

The organic acids that are accumulated in the flesh of fruits: occurrence, metabolism and factors affecting their contents – a review

Ácidos orgánicos acumulados en la pulpa de los frutos: ocurrencia, metabolismo y factores que afectan sus contenidos- una revisión

Franco Famiani^{1*}; Alberto Battistelli²; Stefano Moscatello²;
Juan Guillermo Cruz-Castillo³; Robert P. Walker^{1*}

¹Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Ambientali, Università degli Studi di Perugia, Perugia, ITALY.
Correo-e: franco.famiani@unipg.it y rob.walker@talktalk.net (*Autores para correspondencia)

²Istituto di Biologia Agroambientale e Forestale, CNR, Porano (TR), ITALY.

³Centro Regional Universitario Oriente, Universidad Autónoma Chapingo, Huatusco, Veracruz, MÉXICO.

Abstract

Keywords: citrate, cultural practices, malate, malate dehydrogenase (MDH), malic enzyme, phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC), pyruvate orthophosphate dikinase (PPDK), temperature.

Organic acids are abundant constituents of ripe fruits and are responsible for their sourness. In addition, they contribute to their flavour. In many fruits, the most abundant organic acids are malic and citric. The aims of this review are two-fold. The first is to provide a clear overview of malic and citric acids in the flesh of fruits. The abundance of different organic acids in commercially grown fruits is described. How this abundance changes during fruit development is outlined. The metabolic pathways used in the synthesis and dissimilation of malic and citric acids in fruits are described. The functions of malic and citric acids in the flesh of fruits are discussed. Secondly, how environmental and cultural practices can alter the organic acid content of fruits is considered.

Resumen

Palabras clave: citrato, prácticas culturales, malato, Malato deshidrogenasa (MDH), enzima málica, fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK), fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC), piruvato ortofosfato diquinasa (PPDK), temperatura.

Los ácidos orgánicos son componentes abundantes de los frutos maduros y responsables de la acidez, además contribuyen en su sabor. En muchos frutos, los ácidos más abundantes son el málico y el cítrico. Los objetivos de esta revisión son, en primer lugar, proporcionar una reseña clara respecto de los ácidos málico y cítrico en los frutos. Se describe la abundancia de diferentes ácidos en frutos cultivados comercialmente, la manera en que esta abundancia cambia durante el desarrollo de los frutos y las rutas metabólicas usadas en la síntesis y la desasimilación de los ácidos málico y cítrico en los frutos; adicionalmente, se discute sobre las funciones de estos ácidos en la pulpa de los frutos. En segundo lugar, se aborda la manera en que las prácticas ambientales y culturales pueden alterar el contenido de los ácidos orgánicos en frutos.



Introduction

Organic acids together with sugars are the main soluble components of ripe fruits and have a major effect on taste, being responsible for sourness and contributing to the flavour. Sourness is generally attributed to proton release from acids, whereas their different anions each impart a distinct taste (Johanningsmeiner et al., 2005). Acidity is also one of the main ripening indices that determines the harvest date of fruits used either for direct consumption or industrial processing (Neri, Pratella, & Brigati, 2003). In this article, organic acids are often referred to by the names of their anions, e.g. citrate and malate, and this is because at the pH of the cytoplasm the bulk of their content is in this form. The vast majority of the malate and citrate content of the flesh of fruits is located in the vacuole, and the pH of the vacuole determines the ratio of the undissociated:dissociated acid (Etienne, Génard, Lobit, Mbéguié-A-Mbéguié, & Bugaud, 2013).

Many fruits accumulate organic acids in their flesh at certain stages of their development. Usually either one or two acids account for the bulk of this content (Ulrich, 1971). The organic acid(s) that accumulate are dependent on the fruit in question (Ulrich, 1971). However, the most abundant organic acids in many fruits are citric and malic (Ulrich, 1971). A characteristic feature of this accumulation in many fruits is that the concentrations ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ fresh weight - FW) of these acids increase until the beginning of ripening and then decrease (Walker, Battistelli, Moscatello, Chen, Leegood, & Famiani, 2011a; Famiani, Baldicchi, Battistelli, Moscatello, & Walker, 2009; Famiani, Casulli, Baldicchi, Battistelli, Moscatello, & Walker, 2012b; Famiani, Farinelli, Palliotti, Moscatello, Battistelli, & Walker, 2014a). However, the patterns of their changes during fruit development are often different when the total amount of these compounds per fruit is considered. In this case, in the flesh of several fruits, there is an increase in their content during most of fruit development and ripening (Walker et al., 2011a; Famiani et al., 2012b).

The bulk of the organic acids present in the flesh of fruits is not imported but rather synthesized in the flesh from imported sugars (Ruffner, 1982a, 1982b; Sweetman, Deluc, Cramer, Ford, & Soole, 2009; Etienne et al., 2013). If these acids are metabolized during ripening there are a number of fates. The main ones are: metabolism by the Krebs cycle (respiration), gluconeogenesis, fermentation to ethanol, amino acid synthesis/interconversion, and as a substrate for the synthesis of secondary metabolites such as pigments (Ruffner, 1982a, 1982b; Famiani, Walker, Técsi, Chen, Proietti, & Leegood, 2000; Famiani et al., 2005; Famiani, Casulli, Proietti, Walker, & Battistelli, 2007; Famiani et al., 2014a; Famiani, Moscatello, Ferradini, Gardi, Battistelli, & Walker, 2014b; Sweetman et al., 2009; Etienne et al., 2013).

Introducción

Los ácidos orgánicos junto con los azúcares son los principales componentes solubles de los frutos maduros y tienen un efecto muy importante sobre el sabor, debido a que son responsables de su acidez. Generalmente, la acidez se atribuye a la liberación de protones de los ácidos, mientras que cada uno de sus diferentes aniones imparte un sabor distintivo (Johanningsmeiner et al., 2005). La acidez también es uno de los principales índices de maduración que determina la fecha de cosecha de los frutos, sean para el consumo directo o para la transformación industrial (Neri, Pratella, & Brigati, 2003). En este manuscrito, a menudo se hace referencia a los ácidos orgánicos mediante los nombres de sus aniones, por ejemplo citrato y malato; esto es porque en el pH del citoplasma, la mayor parte de su contenido, se encuentra en esta forma. La gran mayoría de malato y citrato de la pulpa de los frutos está localizada en la vacuola, y el pH de ésta determina la relación entre ácido no disociado y disociado (Etienne, Génard, Lobit, Mbéguié-A-Mbéguié, & Bugaud, 2013).

Muchos frutos, en ciertas etapas de su desarrollo, acumulan ácidos orgánicos en su pulpa; generalmente, ya sea uno o dos ácidos representan la mayor parte de este contenido, y dependen del fruto en cuestión (Ulrich, 1971). Sin embargo, en muchos frutos, los ácidos orgánicos más abundantes son el cítrico y el málico (Ulrich, 1971); una característica distintiva de esta acumulación es que las concentraciones ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso fresco [PF]) de éstos incrementa hasta el inicio de la maduración y luego disminuye (Walker, Battistelli, Moscatello, Chen, Leegood, & Famiani, 2011a; Famiani, Baldicchi, Battistelli, Moscatello, & Walker, 2009; Famiani, Casulli, Baldicchi, Battistelli, Moscatello, & Walker, 2012b; Famiani, Farinelli, Palliotti, Moscatello, Battistelli, & Walker, 2014a). No obstante, los patrones de sus cambios durante el desarrollo del fruto frecuentemente son diferentes cuando se considera la cantidad total de estos compuestos por cada uno. En este caso, en la pulpa de varios frutos, existe un incremento en el contenido durante la mayor parte de su desarrollo y maduración (Walker et al., 2011a; Famiani et al., 2012b).

La mayoría de los ácidos orgánicos presentes en la pulpa de los frutos no son importados; más bien son sintetizados en la pulpa a partir de azúcares transportados (Ruffner, 1982a, 1982b; Sweetman, Deluc, Cramer, Ford, & Soole, 2009; Etienne et al., 2013). Si estos ácidos son metabolizados durante la maduración, existen varios destinos; los principales son: metabolismo mediante el ciclo de Krebs (respiración), gluconeogénesis, fermentación a etanol, síntesis/interconversión de aminoácidos y como sustrato para la producción de metabolitos secundarios, tales como pigmentos (Ruffner, 1982a, 1982b; Famiani, Walker,

The organic acid content of the flesh of fruits is affected by environmental factors and cultivation practices (e.g. temperature, light intensity, cultivar, rootstock, mineral nutrition, water availability, fruit load/pruning). However, how these factors alter metabolism to bring about changes in organic acid content is in most cases uncertain (Etienne et al., 2013).

This review focuses on malic and citric acids, which are the most abundant organic acids in many fruits. The aims of this review are two-fold. Firstly, to give a clear overview of the occurrence, metabolism and functions of these organic acids in fruits. Secondly, to outline how different environmental conditions and cultivation practices can alter the amount of these compounds in the fruits.

Changes in the organic acid content of fleshy fruits during their development and ripening

Organic acids accumulate in the flesh of many types of fruits at certain stages of their development (Hulme, 1971; Ruffner, 1982a, b; Famiani et al., 2005). The organic acids that are accumulated in fruits can be divided into several metabolic groups, and these are synthesized by different pathways. Firstly, the anions of citric, isocitric and malic acids, namely citrate, isocitrate and malate, are Krebs cycle intermediates (we refer to these in this review as Krebs cycle acids), and one or more of them (usually citric or malic) accounts for a large proportion of the organic acid content of the flesh of all fruits that have been studied (Ulrich, 1971). Nevertheless, other types of organic acids may also be abundant in certain fruits.

A second metabolic group is represented by ascorbic and tartaric acid. Tartaric acid is synthesized from ascorbic acid, and the latter is synthesized from imported sugars (Ruffner, 1982a; Ford, 2012). Grapes usually contain large amounts of tartaric acid in addition to malic acid (Ruffner, 1982a).

A third metabolic group includes quinic acid, which is synthesized by the shikimate pathway (Herrmann, 1995). Several fruits, such as apple, kiwifruit, papaya, pear, quince, stone fruits, and soft fruits, often contain substantial amounts of quinic acid (Arfaoli & Bosetto, 1993; Kalt & McDonald, 1996; Moing, Svanella, Gaudillere, Gaudillere, & Monet, 1999; González-Aguilar, Buta, & Wang, 2003; Wu et al., 2007; García-Mariño, de la Torre, & Matilla, 2008; Nishiyama, Fukuda, Shimohashi, & Oota, 2008; Ayaz, Kadioglu, Bertoft, Acar, & Turna, 2001; Bae, Yun, Jun, Yoon, Nam, & Kwon 2014; Szychowski, Munera-Picazo, Szumny, Carbonell-Barrachina, & Hernández, 2014). For a given type of fruit, which organic acids are accumulated in the flesh, and when this accumulation occurs during development, are often characteristic features.

Técsi, Chen, Proietti, & Leegood, 2000; Famiani et al., 2005; Famiani, Casulli, Proietti, Walker, & Battistelli, 2007; Famiani et al., 2014a; Famiani, Moscatello, Ferradini, Gardi, Battistelli, & Walker, 2014b; Sweetman et al., 2009; Etienne et al., 2013).

El contenido de ácido orgánico en la pulpa de los frutos es afectado por factores ambientales y prácticas de cultivo (por ejemplo, la temperatura, intensidad lumínica, el cultivar, el portainjerto, la nutrición mineral, disponibilidad de agua, la carga de fruto/poda). Sin embargo, la manera en que estos factores alteran el metabolismo para provocar cambios en el contenido de ácidos orgánicos es incierta en la mayor parte de los casos (Etienne et al., 2013).

Esta revisión se concentra en los ácidos málico y cítrico, los cuales son los más abundantes en muchos frutos. Los objetivos de esta revisión son dos; en primer lugar, proporcionar una reseña clara de la ocurrencia, el metabolismo y las funciones de estos ácidos orgánicos en los frutos. En segundo lugar, resumir la manera en que las diferentes condiciones ambientales y las prácticas de cultivo pueden afectar la cantidad de estos compuestos en los frutos.

Cambios en el contenido de ácidos orgánicos en frutos carnosos durante su desarrollo y maduración

Los ácidos orgánicos se acumulan en la pulpa de muchos tipos de frutos en ciertas etapas de su desarrollo (Hulme, 1971; Ruffner, 1982a, 1982b; Famiani et al., 2005); éstos pueden dividirse en varios grupos metabólicos, y son sintetizados mediante diferentes rutas. En primer lugar, los aniones de los ácidos cítrico, isocítrico y málico, es decir, citrato, isocitrato y malato, son intermediarios del ciclo de Krebs (en esta revisión nos referimos a ellos como ácidos del ciclo de Krebs), y uno o más de ellos (usualmente el cítrico o el málico) representan gran proporción del contenido de ácido orgánico en la pulpa de los frutos que han sido estudiados (Ulrich, 1971); no obstante, otros también pueden ser abundantes en ciertos frutos.

Un segundo grupo metabólico está representado por los ácidos ascórbico y tartárico. Este último es sintetizado a partir del ácido ascórbico, el cual es formado a partir de azúcares importados (Ruffner, 1982a; Ford, 2012). Las uvas contienen, usualmente, grandes cantidades de ácido tartárico además de ácido málico (Ruffner, 1982a).

Como tercer grupo metabólico se encuentra el ácido quínico, el cual es sintetizado mediante la ruta del ácido shikímico (Herrmann, 1995). Varios frutos, tales como manzana, kiwi, papaya, pera, membrillo, drupas, frutos blandos, a menudo contienen cantidades sustanciales de ácido quínico (Arfaoli & Bosetto, 1993;

Table 1 summarizes the main organic acid(s) that are accumulated in large amounts during development and/or contained in the flesh of ripe fruits of different shrubby and woody species.

In the flesh of many fruits, such as grape, cherry and several soft fruits, the concentration of malate and/or citrate ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ FW) increases until the beginning of ripening and then decreases (Ruffner, 1982a; Famiani et al., 2005, 2014a, 2014b; Walker et al., 2011a). The bulk of the volume of the flesh of most fruits consists of parenchyma cells, and in turn the bulk of the volume of these cells consists of a large vacuole. Most of the stored Krebs cycle acids are contained in these vacuoles (Ruffner, 1982a, 1982b; Etienne et al., 2013).

During the ripening of some fruits, such as grape, tomato and some soft fruits, the amount of malate/citrate in terms of both concentration ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ FW) and content per fruit ($\text{mg}\cdot\text{fruit}^{-1}$) decreases, and this shows that stored organic acids are dissimilated/metabolized (Ruffner, 1982b; Goodenough, Prosser, & Young, 1985; Famiani et al., 2005, 2009, 2014a, 2014b; Famiani & Walker, 2009; Sweetman et al., 2009) (Figure 1). In other fruits, such as mango, strawberry and some cherries, the concentration of citrate/malate ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ FW) decreases during ripening; however, the amount of these compounds per fruit ($\text{mg}\cdot\text{fruit}^{-1}$) increases up to commercial harvest (Figure 2). Therefore, in these fruits there is no net dissimilation of malate/citrate, and the decrease in their concentration ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ FW) is only a dilution effect due to the increase in the size of the fruits, which is brought about largely by vacuolar expansion (Selvaraj & Kumar, 1989; Famiani et al., 2005; Walker et al., 2011a). Also, in kiwifruit no net dissimilation was observed up to harvesting (Walton & de Jong, 1990). In some plums the concentration ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ FW) of malate decreases during ripening. By contrast, the amount of malate per fruit ($\text{mg}\cdot\text{fruit}^{-1}$) increases or remains constant for most of ripening, and decreases only at a very advanced stage of ripening (Famiani et al., 2012b) (Figure 3). Finally, in banana, feijoa and lemon both the organic acid concentration ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ FW) and content per fruit ($\text{mg}\cdot\text{fruit}^{-1}$) increase throughout ripening (Bartholomew & Sinclair, 1951; Harman, 1987; Agravante, Matsui, & Kitagawa, 1991). Therefore, during ripening there can be either a net dissimilation or synthesis of stored Krebs cycle acids, and which occurs is dependent on which fruit is considered. However, a complicating factor is that superimposed on any net synthesis or dissimilation of malate/citrate that occurs over a period of days, there is a cycle of synthesis and dissimilation (Walker et al., 2011a and references therein). The function of this turnover is uncertain; however, it could be associated with the coordination of the import and utilisation of nitrogenous compounds and associated pH regulation (Walker et al., 2011a; Famiani et al., 2012b).

Kalt & McDonald, 1996; Moing, Svanella, Gaudillere, Gaudillere, & Monet, 1999; González-Aguilar, Buta, & Wang, 2003; Wu et al., 2007; García-Mariño, de la Torre, & Matilla, 2008; Nishiyama, Fukuda, Shimohashi, & Oota, 2008; Ayaz, Kadioglu, Bertoft, Acar, & Turna, 2001; Bae, Yun, Jun, Yoon, Nam, & Kwon 2014; Szychowski, Munera-Picazo, Szumny, Carbonell-Barrachina, & Hernández, 2014). Para un determinado tipo de fruto, los ácidos orgánicos se acumulan en la pulpa y, cuando esta acumulación ocurre durante el desarrollo, a menudo son rasgos característicos. El Cuadro 1 resume los principales ácidos orgánicos que están acumulados en grandes cantidades durante el desarrollo o contenidos en la pulpa de frutos maduros de diferentes especies arbustivas y leñosas.

En la pulpa de muchos frutos (tales como uvas, cerezas y varios frutos blandos), la concentración de malato y citrato ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de PF) incrementa hasta el inicio de la maduración y entonces disminuye (Ruffner, 1982a; Famiani et al., 2005, 2014a, 2014b; Walker et al., 2011a). La mayor parte de la pulpa, en casi todos los frutos, se compone de células de parénquima, y a su vez la gran mayoría de estas se constituye de una vacuola grande. En gran medida los ácidos del ciclo de Krebs están almacenados en estas vacuolas (Ruffner, 1982a, 1982b; Etienne et al., 2013).

Durante la maduración de algunos frutos (tales como uvas, tomates y algunos frutos blandos), la cantidad de malato/citrato, tanto en concentración ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de PF) como en contenido por fruto ($\text{mg}\cdot\text{fruto}^{-1}$), disminuye, y ello muestra que los ácidos orgánicos almacenados son desasimilados/metabolizados (Ruffner, 1982b; Goodenough, Prosser, & Young, 1985; Famiani et al., 2005, 2009, 2014a, 2014b; Famiani & Walker, 2009; Sweetman et al., 2009) (Figura 1). En otros frutos (como mangos, fresas y algunas cerezas), la concentración de citrato/malato ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de PF) disminuye durante la maduración, pero la cantidad de estos compuestos por fruto ($\text{mg}\cdot\text{fruto}^{-1}$) incrementa hasta la cosecha comercial (Figura 2). Por lo tanto, en estos no existe desasimilación neta de malato/citrato, y el decremento en su concentración ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de PF) es sólo efecto de dilución debido al incremento en el tamaño de los frutos; el cual es ocasionado en gran parte por la expansión vacuolar (Selvaraj & Kumar, 1989; Famiani et al., 2005; Walker et al., 2011a). Tampoco se observó desasimilación neta en kiwis hasta la cosecha (Walton & de Jong, 1990). En algunas ciruelas la concentración ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ PF) de malato disminuye durante la maduración; en contraste, la cantidad de malato por fruto ($\text{mg}\cdot\text{fruto}^{-1}$) incrementa o permanece constante durante la mayor parte de la maduración, y sólo disminuye en una etapa muy avanzada de dicha maduración (Famiani et al., 2012b) (Figura 3). Finalmente, en plátano, guayabo y limón la concentración ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ PF) de ambos ácidos orgánicos

Table 1. Main organic acid(s) that are accumulated in large amounts during development and/or contained in the mesocarp of ripe fruits of different shrubby and woody species.

Cuadro 1. Principal(es) ácido(s) orgánico(s) acumulado(s) en grandes cantidades durante el desarrollo y contenidos en el mesocarpio de frutos maduros de diferentes especies arbustivas y leñosas.

