

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA  
Máster en Producción Vegetal y Ecosistemas Agroforestales



Expresión temporal de los genes de la floración del níspero japonés (*Eriobotrya japonica* Lindl).

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Presentado por:

D<sup>a</sup>. Andrea Haudorf Venegas

Dirigido por:

Prof. D<sup>a</sup>. Carmina Reig Valor

Valencia, Junio de 2012



## **Agradecimientos**

Quiero agradecer en primer lugar a Carmina y a Manolo por la oportunidad que me han dado al permitirme hacer este trabajo, no saben cuánto significa para mi poder acabar este máster de tan buena manera, no solo me han introducido en un área en la que jamás pensé que iba a trabajar, sino que además han sido un ejemplo de cómo se debe pensar, ser y hacer en la vida laboral.

También quiero agradecer a Amparo, porque juntas nos metimos en este mundo, entre polifenoles, primers y FT's, que nos dieron no pocos dolores de cabeza al principio. Su optimismo, alegría, y su increíble fuerza para enfrentar las dificultades son características que para mí la definen como una súper mujer, sobre todo por aguantarme cuando las cosas se ponían más difíciles. El mensaje que me llevo de ti está muy claro: Ilusión.

A Carlos, porque aunque no trabajamos juntos, siempre estuviste dispuesto a discutir algún problema que se presentara, a animarme cuando las cosas no salían, y porque a veces, la buena vibra es lo único que se necesita para seguir adelante y seguir intentando que las cosas salgan bien.

A Miguel Pérez-Amador y Juan Carbonell, del IBMCP, gracias por recibirnos con tanta amabilidad, por dedicarnos tiempo e interés para solucionar un problema que para nosotros era un mundo, pero sobre todo por hacernos sentir siempre que éramos bien recibidas.

A Javier Agustí por todos sus consejos, apoyo y paciencia

A Ana Alfaro, gracias por tus correcciones tan atentas, por tu tremenda amabilidad y por darnos siempre ánimos.

A la futura doctora, Natalia, por las conversaciones en el laboratorio, y por la buena onda, las risas, pero sobre todo por tu optimismo!

A Ruben y Pati, porque fueron como mi segunda familia, eran el mejor pedacito del norte de España que podía tener, justo aquí en Valencia.

A Rikar, porque no podría explicar aquí todo lo que hiciste por mí, me alegro de haber compartido todo ese tiempo contigo, sé muy bien que desde Polonia estás orgulloso tú también de que esta tesina haya llegado a su final.

Y Finalmente, pero no menos importante, a mi mamá Mati y a mi mamá, pensar en ustedes ha sido siempre mi mayor motivación.

## Resumen

Los procesos de inducción y diferenciación floral han sido ampliamente estudiados, bajo un punto de vista molecular, en plantas herbáceas pero no en especies leñosas en las que su ciclo vegetativo, largo y anual, lo dificultan en gran medida. Un ejemplo de ello es el níspero japonés (*Eriobotrya japonica* Lindl.) cuyo proceso de transición floral es prácticamente desconocido.

En este trabajo, se estudia bajo un punto de vista molecular, la expresión relativa de los genes implicados en la inducción floral de esta especie, como FLOWERING LOCUS T (*FT*) y SUPRESOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 (*SOC1*), así como genes implicados en su diferenciación, LEAFY (*LFY*), APETALA1 (*AP1*) Y TERMINAL FLOWER 1 (*TFL1*).

Para ello se han muestreado hojas y ápices, en distintas épocas, desde aproximadamente después de la recolección hasta el momento de la diferenciación floral, con el fin de determinar el momento en que ésta ocurre así como el periodo de inducción floral.

Nuestros resultados reflejan, a través de una máxima expresión del gen promotor de la inducción (*FT*) en las hojas, que la época de inducción floral en esta especie se localiza entre mediados de mayo y principios de junio. Por otra parte, la máxima expresión de los genes promotores de la diferenciación floral (*LFY*, *AP1*), encontrada a partir de mediados de agosto en los ápices, indica que esta ocurre desde mediados de este mes. Estos resultados contribuyen a mejorar los conocimientos acerca de la floración de las especies leñosas y, en particular, del níspero japonés.

## Abstract

Floral induction and differentiation have been extensively studied under a molecular point of view in herbaceous plants, but not in woody species, in which it's long and annual vegetative growth make it difficult. This is the case of loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) whose floral transition process is practically unknown.

In this work, we study the relative expression levels of the genes involved in loquat floral induction, such as FLOWERING LOCUS T (*FT*) and SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 (*SOC1*) and genes involved in their differentiation, such as LEAFY (*LFY*), APETALA1 (*AP1*) and TERMINAL FLOWER 1 (*TFL1*).

For this purpose, leaves and apical shoots were periodically sampled, from harvest time up to floral differentiation, in order to determine when inductive and differentiation processes take place.

Our results show, through a maximum expression in leaves of the flower induction promoter gene (*FT*), that the inductive floral period occurs between mid-May and early June, and through the maximum expression of the floral differentiation promoter genes (*LFY*, *AP1*), in mid-August, floral differentiation starts. These results contribute to improve knowledge about the flowering of woody species and in particular the loquat tree.

## Resum

Els processos d'inducció y diferenciación a flor han sigut ampliament estudiats, baix un punt de vista molecular, amb les plantes herbàcies y no amb les llenyoses en les que el seu cicle vegetatiu llarg y anual ho dificulten amb gran mesura. Un exemple clar es el nesprer del japó (*Eriobotrya japonica* Lindl.) del que apenes es coneix el procés de la seua transició a flor.

En aquest treball s'estudia baix un punt de vista molecular l'expressió relativa dels gens implicats amb l'inducció a flor d'aquesta espècie, com som el FLOWERING LOCUS T (FT) i SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 (SOC1), així com els gens implicats amb la seua diferenciació, LEAFY (LFY), APETALA1 (AP1) y TERMINAL FLOWER 1 (TFL1).

Amb aquest objectiu s'han mostret fulles y meristems en èpoques diferents, aproximadament des de després de la collita fins el moment de la diferenciació a flor, per tal d'establir l'època d'aquesta, així com la de l'inducció a flor.

Els nostres resultats reflecteixen, a través d'una màxima expressió del gen promotor de l'inducció (FT) en les fulles, que l'època de inducció a flor en aquesta espècie es troba entre a mitjan de maig i principi de juny. Per altra banda la màxima expressió dels gens que promouen la diferenciació a flor (LFY,AP1) trobada des de mitjan d'agost en els meristems indica que aquesta te lloc en aquest moment. Aquestos resultats contribueixen a millorar els coneiximents de la floració de les espècies llenyoses, particularment les del nespres.

## INDICE

Resumen	3
Abstract	4
Resum	5
Introducción	
1.1. Origen y difusión	8
1.2. Clasificación botánica y agronómica	8
1.3. Importancia agronómica	10
1.4. Inducción y diferenciación floral	10
1.5. Control hormonal de la floración	13
1.6. Control ambiental	16
1.7. Control nutricional	20
1.8. Control genético	21
Materiales y métodos	
2.1. Material vegetal	28
2.2. Extracción de ARN	28
2.2.1. Protocolo de extracción de ARN total desarrollado en el presente estudio	29
2.3. Diseño de oligonucleótidos	31
2.4.1. Retrotranscripción	33
2.4.2. qPCR	33
Resultados	
3.1. Desarrollo de un método de extracción de ARN total en níspero	34
3.2. Análisis de la expresión de los genes integradores de la transición floral	37
3.3. Análisis de expresión de los genes responsables de la identidad del meristemo	42
4. Discusión	44
5. Conclusiones	48
6. Referencias bibliográficas	49





## **1. -Introducción**

### **1.1.- Origen y difusión**

Esta especie es originaria del sur de China, de zonas cercanas al río Dahube y al sureste de la cordillera Gongga. Desde ahí se difundió a Japón, donde existen datos de su cultivo desde hace más de mil años. En el año 1784 se introdujo, como planta ornamental, en París y en 1787 en Londres, desde donde se distribuyó por toda la cuenca del mediterráneo llegando a países como Italia, España, Grecia, Túnez y Turquía. Más tarde entre 1867 y 1870 fue llevada desde Europa a California, donde comenzó su difusión por América.

Debido a su rápida difusión, a la fácil propagación por semillas y a la selección de mutantes, la especie se ha diversificado ampliamente y actualmente existen en el mundo numerosos cultivares autóctonos. Sólo en China existen 379 variedades cultivadas y en España se han registrado 123 accesiones, de las cuales el 64% son autóctonas.

### **1.2.- Clasificación botánica y agronómica**

El níspero japonés (*Eriobotrya japonica* Lindl.), pertenece a la familia de las Rosáceas, subfamilia Maloideas, dentro de la cual están incluidas varias especies de interés agronómico como el manzano y el peral, entre otras.

Esta especie florece en otoño, cuaja sus frutos en invierno, durante el cual se desarrolla el fruto hasta madurar en primavera. Inicia el desarrollo vegetativo tras la recolección, en primavera, prolongándose durante todo el verano, al mismo tiempo que se produce la inducción floral y diferenciación de las yemas. El ciclo de desarrollo del níspero japonés se ilustra en la figura 1.

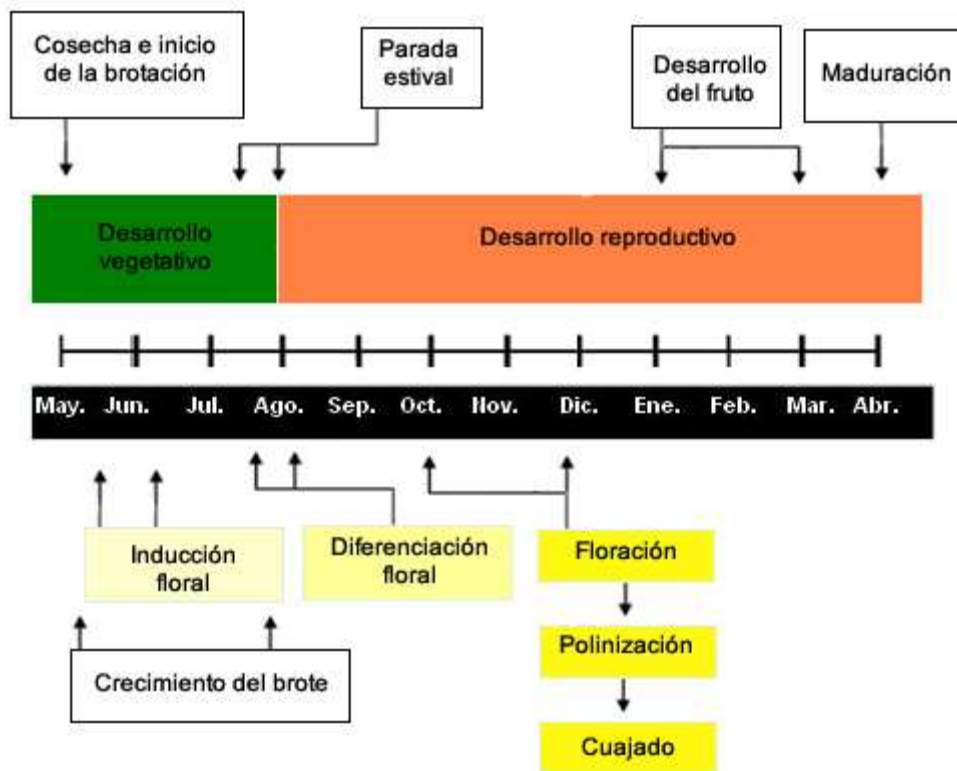
El níspero se encuentra bien adaptado a las condiciones mediterráneas y se desarrolla y fructifica en las mismas zonas donde se concentra la producción de cítricos. Se adapta bien a suelos que tengan buen drenaje, y crece bien en suelos tanto alcalinos como ácidos. El níspero japonés es un árbol vigoroso, puede alcanzar los 5-6 metros de altura, cuando no se poda, y tiene una rápida entrada en producción, a partir de los 2-3 años. Tiene una raíz

pivotante que puede alcanzar los 2,5 metros de profundidad.

Las hojas son alternas, elíptico-lanceoladas, coriáceas, pueden medir entre 18 y 45 cm y están cubiertas por tricomas en su cara abaxial que le confieren un aspecto blanquecino.

Posee dos tipos de yemas: yemas vegetativas, que originan los brotes vegetativos, y yemas mixtas, que originan los brotes mixtos compuestos por hojas y una inflorescencia en posición terminal.

La inflorescencia terminal es una panícula de forma piramidal de entre 18-40 cm de longitud, en la que se insertan de 5 a 10 brazos que contienen entre 50 y 70 flores. La brotación secundaria o anticipada florece más tarde y no llega a producir frutos de tamaño comercial.



**Figura 1:** Representación del ciclo anual de desarrollo del níspero japonés (*Eriobotrya japonica*).

Las flores son hermafroditas, blancas y pequeñas. El cáliz está formado

por cinco sépalos soldados, y la corola por cinco pétalos libres. El ovario está adherido al cáliz, por esto al formarse el fruto se pueden ver restos calicinianos, característica común en las Maloideas.

### **1.3.- Importancia agronómica**

El cultivo del níspero japonés se encuentra ubicado entre los paralelos 25° y 38°, en el hemisferio norte y sur. Los centros de producción más importantes son China, Japón y la cuenca del Mediterráneo, en la que destaca España como principal productor.

A nivel mundial China es el principal productor, con una superficie cultivada de 120.000 ha y una producción estimada de 460.000 t/año. España con 3.700 ha cultivadas y 45.000 t/año, de las que alrededor del 50% se exportan en fresco a países próximos, principalmente a Italia, Francia y Portugal. España es el primer país exportador mundial de este cultivo.

La zona productora de España se encuentra mayoritariamente en la Comunidad Valenciana, concentrada en la provincia de Alicante, con un 59% de la producción, seguida de Andalucía, con el 39% restante, localizado básicamente en la provincia de Almería.

### **1.4.- Inducción y diferenciación floral.**

La *inducción floral* es el proceso que tiene lugar en el interior de un meristemo, modificando su contenido y la distribución de nutrientes y reguladores del desarrollo, inducido por cambios de temperatura y de fotoperiodo, y por estrés, que determinan su desarrollo reproductivo y no vegetativo.

La posterior diferenciación morfológica que sigue y que conduce al desarrollo de una flor o una inflorescencia y a los elementos florales se conoce como *diferenciación floral*.

La inducción floral consta de dos fases: una reversible, durante la cual la interrupción de los factores inductores anula la programación reproductiva de

las yemas, y otra irreversible, en la cual la evolución endógena no es alterada.

