



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior  
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

## Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural

Estudio del efecto inhibitor del fruto en la floración del  
aguacate: Influencia de la naturaleza de la inflorescencia y  
de la presencia de semilla.

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Ingeniería Agronómica

AUTOR/A: Lozano Domínguez, David

Tutor/a: Reig Valor, Carmina

Cotutor/a: Agustí Fonfría, Manuel

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024

**TRABAJO FIN DE MÁSTER**

Curso académico 2023-2024

Valencia, septiembre de 2024

**ESTUDIO DEL EFECTO INHIBIDOR DEL FRUTO EN LA FLORACION DEL  
AGUACATE: INFLUENCIA DE LA NATURALEZA DE LA INFLORESCENCIA  
Y DE LA PRESENCIA DE SEMILLA**

AUTOR:

DAVID LOZANO DOMINGUEZ

TUTOR ACADÉMICO:

MANUEL AGUSTÍ FONFRÍA

COTUTOR:

CARMINA REIG VALOR



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior  
d'Enginyeria Agronòmica  
i del Medi Natural

ETS de Ingeniería agronómica y del Medio Natural

Universidad Politécnica de Valencia

## RESUMEN

El cultivo del aguacate enfrenta un problema de brotación y floración en las ramas con la presencia de frutos, dando lugar a una reducción la cosecha siguiente y provocando la alternancia de cosechas.

En esta especie, las ramas sin frutos tienen la capacidad de brotar y florecer, lo que garantiza la continuidad del ciclo reproductivo del árbol. Sin embargo, las que sostienen frutos experimentan una reducción en su capacidad de brotación y floración, lo que limita la producción futura. Además, se ha observado que los brotes determinados presentan una mayor capacidad de cuajado en comparación con los brotes indeterminados que, no obstante, siguen creciendo vegetativamente tras el cuajado del fruto.

La floración de algunas especies leñosas, como el aguacate, se induce por las bajas temperaturas, al mismo tiempo que la presencia del fruto interfiere en el proceso, impidiendo que las hojas detecten la señal inductora.

Aunque este proceso represivo está bien documentado y tiene una explicación molecular clara en otras especies frutícolas, en el aguacate no se ha demostrado. Se ha propuesto, no obstante que, el gen *DAM1*, el cual se une al promotor del gen *FT* e inhibe su expresión, al menos en *Arabidopsis*, podría estar involucrado a través de un mecanismo similar en el aguacate.

En este trabajo se estudia la expresión de este gen en ramas con y sin fruto como candidato represor del gen inductor *FT*.

**Palabras clave:** Aguacate; Alternancia de cosechas; Brotación; *DAM1*; Inducción floral.

## ABSTRACT

The avocado crop faces a problem of sprouting and flowering on the branches with the presence of fruit, resulting in a reduction of the following crop load and causing alternate bearing.

In this species, fruitless branches have the ability to bud and flower, which ensures the continuity of the tree's reproductive cycle. However, this results in a reduction in the ability of fruit-bearing shoots to bud and flower, which in turn limits future production. Furthermore, determinate inflorescences have been observed to demonstrate a higher fruit setting ability compared to indeterminate inflorescences, which nevertheless continue to grow vegetatively after fruit set.

Flowering in some woody species, such as avocado, is triggered by low temperatures. However, the presence of fruit hinders this process by preventing leaves from detecting the necessary signal.

While this repressive process is well documented and has a clear molecular explanation in other fruit species, it has yet to be demonstrated in avocado. It has been suggested that the *DAM1* gene, which binds to the *FT* gene promoter and inhibits its expression (at least in *Arabidopsis*), may play a similar role in avocado. This study examines the expression of this gene in fruiting and non-fruiting branches as a potential repressor of the FT-inducer gene.

**Key words:** Avocado, Alternate bearing, Bud break, *DAM1*, Flower induction.

## ÍNDICE

I.	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>7</b>
	1.1 <i>Clasificación botánica y origen</i>	8
	1.2 <i>Brotación y tipos de brotes</i>	8
	1.3 <i>La floración del aguacate</i>	9
	1.4 <i>Los problemas agronómicos del aguacate</i>	10
II.	<b>OBJETIVOS DE TRABAJO</b> .....	<b>14</b>
III.	<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>16</b>
	3.1 <i>Material vegetal</i>	17
	3.2 <i>Análisis estadístico</i>	19
IV.	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>40</b>
	4.1 <i>Influencia del fruto en la brotación y floración</i>	21
	4.2 <i>Efecto del fruto en la expresión de los genes de la floración</i>	24
V.	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>28</b>
VI.	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>32</b>
VII.	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>34</b>
VIII.	<b>ANEJOS</b> .....	<b>40</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Influencia de la presencia del fruto sobre la brotación en el aguacate.....	<b>21</b>
<b>Figura 2.</b> Influencia de la presencia del fruto sobre el porcentaje de brotes florales desarrollados en el aguacate.....	<b>22</b>
<b>Figura 3.</b> Influencia de la presencia del fruto sobre el porcentaje de brotes florales indeterminados desarrollados en el aguacate.....	<b>23</b>
<b>Figura 4.</b> Influencia de la presencia del fruto sobre el porcentaje de brotes florales determinados desarrollados en el aguacate.....	<b>24</b>
<b>Figura 5.</b> Influencia de la presencia del fruto sobre la evolución de la expresión del gen inductor de la floración, PaFT, y su represor, DAM1, en hojas de brotes con varios frutos (brote ON) y sin frutos (brote vegetativo) del aguacate.....	<b>25</b>
<b>Figura 6.</b> Influencia de la presencia del fruto sobre la evolución de la expresión del gen inductor de la floración, PaFT, y su represor, DAM1, en hojas de brotes indeterminados con un solo fruto (Rama ind.) y sin frutos (Brote vegetativo) del aguacate.....	<b>26</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Comportamiento floral del aguacate.....	<b>9</b>
<b>Tabla 2.</b> Cebadores elegidos para el análisis de expresión génica.....	<b>19</b>



# **I. INTRODUCCIÓN**



### **1.1. Clasificación botánica y origen**

El aguacate pertenece al orden Laurales, familia Lauraceae, género *Persea*, especie *americana*. Dentro de *Persea americana* Mill, existen tres razas, Antillana, Mexicana y Guatemalteca.

El aguacate es originario del centro de México y de partes altas de Guatemala, donde se encontraron las primeras plantas silvestres y donde se llevó a cabo su domesticación (Williams, 1977b).

El número de variedades de esta especie es muy elevado y, en gran medida, desconocido. Muchas variedades autóctonas de las zonas de origen, en muchos casos denominadas genéricamente *criollas*, aunque sean distintas en origen, aspecto, forma y calidad intrínseca, apenas son conocidas, y aunque su calidad es excelente carecen de importancia. Las más importantes, comercialmente hablando, son 'Bacon', 'Fuerte' y 'Ettinger', dentro del Grupo B, y 'Hass' dentro del grupo A (ver apt. 1.3).

### **1.2. Brotación y tipos de brotes.**

El crecimiento anual del aguacate es intermitente, con varios periodos de crecimiento al año, dependiendo del clima de la zona de cultivo, que se alternan con periodos de parada vegetativa. En la Cuenca Mediterránea se producen tres brotaciones anuales, la primera, la más abundante, tiene lugar a finales del invierno y viene acompañada de flores, la segunda tiene lugar en primavera, y es seguida por otra más tardía, en verano.

El aguacate tiene dos tipos de brotes: vegetativos y reproductivos. Los brotes vegetativos pueden ser terminales, cuando surgen del meristemo apical de las ramas del año anterior, y laterales o axilares, cuando lo hacen a partir de las yemas situadas en las axilas de las hojas de dichas ramas.

Los brotes florales pueden ser, asimismo, de dos tipos, indeterminados, en los que la yema terminal continúa el crecimiento vegetativo, y determinados, cuya yema terminal desarrolla flores o queda latente. Los primeros son más

abundantes que los segundos, y ambos poseen ejes secundarios laterales que forman inflorescencias (panículas), y éstas, a su vez, desarrollan ejes terciarios que forman cimas.

### 1.3. *La floración del aguacate*

La floración del aguacate es un proceso complejo ya que presenta *dicogamia*, esto es, que las partes masculina y femenina de la flor maduran en diferentes momentos del día, *sincronía diurna*, es decir, todas las flores de un árbol tienen un comportamiento femenino durante un periodo del día y masculino en otro, y *protoginia*, lo que significa que el primero antecede al segundo.

De acuerdo con ello, existen dos grupos de variedades, A y B, cuyo comportamiento floral se describe en la Tabla 1.

Tabla 2. Comportamiento floral del aguacate. La coexistencia de flores masculinas y femeninas de ambos grupos a lo largo de dos días, bien por las mañanas, bien por las tardes, hace posible la polinización.