Species / Especie	Main organic acid(s)	Ácido(s) orgánico(s) principal(es)	References / Referencias
Apple / Manzana	malic	málico	Wu et al. (2007)
Apricot / Albaricoque	citric / malic	cítrico / málico	Gurrieri, Audergon, Albagnac, and Reich (2001), Baldicchi et al. (2015)
Banana / Plátano	malic	málico	Agravante et al. (1991), Morvai and Molnár-Perl (1992)
Blackberry / Zarzamora	isocitric	isocítrico	Whiting (1958)
Blueberry / Arándano	citric	cítrico	Famiani et al. (2005)
Cherimola / Chirimoya	malic	málico	Alique and Zamorano (2000)
Cranberry / Arándano rojo	citric	cítrico	Çelik, Özgen, Serçe, and Kaya (2008), Adamczak, Buchwald, and Kozłowski (2011)
Feijoa	malic / citric	málico / cítrico	Harman (1987)
Fig / Higo	citric	cítrico	Trad, Gaaliche, Renard, and Mars (2013)
Gooseberry / Grosella	citric / malic	cítrico / málico	Famiani et al. (2009)
Grape / Uva	malic / tartaric	málico / tartárico	Kliewer, Howarth, and Omori (1967)
Grapefruit / Pomelo	citric	cítrico	Clements (1964)
Guava / Guayaba	citric	cítrico	Soares, Pereira, Marques, and Monteiro (2007)
Goji berry / Goji	citric	cítrico	Mikulic-Petkovsek, Schmitzer, Slatnar, Stampar, and Veberic (2012)
Japanese wineberry / Wineberry japonés	citric	cítrico	Mikulic-Petkovsek et al. (2012)
Jostaberry	citric	cítrico	Mikulic-Petkovsek et al. (2012)
Jujube	malic	málico	Gao, Wu, Yu, Wang, Ma, y Li (2012)
Kiwifruit / Kiwi	citric / quinic	cítrico / quínico	Walton and de Jong (1990), Nishiyama et al. (2008)
Lemon / Limón	citric	cítrico	Bartholomew and Sinclair (1951)
Litchi	tartaric / malic	tartárico / málico	Hu, Wang, and Hu (2005)
Lime / Lima	citric	cítrico	Nour, Trandafir, and Ionica (2010)
Loquat / Níspero japonés	malic	málico	Chen, Liu, and Chen (2009)
Mandarin / tangerine / clementine / Mandarina / tangerina / clementina	citric	cítrico	Daito and Sato (2007), Nour et al. (2010), Legua, Forner, Hernández, and Forner-Giner (2014)
Mamey sapote / Mamey zapote	malic	málico	Arenas-Ocampo, Evangelista-Lozano, Errasquin-Arana, Jiménez-Aparicio, and Dávila-Ortiz (2007)
Mango	citric / malic	cítrico / málico	Medlicott and Thompson (1985), Selvaraj and Kumar (1989)
Medlar / Níspero europeo	malic / citric	málico / cítrico	Glew et al. (2003a and 2003b), Selcuk and Erkan (2015)
Mulberry / Mora	malic	málico	Gundogdu, Muradoglu, Gazioglu-Sensoy, and Yilmaz (2011)
Orange (sweet) / Naranja (dulce)	citric	cítrico	Clements (1964)
Orange (sour) / Naranja (ácida)	citric	cítrico	Widodo, Shiraishi, and Shiraishi (1995)
Papaya	citric	cítrico	González-Aguilar et al. (2003)
Peach / Durazno	malic	málico	Moing et al. (1999)
Pear / Pera	malic / citric	málico / cítrico	Arfaoli and Bosetto (1993)
Persimmon / Caqui	citric / malic	cítrico / málico	Daoood, Biacs, Czinkotai, and Hoschke (1992), Romero-Rodriguez, Vazquez-Oderiz, López-Hernández, and Simal-Lozano (1992)
Pineapple / Piña	citric	cítrico	Bartolomé, Rupérez, and Fuster (1995)
Plum / Ciruela	malic	málico	Famiani et al. (2012b)
Pomegranate / Granada	citric	cítrico	Melgarejo, Salazar, and Artéz (2000)
Pomelo / Toronja	citric	cítrico	Nour et al. (2010)
Raspberry / Frambuesa	citric	cítrico	Famiani et al. (2005)
Ribes	citric	cítrico	Famiani et al. (2005)
Service tree / Serba	malic	málico	Barbieri, Bignami, Cristofori, Paolocci, and Bertazza (2011)
Sweet cherry / Cereza dulce	malic	málico	Walker et al. (2011a)
Sour cherry / Cereza ácida	malic	málico	Füzfa, Katona, Kovács, and Molnár-Perl (2004)
Strawberry / Fresa	citric	cítrico	Famiani et al. (2005)
Strawberry-tree / Madroño	malic	málico	Ruiz-Rodríguez et al. (2011)
Sugar apple / Anona	citric	cítrico	Bolivar-Fernández, Saucedo-Veloz, Solís-Pereira, and Sauri-Duch (2009)

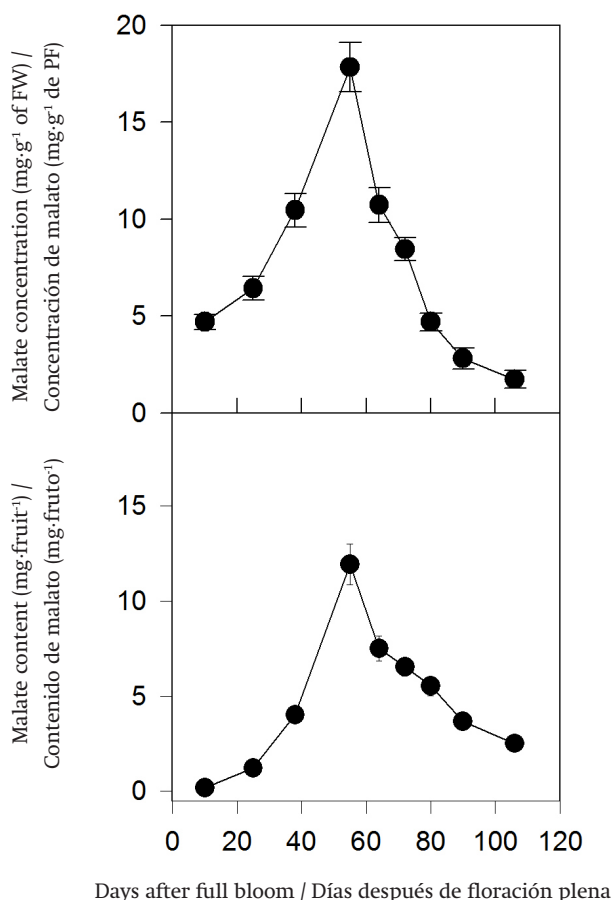


Figure 1. Concentration and content per fruit of malate in the pericarp of grape berries (cv. Cabernet Sauvignon) during their development and ripening. The bars show the standard errors. Adapted from Famiani et al., 2014a.

Figura 1. Concentración y contenido de malato por fruto en el pericarpio de bayas de uva (cv. Cabernet Sauvignon) durante su desarrollo y maduración. Las barras muestran los errores estándar. Adaptada de Famiani et al., 2014a.

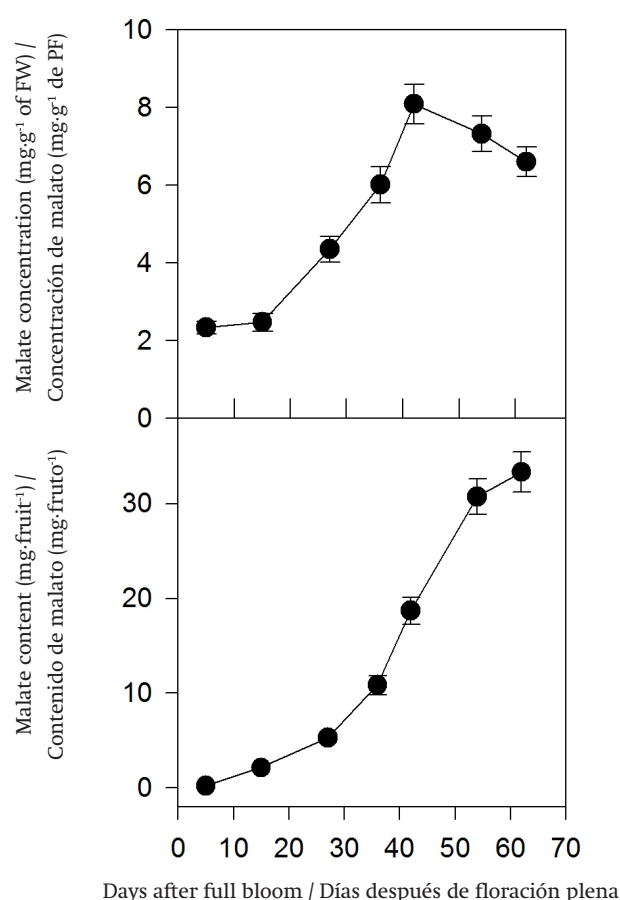


Figure 2. Concentration and content per fruit of malate in the mesocarp of cherry drupes (cv. Durone Nero II) during their development and ripening. The bars show the standard errors. Adapted from Walker et al., 2011a.

Figura 2. Concentración y contenido de malato por fruto en el mesocarpio de drupas de cerezo (cv. Durone Nero II) durante su desarrollo y maduración. Las barras muestran los errores estándar. Adaptada de Walker et al., 2011a.

The studies outlined above have dealt with changes in organic acid content up to commercial ripeness. In many fruits that are over-ripe there is a decline in organic acid content (e.g. sour cherry, plum and grape, unpublished data). If fruits are stored, the storage conditions can affect the organic acid content. In apple after storage under normal air for 3-6 months the malic acid concentration is lower than at harvest (Ackermann, Fischer, & Amad, 1992; Róth et al., 2007). However, this decrease can be reduced if the atmosphere surrounding the apples is modified (Róth et al., 2007). Also, in kiwifruit a slight reduction of citric and malic acid contents was observed after about five months of storage under normal air (temperature = $0^{\circ} \pm 0.5^{\circ} \text{C}$, relative humidity > 90 %) (unpublished data).

y el contenido por fruto ($\text{mg}\cdot\text{fruto}^{-1}$) incrementa a lo largo de la maduración (Bartholomew & Sinclair, 1951; Harman, 1987; Agravante, Matsui, & Kitagawa, 1991). Por ello durante la maduración puede existir cualquiera, una desasimilación neta o síntesis de los ácidos del ciclo de Krebs almacenados, y lo que ocurra depende del fruto que sea considerado. Sin embargo, un factor de complicación es que, sobrepuesto a cualquier síntesis o desasimilación neta de malato/citrato que ocurra en un periodo de días, existe un ciclo de síntesis y desasimilación (Walker et al., 2011a y las referencias incluidas allí). La función de esta rotación es incierta, pero podría estar asociada con la coordinación de la importación, utilización de compuestos nitrogenados y la regulación del pH asociado (Walker et al., 2011a; Famiani et al., 2012b).

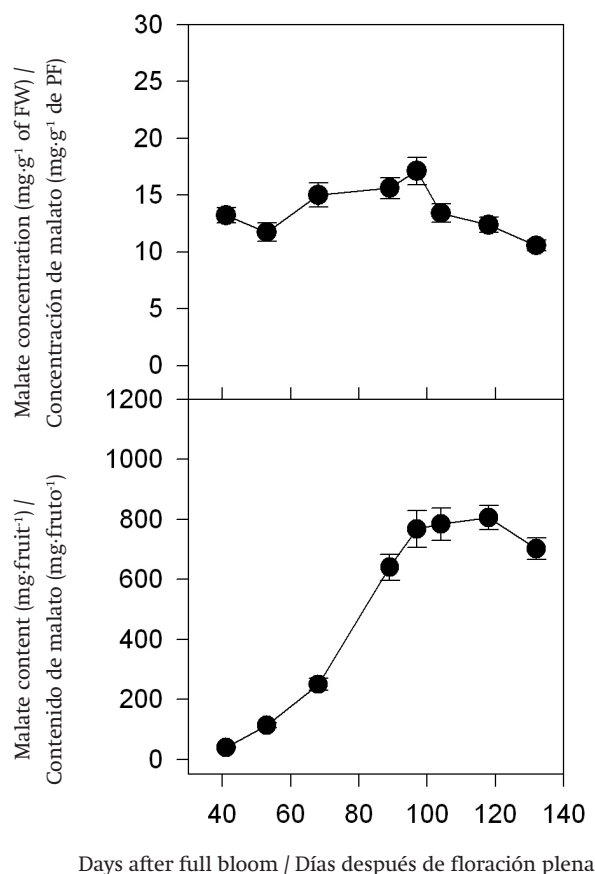


Figure 3. Concentration and content per fruit of malate in the mesocarp of plum drupes (cv. Ozark Premier) during their development and ripening. The bars show the standard errors. Adapted from Famiani et al., 2012b.

Figura 3. Concentración y contenido de malato por fruto en el mesocarpio de drupas de ciruelo (cv. Ozark Premier) durante su desarrollo y maduración. Las barras muestran los errores estándar. Adaptada de Famiani et al., 2012b.

Metabolism of Krebs cycle acids in fleshy fruits

Synthesis. The Krebs cycle acids that accumulate within the flesh of fruits do not appear to be imported, but rather they are synthesized within the flesh from imported sugars (Ruffner, 1982b; Law & Plaxton, 1995). Sugars can also derive from photosynthesis within the fruit, however, these sugars account for only a very small proportion of the sugars present in the fruit (Kanellis & Roubelakis-Angelakis, 1993; Palliotti, Silvestroni, & Petoumenou, 2010).

The bulk of Krebs cycle acids present in fruits is synthesized from sugars in the following way. Products from the metabolism of sugars enter the glycolytic pathway and this converts them to phosphoenolpyruvate (PEP). For example, imported

Los estudios descritos anteriormente han abordado los cambios en el contenido de ácidos orgánicos hasta la madurez comercial. En muchos frutos excesivamente maduros (así como cerezas ácidas, ciruelas y uvas) existe disminución en el contenido de ácidos orgánicos (datos no publicados). Si los frutos son almacenados, las condiciones de almacenamiento pueden afectar el contenido de estos ácidos. En manzanas, después del almacenamiento bajo condiciones de aire normal por periodos de entre tres y seis meses, la concentración de ácido málico es más baja que en la cosecha (Ackermann, Fischer, & Amad, 1992; Róth et al., 2007); sin embargo, esta disminución puede ser reducida si la atmosfera que rodea a las manzanas es modificada (Róth et al., 2007). En kiwis también fue observada una ligera disminución del contenido de ácidos cítrico y málico después de cinco meses de almacenamiento bajo condiciones normales de aire (temperatura = $0^{\circ} \pm 0.5^{\circ} \text{C}$, humedad relativa > 90 %) (datos no publicados).

Metabolismo de los ácidos del ciclo de Krebs en frutos carnosos

Síntesis. Los ácidos del ciclo de Krebs que se acumulan entre la pulpa de los frutos no aparentan ser importados, sino que son sintetizados al interior de la pulpa a partir de azúcares (Ruffner, 1982b; Law & Plaxton, 1995). Estos últimos pueden derivar de la fotosíntesis al interior de los frutos, sin embargo representan una proporción muy pequeña de los azúcares presentes en el fruto (Kanellis & Roubelakis-Angelakis, 1993; Palliotti, Silvestroni, & Petoumenou, 2010).

Para la síntesis de los ácidos del ciclo de Krebs los productos del metabolismo de los azúcares entran en la ruta glucolítica y esto los convierte en fosfoenolpiruvato (PEP). Por ejemplo, la sacarosa introducida es frecuentemente hidrolizada a glucosa y fructosa por una de las invertasas. Estos azúcares son entonces fosforilados, ya sea por glucoquinasa o fructoquinasa, y entran en la glucólisis. En las plantas, la enzima citosólica fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) es necesaria para la síntesis de los ácidos del ciclo de Krebs a partir de los azúcares, ya que esta cataliza la conversión de la PEP a oxalacetato (OAA) (Ruffner, 1982b; Law & Plaxton, 1995). Si el fruto está acumulando malato, el OAA es convertido en malato por la malato deshidrogenasa citosólica (NAD-MDH), y éste es transportado a través del tonoplasto hacia el interior de la vacuola en donde es almacenado (Ruffner, 1982b; Terrier & Romieu, 2001) (Figura 4). Si el citrato está siendo acumulando, una molécula de PEP es convertida en OAA por la PEPC (Figura 5) Una segunda PEP es convertida en acetil-CoA por acciones secuenciales de la piruvato quinasa y la piruvato deshidrogenasa. La acetil-CoA y el OAA son entonces combinados por la citrato sintasa en la

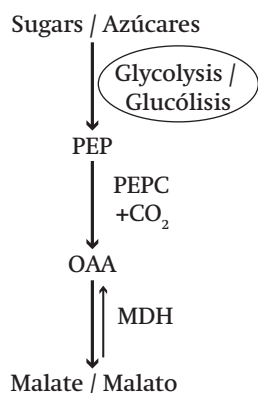


Figure 4. Simplified scheme showing malate synthesis. MDH = malate dehydrogenase, OAA = oxaloacetate, PEP = phosphoenolpyruvate and PEPC = phosphoenolpyruvate carboxylase.

Figura 4. Esquema simplificado mostrando la síntesis de malato. MDH = malato deshidrogenasa, OAA = oxalacetato, PEP = fosfoenolpiruvato y PEPC = fosfoenolpiruvato carboxilasa.

sucrose is often hydrolysed to glucose and fructose by one of the invertases. These sugars are then phosphorylated by either glucokinase or fructokinase and enter glycolysis. In plants, the cytosolic enzyme phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) is necessary for the synthesis of the Krebs cycle acids from sugars. It catalyses the conversion of PEP to oxaloacetate (OAA) (Ruffner, 1982b; Law & Plaxton, 1995). If the fruit is accumulating malate, OAA is converted to malate by cytosolic malate dehydrogenase (NAD-MDH), and malate is transported across the tonoplast into the vacuole in which it is stored (Ruffner, 1982b; Terrier & Romieu, 2001) (Figure 4). If citrate is being accumulated one molecule of PEP is converted to OAA by PEPC (Figure 5). A second PEP is converted to acetyl CoA by the sequential actions of pyruvate kinase and pyruvate dehydrogenase. Acetyl CoA and OAA are then combined by citrate synthase in the mitochondrion to give citrate. Citrate is then transported across the tonoplast into the vacuole in which it is stored. The amount of acids that are stored in the vacuole is the major determinant of the content of Krebs cycle acids in fruits. In the case of malate, it is thought that transport processes at the tonoplast are the key factor in determining the vacuolar content (Ruffner, 1982b; Terrier & Romieu, 2001; Etienne et al., 2013).

Utilization of organic acids. During the ripening of some fruits, such as grape, tomato and some soft fruits, the amount of malate/citrate in terms of both concentration ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ FW) and content per fruit ($\text{mg}\cdot\text{fruit}^{-1}$) decreases and this means that organic acids are metabolized (Ruffner, 1982b; Goodenough et al., 1985; Famiani et al., 2005, 2009, 2014a, 2014b; Famiani & Walker, 2009; Sweetman et al., 2009). There are a number of possible fates for this citrate/

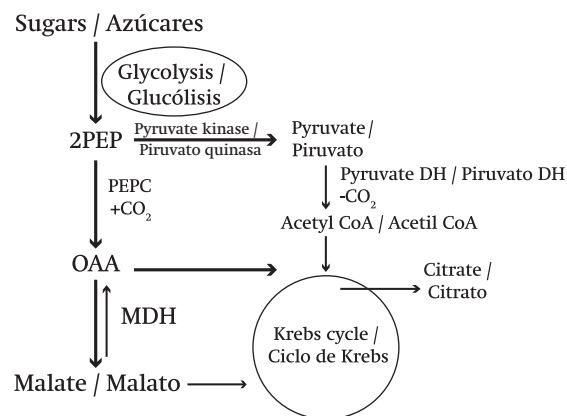


Figure 5. Simplified scheme showing citrate synthesis.

Acetyl-CoA = acetyl-coenzyme A, MDH = malate dehydrogenase, OAA = oxaloacetate, PEP = phosphoenolpyruvate, PEPC = phosphoenolpyruvate carboxylase pyruvate and DH = pyruvate dehydrogenase.

Figura 5. Esquema simplificado mostrando la síntesis de citrato. Acetil-CoA = acetil-coenzima A, MDH = malato deshidrogenasa, OAA = oxalacetato, PEP = fosfoenolpiruvato, PEPC = fosfoenolpiruvato carboxilasa piruvato y DH = piruvato deshidrogenasa.

mitocondria para resultar en citrato; el cual también es transportado a través del tonoplasto hacia el interior de la vacuola. La cantidad de ácidos que son almacenados en la vacuola es el mayor determinante del contenido de ácidos orgánicos del ciclo de Krebs en los frutos, y se cree que en el caso del malato los procesos de transporte en el tonoplasto son factores relevantes en la determinación del contenido vacuolar de los frutos (Ruffner, 1982b; Terrier & Romieu, 2001; Etienne et al., 2013).

Utilización de ácidos orgánicos. Durante la maduración de algunos frutos (como uvas, tomates y algunos frutos blandos), la cantidad de malato/citrato en ambos términos, concentración ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de PF) y contenido por fruto ($\text{mg}\cdot\text{fruto}^{-1}$), disminuye, y esto significa que los ácidos orgánicos están metabolizados (Ruffner, 1982b; Goodenough et al., 1985; Famiani et al., 2005, 2009, 2014a, 2014b; Famiani & Walker, 2009; Sweetman et al., 2009). Existen varios posibles destinos para este citrato/malato; estos son la oxidación mediante el ciclo de Krebs (respiración), la gluconeogénesis, la síntesis/transformación de aminoácidos, la síntesis de productos secundarios y la producción de etanol mediante fermentación (Farineau & Laval-Martin, 1977; Ruffner, 1982b; Famiani et al., 2000, 2005, 2014a).

Respiración. El catabolismo del malato y el citrato, a través de la respiración, implica las siguientes reacciones: el malato es transformado en piruvato por la enzima málica (ME) o a través de la acción combinada de MDH, PEPC y piruvato-quinasa (Figura 6), para después ser

malate, and these are oxidation by the Krebs cycle (respiration), gluconeogenesis, amino acid synthesis/transformations, synthesis of secondary products and/or the production of ethanol by fermentation (Farineau & Laval-Martin, 1977; Ruffner, 1982b; Famiani et al., 2000, 2005, 2014a).

Respiration. The catabolism of malate and citrate through respiration implies the following reactions. Malate is transformed into pyruvate, by ME or through the combined action of MDH, PEPCK and pyruvate kinase (Figure 6). Pyruvate is then metabolized by pyruvate dehydrogenase before entering the Krebs cycle. In addition, both malate and citrate can enter the Krebs cycle directly (Figure 7). Then the Krebs cycle either partially or completely oxidizes these compounds to CO_2 . Cytosolic NADP-ME is important in the dissimilation of Krebs cycle acids in several fruits (Dilley, 1962; Goodenough et al., 1985; Chen et al., 2009; Sweetman et al., 2009). Moreover, citrate can be converted by cytosolic forms of the Krebs cycle enzymes aconitase and isocitrate dehydrogenase to 2-oxoglutarate, which can then enter the Krebs cycle. In addition, citrate can potentially be converted to OAA and acetyl CoA by cytosolic ATP-citrate lyase. However, there is uncertainty as to which of the above reactions is used in many fruits: these could be dependent on the fruit considered and the stage of development.