La inducción se hace irreversible unas 4-5 semanas antes de iniciarse los cambios morfológicos o diferenciación floral, cuyo primer síntoma es el aplanamiento del ápice seguido de la aparición de los primordios de sépalos. Las etapas posteriores del proceso morfogenético consisten en la diferenciación de los primordios de pétalos, estambres y, por último, los carpelos (Bernier et al, 1981; Faust 1989). Para que este proceso se pueda llevar a cabo, se necesita un estímulo que provoque en los meristemas la evocación floral. Ya en el año 1936, Chailakhyan denominó a dicho estímulo “florigeno” y lo definió como una sustancia universal y específica, producida en las hojas y transportada por el floema hasta el meristemo indiferenciado, al que entrega una señal que le indica que debe adquirir una identidad floral. Este estímulo es transmisible por injerto desde plantas inducidas a no inducidas de una misma especie, e incluso entre especies diferentes. Estas observaciones plantearon la hipótesis del control hormonal de la floración, atribuyéndole al “florigeno” una función de tipo hormonal.

La dificultad de trabajar con especies leñosas hace que se conozca menos sobre estos procesos fisiológicos. Al tratarse de especies perennes y caducifolias, indistintamente, han tenido que adaptar sus ciclos vegetativos y reproductivos a estas condiciones y, por tanto, perder las hojas, o no, en otoño y cesar el desarrollo de sus meristemas. A pesar de ello, la importancia de la presencia de hojas para el desarrollo de las yemas reproductivas se ha demostrado en ambos tipos de especies, perennifolias, como en el mango (Reece et al., 1949), olivo (Hackett y Hartmann 1964), níspero japonés (Fatta del Bosco 1961), cítricos (Ayalon y Monselise 1960), y caducifolias, como el manzano (Harley et al., 1932) y el melocotonero (Li et al., 2010).

Mediante la defoliación de ramas en diferentes épocas y el estudio histológico del ápice, algunos autores han estimado el período de inducción floral en el níspero japonés para el hemisferio norte entre mediados de julio y principios de agosto. (Liu et al 2006; Cuevas y del Grosso, 2011).

Otros autores, como Fatta del Bosco (1961) y Reig et al. (2011) mediante defoliaciones y aplicaciones de ácido giberélico, respectivamente, determinaron la época de inducción floral de esta especie entre mediados de

mayo y principios de junio para el HN.

Un aspecto de especial importancia en este proceso es la edad o estado de desarrollo de la hoja. En este sentido, muchos autores matizan la necesidad de la presencia de hojas maduras en el momento en que se dan las condiciones inductivas para garantizar el proceso (Pérez-Barraza et al., 2006). A este respecto resulta crucial conocer la fenología de esta especie, principalmente su brotación, para comprender mejor los aspectos básicos de su floración en general, y de su inducción y diferenciación floral en particular, y que se reflejarán en nuestros resultados.

La brotación de esta especie se inicia en primavera, mayoritariamente después de la recolección, a partir de yemas laterales de brotes reproductivos ya cosechados, y se desarrolla vegetativamente durante todo el verano, descendiendo en intensidad en otoño. A esta brotación le sigue en importancia la que se conoce como brotación de verano, que se inicia a partir de yemas laterales de los brotes anteriores, originándose, por tanto, sobre los brotes del mismo año; estos brotes, que se conocen como brotes anticipados, crecen también a lo largo del verano, pero con una tasa de crecimiento mucho más alta (Agustí y Reig 2006; Reig 2010). En ambos tipos de brotes, el meristemo cesa temporalmente su actividad vegetativa tras la fase de formación de los nudos y elongación rápida de los entrenudos, a mediados de julio; este cese se conoce como parada estival, que es provocada, probablemente, por una combinación de altas temperaturas y déficit hídrico (Cuevas et al., 1997).

El crecimiento de estos brotes se produce en diferentes flujos, lo que es frecuente en especies tropicales. El primero se inicia tras la recolección y alcanza hasta mediados de mayo, caracterizándose por un rápido crecimiento del brote que se traduce en la formación, por término medio, de 3,6 hojas nuevas por brote, equivalente a un plastocrono de 0,26 hojas/día. Posteriormente el crecimiento es escalonado hasta principios de julio, momento en el que se observa una ralentización en la emisión de hojas nuevas que conlleva una reducción del plastocrono hasta 0,1 hojas/día. El segundo se inicia después de la parada estival, aproximadamente a mediados de agosto, cuando los brotes vuelven a emitir hojas nuevas; este último crecimiento se frena posteriormente hasta detenerse por completo a principios de septiembre

con la emisión de la panícula (Jiménez, 2010). En términos generales, por tanto, el brote del níspero japonés crece en un primer impulso formando 4-5 hojas, deteniéndose a continuación de manera temporal, y retoma de nuevo el crecimiento formando otras 5-6 hojas, con una duración total aproximada de 8-10 semanas.

Una vez recibida la inducción floral se inicia la diferenciación floral, que en esta especie coincide con el período de parada estival, aproximadamente a finales de julio. Según Rodríguez (2006), se identifican hasta siete fases diferentes a lo largo de la misma, que abarcan desde el aplanamiento del domo hasta la elevación de los carpelos. Al igual que en el resto de especies leñosas el desarrollo de los órganos florales es verticilar, iniciándose concéntricamente en primer lugar la formación de los sépalos, seguida de la de los pétalos y los estambres y culminando con el desarrollo de los carpelos. Este proceso se extiende desde julio a septiembre, esto es, tres meses, aproximadamente, desde el inicio de la diferenciación floral hasta la plena antesis. Mientras los pétalos ya son visibles mayoritariamente a principios de septiembre, los estambres y el pistilo se observan a finales de este mes (Cuevas et al., 2007a). Sin embargo, la diferenciación floral de los meristemas de los brotes anticipados es más tardía, completándose entre 15 y 30 días después, mostrando el marcado escalonamiento que presenta la floración de esta especie.

### **1.5.- Control hormonal de la floración**

Las fitohormonas cumplen un papel muy importante en la regulación de muchos aspectos del desarrollo de las plantas y en la señalización del estímulo floral a larga distancia. A pesar de que se conocen muchas de sus funciones y el efecto que su aplicación provoca en el desarrollo reproductivo de diferentes especies frutales, aún no se conoce en detalle sus mecanismos de interacción a nivel molecular y la relación que tienen con otros factores determinantes de la inducción floral.

Las giberelinas son, probablemente, las hormonas vegetales más

estudiadas al respecto. Así, mientras en algunas plantas juegan un papel promotor, en la mayoría de las especies leñosas, por el contrario, actúan como inhibidoras, y en otras, su papel en la inducción floral es irrelevante.

La influencia de las giberelinas en el proceso de floración de las especies frutales ha sido estudiada detalladamente (Pharis y King, 1985., Guardiola et al., 1977) y su acción inhibidora se ha relacionado con el efecto del fruto sobre la floración siguiente (García Luis et al., 1986; Martínez Fuentes, 2010), atribuyéndoles, de este modo, un papel importante en la alternancia de cosechas en los cítricos. Dicho papel ha sido ratificado mediante la aplicación exógena de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) durante el período de inducción. En este momento, esta giberelina interfiere en la inducción floral e inhibe parcialmente la intensidad de floración de la primavera siguiente, tanto en los cítricos (Guardiola et al., 1977), como en los frutales de hueso (Southwick et al, 1995a) y el níspero japonés (Reig et al, 2011) si bien el momento óptimo de aplicación varía con la especie. Así, mientras en el olivo las aplicaciones se realizan en verano u otoño (Fernandez-Escobar et al., 1992), en la vid el momento adecuado es en primavera (Lavee et al, 1981), en algunas especies de la familia de las Rosáceas, como el ciruelo japonés (González-Rossia et al., 2006), el melocotonero (González-Rossia et al., 2007) y el manzano (Looney et al, 1985), las aplicaciones al inicio del verano reducen significativamente la formación de yemas de flor, y en otras, como el níspero japonés, su aplicación en primavera reduce significativamente el número de panículas por m<sup>3</sup>, disminuyendo así la intensidad de floración (Reig et al, 2011).

Por otra parte, en algunas especies, la ausencia de semillas en el fruto reduce el efecto de éste inhibiendo la floración, cuando se la compara con frutos con semillas (Reig, 2011), y este efecto se ha relacionado con la síntesis hormonal producida por el embrión, lo que le confiere su capacidad sumidero de carbohidratos de reserva acumulados como almidón en los cotiledones (Chan y Cain, 1967).

Una de las hipótesis que explican esta reducción de la floración, atribuye a las giberelinas presentes en frutos y brotes en desarrollo un papel de intermediario en la síntesis y transporte del ácido indol-3-acético (IAA) hacia los meristemas (Callejas y Bangerth, 1998). Una evidencia que apoya esta

hipótesis es que la aplicación de ácido triiodobenzóico (TIBA), un inhibidor del transporte de auxinas, estimula la inducción floral en especies anuales y perennes (Bangerth, 2006). Todavía hoy se desconoce el mecanismo en que las giberelinas interfirieren en la inducción floral del meristemo, si bien resulta evidente su antagonismo con el proceso, ya sea por acción directa en el meristemo en el momento de la inducción floral o promoviendo el crecimiento vegetativo en detrimento del reproductivo.

Las citoquininas también se han señalado como sustancias inhibidoras de la inducción floral de especies leñosas angiospermas. Aunque autores como Bangerth (2006), las describen como promotoras, su efecto se debe más probablemente a un aumento en la brotación las de yemas latentes, más que a una interferencia en el proceso de la inducción floral (Davenport y Nuñez-Elisea, 1997). En el caso del níspero japonés, se produce un incremento significativo de la Zeatina en el fluido floemático tanto al inicio como al final de la inducción floral, pero no mientras ésta tiene lugar, y sus niveles más bajos se alcanzan en antesis (Ersoy et al, 2008).

Por otra parte, las auxinas ejercen una acción inhibidora del desarrollo de las yemas laterales, fenómeno conocido como dominancia apical. Se conoce que bajas concentraciones de esta hormona son necesarias para la inducción, mientras que altas concentraciones de la misma actúan como inhibidoras (Hegele et al, 2010). Todo esto sugiere que el AIA influye en el proceso de la floración, directa o indirectamente, aunque su efecto concreto todavía es incierto. Por otra parte, la concentración de AIA en el níspero japonés aumentó considerablemente durante el desborre y el inicio de la floración, alcanzando sus máximos valores en el momento de la diferenciación floral (Ersoy et al, 2008).

El ácido absísico (ABA) tiene numerosos efectos en el crecimiento y desarrollo de la planta. Se le ha relacionado con la transmisión de señales de estrés fisiológico y, además, juega un importante papel en la regulación de la latencia (Addicott, 1983). En 1987, Powell puso de manifiesto que en la vid esta sustancia inhibe el crecimiento de la parte aérea, favoreciendo, por el contrario, la formación de raíces y flores. Pero en otras especies, como los cítricos, el ABA puede reducir la intensidad de la floración, reduciendo el desarrollo de



inflorescencias sin hojas (Davenport, 1990), aunque no se haya encontrada una relación directa entre su contenido endógeno y algunas condiciones inductoras de su floración, como el estrés hídrico o las bajas temperaturas (Southwick y Davenport, 1986). A pesar de ello, el hecho de que aplicaciones de ABA no retrasen la brotación y sólo prolonguen la latencia de las yemas cuando se realizan inmediatamente antes de la brotación, impide atribuir a esta sustancia un papel regulador de la floración (García-Luis et al, 1986).

En el níspero japonés el período de latencia, conocido como reposo estival, es de suma importancia y precede o es contemporáneo a la formación de las inflorescencias. El notable incremento en la concentración de ABA detectado treinta días antes de la formación de las yemas florales en esta especie y su relación, en este caso, con la parada estival, podría indicar que esta hormona se halla involucrada en la diferenciación floral (Ersoy et al, 2008).

Existen otros fitoreguladores implicados en la regulación del proceso de floración de las especies leñosas, como las poliaminas, jasmonatos, ácido salicílico, brasinoesteroides y ácido nítrico, entre otros. Aunque su presencia en las plantas está documentada hace años, su naturaleza como reguladores del crecimiento aún se cuestiona.

## **1.6.- Control Ambiental**

La dependencia ambiental de la floración es un descubrimiento relativamente reciente. Entre los factores externos más influyentes destacan la duración del día y la noche, la temperatura, la intensidad lumínica y la disponibilidad de agua, siendo los dos primeros los más importantes, ya que varían de forma regular a lo largo de año. Aunque puede hablarse de especies con requerimientos de fotoperíodo y especies con requerimientos de temperatura para florecer, esta distinción sólo es aplicable a efectos de clasificación, ya que los requerimientos ambientales de cada especie son muy complejos, siendo necesaria la conjunción de múltiples factores.

En los árboles perennes, a diferencia de lo que ocurre en las plantas anuales, la inducción floral no se produce como consecuencia exclusiva de los

factores ambientales, por lo que se les ha considerado dentro del grupo de plantas que son inducidas de manera autónoma (Bangerth, 2006). Sin embargo, Nishikawa et al. (2007) han conseguido inducir la floración de la mandarina Satsuma mediante tratamientos térmicos, atribuyendo a las bajas temperaturas un papel esencial en la expresión del gen Flowering locus T (FT) responsable de la inducción floral.

De entre estos factores, el fotoperíodo determina si una planta inicia su desarrollo reproductivo o, por el contrario, mantiene solamente el vegetativo, en algunas plantas un solo fotoperíodo inductivo es suficiente para inducir la floración, aunque luego continúe su crecimiento en fotoperíodos no inductivos, otras requieren de un determinado número de ciclos inductivos.

Pero hablar del fotoperíodo exige tener en cuenta la intensidad del estímulo requerido para la inducción, los fotorreceptores implicados en la respuesta fotoperiódica y el papel regulador del ritmo circadiano en la expresión de los genes relacionados con la floración. Los mecanismos de determinación de la duración del día en las plantas están mediados por dos tipos de cromoproteínas (fitocromos): las que absorben luz roja (Pr) y las que absorben luz roja lejana (Pfr). Se conoce que el sombreamiento de la planta reduce la relación entre luz roja y la roja lejana que dispara abundantes respuestas fisiológicas que suprimen la expresión del gen FT, regulador de la floración (Endo et al., 2005). Es por ello que en las zonas más sombreadas del árbol, donde penetra menos la luz solar y la actividad fotosintética es menor, prácticamente no se encuentran yemas de flor (Martin et al., 1987). La razón que lo explica es que los fotorreceptores de las hojas requieren de la luz para inducir la expresión de los genes de la floración. Concretamente, dos de los genes más importantes implicados en la inducción floral: el gen CONSTANS (CO) y el gen FLOWERING LOCUS T (FT), tienen ritmos circadianos de expresión que varían según la disponibilidad de luz durante el día, no expresándose en condiciones de luminosidad reducida (Suarez-López et al., 2001).

Sin embargo, la inducción fotoperiódica, muy común en las especies herbáceas, todavía no ha sido demostrada en especies leñosas, para las que la iniciación floral es independiente del fotoperíodo, aunque este determine su

salida de la latencia. Una de las pocas excepciones es el arándano que florece en condiciones de día corto (8 h), pero no cuando hay condiciones de día largo o se le interrumpe la noche durante una hora (Spann et al., 2003). En el aguacate, en cambio, las plantas sometidas a condiciones de día corto (9 h) en relación a aquellas sometidas a un fotoperíodo de día largo (15 h), experimentan un retraso en la floración (Buttrose y Alexander, 1978). La posibilidad de que estos cambios se deban a diferencias en la tasa fotosintética y a la cantidad de carbono asimilado, más que al fotoperíodo, no debe descartarse.

