

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

DEPARTAMENTOS DE ECOSISTEMAS
AGROFORESTALES Y PRODUCCIÓN VEGETAL



REGULACIÓN HORMONAL DEL CUAJADO DE LA MANDARINA ORRI

TRABAJO FIN DE MÁSTER

MÁSTER UNIVERSITARIO EN SANIDAD Y PRODUCCIÓN VEGETAL

ALUMNO: JUAN MARTÍNEZ COLLADO

TUTOR: CARLOS MESEJO CONEJOS

Curso Académico: 2018/2019

VALENCIA, Septiembre de 2019

REGULACIÓN HORMONAL DEL CUAJADO DE LA MANDARINA “ORRI”

RESUMEN

La mandarina “Orri” es una variedad estéril obtenida por irradiación de la mandarina Orah (*Temple x Dancy*) llevada a cabo por la Agricultural Research Organization (ARO) de Israel. “Orri” destaca por su época de maduración tardía y su calidad organoléptica. No obstante, la principal problemática de la variedad es su irregular producción.

El cuajado es la transición del ovario a fruto. El desarrollo inicial del ovario se lleva a cabo a través de la división celular en el pericarpo y la formación de las vesículas de zumo en el endocarpo. En los cítricos, el proceso está regulado hormonalmente, por las giberelinas, y nutricionalmente. Actualmente se desconoce si el motivo de la falta de producción de la mandarina “Orri” es debido a un cuajado deficiente, y, en su caso, a factores hormonales o nutricionales. En este TFM se estudia la regulación hormonal endógena y exógena del cuajado de la mandarina “Orri”.

Finalmente, los resultados indican que el bajo cuajado partenocárpico no es debido a factores hormonales, porque la mandarina “Orri” aumenta la expresión del gen *GA3ox1* en el ovario (es capaz de sintetizar GA₁) y las aplicaciones exógenas de fitohormonas tienen un efecto nulo en la producción final de la mandarina “Orri”, independientemente del patrón en el cual esté injertada.

Palabras clave: Cítricos; cuajado; mandarina; regulación hormonal

Alumno: D. Juan Martínez Collado

Tutor: D. Carlos Mesejo Conejos

Valencia, Septiembre de 2019

REGULACIÓ HORMONAL DEL QUALLAT EN LA MANDARINA "ORRI"

RESUM

La mandarina "Orri" és una varietat estèril obtinguda per irradiació de la mandarina Orah (Trempe x Dancy) duta a terme per l'Agricultural Research Organization (ARO) d'Israel. "Orri" destaca per la seua època de maduració tardana i la seua qualitat organolèptica. Això no obstant, la principal problemàtica de la varietat és la seua irregular producció.

El quallat és la transició de l'ovari a fruit. El desenvolupament inicial de l'ovari es porta a terme a través de la divisió cel·lular en el pericarp i la formació de les vesícules de suc a l'endocarp. En els cítrics, el procés està regulat hormonalment, per les gibberel·lines, i nutricionalment. Actualment es desconeix si el motiu de la manca de producció de la mandarina "Orri" és causa d'un quallat deficient, i, si s'escau, a factors hormonals o nutricionals. En aquest TFM s'estudia la regulació hormonal endògena i exògena del quallat de la mandarina "Orri".

Finalment, els resultats indiquen que el baix quallat partenocàrpic no és causa de factors hormonals, perquè la mandarina "Orri" augmenta l'expressió del gen *GA3ox1* a l'ovari (és capaç de sintetitzar GA_1) i les aplicacions exògenes de fitohormones tenen un efecte nul en la producció final de la mandarina "Orri", independentment del patró en el qual estiga empeltada.

Paraules clau: cítrics; quallat; regulació hormonal.

Alumne: D. Juan Martínez Collado

Tutor: D. Carlos Mesejo Conejos

València, Setembre de 2019

HORMONAL REGULATION OF FRUIT SET IN THE “ORRI” MANDARIN

ABSTRACT

The “Orri” mandarin is a sterile variety obtained by irradiation of the Orah mandarin (Temple x Dancy) in the Agricultural Research Organization (ARO) of Israel. “Orri” is distinguished because its late ripening and its organoleptic quality. However, the main problem of the variety is its irregular production.

Fruit set is the transition from ovary to fruit. The initial development of the ovary is carried out through cell division in the pericarp and the formation of the juice vesicles in the endocarp. In citrus, the process is regulated hormonally, by gibberellins, and nutritionally. Nowadays it is currently unknown if the reason for the lack of production of the “Orri” mandarin is due to a poor fruit setting provoked by hormonal or nutritional deficiencies. In this TFM the endogenous and exogenous hormonal regulation of the mandarin “Orri” fruit set is studied.

Finally, the results indicate that the low parthenocarpic set fruit is not due to hormonal factors, because the “Orri” mandarin increases the expression of the GA3ox1 gene in the ovary (it is able of synthesizing GA₁) and the exogenous applications of phytohormones have a null effect on the final production of the “Orri” mandarin, regardless of the pattern in which it is grafted.

Keywords: Citrus; fruit set; mandarin; hormonal regulation.

Student: Mr. Juan Martínez Collado

Tutor: Mr. Carlos Mesejo Conejos

Valencia, September 2019

AGRADECIMIENTOS

A Carlos, por su gran paciencia conmigo durante todo este tiempo y su gran dedicación por este tema, además de enseñarme a ver el mundo de la agronomía desde otra perspectiva.

A Amparo, por su simpatía constante y su ayuda a elaborar este trabajo.

A mis amigos y sobre todo a mi pareja, por todo el apoyo ofrecido en el camino.

Y especialmente a mi familia, la clave fundamental de todo esto, sin ellos este trabajo ni si quiera existiría.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 LA MANDARINA “ORRI”	1
1.2 EL CUAJADO EN LOS CÍTRICOS	3
1.2.1 La división celular	4
1.2.2 Factores hormonales.....	5
1.2.3 Factores nutricionales	6
1.3 TÉCNICAS DE CONTROL DEL CUAJADO	7
1.3.1 Aplicación de GA ₃	7
1.3.2 Rayado de ramas	7
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	10
3. MATERIAL Y MÉTODOS	12
3.1 MATERIAL VEGETAL Y DISEÑO EXPERIMENTAL	12
3.2 MÉTODOS DE ANÁLISIS DEL MATERIAL VEGETAL	13
3.2.1 Peso del ovario	13
3.2.2 Expresión génica de <i>GA3ox1</i> , <i>CYCB2</i> y <i>CDKB2</i> mediante RT-PCR.....	13
3.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	16
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
4.1 DESARROLLO PARTENOCÁRPICO DE LA MANDARINA “ORRI”	18
4.2. EFECTO DE LA APLICACIÓN DE GA ₃ Y 6-BA.	20
4.2.1. Efecto de los tratamientos en la expresión génica	21
4.2.2. Efecto de los tratamientos en la producción.	23
5. CONCLUSIONES	27
6. BIBLIOGRAFIA	28

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Distribución del cultivo de la mandarina “Orri” en España. Fuente: www.orcspain.es (2019). 2
- Figura 2.** Evolución de la tasa de crecimiento (g d^{-1}) del ovario de las variedades “Orri”, “Clemenules” y “Marisol”. Cada valor es el promedio de la diferencia de peso entre 2 fechas de muestras de 8 flores tomadas al azar en cada fecha. Valores correspondientes a las primaveras de 2019 (“Orri”, Clemenules y Marisol) y 2018 (“Orri”). 19
- Figura 3.** Evolución del peso fresco (g) del ovario de las variedades “Orri”, “Clemenules” y “Marisol”. Cada valor es el promedio del peso individual del ovario de 8 flores muestreadas al azar en cada fecha. Valores correspondientes a las primaveras de 2018 y 2019..... 19
- Figura 4.** Evolución de la expresión relativa del gen CYCB2 en el ovario de las variedades de mandarina “Orri” (en color negro) y “Clemenules” (en color rojo). Cada valor es la media de 3 réplicas biológicas formadas por 3-4 frutos cada una. La barra vertical azul indica la mínima diferencia significativa (LSD). 20
- Figura 5.** Cuajado final de flores campaneras de las variedades “Orri”, “Clemenules” y “Marisol”. Cada valor es el promedio de 10 ramas, con un mínimo de 8 flores por rama. Valores correspondientes a la primavera de 2019. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas. 20
- Figura 6.** Evolución de la expresión relativa del gen GA3ox1 en los ovarios de la variedad “Orri”. Efecto de la aplicación de GA₃, 6-BA y GA₃+6BA. Cada valor es la media de 3 réplicas biológicas. La línea roja corresponde a la fecha en el que se aplicaron los tratamientos, 30 de abril. No se encontraron diferencias significativas por efecto de los tratamientos. 22
- Figura 7.** Evolución de la expresión relativa del gen CYCB2 en los ovarios de la variedad “Orri”. Efecto de la aplicación de GA₃, 6-BA y GA₃+6BA. Cada valor es la media de 3 réplicas biológicas. La línea roja corresponde a la fecha en el que se aplicaron los tratamientos, 30 de abril. No se encontraron diferencias significativas por efecto de los tratamientos. 23

Figura 8. Evolución de la expresión relativa del gen CDKB2 en los ovarios de la variedad “Orri”. Efecto de la aplicación de GA₃, 6-BA y GA₃+6BA. Cada valor es la media de 3 réplicas biológicas. La línea roja corresponde a la fecha en el que se aplicaron los tratamientos, 30 de abril. No se encontraron diferencias significativas por efecto de los tratamientos. 23