While all fruits carry out respiration there are marked differences in both the rates and patterns of changes in respiration between fruits of different plant species. All fruits show a high respiration rate per gram of FW at the beginning of their development and this then decreases (largely as a result of the increase in the size of the vacuole which reduces the amount of cytoplasm per gram of FW). However, some fruits show a sharp increase in respiration during ripening, and this is called the climacteric. Fruits can be divided into two types based on this: climacteric and non-climacteric fruits. Climacteric fruits include apple, apricot, avocado, chinene (*Persea schiedeana* Nees), kiwifruit, mamey sapote, pear, peach, some plums, sourp, and tomato; non-climacteric fruits include cherry, strawberry, citrus, grape, and pineapple (Tucker, 1993; Kader, 2002; del Angel-Coronel, Cruz-Castillo, de la Cruz-Medina, & Famiani, 2010). Organic acids may be utilized by respiration during the climacteric. An increase in the abundance of NADP-ME together with a dissimilation of malate occurs in some fruits, such as tomato and loquat, during the climacteric (Hirai, 1982; Goodenough et al., 1985; Amorós, Zapata, Pretel, Botella, & Serrano, 2003). However, in the flesh of the non-climacteric fruit grape there is a net dissimilation of malate during ripening (Famiani et al., 2007, 2014a, 2014b), and, in at least one variety of the non-climacteric cherry there is no net dissimilation of stored organic acids in its flesh during

metabolizado por la piruvato deshidrogenasa antes de entrar en el ciclo de Krebs. Además, tanto el malato como el citrato pueden penetrar a este ciclo directamente (Figura 7); entonces, oxida de cualquier forma, parcial o completamente, estos compuestos a CO_2 . La NADP-ME citosólica es importante en la desasimilación de los ácidos del ciclo de Krebs en varios frutos (Dilley, 1962; Goodenough et al., 1985; Chen et al., 2009; Sweetman et al., 2009). Asimismo, el citrato puede ser convertido por las formas citosólicas de las enzimas del ciclo de Krebs, aconitato e isocitrato deshidrogenasa, en 2-oxoglutarato, el cual puede entrar al ciclo; además, el citrato puede ser potencialmente convertido en OAA y acetyl-CoA por ATP-citrato liasa citosólica. Sin embargo, existe incertidumbre en cuanto a cuáles de las reacciones mencionadas son utilizadas en muchos frutos: esto podría depender del fruto considerado y la etapa de desarrollo.

Si bien todos los frutos llevan a cabo la respiración, existen marcadas diferencias entre la tasa y los patrones de cambios entre frutos de diferentes especies de plantas. Todos los frutos muestran una tasa alta de respiración por gramo de PF al inicio de sus desarrollos y después disminuye (mayormente como resultado del incremento en el tamaño de la vacuola, lo que reduce la cantidad de citoplasma por gramo de PF). Sin embargo, algunos frutos muestran un marcado incremento durante la maduración, a esto se le llama climaterio; los frutos pueden dividirse en dos tipos basado en esto: climatéricos y no climatéricos. Los primeros incluyen manzana, albaricoque, aguacate, chinene (*Persea schiedeana* Nees), kiwi, mamey zapote, pera, durazno, algunos ciruelos, guanábana, tomate; los segundos cereza, fresa, cítricos, uva, piña, entre otros (Tucker, 1993; Kader, 2002; del Angel-Coronel, Cruz-Castillo, de la Cruz-Medina, & Famiani, 2010). Los ácidos orgánicos pueden ser utilizados por la respiración durante el climaterio. Un aumento en la abundancia de la NADP-ME junto con una desasimilación del malato ocurre en algunos frutos, tales como los tomates y los nísperos durante el climaterio (Hirai, 1982; Goodenough et al., 1985; Amorós, Zapata, Pretel, Botella, & Serrano, 2003). No obstante, en la pulpa de uvas no climatéricas existe desasimilación neta del malato durante la maduración (Famiani et al., 2007, 2014a, 2014b), y, en al menos una variedad de cerezas no climatéricas no existe una desasimilación neta de ácidos orgánicos almacenados en sus pulpas durante esta etapa (Walker et al., 2011a). Por lo tanto, no parece haber correlación entre la desasimilación neta de los ácidos del ciclo de Krebs en la pulpa de los frutos durante la maduración y la ocurrencia de un climaterio respiratorio.

Por muchos años se pensó que el incremento en el cociente de respiración ($\text{CR} = \text{evolución de } \text{CO}_2 \text{ por consumo de } \text{O}_2$) durante la maduración de las uvas

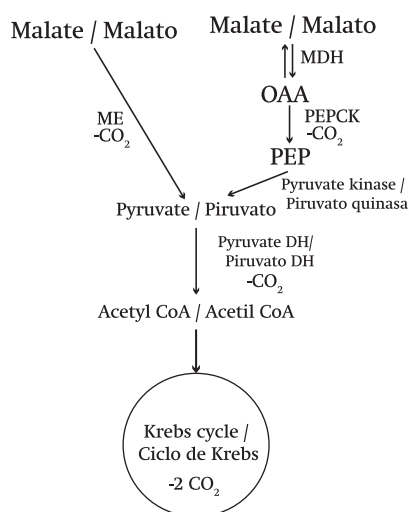


Figure 6. Simplified scheme showing malate catabolism by respiration. Acetyl-CoA = acetyl-coenzyme A, MDH = malate dehydrogenase, ME = malic enzyme, OAA = oxaloacetate, PEP = phosphoenolpyruvate, PEPCK = phosphoenolpyruvate carboxykinase pyruvate and DH = pyruvate dehydrogenase.

Figura 6. Esquema simplificado mostrando el catabolismo del malato por respiración. Acetil-CoA = acetil-coenzima A, MDH = malato deshidrogenasa, ME = enzima málica, OAA = oxalacetato, PEP = fosfoenolpiruvato, PEPCK = fosfoenolpiruvato carboxiquinasa piruvato y DH = piruvato deshidrogenasa.

ripening (Walker et al., 2011a). Therefore, there does not appear to be a correlation between the net dissimilation of Krebs cycle acids in the flesh of fruits during ripening and the occurrence of a respiratory climacteric.

For many years it was thought that the increase in the respiratory quotient ($RQ = CO_2$ evolution/ O_2 consumption) during the ripening of grapes was a result of the use of organic acids as a respiratory substrate (Peynaud & Ribéreau-Gayon, 1971; Ruffner, 1982b; Kanellis & Roubelakis-Angelakis, 1993). However, recent studies have shown that this increase in RQ is largely brought about by other processes such as fermentation and the use of NADH in biosynthesis rather than oxidative phosphorylation (Famiani et al., 2014a; Famiani, Farinelli, Palliotti, Battistelli, Moscatello, & Walker, 2015).

Gluconeogenesis. There is evidence for gluconeogenesis from malate in the flesh of grape, cherry and tomato during ripening (Ruffner, Koblet, & Rast, 1975; Ruffner & Kliewer, 1975; Farinea & Laval-Martin, 1977; Leegood & Walker, 1999; Osorio et al., 2013). The first steps in gluconeogenesis from malate involve its conversion to PEP. In plants, this conversion requires either MDH and PEPCK or ME together with pyruvate,

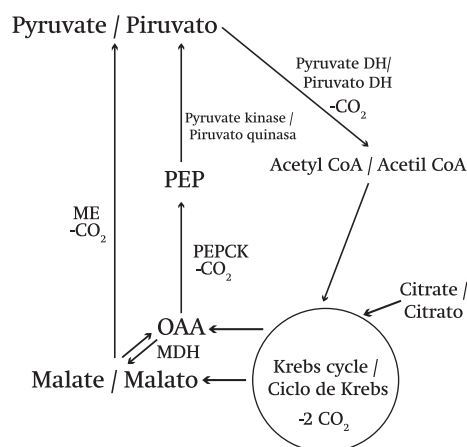


Figure 7. Simplified scheme showing citrate catabolism by respiration. Acetyl-CoA = acetyl-coenzyme A, MDH = malate dehydrogenase, ME = malic enzyme, OAA = oxaloacetate, PEP = phosphoenolpyruvate, PEPCK = phosphoenolpyruvate carboxykinase pyruvate and DH = pyruvate dehydrogenase.

Figura 7. Esquema simplificado mostrando el catabolismo del citrato por respiración. Acetil-CoA = acetil-coenzima A, MDH = malato deshidrogenasa, ME = enzima málica, OAA = oxalacetato, PEP = fosfoenolpiruvato, PEPCK = fosfoenolpiruvato carboxiquinasa piruvato y DH = piruvato deshidrogenasa.

era resultado del uso de los ácidos orgánicos como sustrato respiratorio (Peynaud & Ribéreau-Gayon, 1971; Ruffner, 1982b; Kanellis & Roubelakis-Angelakis, 1993). Sin embargo, estudios recientes han mostrado que este incremento, en el CR, es mayormente propiciado por otros procesos, tales como la fermentación y el uso de la NADH en la biosíntesis, en lugar de la fosforilación oxidativa (Famiani et al., 2014a; Famiani, Farinelli, Palliotti, Battistelli, Moscatello, & Walker, 2015).

Gluconeogenesis. Existe evidencia de gluconeogénesis a partir de malato en la pulpa de uva, cereza y tomate durante la maduración (Ruffner, Koblet, & Rast, 1975; Ruffner & Kliewer, 1975; Farinea & Laval-Martin, 1977; Leegood & Walker, 1999; Osorio et al., 2013). Los primeros pasos en la gluconeogénesis a partir del malato involucran su conversión a PEP. En plantas, esta conversión requiere de MDH y PEPCK o ME junto con piruvato ortofosfato diquinasa (PPDK) (Walker & Chen, 2002; Leegood & Walker, 2003). En el caso de la PEPCK el malato es convertido en OAA por la malato deshidrogenasa, para después ser transformado en PEP por la PEPCK (Figura 8). En el caso de la enzima málica y la PPDK, el malato es convertido en piruvato por la ME y este en PEP por la PPDK (Figura 8). En ambos casos el PEP producido en esta forma pasa a ser azúcares por inversión de las reacciones de glucólisis (Plaxton, 1996). En la pulpa de las uvas, ciruelas, cerezas y de

orthophosphate dikinase (PPDK) (Walker & Chen, 2002; Leegood & Walker, 2003). In the case of PEPCK malate is converted to OAA by malate dehydrogenase, and OAA is then converted to PEP by PEPCK (Figure 8). In the case of malic enzyme and PPDK, malate is converted to pyruvate by ME and pyruvate is converted to PEP by PPDK (Figure 8). In both cases the PEP so produced is then converted to sugars by a reversal of the reactions of glycolysis (Plaxton, 1996). In the flesh of grape, plum, cherry and soft fruits, PPDK appears to be either not present or at very low abundance (Famiani et al., 2005, 2009, 2014b; Famiani & Walker, 2009). This suggests that the majority of any gluconeogenic flux in the flesh of these fruits utilizes the PEPCK pathway. PPDK was detected in the fruit of cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) (Walker, Famiani, Baldicchi, Cruz-Castillo, & Inglese, 2011b), but this plant is a Crassulacean acid metabolism (CAM) plant and PPDK functions in its photosynthesis. Although the contribution of malate and citrate to the amount of stored sugars in ripe fruits can potentially be up to 20 % (Famiani et al., 2009), in reality it will be much lower. This is because the vast majority of the dissimilated malate and citrate is used by catabolic processes such as the Krebs cycle (Ruffner et al., 1975; Famiani et al., 2015). In grape this contribution is likely to be less than 1 % (Famiani et al., 2015).

For many years it was thought that glycolysis was inhibited in ripening grape and that malate provided the bulk of the substrate used by metabolism. Gluconeogenesis was thought to occur because there was an excess of malate (Ruffner, 1982b; Sweetman et al., 2009). However, recent work has shown that this is untrue and that sugars provide the bulk of the substrate used by metabolism (Famiani et al., 2014a, 2015). One explanation for the occurrence of gluconeogenesis is that malate flux from the vacuole is not constant during ripening, and there are times when there is an enhanced efflux of malate which results in an excess of malate in the cytosol (Famiani et al., 2015).

Amino acid and secondary product synthesis. Protein synthesis occurs in the flesh of fruits during ripening, as does the conversion of either stored or newly imported amino acids into those amino acids that accumulate within the ripe fruit (Kanellis & Roubelakis-Angelakis, 1993). Moreover, secondary products, such as pigments that give the fruit its color, are synthesized during ripening. Stored Krebs cycle acids may provide precursors for such amino acids and secondary product synthesis in the flesh of fruits in which Krebs cycle acids are dissimilated during ripening (Famiani et al., 2005, 2009, 2014a, 2014b; Pereira et al., 2006; Famiani & Walker, 2009). Amino acids can be divided into families on the basis of their biosynthetic pathway, with each family having a different precursor. Aspartate, glutamate, PEP and pyruvate are the precursors for the

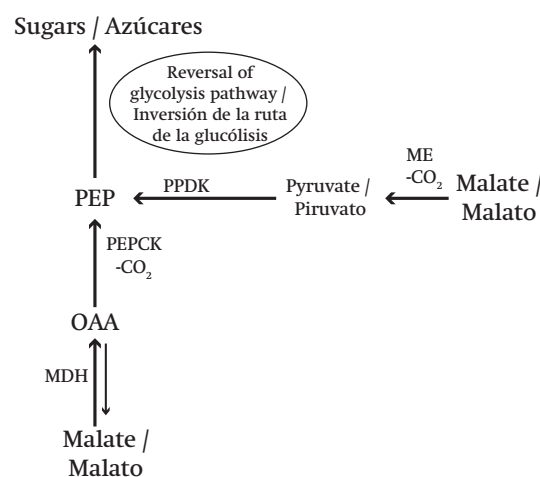


Figure 8. Simplified scheme showing gluconeogenesis from malate. MDH = malate dehydrogenase, OAA = oxaloacetate, PEP = phosphoenolpyruvate and PEPCK = phosphoenolpyruvate carboxykinase.

Figura 8. Esquema simplificado mostrando la gluconeogénesis a partir de malato. MDH = malato deshidrogenasa, OAA = oxalacetato, PEP = fosfoenolpiruvato y PEPCK = fosfoenolpiruvato carboxiquinasa.

los frutos blandos la PPDK aparenta estar ausente o en una abundancia muy baja (Famiani et al., 2005, 2009, 2014b; Famiani & Walker, 2009). En general, lo anterior sugiere que, cualquier flujo gluconeogénico en la pulpa de estos frutos utiliza la ruta de la PEPCK. La PPDK fue detectada en el fruto del nopal (*Opuntia ficus-indica*) (Walker, Famiani, Baldicchi, Cruz-Castillo, & Inglese, 2011b), pero ésta es de metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM) y la PPDK funciona en su fotosíntesis. Aunque la contribución de malato y citrato a la cantidad almacenada de azúcares en frutos maduros puede, potencialmente, ser de hasta 20 % (Famiani et al., 2009), en realidad será mucho más baja; esto es porque la gran mayoría del malato y citrato disimilados son utilizados en procesos catabólicos, como el ciclo de Krebs (Ruffner et al., 1975; Famiani et al., 2015). En uvas es probable que esta contribución sea menos de 1 % (Famiani et al., 2015).

Por muchos años se creyó que la glucólisis era inhibida en la maduración de la uva, y que el malato proveía la mayor parte del sustrato utilizado por el metabolismo. Se pensaba que la gluconeogénesis ocurría porque existía un exceso de malato (Ruffner, 1982b; Sweetman et al., 2009). Sin embargo, trabajos recientes han mostrado que esto es falso, y que los azúcares proveen la mayor parte del sustrato utilizado por el metabolismo (Famiani et al., 2014a, 2015). Una explicación para la ocurrencia de la gluconeogénesis es que el flujo de malato desde la vacuola no es constante durante la maduración, y hay ocasiones en las que es un aflujo ampliado de malato, lo que resulta en exceso de este ácido en el citosol (Famiani et al., 2015).

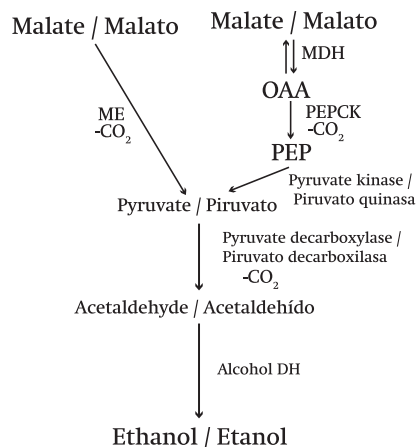


Figure 9. Simplified scheme showing conversion of malate to ethanol by fermentation. Alcohol DH = alcohol dehydrogenase, MDH = malate dehydrogenase, ME = malic enzyme, OAA = oxaloacetate, PEP = phosphoenolpyruvate and PEPCK = phosphoenolpyruvate carboxykinase.

Figura 9. Esquema simplificado mostrando la conversión de malato a etanol por fermentación. Alcohol DH = alcohol deshidrogenasa, MDH = malato deshidrogenasa, ME = enzima málica, OAA = oxalacetato, PEP = fosfoenolpiruvato y PEPCK = fosfoenolpiruvato carboxiquinasa.

synthesis of many amino acids (Lea, 1993). The carbon skeletons of glutamate and aspartate are the organic acids 2-oxoglutarate and OAA respectively, which are intermediates of the Krebs cycle. OAA can also be obtained from malate through the action of cytosolic MDH. PEP can be synthesized from malate through the action of MDH and PEPCK or ME and PPDK. Pyruvate can be obtained through the combined action of MDH, PEPCK and pyruvate kinase or through the action of ME. Hence, the metabolism of many organic and amino acids is closely linked. PEP is also a substrate for the synthesis of secondary products (e.g. phenolic compounds and pigments). Acetyl CoA is used as a precursor for the synthesis of flavonoids and isoprenoids, and acetyl CoA can derive from either pyruvate by the action of pyruvate dehydrogenase, or citrate by the action of ATP isocitrate lyase (Etienne et al., 2013).

Fermentation. Krebs cycle acids can also be converted to ethanol. There is evidence for the occurrence of aerobic fermentation to ethanol in the grape pericarp, and this may be of common occurrence in the vineyard (Romieu, Tesniere, Thanhnam, Flanzky, & Robin, 1992; Tesnière, Romieu, Dugelay, Nicol, Flanzky, & Robin, 1994; Terrier & Romieu, 2001). Similarly, in the juice sacs of citrus during ripening there can be an accumulation of ethanol and decreased aerobic respiration, and this also occurs during the storage of harvested fruits (Roe, Davis, & Bruemmer, 1984; Baldwin, 1993). Krebs cycle acids are converted into ethanol as follows (Figure 9).

Síntesis de aminoácidos y productos secundarios. La síntesis de proteína ocurre en la pulpa de los frutos durante la maduración; así como lo hace la conversión tanto de los aminoácidos almacenados como los recién importados en aquellos que se acumulan dentro del fruto maduro (Kanellis & Roubelakis-Angelakis, 1993). Asimismo, los productos secundarios, como los pigmentos que dan color a los frutos, son sintetizados durante la maduración. Los ácidos del ciclo de Krebs almacenados pueden proporcionar precursores para la síntesis de tales aminoácidos y productos secundarios en la pulpa de los frutos, en la que los ácidos del ciclo son desasimilados durante la maduración (Famiani et al., 2005, 2009, 2014a, 2014b; Pereira et al., 2006; Famiani & Walker, 2009). Los aminoácidos pueden ser divididos en familias sobre la base de su ruta biosintética, teniendo con cada familia diferente precursor (por ejemplo, el aspartato, glutamato, PEP y piruvato [Lea, 1993]). Los esqueletos de carbono del glutamato y del aspartato son los ácidos orgánicos 2-oxoglutarato y OAA, respectivamente, quienes son intermediarios del ciclo de Krebs. El OAA también puede ser obtenido a partir del malato mediante la acción de la MDH citosólica. La PEP puede ser sintetizada a partir del malato a través de la acción de la MDH y PEPCK o la ME y PPDK. El piruvato puede ser obtenido mediante la acción combinada de la MDH, PEPCK y piruvato quinasa, o a través de la acción de la ME. Así, los metabolismos de muchos ácidos orgánicos y aminoácidos están cercanamente vinculados. La PEP también es un sustrato para la síntesis de productos secundarios (por ejemplo, compuestos fenólicos y pigmentos). La acetil-CoA es utilizada como precursor para la síntesis de flavonoides e isoprenoides, y puede derivarse a partir de cualquiera, el piruvato por la acción de la piruvato deshidrogenasa, o el citrato por la acción de la ATP isocitrato liasa (Etienne et al., 2013).

Fermentación. Los ácidos del ciclo de Krebs también pueden ser convertidos en etanol. Existe evidencia de fermentación aeróbica a etanol en el pericarpio de la uva, y esto puede ser de ocurrencia común en el viñedo (Romieu, Tesniere, Thanhnam, Flanzky, & Robin, 1992; Tesnière, Romieu, Dugelay, Nicol, Flanzky, & Robin, 1994; Terrier & Romieu, 2001). Similarmente, en los depósitos de jugo de cítricos durante la maduración puede haber acumulación de etanol y respiración aeróbica disminuida; lo cual también ocurre durante el almacenaje de los frutos cosechados (Roe, Davis, & Bruemmer, 1984; Baldwin, 1993). Los ácidos del ciclo de Krebs son convertidos en etanol de la siguiente manera (Figura 9): el citrato es transformado en malato mediante reacciones catalizadas por las enzimas (o en algunos casos en la forma citosólica de éstas). El malato pasa a ser piruvato, ya sea por la ME o por las acciones combinadas de la MDH, PEPCK y piruvato quinasa.

Citrate is converted to malate by reactions catalysed by Krebs cycle enzymes (or in some cases their cytosolic form). Malate is converted into pyruvate by either ME or the combined actions of MDH, PEPCK and pyruvate kinase. This pyruvate is then converted to ethanol by the sequential actions of pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase.

Glyoxylate cycle. This effectively enables acetyl-CoA to be converted into malate. This cycle has been suggested to function in malate synthesis in young grape and banana fruits and also to provide substrates for gluconeogenesis during post-harvest ripening of banana (Surendranathan & Nair, 1976; Pua, Chandramouli, Han, & Liu, 2003; Liu, Yang, Murayama, Taira, & Fukushima, 2004; Terrier et al., 2005). However, the enzyme isocitrate lyase (ICL), which is necessary for the cycle to work, was not detected in either the pericarp of several soft fruits or grape berries at several stages of development (Famiani et al., 2005; 2014b). Hence, our view is that the occurrence of ICL (potentially as a component of the glyoxylate cycle) in many fruit at certain stages of development or under certain conditions remains uncertain and further investigations are required. However, these studies should determine the abundance of the enzyme and not just its transcript.