La temperatura es otro de los factores ambientales que juegan un papel importante en la inducción floral. En este caso, a diferencia de lo observado en el fotoperíodo, el órgano de la planta que debe ser expuesto directamente al estímulo inductor es el meristemo apical, ya que en las plantas anuales o bianuales su exposición a bajas temperaturas durante el crecimiento vegetativo acelera su diferenciación floral (Gassner, 1918). Sin embargo, puesto que los meristemos de las plantas vernalizadas o sometidas a bajas temperaturas no inician la floración inmediatamente, sino tras completar el desarrollo vegetativo de la planta, el efecto de la vernalización debe mantenerse durante sucesivas divisiones celulares. Adicionalmente, el transcurso de un período de frío no induce la floración inmediata, sino que confiere a las plantas la competencia para florecer cuando el resto de las condiciones ambientales y endógenas sean las adecuadas (Lee y Amasino, 1995).

A pesar de ello, se sabe que la exposición a bajas temperaturas reduce la expresión de un gen represor de la floración, FLOWERING LOCUS C (*FLC*), a través de mecanismos de regulación epigenética. Estos alteran la expresión de un gen sin modificar su secuencia, y pueden activarse frente a determinados factores ambientales. En este caso se producen como consecuencia de la reorganización del ADN, producto de la condensación de la cromatina, que se va modificando progresivamente hasta silenciar la expresión del gen *FLC* cuando las plantas están sometidas a condiciones de frío prolongado (He y Amasino, 2005). Estos resultados ponen de manifiesto el papel de las bajas temperaturas en la regulación del tiempo de floración en algunas especies.

En las especies leñosas, por otra parte, no se conocen con exactitud las

condiciones ambientales que regulan la iniciación de los meristemas florales, dado que lo que determina el tiempo de floración no es tanto este proceso como la rotura de la dormición de las yemas, que tiene lugar en primavera, en la mayoría de las especies, y la duración del proceso de desarrollo de las flores. En muchas especies de clima templado se observan interacciones entre la longitud del fotoperíodo y la temperatura en la regulación de la entrada y salida de la latencia de las yemas. Sin embargo, se sabe que en otros casos, como en la mandarina Satsuma, la exposición a baja temperatura promueve la expresión del gen FT en las hojas, lo que sugiere el papel de aquella en la inducción floral (Nishikawa et al, 2007).

Excepcionalmente, en el níspero japonés, el período de latencia es conocido como reposo estival y es de suma importancia para la floración, ya que precede o es contemporáneo a la formación de las panículas. Aunque en la mayor parte de las especies frutales, durante el verano, las yemas entran, progresivamente, en un estado independiente de las condiciones ambientales y, por tanto, de naturaleza endógena, en el níspero japonés no ocurre así. Aun así, en el níspero japonés la parada estival todavía no está bien definida. Para un mayor entendimiento de los factores implicados véase Lang (1987).

No obstante, en especies frutales de regiones tropicales o de climas secos, la latencia de las yemas puede producirse como consecuencia de la falta de agua. Así, la disponibilidad de agua es otro factor modulador de la inducción floral. En experimentos llevados a cabo por Hueso et al. (2010) en el níspero japonés, un riego deficitario controlado aplicado durante el crecimiento de los brotes previos a la inducción floral, consigue adelantar la fecha de floración como consecuencia de, por una parte, un acortamiento en la etapa de crecimiento de los brotes y, por otra, una anticipación de la diferenciación floral (Cuevas et al., 2008). En cítricos también se ha estudiado el efecto que un estrés hídrico tiene sobre la inducción floral (Southwick y Davenport., 1986). Las plantas sometidas a un estrés hídrico moderado, fueron inducidas a florecer, contrariamente a lo observado en aquellas que se sometieron a un estrés severo. La respuesta dependió marcadamente del cultivar estudiado.

## 1.7.- Control nutricional

En las especies frutales leñosas, los estudios de la floración bajo el punto de vista nutricional no han encontrado relaciones convincentes de la inducción floral con el nivel de reservas, con el metabolismo de los carbohidratos ni con la nutrición mineral. Algunos estudios sugieren una alteración del mecanismo de reducción de nitratos en plantas incapaces de florecer o con una intensidad de floración baja (Reig et al., 2006), pero tampoco son concluyentes.

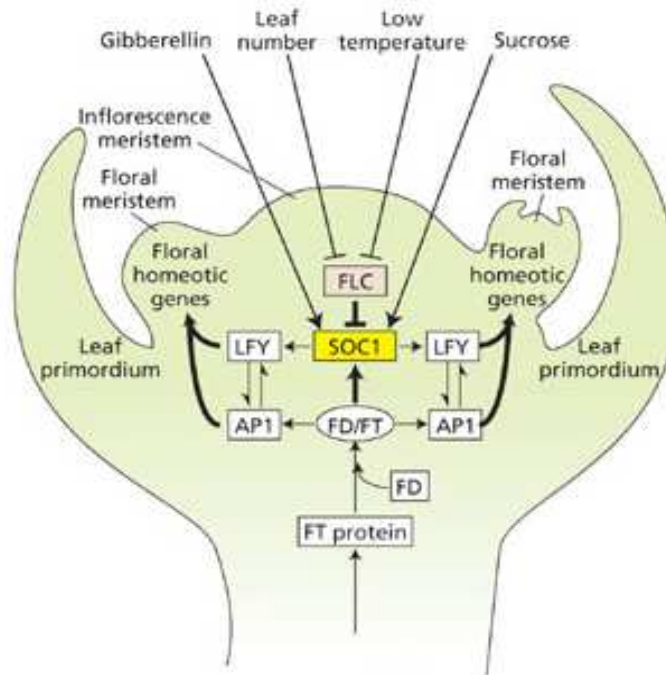
Monselise et al. (1981), trabajando con el mandarino 'Wilking', detectaron una alteración de la reducción de los nitratos en las hojas de los árboles con una elevada cosecha, en comparación con aquellos con escasa cosecha, de un modo similar a lo encontrado por Reig et al. (2006) en el floema próximo a la yema de árboles con elevada cosecha de melocotonero durante la latencia. En ambos casos, los autores sugieren que dicha alteración es más un reflejo metabólico derivado de la cosecha que una acción nutricional directa de este elemento sobre la floración. Por otra parte, existen numerosos trabajos que relacionan la utilización de las reservas con el proceso de la floración, aunque nunca se ha demostrado una relación causa - efecto. La necesidad de energía para atender el proceso resulta más factible, por lo que tanto la acumulación de reservas, como su hidrólisis y transporte se convierten en factores decisivos para la brotación. El aumento de la concentración de azúcares no reductores en la madera de especies caducifolias antes de la brotación, y su acumulación en las yemas de flor antes del desborre así lo indican.

Calabrese (1992), señala que la floración debe estar relacionada con el nivel de carbohidratos acumulados en el tronco y en las ramas, y, por tanto, éste podría promover la diferenciación de las yemas florales. Pero también se ha demostrado que una elevada concentración de carbohidratos de reserva no implica, necesariamente, una mayor floración, cuajado y producción, ya que pueden ser también utilizados para el crecimiento vegetativo. En el níspero japonés en el que la diferenciación floral ocurre al término del crecimiento vegetativo, estudios llevados a cabo por Cuevas et al (2008) cuestionan la

hipótesis de competencia por carbohidratos entre el crecimiento vegetativo y la floración, sugiriendo que una disminución de la tasa de crecimiento del meristemo apical debida, entre otros factores, a cambios hormonales inducidos por algún tipo de estrés, favorece el proceso de inducción floral. La participación de los carbohidratos en el control de la floración sigue estando, por tanto, en discusión. El transporte de sacarosa desde las hojas hasta los meristemas y la posibilidad de inducción floral sin necesidad de aumentar los niveles de ésta podrían indicar que la presencia de sacarosa en el meristemo no está relacionada directamente con la inducción floral, sino más bien con el desarrollo de las estructuras florales.

### **1.8.- Control genético**

Después de muchos años de búsqueda del florígeno, la biología molecular ha permitido dar un gran paso en su conocimiento identificando una serie de genes cuya expresión está relacionada con el proceso de inducción floral. En *A. thaliana* se conocen cuatro vías relacionadas con este proceso, dos que corresponden a condiciones ambientales, como el fotoperíodo (Kobayashi y Weigel, 2007) y la vernalización (Kim et al., 2009), y otras dos, la inducción por giberelinas (Mutasa-Gottgens y Hedden, 2009) y la inducción autónoma (Farrona et al, 2008), que responden a condiciones endógenas, como el estado de desarrollo de la planta y el balance de promotores e inhibidores. En todo caso, todas ellas convergen en la activación de los denominados genes integradores de la floración entre los que destacan los genes FLOWERING LOCUS T (*FT*), SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 (*SOC1*), CONSTANS (*CO*), FLOWERING LOCUS C (*FLC*) y GIGANTEA (*GI*), responsables de la evocación floral (Komeda, 2004), y LEAFY (*LFY*) y APETALA1 (*AP1*), responsables de la identidad o diferenciación floral (Wagner et al., 1999).



**Figura 2:** Genes implicados en la Inducción floral de *Arabidopsis thaliana* y su actividad en el meristemo (Adaptado de Taiz y Zeiger, 2010).

El proceso de inducción floral involucra, por tanto, una red intrínseca y altamente específica en la que confluyen grupos de genes asociados con rutas específicas como la inducción floral, la identidad floral o la formación de estructuras reproductivas, y relaciones antagónicas y sinérgicas entre las actividades de los productos génicos implicados y el efecto de la expresión de algunos genes sobre la transcripción de otros. Esto ha evidenciado una alta complejidad en la interacción entre las posibles rutas que determinan la floración en las plantas superiores, de tal forma que el conocimiento del proceso en cada especie requiere de estudios fisiológicos y moleculares exhaustivos.

El gen *FT* sintetiza un grupo de proteínas que cumplen con las características descritas para el florigeno. Este gen se expresa, activado por *CO*, principalmente en los tejidos vasculares y específicamente en las células acompañantes del floema, donde codifica proteínas de pequeño tamaño (20 kDa), que son transportadas hasta el meristemo indiferenciado participando directamente en su inducción floral (Searle et al., 2006). Esta función promotora de larga distancia ha sido confirmada al fusionar el complejo proteico *FT* con una proteína verde fluorescente (GFP) y comprobar que ambas se mueven desde las hojas hasta los meristemas a través del floema. Finalmente,

experimentos realizados mediante el injerto de hojas que expresaban el gen *FT* sobre plantas mutantes incapaces de expresarlo, demostraron que éstas se comportaban de modo normal corrigiendo su fenotipo mutante (Corbesier et al., 2007).

Tras alcanzar el meristemo, las proteínas *FT* forman un complejo con el factor de transcripción FLOWERING LOCUS D (*FD*), el cual se expresa fuertemente en el ápice bajo condiciones inductivas (Abe et al., 2005). Este complejo *FT-FD* activa la expresión de otro gen involucrado en la inducción floral, *SOC1*, que integra múltiples señales inductoras, como el fotoperíodo, la temperatura, el balance hormonal y las señales relacionadas con la edad de la planta, de modo que su expresión marca el inicio de la inducción floral en los meristemas (Lee y Lee, 2010). Aunque este gen se expresa también en hojas jóvenes, experimentos sobre su expresión ectópica sugieren que su efecto sobre la inducción floral es potencialmente mayor cuando se expresa en los ápices (Searle et al., 2006). La expresión de *SOC1* en las hojas jóvenes contribuye a la inducción floral, pero el mecanismo molecular a través del cual esto ocurre aún no ha sido bien entendido. Se ha sugerido que la(s) proteína(s) expresada(s) por *SOC1* podría(n) moverse por el floema, al igual que la proteína *FT*, hasta llegar al ápice, pero esa posibilidad aún no ha sido comprobada empíricamente (Lee y Lee, 2010).

En cualquier caso, su expresión está regulada mayoritariamente por la acción antagónica de dos genes, *CO*, que lo activa indirectamente mediante la expresión de *FT*, y *FLC*, que inhibe tanto a *SOC1* como a *FT*. De esta manera, cuando *CO* se sobreexpresa, aumentan los niveles de expresión de *FT* y *SOC1*, indicando que estos actúan por debajo de *CO*, y como consecuencia se pierde la sensibilidad al fotoperíodo y se induce la floración temprana. Observando la activación de la expresión de *FT* por *CO*, se propuso que la activación post-transcripcional de *CO* por la luz debe llevar a la activación de *FT* y, en último término, la floración (Suárez-López et al., 2001).

Pero no sólo la activación de los genes integradores de la transición floral es suficiente para que ésta se desencadene, sino que es necesario que sus represores permanezcan inactivos. Así, este mecanismo represor actúa de refuerzo para asegurar que la planta florezca sólo cuando se den todos los

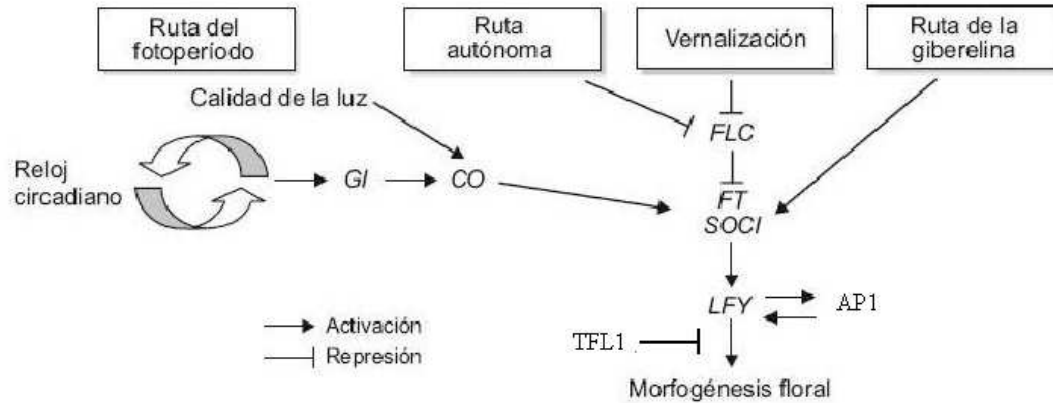


factores adecuados. El gen *FLC* es el principal represor de los genes integradores de la transición floral junto a otra proteína codificada por el gen *SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP)*, este dímero *FLC/SVP* ejerce su efecto represor sobre *FT*, *FD* y *SOC1* (Li et al., 2008), de tal forma que el efecto de las distintas rutas inductoras de la floración, anteriormente citadas, tienen como objetivo prioritario frenar la actuación de *FLC*. La proteína *FLC* impide la activación de *FT*, *FD* y *SOC1* que inducen el inicio de la floración.

En este sentido, si bien empezamos a entender los mecanismos moleculares que permiten a las plantas florecer una vez pasado el invierno, muchas cuestiones permanecen todavía sin resolver, sobre todo en aquellas especies frutales, como el níspero japonés, que no requieren de bajas temperaturas para florecer, así como de los mecanismos y la naturaleza del sensor que percibe la señal y el canal que la transmite hasta las regiones reguladoras de los genes que controlan el inicio de la floración.