Figura 9. Comparativa del número de frutos obtenidos por árbol entre ambas fincas. Situándose la finca 1 a la izquierda (Figura 11.1) y la finca 2 a la derecha (Figura 11.2). Cada valor es el promedio de 5 árboles (10 árboles por tratamiento) en el caso de la finca 1, y de 12 árboles en el caso de la finca 2. No se encontraron diferencias significativas por efecto de los tratamientos 25

Figura 10. Comparativa de las cajas de kilogramos por árbol entre ambas fincas. Situándose la finca 1 a la izquierda (Figura 9.1) y la finca 2 a la derecha (Figura 9.2). Cada valor es el promedio de 5 árboles (10 árboles por tratamiento) en el caso de la finca 1, y de 12 árboles en el caso de la finca 2. No se encontraron diferencias significativas por efecto de los tratamientos. 25

Figura 11. Comparativa del peso por fruto obtenido entre ambas fincas. Situándose la finca 1 a la izquierda (Figura 10.1) y la finca 2 a la derecha (Figura 10.2). Cada valor es el promedio de 5 árboles (10 árboles por tratamiento) en el caso de la finca 1, y de 12 árboles en el caso de la finca 2. No se encontraron diferencias significativas por efecto de los tratamientos..... 25

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Listado y descripción de los oligonucleótidos utilizados en la PCR, en sus formas forward y reverse.....	16
--	----

1. INTRODUCCIÓN

1.1 LA MANDARINA “ORRI”

El cultivo de los cítricos es uno de los que muestra un mayor crecimiento e importancia a nivel mundial. Su producción se ha visto incrementada en los últimos años, llegando a alcanzar en 2015 la producción de 130,9 millones de toneladas, de las cuales 15,6 millones se dedicaron a la exportación (FAO, 2018).

España fue el primer productor y exportador de la región mediterránea ese mismo año, con 6,1 millones de toneladas y 3,6 millones de toneladas, respectivamente. En términos relativos, un 51,75% fue naranjo dulce, un 33,86% fue mandarino, un 12,90% fue limonero, un 1,25% fue pomelo, un 0,18% fue naranjo amargo y también se produjo un 0,06% de otros cítricos (MAPA, 2015).

El 60% de la producción española se localiza en la Comunidad Valenciana, que dedica, aproximadamente, 182.000 Ha a su cultivo. Más del 50% de los frutos se exportan con elevados estándares de calidad destinados al consumo en fresco. (IVIA, 2018).

En los últimos años, la producción de mandarinas ha incrementado significativamente, pasando de una producción total mundial de 22 millones de toneladas en 2010 a 29 millones de toneladas en 2015 (USDA, 2016). La mayor parte de esta producción también se dedica a la exportación para el consumo en fresco de frutos de elevada calidad. Los factores que más condicionan la calidad del fruto para ser más atractivo en el mercado internacional se pueden resumir en 1) la facilidad de pelado, 2) el color, 3) el calibre, 4) la cantidad de semillas presentes en sus gajos y 5) su calidad organoléptica (Goldenberg, 2018).

Desde el punto de vista comercial, se considera que una variedad no posee semillas si cumple el criterio de no tener más de cuatro semillas cada 100 mandarinas y que ninguna de ellas presente más de dos semillas (Goldenberg et al., 2018).

La mayor parte de las variedades cultivadas en España son partenocárpicas. Entre las más importantes se encuentran las naranjas “Navelina”, “Lane Late” y “Valencia Late”, o las mandarinas “Clemenules”, “Nova” y “Nadorcott”. Mientras las naranjas presentan partenocarpia autónoma por la esterilidad del polen y los óvulos, las mandarinas presentan partenocarpia facultativa (Mesejo et al., 2013). Su esterilidad homogenética permite que los frutos no tengan semillas cuando se cultivan aislados. Sin embargo, las mandarinas clementinas y los híbridos presentan un alto grado de compatibilidad de cruce. Por ello, a finales del S.XX, los planes de mejora genética de variedades de cítricos incluyeron, en todo el mundo, la obtención

de variedades estériles. El método que ha obtenido más resultados comerciales ha sido la irradiación de yemas mediante rayos gamma. La técnica implica la mutación mediante diferentes dosis de radiación, creando una modificación aleatoria en los cromosomas, lo que permite generar un amplio rango de mutaciones (Schneider et al., 2009). No obstante, estas deleciones y translocaciones en el ADN causadas por la irradiación con los rayos gamma resultan en una disminución de la fertilidad de la nueva planta, debido a la alta frecuencia de aborto que presentan el polen o el óvulo de los genotipos obtenidos. Además, se ha comprobado recientemente que la reducción del número de semillas mediante esta técnica mutagénica no afecta de una forma muy notable a la calidad organoléptica del fruto, pero estos frutos sin semillas de alguna forma resultan finalmente con un calibre inferior que a los originales sin tratar (Goldenberg et al., 2018).

La mandarina “Orri” una variedad estéril obtenida por irradiación de la mandarina Orah [Temple (*Citrus temple* hort. ex Y.Tanaka) x Dancy (*Citrus tangerina* hort. ex Tanaka)]. El fruto es de color naranja intenso y de gran valor comercial, en la actualidad, debido a su recolección tardía y a sus buenas propiedades organolépticas. En España es una variedad *de club*, es decir, que su producción está limitada a un número determinado de hectáreas. Se cultiva en gran parte de la Comunidad Valenciana, Murcia y Huelva (Figura 1). En 2019, la producción en España se ha situado alrededor de 52,1 millones de kilos de mandarina “Orri”, de las que aproximadamente el 23,63% corresponde a la provincia de Valencia, el 31,70% pertenece a la provincia de Huelva, el 13,57% a la de Murcia, el 10,98% a Castellón, un 9,94% a la de Almería, un 5,68% a la de Alicante y el 4,5% a la provincia de Sevilla. Teniendo en cuenta que existen 908.000 árboles plantados, corresponde a unos 55 kg/árbol, aproximadamente.



Figura 1. Distribución del cultivo de la mandarina “Orri” en España. Fuente: www.orcspain.es (2019).

La principal problemática de esta variedad es la baja producción que presenta con bastante frecuencia, en ocasiones inferior a 50 kg árbol⁻¹ (Schneider et al., 2009). Tanto es así que en Israel se ha evaluado la polinización cruzada con la mandarina “Michal” como técnica para aumentar la producción (Schneider et al., 2009). Con ello se aumenta la productividad en algo más de 10 toneladas por hectárea. Sin embargo, también causa un aumento significativo de semillas en el fruto debido al polen fértil de la variedad “Michal” y, por tanto, una depreciación económica.

1.2 EL CUAJADO EN LOS CÍTRICOS

El cuajado es la transición de la flor a fruto en desarrollo. En las variedades con semillas, la fecundación del óvulo por el tubo polínico es el estímulo que lo permite. Dicho estímulo permite la reiniciación del crecimiento del ovario detenido durante la antesis, y está regulado por una serie de factores, fundamentalmente endógenos. Si dicho crecimiento no se reinicia o una vez reiniciado cesa, el ovario se desprende y, por tanto, no cuaja. Tras la fecundación, la síntesis de auxinas durante el desarrollo del embrión estimula la síntesis de giberelinas y la capacidad sumidero del ovario, que aumenta la tasa mitótica en todos sus tejidos dando el fruto como resultado final (Bermejo et al, 2015).

Sin embargo, la mayor parte de las variedades actualmente cultivadas para consumo en fresco no poseen semillas; son, por tanto, variedades capaces de desarrollar frutos sin el estímulo atribuido a éstas. Es decir, no se puede concluir que la regulación del crecimiento del ovario esté asumida exclusivamente por las semillas. Es en estas condiciones cuando las paredes del ovario, que posteriormente darán lugar a la corteza del fruto, asumen el papel de estimulador del crecimiento como sintetizadores o receptores de los factores reguladores de éste (Agustí, 2003).

El desarrollo de un fruto sin semillas, es decir, sin fecundación previa de los óvulos, recibe el nombre de partenocarpia. La esterilidad gamética y la incompatibilidad homocigótica contribuyen notablemente a la formación de frutos sin semillas y son regulados por factores genéticos y ambientales. La fase I del desarrollo abarca desde la antesis hasta el final de la caída fisiológica de los frutos, y se caracteriza por un rápido crecimiento del fruto provocado por la división celular, con el consiguiente aumento del número de células de todos sus tejidos en desarrollo, excepto del eje central.

El aumento en el tamaño del fruto es debido, principalmente, al crecimiento de la corteza. Por un lado, el volumen del exocarpo aumenta por la división de sus células; por otro, hay un aumento de volumen en el mesocarpo por engrosamiento de sus paredes celulares y un aumento del tejido vascular. Este tejido vascular no tiene conexión con la pulpa en desarrollo (Agustí, 2003).

Además del crecimiento de la corteza, al inicio de este período hay un aumento en el volumen del endocarpo, debido principalmente a la división celular en los septos y en las paredes tangenciales de los lóculos. Al final de este período, los lóculos aumentan de tamaño por engrosamiento de las células centrales de los septos y por la elongación de las células tangenciales. Asimismo, de las células situadas en la cara más interna de las paredes tangenciales de los lóculos se forman los primordios de las vesículas de zumo. Éstas crecen hacia el interior de los lóculos, y al final de este período los ocupan por completo. A través de un pedúnculo muy fino y más o menos largo se llenan de zumo, durante la fase II del desarrollo, y nunca pierden el contacto con las paredes del lóculo de las que se originan (Agustí, 2003).

Por último, la caída fisiológica de frutos viene dada por la alta competencia en carbohidratos entre los frutos en desarrollo. Los primeros ovarios en caer son aquellos que no sean capaces de mantener un elevado ritmo de crecimiento, caracterizado por la tasa de división celular.