Vacuolar storage of organic acids

In grape and other fruits, a widespread view is that malate content is largely determined by its compartmentation in the vacuole. That is, most of the malate is located in the vacuole where it is inaccessible to the enzymes that metabolize it. The main factor that is thought to determine this compartmentation is transport of malate across the membrane that separates the vacuole from the cytosol (i.e. the tonoplast) (Ruffner, 1982b; Etienne et al., 2013). Embedded in the tonoplast there are a number of proteins involved in malate/citrate transport. Those involved in malate transport likely include several different malate transporters, and in addition there are malate channels. One transporter is AttDT, which appears to be regulated by cytosolic pH. That is, if the pH of the cytosol falls, an increase in malate transport to the cytosol occurs (Hurth et al., 2005). Less is known about citrate transport processes (Hurth et al., 2005; Etienne et al., 2013). However, for both malate and citrate, the contributions of the different proteins involved in their transport across the tonoplast are poorly understood. In the case of citrate it is thought that a combination of metabolism and transport processes at the tonoplast may control its vacuolar content (Etienne et al., 2013); however, this is not certain. Neither is it certain that in all fruits transport processes at the tonoplast are the predominant factor in determining vacuolar malate content.

Este piruvato es entonces convertido a etanol por las acciones secuenciales de la piruvato decarboxilasa y alcohol deshidrogenasa.

Ciclo del glioxilato. Esto permite a la acetil-CoA ser convertida en malato. Se ha sugerido que este ciclo funciona en la síntesis del malato en uvas y plátanos jóvenes, y que también proporciona sustratos para la gluconeogénesis durante la maduración poscosecha del plátano (Surendranathan & Nair, 1976; Pua, Chandramouli, Han, & Liu, 2003; Liu, Yang, Murayama, Taira, & Fukushima, 2004; Terrier et al., 2005). Sin embargo, la enzima isocitrato liasa (ICL), la cual es necesaria para que el ciclo funcione, no fue detectada ni en el pericarpio de varios frutos blandos ni en bayas de uva en diversas etapas de desarrollo (Famiani et al., 2005, 2014b). Por lo tanto, nuestra opinión es que la ocurrencia de la ICL (potencialmente como un componente del ciclo del glioxilato), en muchos frutos en determinadas etapas de desarrollo o bajo ciertas condiciones, sigue siendo incierta y es necesario hacer futuras investigaciones. Dichos estudios deberían determinar la abundancia de la enzima y no sólo su transcripción.

Almacenamiento vacuolar de ácidos orgánicos

En las uvas y otros frutos, la opinión generalizada es que el contenido de malato está determinado en gran medida por su compartimentación en la vacuola. Es decir, la mayor parte se encuentra en la vacuola, donde es inaccesible a las enzimas que lo metabolizan. El principal factor al que se atribuye la determinación de esta compartimentación es el transporte del malato a través de la membrana que separa a la vacuola del citosol; es decir, el tonoplasto (Ruffner, 1982b; Etienne et al., 2013). Existen diversas proteínas incrustadas en el tonoplasto que se involucran en el transporte de malato/citrato. Aquellas que participan en el transporte del malato suelen incluir diferentes transportadores, y además existen canales de este ácido. Un transportador es el AttDT, el cual parece estar regulado por el pH citosólico. Es decir, si el pH del citosol baja ocurre un incremento en transporte de malato hacia el citosol (Hurth et al., 2005). Poco se conoce sobre los procesos de transporte del citrato (Hurth et al., 2005; Etienne et al., 2013). Sin embargo, tanto para malato como para citrato, las aportaciones de las diferentes proteínas involucradas en su transporte, a través del tonoplasto, son escasamente comprendidas. En el caso del citrato, se piensa que la combinación del metabolismo y los procesos de transporte en el tonoplasto pueden controlar su contenido vacuolar (Etienne et al., 2013), pero esto no es definitivo; tampoco lo es que en todos los frutos los procesos de transporte en el tonoplasto sean el factor predominante en la determinación del contenido de malato vacuolar.

Functions of Krebs cycle acids in fleshy fruits

In all fruits, as in all plant tissues, Krebs cycle acid anions are intermediates of many metabolic pathways. However, in many fruits large amounts of Krebs cycle acids accumulate in the vacuole, and these stored acids have other functions. First, in many fruits they are likely to contribute to making the fruit unpalatable until its seed(s) have developed. When the seed(s) are approaching maturity the fruit starts to ripen and its concentration of Krebs cycle acids ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ FW) decreases. If there is a net dissimilation of these acids during ripening they can be used as substrates for metabolism (see above). Second, recent studies have suggested that a key function of the Krebs cycle acids in fruits may be in the coordination of the import and utilisation of nitrogenous compounds and associated pH regulation (Walker et al., 2011a; Famiani et al., 2012b).

Effects of both environmental conditions and agronomical practices on the content of Krebs cycle acids in fruits

Temperature. The temperature at which fruits are grown affects both their titratable acidity and content of stored organic acids. For both grape and kiwifruit higher temperatures before ripening increase their malate content (Klenert, Rapp, & Alleweldt, 1978; Richardson et al., 2004), whereas higher temperatures during ripening decrease their content (Kliwer, 1970; Buttrose, Hale, & Kliwer, 1971; Hale & Buttrose, 1974; Ruffner, Hawker, & Hale, 1976; Lakso & Kliwer, 1978; Alleweldt, During, & Jung, 1984; Richardson et al., 2004; Lobit, Génard, Soing, & Habib, 2006). Similarly, elevated temperatures during ripening decrease titratable acidity (Kliwer, 1973; Wang & Camp, 2000; Gautier, Rocci, Buret, Grassely, & Causse, 2005; Trad et al., 2013). Furthermore, at least in grape before ripening, the temperature difference between the day and the night has an effect: cool nights and warm days increase organic acid content (especially malic) more than warm days and warm nights (Kliwer, 1973). Recently it was shown that in grape an increase in maximum temperature (4 - 10 °C above controls) before ripening resulted in a higher malate content (this effect was enhanced by warmer nights); during veraison and ripening the effect was to reduce malate content. This was unless the minimum temperatures (during the night) were also raised by 4 - 6 °C, because in this case malate content was not reduced, suggesting that the regulation of malate metabolism differs during day and night (Sweetman, Sadras, Hancock, Soole, & Ford, 2014). Increased temperature of fruits during ripening almost certainly decreases their content of Krebs cycle acids by increasing the rate of many metabolic processes. In fruits, as in all plant tissues, an increase in temperature increases the rate of their metabolism, and hence the consumption of compounds such

Funciones de los ácidos del ciclo de Krebs en frutos carnosos

En todos los frutos, así como en los tejidos de plantas, los aniones de los ácidos del ciclo de Krebs son intermediarios de muchas rutas metabólicas. No obstante, en muchos frutos, grandes cantidades de ácidos del ciclo se acumulan en la vacuola, y estos, almacenados, tienen otras funciones. En primera, en varios es probable que contribuyan en hacerlos desagradables hasta que su(s) semilla(s) se haya(n) desarrollado. Cuando la(s) semilla(s) se está(n) aproximando a la madurez el fruto también lo hace, y su concentración de ácidos del ciclo de Krebs ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de PF) disminuye. Si existe una desasimilación neta de estos ácidos durante la maduración, ellos pueden ser utilizados como sustratos para el metabolismo (ver arriba). Segunda, estudios recientes han sugerido que una función clave de los ácidos del ciclo de Krebs puede estar en la coordinación de la importación y utilización de compuestos nitrogenados y regulación de pH asociado (Walker et al., 2011a; Famiani et al., 2012b).

Efectos de las condiciones ambientales y las prácticas agronómicas sobre el contenido de ácidos del ciclo de Krebs en los frutos

Temperatura. La temperatura a la que los frutos son cultivados afecta tanto su acidez titulable como el contenido de ácidos orgánicos almacenados. Para uvas y kiwis, temperaturas más altas antes de la maduración incrementan su contenido de malato (Klenert, Rapp, & Alleweldt, 1978; Richardson et al., 2004); mientras que, durante la maduración disminuyen su contenido (Kliwer, 1970; Buttrose, Hale, & Kliwer, 1971; Hale & Buttrose, 1974; Ruffner, Hawker, & Hale, 1976; Lakso & Kliwer, 1978; Alleweldt, During, & Jung, 1984; Richardson et al., 2004; Lobit, Génard, Soing, & Habib, 2006). De manera similar, temperaturas elevadas durante la maduración disminuyen su acidez titulable (Kliwer, 1973; Wang & Camp, 2000; Gautier, Rocci, Buret, Grassely, & Causse, 2005; Trad et al., 2013). Además, al menos en uva antes de madurar, la diferencia de temperatura entre el día y la noche tiene efecto: noches frías y días calurosos aumentan el contenido de ácidos orgánicos (especialmente el ácido málico), más que días y noches calurosas (Kliwer, 1973). Recientemente se mostró que, en uva, un aumento en la temperatura máxima (4 - 10 °C por encima de los testigos), antes de la maduración, resultó en mayor contenido de malato (este efecto fue reforzado por noches más cálidas); en el envero y la maduración el efecto fue reducir el contenido de malato. Esto sucedió a menos que las temperaturas mínimas (durante la noche), también fueron elevadas 4 - 6 °C, ya que en este caso el contenido de malato no se redujo, lo que sugiere que la regulación de su metabolismo difiere durante el día y la noche (Sweetman, Sadras, Hancock, Soole, & Ford, 2014). El aumento de la temperatura

as sugars and stored Krebs cycle acids that serve as metabolic substrates.

Temperature affects the flux through diverse pathways, for example, respiration and secondary metabolite synthesis (Ruffner, 1982b; Pereira et al., 2006). Moreover, it has been proposed that an increase in temperature could alter transport of malate/citrate at the tonoplast resulting in a decrease in their vacuolar content, and as a result more malate/citrate would be available in the cytosol for use in metabolism (Etienne et al., 2013).

An increase in the rate of respiration of fruits as temperature increases has been shown in many studies (Hansen, 1942; Ruffner et al., 1976; Ruffner, 1982b). The results of Taureilles-Saurel, Romieu, Robin, and Flanzky (1995a, 1995b) support an increase in flux through the Krebs cycle in response to higher temperatures. Transcript levels of several mitochondrial dicarboxylate/tricarboxylate transporters increased with warming (Rienth et al., 2014), suggesting/supporting an increased import of malate into the mitochondria for respiration (Sweetman et al., 2014).

Temperature affects the metabolic fate of dissimilated malate in ripening grape berries. At higher temperatures, the ratio of the amount of malate utilized by respiration to that used by gluconeogenesis is greater than at lower temperatures; however, at all temperatures the proportion of malate utilized by gluconeogenesis is small (Ruffner, 1982b; Famiani et al., 2015). At lower temperatures there is a lower rate of respiration and hence more malate is likely used in gluconeogenesis. Furthermore, temperature also increases the amount of ethanol produced by fermentation (Terrier & Romieu, 2001). The explanation for this is likely that an increase in temperature increases the rate of metabolic processes, and an increase in respiration provides ATP and NAD(P)H for these. However, a high respiratory activity at elevated temperatures consumes a large amount of O₂, and ethanol fermentation that produces ATP without consuming O₂ increases. It has been concluded that ethanol production is likely to be very common in grapes grown in the vineyard, as bunches can be subjected to temperatures as high as 50 °C (Romieu et al., 1992). Indeed, the direct exposure of fruit to light can increase their temperature well above air temperature (Smart & Sinclair, 1976).

Light. Several environmental (latitude and orientation of the field if it is on a hill) and cultural factors (training system and pruning) affect light availability for both fruits and leaves. However, the effect of light on fruit composition is difficult to interpret. One reason is that solar irradiance also increases fruit temperature (Smart & Sinclair, 1976), and hence there is an interaction

de los frutos durante la maduración disminuye, casi seguramente, su contenido de ácidos del ciclo de Krebs mediante el incremento de la tasa de muchos procesos metabólicos. En frutos, así como en todos los tejidos de la planta, el aumento en la temperatura incrementa la tasa de su metabolismo, y por lo tanto, el consumo de compuestos, tales como los azúcares y ácidos del ciclo de Krebs almacenados que sirven como sustratos metabólicos.

La temperatura afecta el flujo mediante diversas rutas, por ejemplo, la respiración y la síntesis de metabolitos secundarios (Ruffner, 1982b; Pereira et al., 2006). Asimismo, ha sido propuesto que el incremento en la temperatura podría alterar el transporte de malato/citrato en el tonoplasto, resultando en la disminución en su contenido vacuolar y más malato/citrato estaría disponible en el citosol para usarse en el metabolismo (Etienne et al., 2013).

Un crecimiento en la tasa de respiración de los frutos conforme la temperatura incrementa ha sido mostrado en muchos estudios (Hansen, 1942; Ruffner et al., 1976; Ruffner, 1982b). Los resultados de Taureilles-Saurel, Romieu, Robin, & Flanzky (1995a, 1995b) respaldan un aumento en el flujo a través del ciclo de Krebs en respuesta a temperaturas altas. Los niveles de transcripción de varios transportadores de dicarboxilato/tricarboxilato incrementaron con el calentamiento (Rienth et al., 2014), sugiriendo y respaldando importación incrementada de malato al interior de la mitocondria para la respiración (Sweetman et al., 2014).

En bayas de uva en maduración la temperatura afecta el resultado metabólico del malato desasimilado. A temperaturas más altas, la relación de la cantidad de malato utilizada por la respiración sobre aquella usada por la gluconeogénesis es mayor que a temperaturas más bajas, sin embargo, en cualquiera la proporción de malato utilizado por la gluconeogénesis es pequeña (Ruffner, 1982b; Famiani et al., 2015). A temperaturas más bajas existe una tasa de respiración menor, y por lo tanto es probable que más malato sea usado en la gluconeogénesis. Además, la temperatura también incrementa la cantidad de etanol producida por la fermentación (Terrier & Romieu, 2001). La explicación para esto es probablemente que un incremento en la temperatura eleve la tasa de los procesos metabólicos, y un aumento en la respiración provee ATP y NAD(P)H para estos. Sin embargo, alta actividad respiratoria a temperaturas elevadas consume gran cantidad de O₂, y la fermentación que produce ATP sin consumir O₂ incrementa. Se ha concluido que es probable que la producción de etanol sea muy común en uvas cultivadas en el viñedo; puesto que los racimos pueden ser expuestos hasta a 50 °C (Romieu et al., 1992). De hecho, la exposición directa del fruto a la luz puede

between light and temperature. A second reason is that shade can delay ripening, and this can cause a higher content of organic acids at harvest (Jackson & Lombard, 1993; Tombesi, Antognozzi, & Palliotti, 1993).

In grape, de Bolt, Ristic, Iland, and Ford (2008) varied light intensity at constant fruit temperature. A much lower amount of malate accumulated during stage I of berry development and a lower decrease in malate content occurred during stage III (ripening) in bunches enclosed in boxes compared to those fully exposed to light. The final content of malate was higher in the berries enclosed by boxes. The final soluble solids content (which is an important parameter in defining the ripening stage) was similar in the two treatments. In addition, Hummel and Ferree (1998) showed that in grape increased illumination (compared to a control) decreased total titratable acidity (TTA) and malate content, and this was observed when grapes were harvested at a similar soluble solids concentration or at the same date. Yang, Zhu, Bu, Hu, Wang, and Huang (2009) studied the effects of bagging on development and quality of longan, and they found that the amount of light transmittance affected malic acid content. Photoperiod can also affect fruit composition (including organic acid content) in some fruits such as raspberry (Mazur et al., 2014). Overall these studies suggest that light can alter the organic acid content of fruits directly, that is by a means that is not dependent on increasing fruit temperature.

Cultivar. The different cultivars of one species can have very different organic acids contents (in terms of either the type of acid present or its content) (Kliewer, Howarth, & Omori, 1967; Arfaoli & Bosetto, 1993; Moing et al., 1998; Gurrieri et al., 2001; Albertini, Carcouet, Pailly, Gambotti, Luro, & Berti, 2006; Saradhulhat & Paull, 2007; Wu et al., 2007; Muñoz-Robredo, Robledo, Manríquez, Molina, & Defilippi, 2011). For example, for some fruits, such as grape, citrus and pineapple, there are either high or low acidity cultivars (Diakou et al., 1997; Sadka, Dahan, Cohen, & Marsh, 2000; Sadka, Dahan, Or, Roose, Marsh, & Cohen, 2001; Saradhulhat & Paull, 2007). Hence, cultivar can be one of the main factors affecting organic acid content. However, the differences in metabolism between these cultivars that are responsible for these different organic acid contents are not known with any certainty. It should be noted that cultivars differ in their vegetative characteristics (i.e. vigor and foliage density), and that this too could indirectly affect the organic acid content of the fruit.

There have been many studies that have tried to link organic acid contents to metabolism in the cytoplasm. In peach the activities of PEPC, NAD-MDH and NADP-ME could not explain the difference in malate and citrate content between low- and high-acid cultivars (Moing et al., 1998, 2000). Similarly, PEPC cannot

incrementar su temperatura muy por encima de la del aire (Smart & Sinclair, 1976).

Luz. Muchos factores ambientales (latitud y orientación del campo, si está sobre una colina) y culturales (sistema de formación y poda) afectan la disponibilidad de luz para ambos, frutos y hojas. Sin embargo, su efecto sobre la composición del fruto es difícil de interpretar. Una razón es que la irradiación solar también incrementa la temperatura del fruto (Smart & Sinclair, 1976), y por lo tanto existe interacción entre luz y temperatura. Una segunda razón es que la sombra puede retrasar la maduración, y esto puede causar mayor contenido de ácidos orgánicos en la cosecha (Jackson & Lombard, 1993; Tombesi, Antognozzi, & Palliotti, 1993).

En uvas, de Bolt, Ristic, Iland, y Ford (2008) variaron la intensidad de luz a temperatura constante del fruto. Durante la etapa I del desarrollo de la baya se acumuló menor cantidad de malato se acumuló, y durante la etapa III (maduración) ocurrió menor disminución de este ácido en los racimos que se encontraban en cajas, comparados con aquellos completamente expuestos a la luz. El contenido final de malato fue más alto en las bayas en cajas. La cantidad de sólidos solubles (la cual es importante parámetro en la definición de la etapa de desarrollo) fue similar en los dos tratamientos. Además, Hummel y Ferree (1998) mostraron que en uvas el incremento en la iluminación (comparada con un testigo) disminuyó la acidez titulable total (ATT) y el contenido de malato; esto fue observado cuando las uvas fueron cosechadas a concentración de sólidos solubles similar o en una misma fecha. Yang, Zhu, Bu, Hu, Wang, y Huang (2009) estudiaron los efectos del embolsado sobre el desarrollo y la calidad del longan, y encontraron que la cantidad de transmitancia de luz afectó el contenido de ácido málico. El fotoperiodo también puede afectar la composición del fruto (incluyendo el contenido de ácido orgánico), como la frambuesa (Mazur et al., 2014). En general, estos estudios sugieren que la luz puede alterar el contenido de ácido orgánico de los frutos directamente.

Cultivar. Los diferentes cultivares de una especie pueden tener diferentes contenidos de ácidos orgánicos (en términos, ya sea, del tipo de ácido presente o su contenido) (Kliewer, Howarth, & Omori, 1967; Arfaoli & Bosetto, 1993; Moing et al., 1998; Gurrieri et al., 2001; Albertini, Carcouet, Pailly, Gambotti, Luro, & Berti, 2006; Saradhulhat & Paull, 2007; Wu et al., 2007; Muñoz-Robredo, Robledo, Manríquez, Molina, & Defilippi, 2011); por ejemplo uvas, cítricos y piñas, existen ambos, cultivares de alta o baja acidez (Diakou et al., 1997; Sadka, Dahan, Cohen, & Marsh, 2000; Sadka, Dahan, Or, Roose, Marsh, & Cohen, 2001; Saradhulhat & Paull, 2007). Por lo tanto, el cultivar puede ser uno de los principales factores que afectan el contenido de ácido orgánico. Sin embargo, las

account for differences in malate content of low- and high-acid cultivars in apple and loquat (Chen et al., 2009; Yao et al., 2009). In both plum and cherry, there was no correlation between the abundance of PEPCK and malate/citrate dissimilation (Walker et al., 2011a; Famiani et al., 2012b). The abundance of the enzyme citrate synthase does not appear to be responsible for the differences in the citrate content of fruits of low- and high-acid varieties of several fruits (e.g. citrus, melon, peach and pineapple) (Canel, Bailey-Serres, & Roose, 1996; Sadka et al., 2001; Etienne, Moing, Dirlewanger, Raymond, Monet, & Rothan, 2002; Saradhulhat & Paull, 2007; Tang, Bie, Wu, Yi, & Feng, 2010). On the other hand, it has been suggested that NADP-ME may play a role in determining the low malate content of low acid cultivars of apple and loquat (Chen et al., 2009; Yao et al., 2009). A comparison of low- and high-acid peach varieties showed that there was a difference in the expression of vacuolar proton pumps and it is possible that this could be related to the ability of the vacuole to store malate and citrate (Etienne et al., 2002). In tomato, altered organic acids levels were found in lines which contained sequences for i) PEPCK, ii) PEPC, numerous membrane transporters and a fructokinase-like protein, or iii) an alcohol dehydrogenase and an NADP-linked malic enzyme (Eshed & Zamir, 1994; Causse et al., 2004), indicating that it is likely that some of these proteins are involved in altering the Krebs cycle acid content of fruits. In citrus and pineapple, studies in which low- and high-acid genotypes were compared led to the suggestion that a reduction of aconitase activity in high acidity genotypes played a role in determining citric acid content (Bogin & Wallace, 1966; Sadka et al., 2000; Saradhulhat & Paull, 2007).

Taken together the above studies suggest that there is not just one mechanism, but different ones that may use a range of metabolic pathways that determine cultivar-dependent differences in fruit organic acid content.

