

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



Control hormonal del ciclo celular y el cuajado partenocárpico de las mandarinas Clementinas

TRABAJO FIN DE MÁSTER

MÁSTER UNIVERSITARIO EN INGENIERÍA AGRONÓMICA

Alumno: D. Camilo Garcés Garcés

Tutor: D. Carlos Mesejo Conejos

Cotutor: D. Manuel Agustí Fonfria

Curso Académico: 2018/2019

VALENCIA, Enero de 2019

Control hormonal del ciclo celular y el cuajado partenocárpico de las mandarinas Clementinas.

RESUMEN

En Citricultura, un factor determinante de la producción es el cuajado del fruto, ya que determina el número de frutos que finalmente formarán la cosecha. El cuajado consiste en la transición del ovario de la flor a fruto en desarrollo. Este proceso sucede a través de la reactivación de la división celular en la corteza del ovario y la formación de las vesículas de zumo. En las variedades con semillas, el paso de flor a fruto se produce de un modo eficaz tras la fecundación del óvulo. Por otra parte, en las variedades partenocárpicas, el desarrollo del ovario se produce en ausencia de la fecundación. Pero la capacidad natural para reactivar la división celular de un modo satisfactorio es variable en función de la especie y la variedad.

El ciclo celular está regulado por 2 grupos de proteínas: las ciclinas (CYCs) y las quinasas dependientes de las ciclinas (CDKs). Su actividad en las diferentes fases del ciclo celular es determinante para la división celular, pero se desconoce qué papel juegan en el cuajado de las variedades partenocárpicas de cítricos.

En este TFM se estudia la actividad de las CYCs y las CDKs en las variedades de mandarina clementina "Marisol" y "Clemenules", con una alta y baja capacidad partenocárpica respectivamente. Además, se estudia el efecto de las giberelinas y las citoquininas en la activación del ciclo celular, y, por tanto, en la promoción del cuajado de la mandarina "Clemenules".

Los resultados indican que tanto GA₃ como 6-BA estimulan la fase G1/S y la fase G2/M del ciclo celular. No obstante, los efectos no se observan en el tamaño del fruto hasta varias semanas después.

Palabras clave: Cítricos, Ciclo celular, CDKs, Cuajado, CYCs, Giberelina, Citoquinina, Partenocarpia.

Alumno: D. Camilo Garcés Garcés

Valencia, Enero de 2019

Tutor: D. Carlos Mesejo Conejos

Cotutor: D. Manuel Agustí Fonfria

Control hormonal del ciclo celular i el quallat partenocàrpic de la mandarina Clementina

RESUM

En Citricultura, un factor determinant de la producció és el quallat del fruit, ja que determina el nombre de fruits que finalment formaran la collita. El quallat consisteix en la transició de l'ovari de la flor a fruit en desenvolupament. Aquest procés té lloc a través de la reactivació de la divisió cel·lular en la corfa de l'ovari i la formació de les vesícules de suc. En les varietats amb llavors, el pas de flor a fruit es produïx d'una manera eficaç després de la fecundació de l'òvul. D'altra banda, en les varietats partenocàrpiques, el desenvolupament de l'ovari es produïx en absència de la fecundació. Però la capacitat natural per a reactivar la divisió cel·lular d'una manera satisfactoria és variable en funció de l'espècie i la varietat.

El cycle cel·lular està regulat per 2 grups de proteïnes: les ciclines (CYCs) i les quinases dependents de les ciclines (CDKs). La seua activitat en les diferents fases del cycle cel·lular és determinant per a la divisió cel·lular, però es desconeix quin paper juguen en el quallat de les varietats partenocàrpiques de cítrics.

En este TFM s'estudia l'activitat de les CYCs i les CDKs en les varietats de mandarina clementina "Marisol" i "Clemenules", amb una alta i baixa capacitat partenocàrpica respectivament. A més, s'estudia l'efecte de les giberelines i les citoquinines en l'activació del cycle cel·lular, i, per tant, en la promoció del quallat de la mandarina "Clemenules".

Els resultats indiquen que tant GA₃ com 6-BA estimulen la fase G1/S i la fase G2/M del cycle cel·lular. No obstant això, els efectes no s'observen en la grandària del fruit fins a unes quantes setmanes després.

Paraules clau: Cítrics, Cycle cel·lular, CDKs, Quallat, CYCs, Giberelina, Citoquinina, Partenocàrpia.

Alumne: D. Camilo Garcés Garcés

València, Gener de 2019

Tutor: D. Carlos Mesejo Conejos

Cotutor: D. Manuel Agustí Fonfria

Hormonal control of the cell cycle and parthenocarpic fruit set in Clementine mandarins.

ABSTRACT

In Citriculture, fruit set is the key factor of yield, since it determines the number of fruits that will finally be harvested. The fruit set consists of the transition from the ovary of the flower to the developing fruit. This process happens through the reactivation of cell division in the ovary walls. In the seeded varieties, the flower-to-fruit transition is produced in an effective way after ovule fertilization. On the other hand, in parthenocarpic varieties, which the development of the ovary occurs in the absence of fertilization, the natural ability to reactivate cell division in a satisfactory manner is variable depending on species and varieties.

The cell cycle is regulated by 2 groups of proteins: cyclins (CYCs) and cyclin-dependent kinases (CDKs). Its activity in the different phases of the cell cycle is determinant for cell division, but the role they play in the fruit set of parthenocarpic varieties is unknown.

This Thesis studies the activity of CYCs and CDKs in the Clementine mandarins "Marisol" and "Clemenules", with a high and low parthenocarpic ability respectively. In addition, it is studied the effect of gibberellins and cytokinins in the activation of the cell cycle, and therefore in the promotion of fruit set.

Results indicate that both GA₃ and 6-BA stimulate the G1/S phase and G2/M phase of the cell cycle. However, the effects are not observed in the fruit size until several weeks later.

Keywords: Citrus, Cell cycle, CDKs, fruit set, CYCs, Gibberellin, Cytokinin, Parthenocarpy.

Student: Mr. Camilo Garcés Garcés

Valencia, January 2019

Tutor: Mr. Carlos Mesejo Conejos

Cotutor: Mr. Manuel Agustí Fonfria

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi tutor Carlos que me haya dado la oportunidad de poder aprender junto a él. Durante todo este tiempo me ha transmitido su pasión por la Citricultura y me ha enseñado una forma de trabajo, la cual voy a tener muy presente en mi vida como ingeniero agrónomo.

Agradecerles a Amparo, Manolo y Carmina toda la ayuda que me han brindado durante este tiempo y a todas las personas con las que he podido disfrutar en el IAM.

A Manfredi, por toda la ayuda que me proporcionó durante la fase experimental del trabajo.

A la Finca REVA, por permitirme utilizar su parcela para realizar el estudio.

A mi pareja y amigos, por apoyarme siempre y aconsejarme de la mejor manera posible cuando tenía dudas.

A mi familia, sin ellos nada hubiera sido posible.

ÍNDICE

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 | EL CICLO CELULAR. LA DIVISIÓN CELULAR. | 2 |
| 1.2 | CONTROL HORMONAL DEL CICLO CELULAR Y DEL CUAJADO DEL FRUTO. | 3 |
| 2 | HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS | 7 |
| 3 | MATERIAL Y MÉTODOS | 9 |
| 3.1 | MATERIAL VEGETAL | 9 |
| 3.2 | DISEÑO EXPERIMENTAL | 9 |
| 3.3 | MÉTODOS | 10 |
| 3.3.1 | Peso del fruto | 10 |
| 3.3.2 | Microscopía | 10 |
| 3.3.3 | Análisis de la expresión genética mediante RT-PCR | 11 |
| 3.4 | ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 14 |
| 4 | RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 15 |
| 4.1 | ESTUDIO DEL DESARROLLO PARTENOCÁRPICO DEL OVARIO EN LAS MANDARINAS CLEMENTINAS CV. 'MARISOL' Y CV. 'CLEMENULES' | 15 |
| 4.2 | ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES DEL CICLO CELULAR EN EL OVARIO DE LAS MANDARINAS CLEMENTINAS CV. 'MARISOL' Y CV. 'CLEMENULES' | 18 |
| 4.3 | ESTUDIO DEL EFECTO DE LA APLICACIÓN DE GA ₃ Y 6-BA SOBRE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES DEL CICLO CELULAR EN EL OVARIO DE LA MANDARINA CLEMENTINA CV. 'CLEMENULES' | 21 |
| 4.4 | ESTUDIO DEL EFECTO DE LA APLICACIÓN DE GA ₃ Y 6-BA SOBRE EL DESARROLLO PARTENOCÁRPICO DEL OVARIO DE LA MANDARINA CLEMENTINA CV. 'CLEMENULES' | 23 |
| 5 | CONCLUSIONES | 27 |
| 6 | BIBLIOGRAFÍA | 29 |

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Desarrollo del ovario y cuajado final en las mandarinas clementinas cv. “Clemenules” y cv. “Marisol”. Evolución del peso (A y B) y cuajado final (C). Cada valor de peso del ovario es la media de 20 frutos en los tres primeros muestreos, 15 frutos en los 4 muestreos siguientes y 10 frutos en los últimos 5 muestreos. Cada valor de cuajado es la media de 14 árboles. Las barras verticales indican el error estándar. * indica diferencias estadísticamente significativas. 16
- Figura 2.** Estudio de la división celular en el ovario de las mandarinas clementinas cv. “Clemenules” y cv. “Marisol”. Número de filas de células en el pericarpo (A), Número de vesículas por carpelo (B) y longitud de las vesículas (C) (D). Cada valor es la media de 3 frutos. Las barras verticales indican el error estándar. En la figura B, las barras de error son menores que los símbolos. 17
- Figura 3.** Evolución de la expresión relativa de los genes *CYCD6*, *CDKB2*, *CYCA2-1*, *CYCB2* Y *CYCA1-1* en ovarios de mandarina clementina cv. “Clemenules” y cv. “Marisol”. Cada valor es la medida de 2 réplicas biológicas y 2 réplicas técnicas, realizadas a partir de una muestra homogénea de 10 frutos por tratamiento en cada fecha. Las barras verticales indican la desviación estándar. 19
- Figura 4.** Evolución de la expresión relativa de los genes *CYCD6*, *CDKB2*, *CYCA2-1*, *CYCB2* y *CYCA1-1* en ovarios de mandarina clementina cv. “Clemenules” que han sido tratados con GA3 y 6-BA. Los tratamientos se realizaron cuando las flores habían perdido los pétalos con GA3 (10 mg/l) y 6-BA (100 mg/l). Cada valor es la media de 2 réplicas biológicas y 2 réplicas técnicas, realizadas a partir de una muestra homogénea de 10 frutos por tratamiento en cada fecha. Las barras verticales indican la desviación estándar. 22
- Figura 5.** Comparación del desarrollo del ovario en mandarina “Clemenules” en función de los tratamientos realizados. Los tratamientos se realizaron cuando las flores habían perdido los pétalos con GA (10 mg/l) y BA (100 mg/l). Evolución del número de filas de células del pericarpo (A) y la longitud de las vesículas (B). Cada valor es la media de 3 frutos. Las barras verticales indican el error estándar. 25
- Figura 6.** Control del cuajado en la mandarina “Clemenules” en función de los tratamientos realizados. Evolución del peso (A)(B) y cuajado final (C). Los tratamientos se realizaron cuando las flores habían perdido los pétalos con GA (10 mg/l) y BA (100 mg/l). Cada valor de peso es la media del 6-7 frutos. Cada valor de cuajado es la media de un mínimo de 4 ramas. Las barras verticales indican el error estándar. 26

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Listado de oligonucleótidos usados en la PCR..... | 13 |
|--|----|

1 INTRODUCCIÓN

El cultivo de cítricos tiene una gran importancia a nivel mundial. La producción ha aumentado de forma considerable en las últimas décadas, llegándose a producir 131,7 millones de toneladas en el año 2014. España tuvo una producción de 6,8 millones de toneladas en el año 2016, siendo el primer productor de la Unión Europea y mayor exportador de fruta fresca a nivel mundial (FAO,2018).

En España, la superficie citrícola actual es, aproximadamente, de 294.000 Ha, de las que el 47,5% se dedican al cultivo de naranjos, el 36,5% se dedican al cultivo de mandarinos, el 14,5% se dedican al cultivo limoneros, el 0,7% se dedican al cultivo de pomelos y el 0,08% se dedican al cultivo de naranja amargo y otros cítricos (MAGRAMA,2017). La Comunidad Valenciana presenta una superficie citrícola de, aproximadamente, 182.00 ha, lo que supone el 60% de la superficie nacional, y una producción que supera los 3 millones de toneladas anuales. Esto sitúa a la Comunidad Valenciana como la principal región citrícola a nivel nacional (IVIA,2018).

El panorama varietal citrícola es muy amplio, con el fin de maximizar el periodo de comercialización. Además, se dirigen constantes esfuerzos hacia la obtención de nuevas variedades que permitan una mejor adaptación de nuestro sector citrícola a las condiciones de mercado, incidiendo en aspectos como la ampliación del periodo de producción, la mejora de la calidad o el aumento de la producción. Sin embargo, las variedades con mayor importancia comercial (por volumen de producción) son tradicionales, como las naranjas “Navelina”, “Lane-Late” y “Valencia late”, y la mandarina “Clemenules”. Entre las variedades más novedosas destacan actualmente “Nadorcott” y “Orri” por el elevado precio que consiguen en la parte final de la campaña de mandarinas.

En la actualidad, la mayor parte de la producción de cítricos en España se destina al consumo en fresco de frutos con elevada calidad. Uno de los aspectos de calidad más demandados es la ausencia de semillas. Por ello, la mayor parte de variedades en cultivo presentan algún tipo de esterilidad. Las mandarinas clementinas son autoincompatibles por presentar esterilidad homocigótica, por lo que no producen semillas. Las variedades híbridas, como la mandarina “Nova” y el tangor “Ortanique”, también son autoincompatibles y por ello no producen semillas. Pero cuando las plantaciones de híbridos y de clementinas se sitúan a corta distancia, se producen semillas en ambos grupos por efecto de la polinización cruzada. Esto provoca una mejora en el cuajado y en el tamaño final del fruto, pero una disminución de la calidad (Agustí, 2003).