Comportamiento floral				
Grupo floral	Día 1		Día 2	
	Mañana	Tarde	Mañana	Tarde
<b>A</b>	Femenina	Cerrada	Cerrada	Masculina
<b>B</b>	Cerrada	Femenina	Masculina	Cerrada

Estas flores tienen un periodo de antesis de dos días. Las variedades del Grupo A son receptivas como femeninas por la mañana del primer día y cierran al mediodía, abriendo como masculinas en la tarde del día siguiente, mientras que las del Grupo B son receptivas como femeninas durante la tarde del primer día y cierran al anochecer, comportándose como masculinas en la mañana del día siguiente. La coexistencia de variedades de ambos grupos consigue la polinización, de modo que los cvs. del Grupo A son polinizadoras del Grupo B y viceversa (Tabla 1).

No obstante, es frecuente que existan periodos de solape entre el comportamiento sexual de estas flores. Así, en el Clima Mediterráneo se observa con frecuencia la polinización de árboles aislados y, por tanto, en ausencia de

polinizadores. Periodos de coincidencia entre las fases masculina y femenina de la flor de hasta 1 y 2 h han sido descritos en el cv. Hass cultivado en la Península Ibérica.

Asimismo, el aguacate posee un cierto grado de partenocarpia, variable con el cultivar, el año y hasta con el árbol. Los frutos así formados, denominados *paltines*, desarrollan una forma alargada como consecuencia de la ausencia de semilla, un mesocarpo más estrecho y un menor porcentaje de grasa.

#### **1.4 Los problemas agronómicos del aguacate**

El aguacate produce cosechas muy bajas, si se compara con otras especies frutícolas leñosas, debido a la esterilidad del óvulo, a problemas de polinización, a la degeneración del fruto recién cuajado, o al desarrollo defectuosos de la semilla, todo lo cual provoca la abscisión casi total (99.9%) de las flores inicialmente formadas (ver Monselise y Goldschmidt, 1982).

Las dificultades de polinización descritas por la dicogamia de la especie se ven agravadas por las dimensiones tan pequeñas de sus flores, apenas 1 cm de diámetro en anthesis, que dificultan la labor de insectos polinizadores, y por el elevado número de éstas que poseen por inflorescencia, lo que hace que la mayor parte queden ocultas a ellos. El hecho es que los árboles adultos de aguacate en producción poseen entre 2 y 3 millones de flores los años que florecen, y tan sólo entre el 0.001 y el 0.0001% de ellas inician el desarrollo de su ovario tras la fecundación. En estas condiciones, la producción de los cvs. de esta especie apenas superan las 15 t·ha<sup>-1</sup>, en promedio, en la Cuenca Mediterránea.

Pero, además, a un periodo de producción (año ON) le sigue otro de escasa floración y cosecha (año OFF), y a éste otro productivo, y así sucesivamente, lo que desencadena un comportamiento de periodos de alta y escasa producción alternados con otros de baja y alta floración (Garner y Lovatt, 2008). A este fenómeno se le conoce como *alternancia de cosechas*.

La alternancia de cosechas no es privativa del aguacate, y se presenta también en el mango (Mukherjee, 1953), el manzano (Spinelli et al., 2009), el pistacho (Rosenstock et al., 2010), el olivo (Lavee, 2007), la nuez pecan (Conner y Worley,

2000) y los cítricos (Monselise y Goldschmidt, 1982), entre otras especies frutícolas.

El estudio de este fenómeno se ha centrado en la acción del fruto sobre las hojas. Se ha demostrado repetidas veces que es éste el que interfiere en el proceso inductivo de la floración de las especies alternantes, de modo que la eliminación de los frutos en etapas precoces de su desarrollo permite la floración del año siguiente, pero si se mantienen los frutos hasta que alcanzan su tamaño definitivo la floración siguiente disminuye hasta casi anularse (Martínez-Fuentes et al., 2010), dependiendo, en intensidad, de la especie y el número de frutos por árbol.

Luckwill (1970) sugirió que algunas sustancias sintetizadas en las semillas (el autor refirió *gibberellin-like substances*) eran las responsables de la reducción y hasta supresión de la floración en el manzano después de un año de elevada cosecha. Es más, Chan y Cain (1967) consiguieron hacer alternantes variedades partenocárpicas de manzano que producían regularmente año tras año polinizándolas manualmente, y demostraron la influencia primordial de los frutos con semillas frente a los frutos partenocárpicos sin semillas en la formación de yemas florales. Más tarde, Huet (1972) lo confirmó con peras con y sin semillas. Sin embargo, algunos frutos partenocárpicos pueden influir negativamente sobre la formación de flores. Así, algunas variedades de cítricos, como los mandarinos 'Moncada', Satsuma, 'Murcott', 'Nadorcott'..., siendo partenocárpicas son marcadamente alternantes (Muñoz-Fambuena et al. 2011, 2012b; Nishikawa et al. 2012; Shalom et al. 2012). En el caso del aguacate, la influencia de los frutos partenocárpicos (*paltines*) sobre la floración se desconoce.

Molecularmente, en las plantas anuales, el fotoperiodo (Suárez-López et al., 2001), la vernalización (Sheldon et al., 2000) y la temperatura ambiente (Blázquez et al., 2003) afectan a la expresión del gen integrador de la floración *FLOWERING LOCUS T (FT)*, determinando el momento de la floración. Las plantas anuales de verano se desarrollan y florecen rápidamente cuando crecen bajo días largos, mientras que las anuales de invierno pueden crecer durante meses bajo días largos sin florecer (Andrés y Coupland, 2012), evitando, de esta manera, la floración en condiciones desfavorables bloqueando la respuesta a las señales inductoras del dominio MADS del factor de transcripción *FLOWERING LOCUS C (FLC)* y sus homólogos, que reprimen directamente los genes

relacionados con la transición floral (Sheldon et al., 2000). Tras un cambio a temperaturas frías, las modificaciones de la cromatina reprimen de forma estable la transcripción de *FLC*, y esta represión persiste tras la vernalización (Finnegan y Dennis, 2007), permitiendo la floración.

Los frutales, sin embargo, presentan un comportamiento policárpico distinto ya que el efecto inductor de las señales ambientales se ve localmente reprimido por la presencia del fruto, pudiendo provocar, como se ha dicho, la alternancia de cosechas. El estudio molecular de este comportamiento se abordó, por primera vez, en los cítricos, demostrando que el fruto reduce la expresión del gen inductor *FLOWERING LOCUS T (FT)* (Muñoz-Fambuena et al., 2011), provocando la activación epigenética del gen ortólogo de *FLC* que codifica *CcMADS19* (Hou et al., 2014), con el enriquecimiento de marcas H3K4me3, que reprime local y temporalmente al gen inductor ortólogo de *FT (CiFT2)* (Agustí et al., 2020). En éstos, el frío induce la floración en los climas mediterráneos (Liebig y Chapman, 1963), mientras que en zonas tropicales es el estrés hídrico (Cassin et al., 1969). Este último se ha asociado, también, con un aumento estacional de la expresión *CiFT2* (Nishikawa et al., 2007; Chica y Albrigo, 2013), y en ambos casos la permanencia del fruto correlaciona con niveles reducidos de su expresión (Muñoz-Fambuena et al., 2011).

El comportamiento del aguacate es muy similar, ya que, por una parte, la floración se induce, también, por las bajas temperaturas, a través de la expresión del gen *PaFT* (Lovatt, 2010; Acosta-Rangel, 2021), y, por otra, la presencia del fruto la inhibe reprimiendo su expresión, promoviendo así la alternancia de cosechas (Ziv et al., 2014). Sin embargo, en esta especie no se ha identificado ningún factor de transcripción represor del gen *PaFT* como se ha hecho en los cítricos.

En múltiples especies perennes, la salida de la endolancia se halla fuertemente asociada a la reducción de la expresión del gen *SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP)/DORMANCY ASSOCIATED MADS-box (DAM)* (Tuan et al., 2017; Yang et al., 2021), de modo que su sobreexpresión inhibe la brotación de las yemas (Barbier et al., 2019; Falavigna et al., 2019). Asimismo, el gen *DRM1* también se halla asociado a la latencia y su expresión se reduce con la salida de ésta, aunque el papel molecular exacto de esta proteína sigue siendo impreciso (Rae et al., 2013; Wood et al., 2013). En el aguacate, la

expresión de los genes *DAM* y *DRM1* también se halla asociada a la endolatenia y es reprimida en el momento de la floración (Ahsan et al., 2023). La regulación de la latencia y la floración están estrechamente relacionadas y se han identificado diferentes interacciones a nivel molecular (Barbier et al., 2019; Fichtner et al., 2021; Niwa et al., 2013). Por ejemplo, *SOC1* se une a la secuencia reguladora y controla la expresión del represor floral *DAM1* en *Arabidopsis*, kiwi, y *Euphorbia esula* (Hao et al., 2015; Voogd, 2015; Searle et al., 2006). En *E. esula*, se ha demostrado que *DAM1* se une al promotor *FT* e inhibe su expresión (Hao et al., 2015). Esta interacción no se limita a especies perennes. De hecho, los homólogos de *DAM*, *SVP* y *AGL24* también están implicados en la represión de la floración en *Arabidopsis* (Lee y Lee, 2010).

En todo caso, la acción represora del fruto tiene lugar a través de las hojas. Dado que el carácter policárpico de estas especies se ve garantizado por el desarrollo de brotes vegetativos a partir de las yemas terminales de las panículas indeterminadas y de yemas axilares, es lógico preguntarse de cuáles de estos brotes son las hojas receptoras de la señal represora del fruto.