Todas las rutas de transición de la floración inducen, en última instancia, la actividad transcripcional de un mismo conjunto de genes de identidad del meristemo (Piñeiro y Coupland, 1998) que finalmente inducirán la formación de las flores en los flancos del meristemo apical, activando los genes homeóticos florales encargados de construir la flor. Los principales genes de identidad del meristemo en *Arabidopsis* son el *LFY* y *AP1*, sin embargo el gen *TFL1* es completamente antagónico a ellos. Por lo tanto, para que la inflorescencia de *Arabidopsis* se desarrolle completamente es necesario que la expresión de *TFL1* quede confinada en el centro del meristemo apical, mientras que la de *AP1* y *LFY* lo haga en sus flancos, que es donde se formarán las flores. De esta forma, *LFY* y *AP1* especifican y mantienen la identidad del meristemo floral, evitando su reversión al reprimir en él la expresión de *TFL1* (Liljgren et al. 1999; Kaufmann et al., 2010b). Por otro lado, la acción de *TFL1* en el centro del meristemo reprime la expresión de los genes de identidad del meristemo floral manteniéndose así el carácter no florescente. De acuerdo con esto, la relación antagonista entre estos genes determina el momento y posición en que se va a generar una flor o una inflorescencia, definiendo así, en última instancia, la arquitectura de la planta. Este antagonismo parece estar conservado entre los ortólogos de *TFL1* y *LFY/AP1* en otras especies, por lo

que las diferencias en el patrón de expresión de genes ortólogos de *TFL1* podrían explicar la variabilidad en el tipo de inflorescencia entre distintas especies de plantas (Benlloch et al., 2007).



**Figura 3:** Resumen de las vías de inducción de la floración en *Arabidopsis thaliana* (Adaptado de Corbesier y Coupland, 2005)

A pesar de la importancia de *TFL1* en el desarrollo de la inflorescencia, los factores que regulan su expresión todavía no se conocen con precisión. La ruta del fotoperíodo parece activar a *TFL1*, como lo indica el aumento en sus niveles registrado en plantas que expresan *CO* de manera constitutiva (Serrano Mislata, 2010). Existen indicios que sugieren que esta activación podría estar mediada por el factor de transcripción *SOC1*. Por otro lado, una de las proteínas capaces de interactuar tanto con *FT* como con *TFL1* es el factor de transcripción *FD* (Abe et al., 2005) que junto a *FT* activa la expresión de los genes de la floración *AP1* y *SOC1*. Modelos que intentan explicar el antagonismo entre las funciones de *TFL1* y *LFY* proponen la competencia entre *TFL1* y *FT* por un cofactor que es necesario para su activación (Ahn et al., 2006), este cofactor podría ser *FD*.

Como ya se ha comentado anteriormente, todas las rutas de transición floral inducen, en última instancia, la activación transcripcional de un conjunto de genes de identidad del meristemo. El gen *LFY* es el primero de estos genes que se expresa y activa directamente a otros como *AP1* (Wagner et al., 1999). *LFY* codifica un factor de transcripción que se expresa fuertemente durante el desarrollo del meristemo, en los primordios laterales, especificando la identidad floral de los mismos, ya que activa a su vez la expresión de otros genes como *AP1* y *CAL* relacionados con este proceso (William et al., 2004). Una de las

principales funciones atribuidas a *LFY* es regular la arquitectura de las inflorescencias (Lohman et al., 2001). En este sentido, cuando una planta que de manera natural produce inflorescencias en forma de panícula sufre una mutación en el gen *LFY*, éstas se convierten en racimos, ya que este gen está relacionado directamente con la ramificación de las inflorescencias (Benlloch et al., 2007).

Por otro lado, *AP1* además de ser activado por *LFY* en el meristemo floral, mantiene inducida su expresión en el mismo, asegurando el mantenimiento de la identidad floral y evitando su reversión (Liljegren et al., 1999; Kaufmann et al., 2010). Posteriormente, la expresión de *AP1* queda reducida a los dos verticilos más externos de la flor, donde participa, junto al gen *APETALA2* (*AP2*) como gen homeótico floral en el desarrollo de los sépalos y pétalos (Bowman et al., 1993). Por otra parte, *AP1* establece también la identidad floral reprimiendo la expresión de *SOC1* y *TFL1*, previniendo de esta manera la reversión floral (Lee y Lee, 2010). El gen *AP1* también puede ser activado por *FT* y aunque todavía no se conoce su mecanismo, se ha comprobado que plantas que presentan una mutación en el gen *LFY* consiguen producir flores, mientras que las que presentan una doble mutación en *LFY* y *FT*, no lo consiguen (Parcy, 2005). En definitiva, como ya se ha descrito anteriormente, el antagonismo entre *TFL1* y *LFY-AP1* determina el momento y posición en que se va a producir una flor o una inflorescencia.

Adicionalmente, se sabe que las giberelinas están relacionadas con la inducción floral de las especies frutales y que su acción es, en este caso, inhibidora frente a la acción promotora que esta sustancia ejerce en especies herbáceas. Así, en cítricos, se ha comprobado que las giberelinas inhiben la floración al regular negativamente la expresión del gen *CiFT* (Muñoz-Fambuena et al., 2012), y resultados similares se han obtenido en otras especies frutales como el mango (Nakawaga et al., 2012). Adicionalmente, Koshita et al (1999) demostraron también en cítricos que los altos niveles de giberelinas en las hojas se correlacionan de manera significativa con una disminución de la floración, mientras que niveles bajos, por el contrario, originan brotes con una floración abundante, demostrando así que estas hormonas juegan un papel en la inducción floral. De entre las giberelinas que

se conocen, las más activas son la GA<sub>1</sub> y la GA<sub>4</sub>. Por otra parte, el gen *GA 20-oxidasa* es un indicador del contenido endógeno de giberelinas en la planta, ya que codifica para la enzima GA 20-oxidasa, que cataliza el último paso en la ruta de síntesis de giberelinas bioactivas en las plantas. Por ello, los altos niveles de expresión de este gen se corresponden con altos niveles endógenos de giberelinas, específicamente de GA<sub>1</sub> y GA<sub>4</sub> (Hedden y Phillips., 2000). Por este motivo el estudio de sus niveles de expresión sirve indirectamente como indicador de los niveles de síntesis de giberelinas en las plantas.

En el caso del níspero japonés, el proceso de la inducción floral, desde el punto de vista de la biología molecular, ha sido muy poco estudiado. Liu et al (2011), han caracterizado y, posteriormente, estudiado la expresión ectópica de *EjLFY* y de *EjAP1* en ápices, con el objetivo de determinar su función biológica en esta especie. Sus resultados han demostrado que *EjLFY* guarda un 62% de homología respecto a su homólogo en *A. thaliana*, y además, que éste es capaz de promover la transición floral de una manera similar al gen *LFY* endógeno de *A. thaliana*. Resultados similares se obtuvieron al estudiar el gen *EjAP1*.

El gen *TFL1* ha sido también estudiado en el níspero japonés (Esumi et al, 2005) y se encuentra muy conservado dentro de la subfamilia de las Maloideae (89 - 100% de homología). Asimismo, se ha señalado que el gen *LFY* está menos conservado dentro de la subfamilia, y se ha atribuido a esta menor homología las diferencias observadas en los hábitos de floración y en la arquitectura floral de las diferentes especies de la subfamilia Maloideae.

Sin embargo, a pesar de que ya existen importantes estudios en la floración del níspero japonés, estos no se han abordado desde el punto de vista de la biología molecular, y por tanto no se conoce el conjunto de los genes implicados en la inducción y en la diferenciación floral de esta especie. Además, se desconoce la evolución de su expresión a lo largo del tiempo. Es por esto que el objetivo de este trabajo es determinar la época de inducción floral en el níspero japonés, y aportar conocimiento sobre los mecanismos moleculares implicados en la inducción y en la diferenciación floral de esta especie.

## **2. - Materiales y métodos**

### **2.1.- Material Vegetal**

El experimento se realizó en una plantación comercial de árboles adultos de níspero japonés (*Eriobotrya japonica* Lindl.) cv. Algerie, bajo condiciones normales de cultivo y fertirrigación.

Los árboles de entre 20 y 25 años de edad estaban injertados sobre patrón franco, podados en forma de vaso, con un marco de plantación de 4 x 5m y localizados en Callosa d'En Sarrià (Alicante, España, 38°39'N; 00°07'W). Se seleccionaron 4 de ellos con volúmenes de copa parecidos y de cada uno se eligió un brote reproductivo diferente que se marcó periódicamente según la fecha de muestreo, desde principios de marzo (coincidiendo con el final del crecimiento del fruto) hasta finales de agosto (al inicio de la diferenciación floral), con una frecuencia aproximada de 1 mes al principio y cada 15 días desde el momento de la recolección (mediados de abril).

De todos los brotes marcados se tomaron muestras de hojas adultas y de hojas jóvenes o del brote del año, cuando las hubo (desde mediados de mayo), así como de ápices a partir de mediados de junio. Inmediatamente se congelaron con nitrógeno líquido y se guardaron en un congelador a -80°C para la posterior extracción de ARN.

### **2.2.- Extracción de ARN**

La obtención de ARN libre de polisacáridos, polifenoles, proteínas, metabolitos secundarios y otros contaminantes como el fenol y sales inorgánicas, es un requisito esencial para la realización de análisis de RT - qPCR (Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa), ya que algunos de estos compuestos pueden comprometer la exactitud de los resultados al comportarse como inhibidores enzimáticos (Fleige y Pfaffl, 2006). Debido a esto, se han desarrollado diversos protocolos de extracción

específicos para tejidos con altos contenidos de estos contaminantes (Kiefer et al., 2000; Xu et al., 2004).

Song et al (2011) han reportado sin embargo, que estos métodos de extracción tradicionales no son eficaces en la extracción de ARN en tejidos de níspero japonés, por lo que realizaron una comparación entre tres protocolos de extracción de ARN distintos, y desarrollaron un método mejorado de extracción de ARN total basado en el método CTAB-LiCl (Chang et al., 1993) para ápices en diferentes estados de desarrollo.

Por consiguiente, inicialmente se empleó este protocolo para la extracción del ARN de las muestras de níspero recogidas del presente estudio. Sin embargo, no se consiguieron los valores de pureza del ARN esperados, en muestras de ápices ni en hojas. Así pues, se realizaron distintas modificaciones para la adaptación de dicho método con el fin de obtener ARN de alta pureza y calidad.

A continuación se detalla el protocolo modificado empleado en este trabajo para la extracción de ARN en hojas y ápices de níspero japonés. Las modificaciones realizadas al protocolo de Song et al (2011) se detallan en el capítulo de resultados.

### **2.2.1.- Protocolo de extracción de ARN total desarrollado en el presente estudio.**

El material vegetal congelado se trituró con mortero hasta su pulverización en presencia de nitrógeno líquido, transfiriendo 0,5 g de cada muestra a un tubo de polipropileno estéril (30 ml) que contenía 0,4 g de PVPP (Polivinilpolipirrolidona). Se añadieron 10 ml del tampón de extracción CTAB (3% CTAB, 1,4 M NaCl, 200 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl a pH 8,0, 4%  $\beta$ -mercaptoetanol) precalentado a 65°C. Las muestras fueron incubadas 20 minutos a 65°C, agitando ocasionalmente. Se añadió 1 ml de acetato de potasio (3M) y se incubó en hielo durante 20 minutos.

El ARN fue extraído con un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico en una proporción 25:24:1 (v/v), y recuperado luego en el

sobrenadante tras la centrifugación (10.000 rpm/10 minutos a 4°C). Esta operación se repitió tres veces. Posteriormente se añadió a cada tubo 1 volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1 v/v), se centrifugó (10.000 rpm/10 minutos a 4°C) y se recuperó el sobrenadante al que se le añadió 1 volumen de isopropanol. Las muestras se incubaron durante toda la noche a -80°C.

Después de centrifugar (10.000 rpm/20 minutos a 4°C), se eliminó la fase líquida, recuperando el sedimento que fue lavado dos veces con etanol 70% y secado con corriente de aire sintético. El sedimento fue resuspendido en 1 ml de Tris-HCl (10 mM, pH 7,5) al que se le añadió ¼ de volumen de LiCl (10M), incubándose durante dos horas a -80°C. Posteriormente se recuperó el ARN por centrifugación (10.000 rpm/20 minutos a 4°C). el sedimento obtenido se lavó con etanol 70%, secándose posteriormente con corriente de aire sintético. Finalmente, el sedimento de ARN obtenido se resuspendió en 100µl de agua libre de RNasas.

Para la eliminación de ADN genómico, los extractos de ARN fueron purificados mediante columnas utilizando el kit RNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen) con el kit RNase free DNase set (Qiagen) según las instrucciones del fabricante. Los extractos de ARN obtenidos se conservaron a -80°C hasta su posterior utilización.

Para cuantificar la cantidad y calidad del ARN, se determinó la densidad óptica de los extractos mediante espectrofotometría usando un equipo NanoDrop ND-100 (NanoDrop Technologies). La cantidad de ARN viene determinada en ng/µl, y la calidad se evaluó según la relación de absorbancia A260/280 y A260/230, considerando 1,8 como el valor mínimo aceptable para cada relación (Becker et al., 2010).

### 2.3.- Diseño de oligonucleótidos

Como se ha indicado anteriormente el objetivo de este estudio era la cuantificación relativa de los genes EjAP1, EjLFY, EjTFL1, FT, SOC1 y Ga 20-Ox relacionados con la inducción y diferenciación florales.

Para amplificar fragmentos de los genes EjACT, EjAP1, EjLFY, EjTFL1, se diseñaron oligonucleótidos específicos usando como base las secuencias publicadas en la base de datos del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) correspondientes a dichos genes de níspero japonés, el número de accesión de cada secuencia utilizada se encuentra descrito en la tabla X. Posteriormente, estas secuencias se introdujeron en el programa Primer 3 (Rozen et al, 2000) que se utilizó para seleccionar los pares de oligonucleótidos más adecuados.