Rootstock. Fruit of 'Rangpur' (*Citrus limonia* Osb.) and sweet lemon (*Citrus limettoides* Tan.), high-acid and low-acid species, respectively, were reciprocally grafted. The fruit content of organic acids was unchanged, and in this situation the rootstock had very little effect (Castle, 1995). However, there are studies which show that rootstock can affect the organic acid contents of fruits, such as cherry, citrus, grape, kiwifruit, peach, etc. (Caruso, Giovannini, & Liverani, 1996; Boyes, Strübi, & Marsh, 1997; Cantín, Pinochet, Gogorcena, & Moreno, 2010; Gong, Blackmore, & Walker, 2010; Usenik, Fajt, Mikulic-Petkovsek, Slatnar, Stampar, & Veberic, 2010; Orazem, Stampar, & Hudina, 2011a, 2011b; Legua et al., 2014). In addition to a possible direct influence on the organic acid content of the fruit, the rootstocks may have indirect effects, that is by altering, for example, vegetative vigor, density of the canopy (hence amount of light reaching the fruit), source/sink ratio, water and

diferencias en metabolismo entre estos cultivares que son responsables de los contenidos de ácido orgánico no son conocidas con ninguna certeza. Cabe señalar que estos difieren en sus características vegetativas (es decir, vigor y densidad de follaje), y que esto también podría afectar indirectamente el contenido de ácido orgánico del fruto.

Existen muchos estudios que han tratado de vincular los contenidos de ácido orgánico con el metabolismo en el citoplasma. En duraznos, las actividades de la PEPC, NAD-MDH y NADP-ME no podrían explicar la diferencia en el contenido de malato y citrato entre cultivares de alta y baja acidez (Moing et al., 1998, 2000). Similarmente, la PEPC no puede explicar las diferencias en la cantidad de malato de los cultivares de alta y baja acidez en manzana y níspero (Chen et al., 2009; Yao et al., 2009). En ciruelas y cerezas no hubo correlación entre la abundancia de PEPCK y la desasimilación de malato/citrato (Walker et al., 2011a; Famiani et al., 2012b). La copiosidad de la enzima citrato sintasa no parece ser responsable por las diferencias en la cantidad de citrato de frutos de variedades de baja y alta acidez (por ejemplo, cítricos, melones, duraznos y piñas) (Canel, Bailey-Serres, & Roose, 1996; Sadka et al., 2001; Etienne, Moing, Dirlewanger, Raymond, Monet, & Rothan, 2002; Saradhulhat & Paull, 2007; Tang, Bie, Wu, Yi, & Feng, 2010). Por otra parte, se ha sugerido que la NADP-ME puede jugar un papel en la determinación del bajo contenido de malato de cultivares de baja acidez de manzanas y nísperos (Chen et al., 2009; Yao et al., 2009). Una comparación de variedades de durazno de alta y baja acidez mostró que había diferencia en la expresión de bombas de protones vacuolares, y es posible que esto pudiese estar relacionado con la habilidad de la vacuola para almacenar malato y citrato (Etienne et al., 2002). En tomates, fueron encontrados niveles alterados de ácidos orgánicos en líneas que contenían secuencias de 1) PEPCK, 2) PEPC, numerosos transportadores de membrana y una proteína similar a la fructoquinasa o 3) una alcohol deshidrogenasa y una enzima málica vinculada a la NADP (Eshed & Zamir, 1994; Causse et al., 2004); indicando que es probable que algunas de estas proteínas estén involucradas en alterar el contenido de los ácidos del ciclo de Krebs en los frutos. En estudios de cítricos y piñas, fueron comparados los genotipos de baja y alta acidez y sugieren que la reducción en la actividad de la aconitasa en los de alta acidez jugó un rol al determinar el contenido de ácido cítrico (Bogin & Wallace, 1966; Sadka et al., 2000; Saradhulhat & Paull, 2007).

Tomadas en conjunto las investigaciones antes mencionadas sugieren que no existe sólo un mecanismo, sino diferentes que pueden usar una serie de rutas metabólicas que determinan las diferencias dependientes del cultivar en el contenido de ácido orgánico del fruto.

mineral salt uptake, and these are known to affect the organic acid content of fruits.

Mineral nutrition. In the leaves of many plants nitrogen metabolism is the major factor affecting the content of Krebs cycle acids and large amounts of these can accumulate (Smith & Raven, 1979). This is because the assimilation of nitrate or ammonium into amino acids is not a proton neutral process. Malate metabolism is associated with the pH regulation necessary for this nitrogen assimilation. For example, the assimilation of nitrate into amino acids in leaves consumes protons. Malic acid is synthesized in the leaf and malate is transported to the root. This leaves protons in the leaf to restore the pH (Raven and Smith, 1976). In contrast to leaves, fruits import amides such as glutamine and asparagine as their main source of nitrogen, and the assimilation of these into compounds such as amino acids is proton neutral. Hence, there is no requirement for the synthesis of large amounts of malate in response to their assimilation during the long term growth of the fruit (Walker & Chen, 2002).

Most studies of the effect of mineral nutrition on fruit quality have dealt with nitrogen and potassium, and for both their effects vary in different studies. Nitrogen supply affects plant vigor and the leaf/fruit ratio, which can then affect both fruit ripening and humidity and sunlight penetration inside the canopy. Therefore, it is often difficult to determine whether the effect of nitrogen is direct or indirect.

In grape, a low nitrogen status of the plant reduces vine vigor, and berries from such plants have both a high soluble solids content and pH together with a low malic acid content (Reynard, Zufferey, Nicol, & Murisier, 2011). In apricot a relatively low N supply (80 kg·ha⁻¹, as opposed to a higher N supply of 150 kg·ha⁻¹) resulted in fruits with a slightly higher sugar concentration and lower acid concentration (Radi, Mahrouz, Jaouad, & Amiot, 2003). In peach and tomato a higher nitrogen supply resulted in higher values of titratable acidity and an increase in organic acid contents (Davies & Winsor, 1967; Davies, 1964; Jia et al., 1999). In orange a higher nitrogen supply resulted in a higher titratable acidity (Reitz & Koo, 1960). On the other hand, nitrogen supply caused a reduction in titratable acidity in pineapple (Spironello, Quaggio, Teixeira, Furlani, & Sigrist, 2004), and had no significant effect in peach and kiwifruit (Cummings & Reeves, 1971; Pacheco et al., 2008). In addition, the form in which nitrogen is supplied affects the organic acid content of fruits. Hydroponically-cultivated tomato plants fed with NH₄⁺ had lower citrate and malate contents in ripe fruits than plants fed with NO₃⁻ or NO₃⁻ + NH₄⁺ (Xin-Juan, Qing-Yu, Xiao-Hui, Shen, & Dong, 2012). Nevertheless, the differences in malate/citrate content observed in these fruits were much less than

Portainjerto. El fruto 'Rangpur' (*Citrus limonia* Osb.) y el limón dulce (*Citrus limettoides* Tan.), especies de alta y baja acidez, respectivamente, fueron recíprocamente injertadas. El contenido de ácidos orgánicos del fruto permaneció sin cambio, y en esta situación el portainjerto tuvo muy poco efecto (Castle, 1995); sin embargo, existen estudios que demuestran que éste puede afectar el contenido de ácidos orgánicos de frutos (como cerezas, cítricos, uvas, kiwis, duraznos, etc.) (Caruso, Giovannini, & Liverani, 1996; Boyes, Strübi, & Marsh, 1997; Cantín, Pinochet, Gogorcena, & Moreno, 2010; Gong, Blackmore, & Walker, 2010; Usenik, Fajt, Mikulic-Petkovsek, Slatnar, Stampar, & Veberic, 2010; Orazem, Stampar, & Hudina, 2011a, 2011b; Legua et al., 2014), y además de influencia directa pueden tener efectos indirectos. Es decir, alterando, por ejemplo, el vigor vegetativo, la densidad del dosel (por lo tanto, la cantidad de luz que llega al fruto) la relación fuente/sumidero, la absorción de agua y sales minerales, y estos son conocidos por afectar el contenido de ácido orgánico de los frutos.

Nutrición mineral. En muchas plantas el metabolismo del nitrógeno en las hojas es el principal factor que afecta el contenido de ácidos del ciclo de Krebs, y grandes cantidades de estos pueden acumularse (Smith & Raven, 1979). Esto es porque la asimilación de nitrato o amonio en aminoácidos no es un proceso de protón neutral; el metabolismo del malato está asociado con la regulación del pH necesario para esta asimilación (por ejemplo, incorporación del nitrato en aminoácidos en las hojas consume protones). El ácido málico es sintetizado en la hoja y el malato es transportado a la raíz. Esto deja protones en la hoja para restaurar el pH (Raven & Smith, 1976). En contraste con las hojas, los frutos importan amidas, como la glutamina y la asparagina, como su principal fuente de nitrógeno, y la asimilación de éstas en compuestos, tales como los aminoácidos, es neutral en protones. Por lo tanto, no existe necesidad de la síntesis de grandes cantidades de malato en respuesta a su asimilación durante el largo periodo de crecimiento del fruto (Walker & Chen, 2002).

La mayoría de los estudios sobre el efecto de la nutrición mineral en la calidad de los frutos han abordado al nitrógeno y potasio, y para ambos sus efectos varían. El suministro de nitrógeno afecta el vigor de la planta y la relación hoja/fruto; la cual puede afectar, la maduración, humedad de fruto y la penetración de luz solar al interior del dosel. Por lo tanto, a menudo es difícil determinar si su efecto es directo o indirecto.

En uva, un bajo estatus de nitrógeno el vigor de las parras, y los frutos de estas plantas presentan alto contenido de sólidos solubles y pH, junto con un bajo contenido de ácido málico (Reynard, Zufferey, Nicol, & Murisier, 2011). En albaricoque, el suministro relativamente

the differences in content in leaves found in comparable studies (Walker & Chen, 2002). However, in this study (Xin-Juan et al., 2012) no significant correlations were found between the different organic acid contents in the fruits of plants grown using different forms of nitrogen and the content of the enzymes studied (PEPC, NAD-MDH and CS), suggesting that other factors, such as compartmentation, might be involved in determining differences in organic acid content (Gutiérrez-Granda & Morrison, 1992).

In several studies, an increased potassium supply to the plant has been found to increase the titratable acidity of its fruits (Reitz & Koo, 1960; Embleton, Jones, Pallares, & Platt, 1978; du Preez, 1985; Ruhl, 1989; Spironello et al., 2004; Alva, Mattos, Paramasivam, Patil, Dou, & Sajwan, 2006). However, in other cases an increased potassium supply led to either a reduction of fruit titratable acidity (Vadivel & Shanmugavelu, 1978; Ramesh-Kumar & Kumar, 2007) or had no effect on titratable acidity and organic acid contents (Cummings & Reeves, 1971; Pacheco et al., 2008; Etienne, Génard, Bancel, Benoit, Lemire, & Bugaud, 2014). In grape, musts which contain high amounts of potassium also tend to have high pH and malate content (Ruhl, 1989; Jackson & Lombard, 1993; Mpelasoka, Schachtman, Treeby, & Thomas, 2003). Failla, Scienza, and Brancadoro (1996) found a relationship between potassium and malic acid at veraison which, however, was not evident in the ripe berry. The positive correlation between malate and potassium contents is also demonstrated by the positive correlation between malate content and ash alkalinity (that is strongly related to potassium content) found in ripe fruits (Genevois & Peynaud, 1947a, 1947b; Souty, Perret, & Andre, 1967; Morrison & Noble, 1990). It has been suggested that a possible explanation for the relationship between potassium and organic acid contents in some fruits is that potassium may have a role in balancing the charge present on organic acid anions in the vacuole (Lang, 1983; Lobit, Genard, Wu, Soing, & Habib, 2003).

Water availability. Excess water supply, resulting from either excessive rainfall or irrigation, can affect fruit composition. In over-watered grapevines it appears that a higher organic acid content of the fruit is brought about by both a delay in the ripening of the fruit and excessive growth of the leaves that shade the berries (Smart & Coombe, 1983; Jackson & Lombard, 1993). In grape, especially if grown in dry climatic regions, irrigation can increase titratable acidity and organic acid content (Esteban, Villanueva, & Lissargue, 1999; des Gachons, Leeuwen, Tominaga, Soyer, Gaudillere, & Dubourdieu, 2004; de la Hera-Orts, Martinez-Cutillas, Lopez-Roca, & Gomez-Plaza, 2005).

When fruits of two cultivars of nectarines from well-watered and under-watered trees were compared,

bajo de N (80 kg·ha⁻¹, en lugar de 150 kg·ha⁻¹) resultó en frutos con concentración de azúcares ligeramente más alta y concentración de ácido más baja (Radi, Mahrouz, Jaouad, & Amiot, 2003). En durazno y tomate, mayor abastecimiento de N resultó en valores más altos de acidez titulable e incremento en el contenido de ácido orgánico (Davies & Winsor, 1967; Davies, 1964; Jia et al., 1999); en naranja, también se obtuvo acidez titulable más alta (Reitz & Koo, 1960). Por otro lado, el suministro de N causó reducción de acidez titulable en piña (Spironello, Quaggio, Teixeira, Furlani, & Sigrist, 2004). Otros estudios reportan que no tuvo efecto significativo ni en durazno ni en kiwi (Cummings & Reeves, 1971; Pacheco et al., 2008). Además, de efectos varietales (durazno), la forma en que el N es adicionado afecta el contenido de ácidos orgánicos de los frutos.

Plantas de tomate cultivadas hidropónicamente, nutridas con NH₄⁺, mostraron contenidos de citrato y malato más bajos en frutos maduros que plantas nutridas con NO₃⁻ o NO₃⁻ + NH₄⁺ (Xin-Juan, Qing-Yu, Xiao-Hui, Shen, & Dong, 2012). No obstante, las diferencias en la cantidad de malato/citrato observadas en estos frutos fueron mucho menores que las encontradas en hojas en estudios comparables (Walker & Chen, 2002). Sin embargo, Xin-Juan et al. (2012) no encontraron relaciones significativas entre los contenidos de ácido orgánico en los frutos de plantas cultivadas utilizando diferentes formas de nitrógeno y el contenido de las enzimas estudiadas (PEPC, NAD-MDH y CS); sugiriendo que otros factores, como la compartimentación, pueden estar involucrados en la determinación de diferencias en el contenido de ácido orgánico (Gutiérrez-Granda & Morrison, 1992).

En varios estudios, se ha encontrado que el suministro incrementado de potasio a la planta aumenta la acidez titulable de sus frutos (Reitz & Koo, 1960; Embleton, Jones, Pallares, & Platt, 1978; du Preez, 1985; Ruhl, 1989; Spironello et al., 2004; Alva, Mattos, Paramasivam, Patil, Dou, & Sajwan, 2006). No obstante, en otros casos un abastecimiento mayor de potasio condujo a la reducción de la acidez titulable del fruto (Vadivel & Shanmugavelu, 1978; Ramesh-Kumar & Kumar, 2007) o al efecto nulo sobre la acidez titulable y los contenidos de ácido orgánico (Cummings & Reeves, 1971; Pacheco et al., 2008; Etienne, Génard, Bancel, Benoit, Lemire, & Bugaud, 2014). En uva, mostos que contienen altas cantidades de potasio también suelen tener altos pH y contenido de malato (Ruhl, 1989; Jackson & Lombard, 1993; Mpelasoka, Schachtman, Treeby, & Thomas, 2003). Failla, Scienza, y Brancadoro (1996) encontraron relación entre el potasio y el ácido málico en el envero, la cual no fue evidente en la baya madura. La correlación positiva entre los contenidos de malato y potasio es también demostrada entre la cantidad de malato y la alcalinidad de la ceniza (que está fuertemente relacionada a la concentración de potasio) encontrada en frutos maduros (Genevois & Peynaud, 1947a, 1947b; Souty, Perret, &

it was found that fruits from under-watered plants had a lower amount of both malic and total acids per fruit (Thakur & Singh, 2011). However, in most other studies an increased supply of water decreased the titratable acidity and organic acid content of ripe fruits. In different citrus species (orange, clementine, satsuma mandarin) cultivated using different amounts of water supply, it was found that a lower availability of water resulted in fruits with a higher titratable acidity (Yakushiji, Morinaga, & Nonami, 1998; González-Altozano & Castel, 1999; Brandon, Hockema, & Etxeberria, 2001; Kallsen, Sanden, & Arpaia, 2011). Apple and tomato fruits from well-watered plants had a lower titratable acidity (Mills, Behboudian, & Clothier, 1996; Veit-Köhler, Krumbein, & Kosegarten 1999). In strawberry, fruits from well-watered plants and under-watered plants showed differences in organic acid content, both when expressed on a fresh and dry weight basis; however, these effects were not uniform but cultivar dependent (Bordonaba & Terry, 2010). In peach, irrigation did not result in significant differences in the contents of malic and citric acids, and did not affect the seasonal pattern of changes in the content of these acids (Wu, Genard, Lescourret, Gomez, & Li, 2002).

Hence, the effect of water availability on the organic acid content of fruits is complex, and this is because of the interactions with other factors, such as climatic conditions, cultivar and the time during fruit development when water stress occurs. In addition, water supply can increase vegetative growth, which can have an effect, and increase yield (as result of larger berries) and slows/delays ripening (Jackson & Lombard, 1993). The situation is further complicated because water availability can affect the volume of the fruits and this causes complications when expressing data from experiments. For example, a fruit whose volume has increased as a result of additional water import will have a lower organic acid content per FW but its content per DW will be unaltered.

The use of saline water for the irrigation of tomato resulted in a reduction in fruit growth and yield; however, the fruit had increased contents of organic acids, sugars and soluble solids. In addition, there was an increase in the transcription of a PEPCK gene (Incerti, Navari-Izzo, Pardossi, Mensual, & Izzo, 2007; Saito et al., 2008).

Fruit load (source/sink ratio). A different fruit load is the result of fruit-set, which can be affected by both environmental and cultivation practices. Fruit thinning and pruning (including defoliation) are important tools to regulate fruit load and the source/sink ratio. An increase in fruit load modifies fruit composition directly by reducing the amount of sugars and other

Andre, 1967; Morrison & Noble, 1990). Se ha sugerido que una posible explicación para la relación entre el potasio y los contenidos de ácido orgánico en algunos frutos es que el potasio puede tener un papel en el equilibrio de la carga presente en los aniones de ácidos orgánicos en la vacuola (Lang, 1983; Lobit, Genard, Wu, Soing, & Habib, 2003).

Disponibilidad de agua. El suministro excesivo de agua, sea resultante de lluvia o riego excesivos, puede afectar la composición del fruto. En vides sobre-irrigadas parece que el contenido de ácido orgánico más alto del fruto es provocado tanto por retraso en la maduración del fruto y por el crecimiento excesivo de las hojas que sombrean a las bayas (Smart & Coombe, 1983; Jackson & Lombard, 1993). En uva, especialmente si se cultiva en regiones climáticas secas, el riego puede incrementar la acidez titulable y el contenido de ácido orgánico (Esteban, Villanueva, & Lissargue, 1999; des Gachons, Leeuwen, Tominaga, Soyer, Gaudillere, & Dubourdieu, 2004; de la Hera-Orts, Martinez-Cutillas, Lopez-Roca, & Gomez-Plaza, 2005).

Cuando los frutos de dos cultivares de nectarinas, de plantas bien y mal irrigadas, fueron comparadas, se encontró que las segundas tuvieron una cantidad más baja de ácido málico y ácidos totales por fruto (Thakur & Singh, 2011). Sin embargo, en muchos estudios, mayor oferta de agua disminuyó la acidez titulable y el contenido de ácido orgánico de frutos maduros. En diferentes especies de cítricos (naranja, clementina, mandarina satsuma) cultivados usando diferentes cantidades de agua, se encontró que la disponibilidad más baja de agua resultó en frutos con acidez titulable más alta (Yakushiji, Morinaga, & Nonami, 1998; González-Altozano & Castel, 1999; Brandon, Hockema, & Etxeberria, 2001; Kallsen, Sanden, & Arpaia, 2011). Los frutos de manzano y tomate provenientes de plantas bien irrigadas tuvieron acidez titulable más baja (Mills, Behboudian, & Clothier, 1996; Veit-Köhler, Krumbein, & Kosegarten 1999). En fresa, de plantas bien y mal regadas mostraron diferencias en el contenido de ácido orgánico, tanto cuando se expresó sobre la base de peso fresco como cuando se hizo sobre peso seco, pero estos efectos no fueron uniformes, sino dependientes del cultivar (Bordonaba & Terry, 2010). En durazno, la irrigación no resultó en diferencias significativas en los contenidos de ácidos málico y cítrico, y no afectó el patrón estacional de los cambios en el contenido de estos ácidos (Wu, Genard, Lescourret, Gomez, & Li, 2002).

Por lo tanto, el efecto de la disponibilidad de agua sobre el contenido de ácido orgánico de los frutos es complejo, y esto es porque las interacciones con otros factores, tales como las condiciones climáticas, el cultivar y el tiempo durante el desarrollo del fruto

nutrients imported into a fruit in a given period of time. It also changes fruit composition indirectly by slowing fruit development and ripening (Jackson & Lombard, 1993; Poiroux-Gonord, Fanciullino, Bert, & Urban, 2012). In grape, both a higher juice pH and soluble solids content together with a lower content of organic acids are often found in grape berries from plants with a low fruit load (Jackson & Lombard, 1993; Palliotti & Poni, 2011). However, the results of such studies are dependent on when the fruit is sampled. That is whether they are harvested at the same date or when they have a similar soluble solids content (similar ripening stage). When berries were harvested at a similar soluble solids concentration, it was found that an increase in fruit load delayed the time at which berries were suitable for harvesting, and in these berries titratable acidity was reduced, as were tartaric and malic acid contents (Hummel & Ferree, 1998). These results suggest that an increase in crop load decreases the amount of nutrients imported into a given berry, and this then reduces the amount of organic acids synthesized in each berry. Similarly, in kiwifruit yield is negatively correlated with total titratable acidity at harvest (Famiani et al., 2012a).