En este trabajo se aborda el estudio de la represión por el fruto de la señal inductora de la floración en las hojas de ambos tipos de brotes: los procedentes de yemas axilares y los procedentes de las yemas terminales de las inflorescencias indeterminadas, distinguiendo en éstas la presencia de 1 o más frutos. Y si este efecto represor es a través del gen *DAM1* que, de acuerdo con Ahsan et al. (2023), se halla estrechamente relacionado con los transcritos *SVP* y regula el gen *FT* para inducir la latencia (Hao et al., 2015; Niu et al., 2016). Además, en el aguacate, el gen *DAM1* reduce su expresión durante el periodo de inducción floral, al mismo tiempo que *FT* la aumenta.

La Hipótesis de Trabajo de este TFM, por tanto, es:

En el aguacate, las hojas de un brote indeterminado próximas al fruto ven reprimido el proceso floracional por acción del gen *DAM1*.

## **II. OBJETIVOS DE TRABAJO**

Los objetivos del presente trabajo son:

Determinar la importancia del número de frutos por ramo en la brotación.

Determinar qué tipos de brote son más sensibles a la represión por el fruto:  
determinados e indeterminados.

Determinar la importancia del número de frutos por ramo en la floración.

Determinar si el gen *DAM1* reduce la expresión del gen inductor *FT*.



# **III. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **3.1 Material vegetal**

Los experimentos se llevaron a cabo una plantación comercial de aguacate 'Hass', injertados sobre patrón Duke7, localizada en Carcaixent (Valencia), utilizando el cv. Bacon como polinizador, con un marco de plantación de 6x5m, y riego localizado.

Se diseñó un experimento de bloques al azar, con 4 bloques de 5 árboles cada uno, similares en tamaño y cosecha.

#### **3.1.1. Brotación y floración**

De cada árbol se marcaron 3 tipos de ramas:

- .- Ramas con un único fruto ya maduro: Brote ON 1.
- .- Ramas con más de un fruto, todos ya maduros: Brote ON>1.
- .- Ramas con un fruto partenocárpico (*paltín*)
- .- Rama vegetativa, sin ningún fruto: Brote vegetativo.

En el momento de la brotación, de cada tipo de rama se contó el número de yemas brotadas y el número de brotes florales desarrollados, distinguiendo entre determinados e indeterminados, expresando los resultados en porcentaje de yemas brotadas y de brotes desarrollados.

Para determinar la expresión génica, durante los meses de noviembre y diciembre, coincidiendo con la época de inducción floral, se tomaron de tres árboles al azar una hoja por rama de la brotación de primavera de las ON 1, ON>1 y vegetativas en las fechas 27 oct., 11 nov., 23 nov., 1 dic., y 11 dic. Se transportaron al laboratorio a baja temperatura, se congelaron con N líquido y se almacenaron a -80°C hasta su análisis.

#### **3.1.2. Análisis genético**

El RNA se extrajo de las hojas muestreadas siguiendo el método descrito por Martínez-Fuentes et al. (2015) con algunas modificaciones. El protocolo de extracción está dividido en dos partes y tiene una duración de dos días.

Durante el primer día, el material congelado se molió a polvo fino en un mortero preenfriado, utilizando nitrógeno líquido para evitar que el material se descongelase. El buffer de extracción se preparó del siguiente modo: 3% CTAB, 1,4 M NaCl, 200 mM EDTA, y 100mM Tris-HCl (pH 8,0), se calentó y se añadió mercaptoethanol (4%). Posteriormente, se transfirieron 0,5 g de la muestra de polvo fino y 400 mg de PVPP, a un tubo de 30 ml que contenía 5 ml de buffer de extracción previamente calentado a 65°C, se homogeneizó la muestra con el vórtex durante 1 minuto, y se incubó en baño a 65°C durante 25 minutos, homogeneizando la muestra en el vórtex cada 5 minutos. A continuación, se añadió 1 ml de acetato de potasio 3 M (pH 5,5) y se incubó la muestra en hielo durante 30 min.

A la muestra así obtenido se le añadió 1 ml de fenol cloroformo alcohol isoamílico (25:24:1), se homogeneizó con el vórtex y se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4°C, se recuperó el sobrenadante, se añadió 1 volumen de fenol cloroformo alcohol isoamílico (25:24:1) y se volvió a centrifugar a 10.000 rpm durante 10 min a 4°C. Se repitió el proceso una vez más, y al finalizar se recupera el sobrenadante y se añadió 1 volumen de cloroformo isoamílico (25:1) con el objetivo de eliminar los compuestos fenólicos restantes.

Cuando finalizó la última centrifugación, se recuperó el sobrenadante y se añadió 1 volumen de isopropanol, y se incubó durante toda la noche a -80°C.

Al día siguiente, se centrifugó la muestra a 10.000 rpm durante 20 min a 4°C, se desechó el sobrenadante, y se recuperó el sedimento. Éste se lavó con etanol 70% (200-500 µl, dependiendo del tamaño del pellet) y se centrifugó a 10.000 rpm durante 5 minutos a 4°C, y al finalizar la centrifugación se secó el pellet. Posteriormente, se resuspendió en 1 ml de Tris-HCL mM (pH 7,5), se centrifugó 4 min a 11.000 rpm, se recuperó el sobrenadante y se transfirió a un eppendorf de 1,5 ml, teniendo cuidado de no pipetear partículas no disueltas. Se añadieron 250 µl de LiCl, se mezcló todo, suavemente, con la pipeta, y se incubó a -80°C durante 2 h. Posteriormente, se centrifugó la muestra a 11.000 rpm durante 20 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se conservó el pellet. Éste se lavó con 100 µl de etanol 70% y se volvió a centrifugar a 11.000 rpm durante 5 min a 4°C;

al terminar se eliminó el sobrenadante, se secó el sedimento al aire durante 30 min, y se suspendió en 100 µl de agua libre de RNAsas para comprobar en un equipo *NanoDrop* la calidad y cantidad de RNA libre obtenido.

### Elección de genes de interés y sus cebadores

Con el fin de determinar cómo afecta el fruto al proceso de inducción floral, se seleccionaron los siguientes genes reguladores de la floración *PaFT* como gen responsable de la inducción floral y el candidato a gen represor de éste *DAM1* (Ahsan *et al.*, 2023). El gen de síntesis de actina (*PaACT*) se utilizó como gen de referencia.

*Tabla 2. Cebadores elegidos para el análisis de expresión génica.*

Gen	Primer orientation	Sequence (5' – 3')	Reference
<i>PaFT</i>	F	TCCGGGGTGGCGTCAGAACT	Lovatt <i>et al.</i> , (2021)
	R	TCTCCGGCTGTCGTCGGACT	
<i>PaDAM1</i>	F	CAGGTAGCAGAAAAGGGCCA	Ahsan <i>et al.</i> , (2023)
	R	CTAGCACGCGACTTAGTCCC	
<i>PaACT</i>	F	AACATTGTGCTTAGCGGTGGTTCC	Lovatt <i>et al.</i> , (2021)
	R	TCCACATCTGTTGGAAGGTGCTCA	

### Retrotranscripción (RT).

Para la obtención de cDNA, se sometieron las muestras de RNA a una reacción de retrotranscripción utilizando el kit QuantiTect® Reverse Transcription Kit (Qiagen, USA). Se empleó 1 µg de la preparación de RNA en un volumen de reacción de 20 µL. El kit utilizado para la retrotranscripción emplea una mezcla de oligo-dT y de *random primers*, y la reacción es catalizada por la enzima de alta afinidad a RNA Quantiscript Reverse Transcriptase. Las condiciones de reacción fueron 15 min a 42°C, seguidos de 3 min a 95°C.

### PCR cuantitativa (qPCR).

La cuantificación relativa mediante PCR se realizó mediante el kit QuantiTect® SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante, y se empleó un equipo RotorGene® Q 2-Plex (Qiagen, USA). Los resultados se analizaron con el software RotorGene 2.0.2.

Para la reacción de qPCR se utilizaron como molde 2 µL de cDNA de las muestras biológicas en un volumen de reacción de 25 µL. En la reacción se incluyeron 1.5 µL de cada uno de los oligonucleótidos descritos para cada gen de interés (Tabla 1).

Las condiciones de reacción se establecieron en 15 min a 95°C para la activación de la enzima HotStar Taq polimerasa incluida en el kit, seguidos de 40 ciclos de desnaturalización durante 15 seg a 94°C, alineamiento de los cebadores a 60°C durante 30 seg y elongación a 72°C durante 30 seg.

La fluorescencia (SYBR Green) se midió al final de cada etapa de alineamiento. Los niveles de expresión de RNA se analizaron mediante el método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . Los valores de fluorescencia se transformaron a valores de RNA relativos usando calibraciones previas con varias diluciones 10x de la muestra de RNA como curva estándar. Al completar cada reacción de qPCR se incluyó un paso final de análisis de la curva del punto de fusión para la detección de dímeros o de amplificaciones inespecíficas. Cada análisis se realizó a partir de tres replicas biológicas y tres técnicas.