1.2.1 La división celular

El desarrollo del ovario durante el cuajado consiste en una sucesión de ciclos celulares que comprenden el periodo desde el nacimiento de una célula hasta su división, y se pueden dividir en dos partes: la interfase y la mitosis (fase M o mitótica). En la mitosis se da lugar a la separación de los cromosomas y la división (citoquinesis) de la célula, dando lugar a dos células hijas idénticas. Por otra parte, en la interfase sucede la síntesis del ADN y se pueden distinguir varias fases: fase G₁ o fase de pre-síntesis del ADN; fase S o fase de síntesis del ADN y la fase G₂ o fase post-síntesis (Cooper, 2000). En el ciclo celular hay, al menos, dos puntos de control. El primero determina el inicio de una nueva replicación del ADN o el abandono del ciclo, y está situado entre las fases G₁ y S. Por otro lado, el segundo determina si las células entran o no en mitosis y se sitúa entre las fases G₂ y M (Segura, 2008).

En la regulación de los puntos de control participan activamente las ciclinas (CYCs), que son proteínas que se sintetizan durante el ciclo celular. Además de ellas, están también involucradas las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs). Las CYCs, al unirse específicamente

con la quinasa correspondiente la activan, provocando la fosforilación de un gran número de factores relacionados con el ciclo celular, lo que regula las transiciones de fase de la célula. Las CYCs más importantes son CYCA, CYCB y CYCD, mientras que las CDKs más importantes son CDKA y CDKB (Segura, 2008).

El mecanismo de acción de estas proteínas comienza en la transición de las fases G_1/S , iniciándose con la síntesis de CYCD, que al unirse a CDKA y activar el complejo ciclasa-quinasa, promueven la fosforilación y activación de genes específicos para dar lugar a la fase S. En ésta, la CYCD es relevada por la CYCA, y degradada a través de la ruta ubiquitina-proteosoma. Posteriormente, tras la fase S de replicación de ADN, da comienzo la transición entre las fases G_2/M , que regulan CYCB y su correspondiente quinasa específica CDKB. Los complejos CYCA-CDKA y CYCB-CDKB llevan, finalmente, a la célula a la fase M, y, tras ello, son degradados una vez se ha ejecutado el mecanismo de la mitosis (Inzé y De Veylder, 2006). En los cítricos, la capacidad de desarrollo partenocárpico del ovario se ha relacionado con la expresión de los genes CYC y CDK (Mesejo et al., 2016).

1.2.2 Factores hormonales

El ciclo celular también está regulado por las hormonas, que tienen la capacidad de determinar en qué momento y dónde suceden las divisiones celulares. Durante la fase G_1 , la entrada a la fase S es posible mediante la activación de CYCD y su unidad catalítica CDKA, cuya expresión está promovida, a nivel general, por las giberelinas, las auxinas y las citoquininas. Posteriormente durante la fase G_2 , las giberelinas, las auxinas y las citoquininas promueven la expresión de CYCA y CYCB que se unen a sus correspondiente quinastas (CDKA y CDKB) dando lugar a la fase M y finalizando el ciclo celular (Segura, 2008).

En particular, en los cítricos, las giberelinas (GAs) son activos promotores de la división celular y, por tanto, del crecimiento. En las variedades sin semillas, existen niveles suficientes de GAs para iniciar y completar satisfactoriamente el crecimiento. En éstos son las paredes del ovario las que asumen el papel de órgano de síntesis hormonal. En esta síntesis, la expresión de los genes *GA20ox2*, *GA3ox1* y *GA2ox1* se relaciona con el contenido de GA_1 . La enzima *GA20ox2* regula la mayor parte de las reacciones de la ruta de síntesis de GAs; en la vía de 13-hidrooxidación, la GA_{20} es metabolizada a GA_1 por la acción de la GA_3 -oxidasa. No obstante, la GA_1 puede ser inhibida por la acción de la GA_2 -oxidasa (Bermejo et al, 2018).

Las auxinas promueven la activación del metabolismo de las GAs en el óvulo, potenciando la expresión de los genes de síntesis de GAs, y disminuyendo su catabolismo, siendo

finalmente el contenido de GA₁ endógeno que se desarrolla en el ovario el factor limitante para el desarrollo del fruto. (Bermejo et al., 2015).

Las citoquininas, al igual que las GAs, incrementan su concentración en el ovario durante la antesis, incrementando la capacidad sumidero del ovario y activando hacia él el transporte de elementos minerales y carbohidratos (Agustí, 2003). No obstante, parece que su actividad es constitutiva y no está completamente ligada a la polinización o a la fecundación de los óvulos (Bermejo et al., 2015).

Por último y en contraposición a las hormonas mencionadas anteriormente, podemos encontrar el ácido abscísico (ABA), el cual presenta una potente acción como inhibidor del desarrollo y activador de la abscisión. En condiciones normales, la concentración de ABA en los ovarios se incrementa durante la caída de pétalos y en el momento de la transición de la fase de división celular (fase I) a la de elongación celular (fase II), como ya hemos comentado anteriormente, produciendo con este incremento una caída masiva de ovarios.

1.2.3 Factores nutricionales

En el periodo comprendido entre la floración y el crecimiento de los frutos existe una fuerte competencia por los metabolitos presentes en la planta, y esta competencia es más intensa cuanto mayor es la cantidad de flores y frutos que se desarrollan. Los árboles con alta intensidad de floración no son capaces de sustentar nutricionalmente todas las estructuras reproductivas en crecimiento, por lo que se desencadenan procesos de abscisión para adaptar la capacidad del árbol para nutrir a los frutos que han iniciado su desarrollo (Agustí et al., 1982).

Durante el periodo de abscisión fisiológica se ha correlacionado la capacidad de cuajado de los cítricos con su tasa de crecimiento (Ruiz y Guardiola, 1994). Por tanto, el suministro de carbohidratos al fruto en desarrollo es fundamental para su supervivencia, debido a que el crecimiento inicial es producido en base a la división celular y, por tanto, éste es altamente demandante de energía. Es más, el mayor porcentaje de cuajado y crecimiento observado en los frutos de inflorescencias con hojas se atribuye al aporte de azúcares por parte de éstas a través del proceso fotosintético, y éste es más activo cuanto mayor es la demanda energética (Rivas et al., 2007). En este proceso, la sacarosa se transporta hacia las células de tejidos en crecimiento y, tras su hidrólisis, se utiliza como fuente primaria de energía (Quick y Schaffer, 1996). Por lo tanto, la supervivencia de un mayor número de frutos durante la fase inicial de crecimiento se puede incrementar aumentando la disponibilidad de azúcares. La técnica que lo permite es el rayado de ramas, que posee una alta eficacia incrementando la producción en los cítricos (Rivas et al, 2007).

1.3 TÉCNICAS DE CONTROL DEL CUAJADO

1.3.1 Aplicación de GA₃

La mejor época para realizar la aplicación de giberelinas (GAs) en los cítricos es cuando prácticamente la totalidad de las flores del árbol han perdido los pétalos (Agustí, 2003), debido a que es el momento en el que el ovario debe incrementar su tasa de crecimiento para cuajar. La elevada competencia por carbohidratos que se establece genera un gran gasto energético en la planta, que ajusta la cantidad de frutos que puede nutrir durante la caída fisiológica (Goldschmidt, 1999; Bustan y Goldschmidt, 1998).

En las aplicaciones hormonales, la dosis de aplicación es factor muy importante. En el caso del cuajado en los cítricos los mejores resultados para mejorar la cosecha se obtienen a una concentración de 5 mg l⁻¹. Un aumento de la concentración a 10 mg l⁻¹ o más puede resultar en un descenso del tamaño del fruto (Agusti et al., 1982).

Esta aplicación no consigue mejorar el cuajado inicial de todas las variedades. Los frutos genéticamente partenocárpicos contienen, en general, niveles suficientes de GAs para iniciar y completar satisfactoriamente su crecimiento. En éstos son las paredes del ovario las que asumen el papel de órgano de síntesis hormonal, de modo que en estas variedades las aplicaciones exógenas de GAs no incrementan el cuajado y el desarrollo del fruto, como es el caso de las mandarinas Satsumas, la mayor parte de naranjas dulces, y mandarinas híbridas. Algunas variedades de mandarina Clementina, "Marisol" o "Hernandina", también son insensibles al tratamiento (Agustí, 2003). Finalmente, la intensidad de floración también es un factor limitante de la aplicación (Agustí, 2003).

1.3.2 Rayado de ramas

El rayado de ramas consiste en la interrupción, por medios mecánicos, del transporte floemático. Con ello, se reduce el vigor y se favorece la fructificación. El mecanismo de acción del rayado se basa en la acumulación de carbohidratos en la parte del árbol por encima de la zona de rayado. La razón de ello se basa en la interrupción, temporal, del transporte floemático como consecuencia del corte practicado, teniendo como efecto, que los órganos situados en la zona superior incrementan sus posibilidades de captar carbohidratos, debido a que el transporte basípeto de carbohidratos se lleva a cabo por el floema (Agustí, 2003).

Además de incrementar el contenido en carbohidratos de la parte aérea, posee un efecto hormonal y, por tanto, provoca un incremento significativo en el cuajado de los cítricos, como consecuencia del incremento en los niveles de giberelinas (Mehouachi et al., 2000). A ello debe añadirse el incremento de la actividad fotosintética que induce en las hojas jóvenes próximas al fruto y que, posiblemente, responda a los estímulos hormonales (Rivas et al., 2007).