El desarrollo de un fruto sin semilla se denomina **partenocarpia**. El desarrollo inicial del ovario depende de su capacidad para reactivar la división celular en las paredes de los carpelos tras la antesis. Este proceso determina el cuajado del fruto. En las variedades con semillas, la fecundación del óvulo y el inicio del desarrollo del embrión son el estímulo que promueve una elevada tasa mitótica en el ovario, que permite el cuajado. Pero no todas las variedades estériles presentan una buena capacidad de *cuajado partenocárpico*. Esto implica que se tengan que realizar tratamientos específicos, como la aplicación de fitohormonas, para incrementar el cuajado en las variedades con baja capacidad partenocárpica. Los tratamientos no son efectivos en todas las variedades (Talón et al., 1992), de modo que el estudio del mecanismo endógeno que regula la partenocarpia de los cítricos, la división celular y la respuesta a los tratamientos hormonales para activar la división celular y aumentar el cuajado resultan de máximo interés.

1.1 EL CICLO CELULAR. LA DIVISIÓN CELULAR.

El ciclo celular consiste en una secuencia de eventos bioquímicos y morfológicos (Síntesis de DNA y replicación de los cromosomas, mitosis y citocinesis) que conducen a la generación de dos células hijas (Segura, 2008). El proceso en el que una célula da lugar a dos células hijas con un propósito celular diferente se llama división celular formativa o asimétrica (ACD) (Polyn et al., 2015).

El ciclo celular se divide en 4 fases: la fase de pre-síntesis del DNA (G_1), fase de síntesis de DNA (S) y fase de post-síntesis (G_2) y, finalmente, la mitosis (Taiz et al., 2015). En la fase de pre-síntesis (G_1) la nueva célula hija formada no ha replicado aún el DNA. Durante la fase S se produce la replicación del DNA. La fase G_2 consiste en la fase previa a la mitosis, durante la que la célula se encuentra con el DNA replicado.

En el ciclo celular de las plantas existen dos puntos internos de control. El primero se encuentra en la transición entre las fases G_1 y S, donde se determina si la célula inicia una nueva replicación del DNA o abandona el ciclo. El segundo punto de control se sitúa en la transición entre las fases G_2 y M, donde se determina si las células entran o no en mitosis (Segura, 2008). La acción conjunta de dos tipos de proteínas controla la transición de una fase a otra del ciclo celular y la entrada de células nuevas en el ciclo celular. Estas son las ciclinas (CYCs) y las quinasas dependientes de las ciclinas (CDKs). Las quinasas son enzimas que fosforilan proteínas utilizando ATP. Las CDKs requieren la presencia de ciclinas para su activación (Taiz et al., 2015). Las CYCs más importantes en la división celular son las que pertenecen a las clases A, B y D, puesto que regulan las fases S y/o G_2 /M. Las quinasas del tipo CDKA tienen, en general, un papel

esencial en la transición de las fases G_1 a S y la fase G_2 a M. Durante las fases G_1 y S las CDKA son las únicas CDK activas mientras que en la transición de la fase G_2 a M también están activas las de tipo B (CDKB) (Inzé y De Veylder, 2006).

La transición G_1/S se inicia con la síntesis de ciclinas de tipo D (CYCD). Estas interactúan con quinasas CDKA para activar la transcripción de los genes específicos de la fase S. Posteriormente, la CYCD es degradada y aparece la CYCA. En la transición G_2/M se sintetizan la ciclina CYCB y la quinasa CDKB. Las quinasas CDKA y CDKB se asocian con las ciclinas de tipo A y B para llevar a la célula a la mitosis. Completada la fase M, las ciclinas A y B son degradadas (Inzé y De Veylder, 2006; Segura, 2008).

La actividad de las CDKs puede ser regulada de varias formas, pero dos mecanismos son los más importantes. El primer mecanismo consiste en la síntesis y degradación de ciclinas, pues las CDKs se encuentran inactivas si no están asociadas a una ciclina. El segundo mecanismo consiste en la fosforilación y desfosforilación. Las proteínas CDKs poseen dos lugares de fosforilación de la tirosina. Uno causa la activación de la enzima y otro causa la inactivación. Existen quinasas específicas que activan los CDKs mientras que otras los inactivan. Del mismo modo, las proteínas fosfatasa pueden eliminar fosfatos de las CDKs, estimulando o inhibiendo su actividad dependiendo de la posición del fosfato (Taiz et al., 2015).

En el ovario de la flor de los cítricos, la división celular se activa primero en el mesocarpo, mientras se inicia la diferenciación de las vesículas de zumo en el endocarpo. Después, las vesículas formadas incrementan su tasa de crecimiento mediante la división celular. Así, por ejemplo, en la mandarina Satsuma, el mesocarpo alcanza la máxima tasa de división celular 10 días después de la antesis, mientras que las vesículas de zumo alcanzan la mayor tasa de división 30 días después de la antesis (Mesejo et al., 2016).

1.2 CONTROL HORMONAL DEL CICLO CELULAR Y DEL CUAJADO DEL FRUTO.

El ciclo celular también está bajo el control de una serie de señales, como las hormonas, los azúcares o factores ambientales, que determinan cuándo y dónde deben realizarse las divisiones celulares. (Segura, 2008). Entre ellas, las hormonas presentan un papel determinante, ya que intervienen en las diferentes fases del ciclo celular.

De modo general en las plantas, durante la fase G_1 del ciclo, las auxinas y las citoquininas, fundamentalmente, y en algunos casos las giberelinas, activan la expresión de la *ciclina D* y de *CDKA*, permitiendo así la entrada a la fase S. El ácido abscísico reprime la actividad de *CDKA*, promoviendo la acumulación de un inhibidor que se une al complejo *CDKA/CYCA*, impidiendo la

entrada en la fase S. Las auxinas, citoquinas y giberelinas también inducen la expresión de las *ciclina A y B* y activan *CDKA* y *CDKB* promoviendo la entrada en la fase M (Segura, 2008).

En los cítricos con semillas, la fecundación de los óvulos estimula la síntesis de auxinas en sus tejidos, y, tras ello, la síntesis de giberelinas en el óvulo y pericarpo, promoviendo el cuajado del fruto (Bermejo et al., 2017). Debido a ello, parece que la acción de las auxinas y las giberelinas sean parte de la señal que promueve la división celular, dando lugar al cuajado del fruto tras la fecundación. Sin embargo, se desconoce el mecanismo de acción de cada una de las hormonas en la activación del ciclo celular. Tan solo se ha puesto de manifiesto la relación entre las GAs y la ciclina *CYCA1.1* (Mesejo et al., 2016).

Pero la fecundación no es necesaria en los frutos partenocárpicos. La partenocarpia natural puede ser obligada, en especies estériles, o facultativa, en especies fértiles autoincompatibles. Entre ellas, la capacidad de cuajado es variable. El cuajado depende, fundamentalmente, de la capacidad de síntesis endógena de giberelinas en las paredes del ovario (Talón et al., 1992; Mesejo et al., 2016), y ni la concentración de auxinas ni la de citoquininas en la caída de pétalos ha correlacionado con la capacidad partenocárpica de los cítricos (Talón et al., 1990, Mesejo et al., 2013). En los ovarios que desarrollan frutos partenocárpicos con facilidad (por ejemplo, en la mandarina Satsuma) se produce un incremento de los niveles de giberelinas en los días próximos a la antesis, que es escaso o ausente en las mandarinas que desarrollan frutos partenocárpicos con dificultad, como por ejemplo, la mandarina Clementina (Talón et al., 1992).

Además, la acción de las giberelinas se ha relacionado con la división celular. Así, por ejemplo, en la mandarina Satsuma que presenta partenocarpia autónoma, la expresión del gen *GA20ox2* se localiza en el mesocarpo a los 10 días después de la antesis y en el endocarpo a los 30 días después de la antesis (coincidiendo con la máxima tasa de división celular en esos tejidos, respectivamente). Todo ello correlaciona a su vez con la expresión del gen *CYCA1,1* del ciclo celular, que parece estar regulado por las giberelinas también en los cítricos (Mesejo et al., 2016). Las variedades con escasa capacidad partenocárpica, como por ejemplo la mandarina 'Clemenules', presentan una baja expresión del gen *GA20ox2* y una escasa tasa de división celular (Mesejo et al., 2016). Pero se desconoce la razón por la cual esto ocurre.

Las variedades que presentan baja capacidad partenocárpica no alcanzan a producir un buen rendimiento de fruta sin técnicas de mejora del cuajado. La aplicación de fitohormonas resulta ser una técnica agronómica de gran utilidad y ampliamente utilizada para mejorar el cuajado. Si bien las citoquininas y las giberelinas se han mostrado eficaces estimulando la partenocarpia, el tratamiento habitual se realiza con

GA₃. La aplicación de GA₃ durante la caída de pétalos mejora el cuajado a través de un estímulo del desarrollo del ovario. Concentraciones entre 5 mg/l y 10 mg/l son las más utilizadas, pudiendo alcanzar un incremento en la cosecha del 65% en parcelas con rendimientos muy bajos. No obstante, hay que tener en cuenta que la eficacia del tratamiento dependerá, a su vez, del número de frutos que inician el desarrollo, ya que, si éste es muy elevado debido a una floración intensa, la abscisión no se evita. La aplicación de citoquininas también mejora el cuajado del fruto, siendo la caída de pétalos la época más adecuada. Concentraciones de 25 mg/l de 6-Benziladenina (6-BA) pueden aumentar considerablemente el número de frutos en parcelas improductivas (Agustí y Almela, 1991).

Pero el efecto sobre el estímulo del desarrollo partenocárpico no es inmediato. Así, los efectos de la aplicación exógena de GA₃ sobre la división celular y el desarrollo del ovario se empiezan a observar 20-30 días después del tratamiento (Navarro, 2017). Se desconoce el motivo por el cual esto sucede, principalmente porque se desconoce el mecanismo de acción del GA₃ en la activación del ciclo celular. Una posible hipótesis sería que la aplicación de GA₃ activa el ciclo celular, que, a su vez, activaría la síntesis endógena de GAs y otros promotores del desarrollo (auxinas y Cks). El déficit de uno o varios tipos de las hormonas que regulan la división celular, giberelinas, citoquininas y auxinas, o con la falta de sensibilidad a su acción, podría ser la causa de la baja capacidad para reactivar el ciclo celular tras la antesis. Nuevas evidencias indican que el proceso requiere de la acción conjunta de todas ellas (Ding et al., 2013; Bermejo et al, 2017).

2 HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

Con el fin de entender el mecanismo a través del cual las giberelinas y las citoquininas estimulan el cuajado partenocárpico en los cítricos se plantea la siguiente **hipótesis de trabajo**:

En las variedades partenocárpicas de cítricos, las giberelinas estimulan la entrada en la fase de mitosis (fase G2/M) mientras que las citoquininas estimulan el inicio del ciclo celular o fase de presíntesis del DNA (fase G1/S).

Los objetivos de este TFM son:

1. Determinar qué genes *CYC* y *CDK* del ciclo celular correlacionan con la capacidad partenocárpica de las mandarinas clementinas 'Marisol' y 'Clemenules', con alta y baja capacidad partenocárpica, respectivamente.
2. Determinar en qué fase del ciclo celular ejercen su efecto la aplicación exógena de GA₃ y 6-BA.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

El experimento se realizó con 14 árboles adultos de mandarina Clementina cv. 'Clemenules' (*Citrus reticulata* Hort. Ex. Tan.) injertados sobre patrón citrange Carrizo (*Citrus sinensis* (L.) Osb. X *Poncirus trifoliata* (L.) Raf) y con 14 árboles adultos de mandarina clementina cv. 'Marisol' (*Citrus reticulata* Hort. Ex. Tan.) injertados sobre patrón citrange Carrizo (*Citrus sinensis* (L.) Osb. X *Poncirus trifoliata* (L.) Raf). Los árboles se encuentran en 2 parcelas comerciales próximas, situadas en Valencia (España). Los árboles estaban en perfectas condiciones fitosanitarias, con riego por goteo, en suelo franco-arcilloso y bajo condiciones estándar del manejo del cultivo.

3.2 DISEÑO EXPERIMENTAL

En la parcela de mandarina clementina cv. 'Clemenules' se seleccionaron 1400 flores campaneras distribuidas en los 14 árboles (100 por árbol). En cada árbol, se seleccionaron 25 flores para cada uno de los siguientes tratamientos:

T1. Control

T2. Ácido giberélico (GA_3 10 mg l⁻¹; Semefil SL 1,6%, Nufarm)

T3. Citoquininas (6-Benziladenina, 6-BA, 100 mg l⁻¹ Globaryl 100, Globachem)

T4. GA_3 + 6-BA.

Los tratamientos se realizaron en el momento de mayor sensibilidad del ovario, es decir, cuando el 100% de las flores habían perdido los pétalos (estado fenológico 69 de la escala BBCH), como propusieron García-Martínez y García-Papí (1979). Las aplicaciones hormonales se realizaron con un pulverizador manual con un consumo de 3 l. por tratamiento e incluyendo en todos los tratamientos un mojante no iónico al 0,05%. El experimento se realizó desde inicios de abril hasta finales de junio. Se realizaron muestreos en preantesis, antesis, caída de pétalos y, posteriormente, semanalmente alcanzando un total de 12 muestreos en el experimento.

Para el estudio histológico de la de división celular, se utilizaron 165 frutos, muestreando 5 frutos por fecha y tratamiento. Para el estudio de la expresión de los genes del ciclo celular se utilizaron 435 frutos, muestreando 20 frutos por tratamiento hasta la caída de pétalos, 15 frutos por tratamiento desde la caída de pétalos hasta 20 días después de antesis y 10 frutos por tratamiento desde 25 días después de antesis hasta 60 días después de antesis.