### **3.2. Análisis estadístico**

A los resultados obtenidos se les aplicó el análisis de la varianza, utilizando el test de Student-Newman-Keuls para la separación de medias. A los valores porcentuales se les aplicó la transformación  $\arcsin \sqrt{p}$  para uniformizar la muestra.

# **IV. RESULTADOS**

#### 4.1. Influencia del fruto en la brotación y floración

En el aguacate, la presencia del fruto determina significativamente la intensidad de brotación. Así, mientras en las ramas que desarrollaron al menos un fruto (ON 1; ON>1) brotaron un 16% de las yemas, de los brotes que no desarrollaron ninguno (B. vegetativos) brotaron el 21%, alcanzando la diferencia la significación estadística ( $P<0.05$ ) (Fig. 1).

Es de destacar que las ramas que desarrollaron *paltines*, esto es, frutos sin semilla, brotaron con la misma intensidad que aquellas que los desarrollaron con semillas, y con independencia del número de frutos (Fig. 1).

La brotación de las ramas con uno o más fruto, con o sin semillas, no difirió estadísticamente entre ellos ( $P<0.05$ ).

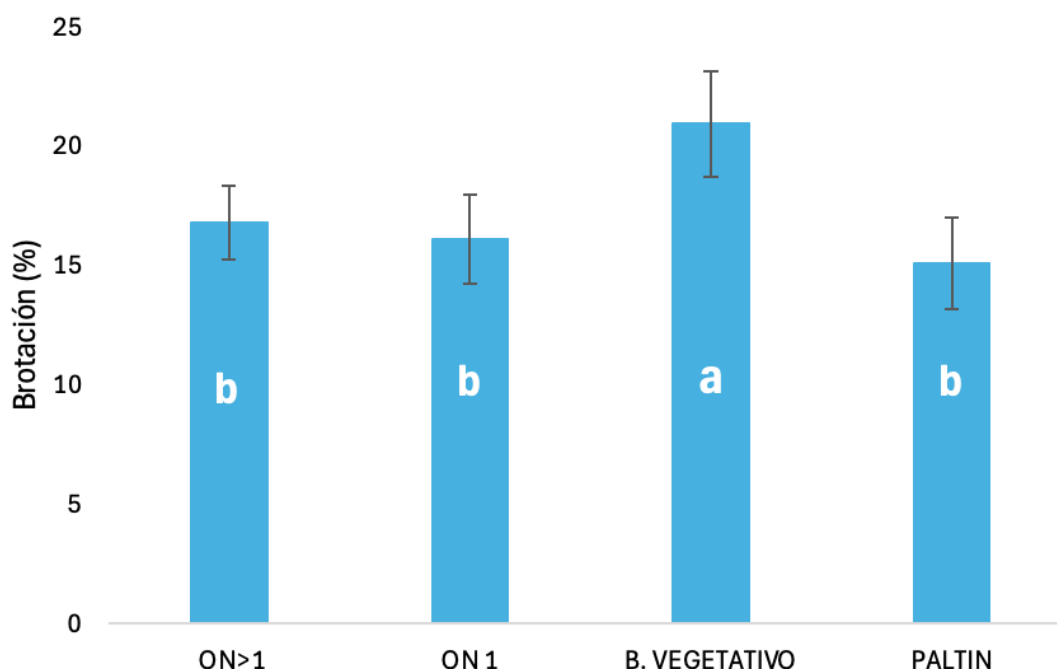


Figura 1. Influencia de la presencia del fruto sobre la brotación en el aguacate. Valores correspondientes al porcentaje de yemas que iniciaron la brotación. ON>1 y ON 1 significa ramas con más de un fruto o con un solo fruto, respectivamente, desarrollados hasta la maduración. Cada valor es la media de 3 ramas por árbol y 20 árboles. Las barras verticales indican el error estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $P<0.05$ ).

Del mismo modo, la presencia del fruto redujo significativamente la floración ( $P<0.05$ ). De las ramas sin fruto, el 18.4% de los brotes fueron florales, mientras que de las que tenían un fruto, sólo lo fueron el 10.3%, y de las que tenían más de un fruto, el 6.1%; es decir, en las ramas con fruto los brotes florales se redujeron en un 44% y un 67%, respectivamente (Fig. 2).

Y también en este caso, los frutos sin semillas redujeron significativamente la floración ( $P<0.05$ ), dando lugar tan sólo a un 8.9% de brotes florales de todos los que se desarrollaron de sus yemas (Fig. 2), esto es, a una reducción del 52%.

Tampoco en este caso difirieron significativamente las diferencias en el porcentaje de brotes florales entre las ramas con uno o más frutos, con o sin semillas ( $P<0.05$ ).

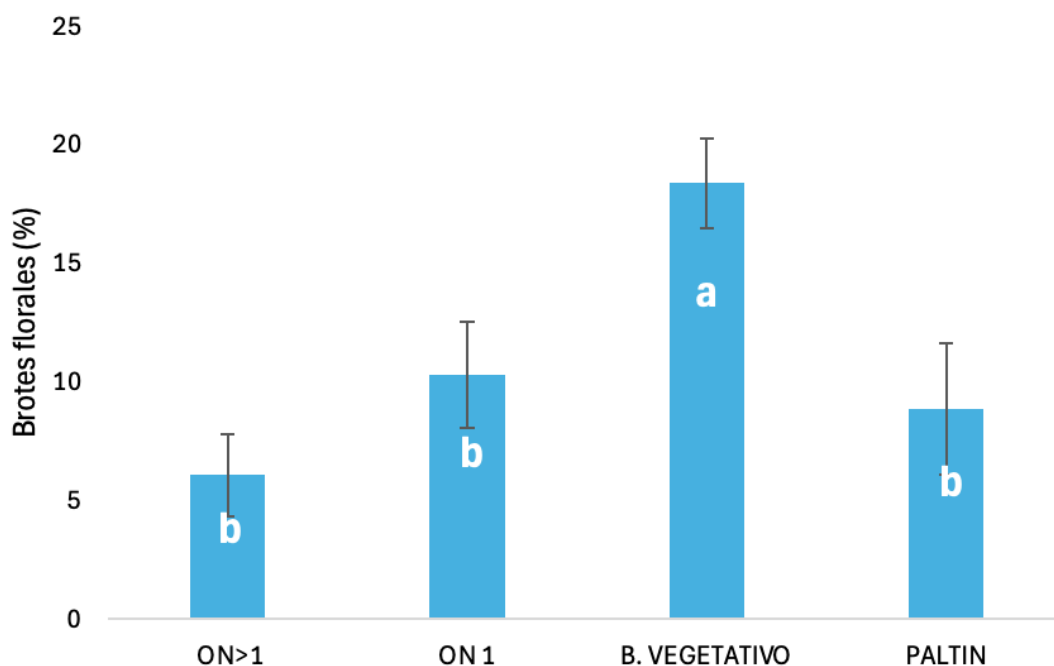


Figura 2. Influencia de la presencia del fruto sobre el porcentaje de brotes florales desarrollados en el aguacate. ON>1 y ON 1 significa ramas con más de un fruto o con un solo fruto, respectivamente, desarrollados hasta la maduración. Cada valor es la media de 3 ramas por árbol y 20 árboles. Las barras verticales indican el error estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $P<0.05$ ).

De estos brotes, en las ramas con más de un fruto el 4.4% fueron brotes indeterminados y el 1.7% determinados, en las ramas con un solo fruto el 6.2%



y el 4.1%, respectivamente, y en las ramas sin fruto el 12.3% y el 6.1%, respectivamente (Figs. 3 y 4).

En el caso de los brotes indeterminados, la diferencia entre las ramas con uno o varios frutos no fue estadísticamente significativa, difiriendo ambas de las ramas vegetativas, sin fruto ( $P < 0.05$ ).

En el caso de los brotes determinados, las ramas con un solo fruto y sin fruto no difirieron estadísticamente entre sí, pero sí de las ramas que desarrollaron varios frutos ( $P < 0.05$ ).

