Woodhead Publishing, pp. 437-514.

Fanciullino, A. L., Dhuique-Mayer, C., Luro, F., Casanova, J., Morillon, R. & Ollitrault, P. (2006) Carotenoid diversity in cultivated Citrus is highly influenced by genetic factors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4397-4406.

FAOSTAT, 2016. Fecha consulta: 01/03/2017.
<http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>

Fiedor, J. & Burda, K. (2014) Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. *Nutrients*, 6, 466-488.

Futch, S. H. y Jackson, L. K. (2003) Murcott (Honey tangerine). Gainesville: University of Florida Institute of Food and Agricultural Sciences. Fecha de consulta: Junio, 2017. <http://edis.ifas.ufl.edu/ch078>

Ghasemnezhad, M., Marsh, K., Shilton, R., Babalar, M. & Woolf, A. (2008) Effect of hot water treatments on chilling injury and heat damage in 'satsuma' mandarins: Antioxidant enzymes and vacuolar ATPase, and pyrophosphatase. *Postharvest Biology and Technology*, 48, 364-371.

Giovannoni, J. J. (2007) Fruit ripening mutants yield insights into ripening control. *Current opinion in plant biology*, 10, 283-289.

Gonzalez-Aguilar, G. A., Zacarías, L., Perez-Amador, M. A., Carbonell, J. & Lafuente, M. T. (2000) *Physiologia Plantarum*, 108, 140-146.

Herrera, A. O. (2007) Emisión de compuestos volátiles durante la postcosecha de frutos de mandarina: Efecto de las bajas temperaturas y del tratamiento con etileno. (Tesis Doctoral) Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España.

Hossain, Z., Nouri, M-Z. & Komatsu, S. (2012) Plant cell organelle proteomics in response to abiotic stress. *Journal of Proteome Research*, 11, 37-48.

Hou, X., Rivers, J., León, P., McQuinn, R. P. & Pogson, B. J. (2016) Synthesis and function of apocarotenoid signals in plants. *Trends in Plant Science*, 21 (9), 792-803.

Kato, M., Ikoma, Y., Matsumoto, H., Sugiura, M., Hyodo, H. & Yano, M. (2004) Accumulation of carotenoids and expressions of carotenoid biosynthetic genes during maturation in Citrus fruit. *Plant Physiology*, 134, 824-837.

Kato, M. (2012) Mechanism of carotenoid accumulation in Citrus fruit. *Journal of the Japanese Society of Horticultural Science*, 81 (3), 219-233.

Lado, J., Rodrigo, M.J., López-Climent, M., Gómez-Cadenas, A. & Zacarías, L. (2016) Implication of the antioxidant system in chilling injury tolerance in the red peel of grapefruit. *Postharvest Biology and Technology*, 111, 217-223.

Lado, J., Cronje, P., Alquézar, B., Page, A., Manzi, M., Gómez-Cadenas, A., Stead, A.D., Zacarías, L. & Rodrigo, M.J. (2015a) Fruit shading enhances peel color, carotenes accumulation and chromoplast differentiation in red grapefruit. *Physiologia Plantarum*, 154, 469-484.

Lado, J., Rodrigo, M.J., Cronje, P. & Zacarías, L. (2015b) Involvement of lycopene in the induction of tolerance to chilling injury in grapefruit. *Postharvest Biology and Technology*, 100, 176-186.

Lado, J., Rodrigo, M. J. & Zacarías, L. (2015c) Analysis of ethylene biosynthesis and perception during postharvest cold storage of Marsh and Star Ruby grapefruits. *Food Science and Technology International*, 21 (7), 537-546.

Lafuente, M.T. & Zacarías, L. (2006) Postharvest physiological disorders in citrus fruit. *Stewart Postharvest Review*, 1 (2), 1-9.

Lafuente, M.T., Zacarías, L., Sala, J.M., Sánchez-Ballesta, M.T., Gosalbes, M.J., Marcos, J.F., González-Candelas, L., Lluch, Y. & Granell, A. (2005) Understanding the basis of chilling injury in citrus fruit. *Acta Horticulturae*, 682, 831-842.

Lafuente, M.T., Sala, J.M. and Zacarias, L. (2004) Active oxygen detoxifying enzymes and phenylalanine ammonia-lyase in the ethylene-induced chilling tolerance in citrus fruit. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 52, 3606–36011.

Lafuente, M. T., Zacarías, L., Martínez-Telléz, M. A., Sanchez-Ballesta, M. T. & Granell, A. (2003) Phenylalanine ammonia-lyase and ethylene in relation to chilling injury as affected by fruit age in citrus. *Postharvest Biology and Technology*, 29, 308-317.