In peach and mango a different behaviour of citric and malic acids was observed. At the beginning of growth, fruits with high leaf/fruit ratio had lower malate and higher citrate concentrations, whereas near maturity, greater assimilate supply was related to high malate and low citrate concentrations (Souty, Génard, Reich, & Albagnac, 1999; Wu et al., 2002; Léchaudel, Joas, Caro, Génard, & Jannoyer, 2005). In these studies the comparisons were done on samples collected on the same date and not at similar stages of development and ripening; the pattern of changes in organic acid contents indicate a slower development and late ripening of fruits growing on shoots with a low leaf/fruit ratios. However, it appears that fruits from plants with a higher leaf/fruit ratio often have a higher organic acid content, and this may be a result of an increased import of photoassimilates. In banana, fruit load had no effects on the accumulation of organic acids in the fruits (Etienne et al., 2014).

Source-sink relationships can also be altered by applying compounds that increase the sink strength of the fruit. For example, the application of growth regulators which promote fruit growth (such as the cytokinin-like compounds CPPU and Thidiazuron) alter the acidity of kiwifruits at harvest (Famiani, Battistelli, Moscatello, Boco, & Antognozzi, 1999). However, this change in acidity appears to be a result of earlier ripening, and the effects of these plant growth regulators are dependent on both the time of their application and the concentration that is used (Cruz-Castillo et al., 2014).

cuando el estrés hídrico ocurre. Además, el suministro de agua puede incrementar el crecimiento vegetativo, lo que puede tener algún efecto, e incrementar el rendimiento (como resultado de bayas de mayor tamaño) y desacelera/retrasa la maduración (Jackson & Lombard, 1993). Esta situación es aún más complicada porque la disponibilidad de agua puede afectar el volumen de los frutos, y esto causa complicaciones cuando se expresan los datos de los experimentos. Por ejemplo, un fruto cuyo volumen se ha incrementado, como resultado de la importación adicional de agua, tendrá menor contenido de ácido orgánico por PF, pero su contenido por PS estará sin alteración.

El uso de agua salina para la irrigación de tomate resultó en reducción del crecimiento y rendimiento del fruto, sin embargo, el fruto había incrementado los contenidos de ácidos orgánicos, azúcares y sólidos solubles. Además, hubo aumento en la transcripción de un gen PEPCK (Incerti, Navari-Izzo, Pardossi, Mensual, & Izzo, 2007; Saito et al., 2008).

Carga de fruto (relación fuente/sumidero). La carga diferente de fruto es el resultado del amarre, lo que puede ser afectado tanto por las prácticas ambientales como las de cultivo. El raleo de frutos y la poda (incluyendo la defoliación) son herramientas importantes para regular la carga de frutos y la relación fuente/sumidero. Un incremento en la carga de fruto modifica la composición directamente mediante la reducción de la cantidad de azúcares y otros nutrientes importados al interior en un periodo de tiempo dado. Indirectamente, también cambia la composición del fruto mediante la desaceleración del desarrollo y la maduración (Jackson & Lombard, 1993; Poiroux-Gonord, Fanciullino, Bert, & Urban, 2012). En uva, el pH más alto en el jugo y la cantidad de sólidos solubles, junto con un contenido de ácidos orgánicos más bajo, son frecuentemente encontrados en bayas provenientes de plantas con una baja carga de frutos (Jackson & Lombard, 1993; Palliotti & Poni, 2011). Sin embargo, los resultados de tales estudios dependen de cuándo se muestrea la fruta; es decir, si son cosechadas en la misma fecha o cuando tienen contenido similar de sólidos solubles (etapa similar de maduración). Cuando las bayas se cosecharon a concentración similar de sólidos solubles, se encontró que el incremento en la carga del fruto retrasó el tiempo en el cual estas estuvieron adecuadas para la cosecha, y su acidez titulable fue reducida, así como lo fueron los contenidos de los ácidos tartárico y málico (Hummel & Ferree, 1998). Estos resultados sugieren que el aumento en la carga del cultivo disminuye la cantidad de nutrientes importados al interior de la baya; lo que reduce la concentración de ácidos orgánicos sintetizados en cada fruto. Similarmente, en kiwi el rendimiento está negativamente correlacionado con la acidez titulable en la cosecha (Famiani et al., 2012a).

Conclusions

The aims of this review were to give a clear overview of the occurrence, metabolism and functions of organic acids in fruits, together with an outline of how different environmental conditions and cultivation practices can alter their contents. The following points can be emphasized.

The observation that organic acid concentration ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ FW) decreases during ripening can be misleading. This is because in many fruits this decrease is not brought about by the metabolism of the organic acid but by an increase in the weight of the fruit caused by its expansion. If there is an actual dissimilation of malate/citrate during ripening, their metabolic fate can be respiration, gluconeogenesis, amino acid synthesis/transformations, synthesis of secondary products and/or the production of ethanol by fermentation. If gluconeogenesis occurs, then it appears that in most fruits the PEPCK and not the PPK pathway is utilized.

Although much progress has been made in understanding the metabolism of malate and citrate metabolism in fruits, many questions remain to be answered. The reason why gluconeogenesis occurs in fruits is one such question. To further understand this requires a combination of biochemical and molecular approaches. For example, metabolic studies in tomato plants with reduced amounts of PEPCK in their fruits have provided useful information on the pathways of gluconeogenesis in tomato fruit (Osorio et al., 2013). In fruits both PEPCK and PEP are present in the cytosol of the same cells (Famiani et al., 2005). PEP functions in the conversion of PEP to malate and PEPCK functions in the reverse reaction. To understand how the activity of these enzymes are coordinated will require biochemical approaches as was used to study the regulation of these enzymes in CAM plants (Walker & Chen, 2002). Another example of an important gap in our knowledge of malate metabolism in fruits is how malate transport across the tonoplast is regulated. Molecular approaches have identified homologues of malate transporters in fruits (Etienne et al., 2013). However, to understand how the activity of these transporters is regulated will require biochemical studies using, for example, assays of their activity in systems in which the transporters are reconstituted into lipid vesicles. Such studies could investigate the effects of metabolite effectors and phosphorylation of the transporter. There have been no such studies in fruits.

In several cases how environmental and agronomical factors bring about changes in the organic acid content of fruits is not simple. This may be due in part to the fact that these factors can often change conditions other than the one which is being studied

En durazno y mango se observó un comportamiento diferente de los ácidos cítrico y málico. Al principio del crecimiento, los frutos con alta relación hoja/fruto tuvieron concentraciones más bajas de malato y más altas de citrato; mientras que cerca de la madurez, mayor suministro de asimilados fue relacionado con altas concentraciones de malato y bajas de citrato (Souty, Génard, Reich, & Albagnac, 1999; Wu et al., 2002; Léchaudel, Joas, Caro, Génard, & Jannoyer, 2005). En estos estudios las comparaciones fueron hechas sobre muestras colectadas en la misma fecha, y no en etapas de desarrollo y madurez similares. El patrón de cambios en el contenido de ácidos orgánicos indican desarrollo más lento y maduración tardía de los frutos que crecieron en brotes con relación hoja/fruto baja. Sin embargo, parece que los frutos provenientes de plantas con relación hoja/fruto más alta, frecuentemente tienen contenido de ácidos orgánicos más alto, y esto puede ser resultado del aumento en la importación de fotoasimilados. En plátano, la carga de fruto no tuvo efectos sobre la acumulación de ácidos orgánicos en ellos (Etienne et al., 2014).

Las relaciones de fuente-demanda también pueden ser alteradas por la aplicación de compuestos que incrementan la fuerza de los frutos. Por ejemplo, la aplicación de reguladores del crecimiento que promueven el crecimiento (como los compuestos similares a citocinina CPPU y Thidiazuron) alteran la acidez del kiwi al momento de la cosecha (Famiani, Battistelli, Moscatello, Boco, & Antognozzi, 1999). Sin embargo, este cambio en acidez parece resultar de una madurez temprana, y los efectos de estos reguladores dependen del tiempo de aplicación y de la concentración aplicada (Cruz-Castillo et al., 2014).

Conclusiones

Los objetivos de esta revisión fueron proveer una reseña clara de la ocurrencia, el metabolismo y las funciones de los ácidos orgánicos en los frutos, junto con un resumen de cómo las diferentes condiciones ambientales y las prácticas de cultivo pueden alterar su contenido. Los siguientes puntos pueden ser enfatizados.

La observación referente a la disminución de la concentración de ácido orgánico ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de PF) durante la maduración puede ser engañosa. Esto es porque en muchos frutos esta disminución no es provocada por el metabolismo del ácido orgánico sino por el incremento en el peso del fruto causado por su expansión. Si existe una verdadera desasimilación de malato/citrato durante la maduración sus destinos metabólicos pueden ser respiración, gluconeogénesis, síntesis/transformación de aminoácidos, síntesis de productos secundarios y producción de etanol por fermentación. Si ocurre la gluconeogénesis, entonces parece que, en la mayoría de

(e.g. an increase in light exposure also increases temperature; a high fruit load can delay ripening). However, the effects of temperature are understood in a number of situations. The light intensity likely has a direct effect on organic acids. For a given type of fruit the cultivar has a large and reproducible effect on organic acid content. However, in different fruits it appears that different mechanisms (e.g. metabolic pathways or transport processes at the tonoplast) are responsible for these differences. Further studies, using a combination of physiological, biochemical and molecular approaches, are necessary to further understand the mechanisms responsible for these differences. An understanding of these mechanisms would be of assistance in both genetic improvement programs and in the optimization of cultural practices. For many species/genotypes, an increased fruit load decreases the organic acid content of the fruits. The direct effects of cultural practices such as irrigation and the application of fertilizers are complex. Often their effects are variable, and this is because there are interactions with other environmental and cultural factors. Therefore, detailed studies are required to define the effects of a given cultural practice under different environmental and cultural conditions.

Acknowledgements

The work was partially funded by the “Fondazione Cassa di Risparmio di Perugia e Codice Progetto 2010.011.0470”.

End of English version

References / Referencias

- Ackermann, J., Fischer, M., & Amadó, R. (1992). Changes in sugars, acids, and amino acids during ripening and storage of apples (cv. Gloedenapfel). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(7), 1131-1134. doi: 10.1021/jf00019a008
- Adamczak, A., Buchwald, W., & Kozłowski, J. (2011). Variation in the content of flavonols and main organic acids in the fruit of European cranberry (*Oxycoccus palustris* Pers.) growing in peatlands of North-Western Poland. *Herba Polonica*, 57(4), 5-15.
- Agravante, J. U., Matsui, T., & Kitagawa, H. (1991). Sugars and organic acids in ethanol-treated and ethylene-treated banana fruits. *Japanese Society for Food Science and Technology*, 38, 441-444. doi: 10.3136/nskkk1962.38.441
- Albertini, M. V., Carcouet, E., Pailly, O., Gambotti, C., Luro, F., & Berti, L. (2006). Changes in organic acids and sugars during early stages of development of acidic and acidless citrus fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(21), 8335-8339. doi: 10.1021/jf061648j

los frutos se utiliza la ruta de la PEPCK y no la de PPDCK. A pesar de que en frutos se ha progresado mucho en la comprensión del metabolismo del malato y citrato, muchas preguntas continúan sin respuesta. La razón por la que ocurre la gluconeogénesis en los frutos es una de esas preguntas. Para entender esto de mejor manera se requiere de la combinación de enfoques bioquímicos y moleculares. Por ejemplo, estudios metabólicos en plantas de tomate con cantidades reducidas de PEPCK en sus frutos han proporcionado información útil sobre las rutas de la gluconeogénesis (Osorio et al., 2013). En los frutos, tanto la PEPCK como la PEPC están presentes en el citosol de las mismas células (Famiani et al., 2005). La PEPC funciona en la conversión de la PEP en malato y la PEPCK en la reacción inversa. Para comprender la manera en que la actividad de estas enzimas está coordinada, se requerirán enfoques bioquímicos como el que fue utilizado para estudiar la regulación de éstas en plantas CAM (Walker & Chen, 2002). Otro ejemplo de un vacío importante en nuestro conocimiento del metabolismo del malato en los frutos es la manera en que su transporte a través del tonoplasto es regulado. Enfoques moleculares han identificado homólogos de transportadores de malato en frutos (Etienne et al., 2013); sin embargo, para comprender la manera en que la actividad de estos es regulada se requerirán estudios bioquímicos utilizando, por ejemplo, ensayos de su actividad en sistemas en que los transportadores sean reconstituidos en vesículas lipídicas. Tales estudios podrían investigar las consecuencias de los efectores de metabolitos, y la fosforilación del transportador. No existen tales estudios en frutos.

En varios casos la manera en que los factores ambientales y agronómicos causan cambios en el contenido de ácidos orgánicos en los frutos no es sencilla. Esto puede ser debido, en parte, al hecho de que estos factores frecuentemente pueden cambiar condiciones distintas a la que esté siendo estudiada (por ejemplo, un incremento en la exposición a la luz también aumenta la temperatura y la carga alta de fruto puede retrasar la maduración); no obstante, los efectos de la temperatura son entendidos en varias situaciones. La luz probablemente tiene un efecto directo sobre los ácidos orgánicos. Para un determinado tipo de fruto, el cultivar tiene un gran efecto y reproducible sobre el contenido de ácido orgánico; sin embargo, en diferentes frutos parece que distintos mecanismos (como las rutas metabólicas o los procesos de transporte en el tonoplasto) son responsables de estas diferencias. Son necesarios otros estudios utilizando combinación de enfoques fisiológicos, bioquímicos y moleculares, para comprender mejor los procesos responsables de estas diferencias; esto sería de ayuda tanto en programas de mejoramiento genético como en la optimización de las prácticas culturales. Para muchas especies/genotipos, el aumento en la carga del fruto disminuye su contenido de ácidos orgánicos. Los efectos directos de prácticas

- Alique, R., & Zamorano, J. P. (2000). Influence of harvest date within the season and cold storage on cherimoya fruit ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(9), 4209-4216. doi: 10.1021/jf9913561
- Alleweldt, G., During, H., & Jung, K. H. (1984). Zum einfluss des klimas auf beerentwicklung, ertrag, und qualitt bei reben: ergebnisse einer siebenjahringen factorenanalyse. *Vitis*, 23, 27-142. Recuperado de <http://www.vitis-vea.de/admin/volltext/e022738.pdf>
- Alva, A. K., Mattos, D. Jr., Paramasivam, S., Patil, B., Dou, H., & Sajwan, K. S. (2006). Potassium management for optimizing citrus production and quality. *International Journal of Fruit Science*, 6(1), 3-43. doi: 10.1300/J492v06n01_02
- Amorós, A., Zapata, P., Pretel, M. T., Botella, M. A., & Serrano, M. (2003). Physico-chemical and physiological changes during fruit development and ripening of five Loquat (*Eriobotrya Japonica* Lindl.). *Food Science & Technology*, 9(1), 43-51. doi: 10.1177/1082013203009001007
- Arenas-Ocampo, M. L., Evangelista-Lozano, S., Errasquin-Arana, R., Jiménez-Aparicio, A., & Dávila-Ortiz, G. (2007). Softening and biochemical changes of sapote mamey fruit *Pouteria sapota* at different development and ripening stages. *Journal of Food Biochemistry*, 27(2): 91-107. doi: 10.1111/j.1745-4514.2003.tb00269.x
- Arfaoli, P., & Bosetto, M. (1993). Time changes of free organic acid contents in seven Italian pear (*Pyrus communis*) varieties with different ripening times. *Agricoltura Mediterranea*, 123(3), 224-230.
- Ayaz, F. A., Kadioglu, A., Bertoft, E., Acar, C., & Turna, I. (2001). Effect of fruit maturation on sugar and organic acid composition in two blueberries (*Vaccinium arctostaphylos* and *V. myrtillus*) native to Turkey. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 29(2), 137-141. doi: 10.1080/01140671.2001.9514171
- Bae, H., Yun, S. K., Jun, J. H., Yoon, I. K., Nam, E. Y., & Kwon, J. H. (2014). Assessment of organic acid and sugar composition in apricot, plumcot, plum, and peach during fruit development. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 87, 24-29. doi: 10.5073/JABFQ.2014.087.004
- Baldicchi, A., Farinelli, D., Micheli, M., Di Vaio, C., Moscatello, S., Battistelli, A., Walker, R. P., & Famiani, F. (2015). Analysis of seed growth, fruit growth and composition and phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) occurrence in apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Scientia Horticulturae*, 186, 38-46. doi: 10.1016/j.scienta.2015.01.025
- Baldwin, E. A. (1993). Citrus fruit. En: Seymou, G. B., Taylor, J. E., & Tucker, G. A. (Eds.), *Biochemistry of Fruit Ripening* (pp. 107-149). Chapman and Hall, London.
- Barbieri, C., Bignami, C., Cristofori, V., Paolocci, M., & Bertazza, G. (2011). Characterization and exploitation of minor pome fruits in Italy. *Acta Horticulturae*, 918, 953-960. doi: 10.17660/ActaHortic.2011.918.125
- Bartholomew, E. T., & Sinclair, W. B. (1951). *The lemon fruit: its composition, physiology, and products*. University of California Press, Berkeley.
- culturales, tales como la irrigación y la aplicación de fertilizantes, son complejos. A menudo los resultados son variables, y esto es porque existen interacciones con otros factores ambientales y culturales. Por lo tanto, estudios detallados son requeridos para definir las consecuencias de una determinada práctica cultural bajo diferentes condiciones.
- ### Agradecimientos
- Esta revisión fue parcialmente financiada por la "Fondazione Cassa di Risparmio di Perugia e Codice Progetto 2010.011.0470".
- Fin de la versión en español*
-
- Bartolomé, A. P., Rupérez, P., & Fúster, C. (1995). Pineapple fruit: morphological characteristics, chemical composition and sensory analysis of Red Spanish and Smooth Cayenne cultivars. *Food Chemistry*, 53(1), 75-79. doi: 10.1016/0308-8146(95)95790-D
- Bogin, E., & Wallace, A. (1966). The inhibition of lemon citrate-condensing enzyme by ATP. *Biochimica et Biophysica Acta*, 128(1), 190-192. doi:10.1016/0926-6593(66)90158-5
- Bolivar-Fernández, N., Saucedo-Veloz, C., Solís-Pereira, S., & Sauri-Duch, E. (2009). Maduración de frutos de saramuyo (*Annona squamosa* L.) desarrollados en Yucatán, México. *Agrociencia*, 43(2), 133-141.
- Bordonaba, G. J., & Terry, L. A. (2010). Manipulating the taste-related composition of strawberry fruits (*Fragaria x ananassa*) from different cultivars using deficit irrigation. *Food Chemistry*, 122(4), 1020-1026.
- Boyes, S., Strübi, P., & Marsh, H. (1997). Sugar and organic acid analysis of *Actinidia arguta* and rootstock-scion combinations of *Actinidia arguta*. *Journal of Food Science*, 30(4): 390-397. doi: 10.1006/fstl.1996.0201
- Brandon, R., Hockema, R., & Etxeberria, E. D. (2001). Metabolic contributors to drought-enhanced accumulation of sugars and acids in oranges. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 126(5), 599-605. Recuperado de <http://www.crec.ifas.ufl.edu/academics/faculty/Etxeberria/PDF/Hockema%20and%20Etxeberria.pdf>
- Buttrose, M. S., Hale, C. R., & Kliewer, W. M. (1971). Effect of temperature on the composition of 'Cabernet sauvignon' berries. *American Journal of Enology Viticulture*, 22(2), 71-75.
- Canel, C., Bailey-Serres, J. N., & Roose, M. L. (1996). Molecular characterization of the mitochondrial citrate synthase gene of an acidless pummelo (*Citrus maxima*). *Plant Molecular Biology*, 31(1), 143-147. doi: 10.1007/BF00020613
- Cantín, C. M., Pinochet, J., Gogorcena, Y., & Moreno, M. A. (2010). Growth; yield and fruit quality of 'Van' and 'Stark Hardy Giant' sweet cherry cultivars as