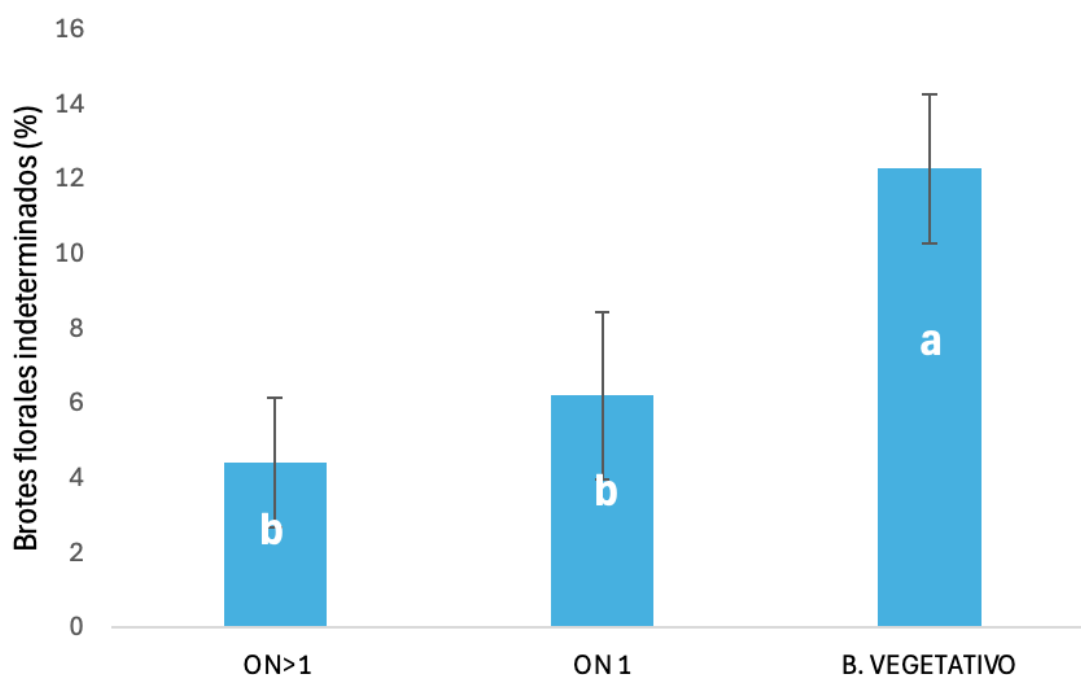


Figura 3. Influencia de la presencia del fruto sobre el porcentaje de brotes florales indeterminados desarrollados en el aguacate. ON>1 y ON 1 significa ramas con más de un fruto o con un solo fruto, respectivamente, desarrollados hasta la maduración. Cada valor es la media de 3 ramas por árbol y 20 árboles. Las barras verticales indican el error estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ).

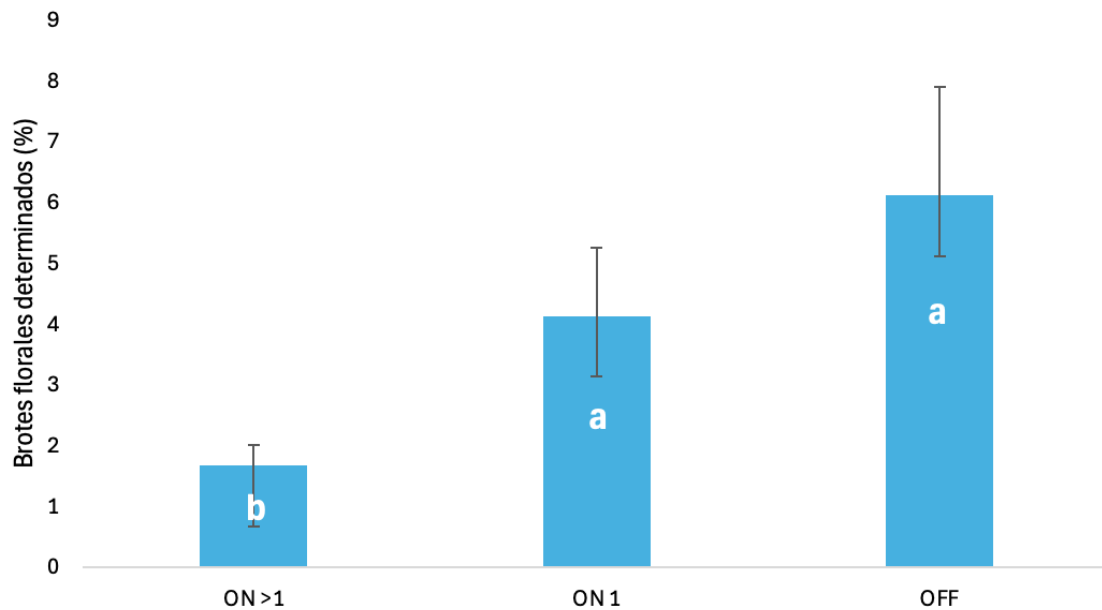


Figura 4. Influencia de la presencia del fruto sobre el porcentaje de brotes florales determinados desarrollados en el aguacate. ON>1 y ON 1 significa ramas con más de un fruto o con un solo fruto, respectivamente, desarrollados hasta la maduración. Cada valor es la media de 3 ramas por árbol y 20 árboles. Las barras verticales indican el error estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ).

#### 4.2. Efecto del fruto en la expresión de los genes de la floración

En las condiciones de Clima Mediterráneo de Valencia, la máxima expresión del gen inductor de la floración, *PaFT*, se dio a principios de noviembre, y la presencia del fruto reprimió su expresión a lo largo del periodo de inducción (Fig. 5)

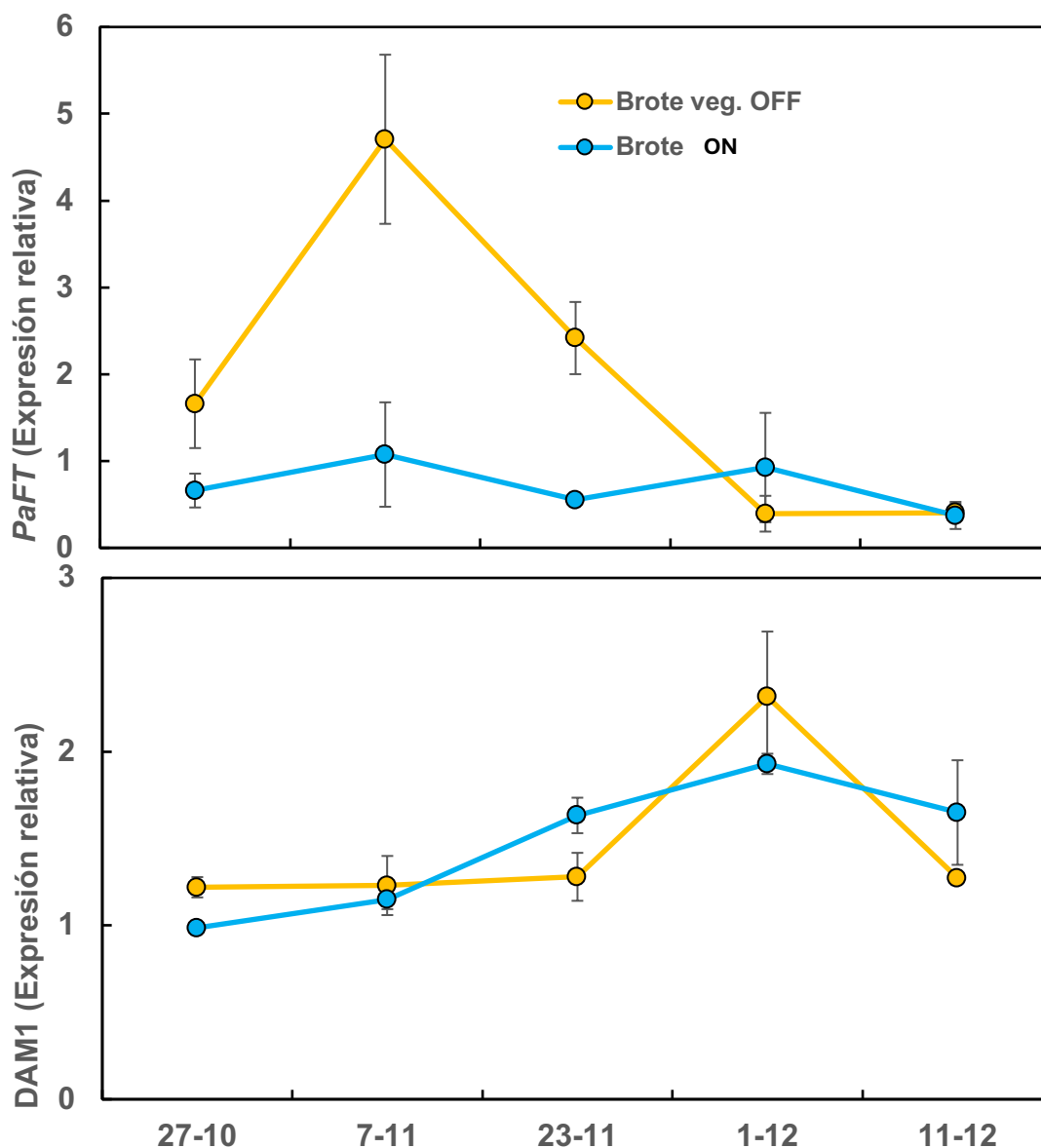


Figura 5.. Influencia de la presencia del fruto sobre la evolución de la expresión del gen inductor de la floración, *PaFT*, y su represor, *DAM1*, en hojas de brotes con varios frutos (brote ON) y sin frutos (brote vegetativo) del aguacate. Cada valor es la media de 3 muestras biológicas y 3 réplicas técnicas. Las barras verticales indican el error estándar; en algún caso éste es más pequeño que el tamaño del símbolo. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ).

La expresión del gen *DAM1* se vio alterada significativamente por la presencia del fruto a finales de noviembre ( $P < 0.05$ ), pero no en el momento de máxima expresión de *PaFT* en las hojas de brotes OFF (7-nov.) (Fig. 5). Una vez superado el periodo de inducción floral (1 diciembre.), la expresión en las hojas tanto de los brotes ON como OFF presentaron diferencias poco consistentes con la presencia del fruto y sin alcanzar la significación estadística.