Por otra parte, el rayado retarda y reduce la abscisión durante la primera fase del crecimiento de los frutos, debido a que reduce la concentración de ácido abscísico (ABA) (Rivas et al., 2006). A diferencia de la aplicación de GAs, el rayado tiene un efecto general en las variedades de cítricos, aunque la intensidad de floración también limita su eficacia.

Por tanto, de acuerdo con lo expuesto, la disponibilidad de carbohidratos y el contenido hormonal, que determina la capacidad sumidero del ovario, constituyen los factores decisivos del desarrollo del fruto y, por tanto, de la producción. Bajo un punto de vista agronómico, solo existen cuatro combinaciones posibles de su relación, combinando las técnicas descritas: aplicación de GA₃, para aumentar la capacidad sumidero del ovario, y rayado de ramas, para mejorar su disponibilidad de carbohidratos (Agustí, 2003).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Con la finalidad de mejorar la cosecha de la mandarina “Orri” se plantea la siguiente hipótesis:

La mandarina “Orri” presenta un déficit de síntesis de GAs que se traduce en una escasa tasa de división celular, crecimiento del ovario y cuajado.

Para confirmar o rechazar la hipótesis, los objetivos de este trabajo son:

1. Determinar la capacidad de síntesis de GA_1 a partir de la expresión del gen *GA3ox1*.
2. Determinar la tasa de división celular, a partir de la expresión de los genes *CYCB2* y *CDKB2*, y desarrollo del ovario, en comparación con otras variedades de cítricos.
3. Determinar el efecto de la aplicación de ácido giberélico (GA_3) y 6-benciladenina (6-BA) en la capacidad de desarrollo de la mandarina “Orri” y la cosecha.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL Y DISEÑO EXPERIMENTAL

El estudio se realizó en 2 fincas comerciales de mandarina “Orri” [Temple (*Citrus temple* hort. ex Y. Tanaka) x Dancy (*Citrus tangerina* hort. ex Tanaka)] situadas en Torrente (Valencia, España) y Gibraleón (Huelva, España). En la primera finca se utilizaron 45 árboles adultos injertados alternamente en los patrones citrange ‘Carrizo’ (*Citrus sinensis* (L.) Osb. X *Poncirus trifoliata* (L.) Raf) y *Citrus volkameriana* (Ten. & Pasq.). En la segunda finca se utilizaron 24 árboles injertados sobre patrón Citrumelo CPB 4475 (*Poncirus trifoliata* x *Citrus paradisi*).

Además, para comparar la tasa de crecimiento del ovario de “Orri” con dos variedades de capacidad partenocárpica conocida, se seleccionaron 5 árboles de mandarina clementina “Marisol” (*Citrus clementina* hort. ex. Tan.) (alta capacidad partenocárpica) y 5 árboles de mandarina clementina “Clemenules” (baja capacidad partenocárpica), todos ellos injertados sobre patrón c. Carrizo en la finca de Torrente.

Todos los árboles seleccionados estaban en perfectas condiciones nutricionales y sanitarias, el suelo era franco-arcilloso (Torrente) o arenoso (Gibraleón), con riego por goteo, dosis de abonado y riego según las necesidades del cultivo y bajo la normativa de producción integrada.

Para determinar la capacidad de desarrollo del ovario y la síntesis de GAs, se recogieron los ovarios de un total de 500 flores campaneras de “Orri” (con patrón c. Carrizo), “Marisol” y “Clemenules”, en 10 muestreos con una frecuencia semanal, distribuidas en los 5 árboles seleccionados y muestreando 10 flores por árbol y día. El primer muestreo tuvo lugar en abril, con las flores cerradas en estado de preantesis (estadio fenológico 59 de la escala BBCH). El último muestreo tuvo lugar en junio, estadio fenológico 72 de la escala BBCH, al final de la caída fisiológica de frutos. El muestreo de flores de “Orri” se realizó en las primaveras 2018 y 2019.

El efecto de la aplicación de GA₃ y 6-BA se determinó en 40 y 24 árboles de “Orri” en las fincas de Torrente y Gibraleón, respectivamente. En la finca de Torrente se realizaron 4 tratamientos (T1-T4), mientras que en Gibraleón se hicieron 2 (T1 y T2). Cada tratamiento se realizó en 10 árboles en la finca de Torrente, y 12 árboles en la finca de Gibraleón. Los tratamientos realizados fueron:

T1. Control.

T2. Ácido giberélico (GA₃ 10 mg l⁻¹; Semefil SL 1,6%, Nufarm).

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

T4. GA₃ + 6-BA.

La aplicación se realizó el 30 de abril de 2018 (estadio fenológico de caída de pétalos) mediante tanque a presión, con un consumo promedio de 7 litros por árbol y añadiendo un mojante no iónico a la concentración de 0,05%. Para determinar el efecto de los tratamientos sobre el desarrollo partenocárpico del ovario se seleccionaron 400 ovarios de flores campaneras durante 10 muestreos, recolectando 10 ovarios por árbol, en un total de 4 árboles tratados. En febrero de 2019 se evaluó el efecto de los tratamientos sobre la cosecha.

3.2 MÉTODOS DE ANÁLISIS DEL MATERIAL VEGETAL

3.2.1 Peso del ovario

Las flores muestreadas se transportaron en una nevera al laboratorio e, inmediatamente, se procesaron. En cada muestreo, el ovario se separó del resto de tejidos de la flor, y se determinó el peso fresco individual mediante una balanza analítica de precisión (Sartorius Basic, modelo B 120S) con un error de 0,0001 gramos. Posteriormente se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C para el posterior estudio de expresión génica.

3.2.2 Expresión génica de *GA3ox1*, *CYCB2* y *CDKB2* mediante RT-PCR

Para determinar la capacidad de síntesis de GA₁ en el ovario se seleccionó el gen *GA3ox1*, que cataliza la conversión de GA₂₀ en GA₁ (Davies, 2010) y cuya expresión se ha relacionado con la capacidad partenocárpica del ovario en los cítricos (Mesejo et al., 2016). El estudio de la tasa de división celular se realizó, indirectamente, a través de la cuantificación de la expresión de los genes *CYCB2* y *CDKB2*. La expresión de estos 2 genes correlaciona con el número de células formadas durante el desarrollo inicial del ovario (Garcés, 2018), al participar en la fase de transición G2/M (Segura, 2008).

3.2.2.1 Extracción del RNA

Las muestras se trituraron en un mortero, utilizando nitrógeno líquido para evitar la descongelación, hasta llegar a obtener un polvo muy fino. Posteriormente, las muestras dispuestas en tubos Falcon se almacenaron a una temperatura de -80°C hasta su posterior uso.

3.2.2.2 Purificación del RNA

Para la purificación del RNA se extrajo 0,5 g de cada muestra en un tubo Eppendorf de 30 ml, se añadió 2 ml de TCES (Tris 0.2M pH 8 + NaCl 0.2 M + EDTA 50mM + SDS 2%), 2 ml de fenol (ácido félico) y 40 µl de β-mercaptoetanol.

Todo este conjunto se agitó mediante vórtex durante 1 minuto y, después, los tubos se introdujeron en un baño caliente de 65°C durante 5 minutos. Tras ello, fueron centrifugados durante 30 minutos (4000 r.p.m) a 4°C y al finalizar, se extrajo el sobrenadante.

A continuación, se añadió 1 volumen de cloroformo alcohol isoamílico (24:1). De nuevo, la muestra fue homogenizada mediante el vórtex y tras ello fue centrifugada otros 30 minutos a 4000 r.p.m. Tras la separación de ambas fases del tubo, la fase superior se recuperó en microtubos de 1,5ml y fue centrifugada de nuevo a 10000 r.p.m. durante 15 minutos. Tras esto, las impurezas quedan eliminadas y tras finalizar la centrifugación, se procedió a trasladar el sobrenadante a un microtubo de 1,5 ml añadiéndole la mitad de su volumen de LiCl 6M (DEPC) y finalmente, se dejó precipitar a -20°C durante una noche.

Tras el tiempo en reposo, las muestras fueron centrifugadas a 10000 r.p.m durante un tiempo de 30 minutos con el fin de obtener el precipitado. Posteriormente, las muestras fueron lavadas con 200 µl de alcohol etílico (EtOH) al 70% y más tarde se centrifugó de nuevo 5 minutos repitiendo el proceso hasta que el pellet quedó completamente limpio. Tras esto, se dejó secar unos 20 minutos al aire libre y fue resuspendido en 100 µl de agua.

Finalmente, con el fin de eliminar cualquier resto de ADN genómico, los extractos de ARN fueron purificados por columnas mediante el kit RNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen, USA) siguiendo en todo momento las instrucciones de la casa comercial. Además de ello, para cuantificar la calidad y cantidad del RNA obtenido, se evaluó con un equipo de NanoDrop ND-100 (NanoDrop Technologies).

3.2.2.3 Reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR)

Primeramente, se utilizó el tampón gDNA Wipeout, con el fin de eliminar los residuos de ADN genómico que pudieran permanecer en la muestra. Tras esto, se realizó la síntesis de cDNA utilizando 1 µg de ARN del kit QuantiTect® Reverse Transcription Kit (Qiagen, USA), con un volumen total de 20 µl siguiendo las instrucciones ofrecidas por el fabricante.