Lafuente, M.T., Zacarias, L., Martínez-Téllez, M. A, Sanchez-Ballesta, M.T. and Dupille, E. (2001) Phenylalanine ammonia-lyase as related to ethylene in the development of chilling symptoms during cold storage of citrus fruits. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 49, 6020-6025.

Lafuente, M.T., Martínez-Téllez, M.A. & Zacarías, L. (1997) Abscisic acid in the response of 'Fortune' mandarins to chilling. Effect of maturity and high-temperature conditioning. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 73, 494-502.

Lo Piero, A. R. (2015) The state of the art in biosynthesis of anthocyanins and its regulation in pigmented sweet oranges [(*Citrus sinensis*) L. Osbeck]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 4031-4041.

Ma, G., Zhang, L., Matsuta, A., Matsutani, K., Yamawaki, K., Yahata, M., Wahyudi, A., Motohashi, R. & Kato, M. (2013) Enzymatic formation of β -Citraurin from β -Cryptoxanthin and Zeaxanthin by Carotenoid Cleavage Dioxygenase4 in the Flavedo of Citrus Fruit. *Plant Physiology*, 163, 682-695.

Matsumoto, H., Ikoma, Y., Kato, M., Kuniga, T., Nakajima, N. & Yoshida, T. (2007) Quantification of carotenoids in Citrus fruit by LC-MS and comparison of patterns of seasonal changes for carotenoids among Citrus varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 2356-2368.

Matsumoto, H., Ikoma, Y., Kato, M., Nakajima, N. & Hasegawa, Y. (2009) Effect of postharvest temperature and ethylene on carotenoid accumulation in the flavedo and juice sacs of Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 4724-4732.

Martínez-Téllez, M. A. & Lafuente, M. T. (1997) Effect of high temperature conditioning on ethylene, phenylalanine ammonia-lyase, peroxidase and polyphenol oxidase activities in flavedo of chilled 'Fortune' m andarin. *The Journal of Plant Physiology*, 150, 674-678.

Maul, P., McCollum, G. T., Popp, M., Guy, C.L. & Porat, R. (2008) Transcriptome profiling of grapefruit flavedo following exposure to low temperature and conditioning treatments uncovers principal molecular components involved in chilling tolerance and susceptibility. *Plant, Cell and Environment*, 31, 752-768.

McCollum, T. G. & McDonald, R. E. (1991) Electrolyte leakage, respiration, and ethylene production as indices of chilling injury in grapefruit. *HortScience*, 26 (9), 1191-1192.

Ollitrault P, Terol J, Chen C, Federici C, Lotfy S, Hippolyte I, Ollitrault F, Bérard A, Chauveau A, Cuenca J, Costantino C, Kacar Y, Mu L, Garcia-Lor A, Froelicher Y, Aleza P, Billot C, Navarro P, Luro F, Roose M, Gmitter, F Talon y Brunel D. (2012). A reference genetic map of *C. clementina* hort. ex Tan.; citrus evolution interferences from comparative mapping. *BMC Genomics*, 13, 1471-2169

Pizarro, L. & Stange, C. (2009) Light-dependent regulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Ciencia e Investigación Agraria*, 36 (2), 143-162.

Porat, R., Weiss, B., Cohen, L., Daus, A., Goren, R. & Droby, S. (1999) Effects of ethylene and 1-methylcyclopropene on the postharvest qualities of 'Shamouti' oranges. *Postharvest Biology and Technology*, 15 (2), 155-163.

Purvis, A. C., Kawada, K. & Grierson, W. (1979) Relationship between midseason resistance to chilling injury and reducing sugar level in grapefruit peel. *HortScience*, 14, 227 – 229.

Rao, A. V. & Rao, L. G. (2007) Carotenoids and human health. *Pharmacological Research*, 55, 207-216.

Ríos, G., Naranjo, M. A., Rodrigo, M. J., Alós, E., Zacarías, L., Cercós, M. & Talón, M. (2010) Identification of a GCC transcription factor responding to fruit color change events in citrus through the transcriptomic analyses of two mutants. *BMC Plant Biology*, 10, 276.

Rodrigo, M.J., Alos, E., Lado, J. & Zacarías, L. (2013a) Biochemical bases and molecular regulation of pigmentation in the peel of Citrus fruit. *Scientia Horticulturae*, 163, 46-62.