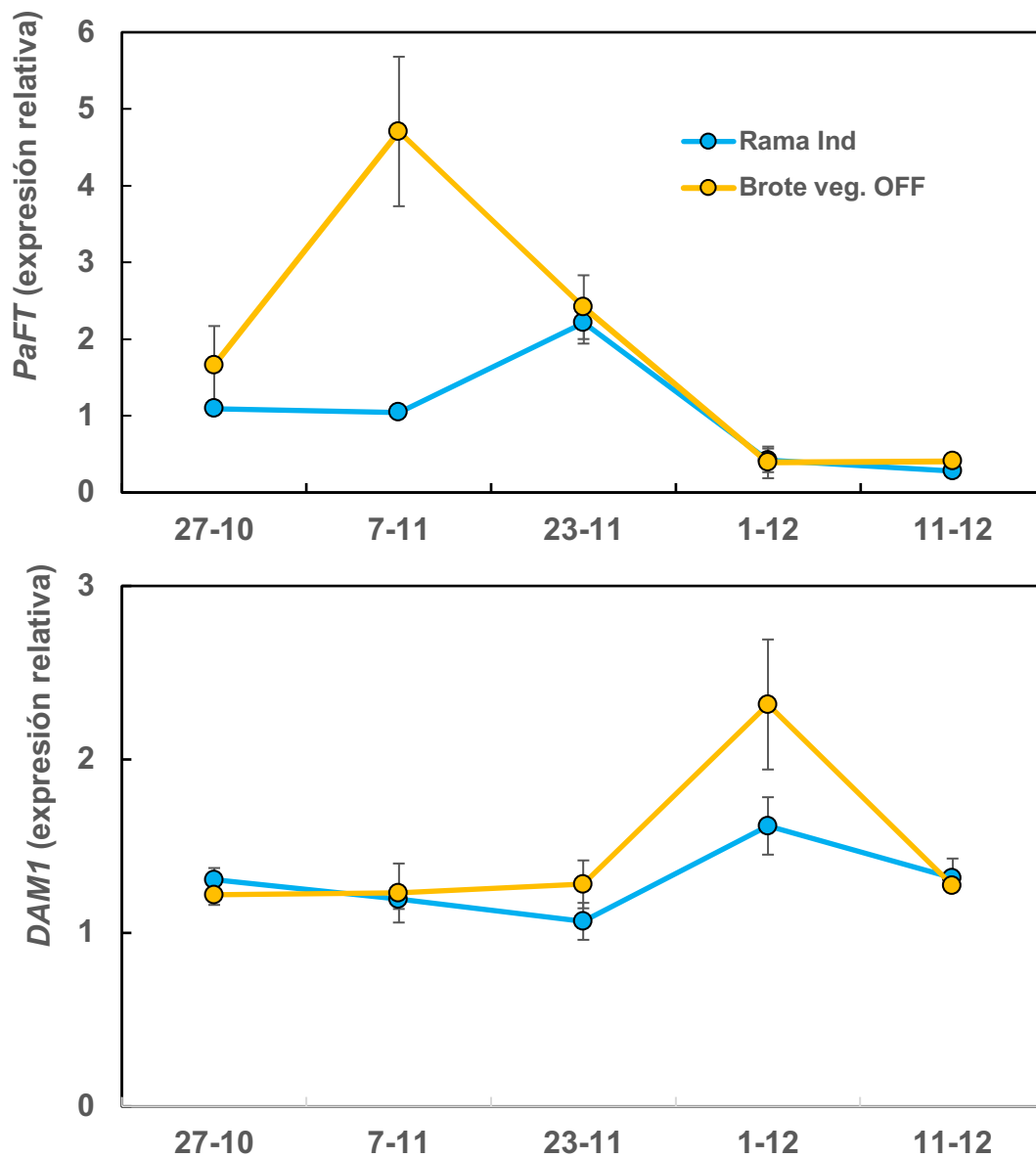


Figura 6. Influencia de la presencia del fruto sobre la evolución de la expresión del gen inductor de la floración, *PaFT*, y su represor, *DAM1*, en hojas de brotes indeterminados con un solo fruto (Rama ind.) y sin frutos (Brote vegetativo) del aguacate. Cada valor es la media de 3 muestras biológicas y 3 réplicas técnicas. Las barras verticales indican el error estándar; en algún caso éste es más pequeño que el tamaño del símbolo. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ).

En nuestro experimento, las hojas de los brotes indeterminados mostraron el pico de expresión del gen inductor de la floración *PaFT* 15 d más tarde que las de los brotes vegetativos, sin frutos (Fig.6).

En este caso, la expresión del gen *DAM1* no mostró diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ) entre ambos tipos de brotes durante el periodo de inducción floral. La diferencia observada el 1 de diciembre no debe tenerse en cuenta ya que tuvo lugar una vez superado dicho periodo, cuando ya la expresión en las hojas del gen inductor no difería entre ellos (Fig. 6).

# **V. DISCUSIÓN**

En muchas especies de frutales leñosos la intensidad de floración se ha relacionado con la presencia del fruto (ver la revisión de Monselise y Goldschmidt, 1982; Sadka et al., 2023). En las ramas en que éste se desarrolla la floración se reduce notablemente y hasta se anula, y la falta de frutos que ello conlleva permite que florezca al año siguiente, estableciéndose ciclos de alta y baja cosecha alternando con baja y alta floración, respectivamente, lo que se denomina alternancia de cosechas. El proceso continuado en los años ha sido estudiado molecularmente en los cítricos (Agustí et al., 2020; Mesejo et al., 2022); y en el aguacate, aunque la alternancia es muy pronunciada, ha sido también estudiada, pero con menor profundidad, (Ziv et al., 2014).

Nuestros resultados demuestran que apenas el 15% de las yemas de las ramas que soportan, al menos, un fruto, consiguen brotar. Salazar-García et al. (1998) y Ziv et al. (2014) obtuvieron resultados similares, pero no distinguieron el tipo de brote, y ello es importante puesto que el porcentaje de flores que cuajan viene determinado por el tipo de brote en el que se encuentran. Así las de los brotes determinados poseen una mayor capacidad de cuajado que las situadas en brotes indeterminados (Salazar-García y Lovatt, 1998), lo que correlaciona con la mayor concentración de GA<sub>1</sub> y transzeatina en sus ovarios (D'Asaro et al., 2021). Nuestros resultados indican que la reducción de la brotación afectó a ambos tipos de brotes, determinados e indeterminados, pero más intensamente a los primeros, lo que conlleva un mayor efecto negativo sobre la producción.

Este efecto, sin embargo, no es sólo consecuencia de la brotación. Así, mientras la brotación se redujo de un 21% de yemas brotadas de las ramas vegetativas a un 16% de las situadas en ramas con más de un fruto, la floración lo hizo de un 19% a un 6%. Esta falta de proporcionalidad indica un efecto directo del fruto sobre la floración. En efecto, nuestros resultados ratifican que la carga de frutos afecta negativamente el retorno de la floración al reprimir la expresión de *PaFT* en las hojas, como ya habían demostrado Ziv et al. (2014).

El control de la expresión de los genes homólogos de *FT* en las especies frutícolas está relacionado con varias señales ambientales externas y con diferentes factores endógenos. Por ejemplo, se ha demostrado que las bajas temperaturas de otoño inducen la acumulación de genes que codifican *FT* en el tallo de los cítricos (Nishikawa et al., 2007) y en las hojas del mango (Nakagawaa et al., 2012), sugiriendo que éste podría ser un mecanismo común de algunas

leñosas perennes para controlar la inducción floral. En coherencia con ello, el retorno de la floración del aguacate 'Hass' también requiere de bajas temperaturas que se correlacionan con el aumento de la expresión de *PaFT* (Ziv et al., 2014), como ocurre en nuestro estudio. Por otra parte, nuestros resultados también indican que la presencia del fruto impide el reconocimiento de esta señal por parte de la hoja.

Alternativamente, otros modelos sugieren que el fruto, directa o indirectamente, altera el estado nutricional y/u hormonal de la planta, explicando así su acción sobre la expresión de *PaFT*, con independencia de la baja temperatura como señal inductora de floración (Muñoz-Fambuena et al., 2011).

El fruto en desarrollo es un fuerte sumidero de carbohidratos producidos en las hojas. Estudios recientes evidencian, en *Arabidopsis*, el papel de los azúcares en la expresión de *AtFT* y, por tanto, en la inducción y regulación temporal de la floración (King et al., 2008). En consecuencia, durante las últimas décadas se ha sugerido la posibilidad de que los azúcares desempeñen una función reguladora de la floración en los frutales (Li et al., 2003), y resultados recientes indican que, durante los años OFF, la ausencia de frutos de aguacate 'Hass' incrementan los niveles foliares de azúcares, lo que correlaciona con un incremento en la expresión de *PaFT* (Ziv et al., 2014). Nuestros resultados coinciden con ello, ya que la reducción de la expresión de *PaFT* provocada por la cosecha es mayor en las hojas de los brotes indeterminados con más de un fruto que en los que sólo poseen uno o ninguno (brotes vegetativos), lo que resulta lógico, de acuerdo con dicha hipótesis, ya que cuantos más frutos desarrolla un brote mayor es la capacidad sumidero que desarrollan en conjunto. Por otra parte, el número de nuevos brotes determinados es menor en los que poseían más de un fruto, en un orden idéntico al de la expresión del gen inductor (ver Fig. 4).