**Tabla 1.-** Lista de oligonucleótidos utilizados.

Gen	Sentido	Secuencia 5`-3`	Tamaño producto (bp)	Localización (nt)	Nº accesión
EjAct	D	TGTTGCCATACAGGCTGTTC	120	36-55	FJ481118
	R	ATGAGGGAGGGCATAACCTT		156-137	
EjAP1	D	AGCTGGACCTGACTCTGGAA	65	663-682	AY880261
	R	TGATGATCAAGCAGCAAAGC		727-708	
EjLFY	D	ATCCAGGTCCAGAACATTGC	100	838-857	AB162033
	R	ATGTAGCTTGCGCCTGACTT		938-919	
EjTFL1	D	TCTGTTGTCACAGCCAAACC	65	250-269	GU320722
	R	AGTGCAGGTGCTCCCTTAGA		516-535	
FT	D	GCTTCGGGCAAGAGATAGTG	142	318-337	DQ53588.1 AB524587
	R	TCGGCGAAGTCTCTGGTATT		465-446	
SOC1	D	GCTTCTTGAAGTATCAAAACG	156	798-818	GU983664 JF806632
	R	TCTCAGTTGCTCAATCTGTTC		954-934	
GA 20-Ox	D	GACTTGGGAGGCTTTCTCTC	90	223-242	HQ833589 AB037114
	R	GGAAAATCCATGCTTCTGG		313-294	



Para el diseño de los oligonucleótidos de los genes FT, SOC1 y Ga 20-Ox, donde no se encontraron secuencias publicadas para níspero en la base de datos del GenBank, se emplearon las secuencias de los genes homólogos de especies emparentadas con el níspero japonés que sí estaban disponibles. En el caso de los genes FT y Ga 20-Ox, las secuencias de genes homólogos empleados para el diseño pertenecían a dos especies pertenecientes a la familia Rosaceae y subfamilia Maloideae: *Pyrus pyrifolia* Nakai (gen FT: número de accesión B524587; gen Ga20-Ox: número de accesión HQ833589) y *Malus domestica* Borkh (gen FT: número de accesión DQ535887 ; gen Ga20-Ox: número de accesión AB037114). En cambio, para el gen SOC1 la búsqueda de homologías se extendió al género Prunus (familia Rosaceae, subfamilia Prunoideae), empleándose secuencias pertenecientes a *Prunus mume* Siebold & Zucc. (número de accesión JF806632) y a *M. domestica* (número de accesión: GU983664).

Las secuencias empleadas para cada gen fueron alineadas mediante el programa **Clustal W** (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>) y de las zonas conservadas entre las distintas especies se seleccionaron los oligonucleótidos más adecuados gracias al programa Primer3, verificándose posteriormente su idoneidad gracias a los resultados obtenidos de las curvas de calibrado para cada gen, donde éstos oligonucleótidos presentaban una eficiencia de amplificación de entre 95-100%. La lista de oligonucleótidos utilizados se encuentra en la tabla nº 1.

Para confirmar que los amplificadas con los oligonucleótidos seleccionados correspondían al fragmento del gen esperado, los productos amplificadas de *EjAP1*, *EjLFY*, *FT*, *SOC1* y *Ga 20-Ox*, fueron clonados en un vector pGEM® -T (Promega) según las instrucciones del fabricante y secuenciados. Las secuencias obtenidas fueron comparadas mediante un análisis BLAST con las secuencias depositadas en la base de datos del GenBank

### 2.4.1.- Retrotranscripción

Para la síntesis de cDNA se utilizaron 2µg de ARN, empleándose el kit QuantiTect® Reverse Transcription kit (Qiagen) según las instrucciones del fabricante. Previamente se empleó el tampón gDNA Wipeout buffer, incluido en el kit para la eliminación de restos de ADN genómico. Se utilizó una mezcla de *oligo dT* y de *random primers*, también incluidos en el kit. El programa utilizado fue de 15 minutos a 42°C seguidos de 3 minutos a 95°C.

### 2.4.2.- qPCR

Para la cuantificación relativa mediante PCR se utilizó el kit QuantiTect® SYBR® Green PCR Kit (Qiagen), según las instrucciones del fabricante. Se utilizaron para cada muestra 2,5 µl provenientes de la reacción de retrotranscripción anterior. El programa utilizado fue de 15 minutos a 95°C para la activación de la Hotstar Taq polimerasa, seguidos de 40 ciclos de 15 segundos a 94°C (desnaturalización), 30 segundos a 60°C (alineamiento) y 30 segundos a 72°C (extensión). La fluorescencia se midió al final de la etapa de alineamiento. Los oligonucleótidos específicos para la amplificación de cada gen (Tabla 1) se emplearon a una concentración de 0,3 µM.

Al final de cada qPCR se incluyó un paso final de análisis de la curva del punto de fusión, para detectar la presencia de dímeros o de amplificaciones inespecíficas.

Se realizaron tres replicas técnicas de cada muestra de cDNA, incluyéndose por duplicado controles en los que el molde de cDNA se sustituyó por agua para detectar la posible presencia de contaminación o de formación de dímeros.

### **3.- Resultados**

#### **3.1.- Desarrollo de un método de extracción de ARN total en níspero**

La presencia de polifenoles en los tejidos del níspero japonés dificulta en gran medida la extracción de ARN. Hasta ahora, el único protocolo descrito para dicha extracción es el desarrollado por Song et al. (2011), pero la escasa riqueza de los extractos exige su mejora. En el presente trabajo se han realizado modificaciones al protocolo de extracción de ARN en ápices de níspero japonés descrito por Song et al (2011) (tabla 2) que contribuyen a incrementar la precisión en la determinación de la expresión génica de esta especie.

La cantidad de material vegetal, fue reducida de 2 a 0,5 g, ya que esta última fue suficiente para obtener entre 150-280 µg totales de ARN, cantidad adecuada para la realización de análisis de expresión cuantitativa. Respecto al volumen del tampón de extracción empleado, se observó que con el protocolo publicado por Song et al. (2011), el sobrenadante obtenido presentaba un aspecto turbio, extremadamente difícil de pipetear sin arrastrar en el proceso las capas blancas que corresponden a las proteínas que se separan de la fase acuosa y que son una importante fuente de contaminación (Zeng y Yang, 2002). Por esta razón, se utilizaron 10 ml de tampón, disminuyendo así la viscosidad y obteniendo una clara separación de las fases.

Por otra parte, se aumentó la concentración de β-mercaptoetanol hasta un 4%. Este compuesto es un fuerte inhibidor de las ribonucleasas, enzimas que degradan el ARN y que son liberadas durante la lisis celular que se produce en la extracción de ARN (Lehninger, 2005).

**Tabla 2.-** Comparación entre el protocolo de extracción para yemas de níspero japonés (Song et al, 2011) y el protocolo modificado en el presente trabajo.

	Song et al (2011)	Protocolo modificado
Material vegetal	2 g	0,5 g
Volumen de tampón utilizado	20 ml	10 ml
% $\beta$ -mercaptoetanol	2%	4%
% PVPP	2%	4%
Proteinasa K	80 $\mu\text{g/ml}^{-1}$	No utilizada
N° de extracciones con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1)	1	3
Extracción adicional con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1)	0	1
Precipitación (día 1)	LiCl a concentración de final 2M. Incubación durante toda la noche en hielo	1 volumen de isopropanol. Incubación durante toda la noche a $-80^{\circ}\text{C}$ .
Lavado del sedimento (día 1)	3 lavados con 2 ml de LiCl 2M	2 lavados con 100-200 $\mu\text{l}$ de etanol 70%
Precipitación ( día 2)	2,5 volumen de alcohol absoluto. Incubación 2 horas a $-80^{\circ}\text{C}$	LiCl a concentración final 2M Incubación 2 horas a $-80^{\circ}\text{C}$
Lavado del pellet (día 2)	2 lavados con etanol 75%	2-3 lavados con etanol 70%
Tiempo de centrifugado	20 min para precipitación con LiCl 30 min para precipitación con alcohol absoluto	20 min para precipitación con isopropanol 20 min para precipitación con LiCl

Uno de los principales problemas encontrados al trabajar con el protocolo de extracción de Song et al. (2011) fue la oxidación observada en el sedimento de ARN producto de la incorrecta eliminación de los polifenoles. Debido a esto, se modificó la composición del tampón de extracción, aumentando la cantidad de PVPP hasta un 4%. Este compuesto es un polímero que tiene una alta afinidad con los polifenoles (Haaf et al, 1985), se une a éstos y ambos coprecipitan al ser sometidos a centrifugado, eliminando de esta manera gran parte de los polifenoles presentes en la fase acuosa.

Se eliminó la proteinasa K del tampón de extracción, enzima utilizada para digerir proteínas en el protocolo de Song et al. (2011). Este enzima, además de tener un alto coste, no demostró ser de gran ayuda en la

eliminación de proteínas, ya que los atributos de pureza de las muestras de ARN tratadas con proteinasa K estaban bajo los rangos mínimos aceptados, como puede observarse en la Tabla 3. Debido a esto se decidió aumentar a tres las extracciones fenólicas, y se incluyó, además, una última extracción con cloroformo:alcohol Isoamílico (24:1 v/v), para lograr una óptima separación de las fases y eliminar posibles restos de fenol presentes en la fase acuosa.

Posteriormente, se llevó a cabo una precipitación con isopropanol el día 1, ya que permite rescatar una mayor cantidad de ARN que la precipitación con etanol absoluto. El único problema del empleo de isopropanol es que se corre el riesgo de coprecipitar también una mayor cantidad de contaminantes, cosa que no representa un mayor problema en nuestro protocolo modificado debido a que en este punto el sobrenadante obtenido ya está lo suficientemente limpio como para permitir una incubación a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche.

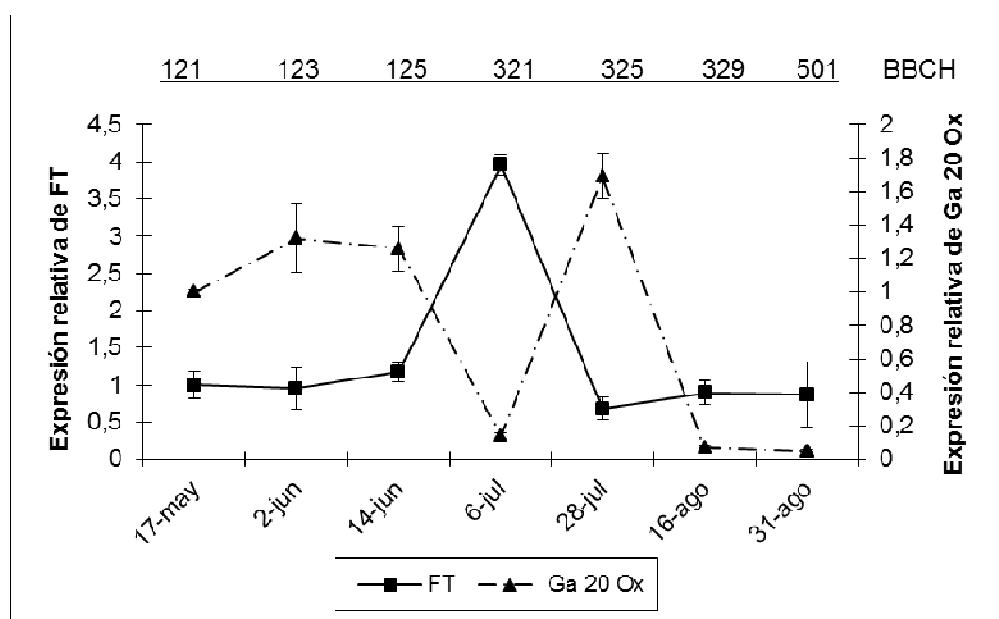
Otra de las modificaciones realizadas fue la precipitación el segundo día con cloruro de litio (2M), paso que tiene como objetivo la precipitación selectiva de ARN. Dicha precipitación se realizó solo durante dos horas para favorecer la obtención de ARN limpio, y posteriormente se lavó el sedimento con etanol 70% y no con LiCl (2M) como propone el protocolo de Song et al (2011), ya que lo que se busca es eliminar las sales residuales de la superficie del sedimento.

**Tabla 3.-** Resultados obtenidos en la extracción de ARN para el protocolo de Song et al (2011) y el protocolo modificado en este trabajo.

Protocolo		ARN total ( $\mu\text{g/g}$ peso fresco)	A260/280	A260/230
Song et al (2011)	Ápices	36	0.9 - 1	0.8 - 1
	Hojas	64	0.9 - 1.3	0.75 - 1.2
Protocolo modificado	Ápices	400-700	2 - 2.4	2 - 2.3
	Hojas	300-500	2 - 2.4	2 - 2.3

### 3.2.- Análisis de la expresión de los genes integradores de la transición floral.

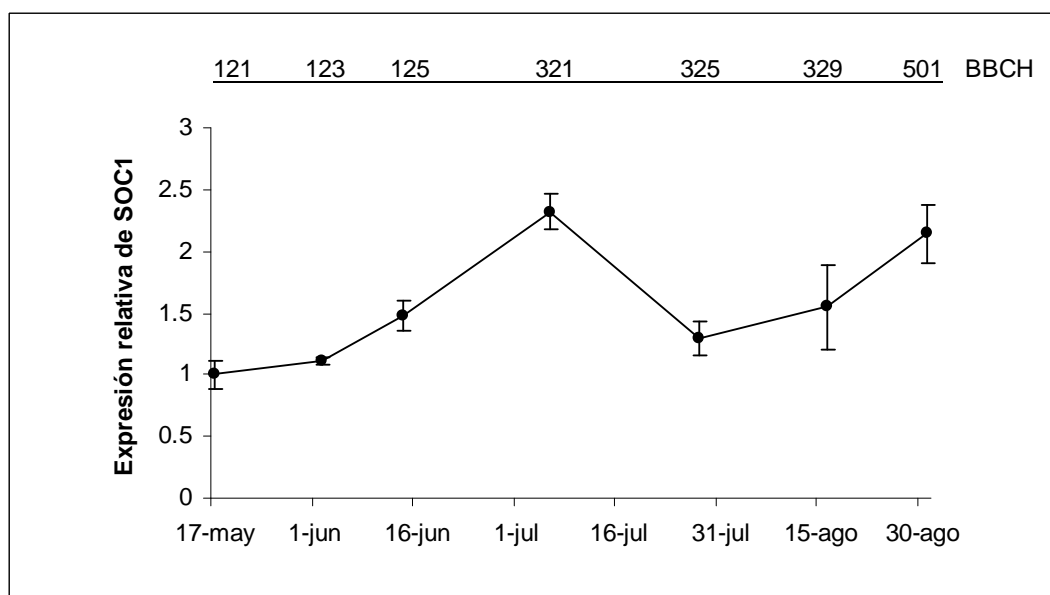
La evolución de la expresión del gen *FT* en las hojas jóvenes o brotes del año, desde el inicio de su formación (estado 121 de la escala BBCH) hasta el inicio de la diferenciación del meristemo terminal (estado 501 de la escala BBCH), siguió una tendencia ligeramente ascendente, alcanzando un pico máximo a principios de julio para luego descender bruscamente 20 días después, llegando prácticamente los valores iniciales que se mantuvieron hasta el final del período estudiado (Fig 4). Contrariamente, la expresión del gen *GA 20-Ox* en estas mismas hojas mostró una tendencia claramente opuesta, alcanzando valores prácticamente nulos, respecto al valor de referencia, a principios de julio y máximos 20 días después, para descender nuevamente durante el resto del período.



**Figura 4.-** Evolución de la expresión relativa de los genes *FT* y *GA 20-Ox* en hojas jóvenes de níspero japonés cv. Algerie desde que comienza el despliegue de las primeras hojas nuevas, hasta el inicio de la diferenciación floral, estados fenológicos 121 y 501 respectivamente. Los valores están expresados como la media de tres repeticiones individuales, ( $n=3$ )  $\pm$  error estándar.