Rodrigo, M.J., Alquézar, B., Alós, E., Medina, V., Carmona, L., Bruno, M., Al-Babili, S. & Zacarías, L. (2013b) A novel carotenoide cleavage activity involved in the biosynthesis of Citrus fruit-specific apocarotenoide pigments. *Journal of Experimental Botany*, 64 (14), 4461-4478.

Rodrigo, M.J., Marcos, J.F. & Zacarías, L. (2004) Biochemical and molecular analysis of carotenoid biosynthesis in flavedo of orange (*Citrus sinensis* L) during fruit development and maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6724-6731.

Rodrigo, M.J., Marcos, J.F., Alférez, F., Mallent, M.D. & Zacarías, L. (2003) Characterization of Pinalate, a novel *Citrus sinensis* mutant with a fruit-specific alteration that results in yellow pigmentation and decreased ABA content. *Journal of Experimental Botany*, 54 (383), 727-738.

Ruiz-Sola, M.Á. y Rodríguez-Concepción, M. (2012) Carotenoid biosynthesis in Arabidopsis: A colorful pathway. *The Arabidopsis Book*, 10:e0158. doi: 10.1199/tab.0158

Sala, J.M. (1998) Involvement of oxidative stress in chilling injury in coldstored mandarin fruits. *Postharvest Biology Technology*, 13, 255–261.

Sala, J. M. & Lafuente, M. T. (2000) Catalase enzyme activity is related to tolerance of mandarin fruits to chilling. *Postharvest Biology and Technology*, 20, 81-89.

Sanchez-Moreno, C., Plaza, L., de Ancos, B., Cano, M.P. (2003) Quantitative bioactive compounds assessment and their relative contribution to the antioxidant capacity of commercial orange juices. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83 (5), 430-439.

Schirra, M., D'hallewin, G., Cabras, P., Angioni, A., Ben-Yehoshua, S. & Lurie, S. (2000) Chilling injury and residue uptake in cold-stored 'Star Ruby' grapefruit following thiabendazole and imazalil dip treatments at 20 and 50 °C. *Postharvest Biology and Technology*, 20, 91-98.

Sevillano, L., Sanchez-Ballesta, M.T., Romojaro, F. & Flores, F.B. (2009) Physiological, hormonal and molecular mechanisms regulating chilling injury in horticultural species. Postharvest technologies applied to reduce its impact. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89, 555-573.

Stange, C (2016) *Carotenoids in Nature* (1st ed.) Switzerland: Springer International Publishing.

Stinco, C.M., Escudero-Gilete, M.L., Heredia, F.J., Vicario, I.M., Meléndez-Martínez, A.J. (2016) Multivariate analyses of a wide selection of orange varieties base don carotenoid contents, color and in vitro antioxidant capacity. *Food Research International*, 90, 194-204.

Tietel, Z., Lewinsohn, E., Fallik, E. & Porat, R. (2011) Importance of storage temperatures in maintaining flavor and quality of mandarins. *Postharvest Biology and Technology*, 64, 175-182.

Toivonen, P.M.A. (2004) Postharvest storage procedures and oxidative stress. *Horticultural Science*, 39 (5), 938-942.

Wang, C. Y. (2010) Alleviation of chilling injury in tropical and subtropical fruits. *Acta Horticulturae* 864, 267-273.

8. RESÚMENES BIBLIOGRÁFICOS

Alquezar, B., Rodrigo, M.J. y Zacarías, L. (2008a)

Estos autores analizan el contenido y perfil de carotenoides, como la expresión de los principales genes involucrados en la biosíntesis de carotenoides en la piel y pulpa de naranja Navel y su mutante Cara Cara. Observan mayor acumulación de licopeno y carotenoides del principio de la ruta en Cara Cara, y menor contenido de ABA (aunque la expresión de los genes en su biosíntesis era igual).

Carmona, L., Zacarías, L. & Rodrigo, M. J. (2012)

Estos autores evalúan el efecto de la temperatura de almacenamiento (2 vs 12°C) en el color, contenido y composición de carotenoides y la expresión de los genes de la ruta en Navelina. La conservación a 12°C incrementó la coloración y el contenido de carotenoides, principalmente de β -citraurina. El aumento se asoció a una mayor expresión de los genes principales de la ruta. A 2°C no se observan variaciones.

Dou, H. (2005)

Este autor evalúa el DF y picado postcosecha en distintas variedades de pomelo, recolectadas en distintos momentos de desarrollo de los frutos y diferentes localidades. Observan que los pomelos blancos Marsh presentaron mayor susceptibilidad al DF que los pomelos coloreados, y no encuentran diferencias en DF entre los pomelos coloreados.