También se ha propuesto que la exportación de giberelinas desde el fruto a las hojas es la razón de que éste inhiba la floración de las especies frutales, como es el caso de los cítricos (Guardiola et al., 1982) y el aguacate (Salazar-García y Lovatt, 1998). Esta hipótesis está basada en la respuesta a la aplicación foliar de GA<sub>3</sub> en la época de inducción floral, que la reduce marcadamente, siendo su acción a través de la represión en la expresión de *FT*, como se ha demostrado en el naranjo dulce (Muñoz-Fambuena et al., 2012), el mango (Nakagawaa et al., 2012), y en el propio aguacate (Salazar-García y Lovatt, 2000). Sin embargo,



no existen pruebas que apoyen el movimiento de estas hormonas desde el fruto a las hojas y/o yemas.

El estudio molecular del comportamiento alternante se abordó, por primera vez, en los cítricos, demostrando que el fruto reduce la expresión del gen inductor *FLOWERING LOCUS T (FT)* (Muñoz-Fambuena et al., 2011), a través de la activación epigenética del gen *CcMADS19* (Agustí et al., 2020). En el aguacate, este proceso no ha sido demostrado y se ha propuesto que es a través de la expresión del gen *DAM1* que se une al promotor *FT* e inhibe su expresión en *Arabidopsis* (Lee y Lee, 2010) y *E. ésula* (Hao et al., 2015). Pero nuestros resultados no encuentran un mecanismo similar en el aguacate. Las diferencias entre los brotes ON y OFF son inexistentes para las fechas de máxima expresión del gen inductor *PaFT*, con independencia del número de frutos desarrollados, y las encontradas aparecen una vez superado el periodo de inducción floral. En consecuencia, el mecanismo represor de la floración inducido por el fruto permanece por determinar en el aguacate.

# **VI. CONCLUSIONES**

A la vista de estos resultados, de nuestro trabajo se extraen las siguientes conclusiones:

1. El fruto reduce la floración a) disminuyendo el número de yemas que brotan, y b) a través de la reducción de la expresión del gen *PaFT* inductor de la floración.
2. La represión de este gen inductor no ha correlacionado con el gen *DAM1*.
3. El efecto represor del fruto sobre la brotación y la floración es independiente del número de frutos desarrollados por rama y de la presencia de la semilla.
4. Los brotes determinados con más de un fruto son los más sensibles y se ven más afectados que los indeterminados.

# **VII. BIBLIOGRAFÍA**

- Agustí M, Mesejo C, Muñoz-Fambuena N, Vera-Sirera F, de Lucas M, Martínez-Fuentes, A, Reig C, Iglesias DJ, Primo-Millo E, Blázquez, M.** 2020. Fruit-dependent epigenetic regulation of flowering in Citrus. *New Phytol.* 225: 376-384.
- Aleyda Acosta-Rangel, Rui Li, Peggy Mauk, Louis Santiago, Carol J. Lovatt.** 2021. Effects of temperatura, soil moisture and light intensity on the temporal pattern of floral gene expression and flowering of avocado buds (*Persea americana* cv. Hass). *Scientia Horticulturae* 280: 109940.
- Andrés F, Coupland G.** 2012. The genetic basis of flowering responses to seasonal cues. *Nature Reviews Genetics* 13: 627–639.
- Ahsan MU, Barbier F, Hayward A, Powell R, Hofman H, Parfitt SC, Wilkie j, Beveridge CA, Mitter N.** 2023. Molecuylar cues for phenological events in the flowering cycle in avocado. *Plants* 12: 2304.
- Barbier FF, Dun EA, Kerr SC, Chabikwa TG, Beveridge CA.** 2019. An update on the signals controlling shoot branching. *Trends Plant Sci.* 24: 220-236.
- Blázquez MA, Ahn JH, Weigel D.** 2003. A thermosensory pathway controlling flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genetics* 33: 168–171.
- Cassin J, Bourdeuet J, Fougue A, Furon V, Gaillard JP, Bourdelles J, Montaguad G, Moreuil C.** 1969. The influence of climate upon the blooming of citrus in tropical areas. *Proc. First Intl. Citrus Symp.* 1:315–323.
- Conner PJ, Worley RE.** 2000. Alternate bearing intensity of pecan cultivars. *HortSci.* 35: 1067-1069.
- Chica EJ, Albrigo LG.** 2013. Expression of flower promoting genes in sweet orange during floral inductive water deficits. *J. Amer. Soc. Hortic. Sci.* 138: 88-94.
- Chan BC, Cain JC.** 1967. The effect of seed formation on subsequent flowering in apple. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 91:63-67.
- D'Asaro A, Reig C, Martínez-Fuentes A, Mesejo C, Farina V, Agustí M.** 2021. Hormonal and carbohydrate control of fruit set in avocado 'Lamb Hass'. A question of the type of inflorescence? *Sci. Hortic.* 282: 110046.
- Falavigna VdS, Guitton B, Costes E, Andrés F.** 2019. I want to (bud) break free: The potential role of *DAM* and *SVP-Like* genes in regulating dormancy cycle in temperate fruit trees. *Front. Plant Sci.* 9: 1990.

- Finnegan EJ, Dennis ES.** 2007. Vernalization-induced trimethylation of histone H3 lysine 27 at FLC is not maintained in mitotically quiescent cells. *Current Biology* 17: 1978–1983.
- Fichtner F, Barbier FF, Kerr SC, Dudley C, Cubas P, Turnbull C Brewer PB, Beveridge CA.** 2021. Plasticity of bud outgrowth varies at cauline and rosette nodes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 188, 1586–1603.
- Garner LC, Lovatt CJ.** 2008. The relationship between flower and fruit abscission and alternate bearing of ‘Hass’ avocado. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 133: 3–10.
- Goldberg-Moellera R, Shaloma L, Shlizermana L, Samuelsa S, Zura N, Ophir R, Bulmwald E, Sadka A.** 2013. Effects of gibberellin treatment during flowering induction period on global gene expression and the transcription of flowering-control genes I Citrus buds. *Plant Sci.* 198: 46-57.
- Guardiola JL, Monerri C, Agustí M.** 1982. The inhibitory effect of gibberellic acid on flowering in citrus. *Physiol Plant* 55: 136–142.
- Hanzawa Y, Money T, Bradley D.** 2005. A single amino acid converts a repressor to an activator of flowering. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 7748-7753.
- Hao X, Chao W, Yang Y, Horvath D.** 2015. Coordinated expression of *FLOWERING LOCUS T* and *DORMANCY ASSOCIATED MADS-BOX-like* genes in leafy spurge. *PLoS ONE* 10: e0126030.
- Hartmann U, Höhmann S, Nettesheim K, Wisman E, Saedler H, Huijser P.** 2000. Molecular cloning of SVP: A negative regulator of the floral transition in *Arabidopsis*. *Plant J.* 21: 351-360.
- Hou XJ, Liu SR, Khan MRG, Hu CG, Zhang JZ.** 2014. Genome-wide identification, classification, expression profiling, and SSR marker development of the MADS-box gene family in Citrus. *Plant Molecular Biology Reporter* 32: 28-41.
- Huet J.** 1972. Etude des effets des feuilles et des fruits sur l'induction florale des brachyblastes du Poirier. *Physiol. Veg.* 10: 529-545.
- King RW, Hisamatsu T, Goldschmidt EE, Blundell C.** 2008. The nature of floral signals in *Arabidopsis*. I. Photosynthesis and a far-red photoresponse independently regulate flowering by increasing expression of *FLOWERING LOCUS T (FT)*. *J. Exp. Bot.* 59: 3811-3820.