La cuantificación relativa de la expresión génica mediante PCR se realizó mediante el kit QuantiTect® SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen), siguiendo también las instrucciones del fabricante. El cDNA diluido se empleó como molde para la amplificación con un volumen final de muestra de 2,5 µl, en la cual había una concentración de 0,3 µM de cada oligonucleótido y, además, 12,5 µl de la mezcla de los contenidos en el kit. El programa utilizado fue de 15 minutos a 95°C para la activación de la Hotstar Taq polimerasa, precedidos 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). Al final de la etapa de alineamiento, se midió la fluorescencia, y se incluyó un paso final de análisis de la curva del punto de fusión, con el fin de detectar si había presencia de amplificaciones inespecíficas o de dímeros. Se realizaron tres réplicas técnicas de cada muestra de cDNA, a la par que controles en los que el molde de cDNA se sustituyó por agua con el fin de poder asegurar la ausencia de contaminación (control negativo). Se utilizó el gen licopeno ciclasa (β -LYC) como gen de referencia (Mesejo et al., 2016). La cuantificación se realizó con un equipo RotorGene® Q 2-Plex (Qiagen) y los resultados se procesaron con el software RotorGene 2.0.2.

3.2.2.4 Elección de oligonucleótidos para los genes de interés

Para la selección de los genes *GA3ox1*, *CYCB2* y *CDKB2*, se realiza una selección de las secuencias descritas en *Citrus clementina*. Tras esto, se realiza 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 recomendados para estudiar la expresión génica de *GA3ox1*, *CYCB2*, *CDKB2* se utilizaron basados en experimentos semejantes anteriores y se empleó el gen β -LYC como gen de referencia (MJ136 5'-GAACCAGGAGCTTAGGTCTG-3' y MJ137 5'-GCTAGGTCTACAACAAGGCC-3') (Alquezar et al., 2008).

Gen	Descripción	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>GA3ox1</i>	Síntesis GA	CAACGCAAGATGTCAAATGG	CAGGCCGGGTAGTAATTCAA
<i>CYCB2</i>	División celular	GAAAGCAGCAACAGGGAAGC	TCCAAAAGAAATTGCGCCGG
<i>CDKB2</i>	División celular	GAGGTCTCCATCTTGCGCAT	CGTCCTGCCTTCCTTGTCT

Tabla 1. Listado y descripción de los oligonucleótidos utilizados en la PCR, en sus formas forward y reverse.

3.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

A los resultados obtenidos se les aplicó un análisis de la varianza (ANOVA). Los datos porcentuales se transformaron con la ecuación $\arcsin(\sqrt{p})$. Los datos experimentales fueron analizados con el software Statgraphics Centurion XVII (Gráficos estadísticos, Englewoods Cliffs, Nj, EE.UU.).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 DESARROLLO PARTENOCÁRPICO DE LA MANDARINA “ORRI”.

Para determinar la capacidad de crecimiento partenocárpico de la mandarina “Orri” se estudió la evolución del peso del ovario de flores campaneras, su tasa de crecimiento, el cuajado y la expresión del gen *CYCB2*, en comparación con las mandarinas clementinas “Marisol” y “Clemenules”. El cultivar “Marisol” muestra una buena capacidad de desarrollo partenocárpico ya que presenta un alto contenido de GA₁ e, inversamente, un bajo contenido de ABA. El cultivar “Clemenules”, por el contrario, muestra una baja capacidad de desarrollo partenocárpico por su déficit de síntesis de GA₁. (Mesejo et al., 2013).

En el caso particular de este estudio, la tasa de crecimiento de los ovarios de “Marisol” se mantuvo en torno a 5-7 mg d⁻¹ durante las 2-3 semanas posteriores a la antesis, desde la caída de pétalos (13 DDA) hasta el inicio de la fase de crecimiento rápido (29 DDA). Por el contrario, los ovarios de “Clemenules” y, especialmente, “Orri”, mostraron un retraso en la reactivación de su desarrollo tras la antesis hasta 21 y 34 días después, respectivamente (Figura 2). En particular, los ovarios de “Clemenules” crecieron en torno a 7 mg d⁻¹ a los 21 DDA, y los de “Orri” crecieron entre 1,6 y 3,1 mg d⁻¹ entre 13 y 34 DDA, antes de iniciar el periodo de crecimiento rápido en la primavera de 2018. En la primavera de 2019, los resultados fueron similares, aunque el periodo de crecimiento rápido se adelantó, aproximadamente, 10 días (Figura 2).

Las diferencias entre variedades en la tasa de crecimiento del ovario aun fueron mayores en la fase de crecimiento rápido. Como consecuencia, el peso fresco del ovario de “Marisol” fue significativamente mayor al de “Clemenules” y “Orri” ya a partir de 30 DDA (Figura 3). El peso del ovario de la variedad “Orri” fue reducido en los 2 años de estudio, y, en particular, en 2018, fue incluso inferior al peso del ovario de “Clemenules” (Figura 3). Este hecho es de gran interés debido a que la variedad “Clemenules”, aun siendo conocida por su bajo desarrollo partenocárpico, mostró una tasa de desarrollo ligeramente superior a la de la variedad “Orri”.

El estudio de la expresión de los genes del ciclo celular permite establecer diferencias a nivel molecular entre “Clemenules” y “Orri”, como ya fue puesto de manifiesto para otras variedades (Mesejo et al., 2016). La tasa de división celular se determinó a través de la expresión del gen *CYCB2*. La expresión relativa de *CYCB2* de la mandarina “Clemenules” fue significativamente mayor que la de la mandarina “Orri”, de modo que mientras la transcripción de *CYCB2* en “Clemenules” aumentó un 133% entre la preantesis y la antesis, en la mandarina

“Orri” aumentó un 50% (Figura 4). Sin embargo, las dos variedades mostraron la misma tendencia, es decir, un descenso progresivo tras el pico de expresión de la antesis, pero, en la mandarina “Orri”, siempre con valores significativamente inferiores a “Clemenules” (Figura 4).

Como consecuencia de ello, el porcentaje de cuajado de ésta última fue significativamente inferior (Figura 5), dada la estrecha relación que existe entre la tasa de crecimiento del ovario y su cuajado (Zacarías et al., 1995).

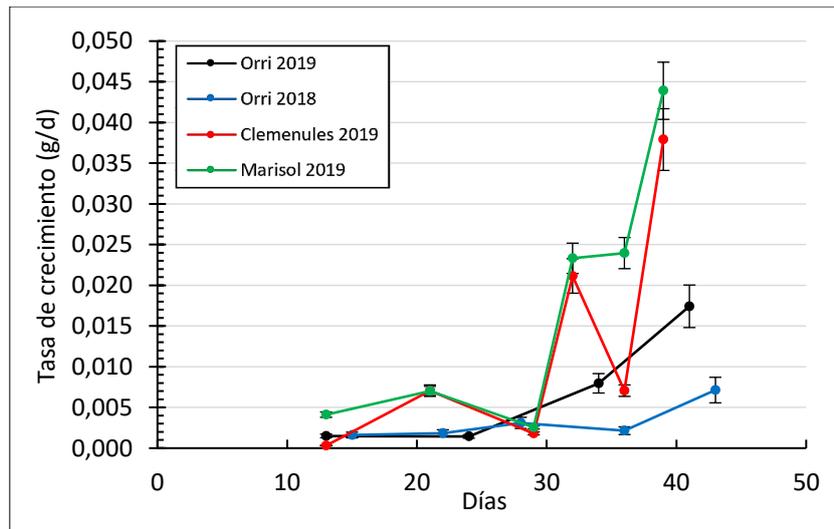


Figura 2. Evolución de la tasa de crecimiento ($g d^{-1}$) del ovario de las variedades “Orri”, “Clemenules” y “Marisol”. Cada valor es el promedio de la diferencia de peso entre 2 fechas de muestras de 8 flores tomadas al azar en cada fecha. Valores correspondientes a las primaveras de 2019 (“Orri”, “Clemenules” y “Marisol”) y 2018 (“Orri”).

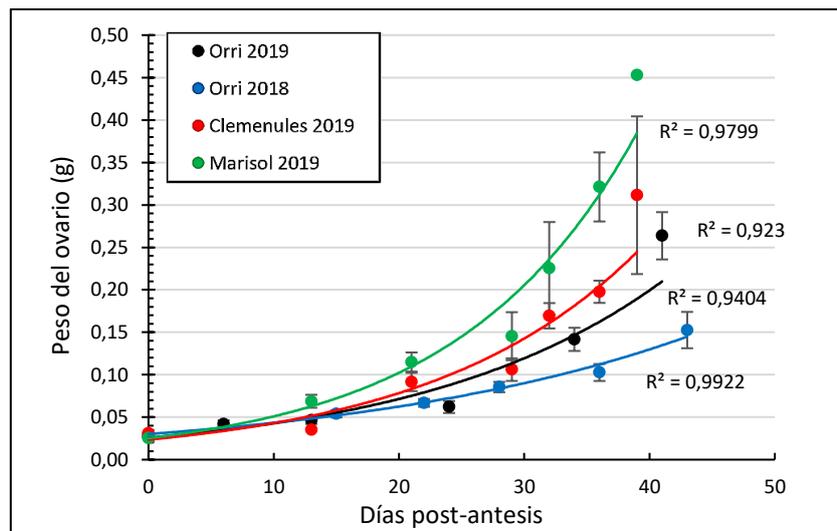


Figura 3. Evolución del peso fresco (g) del ovario de las variedades “Orri”, “Clemenules” y “Marisol”. Cada valor es el promedio del peso individual del ovario de 8 flores muestreadas al azar en cada fecha. Valores correspondientes a las primaveras de 2018 y 2019.