Ghasemnezhad, M., Marsh, K., Shilton, R., Babalar, M. & Woolf, A. (2008)

Estos autores evalúan el efecto de baños de agua caliente a diferentes temperaturas en el daño por frío y calor durante la postcosecha de frutos de Satsuma. En este sentido concluyen que baños a 50°C por 2min son los más efectivos en reducir el DF pero no evitan por completo su aparición. También evalúan la producción de etileno, y observan mayor producción en los frutos con mayor DF

Kato, M. (2012)

Revisión sobre la biosíntesis de carotenoides, su acumulación en el flavedo y vesículas de jugo en frutos cítricos y su relación a la expresión de los principales genes de la ruta. Además hace énfasis en la síntesis de xantofilas en frutos de Satsuma y Valencia, el catabolismo de carotenoides y presenta el mecanismo de acumulación de criptoxantina en el híbrido 'Tamani', que la acumula en altas concentraciones.

Kato, M., Ikoma, Y., Matsumoto, H., Sugiura, M., Hyodo, H. & Yano, M. (2004)

Estudian la relación entre la acumulación de carotenoides y la expresión de los genes de su biosíntesis durante la maduración de frutos de Satsuma, Valencia y limón Lisbon. En el cambio de color, observan un cambio hacia la rama de la ruta de β -carotenoides correlacionada con mayor expresión de LCYb y menor de LCYe. En Satsuma y Valencia observan una acumulación masiva de β , β -xantofilas; y en caso de limón de fitoeno (también en Satsuma).

Concluyen que la acumulación de carotenoides está fuertemente regulada por la expresión de los genes de la biosíntesis.

Lado, J., Rodrigo, M.J., López-Climent, M., Gómez-Cadenas, A. & Zacarías, L. (2016)

Estos autores evalúan si la tolerancia al DF en frutos de pomelo que acumulan licopeno se debe a un aumento en el sistema antioxidante y para ello analizan la capacidad antioxidante, actividad y expresión génica de las principales enzimas antioxidantes y contenidos de metabolitos antioxidantes. Encuentran menor peroxidación lipídica y mayor capacidad de secuestrar el oxígeno singlete en los frutos que acumulan licopeno en la piel y con mayor tolerancia al DF.

Lado, J., Cronje, P., Alquézar, B., Page, A., Manzi, M., Gómez-Cadenas, A., Stead, A.D., Zacarías, L. & Rodrigo, M.J. (2015a)

En este artículo se embolsaron frutos de pomelo rojo 'Star Ruby', con el objetivo de evaluar el efecto de la luz sobre el contenido de pigmentos. Observaron una mayor coloración y acumulación de carotenoides (principalmente de licopeno), en los frutos embolsados. No detectan cambios en la expresión de los genes de la biosíntesis de carotenoides, pero si una transición más rápida de cloroplastos a cromoplastos y mayor desarrollo de estructuras de almacenamiento de carotenoides.

Lado, J., Rodrigo, M.J., Cronje, P. & Zacarías, L. (2015b)

Comparan la tolerancia al DF en frutos de pomelo blancos 'Marsh', casi sin acumulación de carotenoides y pomelo rojo 'Star Ruby'. Los frutos de 'Star Ruby' tuvieron una mayor acumulación de carotenoides, principalmente licopeno y mayor tolerancia al DF. A su vez, evalúan la producción de etileno durante la conservación y observan mayor producción y expresión genes de su síntesis en los frutos con DF.

Lado, J., Rodrigo, M. J. & Zacarías, L. (2015c)

Estudian la producción y expresión de genes de la biosíntesis de etileno en pomelo Marsh y Star Ruby, con o sin la aplicación de un inhibidor de su acción (1-MCP). Observan que la aplicación de 1-MCP indujo la producción de etileno, y que el incrementó fue aún mayor al transferir los frutos a 20 °C. Corroboran la regulación autoinhibitoria del etileno en los frutos de pomelo.

Lafuente, M.T. & Zacarías, L. (2006)

Estos autores hacen una revisión de los desórdenes fisiológicos más comunes durante la postcosecha de frutos cítricos, tanto los causados por daño por frío como los. Plantean los aspectos fisiológicos y bioquímicos asociados a los desórdenes como su control a nivel molecular; y posibles técnicas para disminuirlos.

Lafuente, M. T., Zacarías, L., Martínez-Telléz, M. A., Sanchez-Ballesta, M. T. & Granell, A. (2003)

Analizan la relación entre el DF y producción de etileno (y PAL) en Fortune, Valencia y Navelina, que presentan diferente tolerancia al DF. Observan una mayor producción de etileno en los frutos con DF concomitantemente con la aparición de los síntomas. La magnitud de la respuesta en la producción no fue directa al DF observado en las diferentes variedades, y no encuentran relación entre la edad de la fruta y la producción de etileno a causa de DF.