En la parcela de mandarina clementina cv. 'Marisol' se seleccionaron 700 flores campaneras distribuidas en los 14 árboles (50 flores por árbol). Para el estudio histológico de la división celular se utilizaron 60 frutos, muestreando 5 frutos por fecha. Para el análisis de la expresión de los genes del ciclo celular se utilizaron 170 frutos, muestreando 20 frutos hasta la caída de pétalos, 15 frutos desde la caída de pétalos hasta 20 días después de antesis y 10 frutos desde 25 días después de antesis hasta 60 días después de antesis. El porcentaje de cuajado del fruto se determinó en 25 flores de cada árbol.

En todas las muestras seleccionadas, se determinó la evolución del desarrollo partenocárpico del ovario. Para ello, se evalúa el peso del fruto (g) mediante una balanza con precisión de 0,0001 g, el diámetro del fruto (mm), el número de filas de células a lo ancho del pericarpo, la longitud de las vesículas de zumo, el número de vesículas por carpelo, y la expresión de los genes *CYCB2*, *CYCA1-1*, *CYCA2-1*, *CYCD6* y *CDKB2*, que actúan en el ciclo celular.

3.3 MÉTODOS

3.3.1 Peso del fruto

Para la medición del peso del fruto se utilizó una balanza analítica de precisión (Sartorius Basic, modelo B 120S). Los resultados obtenidos se expresan en gramos.

3.3.2 Microscopía

Los frutos muestreados en diferentes etapas de crecimiento se transportaron a 4 °C hasta el laboratorio donde se fijaron en una solución de FPA (900 ml de etanol al 70%, 50 cm³ de ácido propiónico y 50 cm³ de formaldehído). Se mantuvieron 24 h en FPA, y tras ese tiempo se procedió a su conservación en etanol al 70% a -20°C.

Se seleccionan tres ovarios por tratamiento y se realizó un corte transversal. En cada ovario se determinó bajo el microscopio la anchura del pericarpo (exocarpo y mesocarpo) del ovario, el radio del fruto, el número de vesículas por lóculo y la longitud de éstas. Dada la estrecha relación entre el crecimiento del pericarpo y la división celular durante la fase I del desarrollo, el número de filas de células en el pericarpo se determinó por regresión simple con datos propios del laboratorio (Mesejo et al, 2013; 2016).

Las muestras han sido observadas y fotografiadas con un microscopio de campo brillante (NIKON, E600). Las imágenes se fotografiaron usando la cámara fotográfica digital unida al microscopio.

3.3.3 Análisis de la expresión genética mediante RT-PCR

3.3.3.1 Extracción y purificación de RNA

En primer lugar, el material vegetal (ovario del fruto) previamente congelado a -80°C , se trituró en un mortero preenfriado con nitrógeno líquido hasta conseguir un polvo fino.

A continuación, se pesaron 0,5 g de cada muestra y se transfirieron a un tubo de 30 ml. Se introducen 2 ml de buffer previamente calentado a 50°C en TCES (Tris 0.2M pH 8 + NaCl 0.2 M + EDTA 50mM + SDS 2%), además de, 2 ml de fenol ácido y 40 μl de β -mercaptoetanol.

Posteriormente, se agitaron en vórtex durante 1 min y se mantuvieron los tubos en el baño a 65°C durante 5 minutos. Después, los tubos se centrifugaron durante 30 min a 4.000 r.p.m y a 4°C y se recogió el sobrenadante.

Inmediatamente después, se añadió el mismo volumen de sobrenadante de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Las muestras se agitaron en vórtex y centrifugado (30 min; 4.000 r.p.m.; 4°C), y una vez separadas las fases, se recogió la parte superior donde se añadió LiCl 6M ($\frac{1}{2}$ volumen), dejándolo precipitar toda la noche a -20°C .

Las muestras se centrifugaron durante 20 min a 11.000 r.p.m., conservando el sedimento. Posteriormente, se dejó secar y se resuspendió en 100 μl de agua libre de RNasas.

Por último, para eliminar los restos de ADN genómico, los extractos de ARN fueron purificados mediante el kit RNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen, USA) según las instrucciones del fabricante. Los extractos de ARN purificados se conservaron a -80°C hasta su posterior utilización.

La calidad y concentración del ARN se evaluó en NanoDrop ND-2000™ (Thermo Fisher, USA).

3.3.3.2 Retrotranscripción

Para la síntesis de cDNA se empleó 1 µg de ARN, utilizando el kit QuantiTect® Reverse Transcription Kit (Qiagen, USA) en un volumen de 20 µl según las instrucciones del fabricante. Previamente se empleó el tampón gDNA Wipeout buffer, incluido en el kit para la eliminación de los restos de ADN genómico. Se utilizó una mezcla de oligo-dT y de random primers, también incluidos en el kit. El programa empleado fue de 15 minutos a 42°C seguidos de 3 minutos a 95°C.

3.3.3.3 qPCR

Para la cuantificación relativa mediante PCR se empleó el kit QuantiTect® SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen), según las instrucciones del fabricante. El cDNA diluido se emplea como molde para la amplificación en un volumen final de reacción de 2,5 µl con una concentración de 0,3 µM de cada oligonucleótido y 12,5 µl de la mezcla de los contenidos en el kit.

El programa utilizado fue de 15 min a 95°C para la activación de la Hotstar Taq polimerasa, seguidos de 40 ciclos de 15 segundos a 94°C (desnaturalización), 30 segundos a 60°C (anillamiento o alineamiento de los cebadores) y 30 segundos a 72°C (extensión).

La fluorescencia se midió al final de la etapa de alineamiento y se transformaron en valores relativos de ARNm usando una serie de dilución 10x de muestra de ARN como curva estándar. Los niveles relativos de ARNm se normalizaron a las cantidades totales de ARNm (Bustin, 2002). Y en cada caso, se asignó de manera arbitraria un valor de expresión de 1 a la muestra de-licopeno ciclasa (b-LYC) como genes de referencia, ya que muestran expresión constitutiva en los ovarios de flor de cítricos (Mesejo et al., 2016). Al final de cada qPCR se incluyó un paso final de análisis de la curva del punto de fusión, para detectar la presencia de dímeros o de amplificaciones inespecíficas.

Se empleó un equipo RotorGene® Q 2-Plex (Qiagen) y los resultados fueron evaluados mediante el software RotorGene 2.0.2. Se realizan tres réplicas técnicas de cada muestra biológica para emplearlas en el análisis RT-qPCR.

3.3.3.4 Diseño de los oligonucleótidos

Para la selección de los genes *CYCB2*, *CYCA2-1*, *CYCA1-1*, *CYCD6* y *CDKB2*, se realizó una primera selección de las secuencias descritas en el árbol filogenético de *Citrus clementina*. Tras seleccionar las secuencias se realizó una búsqueda de los posibles genes candidatos por homología con la secuencia original de *Arabidopsis* utilizando la herramienta BLAST de la base de datos Phytozome v12.1 (<http://www.phytozome.net>).

Por lo tanto, los oligonucleótidos utilizados para estudiar la expresión génica de *CYCB2*, *CYCA2-1*, *CYCA1-1*, *CYCD6* y *CDKB2* se diseñaron basados en las secuencias genómicas tag (EST) de Phytozome utilizando el software Primer3 (Tabla 1) y se empleó el gen β -LCY como gen de referencia (MJ136 5'-GAACCAGGAGCTTAGGTCTG-3' y MJ137 5'-GCTAGGTCTACAACAAGGCC-3') (Alquezar et al., 2008).

| Gen | Código EST | QC (%) | Forward primer (5'-3') Reverse primer (5'-3') |
|----------------|-----------------|--------|--|
| <i>CYCB2</i> | Ciclev10025564m | 96 | GAAAGCAGCAACAGGGAAGC TCCAAAAGAAATTGCGCCGG |
| <i>CYCA2-1</i> | Ciclev10008128m | 99 | CCTCGCTCTTCTTCAAGGCA TTGCTCGTGTGATCCGTGAA |
| <i>CYCA1-1</i> | Ciclev10003984m | 96 | CCAGTTTTGTGCAACCATTG TGGACCCTCTCCATGAAGTC |
| <i>CYCD6</i> | Ciclev10015968m | 94 | TTGCCTGCAATTTGAGCCC TCTTGCCGAGAGATGAACCG |
| <i>CDKB2</i> | Ciclev10002132m | 97 | GAGGTCTCCATCTTGCGCAT CGTCCTGCCTTCCTTGTCT |

Tabla 1. Listado de oligonucleótidos usados en la PCR.

3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos se evaluaron estadísticamente mediante una t de Student o un análisis de la varianza (ANOVA). Los datos experimentales se analizaron con el software Statgraphics Centurion XVI (Gráficos estadísticos, Englewoods Cliffs,Nj, EE.UU.).

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 ESTUDIO DEL DESARROLLO PARTENOCÁRPICO DEL OVARIO EN LAS MANDARINAS CLEMENTINAS CV. 'MARISOL' Y CV. 'CLEMENULES'.

Con el fin de estudiar en profundidad el control hormonal de la activación del ciclo celular durante el cuajado partenocárpico de los cítricos, se eligieron 2 variedades de *Citrus clementina* con una marcada diferencia en su capacidad partenocárpica. El cv. 'Marisol' muestra una mayor capacidad de desarrollo que el cv. 'Clemenules', lo que correlaciona con el mayor contenido de GA₁ y el menor contenido en ABA en el ovario de Marisol (Mesejo et al., 2013).

En el experimento realizado en este TFM, se ha observado que el ovario de la flor de 'Marisol' activa su desarrollo partenocárpico con intensidad, lo que anticipa la antesis, caída de pétalos y cuajado del fruto en comparación con el ovario de 'Clemenules' (Figura 1). Así, la antesis de las flores de 'Marisol' ocurrió el 26/4 mientras que la antesis de 'Clemenules' ocurrió el 2/5 (+7 días). En ese estado fenológico, el peso del ovario no difirió significativamente entre las 2 variedades (250 mg 'Marisol', 309 mg 'Clemenules') (Figura 1B). Pero a partir del 10/5, el peso del ovario de 'Marisol' fue significativamente mayor al de 'Clemenules' y, desde ese momento, la diferencia aumentó significativamente con el tiempo entre las 2 variedades. Al final de la caída fisiológica el ovario de 'Marisol' pesaba 9.2 g mientras que el de 'Clemenules' pesaba 2.2 g. Además, el porcentaje de cuajado de 'Marisol' fue significativamente mayor al de 'Clemenules' (39% y 21%, respectivamente) (Figura 1C). Los resultados concuerdan con otros estudios publicados con anterioridad (Mesejo et al., 2013).

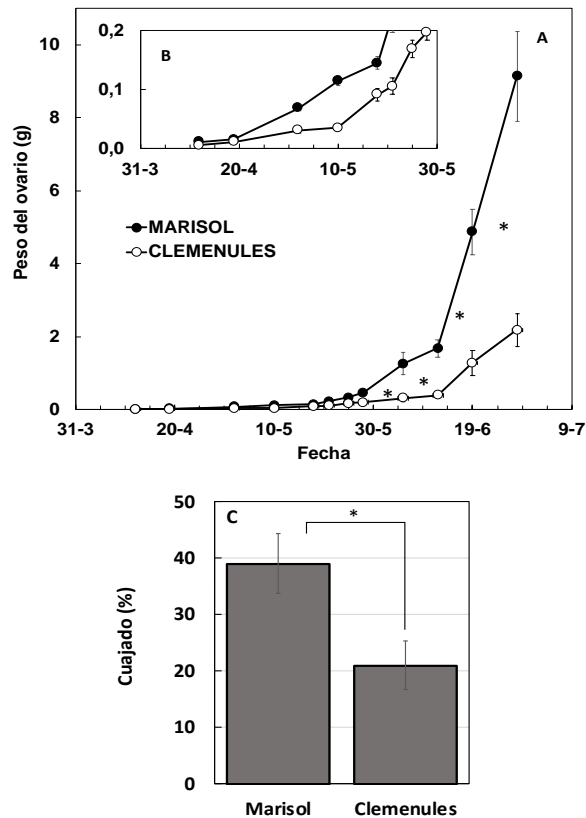


Figura 1. Desarrollo del ovario y cuajado final en las mandarinas clementinas cv. “Clemenules” y cv. “Marisol”. Evolución del peso (A y B) y cuajado final (C). Cada valor de peso del ovario es la media de 20 frutos en los tres primeros muestreos, 15 frutos en los 4 muestreos siguientes y 10 frutos en los últimos 5 muestreos. Cada valor de cuajado es la media de 14 árboles. Las barras verticales indican el error estándar. * indica diferencias estadísticamente significativas.

En los cítricos, el desarrollo inicial de ovario consiste en el aumento de la anchura del pericarpo y la diferenciación y crecimiento de las vesículas de zumo hacia el interior del carpelo, a través de la división celular. El número de filas de células en el pericarpo no difirió significativamente entre las 2 variedades hasta después del cuajado (25/5) (Figura 2A). A partir de ese momento, y correlacionando con el peso de ovario, el número de filas de células del pericarpo de ambas variedades aumentó exponencialmente, pero a mayor velocidad en la mandarina ‘Marisol’ que en la mandarina ‘Clemenules’ (Figura 2A). Por otra parte, en la mandarina ‘Marisol’, el ovario de la flor ya había diferenciado 25 vesículas de zumo por carpelo 7 días antes de la antesis (19/4), mientras que en la mandarina ‘Clemenules’ esto no sucedió hasta la antesis (el 2/5), es decir, 14 días después (Figura 2B). Además, la longitud de las vesículas de zumo (debido al aumento del número de células, principalmente) siempre fue significativamente mayor en ‘Marisol’ que en ‘Clemenules’ (Figura 2 C-D).