- Lavee S.** 2007. Biennial bearing in olive (*Olea europaea*). *Annales Series Historia Naturalis* 17(1): 101–112.
- Lee J, Lee I.** 2010. Regulation and function of *SOC1*, a flowering pathway integrator. *J. Exp. Bot.* 61: 2247-254.
- Li CY, Weiss D, Goldschmidt EE.** 2003. Girdling affects carbohydrate-related gene expression in leaves, bark and roots of alternate-bearing citrus trees. *Ann. Bot.* 92: 137-143.
- Liebig GF, Chapman HD.** 1963. The effect of variable root temperatures on the behaviour of young Navel orange trees in the greenhouse. *Proc. Amer. Soc. Hortic. Sci.* 82: 204-209.
- Lovatt C.** 2010. Alternate bearing of ‘Hass’ avocado. *California Avocado Society 2010 Yearbook* 93:125-140.
- Luckwill LC.** 1970. The control of growth and fruitfulness of apple trees. En: LC Luckwill y CV Cuttings (Eds.). *The physiology of tree crops*. Academic Press, New York. pp. 237-254.
- Martínez-Fuentes A, Mesejo C, Agustí M, Reig C.** 2015. Toward a more efficient isolation of total RNA from loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) tissues. *Fruits* 70: 47-51.
- Martínez-Fuentes A, Mesejo C, Reig C, Agustí M.** 2010. Timing of the inhibitory effect of fruit on return bloom of ‘Valencia’ sweet Orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90: 1936–1943.
- Mesejo C, Marzal A, Martínez-Fuentes A, Reig C, de Lucas M, Iglesias DJ, Primo-Millo E, Blázquez MA, Agustí M.** 2022. Reversion of fruit-dependent inhibition of flowering in *Citrus* requires sprouting of buds with epigenetically silenced *CcMADS19*. *New Phytol.* 233: 526-533.
- Monselise SP, Goldschmidt, EE.** 1982. Alternate bearing in fruit trees. *Hortic. Rev.* 4: 128-173.
- Mukherjee SK.** 1953. The mango—its botany, cultivation, uses and future improvement, especially as observed in India. *Eco Bot* 7:130–162
- Muñoz-Fambuena N, Mesejo C, González-Mas C, Iglesias DJ, Primo-Millo E, Agustí M.** 2012. Gibberellic acid reduces flowering intensity in sweet Orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] by repressing *CiFT* gene expression. *J. Plant Growth Regul.* 31: 529-536.

- Muñoz-Fambuena N, Mesejo C, González-Mas C, Primo-Millo E, Agustí M, Iglesias DJ.** 2011. Fruit regulates seasonal expression of flowering genes in alternate-bearing 'Moncada' mandarin. *Ann. Bot.* 18: 511-519.
- Nakagawaa M, Honsho C, Kanzakia S, Shimizuc K, Utsunomiyaa N.** (2012) Isolation and expression analysis of FLOWERING LOCUS T-like and gibberellin metabolism genes in biennial-bearing mango trees. *Sci. Hortic.* 139: 108–117.
- Nishikawa F, Endo T, Shimada T, Fujii H, Shimizu T, Omura M, Ikoma Y.** 2007. Increased *CiFT* abundance in the stem correlates with floral induction by low temperature in Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.). *J. Exp. Bot.* 58: 3915–3927.
- Nishikawa F, Iwasaki M, Fukamachi H, Nonaka K, Imai A, Takishita F, Yano T, Endo T.** 2012. Fruit bearing suppresses Citrus FLOWERING LOCUS T expression in vegetative shoots of Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.). *J. Japan Soc. Hort. Sci.* 81: 48-53.
- Niu Q, Li J, Cai D, Qian M, Jia H, Bai S, Hussain S, Liu G, Teng Y, Zheng X.** 2016. Dormancy-associated MADS-box genes and microRNAs jointly control dormancy transition in pear (*Pyrus pyrifolia* white pear group) flower bud. *J. Exp. Bot.* 67: 239–257.
- Niwa M Daimon Y, Kurotani KI, Higo A, Pruneda-Paz, JL, Breton, G, Mitsuda N, Kay SA, Ohme-Takagi M, Endo M. Araki T.** 2013. *BRANCHED1* Interacts with *FLOWERING LOCUS T* to repress the floral transition of the axillary meristems in Arabidopsis. *Plant Cell* 25: 1228-1242.
- Rae GM, David K, Wood M.** 2013. The dormancy marker *DRM1/ARP* associated with dormancy but a broader role in planta. *Dev. Biol. J.* 2013: 632524.
- Rosenstock TS, Rosa UA, Plant RE, Brown PH.** 2010. A reevaluation of alternate bearing in pistacchio. *Sci. Hortic.* 124: 149-152.
- Sadka A, Walker CH, Haim D, Bennett T.** 2023. Just enough fruit: understanding feedback mechanisms during sexual reproductive development. *J. Exp. Bot.* 8: 2448-2461.
- Salazar-García S, Lord EM, Lovatt CJ.** 1998. Inflorescence and flower development of the 'Hass' avocado (*Persea americana* Mill.) during "On" and "Off" crop years. *J. Amer. Hortic. Sci.* 123: 537-544.



- Salazar-García S, Lovatt CJ.** 1998. GA<sub>3</sub> application alters flowering phenology of 'Hass' avocado. *J. Amer. Soc. Hortic. Sci.* 123: 791–797.
- Salazar-García S, Lovatt CJ.** 2000. Use of GA<sub>3</sub> to manipulate flowering and yield of avocado. *J. Amer. Soc. Hortic. Sci.* 125: 25-30.
- Searle I, He Y, Turck F, Vincent C, Fornara F, Kröber S, Amasino RA, Coupland G.** 2006. The transcription factor *FLC* confers a flowering response to vernalization by repressing meristem competence and systemic signaling in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 20: 898-912.
- Shalom L, Samuels S, Zur N, Shlizerman L, Zemach H, Weissberg M, Ophir R, Blumwald E, Sadka A.** 2012. Alternate bearing in citrus: changes in the expression of flowering control genes and in global gene expression in ON versus OFF-crop trees. *PLoS ONE* 7: e46930.
- Sheldon CC, Rouse DT, Finnegan EJ, Peacock WJ, Dennis ES.** 2000. The molecular basis of vernalization: the central role of *FLOWERING LOCUS C (FLC)*. *PNAS, USA* 97: 3753– 3758.
- Spinelli F, Fiori G, Noferini M, Sprocatti M, Costa G.** 2009. Perspectives on the use of a seaweed extract to moderate the negative effects of alternate bearing in apple trees. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 84: 131–137.
- Suárez-López P, Wheatley K, Robson F, Onouchi H, Valverde F, Coupland G.** 2001. *CONSTANS* mediates between the circadian clock and the control of flowering in *Arabidopsis*. *Nature* 410: 1116–1120.
- Tuan PA, Bai S, Saito T, Ito A, Moriguchi T.** 2017. Dormancy-Associated MADS-Box (*DAM*) and the abscisic acid pathway regulate pear endodormancy through a feedback mechanism. *Plant Cell Physiol.*,58: 1378-1390.
- Voogd C, Wang T, Varkonyi-Gasic E.** 2015. Functional and expression analyses of kiwifruit *SOC1-like* genes suggest that they may not have a role in the transition to flowering but may affect the duration of dormancy. *J. Exp. Bot.* 66: 4699-4710.
- Wickland DP, Hanzawa Y.** 2015. The *FLOWERING LOCUS T/TERMINAL FLOWER 1* Gene Family: Functional Evolution and Molecular Mechanisms. *Mol. Plant* 8: 983–997.

- Wood M, Rae GM, Wu R-M, Walton EF, Xue B, Hellens RP, Uversky VN.** 2013. Actinidia *DRM1* - An intrinsically disordered protein whose mRNA expression is inversely correlated with spring budbreak in Kiwifruit. PLoS ONE 8: e57354.
- Yang Q, Gao Y, Wu X, Moriguchi T, Bai S, Teng Y.** 2021 Bud endodormancy in deciduous fruit trees: Advances and prospects. Hortic. Res. 8: 139.
- Ziv D, Zviran T, Zezak O, Samach A, Irihimovitch V.,** 2014. Expression profiling of *FLOWERING LOCUS T*-like gene in alternate bearing ‘Hass’ avocado trees suggests a role for *PaFT* in avocado flower induction. PLoS One 9.

# ANEJO I

## Relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la agenda 2030 Anexo al Trabajo de Final de Grado

A. Indicar el grado de relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS).

	Alto	Medio	Bajo	No procede
ODS 1. Fin de la pobreza	X			
ODS 2. Hambre cero	X			
ODS 3. Salud y bienestar		X		
ODS 4. Educación de calidad		X		
ODS 5. Igualdad de género				X
ODS 6. Agua limpia y saneamiento				X
ODS 7. Energía asequible y no contaminante				X
ODS 8. Trabajo decente y crecimiento económico			X	
ODS 9. Industria, innovación e infraestructuras				X
ODS 10. Reducción de las desigualdades				X
ODS 11. Ciudades y comunidades sostenibles				X
ODS 12. Producción y consumo responsables			X	
ODS 13. Acción por el clima				X
ODS 14. Vida submarina				X
ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres				X
ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas				X
ODS 17. Alianzas para lograr objetivos.				X

B. Describir brevemente la alineación del TFM con los ODS, marcados en la tabla anterior, con un grado alto.

ODS 1. Al explorar cómo la producción de aguacates, un cultivo de alto valor económico puede optimizarse. Al estudiar el efecto inhibitor del fruto en la floración y su relación con la inflorescencia y la semilla, puedes contribuir a mejorar la productividad agrícola. Esto no solo puede aumentar los ingresos de los agricultores, sino también fomentar el desarrollo económico en comunidades vulnerables y reducir la pobreza al crear empleo y mejorar las condiciones económicas en áreas donde se cultiva aguacate.

ODS 2. Al centrarse en mejorar la producción de aguacates, un alimento nutritivo y valioso. Al investigar cómo el fruto afecta la floración del aguacate, buscas optimizar su cultivo y aumentar el rendimiento de las cosechas. Esto puede contribuir a una mayor disponibilidad de alimentos y a la seguridad alimentaria, ayudando a satisfacer las necesidades nutricionales y reducir el hambre en comunidades que dependen de este cultivo.