Matsumoto, H., Ikoma, Y., Kato, M., Nakajima, N. & Hasegawa, Y. (2009)

Estos autores evalúan el efecto de tres temperaturas de conservación en el contenido de carotenoides en frutos de Satsuma. Observan acumulación de carotenoides en las tres temperaturas analizadas (5, 20, 30°C), pero más marcada y rápida a 20 °C (principalmente por un incremento de β -criptoxantina y 9-cis-violaxantina). A partir de los resultados sugieren que la biosíntesis de carotenoides es sensible a la temperatura.

Matsumoto, H., Ikoma, Y., Kato, M., Kuniga, T., Nakajima, N. & Yoshida, T. (2007)

Analizan comparativamente el contenido y composición de carotenoides en flavedo y vesículas de jugo de 39 variedades de citrus, y sus variaciones durante el desarrollo. Proponen que los genotipos de citrus pueden distinguirse entre ellas por el contenido de β -criptoxantina y violaxantina en tres grupos, ricos en β -criptoxantina, ricos en violaxantina y pobres en carotenoides.

Maul, P., McCollum, G. T., Popp, M., Guy, C.L. & Porat, R. (2008)

Estos autores hacen un análisis para detectar mecanismos moleculares implicados en la tolerancia o susceptibilidad al DF en pomelo. Observan que la exposición a bajas temperaturas detiene actividades metabólicas generales (disminuye defensa contra patógenos, fotosíntesis, respiración, etc). Pero aumenta procesos de adaptación que implican cambios en la expresión de transcritos relacionado al metabolismo de membranas, lípidos, esteroides y carbohidratos.

Rodrigo, M.J., Alos, E., Lado, J. & Zacarías, L. (2013a)

Revisión exhaustiva sobre el contenido y composición de pigmentos en los frutos cítricos, con énfasis en el contenido y perfil de carotenoides en las distintas especies y sus cambios durante el desarrollo de fruto. A su vez, resume la ruta de biosíntesis y su regulación genética como los factores ambientales, nutricionales y hormonales que inciden en la acumulación de carotenoides en los frutos cítricos.

Rodrigo, M.J., Alquézar, B., Alós, E., Medina, V., Carmona, L., Bruno, M., Al-Babili, S. & Zacarías, L. (2013b)

El objetivo de este artículo fue la identificación de la enzima de corte de carotenoides implicada en la formación del apocarotenoide C30 β -citaurina. Identifican un gen de la familia CCD4, tanto en tejido vegetativo como reproductivo que se correlaciona con la acumulación de β -citaurina. Corroboran que se forma por el corte asimétrico en los dobles enlaces 7',8' de β -criptoxantina y zeaxantina, y que su acumulación depende de la disponibilidad de estos dos precursores.

Rodrigo, M. J., Marcos, J. F. & Zacarías, L. (2004)

Analizan durante el desarrollo y maduración de frutos de naranja los cambios en el contenido y composición de carotenoides y la expresión de los genes de su biosíntesis. Observan que en tejidos cloroplásticos predomina la acumulación de luteína y trans-violaxantina (y la expresión de PDS), y durante la coloración de fitoeno, β -criptoxantina, zeaxantina y principalmente 9-cis-violaxantina (con regulación positiva de PSY, ZDS y β -CHX).

Sevillano, L., Sanchez-Ballesta, M.T., Romojaro, F. & Flores, F.B. (2009)

Este artículo es una revisión muy completa de los mecanismos fisiológicos, hormonales y moleculares implicados en la inducción y desarrollo del DF en especies hortícolas. Resume las principales respuestas al frío en las plantas, desde las alteraciones de membrana celular al daño por estrés oxidativo, y su asociación con compuestos y hormonas vegetales, entre ellas el etileno. Entre las especies da ejemplos y resume las respuestas observadas en cítricos.

Stinco, C.M., Escudero-Gilete, M.L., Heredia, F.J., Vicario, I.M., Meléndez-Martínez, A.J. (2016)

Estos autores analizan el contenido y composición de carotenoides, el color y la capacidad antioxidante de 20 genotipos de naranja. Sugieren que la capacidad antioxidante este más relacionada a la composición cualitativa de carotenoides (o interacción entre ellos) y no tanto al contenido de carotenoides total, ya que observan alta capacidad antioxidante en variedades que no presentaron alto contenido de carotenoides pero si específicos (ej. β -criptoxantina)

Toivonen, P.M.A. (2004)

Discusión sobre el estrés oxidativo de frutos y vegetales, en relación a desórdenes fisiológicos postcosecha. A diferencia de la otra revisión del daño por frío, esta hace énfasis en las bases del estrés oxidativo y la capacidad de los sistemas celulares para mitigarlo.