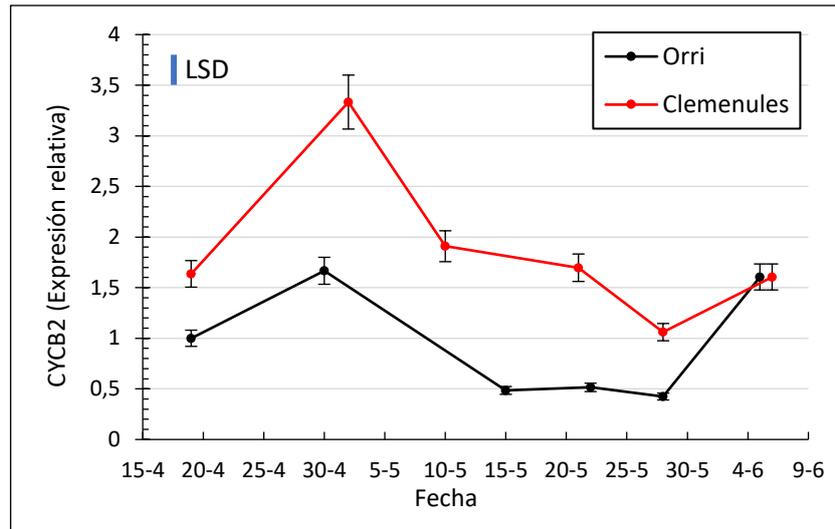


Figura 4. Evolución de la expresión relativa del gen CYCB2 en el ovario de las variedades de mandarina “Orri” (en color negro) y “Clemenules” (en color rojo). Cada valor es la media de 3 réplicas biológicas formadas por 3-4 frutos cada una. La barra vertical azul indica la mínima diferencia significativa (LSD).

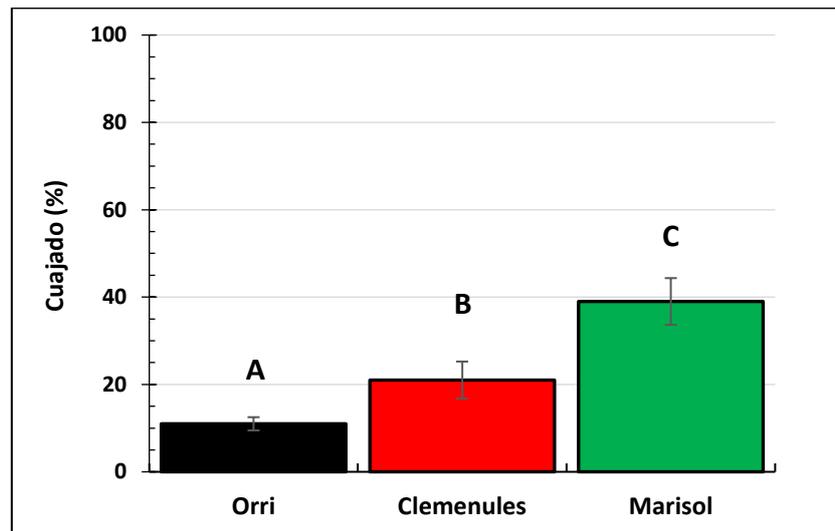


Figura 5. Cuajado final de flores campaneras de las variedades “Orri”, “Clemenules” y “Marisol”. Cada valor es el promedio de 10 ramas, con un mínimo de 8 flores por rama. Valores correspondientes a la primavera de 2019. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas.

4.2. EFECTO DE LA APLICACIÓN DE GA₃ Y 6-BA.

La aplicación de GA₃ y 6-BA produce un incremento en el cuajado partenocárpico de los cítricos deficientes en la síntesis hormonal y, por lo tanto, mejora la producción (García-Martínez y García-Papí, 1979). Como la mandarina “Orri” presenta una baja capacidad partenocárpica, se planteó la hipótesis de que el déficit hormonal del ovario es la causa de la falta de cuajado, y, por tanto, la aplicación de hormonas lo mejoraría. Este es el caso de variedades de mandarinas

como “Clemenules”, en las que la aplicación de fitohormonas compensa su déficit natural de GAs y es posible lograr, de este modo, una mejora de la tasa de división celular, un incremento en el desarrollo de los frutos y en el número total de frutos que finalmente se recogen.

4.2.1. Efecto de los tratamientos en la expresión génica

Se estudió el efecto de los tratamientos en la expresión relativa de genes implicados en la síntesis de las giberelinas, *GA3ox1*, y la división celular, la quinasa dependiente de ciclina *CDKB2* y su correspondiente ciclina *CYCB2*.

El ovario de mandarina “Orri” muestra un incremento significativo en la expresión relativa de *GA3ox1* entre la preantesis y la antesis de un 203%, alcanzando un valor máximo de 3,75. Tras ese momento, se produce un descenso de la expresión de *GA3ox1* que tras la caída de pétalos se estabiliza en un nivel basal. Es decir, la mandarina “Orri” presenta el mecanismo endógeno de síntesis de GA_1 necesario para la transición de flor a fruto en los cítricos, como se ha puesto de manifiesto en otras variedades. Así, Mesejo et al (2016) demostraron que la mandarina Satsuma (partenocarpia autónoma) presenta un incremento en la transcripción de los genes *GA20ox2*, *GA3ox1* y *GA3ox2* en la antesis, mientras que la mandarina “Clemenules” no. Sin embargo, la técnica utilizada (RT-PCR) no permite asegurar que la concentración de GA_1 en el ovario sea la necesaria para promover una tasa de división celular que permita el cuajado (Talón et al., 1992; Mesejo et al., 2016).

Los tratamientos con GA_3 y 6-BA no modificaron significativamente la expresión de *GA3ox1* 15 días después del tratamiento en antesis en comparación al control (Figura 6). Su evaluación 45 días después del tratamiento mostró un aumento leve de la expresión en los tratamientos GA_3 y 6-BA, pero no cuando se aplicaron conjuntamente, por lo que el factor hormonal (GA_3 o 6-BA) no alcanzó la significación estadística.

La expresión relativa de la ciclina *CYCB2* aumentó significativamente entre la preantesis y la antesis, alcanzando su valor más alto (1,3), y, correlacionando con el aumento en la expresión de *GA3ox1* (Figuras 6 y 7). Posteriormente, los niveles decrecen en torno a un 70% tras la caída de pétalos. Al inicio de la fase de crecimiento rápido del ovario (36 días después de la antesis), se observó un incremento del 340% (de 0,3 a 1,3) (Figura 7) que coincidió con el aumento de la tasa de crecimiento del ovario (Figura 2).

La expresión relativa de la quinasa dependiente ciclina *CDKB2* mostró un patrón de expresión similar al de *CYC2*, al estar ambas relacionadas en la fase G2/M del ciclo celular (Inzé y De Veylder, 2006). En particular, la expresión relativa de *CDKB2* aumentó entre la preantesis y la antesis, un 50%, y un 100% 36 días después (Figura 8), coincidiendo con el aumento de la tasa de crecimiento del ovario (Figura 2).

Pero como ocurrió con la expresión de *GA3ox1*, los tratamientos con GA₃, 6-BA y GA₃+6BA no aumentaron significativamente ni la expresión de *CYCB2* ni la de *CDKB2*, de modo que los niveles de expresión del control se encontraron incluso por encima de los niveles de expresión los árboles tratados (Figuras 7 y 8).

El nulo efecto que los tratamientos han tenido sobre la expresión de los genes de la división celular, junto con el aumento natural de la expresión del gen *GA3ox1* que la mandarina “Orri” muestra alrededor de la antesis sugiere que esta variedad es insensible a las aplicaciones hormonales para aumentar el cuajado, y que deben ser otros factores los que limitan su producción, ya que en las variedades con déficit de síntesis de GAs, la aplicación de GA₃ estimula la división celular y, con ello, la síntesis endógena de GAs (Mesejo et al., 2016). Con el fin de comprobar esta hipótesis se estudió el efecto de las aplicación de GA₃, 6-BA y GA₃+6BA sobre la cosecha.

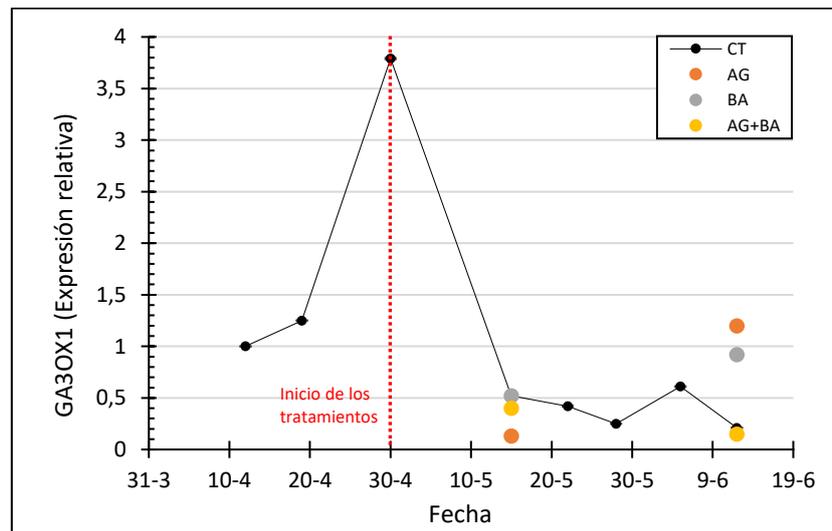


Figura 6. Evolución de la expresión relativa del gen *GA3ox1* en los ovarios de la variedad “Orri”. Efecto de la aplicación de GA₃, 6-BA y GA₃+6BA. Cada valor es la media de 3 réplicas biológicas. La línea roja corresponde a la fecha en el que se aplicaron los tratamientos, 30 de abril. No se encontraron diferencias significativas por efecto de los tratamientos.