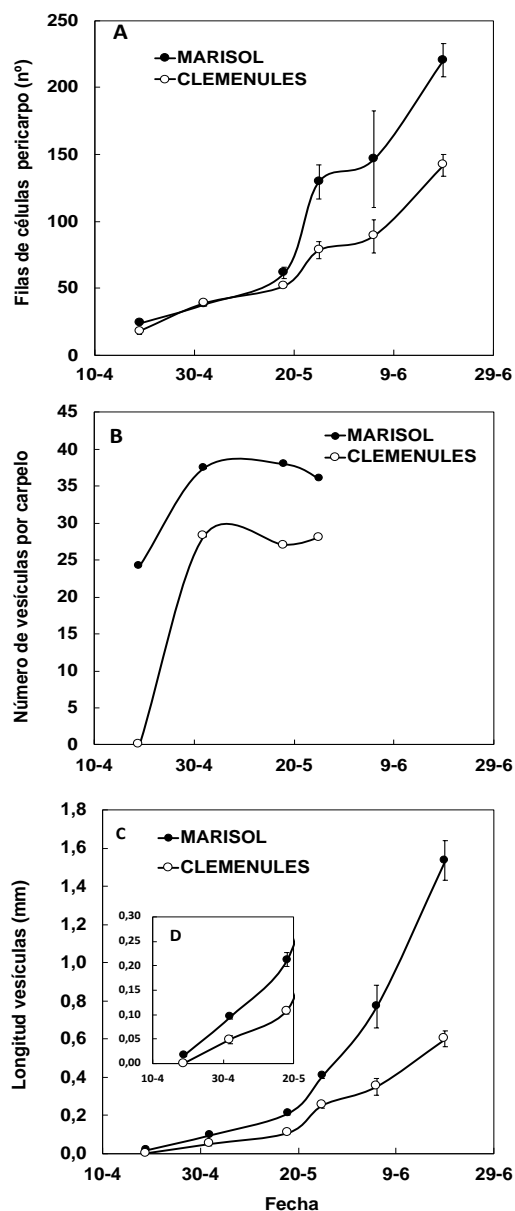


Figura 2. Estudio de la división celular en el ovario de las mandarinas clementinas cv. "Clemenules" y cv. "Marisol". Número de filas de células en el pericarpo (A), Número de vesículas por carpelo (B) y longitud de las vesículas(C) (D). Cada valor es la media de 3 frutos. Las barras verticales indican el error estándar. En la figura B, las barras de error son menores que los símbolos.

Los resultados obtenidos son similares a un estudio anterior que relacionaba la capacidad partenocárpica con la división celular en el ovario de 2 especies de mandarina, Citrus unshiu y Citrus clementina, con esterilidad gamética y homogenética, respectivamente (Mesejo et al., 2016). El ovario de Citrus unshiu, con partenocárpica autónoma debida a su esterilidad gamética, también diferencia las vesículas de zumo en el carpelo con anterioridad a la antesis floral, como ocurre en la mandarina 'Marisol'. Pero en este estudio, se compara 2 cultivares de la misma especie, Citrus clementina, con el misto tipo de esterilidad, la homogenética. El tipo de partenocarpia que se atribuye a esta esterilidad es facultativa (Mesejo et al., 2013). Pero los

resultados sugieren que cultivar 'Marisol' se comporta como si su partenocarpia fuera autónoma, con una elevada capacidad partenocárpica, que estaría relacionada 1) con una anticipación de la reactivación del ciclo celular, 2) con una mayor intensidad en la síntesis y actividad de las ciclinas y las quinasas dependientes de ciclinas, o 3) con las 2 cosas a la vez.

4.2 ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES DEL CICLO CELULAR EN EL OVARIO DE LAS MANDARINAS CLEMENTINAS CV. 'MARISOL' Y CV. 'CLEMENULES'.

Un mayor desarrollo del ovario supone una mayor tasa de división celular y, por lo tanto, una mayor expresión de los genes que regulan el ciclo celular. Los resultados muestran que en los ovarios del cultivar 'Marisol' la expresión de los genes involucrados en el ciclo celular es significativamente mayor a la de los ovarios de Clemenules (Figura 3).

La expresión de la ciclina *CYCD6* 7 días antes de antesis es 170 veces mayor en el cultivar 'Marisol' que en el cultivar 'Clemenules' (Figura 3A y 3B). A pesar de la diferencia cuantitativa, en ambos cultivares se observa un descenso de la expresión de *CYCD6* a lo largo del experimento. Las ciclinas *CYCD* tienen un papel fundamental en el inicio del ciclo celular (Fase G1) por lo que su represión puede suponer el cese de la actividad de división (Taiz et al., 2015). Por ello, los resultados sugieren que el ovario de 'Clemenules' tiene la tasa de división celular disminuida, pero no inhibida, y que la transcripción de *CYCD6* está reducida por algún factor. Una explicación al escaso desarrollo podría ser el elevado contenido en ABA que presenta el ovario de 'Clemenules' en la antesis, en comparación con el de 'Marisol' (Mesejo et al., 2013). El ABA bloquea la transición de la fase G1 a la fase S mediante un incremento en los niveles de las proteínas KRP, que inhiben la actividad del complejo formado por las quinasas dependientes de ciclinas (CDK) y las ciclinas D (*CYCD*) (Inze and De Veylder, 2006).

Una vez se inicia la fase S, las ciclinas *CYCD* son degradadas y aparecen las ciclinas de tipo A *CYCA* que estarán presentes en el ciclo celular hasta la fase G2, donde actúan promoviendo la entrada a la fase M o mitosis (Segura, 2008).

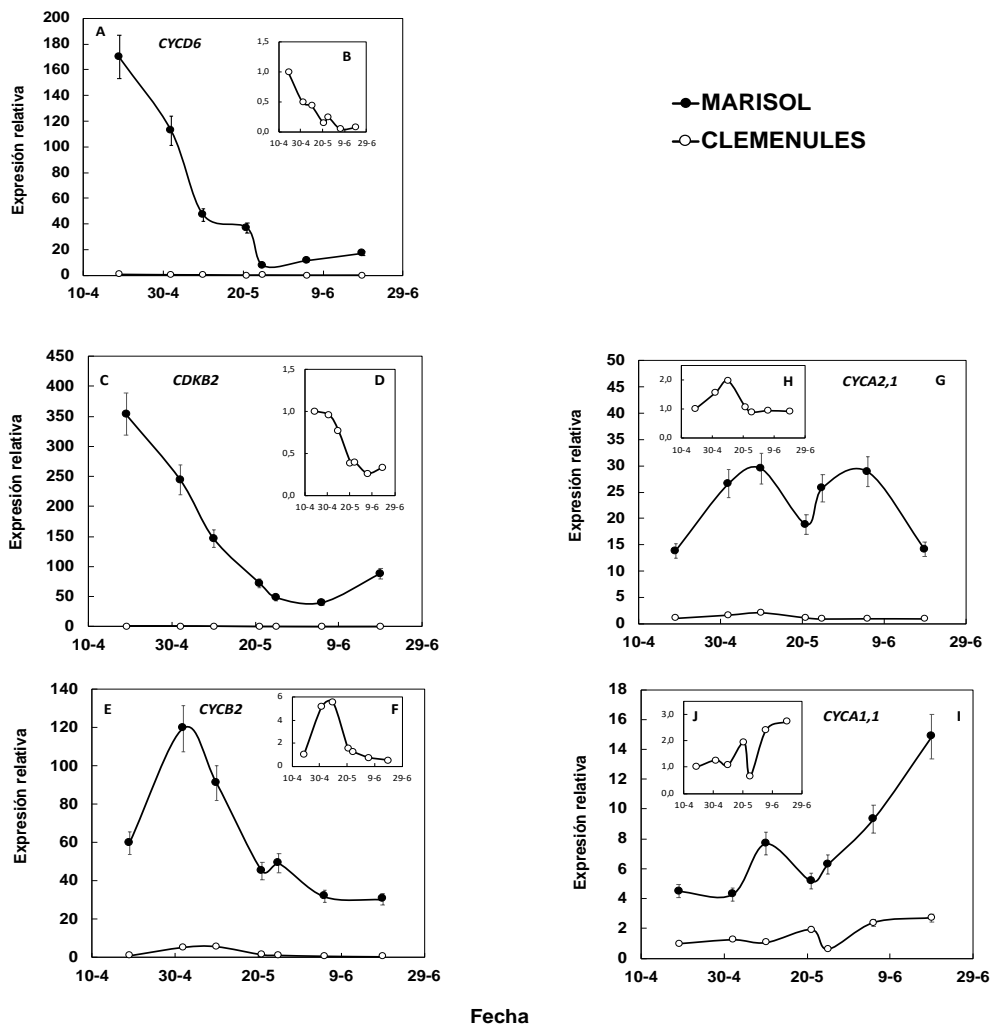


Figura 3. Evolución de la expresión relativa de los genes *CYCD6*, *CDKB2*, *CYCA2-1*, *CYCB2* Y *CYCA1-1* en ovarios de mandarina clementina cv. "Clemenules" y cv. "Marisol". Cada valor es la medida de 2 réplicas biológicas y 2 réplicas técnicas, realizadas a partir de una muestra homogénea de 10 frutos por tratamiento en cada fecha. Las barras verticales indican la desviación estándar. En Clemenules las barras de error son menores que los símbolos.

Los resultados sobre la expresión de la ciclina *CYCA2-1* muestran un comportamiento cualitativamente similar en ambos cultivares tras la antesis, aunque, nuevamente, la expresión en el cultivar 'Marisol' llega a ser 30 veces mayor al cultivar 'Clemenules' (Figura 3G y 3H). Se produce un incremento en la expresión después de antesis, aunque 10 días después de la máxima expresión se produce un descenso que se mantiene en 'Clemenules'; en 'Marisol', sin embargo, se produce un segundo incremento en la expresión de *CYCA2-1* durante la fase de crecimiento rápido del ovario. Esto sugiere que en el cultivar 'Clemenules' se inicia la actividad de *CYCA2-1* pero no es persistente en el tiempo mientras que el cultivar Marisol sí que es capaz de mantener la actividad de dicho gen durante más tiempo.

Por otro lado, la expresión de la ciclina *CYCA1-1* aumenta 15 días después de antesis, aproximadamente, en ambos cultivares, aunque en 'Marisol' la expresión es 8 veces mayor que en Clemenules. Tras un breve descenso en la expresión en la caída de pétalos en ambas variedades, se produce un incremento constitutivo en la expresión 25 días después de antesis, siendo este más intenso en 'Marisol' que llega a alcanzar niveles de expresión 14 veces superiores a los de 'Clemenules'.

En cuanto a la evolución de la expresión de la quinasa dependiente de ciclina *CDKB2* los resultados siguen un patrón similar a la ciclina *CYCD6*, siendo máxima en preantesis, aunque, nuevamente, con diferencias cuantitativas entre los ovarios de 'Marisol' y los de 'Clemenules'. La formación del complejo *CYCB-CDKB* juega un papel fundamental en la transición de la fase G2 a mitosis (Taiz et al., 2015) y una elevada expresión de los genes que permiten la transición a la mitosis supone una elevada tasa de división de células (Malladi y Johnson, 2010). La evolución de la expresión de *CYCB2* fue máxima en la antesis de las 2 variedades, Marisol y Clemenules, alcanzando un nivel de relativo de expresión entre ellas de 120 y 6, respectivamente (Figura 3 E y 3F).

Las diferencias cuantitativas, pero no cualitativas en la evolución de la expresión de los genes del ciclo celular, sugiere que el ovario de 'Clemenules' presenta algún tipo de represión por la que no es capaz de desarrollarse. La aplicación de GA₃ en la caída de pétalos reduce el contenido de ABA en el ovario de 'Clemenules' y mejora la tasa de crecimiento, hasta el punto de llegar a tener un comportamiento similar al de un ovario de una mandarina con elevada capacidad partenocárpica (Zacarías et al., 1995). Con el fin de determinar el mecanismo a través del cual el GA₃ realiza su acción se estudió la expresión de los genes del ciclo celular en árboles de mandarina Clemenules tratados con GA₃, en comparación con árboles tratados con 6-BA y árboles sin tratar.

4.3 ESTUDIO DEL EFECTO DE LA APLICACIÓN DE GA₃ Y 6-BA SOBRE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES DEL CICLO CELULAR EN EL OVARIO DE LA MANDARINA CLEMENTINA CV. 'CLEMNULES'.

El ciclo celular se encuentra influenciado por diferentes factores externos que regulan la expresión de los genes que intervienen en las distintas fases del ciclo. Por ello, estos factores, entre los que se encuentran las hormonas, presentan un papel muy importante en el desarrollo del ovario (Segura, 2008).

La aplicación de GA₃ (el 18/5) sobre los ovarios de 'Clemenules' produjo un incremento significativo (ver ANOVA en anejo 1) en la expresión de la ciclina *CYCD6* respecto del control entre 3 y 7 días después del tratamiento (Figura 4A). Del mismo modo, la aplicación de 6-BA promovió la expresión de la ciclina *CYCD6*, siendo superior al control, aunque no con la misma intensidad que el GA₃. Sin embargo, tras la máxima expresión alcanzada 7 días después del tratamiento se produjo un descenso significativo hasta 20 días después del tratamiento. El aumento en la expresión de *CYCD6* por efecto de los tratamientos sugiere una mayor actividad en el ciclo celular dando lugar a un mayor desarrollo del ovario.

Así mismo, la expresión de *CDKB2* aumentó significativamente (ver ANOVA en el anejo 1) tras la aplicación de GA₃ y 6-BA. El efecto de ambas hormonas sobre la CDK se produjo de forma inmediata ya que a los 3 días después del tratamiento se aumentó significativamente la expresión, que llegó a ser 3 veces superior a la del control. Durante los 20 días después del tratamiento la expresión de *CDKB2* fue ligeramente superior en los ovarios tratados con 6-BA en comparación con los ovarios tratados con GA₃, pero a partir de entonces la expresión en los ovarios tratados con 6-BA disminuyó, siendo significativamente inferior con respecto de los ovarios tratados con GA₃ 32 días después del tratamiento (Figura 4B).