- influenced by grafting on different rootstocks. *Scientia Horticulturae*, 123(3), 329-335. doi: 10.1016/j.scienta.2009.09.016
- Caruso, T., Giovannini, D., & Liverani, A. (1996). Rootstock influences the fruit mineral; sugar and organic acid content of a very early ripening peach cultivar. *Journal Horticultural Science and Biotechnology*, 71(6), 931-937.
- Castle, W. S. (1995). Rootstock as a fruit quality factor in citrus and deciduous tree crops. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 23(4), 383-394. doi: 10.1080/01140671.1995.9513914
- Causse, M., Duffe, P., Gomez, M. C., Buret, M., Damidaux, R., Zamir, D., Gur, A., Chevalier, C., Lemaire-Chamley, M., & Rothan, C. (2004). A genetic map of candidate genes and QTLs involved in tomato fruit size and composition. *Journal Experimental Botany*, 55(403), 1671-1685. doi: 10.1093/jxb/erh207
- Çelik, H., Özgen, M., Serçe, S., & Kaya, C. (2008). Phytochemical accumulation and antioxidant capacity at four maturity stages of cranberry fruit. *Scientia Horticulturae*, 117 (4), 345-348. doi: 10.1016/j.scienta.2008.05.005
- Chen, F. X., Liu, X. H., & Chen, L. S. (2009). Developmental changes in pulp organic acid concentration and activities of acid-metabolising enzymes during the fruit development of two loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) cultivars differing in fruit acidity. *Food Chemistry*, 114(2), 657-664. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.10.003
- Clements, R. L. (1964). Organic acids in citrus fruits. I. Varietal differences. *Journal of Food Science*, 29(3), 276-280. doi: 10.1111/j.1365-2621.1964.tb01731.x
- Cruz-Castillo, J. G., Baldicchi, A., Frioni, T., Marocchi, F., Moscatello, S., Proietti, S., Battistelli, A., & Famiani, F. (2014). Pre-anthesis CPPU low dosage application increases 'Hayward' kiwifruit weight without affecting the other qualitative and nutritional characteristics. *Food Chemistry*, 158, 224-228. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.01.131
- Cummings, G. A., & Reeves, J. (1971). Factors influencing chemical characteristics of peaches. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 96, 320-322.
- Daito, H., & Sato, V. (2007). Changes in the sugar and organic acid components of satsuma mandarin fruit during maturation. *Journal of the Japanese Society Horticultural Science*, 54(2), 155-162. doi: 10.2503/jjshs.54.155
- Daood, H. G., Biacs, P., Czinkotai, B., & Hoshke, Á. (1992). Chromatographic investigation of carotenoids, sugars and organic acids from *Diospyros kaki* fruits. *Food Chemistry*, 45(2), 151-153. doi: 10.1016/0308-8146(92)90027-Y
- Davies, J. N. (1964). Effect of nitrogen, phosphorus and potassium fertilisers on the non-volatile organic acids of tomato fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 15(10), 665-673. doi: 10.1002/jsfa.2740151002
- Davies, J. N., & Winsor, G. W. (1967). Effect of nitrogen, phosphorus, potassium, magnesium and liming on the composition of tomato fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 18(10), 459-466. doi: 10.1002/jsfa.2740181005
- de Bolt, S., Ristic, R., Iland, P. G., & Ford, C. M. (2008). Altered light interception reduces grape berry weight and modulates organic acid biosynthesis during development. *HortScience*, 43(3), 957-961. Recuperado de <http://hortsci.ashspublications.org/content/43/3/957.full.pdf+html>
- de la Hera-Orts, M., Martinez-Cutillas, A., Lopez-Roca, J., & Gomez-Plaza, E. (2005). Effect of moderate irrigation on grape composition during ripening. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 3(3), 352-361. doi: 10.5424/sjar/2005033-158
- del Angel-Coronel, O. A., Cruz-Castillo, J. G., de la Cruz-Medina, J., & Famiani, F. (2010). Ripening and physiological changes in the fruit of *Persea schiedeana* Nees during the postharvest period. *HortScience*, 45(1), 172-175.
- des Gachons, C. P., Leeuwen, C. V., Tominaga, T., Soyer, J. P., Gaudillere, J. P., & Dubourdieu, D. (2004). Influence of water and nitrogen deficit on fruit ripening and aroma potential of *Vitis vinifera* L cv Sauvignon blanc in field conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(1), 73-85. doi: 10.1002/jsfa.1919
- Diakou, P., Moing, A., Svanella, L., Ollat, N., Rolin, D. B., Gaudillere, M., & Gaudillere, J. P. (1997). Biochemical comparison of two grape varieties differing in juice acidity. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 3(3), 1-10. doi: 10.1111/j.1755-0238.1997.tb00122.x
- Dilley, D. R. (1962). Malic enzyme activity in apple fruit. *Nature*, 196, 387-388. doi: 10.1038/196387a0
- du Preez, M. (1985). *Effect of fertilisation on fruit quality*. Deciduous Fruit Grower, April: 138-140.
- Embleton, T., Jones, W., Pallares, C., & Platt, R. G. (1978). Effects of fertilization of citrus on fruit quality and ground water nitrate-pollution potential. *International citrus congress, Sidney, Australia*, 280-285.
- Eshed, Y., & Zamir, D. A. (1994). A genomic library of *Lycopersicon pennellii* in *L. esculentum*: a tool for fine mapping of genes. *Euphytica*, 79(3), 175-179. doi: 10.1007/BF00022516
- Esteban, M. A., Villanueva, M. J., & Lissargue, J. R. (1999). Effect of irrigation on changes in berry composition of Tempranillo during maturation. Sugars; organic acids; and mineral elements. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50(4), 418-434.
- Etienne, A., Génard, M., Bancel, D., Benoit, S., Lemire, G., & Bugaud, C. (2014). Citrate and malate accumulation in banana fruit (*Musa* sp. AA) is highly affected by genotype and fruit age, but not by cultural practices. *Scientia Horticulturae*, 169(16), 99-110. doi:10.1016/j.scienta.2014.02.013
- Etienne, A., Génard, M., Lobit, P., Mbéguié-A-Mbéguié, D., & Bugaud, C. (2013). What controls fleshy fruit acidity? A review of malate and citrate accumulation in fruit cells. *Journal of Experimental Botany*, 64(6), 1451-1469. doi: 10.1093/jxb/ert035

- Etienne, C., Moing, A., Dirlewanger, E., Raymond, P., Monet, R., & Rothan, C. (2002). Isolation and characterization of six peach cDNAs encoding key proteins in organic acid metabolism and solute accumulation: involvement in regulating peach fruit acidity. *Physiologia Plantarum*, 114(2), 259-270. doi: 10.1034/j.1399-3054.2002.1140212.x
- Failla, O., Scienza, A., & Brancadoro, L. (1996). Effects of nutrient spray applications on malic and tartaric acid levels in grapevine berry. *Journal of Plant Nutrition*, 19(1): 45-50. doi: 10.1080/01904169609365105
- Famiani, F., Farinelli, D., Palliotti, A., Moscatello, S., Battistelli, A., & Walker, R. P. (2014a). Is stored malate the quantitatively most important substrate utilised by respiration and ethanolic fermentation in grape berry pericarp during ripening? *Plant Physiology and Biochemistry*, 76, 52-57. doi:10.1016/j.plaphy.2013.12.017
- Famiani, F., Baldicchi, A., Battistelli, A., Moscatello, S., & Walker, R. P. (2009). Soluble sugar and organic acid contents and the occurrence and potential role of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) in gooseberry (*Ribes grossularia* L.). *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 84(3), 249-254.
- Famiani, F., Baldicchi, A., Farinelli, D., Cruz-Castillo, J. G., Marocchi, F., Mastroleo, M., Moscatello, S., Proietti, S., & Battistelli, A. (2012a). Yield affects qualitative kiwifruit characteristics and dry matter content may be an indicator of both quality and storability. *Scientia Horticulturae*, 146, 124-130. doi:10.1016/j.scienta.2012.08.009
- Famiani, F., Battistelli, A., Moscatello, S., Boco, M., & Antognozzi, E. (1999). Thidiazuron affects fruit growth, ripening and quality of *Actinidia deliciosa* J. Hort. Sci. Biotechnol. 74: 375-380.
- Famiani, F., Casulli, V., Baldicchi, A., Battistelli, A., Moscatello, S., & Walker, R. P. (2012b). Development and metabolism of the fruit and seed of the japanese plum Ozark Premier (*Rosaceae*). *Journal of Plant Physiology*, 169(6), 551-560. doi:10.1016/j.jplph.2011.11.020
- Famiani, F., Casulli, V., Proietti, P., Walker, R. P., & Battistelli, A. (2007). Organic acid metabolism in grape: role of phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Acta Horticulturae*, 754, 599-602. doi: 10.17660/ActaHortic.2007.754.80
- Famiani, F., Cultrera, N., Battistelli, A., Casulli, V., Proietti, P., Standardi, A., Chen, Z. H., Leegood, R. C., & Walker, R. P. (2005). Phosphoenolpyruvate carboxykinase and its potential role in the catabolism of organic acids in the flesh of soft fruit during ripening. *Journal of Experimental Botany*, 56 (421), 2959-2969. doi: 10.1093/jxb/eri293
- Famiani, F., Farinelli, D., Palliotti, A., Battistelli, A., Moscatello, S., & Walker, R. P. (2015). Malate as a substrate for catabolism and gluconeogenesis during ripening in the pericarp of different grape cultivars. *Biologia Plantarum* (in press).
- Famiani, F., Moscatello, S., Ferradini, N., Gardi, T., Battistelli, A., & Walker, R. P. (2014b). Occurrence of a number of enzymes involved in either gluconeogenesis or other processes in the pericarp of three cultivars of grape (*Vitis vinifera* L.) during development. *Plant Physiol Biochem*, 84, 261-270. doi: 10.1016/j.plaphy.2014.10.003
- Famiani, F., & Walker, R. P. (2009). Changes in abundance of enzymes involved in organic acid, amino acid and sugar metabolism, and photosynthesis during the ripening of blackberry fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 134(2), 167-75. Recuperado de <http://journal.ashspublications.org/content/134/2/167.full.pdf+html>
- Famiani, F., Walker, R. P., Técsi, L., Chen, Z. H., Proietti, P., & Leegood, R. C. (2000). An immunohistochemical study of the compartmentation of metabolism during the development of grape (*Vitis vinifera* L.) berries. *Journal of Experimental Botany*, 51(345), 675-683. doi: 10.1093/jexbot/51.345.675
- Farineau, J., & Laval-Martin, D. (1977). Light versus dark carbon metabolism in cherry tomato fruits. II. Relationship between malate metabolism and photosynthetic activity. *Plant Physiology*, 60(6), 877-880. doi: 10.1104/pp.60.6.877
- Ford, C. M. (2012). The biochemistry of organic acids in the grape, pp. 67-88. In: *The Biochemistry of the grape berry*. Geros, H., Chaves, M. M., & Delrot, S. (eds.). Bentham Science Publishers, Illinois.
- Füzfai, Z., Katona, Z. F., Kovács, E., & Molnár-Perl, I. (2004). Simultaneous identification and quantification of the sugar, sugar alcohol, and carboxylic acid contents of sour cherry, apple, and berry fruits, as their trimethylsilyl derivatives, by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(25), 7444-7452. doi: 10.1021/jf040118p
- Gao, Q. H., Wu, C. S., Yu, J. G., Wang, M., Ma, Y. J., & Li, C. L. (2012). Textural characteristic, antioxidant activity, sugar, organic acid, and phenolic profiles of 10 promising jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) selections. *Journal of Food Science*, 77(11), C1218-C1225. doi: 10.1111/j.1750-3841.2012.02946.x
- García-Mariño, N., de la Torre, F., & Matilla, A. J. (2008). Organic acids and soluble sugars in edible and nonedible parts of damson plum (*Prunus domestica* L. subsp. *Insititia* cv. *Syriaca*) fruits during development and ripening. *Food Science and Technology International*, 14(2), 187-93. doi: 10.1177/1082013208092150
- Gautier, H., Rocci, A., Buret, M., Grassely, D., & Causse, M. (2005). Fruit load or fruit position alters response to temperature and subsequently cherry tomato quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(6), 1009-1016. doi: 10.1002/jsfa.2060
- Genevois, L., & Peynaud, E. (1947a). Composition de 16 variétés de pêches. *Revue Horticole*, 30, 295-298.
- Genevois, L., & Peynaud, E. (1947b). Composition de neuf variétés de prunes. *Revue Horticole*, 30, 317-318.
- Glew, R. H., Ayaz, F. A., Sanz, C., Vanderjagt, D. J., Huang, H. S., Chuang, L. T., & Strnad, M. (2003a). Changes in sugars, organic acids and amino acids in medlar (*Mespilus germanica* L.) during fruit development

- and maturation. *Food Chemistry*, 83(3), 363-369. doi: 10.1016/S0308-8146(03)00097-9
- Glew, R. H., Ayaz, F. A., Sanz, C., Vanderjagt, D. J., Huang, H. S., Chuang, L. T., & Strnad, M. (2003b). Effect of postharvest period on sugars, organic acids and fatty acids composition in commercially sold medlar (*Mespilus germanica* 'Dutch') fruit. *European Food Research and Technology*, 216(5), 390-394. doi: 1007/s00217-002-0654-3
- Gong, H., Blackmore, D. H., & Walker, R. R. (2010). Organic and inorganic anions in Shiraz and Chardonnay grape berries and wine as affected by rootstock under saline conditions. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 16(1), 227-236. doi: 10.1111/j.1755-0238.2009.00070.x
- González-Altozano, P., & Castel, J. R. (1999). Regulated deficit irrigation in 'Clementina De Nules' citrus trees. I. Yield and fruit quality effects. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 74(4), 706-713. Recuperado de http://www.researchgate.net/profile/Juan_Castel/publication/259935904_RDI_Clementina_de_Nules_trees._II._Veg_growth/links/0c96052ea430780e60000000.pdf
- González-Aguilar, G. A., Buta, J. G., & Wang, C. Y. (2003). Methyl jasmonate and modified atmosphere packaging (MAP) reduce decay and maintain postharvest quality of papaya 'Sunrise'. *Postharvest Biology and Technology*, 28(3), 361-370. doi: 10.1016/S0925-5214(02)00200-4
- Goodenough, P. W., Prosser, I. M., & Young, K. (1985). NADP-linked malic enzyme and malate metabolism in ageing tomato fruit. *Phytochemistry*, 24(6), 1157-62. doi: 10.1016/S0031-9422(00)81093-6
- Gundogdu, M., Muradoglu, F., Gazioglu-Sensoy, R. I., & Yilmaz, H. (2011). Determination of fruit chemical properties of *Morus nigra* L., *Morus alba* L. and *Morus rubra* L. by HPLC. *Scientia Horticulturae*, 132(5), 37-41. doi:10.1016/j.scienta.2011.09.035
- Gurrieri, F., Audergon, J. M., Albagnac, G., & Reich, M. (2001). Soluble sugars and carboxylic acids in ripe apricot fruit as parameters for distinguishing different cultivars. *Euphytica*, 117(3), 183-189. doi: 10.1023/A:1026595528044
- Gutiérrez-Granda, M. J., & Morrison, J. C. (1992). Solute distribution and malic enzyme activity in developing grape berries. *American Journal of Enology and Viticulture*, 43(4), 323-328.
- Hale, C. R., & Buttrose, M. S. (1974). Effect of temperature on ontogeny of berries of *Vitis vinifera* L. cv Cabernet Sauvignon. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 99(5), 390-394.
- Hansen, E. (1942). Quantitative study of ethylene production in relation to respiration of pears. *Botanical Gazette*, 103(3), 543-558.
- Harman, J. E. (1987). Feijoa fruit: growth and chemical composition during development. *New Zealand Journal of Experimental Agriculture*, 15(2), 209-215. doi: 10.1080/03015521.1987.10425561
- Herrmann, K. M. (1995). The shikimate pathway: early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *The Plant Cell*, 7, 907-919. Recuperado de <http://www.plantcell.org/content/7/7/907.full.pdf+html>
- Hirai, M. (1982). Accelerated sugar accumulation and ripening of loquat fruit by exogenously applied ethylene. *Journal of the Japanese Society Horticultural Science*, 51, 159-64. doi: 10.2503/jjshs.51.159
- Hu, Z., Wang, H., & Hu, G. (2005). Measurements of sugars, organic acids and vitamin C in litchi fruit by high performance liquid chromatography. *Journal of Fruit Science*, 22(5), 582-585.
- Hulme, A. C. (1971). *The biochemistry of fruits and their products*, vol. 2. Academic Press, London and New York.
- Hummel, A. K., & Ferree, D. C. (1998). Interaction of crop level and fruit cluster exposure on 'Seyval Blanc' fruit composition. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 123(5), 755-761. Recuperado de <http://journal.ashspublications.org/content/123/5/755.full.pdf+html>
- Hurth, M. A., Suh, S. J., Kretzschmar, T., Geis, T., Bregante, M., Gambale, F., Martinoia, E., & Neuhaus, H. E. (2005). Impaired pH homeostasis in Arabidopsis lacking the vacuolar dicarboxylate transporter and analysis of carboxylic acid transport across the tonoplast. *Plant Physiology*, 137, 901-910. doi: 10.1104/pp.104.058453
- Incerti, A., Navari-Izzo, F., Pardossi, A., Mensual, A., & Izzo, R. (2007). Effect of sea water on biochemical properties of fruit of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) genotypes differing for ethylene production. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(13), 2528-2537. doi: 10.1002/jsfa.3020
- Jackson, D. I., & Lombard, P. B. (1993). Environmental and management practices affecting grape composition and wine quality - a review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 44(4), 409-430.
- Jia, H., Hirano, K., & Okamoto, G. (1999). Effects of fertilizer levels on tree growth and fruit quality of 'Hakuho' peaches (*Prunus persica*). *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 68(3), 487-493. doi: 10.2503/jjshs.68.487
- Johanningsmeiner, S. D., Mcfeeters, R. F., & Drake, M. (2005). A hypothesis for the chemical basis for perception of sour taste. *Journal for the Food Science*, 70(2), 44-48. doi: 10.1111/j.1365-2621.2005.tb07111.x
- Kader, A. A. (2002). *Post-harvest technology of horticultural crops*. Oakland University of California; Division of Agriculture and Natural Resources, Publication: 3311-3535.
- Kallsen, C. E., Sanden, B., & Arpaia, M. L. (2011). Early navel orange fruit yield, quality, and maturity in response to late-season water stress. *HortScience*, 46(8), 1163-1169. Recuperado de <http://hortsci.ashspublications.org/content/46/8/1163.full.pdf+html>
- Kalt, W., & McDonald, J. E. (1996). Chemical composition of lowbush blueberry cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 121(1), 142-146.

- Recuperado de <http://journal.ashspublications.org/content/121/1/142.full.pdf+html>
- Kanellis, A. K., & Roubelakis-Angelakis, K. A. (1993). Grape. En Seymour, G. B., Taylor, J. E. & Tucker, G.A. (eds.), *Biochemistry of fruit ripening* (pp.189-234). Chapman and Hall, London.
- Klenert, M., Rapp, A., & Alleweldt, G. (1978). Einfluss des traubentemperatur auf beerenwachstum and beerenreife der rebsorte silvaner. *Vitis*, 17, 350-360. Recuperado de <http://www.vitis-vea.de/admin/volltext/e002252.pdf>
- Kliewer, W., Howarth, L., & Omori, M. (1967). Concentrations of tartaric acid and malic acids and their salts in *Vitis vinifera* grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*, 18(1), 42-54.
- Kliewer, W. M. (1970). Effect of day temperature and light intensity on coloration and composition of *Vitis vinifera* L. grapes. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 95(6), 693-697.
- Kliewer, W. M. (1973). Berry composition of *Vitis vinifera* cultivars as influenced by photo-and nycto-temperatures during maturation. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 98, 153-159.
- Lakso, A. N., & Kliewer, W. M. (1978). The influence of temperature on malic acid metabolism in grape berries. II. Temperature responses of net dark CO₂ fixation and malic acid pools. *American Journal of Enology and Viticulture*, 29(3), 145-149.
- Lang, A. (1983). Turgor-related translocation. *Plant Cell and Environment*, 6(9), 683-689. doi: 10.1111/1365-3040.ep11589312
- Law, R. D., & Plaxton, W. C. (1995). Purification and characterization of a novel phosphoenolpyruvate carboxylase from banana fruit. *Biochemical Journal*, 307, 807-816. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1136721/pdf/biochemj00064-0189.pdf>
- Lea, P. J. (1993). Nitrogen metabolism. En: Lea, P. J. & Leegood, R. C. (Eds.), *Plant biochemistry and molecular biology* (pp. 155-180). John Wiley, New York.
- Léchaudel, M., Joas, J., Caro, Y., Génard, M., & Jannoyer, M. (2005). Leaf:fruit ratio and irrigation supply affect seasonal changes in minerals, organic acids and sugars of mango fruit. *Journal of the Science Food and Agriculture*, 85(2), 251-260. doi: 10.1002/jsfa.1968
- Leegood, R. C., & Walker, R. P. (2003). Regulation and roles of phosphoenolpyruvate carboxykinase in plants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 414(2), 204-210. doi: 10.1016/S0003-9861(03)00093-6
- Leegood, R. C., & Walker, R. P. (1999). Phosphoenolpyruvate carboxykinase in plants: its role and regulation. En: Bryant, J. A., Burrell, M. M. & Kruger, N. J. (Eds.), *Plant carbohydrate biochemistry* (pp. 201-211). BIOS Scientific Publishers Ltd, Oxford.
- Legua, P., Forner, J. B., Hernández, F., & Forner-Giner, M. A. (2014). Total phenolics, organic acids, sugars and antioxidant activity of mandarin (*Citrus clementina* Hort. ex Tan.): Variation from rootstock. *Scientia Horticulturae*, 174(22), 60-64. doi: 10.1016/j.scienta.2014.05.004
- Liu, S., Yang, Y., Murayama, H., Taira, S., & Fukushima, T. (2004). Effects of CO₂ on respiratory metabolism in ripening banana fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 33(1), 27-34. doi: 10.1016/j.postharvbio.2004.01.006
- Lobit, P., Génard, M., Soing, P., & Habib, R. (2006). Modelling malic acid accumulation in fruits: relationships with organic acids, potassium and temperature. *Journal of Experimental Botany*, 57(6), 1471-1483. doi: 10.1093/jxb/erj128
- Lobit, P., Génard, M., Wu, B. H., Soing, P., & Habib, R. (2003). Modelling citrate metabolism in fruits: responses to growth and temperature. *Journal of Experimental Botany*, 54(392), 2489-2501. doi: 10.1093/jxb/erg264
- Mazur, S. P., Sønsteby, A., Wold, A. B., Foito, A., Freitag, S., Verrall, S., Conner, S., Stewart, D., & Heide, O. M. (2014). Post-flowering photoperiod has marked effects on fruit chemical composition in red raspberry (*Rubus idaeus*). *Annals of Applied Biology*, 165(3), 454-465. doi: 10.1111/aab.12153
- Medlicott, A. P., & Thompson, A. K. (1985). Analysis of sugars and organic acids in ripening mango fruits (*Mangifera indica* L. var Keitt) by high performance liquid chromatography. *Journal of the Science and Food Agricultural*, 36(7), 561-566. doi: 10.1002/jsfa.2740360707
- Melgarejo, P., Salazar, D. M., & Artéz, F. (2000). Organic acids and sugars composition of harvested pomegranate fruits. *European Food Research and Technology*, 211(3), 185-190. doi: 10.1007/s002170050021
- Mikulic-Petkovsek, M., Schmitzer, V., Slatnar, A., Stampar, F., & Veberic, R. (2012). Composition of sugars, organic acids, and total phenolics in 25 wild or cultivated berry species. *Journal of Food Science*, 77(10), C1064-C1070. doi: 10.1111/j.1750-3841.2012.02896.x
- Mills, T. M., Behboudian, M. H., & Clothier, B. E. (1996). Water relations; growth; and the composition of 'Braeburn' apple fruit under deficit irrigation. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 121(2), 286-291. Recuperado de <http://journal.ashspublications.org/content/121/2/286.full.pdf+html>
- Moing, A., Rothan, C., Svanella, L., Just, D., Diakou, P., Raymond, P., Gaudillere, J. P., & Monet, R. (2000). Role of phosphoenolpyruvate carboxylase in organic acid accumulation during peach fruit development. *Physiologia Plantarum*, 108(1), 1-10. doi: 10.1034/j.1399-3054.2000.108001001.x
- Moing, A., Rothan, C., Svanella, L., Just, D., Diakou, P., Rolin, D., Gaudillere, J. P., Monet, R. (1998). Organic acid metabolism during the development of two peach cultivars. *Acta Horticulturae*, 465, 425-432. doi: 10.17660/ActaHortic.1998.465.53
- Moing, A., Svanella, L., Gaudillere, M., Gaudillere, J. P., & Monet, R. (1999). Organic acid concentration is little controlled by phosphoenolpyruvate carboxylase