Resulta de interés que el gen *FT* alcanza el máximo 20 días antes que el gen *GA 20-Ox*, (Fig 4), y que mientras el primero apenas alcanzó valores inferiores al valor de referencia, el segundo llegó a valores muy bajos. Es de

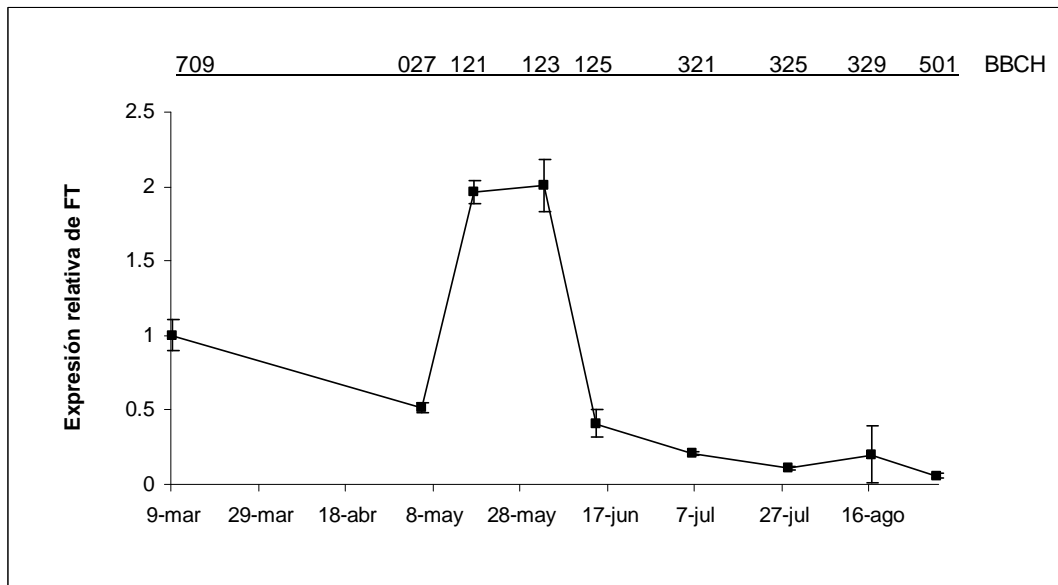
destacar que el primer mínimo de *Ga 20-ox* observado a principios de julio coincidió con la máxima expresión del gen *FT*.



**Figura 5:** Evolución de la expresión relativa del gen *SOC1* en hojas jóvenes de níspero japonés cv. Algeria desde que comienza el despliegue de las primeras hojas nuevas, hasta el inicio de la diferenciación floral, estados fenológicos 121 y 501 respectivamente. Los valores están expresados como la media de tres repeticiones individuales, (n=3) ± error estándar.

Paralelamente, la evolución de la expresión del gen *SOC1* en las mismas hojas, fue prácticamente idéntica a la observada en el gen *FT*. También en este caso el nivel de expresión ascendió ligeramente las primeras fechas de estudio hasta alcanzar el máximo a principios de julio y descender 20 días después, para posteriormente, a diferencia del gen *FT*, ascender de nuevo, en la época próxima a la diferenciación del meristemo, hasta valores muy próximos a los máximos obtenidos a principios de julio (Fig 5).

En este caso el valor máximo alcanzado para esta fecha fue 2,32 veces superior al valor de referencia. A la vista de esto, el período de máxima expresión de los genes promotores de la transición floral estudiados, *FT* y *SOC1*, y por tanto, relacionados con el período de inducción floral de esta especie, estaría comprendido entre finales de junio y principios de julio, algo retrasado respecto a lo registrado en la bibliografía para la mayoría de las especies de esta familia.

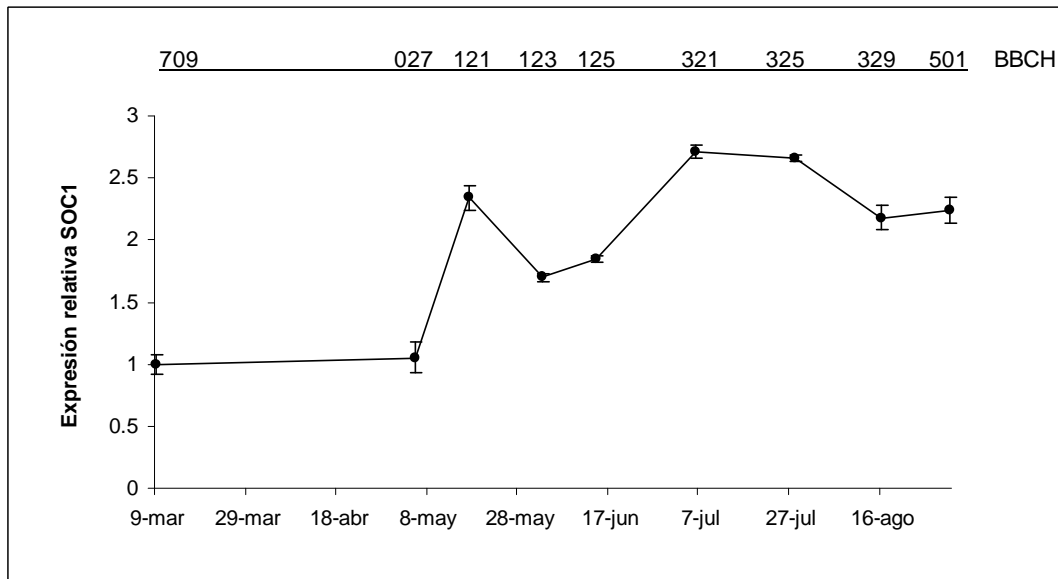


**Figura 6.-** Evolución de la expresión relativa del gen *FT* en hojas adultas de níspero japonés cv. Algeria desde que el fruto había alcanzado su tamaño final hasta el inicio de la diferenciación floral, estados fenológicos 709 y 501 respectivamente. Los valores están expresados como la media, de tres repeticiones individuales ( $n=3$ )  $\pm$  error estándar.

Sin embargo, el análisis de la expresión del gen *FT* en hojas adultas (Fig. 6), es decir, en hojas de más de un año de edad que ya estaban presentes en el árbol cuando emergieron las nuevas y se iniciaba el crecimiento del brote (ver introducción, apartado 1.4), reveló una tendencia diferente. En este caso, la máxima expresión del gen *FT* se detectó a mediados de mayo y se prolongó hasta principios de junio, anticipándose un mes respecto de lo observado en las hojas jóvenes y acercándose más a lo encontrado en especies afines, como el manzano.

Por otra parte, la expresión del gen *SOC1* en las hojas adultas (Fig. 7) sigue una tendencia prácticamente plana durante las dos primeras fechas, para luego ascender en una magnitud 2,5 veces superior al valor de referencia. Esta subida se corresponde con la observada para la misma fecha en el gen *FT* en hojas adultas (Fig. 6). Posteriormente la evolución de *SOC1* experimenta una leve caída para luego volver a subir a principios de julio y mantenerse prácticamente constante hasta el final del periodo estudiado.

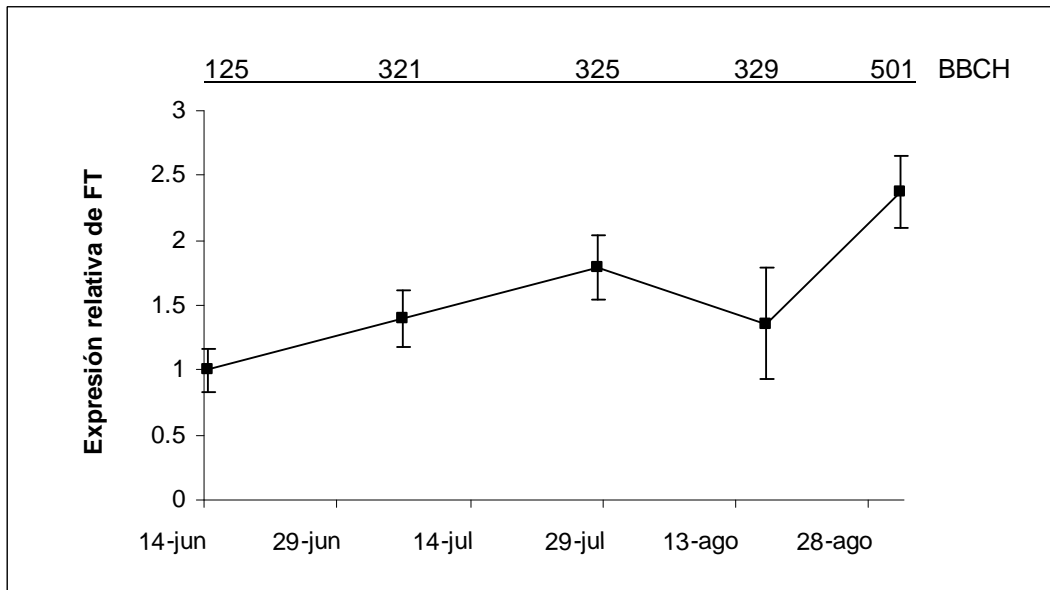




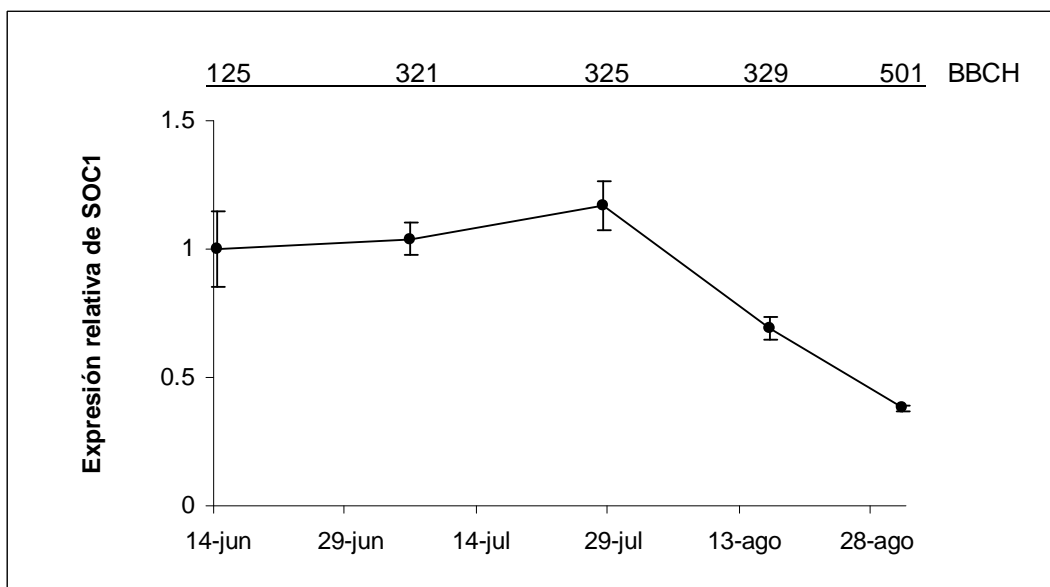
**Figura 7.-** Evolución de la expresión relativa del gen SOC1 en hojas adultas de níspero japonés cv. Algeria desde que el fruto había alcanzado su tamaño final hasta el inicio de la diferenciación floral, estados fenológicos 709 y 501 respectivamente. Los valores están expresados como la media, de tres repeticiones individuales (n=3) ± error estándar.

Aunque el gen *FT* no está descrito como uno de los genes relacionados con la identidad floral del meristemo, su expresión en éste revela una tendencia ligeramente ascendente hasta alcanzar valores máximos en el momento de la diferenciación floral, alcanzando valores 2,5 veces superiores al nivel de referencia (Fig. 8).

Sin embargo, al analizar la expresión de otro gen integrador de la floración, el *SOC1*, en estos órganos, su evolución fue contraria a la observada en el gen *FT*. En este caso, el nivel de expresión se mantuvo constante en las tres primeras fechas analizadas para descender luego hasta alcanzar valores mínimos al inicio de su diferenciación, contrariamente a lo observado en el gen *FT* que alcanzó valores máximos (Fig. 8)



**Figura 8.-** Evolución de la expresión relativa del gen FT en ápices de níspero japonés cv. Algerie desde pleno crecimiento del brote vegetativo, hasta el inicio de la diferenciación floral, estados fenológicos 125 y 501 respectivamente. Los valores están expresados como la media, de tres repeticiones individuales (n=3)  $\pm$  error estándar.



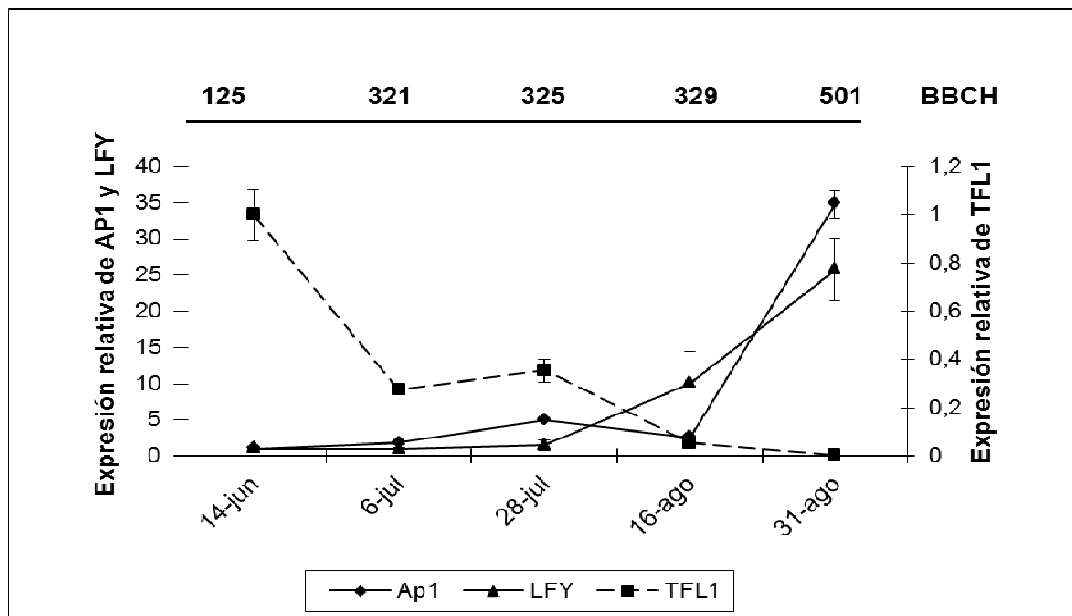
**Figura 9.-** Evolución de la expresión relativa del gen SOC1 en ápices de níspero japonés cv. Algerie desde pleno crecimiento vegetativo, hasta el inicio de la diferenciación floral, estados fenológicos 125 y 501 respectivamente. Los valores están expresados como la media, de tres repeticiones individuales (n=3)  $\pm$  error estándar.