La respuesta a los tratamientos de la ciclina *CYCA1-1* difirió de los anteriores genes, pues solamente aumentó casi 20 días después de la aplicación de GA₃ (Figura 4E).

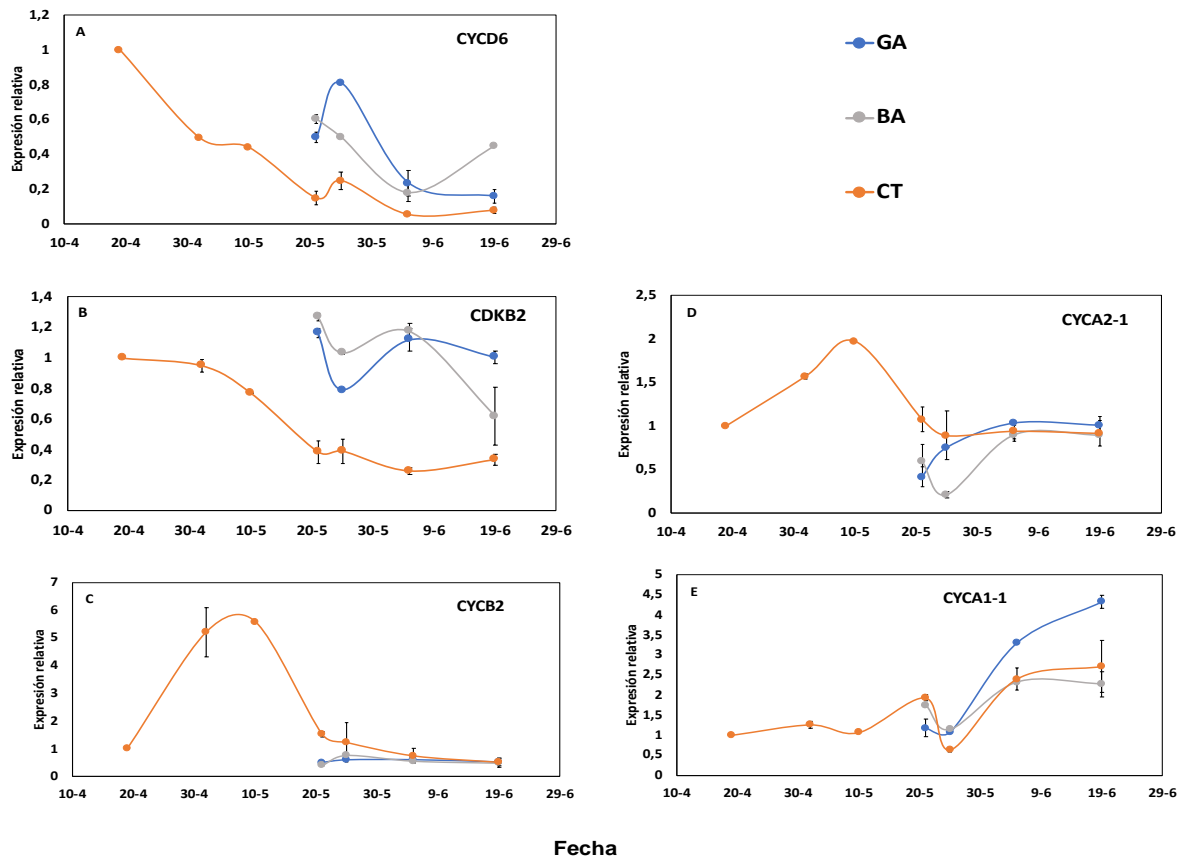


Figura 4. Evolución de la expresión relativa de los genes *CYCD6*, *CDKB2*, *CYCA2-1*, *CYCB2* y *CYCA1-1* en ovarios de mandarina clementina cv. "Clemenules" que han sido tratados con GA₃ y 6-BA. Los tratamientos se realizaron cuando las flores habían perdido los pétalos con GA₃ (10 mg/l) y 6-BA (100 mg/l). Cada valor es la media de 2 réplicas biológicas y 2 réplicas técnicas, realizadas a partir de una muestra homogénea de 10 frutos por tratamiento en cada fecha. Las barras verticales indican la desviación estándar

A pesar de lo anterior, no todos los genes estudiados en el experimento han respondido frente a la aplicación de las hormonas. Los resultados obtenidos en la expresión de las ciclinas *CYCB2* y *CYCA2-1* no muestran variaciones significativas en comparación a la expresión en los ovarios control (Figura 4C y 4D). Los resultados muestran la especificidad de las hormonas en el control del ciclo celular y su actuación localizada en puntos específicos del ciclo, de modo que tanto el GA₃ como la 6-BA estimulan las fases G1/S y G2/M a través del estímulo de la ciclina *CYCD6* y la quinasa *CDKB2* respectivamente, de forma que su efecto no se limita a una fase del ciclo celular de forma específica.

4.4 ESTUDIO DEL EFECTO DE LA APLICACIÓN DE GA₃ Y 6-BA SOBRE EL DESARROLLO PARTENOCÁRPICO DEL OVARIO DE LA MANDARINA CLEMENTINA CV. 'CLEMENULES'.

La mandarina 'Clemenules' presenta una baja capacidad partenocárpica, por lo que necesita la aplicación de hormonas para promover el desarrollo del ovario y el cuajado (Agustí, 2003). La aplicación de GA₃ y 6-BA incrementa su cuajado y, por lo tanto, la producción (García-Martínez, J.L. y García-Papí, M.A., 1979).

A la vista de los resultados mostrados en el apartado 3, tanto la aplicación de GA₃ como la de 6-BA activan las fases G1/S y G2/M (mediante el estímulo de la expresión de *CYCD6* y *CDKB2*, respectivamente). Sin embargo, mientras la expresión de dichos genes aumentó significativamente a los pocos días del tratamiento y desde la primera fecha de muestreo, el estímulo del número de filas de células del pericarpo, la longitud de las vesículas de zumo y el peso del ovario no se observó hasta 25-30 días después del tratamiento, ni siquiera realizando un tratamiento combinado de GA₃ + 6-BA. Solo a partir de entonces, los tratamientos alcanzaron diferencias estadísticamente significativas en relación con el tratamiento control (Figura 5). Así, el 19/6, al final de la caída fisiológica de frutos, el número de filas de células del pericarpo aumentó de 142 en los ovarios control a más de 200 en los ovarios tratados, con un efecto sinérgico del tratamiento con las 2 hormonas; la longitud de las vesículas de zumo aumentó de 0,6 mm (Control) a 1mm (GA) o 1,5 mm (BA); y el peso del ovario aumentó de 0,9 g (Control) a 1,5 g (GA) o 1,7 g (BA) (Figura 6A y 6B). Los tratamientos mejoraron significativamente el cuajado final respecto del control. Como se muestra en la figura 6, en los frutos control el cuajado medio fue del 21%, mientras que en los frutos tratados con GA, BA y GA+BA se obtuvo un porcentaje de cuajado del 69%, 57% y 75% respectivamente (Figura 6C) El retraso observado tras la aplicación de GA₃ también fue registrado por Navarro (2017). Es importante destacar que la longitud de las vesículas de zumo fue significativamente mayor en los tratamientos con 6-BA (y la mezcla con GA₃) que en el tratamiento con GA₃ solo.

Varias hipótesis podrían explicar este retraso en el efecto del tratamiento. Una de ellas podría ser la ausencia de estímulo de las ciclinas de tipo A y B (*CYCB2*, *CYCA2,1* y *CYCA1,1* figura 4), que son necesarias para que la quinasa *CDKB2* realice su acción en la fase G2/M. De hecho, aunque solamente sea para el tratamiento con GA₃, la ciclina *CYCA1,1* incrementó significativamente su expresión 1 mes después del tratamiento coincidiendo con el aumento en la división celular. Pero si esta fuera la razón principal, los resultados obtenidos no podrían explicar el aumento de la división celular provocado por la BA.

El retraso en el efecto de los tratamientos podría ser debido, también, a la presencia y acción de inhibidores del ciclo celular, de modo que por mucho que se activen algunos promotores del ciclo la represión persistiría mientras los inhibidores estuviesen activos. En efecto, en condiciones de baja síntesis endógena de GAs, las proteínas DELLA promueven la detención del ciclo celular a través de genes inhibidores de quinasas *CDK*, los genes *KRP* y los genes *SIM*. En esas condiciones (mutantes de *Arabidopsis* deficientes en la síntesis de GAs), la aplicación de GA₃ reduce la expresión de los genes *KRP* y *SIM*, del mismo modo que ocurre en los dobles mutantes *ga1-3-DELLA* (deficiente en síntesis de GAs y deficiente en proteínas DELLA) (Achard et al., 2009). En el manzano cv. 'Gala', la emasculación activa la expresión de los 4 parálogos *KRP* de la especie, a la vez que inhibe la división celular (Malladi and Johnson, 2010). Finalmente, la síntesis de proteínas *KRP* y *SIM* se estimula por acción del ABA (Takatsuka y Umeda, 2014), y la concentración de ABA en el ovario de 'Clemenules' es elevada durante la antesis, cuajado y caída fisiológica del fruto (Zacarías et al., 1995; Mesejo et al., 2013).

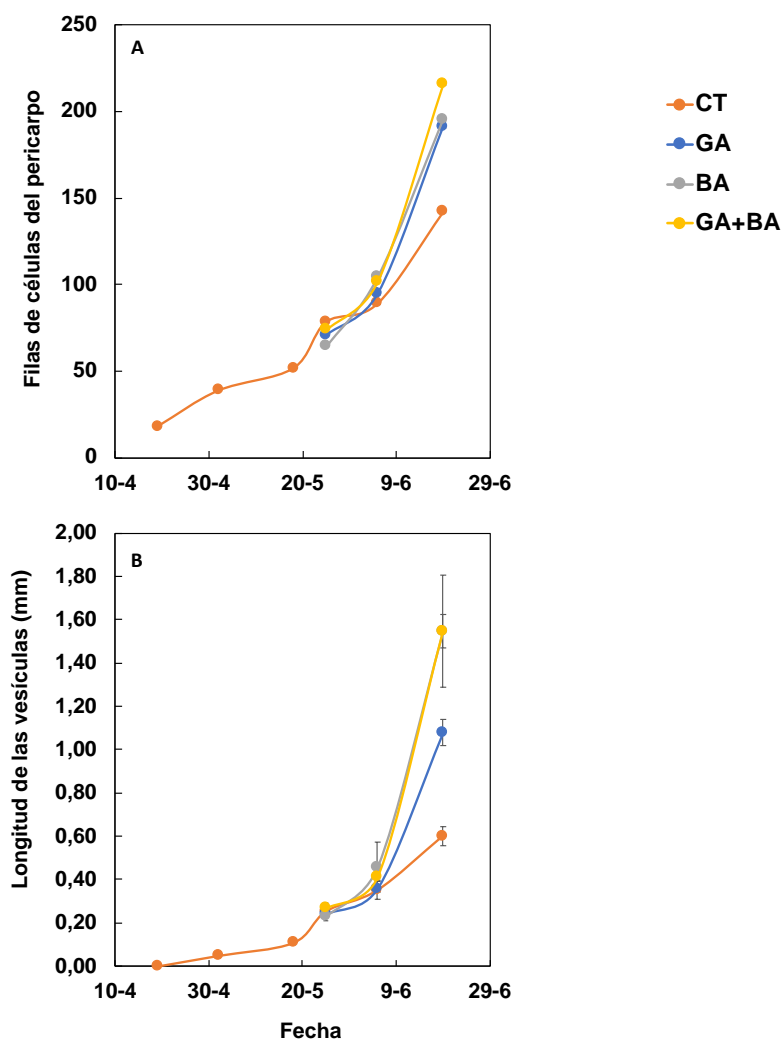


Figura 5. Comparación del desarrollo del ovario en mandarina "Clemenules" en función de los tratamientos realizados. Los tratamientos se realizaron cuando las flores habían perdido los pétalos con GA (10 mg/l) y BA (100 mg/l). Evolución del número de filas de células del pericarpo (A) y la longitud de las vesículas(B). Cada valor es la media de 5-8 frutos. Las barras verticales indican el error estándar. En la figura A, las barras de error son menores que los símbolos.

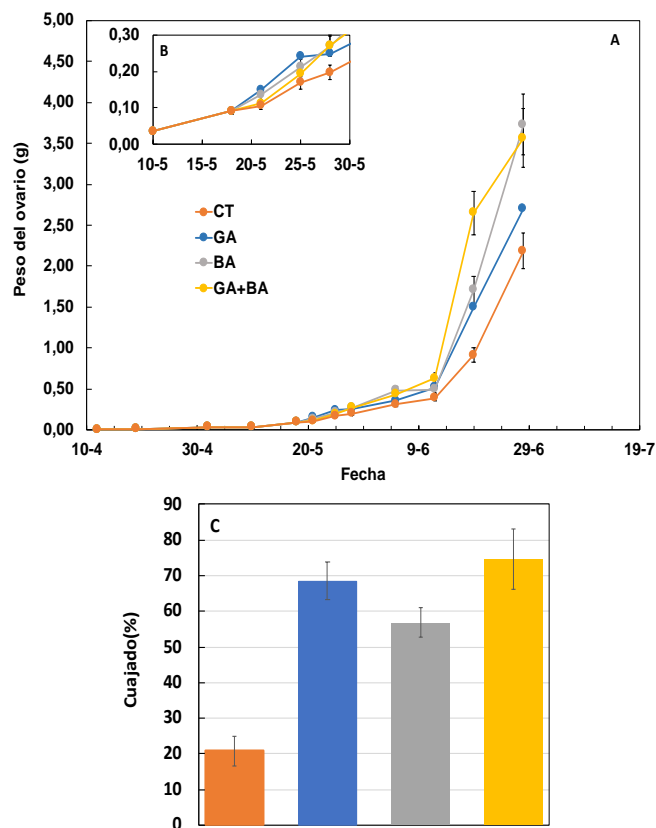


Figura 6. Control del cuajado en la mandarina “Clemenules” en función de los tratamientos realizados. Evolución del peso (A)(B) y cuajado final (C). Los tratamientos se realizaron cuando las flores habían perdido los pétalos con GA (10 mg/l) y BA (100 mg/l). Cada valor de peso es la media del 6-7 frutos. Cada valor de cuajado es la media de un mínimo de 4 ramas. Las barras verticales indican el error estándar.