9. ANEXOS

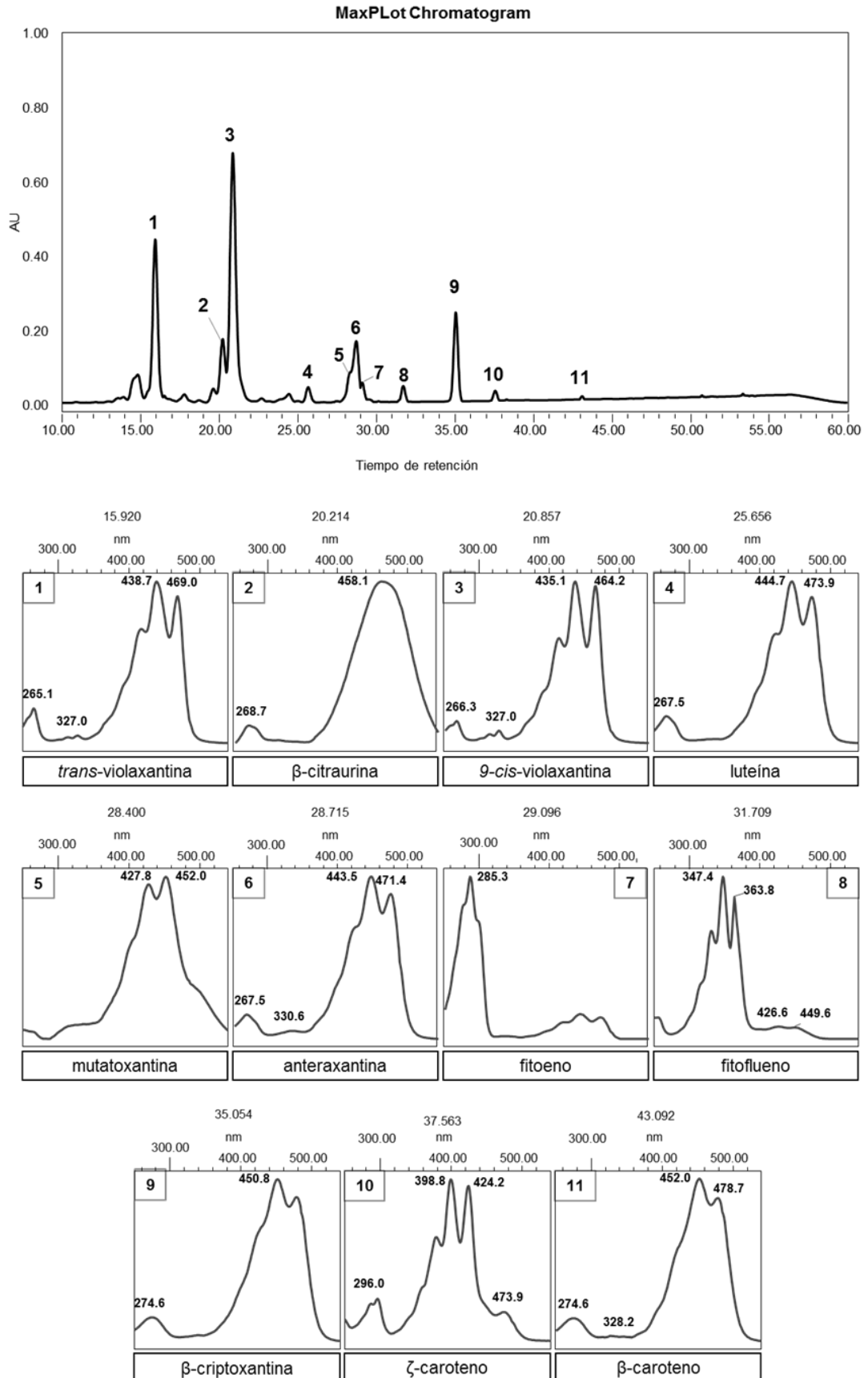
9.1. ANEXO 1: CARACTERÍSTICAS ESPECTROSCÓPICAS DE LOS CAROTENOIDES IDENTIFICADOS.