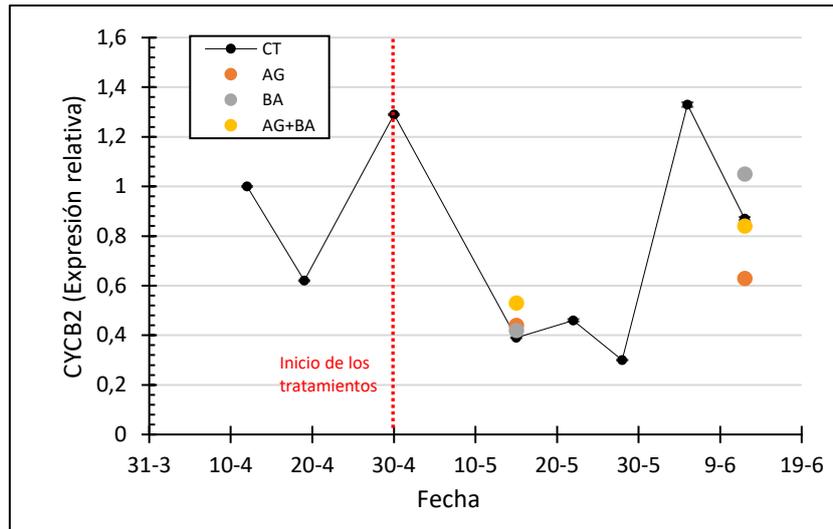


Figura 7. Evolución de la expresión relativa del gen CYCB2 en los ovarios de la variedad "Orri". Efecto de la aplicación de GA₃, 6-BA y GA₃+6BA. Cada valor es la media de 3 réplicas biológicas. La línea roja corresponde a la fecha en el que se aplicaron los tratamientos, 30 de abril. No se encontraron diferencias significativas por efecto de los tratamientos.

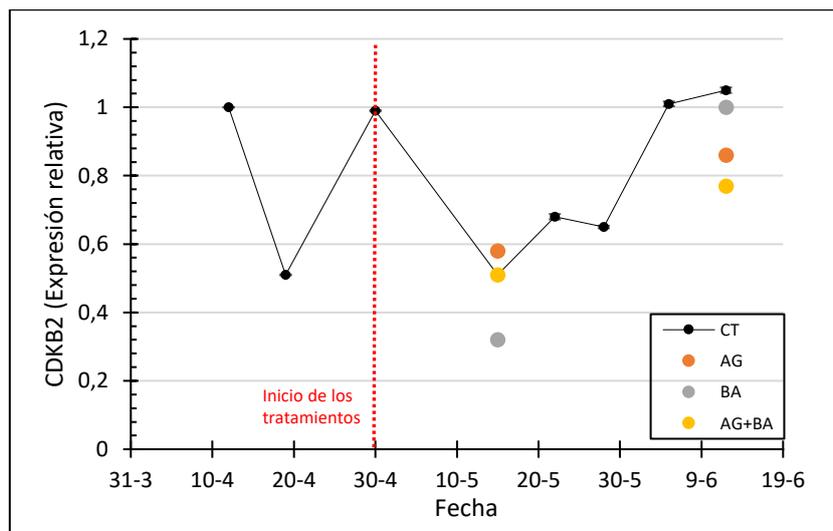


Figura 8. Evolución de la expresión relativa del gen CDKB2 en los ovarios de la variedad "Orri". Efecto de la aplicación de GA₃, 6-BA y GA₃+6BA. Cada valor es la media de 3 réplicas biológicas. La línea roja corresponde a la fecha en el que se aplicaron los tratamientos, 30 de abril. No se encontraron diferencias significativas por efecto de los tratamientos.

4.2.2. Efecto de los tratamientos en la producción.

La aplicación de GA₃ y 6BA y la mezcla de las 2 hormonas (T1 control, T2 GA, T3 BA y T4 GA+BA) se realizó con el objetivo de mejorar la producción de la mandarina "Orri". Por ello, en el momento de la cosecha, se evaluó el número de cajas recolectadas por árbol (cajas/árbol), su peso, y el número de frutos recolectados por caja (frutos/caja), para calcular el número de frutos totales recolectados por árbol (frutos/árbol) y el peso promedio por fruto.

La variabilidad en la producción que muestra la mandarina "Orri" en condiciones de cultivo se observa en la diferente cosecha que se obtuvo en los árboles control de las dos fincas estudiadas. Así, la finca 1 tuvo un mayor número de kilogramos por árbol que la finca 2, con una media en torno a 86,2 y 119,1 kilogramos, respectivamente. (Figura 10). En la finca 1, además, los árboles injertados sobre patrón "Carrizo" fueron más productivos (98,2 kilogramos) que los árboles injertados sobre patrón Volkameriana (80,5 kilogramos), debido principalmente al mayor número de frutos totales que formaron parte de la cosecha en cada árbol (1230 y 925 en los árboles de Carrizo y Volkameriana, respectivamente) (Figura 9). Dicha producción, en cualquier caso, fue muy superior a la de los árboles de la finca 2 (647 frutos/árbol) injertados sobre patrón Citrumelo. La influencia del patrón en la producción de la mandarina "Orri" es evidente (un 38% más de producción en la finca 1), como ya se ha comprobado en numerosas ocasiones con otras especies y variedades (Forner-Giner et al., 2003).

En los árboles control, el mayor número de frutos por árbol de la finca 1 provocó una reducción del tamaño del fruto, de modo que el número de frutos por caja de la finca 1 fue más elevado. Así, por término medio, el peso por fruto de los árboles injertados sobre Carrizo fue de 73,5 g fruto⁻¹, mientras que en los árboles injertados sobre Volkameriana los frutos pesaron 86,7 g, y los frutos de la finca 2, sobre Citrumelo, 107,5 g (Figura 11). En los cítricos, la relación entre el número de frutos por árbol y su tamaño final es inversa y exponencial (Agustí, 2003).

Los tratamientos con GA3, 6BA y la mezcla no mejoraron la producción en ninguna de las 2 fincas, de modo que el número de frutos por árbol, kilogramos por árbol y peso por fruto no se vio significativamente alterado en ningún caso (Figuras 9-11). Los resultados concuerdan con los obtenidos en el apartado anterior (Figuras 6-8), por lo que se sugiere que el déficit en el cuajado partenocárpico de la mandarina "Orri", por tanto, debe estar provocado por alguna otra razón a las estudiadas en este trabajo, como puede ser los factores nutricionales, un déficit en la ruta de síntesis de las GAs a nivel post-transcripcional, o un déficit en la capacidad de percepción de GAs. El control de que ejercen las proteínas DELLA y el receptor de GAs, GID1 (Daviere y Achard, 2013), sobre el cuajado partenocárpico de los cítricos está por determinar.

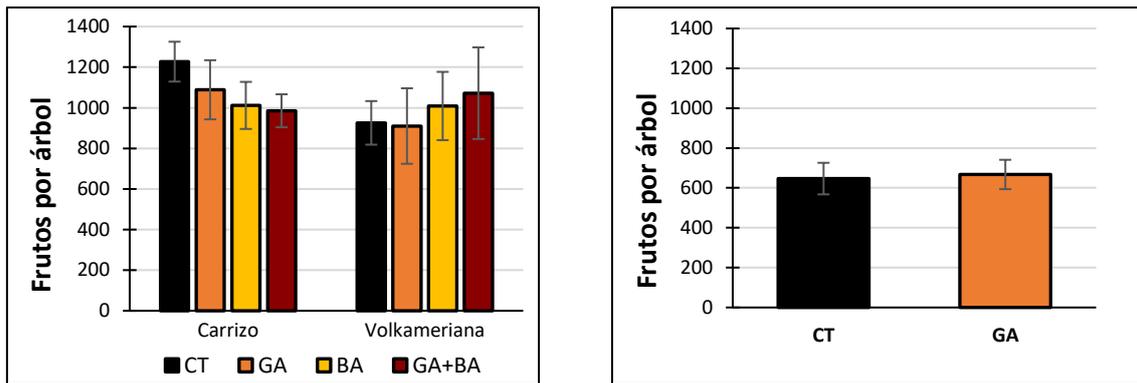


Figura 9. Comparativa del número de frutos obtenidos por árbol entre ambas fincas. Situándose la finca 1 a la izquierda (Figura 11.1) y la finca 2 a la derecha (Figura 11.2). Cada valor es el promedio de 5 árboles (10 árboles por tratamiento) en el caso de la finca 1, y de 12 árboles en el caso de la finca 2. No se encontraron diferencias significativas por efecto de los tratamientos

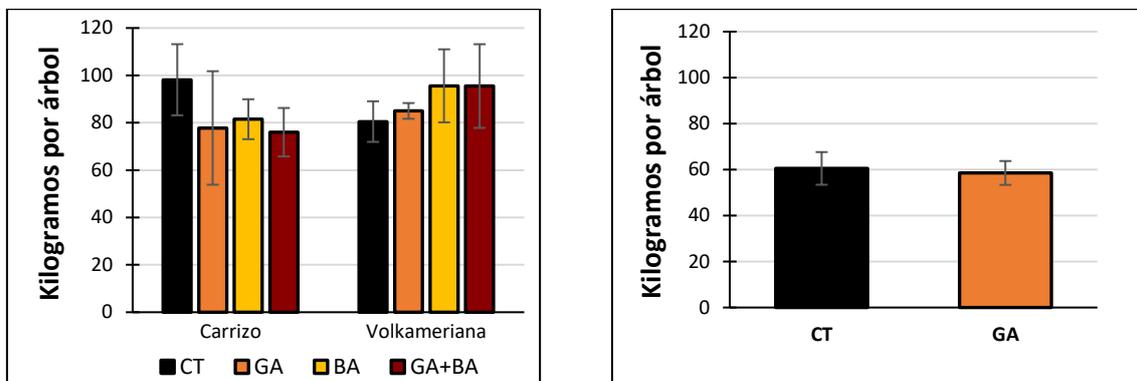


Figura 10. Comparativa de las cajas de kilogramos por árbol entre ambas fincas. Situándose la finca 1 a la izquierda (Figura 9.1) y la finca 2 a la derecha (Figura 9.2). Cada valor es el promedio de 5 árboles (10 árboles por tratamiento) en el caso de la finca 1, y de 12 árboles en el caso de la finca 2. No se encontraron diferencias significativas por efecto de los tratamientos.