- activity in peach fruit. *Australian Journal of Plant Physiology*, 26(6), 579-585. doi: 10.1071/PP98164
- Morrison, J. C., & Noble, A. C. (1990). The effects of leaf and cluster shading on the composition of Cabernet sauvignon grapes and on fruit and wine sensory properties. *American Journal of Enology and Viticulture*, 41(3), 193-200.
- Morvai, M., & Molnar-Perl, I. (1992). Simultaneous gas chromatographic quantitation of sugars and acids in citrus fruits, pears, bananas, grapes, apples and tomatoes. *Chromatographia*, 34(9-10), 502-504. doi: 10.1007/BF02290244
- Mpelasoka, B. S., Schachtman, D. P., Treeby, M. T., & Thomas, M. R. (2003). A review of potassium nutrition in grapevines with special emphasis on berry accumulation. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 9(3), 154-168. doi: 10.1111/j.1755-0238.2003.tb00265.x
- Muñoz-Robredo, P., Robledo, P., Manríquez, D., Molina, R., & Defilippi, B. G. (2011). Characterization of sugars and organic acids in commercial varieties of table grapes. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 71(3), 452-458. Recuperado de <http://www.readcube.com/articles/10.4067%2Fs0718-58392011000300017>
- Neri, F., Pratella, G. C., & Brigati, S. (2003). Gli indici di maturazione per ottimizzare la qualità organolettica della frutta. *Rivista di Frutticoltura e di Ortofloricoltura*, 5, 20-29.
- Nishiyama, I., Fukuda, T., Shimohashi, A., & Oota, T. (2008). Sugar and organic acid composition in the fruit juice of different Actinidia varieties. *Food Science Technology Research*, 14(1), 67-73. doi: 10.3136/fstr.14.67
- Nour, V., Trandafir, I., & Ionica, M. E. (2010). HPLC organic acid analysis in different citrus juices under reversed phase conditions. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 38(1), 44-48.
- Orazem, P., Stampar, F., & Hudina, M. (2011a). Fruit quality of Redhaven and Royal Glory peach cultivars on seven different rootstocks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(17), 9394-9401. doi: 10.1021/jf2009588
- Orazem, P., Stampar, F., & Hudina, M. (2011b). Quality analysis of 'Redhaven' peach fruit grafted on 11 rootstocks of different genetic origin in a replant soil. *Food Chemistry*, 124(4), 1691-1698. doi:10.1016/j.foodchem.2010.07.078
- Osorio, S., Vallarino, J. G., Szecowka, M., Ufaz, S., Tzin, V., Angelovici, R., Galili, G., & Fernie, A. R. (2013). Alteration of the interconversion of pyruvate and malate in the plastid or cytosol of ripening tomato fruit invokes diverse consequences on sugar but similar effects on cellular organic acid, metabolism, and transitory starch accumulation. *Plant Physiol*, 161(2), 628-643. doi: 10.1104/pp.112.211094
- Pacheco, C., Calouro, F., Vieira, S., Santos, F., Neves, N., Curado, F., Franco, J., Rodrigues, S., & Antunes, D. (2008). Effect of nitrogen and potassium fertilization on yield and fruit quality in kiwifruit. 4th Proceedings "IASME/WSEAS International Conference on "Energy, environment, ecosystems and sustainable development (EEESD'08)", Algarve, Portugal, June 11-13 2008.
- Palliotti, A., Silvestroni, O., & Petoumenou, D. (2010). Seasonal patterns of growth rate and morphophysiological features in green organs of Cabernet sauvignon grapevines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 61(1), 74-82.
- Palliotti, A., & Poni, S. (2011). Traditional and innovative summer pruning techniques for vineyard management. *Advances in Horticultural Science*, 25(3), 151-163.
- Pereira, G. E., Gaudillere, J. P., Pieri, P., Hilbert, G., Maucourt, M., Deborde, C., Moing, A., & Rolin, D. (2006). Microclimate influence on mineral and metabolic profiles of grape berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(18), 6765-6775. doi: 10.1021/jf061013k
- Peynaud, E., & Ribéreau-Gayon, G. P. (1971). The grape. En: Hulme, A. C. (Ed.), *The biochemistry of fruits and their products*, vol. 2 (pp. 179-205). Academic Press, London.
- Plaxton, W. C. (1996). The organization and regulation of plant glycolysis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47, 185-214. doi: 10.1146/annurev.arplant.47.1.185
- Poiroux-Gonord, F., Fanciullino, A. L., Bert, L., & Urban, L. (2012). Effect of fruit load on maturity and carotenoid content of clementine (*Citrus clementina* Hort. ex Tan.) fruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(10), 2076-2083. doi: 10.1002/jsfa.5584
- Pua, E. C., Chandramouli, S., Han, P., & Liu, P. (2003). Malate synthase gene expression during fruit ripening of Cavendish banana (*Musa acuminata* cv. Williams). *Journal of Experimental Botany*, 54(381), 309-316. doi: 10.1093/jxb/erg030
- Radi, M., Mahrouz, M., Jaouad, A., & Amiot, M. J. (2003). Influence of mineral fertilization (NPK) on the quality of apricot fruit (cv. Canino). The effect of the mode of nitrogen supply. *Agronomie*, 23(8), 737-745. doi: 10.1051/agro:2003052
- Ramesh-Kumar, A., & Kumar, N. (2007). Sulfate of potash foliar spray effects on yield, quality, and post-harvest life of banana. *Better Crops*, 91, 22-24.
- Raven, J. A., & Smith, F. A. (1976). Nitrogen assimilation and transport in vascular land plants in relation to intracellular pH regulation. *New Phytologist*, 76(3), 415-431. doi: 10.1111/j.1469-8137.1976.tb01477.x
- Reitz, H. J., & Koo, R. C. J. (1960). Effect of nitrogen and potassium fertilization on yield, fruit quality, and leaf analysis of Valencia orange. *American Society for Horticultural Science*, 75, 244-252.
- Reynard, J. S., Zufferey, V., Nicol, G. C., & Murisier, F. (2011). Soil parameters impact the vine-fruit-wine continuum by altering vine nitrogen status. *Journal International des Science Vigne et du Vin*, 45(4), 211-221.
- Richardson, A. C., Marsh, K. B., Boldingh, H. L., Pickering, A. H., Bulley, S. M., Frearson, N. J., Ferguson, A. R., Thornber, S. E., Bolitho, K. M., & Marrae, E. A. (2004). High growing temperatures reduce fruit carbohydrate and vitamin C in kiwifruit. *Plant, Cell*

- & *Environment*, 27(4), 423-435. doi: 10.1111/j.1365-3040.2003.01161.x
- Rienth, M., Torregrosa, L., Luchaire, N., Chatbanyong, R., Lecourieux, D., Kelly, M. T., & Romieu, C. (2014). Day and night heat stress trigger different transcriptomic responses in green and ripening grapevine (*Vitis vinifera*) fruit. *BMC Plant Biology*, 14, 108. doi: 10.1186/1471-2229-14-108
- Roe, B., Davis, P. L., & Bruemmer, J. H. (1984). Pyruvate metabolism during maturation of Hamlin oranges. *Phytochemistry*, 23(4), 713-717. doi: 10.1016/S0031-9422(00)85010-4
- Romero-Rodríguez, M. A., Vazquez-Oderiz, M. L., López-Hernández, J., & Simal-Lozano, J. (1992). Determination of vitamin C and organic acids in various fruits by HPLC. *Journal of Chromatographic Science*, 30(11), 433-437. doi: 10.1093/chromsci/30.11.433
- Romieu, C., Tesniere, C., Thanhnam, L., Flanzky, C., & Robin, J. P. (1992). An examination of the importance of anaerobiosis and ethanol in causing injury to grape mitochondria. *American Journal of Enology and Viticulture*, 43(2), 129-133.
- Róth, E., Berna, A., Beullens, K., Yarramraju, S., Lammertyna, J., Schenk, A., & Nicolai, B. (2007). Postharvest quality of integrated and organically produced apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 45(1), 11-19. doi: 10.1016/j.postharvbio.2007.01.006
- Ruffner, H. P. (1982a). Metabolism of tartaric and malic acid in *Vitis*: a review. Parte A. *Vitis*, 21, 241-249.
- Ruffner, H. P. (1982b). Metabolism of tartaric and malic acid in *Vitis*: a review. Parte B. *Vitis*, 21, 346-358.
- Ruffner, H. P., Koblet, W., & Rast, D. (1975). Gluconeogenesis in reifenden Beeren von *Vitis vinifera*. *Vitis*, 13, 319-328.
- Ruffner, H. P., Kliever, W. M. (1975). Phosphoenolpyruvate carboxykinase activity in grape berries. *Plant Physiology*, 56(1), 67-71. doi: 10.1104/pp.56.1.67
- Ruffner, H. P., Hawker, J. S., & Hale, C. R. (1976). Temperature and enzymic control of malate metabolism in berries of *Vitis vinifera*. *Phytochemistry*, 15(12), 1877-1880. doi: 10.1016/S0031-9422(00)88835-4
- Ruhl, E. H. (1989). Effect of potassium and nitrogen supply on the distribution of minerals and organic acids and the composition of grape juice of Sultana vines. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 29(1), 133-137. doi: 10.1071/EA9890133
- Ruiz-Rodríguez, B. M., Morales, P., Fernández-Ruiz, V., Sánchez-Mata, M. C., Cámara, M., Díez-Marqués, C., Pardo-De-Santayana, M., Molina, M., & Tardío, J. (2011). Valorization of wild strawberry-tree fruits (*Arbutus unedo* L.) through nutritional assessment and natural production data. *Food Research International*, 44(5), 1244-1253. doi: 10.1016/j.foodres.2010.11.015
- Sadka, A., Dahan, E., Cohen, L., & Marsh, K. B. (2000). Aconitase activity and expression during the development of lemon fruit. *Physiologia Plantarum*, 108(3), 255-262. doi: 10.1034/j.1399-3054.2000.108003255.x
- Sadka, A., Dahan, E., Or, E., Roose, M. L., Marsh, K. B., & Cohen, L. (2001). Comparative analysis of mitochondrial citrate synthase gene structure; transcript level and enzymatic activity in acidless and acid-containing citrus varieties. *Functional Plant Biology*, 28(5), 383-390. doi:10.1071/PP00136
- Saito, T., Matsukura, C., Ban, Y., Shoji, K., Sugiyama, M., Fukuda, N., & Nishimura, S. (2008). Salinity stress affects assimilate metabolism at the gene-expression level during fruit development and improves fruit quality in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 77(1), 61-68. Recuperado de www.jstage.jst.go.jp/article/jjshs1/77/1/77_1_61/_pdf
- Saradhuldhat, P., & Paull, R. E. (2007). Pineapple organic acid metabolism and accumulation during fruit development. *Scientia Horticulturae*, 112(3), 297-303. doi: 10.1016/j.scienta.2006.12.031
- Selcuk, N., & Erkan, M. (2015). The effects of 1-MCP treatment on fruit quality of medlar fruit (*Mespilus germanica* L. cv. Istanbul) during long term storage in the palliflex storage system. *Postharvest Biology and Technology*, 100, 81-90. doi: 10.1016/j.postharvbio.2014.09.018
- Selvaraj, Y., & Kumar, R. (1989). Pyruvate kinase activity in ripening mango (*Mangifera indica* L.) fruit. *Journal of Food Science and Technology*, 26(4), 228-229.
- Smart, R., & Coombe, B. G. (1983). Water relations of grapevines. En: Kozlowski, T. T. (Ed.), *Water deficits and plant growth*, vol. VII: Additional woody crop plants (pp. 137-196). Academic Press, New York.
- Smart, R. E., & Sinclair, T. R. (1976). Solar heating of grape berries and other spherical fruits. *Agricultural Meteorology*, 17(4), 241-259. doi: 10.1016/0002-1571(76)90029-7
- Smith, F. A., & Raven, J. A. (1979). Intracellular pH and its regulation. *Annual Reviews of Plant Physiology*, 30, 289-311. doi: 10.1146/annurev.pp.30.060179.001445
- Soares, F. D., Pereira, T., Marques, M. O. M., & Monteiro, A. R. (2007). Volatile and non-volatile chemical composition of the white guava fruit (*Psidium guajava*) at different stages of maturity. *Food Chemistry*, 100(1), 15-21. doi: 10.1016/j.foodchem.2005.07.061
- Souty, M., Perret, A., & Andre, P. (1967). Premières observations sur quelques variétés de pêches destinées à la conserve. *Annual Technology Agricultural*, 16, 55-68.
- Souty, M., Génard, M., Reich, M., & Albagnac, G. (1999). Effect of assimilate supply on peach fruit maturation and quality. *Canadian Journal of Plant Science*, 79, 259-268.
- Spironello, A., Quaggio, J. A., Teixeira, L. A. J., Furlani, P. R., & Sigrist, J. M. M. (2004). Pineapple yield and fruit quality effected by NPK fertilization in a tropical soil. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 26(1), 155-159. doi: 10.1590/S0100-29452004000100041
- Surendranathan, K. K., & Nair, P. M. (1976). Stimulation of the glyoxylate shunt in gamma-irradiated banana. *Phytochemistry*, 15(3), 371-373. doi: 10.1016/S0031-9422(00)86825-9
- Szychowski, P. J., Munera-Picazo, S., Szumny, A., Carbonell-Barrachina, Á. A., & Hernández, F. (2014). Quality

- parameters, bio-compounds, antioxidant activity and sensory attributes of Spanish quinces (*Cydonia oblonga* Miller). *Scientia Horticulturae*, 165(22), 163-170. doi: 10.1016/j.scienta.2013.11.028
- Sweetman, C., Deluc, L. G., Cramer, G. R., Ford, C. M., & Soole, K. L. (2009). Regulation of malate metabolism in grape berry and other developing fruits. *Phytochemistry*, 70(11-12), 1329-1344. doi: 10.1016/j.phytochem.2009.08.006
- Sweetman, C., Sadras, V. O., Hancock, R. D., Soole, K. L., & Ford, C. M. (2014). Metabolic effects of elevated temperature on organic acid degradation in ripening *Vitis vinifera* fruit. *Journal of Experimental Botany*, 65(20), 5975-5988.
- Tang, M., Bie, Z. L., Wu, M. Z., Yi, H. P., & Feng, J. X. (2010). Changes in organic acids and organic acids metabolism enzymes in melon fruit during development. *Scientia Horticulturae*, 123(3), 360-365. doi: 10.1016/j.scienta.2009.11.001
- Taureilles-Saurel, C., Romieu, C. G., Robin, J. P., & Flanzzy, C. (1995a). Grape (*Vitis vinifera* L.) malate dehydrogenase. I. Interacellular compartmentation of the isoforms. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46(1), 22-28.
- Taureilles-Saurel, C., Romieu, C. G., Robin, J. P., & Flanzzy, C. (1995b). Grape (*Vitis vinifera* L.) Malate dehydrogenase. II. Characterization of the major mitochondrial and cytosolic isoforms and their role in ripening. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46(1), 29-36.
- Terrier, N., & Romieu, C. (2001). Grape berry acidity. En: Roubelakis-Angelakis, K. A. (Ed.), *Molecular biology and biotechnology of the grapevine* (pp. 35-57). Springer, Dordrecht.
- Terrier, N., Glissant, D., Grimplet, J., Barrieu, F., Abbal, P., Couture, C., Ageorges, A., Atanassova, R., Léon, C., Renaudin, J. P., Dédaldéchamp, F., Romieu, C., Delrot, S., & Hamdi, S. (2005). Isogene specific oligo arrays reveal multifaceted changes in gene expression during grape berry (*Vitis vinifera* L.) development. *Planta*, 222(5), 832-847. doi: 10.1007/s00425-005-0017-y
- Tesnière, C., Romieu, C., Dugelay, I., Nicol, M. Z., Flanzzy, C., & Robin, J. P. (1994). Partial recovery of grape energy-metabolism upon aeration following anaerobic stress. *Journal of Experimental Botany*, 45(1), 145-151. doi: 10.1093/jxb/45.1.145
- Thakur, A., & Singh, Z. (2011). Responses of 'Spring Bright' and 'Summer Bright' nectarines to deficit irrigation: fruit growth and concentration of sugars and organic acids. *Scientia Horticulturae*, 135(24), 112-119. doi: 10.1016/j.scienta.2011.12.013
- Tombesi, A., Antognozzi, E., & Palliotti, A., (1993). Influence of light exposure on characteristics and storage life of kiwifruit. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 21(1), 85-90. doi: 10.1080/01140671.1993.9513750
- Trad, M., Gaaliche, B., Renard, C. M. G. C., & Mars, M. (2013). Inter- and intra-tree variability in quality of figs. Influence of altitude, leaf area and fruit position in the canopy. *Scientia Horticulturae*, 162, 49-54. doi: 10.1016/j.scienta.2013.07.032
- Tucker, G. A. (1993). Introduction. En: Seymour, G. B., Taylor, J. E. & Tucker, G. A. (Eds.), *Biochemistry of fruit ripening* (pp. 1-51). Chapman and Hall, London.
- Ulrich, R. (1971). Organic acids. En: Hulme, A. C. (Ed.), *The biochemistry of fruits and their products*, vol. 1. (pp. 98-118). Academic Press, London, New York.
- Usenik, V., Fajt, N., Mikulic-Petkovsek, M., Slatnar, A., Stampar, F., & Veberic, R. (2010). Sweet cherry pomological and biochemical characteristics influenced by rootstock. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(8), 4928-4933. doi: 10.1021/jf903755b
- Vadivel, E., & Shanmugavelu, K. G. (1978). Effect of increasing rates of potash on banana quality cv. Robusta. *Revue de la Potasse*, 24, 1-4.
- Veit-Köhler, U., Krumbein, A., & Kosegarten, H. (1999). Effect of different water supply on plant growth and fruit quality of *Lycopersicon esculentum*. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 162(6), 583-588. doi: 10.1002/(SICI)1522-2624(199912)162:6<583::AID-JPLN583>3.0.CO;2-P
- Walker, R. P., & Chen, Z. H. (2002). Phosphoenolpyruvate carboxykinase: structure function and regulation. *Advances in Botanical Research*, 38, 93-189. doi: 10.1016/S0065-2296(02)38029-7
- Walker, R. P., Battistelli, A., Moscatello, S., Chen, Z. H., Leegood, R. C., & Famiani, F. (2011a). Phosphoenolpyruvate carboxykinase in cherry (*Prunus avium* L.) fruit during development. *Journal of Experimental Botany*, 62(15), 5357-65. doi: 10.1093/jxb/err189
- Walker, R. P., Famiani, F., Baldicchi, A., Cruz-Castillo, J. G., & Inglese, P. (2011b). Changes in enzymes involved in photosynthesis and other metabolic processes in the fruit of *Opuntia ficus-indica* during growth and ripening. *Scientia Horticulturae*, 128(3), 213-219. doi: 10.1016/j.scienta.2011.01.017
- Walton, E. F., & de Jong, T. M. (1990). Estimating the bioenergetic cost of a developing kiwifruit berry and its growth and maintenance respiration components. *Annals of Botany*, 66(4), 417-424.
- Wang, S. Y., & Camp, M. J. (2000). Temperature after bloom affects plant growth and fruit quality of strawberry. *Scientia Horticulturae*, 85(3), 183-199. doi: 10.1016/S0304-4238(99)00143-0
- Whiting, G. C. (1958). The non-volatile organic acids of some berry fruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 9(4), 244-248. doi: 10.1002/jsfa.2740090411
- Widodo, S. E., Shiraishi, M., & Shiraishi, S. (1995). Organic acids in the juice of acid lemon and Japanese acid citrus by gas chromatography. *Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University*, 40(1-2), 39-44.
- Wu, B. H., Genard, M., Lescourret, F., Gomez, L., & Li, S. H. (2002). Influence of assimilate and water supply on seasonal variation of acids in peach (cv Suncrest). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(15), 1829-1836. doi: 10.1002/jsfa.1267

- Wu, J., Gao, H., Zhao, L., Liao, X., Chen, F., Wang, Z., & Hu, X. (2007). Chemical compositional characterization of some apple cultivars. *Food Chemistry*, 103(1), 88-93. doi: 10.1016/j.foodchem.2006.07.030
- Xin-Juan, X., Qing-Yu, L., Xiao-Hui, S., Shen, Q. R., & Dong, C. X. (2012). Dynamic regulation of nitrogen and organic acid metabolism of cherry tomato fruit as affected by different nitrogen forms. *Pedosphere*, 22(1), 67-78. doi: 10.1016/S1002-0160(11)60192-6
- Yakushiji, H., Morinaga, K., & Nonami, H. (1998). Sugar accumulation and partitioning in Satsuma mandarin tree tissues and fruit in response to drought stress. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 123(4), 719-726.
- Yang, W. H., Zhu, X. C., Bu, J. H., Hu, G. B., Wang, H. C., & Huang, X. M. (2009). Effects of bagging on fruit development and quality in cross-winter off-season longan. *Scientia Horticulturae*, 120(2), 194-200. doi: 10.1016/j.scienta.2008.10.009
- Yao, Y. X., Li, M., Liu, Z., You, C. X., Wang, D. M., Zhai, H., & Hao, Y. J. (2009). Molecular cloning of three malic acid related genes MdPEPC, MdVHA-A, MdcyME and their expression analysis in apple fruits. *Scientia Horticulturae*, 122(3), 404-408. doi: 10.1016/j.scienta.2009.05.033