Carotenoides	Observado		Literatura		
	λ máx (nm)	% III/II	λ máx (nm)	% III/II	
violaxantina	416 / 439 / 469	96	416 / 440 / 465	100	(2)
β -citraurina	462	-	453	-	(1)
9- <i>cis</i> -violaxantina	413 / 435 / 464	94	411 / 435 / 463	nd	(2)
luteína	S / 445 / 473	67	421 / 445 / 474	60	(1)
zeaxantina	S / 451 / 478	38	427 / 449 / 476	sd	(2)
mutatoxantina	S / 425 / 450	71	406 / 427 / 451	sd	(2)
anteraxantina	S / 443 / 470	47	418 / 441 / 471	sd	(2)
fitoeno	S / 285 / S	-	S / 286 / S	-	(1)
fitoflueno	331 / 347 / 364	67	331 / 347 / 367	90	(1)
β -criptoxantina	S / 448 / 476	46	425 / 449 / 476	25	(1)
ζ -caroteno	380 / 398 / 424	86	379 / 399 / 425	sd	(2)
β -caroteno	S / 452 / 478	27	S / 450 / 477	25	(1)

(1) Britton, G. (1995) Spectroscopy. In: G. Britton, S. Liaaen Jensen y H. Pfander (Eds.), *Biosynthesis and Metabolism*, (pp. 13-16). Basel: Birkhauser Verlag.

(2) Rouseff, R.L., Raley, L. y Hofsommer, H.J. (1996) Application of diode array detection with a C-30 reversed phase column for the separation and identification of saponified orange juice carotenoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 2176-2181.

9.2. ANEXO 2: Ejemplo cromatograma (MaxPlot) y espectros de los principales carotenoides identificados.



9.3. ANEXO 3: Distribución de los carotenoides.

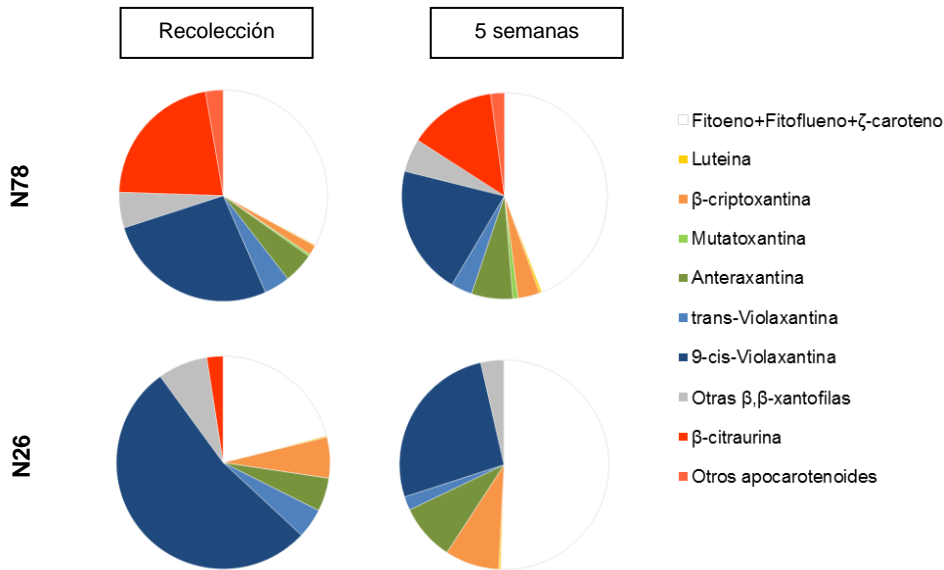


Figura 17. Distribución de los carotenoides individuales, como porcentaje del contenido total en el momento de la cosecha y tras la conservación a 2 °C en el flavedo de los híbridos Nulpink N26 y N78.