5 CONCLUSIONES

Atendiendo a la hipótesis de trabajo y los objetivos establecidos en este TFM, las conclusiones obtenidas son las siguientes:

1. La evolución temporal de la expresión de los genes del ciclo celular no difiere cualitativamente entre el cv. 'Marisol' y el cv. 'Clemenules', pero las diferencias cuantitativas son notables.
2. Tanto la aplicación exógena de GA₃ como la de 6-BA estimulan la fase G₁/S como la fase G₂/M del ciclo celular, al aumentar, al menos, la expresión de los genes *CYCD6* y *CDKB2*.
3. El efecto de los tratamientos con GA₃ y 6-BA sobre la división celular y el tamaño del fruto no se observa hasta 20-30 días después.

6 BIBLIOGRAFÍA.

- Achard, P., Gusti, A., Cheminant, S., Alioua, M., Dhondt, S., Coppens, F., ... & Genschik, P. (2009). Gibberellin signaling controls cell proliferation rate in Arabidopsis. *Current biology*, 19(14), 1188-1193.
- Agustí Fonfría, M., & Almela Orenga, V. (1991). *Aplicación de fitorreguladores en citricultura*. Aedos.
- Agustí, M. (2003). *Citricultura* (No. 634.3 A3).
- Alquezar, B., Rodrigo, M. J., & Zacarías, L. (2008). Regulation of carotenoid biosynthesis during fruit maturation in the red-fleshed orange mutant Cara Cara. *Phytochemistry*, 69(10), 1997-2007.
- Bermejo, A., Granero, B., Mesejo, C., Reig, C., Tejedó, V., Agustí, M., ... & Iglesias, D. J. (2017). Auxin and Gibberellin Interact in Citrus Fruit Set. *Journal of Plant Growth Regulation*, 1-11.
- Ding, J., Chen, B., Xia, X., Mao, W., Shi, K., Zhou, Y., & Yu, J. (2013). Cytokinin-induced parthenocarpic fruit development in tomato is partly dependent on enhanced gibberellin and auxin biosynthesis. *PLoS one*, 8(7), e70080.
- García-Martínez, J. L., & García-Papí, M. A. (1979). The influence of gibberellic acid, 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid and 6-benzylaminopurine on fruit-set of Clementine mandarin. *Scientia horticulturae*, 10(3), 285-293.
- <http://www.fao.org/economic/est/est-commodities/citricos/es/>
- <http://gipcitricos.ivia.es/citricultura-valenciana>
- Inzé, D., & De Veylder, L. (2006). Cell cycle regulation in plant development. *Annu. Rev. Genet.*, 40, 77-105.
- <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/agricultura/superficies-producciones-anuales-cultivos/>
- Malladi, A., & Johnson, L. K. (2010). Expression profiling of cell cycle genes reveals key facilitators of cell production during carpel development, fruit set, and fruit growth in apple (*Malus domestica* Borkh.). *Journal of experimental botany*, 62(1), 205-219.
- Mesejo, C., Yuste, R., Martínez-Fuentes, A., Reig, C., Iglesias, D. J., Primo-Millo, E., & Agustí, M. (2013). Self-pollination and parthenocarpic ability in developing ovaries of self-incompatible Clementine mandarins (*Citrus clementina*). *Physiologia plantarum*, 148(1), 87-96.
- Mesejo, C., Yuste, R., Reig, C., Martínez-Fuentes, A., Iglesias, D. J., Muñoz-Fambuena, N., ... & Agustí, M. (2016). Gibberellin reactivates and maintains ovary-wall cell division causing fruit set in parthenocarpic Citrus species. *Plant Science*, 247, 13-24.

Navarro, M. (2017). Relación entre la síntesis de giberelinas y la activación de la división celular en el ovario de la flor del mandarino "Clemenules" durante la fase de cuajado. Trabajo fin de Máster. Univ. Politécnica de Valencia. 36 pp.

Polyn, S., Willems, A., & De Veylder, L. (2015). Cell cycle entry, maintenance, and exit during plant development. *Current Opinion in Plant Biology*, 23, 1-7.

Segura, J. (2008). Introducción al desarrollo. Concepto de hormona vegetal, en: Fundamentos Fisiología Vegetal, 233-265.

Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M., & Murphy, A. (2015). Plant physiology and development. *Sunderland, MA: Sinauer Associates*.

Talón, M., Hedden, P., & Primo-Millo, E. (1990). Gibberellins in *Citrus sinensis*: A comparison between seeded and seedless varieties. *Journal of Plant Growth Regulation*, 9(1-4), 201.

Talon, M., Zacarias, L., & Primo-Millo, E. (1990). Hormonal changes associated with fruit set and development in mandarins differing in their parthenocarpic ability. *Physiologia Plantarum*, 79(2), 400-406.

Talon, M., Zacarias, L., & Primo-Millo, E. (1992). Gibberellins and parthenocarpic ability in developing ovaries of seedless mandarins. *Plant physiology*, 99(4), 1575-1581.

Takatsuka, H., & Umeda, M. (2014). Hormonal control of cell division and elongation along differentiation trajectories in roots. *Journal of experimental botany*, 65(10), 2633-2643.

Zacarias, L., Talon, M., Ben-Cheikh, W., Lafuente, M. T., & Primo-Millo, E. (1995). Abscisic acid increases in non-growing and paclobutrazol-treated fruits of seedless mandarins. *Physiologia Plantarum*, 95(4), 613-619.

7 ANEJO I

7.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.

7.1.1 Análisis de una t de Student para el peso según la variedad

- Fecha: 19-6-18

Comparación de medias para el Peso

95,0% confidence interval for mean of Variedad=Clemenules: 1,2763 +/- 0,756932 [0,519368; 2,03323]

95,0% confidence interval for mean of Variedad=Marisol: 4,8717 +/- 1,74652 [3,12518; 6,61822]

95,0% confidence interval for the difference between the means
assuming equal variances: -3,5954 +/- 1,58096 [-5,17636; -2,01444]

t test to compare means

Null hypothesis: mean1 = mean2

Alt. hypothesis: mean1 NE mean2

assuming equal variances: t = -5,2443 P-value = 0,000779206

Reject the null hypothesis for alpha = 0,05.

7.1.2 Análisis de la varianza y separación de medias para el peso por tratamiento

- Fecha: 19-6-18

Análisis de Varianza para el Peso por Tratamiento.

| Source | Sum of Squares | Df | Mean Square | F-Ratio | P-Value |
|----------------|----------------|----|-------------|---------|---------|
| Between groups | 10,7225 | 3 | 3,57416 | 8,33 | 0,0007 |
| Within groups | 9,43902 | 22 | 0,429047 | | |
| Total (Corr.) | 20,1615 | 25 | | | |

Pruebas de Múltiple Rango para el Peso por Tratamiento.

Method: 95,0 percent LSD

| Tratamiento | Count | Mean | Homogeneous Groups |
|-------------|-------|----------|--------------------|
| CT | 7 | 0,910113 | X |
| GA | 6 | 1,6808 | X |
| BA | 6 | 1,87167 | X |
| GA+BA | 7 | 2,65146 | X |

| Contrast | Sig. | Difference | +/- Limits |
|------------|------|------------|------------|
| BA - CT | * | 0,961552 | 0,755757 |
| BA - GA | | 0,190868 | 0,784286 |
| BA - GA+BA | * | -0,779797 | 0,755757 |
| CT - GA | * | -0,770684 | 0,755757 |
| CT - GA+BA | * | -1,74135 | 0,726108 |
| GA - GA+BA | * | -0,970665 | 0,755757 |

* denotes a statistically significant difference.

- Fecha: 28-6-18

Análisis de Varianza para el Peso por Tratamiento.

| Source | Sum of Squares | Df | Mean Square | F-Ratio | P-Value |
|----------------|----------------|----|-------------|---------|---------|
| Between groups | 16,1537 | 3 | 5,38455 | 5,27 | 0,0068 |
| Within groups | 22,4733 | 22 | 1,02152 | | |
| Total (Corr.) | 38,627 | 25 | | | |

Pruebas de Múltiple Rango para el Peso por Tratamiento.

Method: 95,0 percent LSD

| Tratamiento | Count | Mean | Homogeneous Groups |
|-------------|-------|---------|--------------------|
| CT | 6 | 1,89247 | X |
| GA | 7 | 3,13014 | X |
| GA+BA | 7 | 3,84979 | X |
| BA | 6 | 3,89667 | X |

| Contrast | Sig. | Difference | +/- Limits |
|------------|------|------------|------------|
| BA - CT | * | 2,0042 | 1,21017 |
| BA - GA | | 0,766524 | 1,16615 |
| BA - GA+BA | | 0,046881 | 1,16615 |
| CT - GA | * | -1,23768 | 1,16615 |
| CT - GA+BA | * | -1,95732 | 1,16615 |
| GA - GA+BA | | -0,719643 | 1,1204 |

* denotes a statistically significant difference.

7.1.3 Análisis de la varianza y separación de medias para el cuajado

Análisis de Varianza para el Cuajado por Tratamiento.

| Source | Sum of Squares | Df | Mean Square | F-Ratio | P-Value |
|----------------|----------------|----|-------------|---------|---------|
| Between groups | 2,00034 | 3 | 0,666781 | 11,87 | 0,0001 |
| Within groups | 1,29239 | 23 | 0,0561907 | | |
| Total (Corr.) | 3,29273 | 26 | | | |

Pruebas de Múltiple Rango para el Cuajado por Tratamiento.

Method: 95,0 percent LSD

| Tratamientos | Count | Mean | Homogeneous Groups |
|--------------|-------|---------|--------------------|
| CT | 14 | 0,42825 | X |
| BA | 5 | 0,85646 | X |
| GA | 4 | 0,99055 | X |
| GA+BA | 4 | 1,05818 | X |

| Contrast | Sig. | Difference | +/- Limits |
|------------|------|------------|------------|
| BA - CT | * | 0,42821 | 0,255476 |
| BA - GA | | -0,13409 | 0,328948 |
| BA - GA+BA | | -0,201715 | 0,328948 |
| CT - GA | * | -0,5623 | 0,278012 |
| CT - GA+BA | * | -0,629925 | 0,278012 |
| GA - GA+BA | | -0,067625 | 0,346742 |

* denotes a statistically significant difference.

7.1.4 Análisis de la varianza y separación de medias para el número de filas de células del pericarpio

- Fecha: 19-6-18

Análisis de Varianza para el Número de filas de células por Tratamiento.

| Source | Sum of Squares | Df | Mean Square | F-Ratio | P-Value |
|----------------|----------------|----|-------------|---------|---------|
| Between groups | 22941,0 | 3 | 7647,0 | 26,94 | 0,0000 |
| Within groups | 6243,91 | 22 | 283,814 | | |
| Total (Corr.) | 29184,9 | 25 | | | |

Pruebas de Múltiple Rango para el Número de filas de células por Tratamiento.

Method: 95,0 percent LSD

| Tratamiento | Count | Mean | Homogeneous Groups |
|-------------|-------|---------|--------------------|
| CT | 8 | 141,927 | X |
| GA | 5 | 191,127 | X |
| BA | 5 | 195,198 | X |
| GA+BA | 8 | 215,426 | X |

| Contrast | Sig. | Difference | +/- Limits |
|------------|------|------------|------------|
| BA - CT | * | 53,2707 | 19,9178 |
| BA - GA | | 4,07106 | 22,0968 |
| BA - GA+BA | * | -20,2281 | 19,9178 |
| CT - GA | * | -49,1996 | 19,9178 |
| CT - GA+BA | * | -73,4988 | 17,4691 |
| GA - GA+BA | * | -24,2991 | 19,9178 |

* denotes a statistically significant difference.

7.1.5 Análisis de la varianza y separación de medias para la longitud de las vesículas

- Fecha: 5-6-18

Análisis de Varianza para la longitud de las vesículas por Tratamiento.

| Source | Sum of Squares | Df | Mean Square | F-Ratio | P-Value |
|----------------|----------------|----|-------------|---------|---------|
| Between groups | 0,494061 | 3 | 0,164687 | 19,67 | 0,0000 |
| Within groups | 0,20095 | 24 | 0,00837292 | | |
| Total (Corr.) | 0,695011 | 27 | | | |

Pruebas de Múltiple Rango para la longitud de las vesículas por Tratamiento.

Method: 95,0 percent LSD

| TT | Count | Mean | Homogeneous Groups |
|-------|-------|---------|--------------------|
| CT | 8 | 0,35125 | X |
| GA | 8 | 0,36 | X |
| GA+BA | 8 | 0,41375 | X |
| BA | 4 | 0,7475 | X |

| Contrast | Sig. | Difference | +/- Limits |
|------------|------|------------|------------|
| BA - CT | * | 0,39625 | 0,115649 |
| BA - GA | * | 0,3875 | 0,115649 |
| BA - GA+BA | * | 0,33375 | 0,115649 |
| CT - GA | | -0,00875 | 0,0944273 |
| CT - GA+BA | | -0,0625 | 0,0944273 |
| GA - GA+BA | | -0,05375 | 0,0944273 |

* denotes a statistically significant difference.

- Fecha: 19-6-18

Análisis de Varianza para la longitud de las vesículas por Tratamiento.

| Source | Sum of Squares | Df | Mean Square | F-Ratio | P-Value |
|----------------|----------------|----|-------------|---------|---------|
| Between groups | 5,13638 | 3 | 1,71213 | 40,95 | 0,0000 |
| Within groups | 1,04536 | 25 | 0,0418144 | | |
| Total (Corr.) | 6,18174 | 28 | | | |

Pruebas de Múltiple Rango para la longitud de las vesículas por Tratamiento.