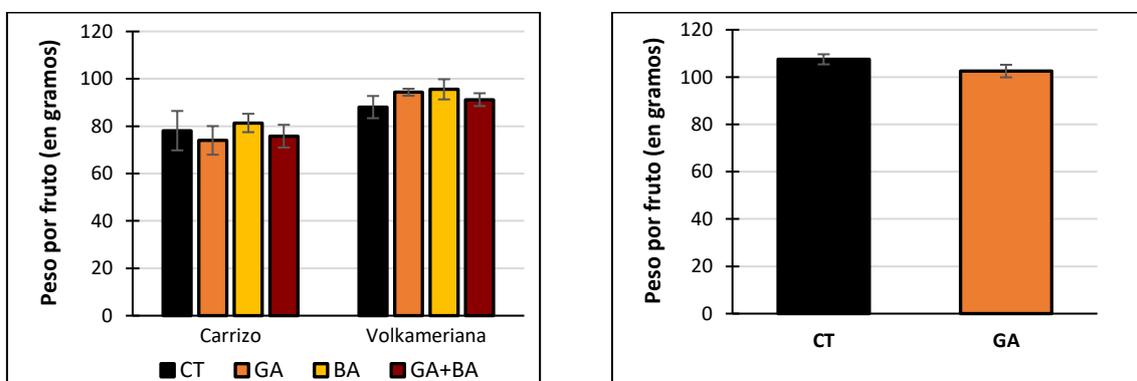


Figura 11. Comparativa del peso por fruto obtenido entre ambas fincas. Situándose la finca 1 a la izquierda (Figura 10.1) y la finca 2 a la derecha (Figura 10.2). Cada valor es el promedio de 5 árboles (10 árboles por tratamiento) en el caso de la finca 1, y de 12 árboles en el caso de la finca 2. No se encontraron diferencias significativas por efecto de los tratamientos

5. CONCLUSIONES

A partir de toda la información recopilada en este trabajo podemos sacar las siguientes conclusiones:

1. La mandarina "Orri" presenta un incremento de expresión de *GA3ox1* en la antesis, por lo que es capaz de sintetizar GA_1 .
2. La expresión de *CYCB2* (tasa de división celular) y por tanto el desarrollo del ovario que se da lugar en la mandarina "Orri" es menor que en las mandarinas Clementinas.
3. La aplicación de ácido giberélico (GA_3) y 6-benciladenina (6-BA) no modifica la expresión de los genes *GA3ox1*, *CYCB2* y *CDKB2* en la mandarina "Orri". Por ello, no presenta efecto en la cosecha final.

6. BIBLIOGRAFIA

- AGUSTÍ, M. (2003). *Citricultura*, Ediciones Mundi-Prensa. Capítulo 7-8, 139-156
- AGUSTÍ, M., GARCÍA-MARÍ, F. and GUARDIOLA, J.L. (1982). *The influence of flowering intensity on the shedding of reproductive structures in sweet orange*. *Scientia Horticulturae* 17, 343-352.
- BERMEJO, A., GRANERO, B., MESEJO, C. et al. (2018), *Auxin and Gibberellin Interact in Citrus Fruit Set*, *Journal of Plant Growth Regulation* 37:491–501.
- BERMEJO, A., PRIMO-MILLO, E., AGUSTÍ, M. et al. (2015), *Hormonal Profile in Ovaries of Mandarin Varieties with Differing Reproductive Behaviour*, *Journal of Plant Growth Regulation*, 34:584–594 .
- BUSTAN, A., y GOLDSCHMIDT., E.E. (1998). *Estimating cost of flowering in a grapefruit tree*. *Plant Cell and Environment* 21, 217-224.
- COOPER G.M. (2000). "Chapter 14: The Eukaryotic Cell Cycle". *The cell: a molecular approach (2nd ed.)*. Washington, D.C: ASM Press. ISBN 978-0-87893-106-4.
- DAVIÈRE, J. M., & ACHARD, P. (2013). *Gibberellin signaling in plants*. *Development*, 140(6), 1147-1151.
- FAO, FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. *Boletín estadístico de producción de cítricos*. Visto el 2 de julio de 2019.
<http://www.fao.org/economic/est/est-commodities/citrus-fruit/en/>
- FORNER-GINER, M. A., ALCAIDE, A., PRIMO-MILLO, E., & FORNER, J. B. (2003). *Performance of 'Navelina' orange on 14 rootstocks in Northern Valencia (Spain)*. *Scientia Horticulturae*, 98(3), 223-232.
- GARCÉS, C., (2018). *Control hormonal del ciclo celular y el cuajado partenocárpico de las mandarinas Clementinas*. 15-27.
- GARCÍA-MARTÍNEZ, J.L., GARCÍA-PAPÍ, M.A. (1979). *Influence of gibberellic acid on early fruit development, diffusible growth substances and content of macronutrients in seedless Clementine mandarin*. *Scientia Horticulturae*, Volume 11, Issue 4, 337-347.
- GOLDENBERG, L., YANIV, Y. et al. (2018). *Mandarin fruit quality: a review*. *J. Sci. Food Agric*, 98: 18-26.
- GOLDSCHMIDT, E.E. (1999). *Carbohydrate supply as a critical factor for citrus fruit development and productivity*. *HortScience* 34, 1020-1024.
- INZÉ, D., & DE VEYLDER, L. (2006). *Cell cycle regulation in plant development*. *Annu. Rev. Genet.*,40; 77-105.

IVIA, INSTITUTO VALENCIANO DE INVESTIGACIONES AGRARIAS. *Gestión integrada de plagas y enfermedades en cítricos. Citricultura Valenciana.*

<http://gipcitricos.ivia.es/citricultura-valenciana>

MAPA, MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN. *Boletín de comercio exterior de cítricos.* Visto el 6 de julio de 2019.

<https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/agricultura/superficies-producciones-anuales-cultivos/>

MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN. *Boletín de comercio exterior de cítricos.* Visto el 6 de julio de 2019.

https://www.mapa.gob.es/estadistica/pags/anuario/2016/CAPITULOSPDF/CAPITULO13/pdfc13_8.1.2.pdf

MEHOUACHI, J., IGLESIAS, D.J., TADEO, F.R., AGUSTÍ, M., PRIMO-MILLO, E., y TALÓN, M., (2000). *The role of leaves in citrus fruitlet abscission: Effects on endogenous gibberellin levels and carbohydrate contents.* Journal of Horticultural Science & Biotechnology 75, 79-85.

MESEJO, C., YUSTE, R., MARTÍNEZ-FUENTES, A., REIG, C. et al. (2013). *Self-pollination and parthenocarpic ability in developing ovaries of self-incompatible Clementine mandarins (Citrus clementina).* Physiologia Plantarum 148: 87–96.

MESEJO, C., YUSTE, R., REIG, C., MARTÍNEZ-FUENTES, A. et al. (2016). *Gibberellin reactivates and maintains ovary-wall cell division causing fruit set in parthenocarpic Citrus species.* Plant Science 247 (2016) 13–24.

QUICK, W.P., y SCHAFFER, A.A., (1996). *Sucrose metabolism in sources and sinks.* Photoassimilate Distribution in Plants and Crops: Source-Sink Relationships. Zaminski, E. y Schaffer, A.A., (eds.). Marcel Dekker, New York, pp. 115-156.

RIVAS F. (2007). *Respuesta nutricional y fisiológica de los cítricos al rayado y sus implicaciones agronómicas.* 25-148.

RIVAS, F., FERNANDO & ERNER, AGUSTÍ, M. et al. (2006). *Girdling increases carbohydrate availability and fruit-set in citrus cultivars irrespective of parthenocarpic ability.* Journal of Horticultural Science and Biotechnology. 289–295.

RUIZ, R., GUARDIOLA, J.L. (1994). *Carbohydrate and mineral nutrition of orange fruitlets in relation to growth and abscission.* Physiologia Plantarum 90, 27-36.

SCHNEIDER D., GOLDWAY M., et al. (2009). *Cross-pollination improves “Orri” mandarin fruit yield,* Scientia Horticulturae, volume 122, issue 3, 380-384.

SEGURA, J. (2008). *Introducción al desarrollo. Concepto de hormona vegetal.* Fundamentos Fisiología Vegetal, pág. 352.

TALON, M., ZACARIAS, L., PRIMO-MILLO, E. (1992). *Gibberellins and parthenocarpic ability in developing ovaries of seedless mandarins.* Plant physiology,99(4), 1575-1581.

USDA, UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. *Citrus: World Markets and Trade*. Visto el 10 de julio de 2019.

<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/citrus.pdf>

ZACARÍAS L., TALÓN, M., BEN-CHEIKH W., LAFUENTE M.T. and PRIMO-MILLO, E. (1995). *Abscisic acid increases in nongrowing and paclobutrazol treated fruits of seedless mandarins*. *Physiologia Plantarum* 95, 613-619.