### 3.3.- Análisis de expresión de los genes responsables de la identidad del meristemo.

La evolución en el meristemo de la expresión de los genes responsables de la identidad floral, tanto promotores, *LFY* y *AP1*, como inhibidores, *TFL1*, presenta comportamientos opuestos. Mientras la expresión de ambos promotores aumentó con el tiempo, la del represor por el contrario, descendió hasta anularse prácticamente por completo en el momento de la diferenciación floral (Fig. 6).

Tanto *LFY* como *AP1* alcanzaron sus valores máximos de expresión en la última fecha de análisis, coincidiendo con el inicio del desarrollo del meristemo floral. Mientras el primero de ellos consiguió hasta 25 veces más expresión que su valor de referencia, el segundo llegó hasta 35 veces. Ambos genes registraron valores muy bajos hasta mediados de agosto (Fig. 10), coincidiendo, a su vez, con el descenso de la expresión del gen *SOC1* (Fig. 9).

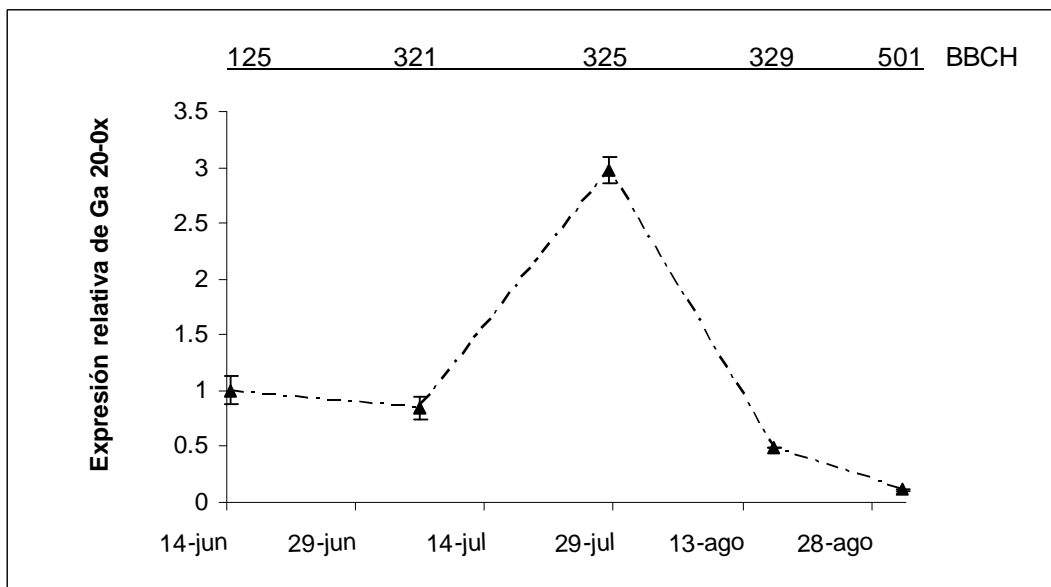
Paralelamente, la expresión de *TFL1*, represor de la floración, descendió progresivamente a medida que nos acercábamos al inicio del desarrollo floral del meristemo (última fecha), en la que llegó prácticamente a anularse.



**Figura 10.-** Evolución de la expresión relativa de los genes AP1, LFY y TFL1 en ápices de níspero japonés cv. Algeria desde pleno crecimiento del brote vegetativo, hasta el inicio de la diferenciación floral, estados fenológicos 125 y 501 respectivamente. Los valores están expresados como la media, de tres repeticiones individuales (n=3) ± error estándar.

Partiendo de los conocimientos que ya se tienen respecto al papel que las giberelinas ejercen en la inhibición de la floración de la mayoría de las especies frutales y, concretamente en el níspero japonés, de manera complementaria se analizó también la expresión del gen GA 20-Ox en los meristemos y en las mismas fechas descritas anteriormente.

La evolución de su expresión a lo largo del tiempo muestra un pico máximo de hasta 3 veces el valor de referencia a finales de julio, seguido de un brusco descenso aproximadamente, 20 días después hasta alcanzar niveles inferiores al valor de referencia en el momento de iniciarse la diferenciación floral (Fig. 11). Debe destacarse la coincidencia en la máxima expresión de este gen en hojas jóvenes y meristemos, en ambos casos a finales de julio, que podría estar relacionada con la salida del reposo estival.



**Figura 11.-** Evolución de la expresión relativa del gen GA 20-Ox en ápices de níspero japonés cv. Algeria desde despliegue de nuevas hojas, pero sin llegar a su tamaño final, hasta el inicio de la diferenciación floral, estados fenológicos 125 y 501 respectivamente. Los valores están expresados como la media, de tres repeticiones individuales (n=3) ± error estándar.

#### 4.- Discusión

En el níspero japonés, nuestros resultados demuestran el gen *FT* encargado de traducir la señal de inducción floral recibida por las hojas, presenta variaciones en su nivel de expresión a lo largo del ciclo del cultivo. En las hojas adultas existe un pico de expresión muy marcado que va desde mediados de mayo a principios de junio. Este incremento coincide con la época de inducción floral ya determinada para el níspero japonés mediante la defoliación (Fatta Del Bosco, 1961) y la aplicación de ácido giberélico (Reig et al., 2011), y es coincidente, a su vez, con los niveles de expresión de este gen en hojas de otras especies de la familia de las Rosáceas, como el manzano y peral (Foster et al., 2003; Hanke et al., 2007).

Sin embargo al estudiar la expresión del gen *FT* en las hojas jóvenes provenientes de la nueva brotación, el patrón de expresión se desplaza en el tiempo, registrándose sus niveles más altos el 7 de julio, coincidiendo con la época de inducción floral descrita por otros autores (Liu et al., 2006; Cuevas y del Grosso, 2011).

Una posible explicación a estas diferencias encontradas en estos dos tipos de hojas puede ser el diferente estado de desarrollo, factor determinante en la capacidad de una hoja como órgano productor y transmisor de la señal floral, como ha sugerido Perez-Barraza et al. (2006). Es más, en experimentos realizados en mango por Nuñez et al. (1996), concluyen que la iniciación floral requiere que las hojas receptoras del estímulo hayan alcanzado cierto estado de madurez, porque de lo contrario esta se ve fuertemente reducida e incluso anulada.

En el níspero japonés, la emisión de hojas nuevas se produce en flujos (Jiménez, 2010), y su crecimiento es escalonado hasta principios de julio, momento en el que se observa una ralentización o parada estival, coincidente con una reducción en la expresión del gen *GA 20-ox*. Una vez superada esta etapa, a finales de julio, se reinicia el crecimiento con un nuevo flujo que se corresponde, en este caso, con un máximo en la expresión de este gen, tanto en hojas jóvenes como en ápices. Inmediatamente después comienza la

diferenciación floral, el gen *GA 20-ox* alcanza los niveles mínimos de expresión y el crecimiento vegetativo se detiene.

Este comportamiento antagónico de los genes *FT* y *GA 20-ox* es coherente con el papel atribuido a las giberelinas en la inhibición de la floración de las especies leñosas (Pharis y King, 1985., Guardiola et al., 1977), demostrado recientemente también en el níspero japonés (Reig et al., 2011). Los resultados de Muñoz-Fambuena et al. (2011) así lo ratifican al demostrar un efecto represor de la expresión del gen *FT* en los cítricos como consecuencia de la aplicación exógena de ácido giberélico.

En nuestros experimentos, la evolución de la expresión del gen *SOC1*, otro promotor de la floración, fue similar en las hojas jóvenes y en las adultas. La función principal de este gen tiene lugar en el meristemo, activando el gen *LFY*, pero puede expresarse también en las hojas (Borner et al., 2000; Hepworth et al., 2002), y existen modelos que lo explican mediante una vía alternativa de activación en su expresión a través del gen *CO* en las hojas (Samach et al., 2000; Michaels et al., 2005; Moon et al., 2005; Yoo et al., 2005). Se ha sugerido que esta expresión de *SOC1* en las hojas podría tener un efecto sobre la inducción floral, y que su proteína podría moverse hasta el ápice al igual que lo hace la proteína *FT* (Lee y Lee, 2010). Sin embargo esto está todavía por demostrar.

Los genes *LFY* y *AP1* son responsables de asignar al meristemo la identidad floral y de activar la acción en cadena de una serie de genes responsables del desarrollo de los órganos constituyentes de una flor o de una inflorescencia (Bowman et al. 1993; Mandel and Yanofsky 1995; Weigel y Nilsson 1995; Savidge, 1996). No resulta extraño, por tanto, que la expresión relativa de estos genes aumente al inicio de la diferenciación floral. Así, *LFY* y *AP1* aumentan su expresión relativa a mediados de agosto, alcanzando su valor máximo al final del período estudiado, esto es, una vez formadas las flores. Estos resultados son coherentes con los obtenidos por Rodríguez (2006), quien demostró, mediante análisis de microscopía electrónica, que en la variedad "Algerie" y, en condiciones climáticas mediterráneas, la diferenciación floral se inicia a finales de julio y finaliza unos pocos días antes de la floración, en octubre.

Rodríguez divide el proceso en siete fases, de entre las cuales la diferenciación del eje principal de la inflorescencia tiene lugar a principios de agosto y la del eje secundario a mediados de ese mismo mes. Es importante destacar que en este proceso de la determinación de la arquitectura floral el gen *LFY* juega un papel fundamental, permitiendo la formación de inflorescencias (Liu et al., 2009). De nuestros resultados se desprende que en el níspero japonés los niveles de expresión del gen *LFY* se encuentran en continuo aumento justo en las fechas en que tiene lugar este proceso.

Estos resultados se confirman al estudiar la evolución en los ápices de la expresión relativa del gen *TFL1* relacionado con la identidad vegetativa del meristemo y que actúa a su vez como un inhibidor de los genes de identidad floral del mismo. Los niveles más altos de su expresión los encontramos a mediados de junio, cuando los ápices permanecen todavía indiferenciados y a partir de este momento descendieron constantemente, alcanzando a mediados de agosto los valores de expresión hasta 2000 veces inferiores a los de referencia y llegando a ser prácticamente indetectables a finales de agosto, momento en el que sus genes antagónicos de identidad floral, *LFY* y *AP1*, presentaron valores máximos de su expresión. Ello confirma la relación de genes promotores/represores de la floración como un indicador del proceso, de modo que al comparar esta ratio al inicio y al final del período estudiado se observa que, inicialmente cuando el represor (*TFL1*) se encuentra en su nivel más alto los promotores de la floración (*LFY* y *AP1*) registran sus valores más bajos, y al final, en plena diferenciación floral, el comportamiento es completamente opuesto. Mediante este equilibrio promotores/represores la planta asegura que los genes de la identidad floral se expresen justo en el momento adecuado, cuando todos los factores endógenos y exógenos son los adecuados para su correcto desarrollo reproductivo (Yant et al., 2009)

Del mismo modo, la comparación de la expresión de los genes *SOC1* y *AP1* en el meristemo indica una acción antagónica entre ambos, de modo que al tiempo que aumenta en los ápices la expresión del gen *AP1* disminuye la del gen *SOC1*. El gen *AP1*, junto al gen *CAL*, actúa de manera redundante para mantener la identidad del meristemo floral y prevenir su reversión mediante la represión de la actividad del gen *SOC1* (Liljegren et al., 1999; Yu et al., 2004).

Si bien el fenómeno de la reversión floral no ha sido todavía estudiado en el níspero japonés, los genes *AP1* y *SOC1* que en esta especie se comportan de manera opuesta, lo hacen de un modo similar a las especies en las que se presenta el fenómeno.

La intención entre los genes estudiados, esto es, la acción del gen *SOC1* activando de manera directa la expresión del gen *LFY* que, a su vez, activa la expresión del *AP1* que, finalmente, reprime la expresión del gen *SOC1*, da cuenta de la complejidad de este proceso que cuenta con numerosos puntos de control, requiriendo de un perfecto balance entre promotores y represores para poder llevar a término de manera óptima la transformación de un meristemo indiferenciado en uno reproductivo. Adicionalmente, el proceso de la inducción floral cuenta con señales que actúan de manera redundante, como es el caso de la activación del gen *AP1* tanto por la acción del gen *FT* como por la de *LFY*. Este tipo de relaciones aseguran la amplia percepción de los cambios endógenos y exógenos y permiten, que aún en el caso de que una ruta de señalización falle, la planta sea capaz de reproducirse utilizando una vía alternativa. Todos los balances y ratios señalados son coherentes con nuestros resultados, por lo que aun siendo este el primer estudio de tipo molecular en el níspero japonés, la extrema complejidad biológica del proceso floracional exige seguir estudiando para aclarar las relaciones moleculares, hormonales, ambientales y nutricionales implicadas en la inducción y diferenciación floral de esta especie.



## **5.- Conclusiones**

A la vista de lo anterior, las conclusiones de este trabajo son:

1. La máxima expresión relativa de los genes promotores de la inducción floral, FT y SOC1, localizan la época de inducción floral del níspero japonés entre mediados de mayo y principios de junio.
2. El balance positivo entre los promotores, LFY, AP1 y represores TLF1 de la identidad floral del meristemo a favor de los primeros, sitúan el periodo diferenciación floral en esta especie a partir de mediados de agosto, hasta la antesis.

## 6. Referencias Bibliográficas

- Abe, M., Kobayashi, Y., Yamamoto, S., Daimon, Y., Yamaguchi, A., Ikeda, Y., Ichinoki, H., Notaguchi, M., Goto, K., Araki, T. 2005. FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. *Science* 309, 1052–1056.
- Addicott, F.T. 1983. *Abscisic acid*. Praeger, New York.
- Agustí, M. y Reig, C. 2006. Fisiología. En: *El Cultivo del Níspero Japonés*, M. Agustí, C. Reig y P. Undurraga (Eds.), Gráficas Alcoy, España, pp 97-129.
- Ahn, J.H., Miller, D., Winter, V.J., Banfield, M.J., Lee, J.H., Yoo, S.J. 2006. A divergent external loop confers antagonistic activity on floral regulators FT and TFL1. *EMBO J.* 25:605-614.
- Ayalon, S., y Monselise, S. P. 1960. Flower bud induction and differentiation in the Shamouti orange. *Proceedings of the American Society of Horticultural Science*, 75: 216-221.
- Bangerth, F. 2006. Flower induction in perennial fruit trees: still and enigma?. *Acta Hort.* 727:177-196.
- Benlloch, R., Berbel, A., Serrano-Mislata, A., y Madueño, F. 2007. Floral initiation and inflorescence architecture: A comparative view. *Ann. Bot.* 100: 659–676.
- Bernier, G., J. Kinet, y Sachs, R. 1981. *The physiology of flowering*, Vol I. The initiation of flowers. 274 p. CRC Press, Boca Ratón, Florida, USA.
- Bowman, J. L., Alvarez, J., Weigel, D., Meyerowitz, E. M. and Smyth, D. R. (1993). Control of flower development in *Arabidopsis thaliana* by APETALA1 and interacting genes. *Development*. 119: 721-743.
- Buttrose, M. y D. Alexander. 1978. Promotion of floral initiation in 'Fuerte' avocado by low temperature and short daylength *Scientia Horticulturae*. 8 213-219
- Calabrese, F. 1992. *El aguacate*. Madrid. Ediciones Mundi-Prensa. 249 p.
- Callejas, R. y F. Bangerth. (1998). Is auxin export of apple fruit an alternative signal for inhibition of flower bud induction? *Acta Hort.* 463:271-277.
- Corbesier L, Vincent C, Jang SH, et al. 2007. FT protein movement contributes to long-distance signalling in floral induction of *Arabidopsis*. *Science* 316, 1030–1033.
- Cuevas, J. y Del Grosso, L. 2011. Loquat response to experimental defoliation: shoot growth, bud dormancy and flowering. *Acta Hort.* (ISHS) 887:185-190

Cuevas, J., Gavilán, J., Lorente, N. 1997. Fenología del níspero japonés (Cv. Algerie) en la Costa de Almería. *Actas de Horticultura* 15:490–495

Cuevas, J., Pinillos, V., Cañete, M. L., González, M., Alonso, F., Fernández, M. D. y Hueso, J. J. 2008. Optimal levels of postharvest deficit irrigation for promoting early flowering and harvest dates in loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.). *Agric. Water Manag.* 96:831–838.