Method: 95,0 percent LSD

| Tratamiento | Count | Mean | Homogeneous Groups |
|-------------|-------|----------|--------------------|
| CT | 9 | 0,596667 | x |
| GA | 5 | 1,078 | x |
| BA | 5 | 1,546 | x |
| GA+BA | 10 | 1,548 | x |

| Contrast | Sig. | Difference | +/- Limits |
|------------|------|------------|------------|
| BA - CT | * | 0,949333 | 0,234905 |
| BA - GA | * | 0,468 | 0,266357 |
| BA - GA+BA | | -0,002 | 0,230672 |
| CT - GA | * | -0,481333 | 0,234905 |
| CT - GA+BA | * | -0,951333 | 0,193504 |
| GA - GA+BA | * | -0,47 | 0,230672 |

* denotes a statistically significant difference.

7.1.6 Análisis de la varianza y separación de medias para la expresión de CYCB2

Análisis de Varianza para la expresión de CYCB2 – Suma de Cuadrados Tipo III

| Source | Sum of Squares | Df | Mean Square | F-Ratio | P-Value |
|-------------------|----------------|----|-------------|---------|---------|
| MAIN EFFECTS | | | | | |
| A:Tratamiento | 0,534067 | 2 | 0,267033 | 3,50 | 0,0983 |
| B:Fecha | 0,242042 | 3 | 0,0806806 | 1,06 | 0,4337 |
| RESIDUAL | 0,457633 | 6 | 0,0762722 | | |
| TOTAL (CORRECTED) | 1,23374 | 11 | | | |

All F-ratios are based on the residual mean square error.

Pruebas de Múltiple Rango para la expresión de CYCB2 por Tratamiento.

Method: 95,0 percent LSD

| Tratamiento | Count | LS Mean | LS Sigma | Homogeneous Groups |
|-------------|-------|---------|----------|--------------------|
| BA | 4 | 0,5525 | 0,138087 | x |
| GA | 4 | 0,5575 | 0,138087 | x |
| Control | 4 | 1,0025 | 0,138087 | x |

| Contrast | Sig. | Difference | +/- Limits |
|--------------|------|------------|------------|
| BA - Control | | -0,45 | 0,477846 |
| BA - GA | | -0,005 | 0,477846 |
| Control - GA | | 0,445 | 0,477846 |

* denotes a statistically significant difference.

7.1.7 Análisis de la varianza y separación de medias para la expresión de CYCA2-1

Análisis de Varianza para la expresión de CYCA2-1 – Suma de Cuadrados Tipo III

| Source | Sum of Squares | Df | Mean Square | F-Ratio | P-Value |
|-------------------|----------------|----|-------------|---------|---------|
| MAIN EFFECTS | | | | | |
| A:Tratamiento | 0,186067 | 2 | 0,0930333 | 1,74 | 0,2531 |
| B:Fecha | 0,264917 | 3 | 0,0883056 | 1,65 | 0,2743 |
| RESIDUAL | 0,320333 | 6 | 0,0533889 | | |
| TOTAL (CORRECTED) | 0,771317 | 11 | | | |

All F-ratios are based on the residual mean square error.

Pruebas de Múltiple Rango para la expresión de CYCA2-1 por Tratamiento.

Method: 95,0 percent LSD

| Tratamiento | Count | LS Mean | LS Sigma | Homogeneous Groups |
|-------------|-------|---------|----------|--------------------|
| BA | 4 | 0,65 | 0,11553 | X |
| GA | 4 | 0,8 | 0,11553 | X |
| Control | 4 | 0,955 | 0,11553 | X |

| Contrast | Sig. | Difference | +/- Limits |
|--------------|------|------------|------------|
| BA - Control | | -0,305 | 0,399788 |
| BA - GA | | -0,15 | 0,399788 |
| Control - GA | | 0,155 | 0,399788 |

* denotes a statistically significant difference.

7.1.8 Análisis de la varianza y separación de medias para la expresión de CYCA1-1

Análisis de Varianza para la expresión de CYCA1-1 – Suma de Cuadrados Tipo III

| Source | Sum of Squares | Df | Mean Square | F-Ratio | P-Value |
|-------------------|----------------|----|-------------|---------|---------|
| MAIN EFFECTS | | | | | |
| A:Tratamiento | 0,89435 | 2 | 0,447175 | 1,07 | 0,3998 |
| B:Fecha | 8,65957 | 3 | 2,88652 | 6,92 | 0,0225 |
| RESIDUAL | 2,50208 | 6 | 0,417014 | | |
| TOTAL (CORRECTED) | 12,056 | 11 | | | |

All F-ratios are based on the residual mean square error.

Pruebas de Múltiple Rango para la expresión de CYCA1-1 por Tratamiento.

Method: 95,0 percent LSD

| Tratamiento | Count | LS Mean | LS Sigma | Homogeneous Groups |
|-------------|-------|---------|----------|--------------------|
| BA | 4 | 1,87125 | 0,322883 | X |
| Control | 4 | 1,92125 | 0,322883 | X |
| GA | 4 | 2,47375 | 0,322883 | X |

| Contrast | Sig. | Difference | +/- Limits |
|--------------|------|------------|------------|
| BA - Control | | -0,05 | 1,11733 |
| BA - GA | | -0,6025 | 1,11733 |
| Control - GA | | -0,5525 | 1,11733 |

* denotes a statistically significant difference.

7.1.9 Análisis de la varianza y separación de medias para la expresión de CYCD6

Análisis de Varianza para la expresión de CYCD6 – Suma de Cuadrados Tipo III

| Source | Sum of Squares | Df | Mean Square | F-Ratio | P-Value |
|-------------------|----------------|----|-------------|---------|---------|
| MAIN EFFECTS | | | | | |
| A:Tratamiento | 0,23415 | 2 | 0,117075 | 5,42 | 0,0452 |
| B:Fecha | 0,251823 | 3 | 0,083941 | 3,89 | 0,0740 |
| RESIDUAL | 0,129583 | 6 | 0,0215972 | | |
| TOTAL (CORRECTED) | 0,615556 | 11 | | | |

All F-ratios are based on the residual mean square error.

Pruebas de Múltiple Rango para la expresión de CYCD6 por Tratamiento.

Method: 95,0 percent LSD

| Tratamiento | Count | LS Mean | LS Sigma | Homogeneous Groups |
|-------------|-------|---------|----------|--------------------|
| Control | 4 | 0,13375 | 0,07348 | X |
| GA | 4 | 0,42625 | 0,07348 | X |
| BA | 4 | 0,43375 | 0,07348 | X |

| Contrast | Sig. | Difference | +/- Limits |
|--------------|------|------------|------------|
| BA - Control | * | 0,3 | 0,254275 |
| BA - GA | | 0,0075 | 0,254275 |
| Control - GA | * | -0,2925 | 0,254275 |

* denotes a statistically significant difference.

7.1.10 Análisis de la varianza y separación de medias para la expresión de CDKB2

Análisis de Varianza para la expresión de CDKB2 – Suma de Cuadrados Tipo III

| Source | Sum of Squares | Df | Mean Square | F-Ratio | P-Value |
|-------------------|----------------|----|-------------|---------|---------|
| MAIN EFFECTS | | | | | |
| A:Tratamiento | 1,23312 | 2 | 0,616558 | 18,57 | 0,0027 |
| B:Fecha | 0,142542 | 3 | 0,0475139 | 1,43 | 0,3234 |
| RESIDUAL | 0,199183 | 6 | 0,0331972 | | |
| TOTAL (CORRECTED) | 1,57484 | 11 | | | |

All F-ratios are based on the residual mean square error.

Pruebas de Múltiple Rango para la expresión de CDKB2 por Tratamiento.

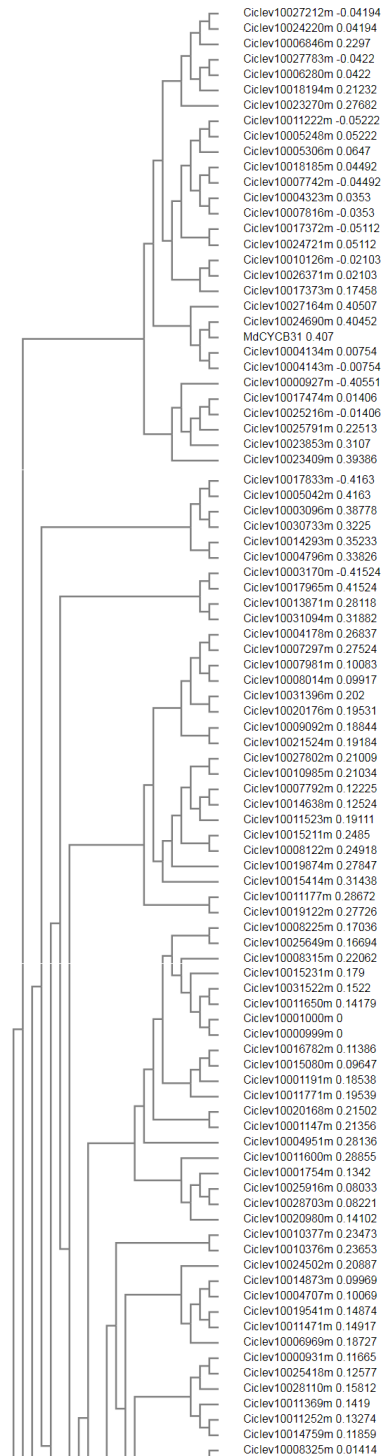
Method: 95,0 percent LSD

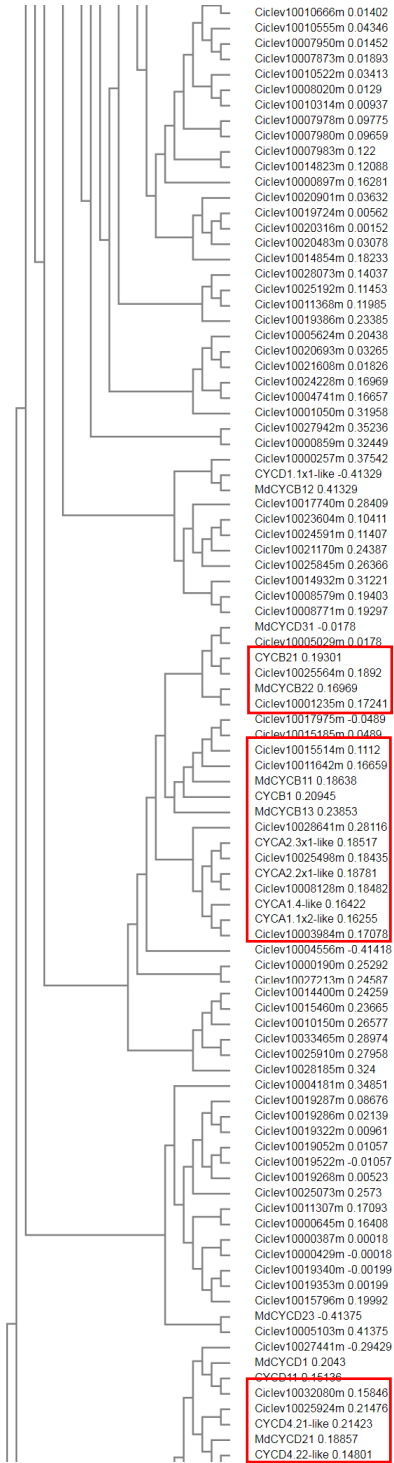
| Tratamiento | Count | LS Mean | LS Sigma | Homogeneous Groups |
|-------------|-------|---------|-----------|--------------------|
| Control | 4 | 0,3425 | 0,0911005 | X |
| GA | 4 | 1,02 | 0,0911005 | X |
| BA | 4 | 1,025 | 0,0911005 | X |

| Contrast | Sig. | Difference | +/- Limits |
|--------------|------|------------|------------|
| BA - Control | * | 0,6825 | 0,31525 |
| BA - GA | | 0,005 | 0,31525 |
| Control - GA | * | -0,6775 | 0,31525 |

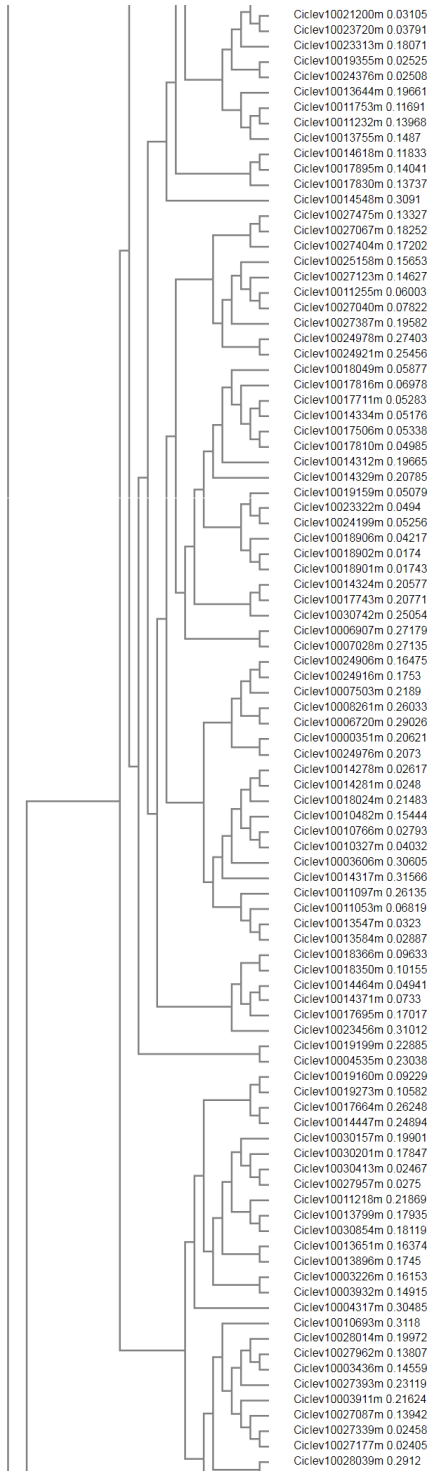
* denotes a statistically significant difference.