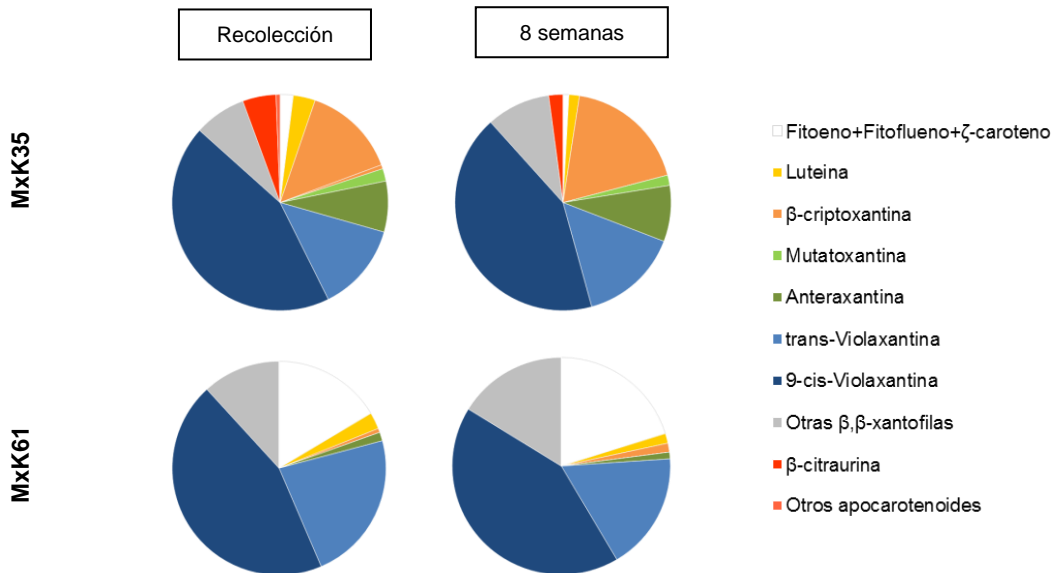


Figura 18. Distribución de los carotenoides individuales, como porcentaje del contenido total en el momento de la cosecha y tras la conservación a 2 °C en el flavedo de los híbridos MxK35 y MxK61.

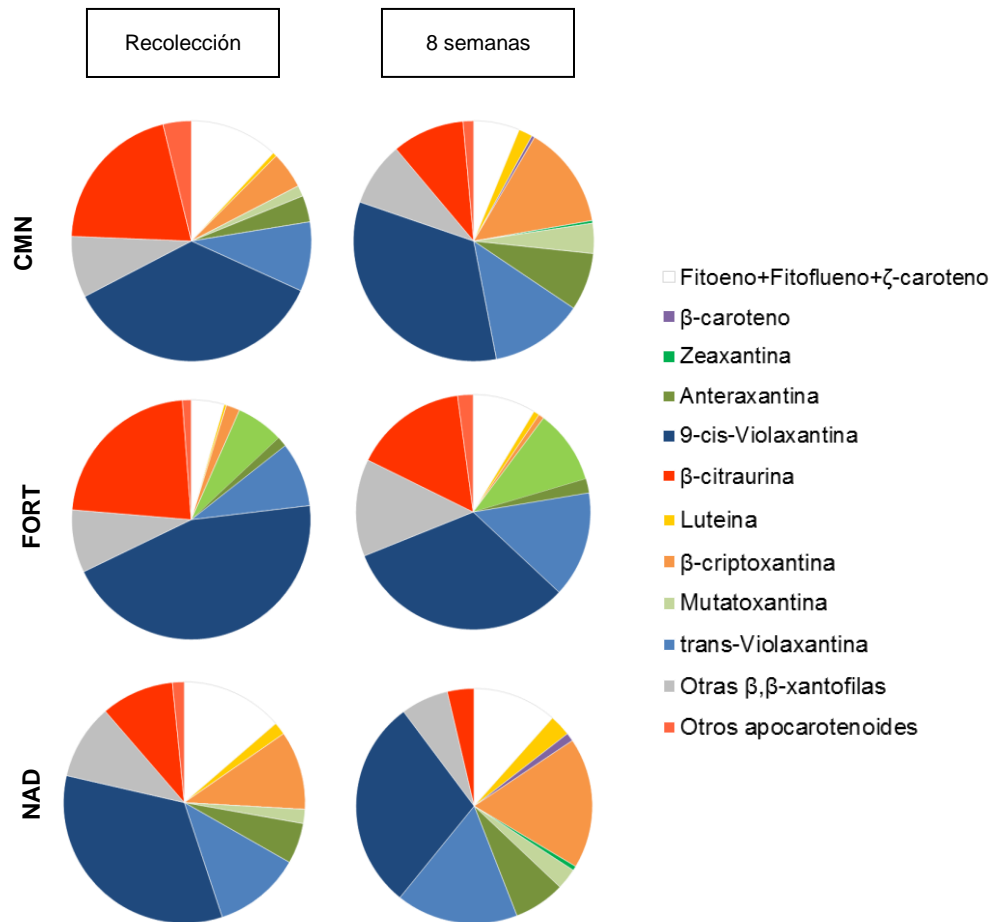


Figura 19. Distribución de los carotenoides individuales, como porcentaje del contenido total en el momento de la cosecha y tras la conservación a 2 °C en el flavedo de Clementina de Nules (CMN), Fortune (FORT) y Nadorcott (NAD).