Cuevas, J., Romero, I.M., Fernández, M.D., y Hueso, J.J. 2007a. Deficit irrigation schedules to promote early flowering in 'Algerie' loquat. *Acta Hort.* 750: 281-286.

Chan, B. y Cain, J. 1967. The effect of seed formation on subsequent flowering in apple. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 91: 63-67.

Chang, S., J. Puryear y J. Caine. 1993. Simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 11(2): 113-116.

Davenport, T. L. 1990. Citrus flowering. *Horticultural Review*, 12: 349-408.

Davenport, T.L., y Nuñez-Elisea, R. 1997. Reproductive physiology, p. 69–146. In: R.E. Litz (ed.). *Mango botany, production and use*. CAB Intl., Wallingford Oxon, U.K

Endo, M., Nakamura, S., Araki, T., Mochizuki, N., Nagatani, A. 2005. Phytochrome B in the mesophyll delays flowering by suppressing FLOWERING LOCUS T expression in *Arabidopsis* vascular bundles. *Plant Cell* 17:1941-1952.

Ersoy, N., Kaynak, L. y Kankaya, A. (2008). Levels of internal Indole-3-acetic acid and abscisic acid in different physiological growth periods in the leaves of loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) fruit. *Asian J. Chem.* 21: 4141-4148.

Esumi, T., R. Tao and K. Yonemori. 2005. Isolation of LEAFY and TERMINAL FLOWER 1 homologues from six fruit tree species in the subfamily Maloideae of the Rosaceae. *Sex. Plant Reprod.* 17:277–287.

Farrona, S., Coupland, G., Turck, F. 2008. The impact of chromatin regulation on the floral transition. *Semin. Cell Dev. Biol.* 19: 560–573.

Fatta del Bosco, G. 1961. Indagini sull'epoca di differenziazione delle gemme nel nespolo del Giappone. *Riv. Ortoflorofrut Ital* 2: 104–118

Faust, M. 1989. *Physiology of temperate zone fruit trees*. 388 p. John Wiley and Sons, New York, USA.

Fernández-Escobar, R., M. Benlloch, C., Navarro y Martín, G.C. 1992. The time of floral induction in the olive. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 117:304-307.

Fleige, S. y Pfaffl, M. 2006. RNA integrity and the effect on the real- qRT-PCR performance. *Molecular Aspects of Medicine* 27: 126–139

García-Luís, A. Almela, V. Monerri, C. Agustí, M. y Guardiola, J. L. 1986. Inhibition of flowering in vivo by existing fruits and applied growth regulators in *Citrus unshiu*. *Physiologia Plantarum* 66: 515-520.

Gassner, G. 1918. Beiträge zur physiologischen Charakteristik sommer- und winterannueller Gewächse, insbesondere der Getreidepflanzen. *Z. Bot.* 10, 417–480.

González-Rossia, D., Juan, M., Reig, C. y Agustí, M. 2006. The inhibition of flowering by means of gibberellic acid application reduces the cost of hand thinning in Japanese plums (*Prunus salicina* Lindl.). *Sci. Hortic.* 110: 319-323.

Guardiola, J. L., Agustí, M., y García-Marí., F. 1977. Gibberellic acid and flower bud development in sweet orange. *Proceedings of the International Society of Citriculture.* 2: 696-699.

Haaf, F., Sanner, A. y Straub, F. 1985. Polymers of N-Vinylpyrrolidone: Synthesis, characterisation and uses. *Polymer Journal* 17 (1): 143-152.

Hackett, W. P. y Hartmann, H. T. 1964. Inflorescence formation in olive as influenced by low temperature, photoperiod, and leaf area. *Botanical Gazette.* 125: 65-72.

Harley, C. P. Masure, M. P. y Magness, J. R. 1932. Effect of leaf area, nitrate of soda and soil moisture on fruit bud formation in the 'Delicious' apple. *Proceedings of the American Society of Horticultural Science* 29: 193-198.

He, Y., and Amasino, R.M. 2005. Role of chromatin modification in flowering-time control. *Trends Plant Sci.* 10, 30–35.

Hedden, P., y Phillips, A.L. 2000. Gibberellin metabolism: New insights revealed by the genes. *Trends Plant Sci.* 5, 523–530.

Hegele, M., Sritontip, C., Chattrakul, A., Tiyyayon, P., Naphrom, D., Sringarm, K., Srumsiri, P., Manochai, P. y Wünsche, J. N. 2010. Hormonal control of flower induction in litchi and longan. *Acta Hort.* 863: 305-314.

Jimenez, J. 2010. Factores que controlan el crecimiento del brote y la floración del níspero japonés (*Eriobotrya japonica* Lindl.) cv. Algeria en respuesta al riego deficitario. Proyecto fin de carrera, Universidad de Almería, España. 135 pp.

Kaufmann, K., Wellmer, F., Muino, J.M., Ferrier, T., Wuest, S.E., Kumar, V., Serrano-Mislata, A., Madueno, F., Krajewski, P., Meyerowitz, E.M., Angenent, G.C., y Riechmann, J.L. 2010b. Orchestration of Floral Initiation by APETALA1. *Science* 328: 85–89

Kiefer, E., W. Heller y D. Ernst. 2000. A Simple and efficient protocol for

isolation of functional RNA from plant tissues rich in secondary metabolites. *Plant Mol. Biol. Rep.* 18: 33-39.

Kim D.H., Doyle M.R., Sung S., Amasino R.M. 2009. Vernalization: Winter and the timing of flowering in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 25: 277–299

Kobayashi, Y. y Weigel, D. 2007. Move on up, it's time for change mobile signals controlling photoperiod-dependent flowering. *Genes Dev.* 21: 2371–2384.

Komeda Y. 2004. Genetic regulation of time to flower in *Arabidopsis thaliana*. *Annu Rev Plant Biol* 55:521-535.

Koshita, Y., Takahara, T., Ogata, T., Goto, A., 1999. Involvement of endogenous plant hormones (IAA, ABA, GAs) in leaves and flower bud formation of satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.). *Scientia Hort.* 79, 185–194.

Lang, G.A. 1987. Dormancy: a new universal terminology. *Hort. science* 22:817–820.

Lavee S, Melamud H Ziv M y Bernstein Z. 1981. Necrosis in grapevine buds (*Vitis vinifera* cv. Queen of Vineyard). Relation to vegetative vigor. *Vitis* 20: 8-14.

Lee, I., y Amasino, R.M. 1995. Effect of vernalization, photoperiod and light quality on the flowering phenotype of *Arabidopsis* plants containing the FRIGIDA gene. *Plant Physiol.* 108:157-162.

Lee, J., y Lee, I. 2010. Regulation and function of SOC1, a flowering pathway integrator. *Journal of Experimental Botany* 61, 2247–2254.

Lehninger, A.L. 2005. *Lehninger principles of biochemistry* (4 th ed.). New York: W.H Freeman.

Li D., Liu C., Shen L., Wu Y., Chen H., Robertson M., Helliwell C.A., Ito T., Meyerowitz E., Yu H. (2008). A repressor complex governs the integration of flowering signals in *Arabidopsis*. *Dev. Cell* 15: 110–120.

Li, B., Xie, Z., Zhang, A., Xu, W., Zhang, C., Liu, Q., Liu, C., Wang, S. 2010. Tree growth characteristics and flower bud differentiation of sweet cherry (*Prunus avium* L.) under different climate conditions in China. *Hort. Sci.* 37: 6–13

Liljegren, S. J., Gustafson-Brown, C., Pinyopich, A., Ditta, G. S. y Yanofsky, M. F. 1999. Interactions among APETALA1, LEAFY, and TERMINAL FLOWER1 specify meristem fate. *Plant Cell* 11, 1007-1018

Liu, Y.X., Hu, G.B., Lin, S.Q. y Han, Z.H. 2010. Ectopic Expression of LFY and API Homologues of Loquat. *Acta Hort.* 887: 227-232

Liu, Z.L., Lin, S.Q., Chen, H.B. 2007. Phenological and anatomical observations

of morphological differentiation of flower bud in loquat. *Acta Hort.*, 750, pp. 299–306.

Lohmann J.U., Hong, R.L., Hobe, M., Busch, M.A., Parcy, F., Simon, R., y Weigel, D. 2001. A molecular link between stem cell regulation and floral patterning in *Arabidopsis*. *Cell* 105: 793–803.

Looney, N. E., Pharis, R.P. y Noms, M. 1985. Promotion of flowering in apple trees with gibberellin A4 and C-3 epi-gibberellin A4. *Planta* 165:292–294.

Martín, F., C. W. Campbell, y R. M. Ruberté. 1987. *Perennial Edible Fruits of the Tropics. An inventory.* Agricultural Research Service. USDA. Agriculture Handbook No. 642.

Martínez-Fuentes, A. 2010. El tiempo de permanencia del fruto en el árbol y su relación con la floración de los cítricos. PhD Tesis, Universidad politécnica, Valencia, España.

Monselise S P, Goldschmidt E E and Golomb A. 1981. Alternate bearing in citrus and ways of control. *Proc. Int. Soc. Citriculture*, 1: 232-242.

Muñoz-Fambuena, N., Mesejo, C., González-Mas, M., Iglesias, D., Primo-Millo, E., y Agustí, M. 2012. Gibberellic Acid Reduces Flowering Intensity in Sweet Orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] by Repressing *CiFT* Gene Expression. *Journal of plant growth regulation*. 25 February 2012: 1-8.

Mutasa-Göttgens E, Hedden P. 2009. Gibberellin as a factor in floral regulatory networks. *Journal of Experimental Botany*. 60:1979–1989.

Nakagawa, N., Honsho, Ch., Kanzakia, S., Shimizu, K., y Utsunomiya, N. 2012. Isolation and expression analysis of FLOWERING LOCUS T-like and gibberellin metabolism genes in biennial-bearing mango trees. *Sci. Hort.* 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.

Parcy F. 2005. Flowering: a time for integration. *International Journal of Developmental Biology*. 49:585-593.

Pérez-Barraza, M. H., Vázquez-Valdivia, V. y Salazar-García, S. 2006. Defoliación de brotes apicales y su efecto sobre la diferenciación floral del mango 'Tommy Atkins'. *Rev. Fitotec. Méx.* 29(4):313- 319.

Pharis, R. D. y King, R. W. 1985. Gibberellins and reproductive development in seed plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 36: 517-568.

Piñeiro, M., Coupland G. 1998. The control of flowering time and floral identity in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 117:1–8.

Powell, L.E. 1987. Hormonal aspects of bud and seed dormancy in temperate-zone woody plants. *HortScience* 22: 845-850.

Reece, P. C. Furr, J. R. y Cooper, W. C. 1949. Further studies of floral induction in the 'Haden' mango (*Mangifera indica* L.) *American Journal of Botany* 36: 734-740.

Reig C, Gonzalez-Rossia D, Juan M y Agusti M. 2006. Effects of fruit load on flower bud initiation and development in peach. *Journal of horticultural science & biotechnology* 81. 6: 1079-1085.

Reig, C. 2010. La acción del fruto en el desarrollo del níspero japonés (*E. japonica*): El fruto y su relación con el desarrollo del árbol frutal. Tesis de doctorado

Reig, C. Farina, V. Volpe, G. Mesejo, C. Martínez-Fuentes, A. Barone, F. Calabrese, F. Agustí, M. 2011. Gibberellic acid and flower bud development in loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.). *Sci Hort* 129: 27–31

Rodríguez, M.C. 2006. Estudio del desarrollo floral en níspero japonés (*Eriobotrya japonica* Lindl.) mediante microscopía electrónica de barrido (MEB). Proyecto Fin de Carrera. Universidad de Almería.

Searle I, He YH, Turck F, Vincent C, Fornara F, Krober S, Amasino RA, Coupland G. 2006. The transcription factor FLC confers a flowering response to vernalization by repressing meristem competence and systemic signalling in *Arabidopsis*. *Genes and Development* 20, 898–912.

Serrano-Mislata, A. 2010. Análisis de la regulación transcripcional del gen TERMINAL FLOWER 1 de *Arabidopsis*. Tesis Doctoral. Universitat Politècnica de València.

Song, H., Liu, Y., Hu, G., Qin Y., y Lin, S. 2011. An improved method for total RNA isolation from recalcitrant loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) buds. *Pak. J. Bot.*, 43(2): 1163-1171.

Southwick, S. M. y Davenport, T. L. 1986. Characterization of water stress and low temperature effects on flower induction in citrus. *Plant Physiology* 81(1): 26-29.

Southwick, S.M., Weis, K.G., Yeager, J.T. y Zhou, H. 1995a. Controlling cropping in "Loadel" cling peach using gibberellin: effects on flower density, fruit distribution, fruit firmness, fruit thinning and yield. *J. Amer. Soc. Hortic. Sci.*, 120 :6. 1087-1095.

Spann, T.M., Williamson, J.G. y Darnell, R.L. 2003. Photoperiodic effects on vegetative and reproductive growth of *Vaccinium darrowi* and *V. corymbosum* Interspecific hybrids. *HortScience* 38(2):192-195.

Suarez-Lopez, P., Wheatley, K., Robson, F., Onouchi, H., Valverde, F. y Coupland, G. 2001. CONSTANS mediates between the circadian clock and the control of flowering in Arabidopsis. *Nature*, 410: 1116–1120.

Wagner, D., Sablowski, R. W. M. y Meyerowitz, E. M. 1999. Transcriptional activation of APETALA1 by LEAFY. *Science* 285: 582-584.

William, D. A., Su, Y., Smith, M. R., Lu, M., Baldwin, D. A. y Wagner, D. 2004. Genomic identification of direct target genes of LEAFY. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 1775-1780.

Xu, C.J., Chen, K.S., Zhang, B., Wang, Q.J. y Ye, W.J. 2004. A study on methods for RNA extraction from citrus tissues. *J. Fruit Sci.* 21(2): 136-140.

Zeng, Y., y Yang, T. 2002. RNA isolation from highly viscous samples rich in polyphenols and polysaccharides. *Plant Mol Biol Rep* 20: 417-417.