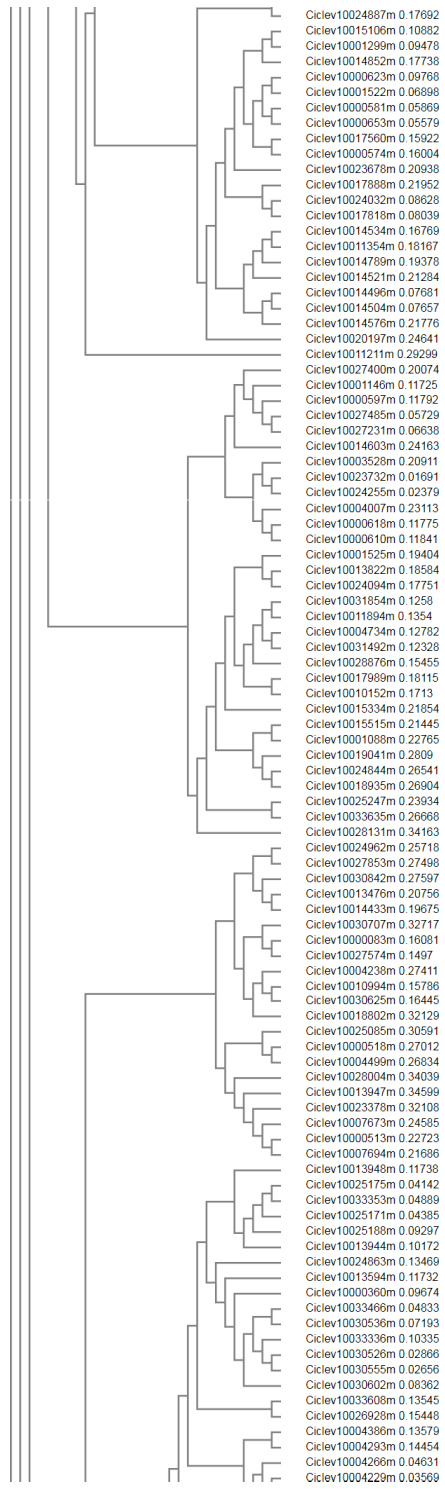
7.2 ÁRBOL FILOGENÉTICO EN *C.clementina*.

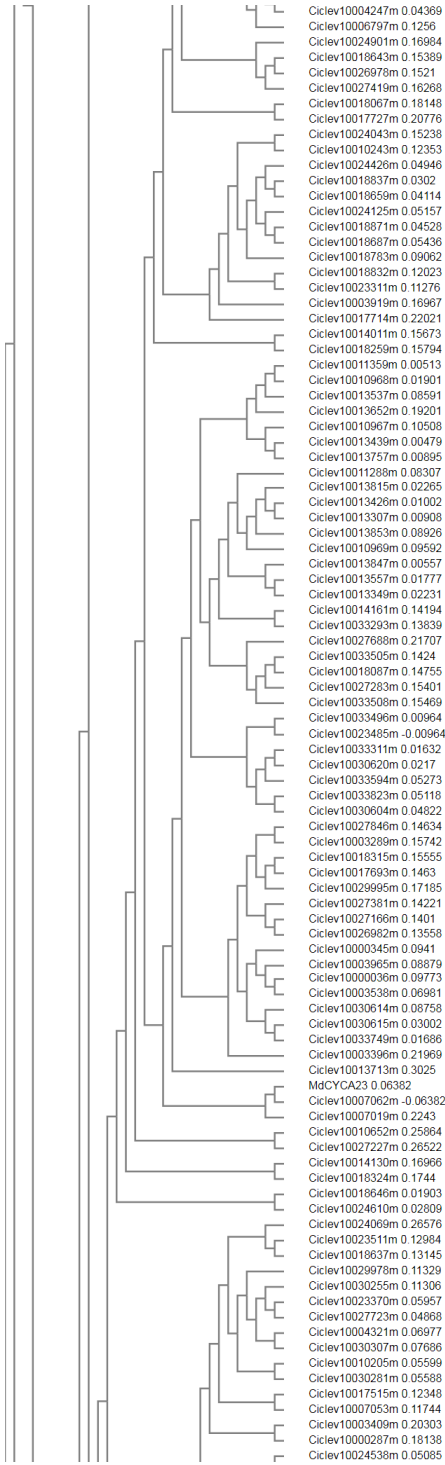


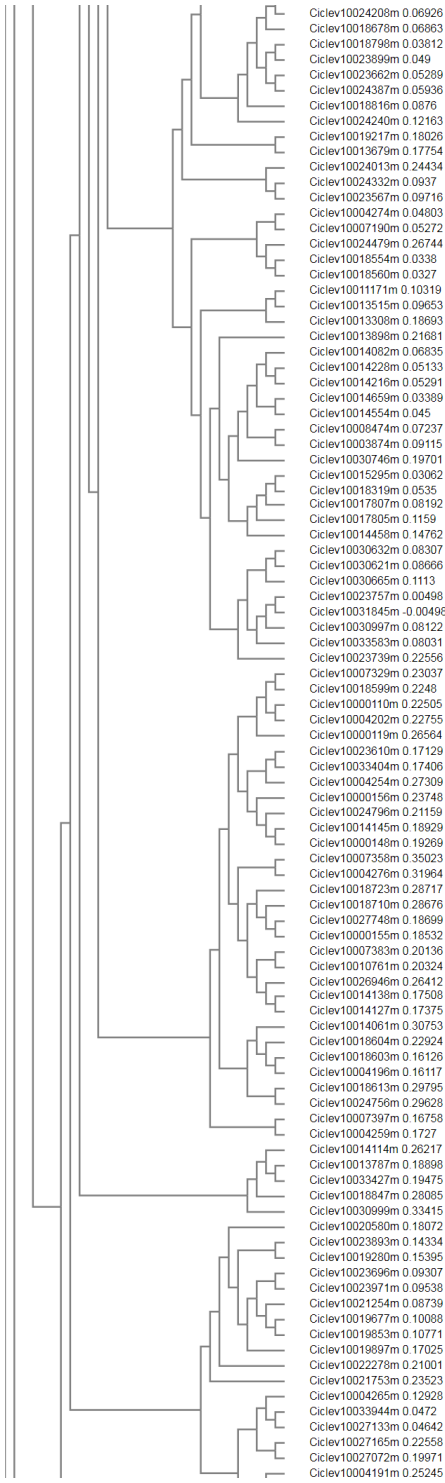


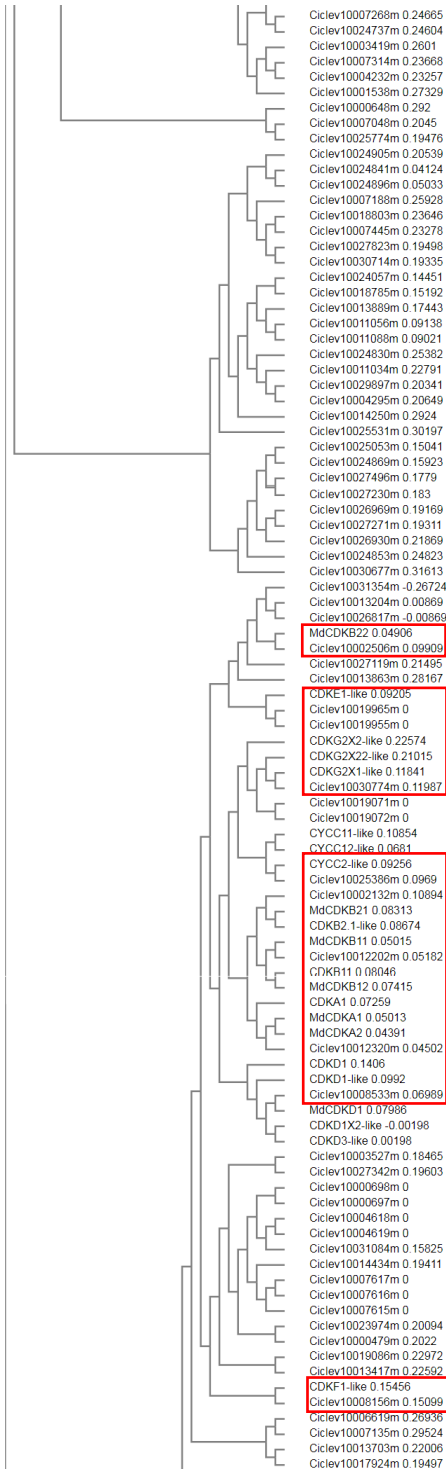


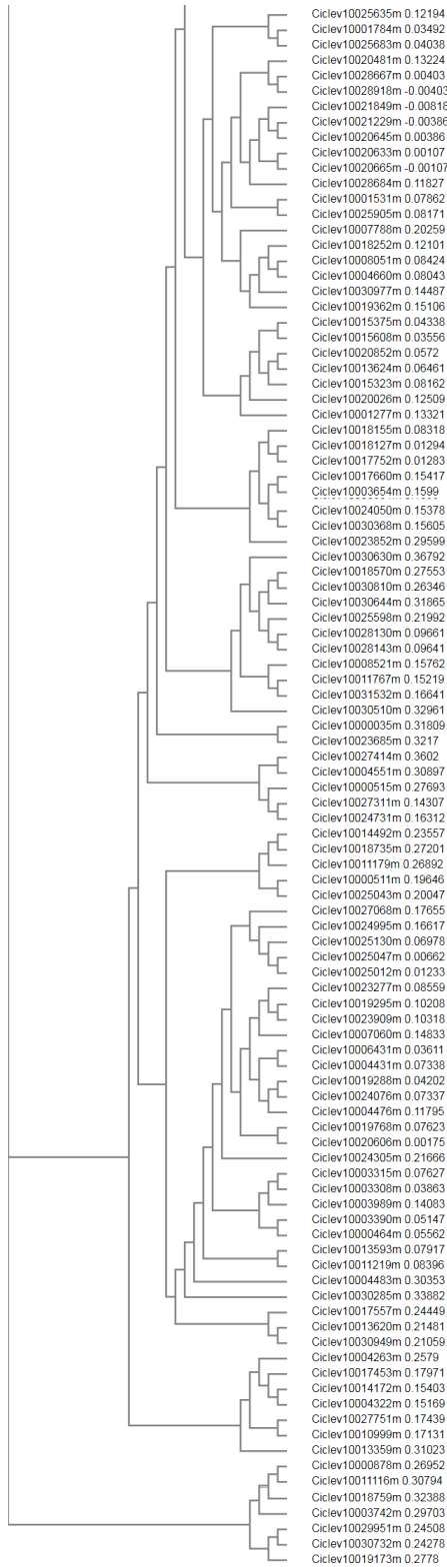












Las secuencias seleccionadas para el estudio son las siguientes:

| Código EST | Gen A. thaliana | QC (%) A. thaliana | Gen M.domestica | QC (%) M. domestica |
|-------------------------|---------------------------|--------------------|------------------------------------|---------------------|
| <u>Ciclev10025564m*</u> | CYCB2 | 97 | CYCB2/G2-mitotic specific cyclin 2 | 98/98 |
| Ciclev10001235m | CYCB2-4 | 97 | G2-mitotic specific cyclin 2 | 98 |
| Ciclev10015514m | CYCB1-4 | 97 | G2-mitotic specific cyclin S13-7 | 95 |
| Ciclev10011642m | CYCB1-2/3 | 97 | - | - |
| Ciclev10028641m | CYCA3-1 | 96 | CYCA3-1 | 97 |
| Ciclev10025498m | CYCA2-4 | 99 | CYCA2-2 | 98 |
| <u>Ciclev10008128m*</u> | CYCA2-1 | 99 | CYCA2-2 | 97 |
| <u>Ciclev10003984m*</u> | CYCA1-1 | 99 | CYCA1-1 | 99 |
| Ciclev10032080m | CYCD1-1 | 99 | CYCD1-1 | 99 |
| Ciclev10025924m | - | - | CYCD4-1 | 96 |
| Ciclev10001581m | - | - | CYCD2-1/4-1 | 99/99 |
| Ciclev10001416m | - | - | CYCD3-1/3-2 | 92/97 |
| Ciclev10028675m | CYCD3-2 | 96 | CYCD3-1/3-2 | 99/95 |
| Ciclev10025890m | CYCD3-2 | 94 | CYCD3-2 | 96 |
| Ciclev10026166m | CYCD1-1 (AI) | 94 | CYCD4-1 | 72 |
| Ciclev10028735m | - | - | CYCD4-1 | 98 |
| Ciclev10028938m | CYCD5-1 | 98 | CYCD5-1 | 98 |
| Ciclev10001544m | CYCA3-4 | 99 | CYCD3-1 | 99 |
| Ciclev10028938m | CYCB2 | 98 | CYCB2 | 99 |
| Ciclev10015968m* | CYCD6 | 94 | CYCD6-1 | 99 |
| Ciclev10002506m* | CDKB2 | 97 | CDKB2-2 | 97 |
| Ciclev10019965m | CDKE-1 | 95 | CDKE-1 | 89 |
| Ciclev10019955m | CDKE-1 | 95 | CDKC-1 | 89 |
| Ciclev10030774m | CDKG-2 | 99 | CDKG-2 | 99 |
| Ciclev10025386m | CDKC1 | 99 | CDKC2 | 99 |
| Ciclev10002132m | CDKB2 | 98 | CDKB2-2 | 98 |
| Ciclev10012202m | CDKB1-2 | 99 | Cell division control protein 2 | 99 |
| Ciclev10012320m | CDC protein 2 | 99 | CDC protein 2 | 99 |
| Ciclev10008533m | CDKD1-3/1-1 | 97/97 | CDKD3 | 99 |
| Ciclev10008156m | CDK activating kinase 1AT | 99 | CDKF-1 | 98 |

* Códigos EST seleccionados para el estudio de la expresión de genes.