

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALENCIA

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE
INGENIERÍA AGRONÓMICA Y DEL MEDIO
NATURAL**



LA INHIBICIÓN DE LA FLORACIÓN EN LOS CÍTRICOS. MECANISMO DE CONTROL EN EL ESTADO JUVENIL Y ADULTO.

TRABAJO FIN DE MÁSTER

MÁSTER UNIVERSITARIO EN INGENIERÍA AGRONÓMICA

Alumna: María Nicolás Almansa

Director: Carlos Mesejo Conejos

Curso Académico: 2016-2017

VALENCIA, julio de 2017

La inhibición de la floración en los cítricos. Mecanismo de control en el estado juvenil y adulto.

RESUMEN

En los cítricos, el meristemo siempre está preparado para florecer a no ser que algún factor/es represivo lo impida. En plantas juveniles y árboles con alta carga de fruta, sin embargo, el meristemo es incapaz de desarrollar una inflorescencia. En los cítricos adultos, el principal factor endógeno que controla la inducción floral es el fruto. La carga de fruta reprime la expresión de los genes de tiempo de floración, de identidad del meristemo y organogénesis, sin embargo, no se conoce mucho sobre el factor que reprime la floración en los meristemos de plantas juveniles. Durante esta etapa, las yemas son incapaces de reconocer las señales inductivas, como la baja temperatura y el estrés hídrico, y necesitan madurar progresivamente para reconocerlas y ser capaces de florecer. Se desconoce el mecanismo por el cual la inducción floral está reprimida en plantas juveniles, de forma constitutiva, y en árboles adultos cuando tienen muchos frutos. En este TFM se plantea la siguiente hipótesis de trabajo: los árboles juveniles y adultos con frutos difieren en el mecanismo endógeno de inhibición de la floración. Para tal fin, se estudia la expresión de los genes de inducción floral (o tiempo de floración), los genes de identidad del meristemo (o diferenciación floral) y los genes de organogénesis floral en yemas y hojas de plantas de plantas jóvenes y árboles adultos durante la etapa de inducción-diferenciación floral (noviembre-marzo). Además, el estudio se completa con el análisis de expresión de estos genes en arboles adultos sin fruto, que florecen abundantemente. Los genes estudiados son *FLOWERING LOCUS T (FT)*, *FLOWERING LOCUS D (FD)*, *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESION OF CONSTANS (SOC1)*, *APETALA1 (AP1)*, *LEAFY (LFY)* *SEPALLATA1 (SEP1)* y *SEPALLATA3 (SEP3)*. Los estudios de expresión génica se realizan con la técnica RT-qPCR.

Palabras clave: Citrus, juvenilidad, inhibición floral, *FT*, *SEP1*, *SEP3*, *FD*, *SOC1*

Flowering inhibition in Citrus: a comparison between the juvenile and adult stages.

ABSTRACT

In Citrus, the meristem is always ready to flower, unless a repressive factor(s) impedes it. In juvenile trees and in heavy-crop-load trees, however, the meristem is unable to develop into inflorescence. Fruit represses the expressions of the flowering time genes, that of identify genes and organogénesis genes, but little is known about which is the factor repressing the flowering in a juvenile tree meristem. During this stage, the buds are insensitive to floral inductive signals, such as low temperatura and water stress, and need to mature progresively to recognize them and to be able to flower. The mechanism by which floral induction is repressed in juvenile plants, constitutively, and in heavy-crop-adult-trees is unknown. In this TFM we propose the following hypotesis: juvenile and heavy-crop-adult-trees differ in the endogenous mechanism of the inhibition of flowering. For this purpose, we studied the expression of floral induction genes (or flowering time), meristem identify genes (or floral differentiation) and floral organogénesis genes in buds and leaves of juvenile plants and heavy-crop-adult-trees during the floral bud induction and differentiation period (November-March). In addition, we also studied the expression of these genes in fruitless-adult-trees, which are prone to flower profusely. The genes studied are FLOWERING LOCUS T (FT), FLOWERING LOCUS D (FD), SUPPRESSOR OF OVEREXPRESION OF CONSTANS (SOC1), APETALA1 (AP1), LEAFY (LFY) SEPALLATA1 (SEP1) y SEPALLATA3 (SEP3). Gene expression studied are performed using the RT-qPCR technique.

Keywords: Citrus, juvenility, flowering inhibition, FT, SEP1, SEP3, FD, SOC1

La inhibició de la floració en els cítrics. Mecanisme de control en l'estat juvenil i adult.

RESUM

En els cítrics, el meristema sempre està preparat per a florir llevat que algun factor repressiu ho impedeixi. En plantes juvenils i arbres amb alta càrrega de fruita, però, el meristema es incapaç de desenvolupar una inflorescència. En els cítrics adults, el principal factor endogen que controla la inducció floral es el fruit. La càrrega de fruita reprimeix l'expressió dels gens de temps de floració, d'identitat del meristema i organogènesi, però, no es coneix molt sobre el factor que reprimeix la floració en els meristemes de plantes juvenils. Durant aquesta etapa, les llemes són incapaces de reconèixer les senyals inductives, com la baixa temperatura i l'estrès hídric, i necessiten madurar progressivament per reconèixer-les i ser capaços de florir. Es desconeix el mecanisme pel qual la inducció floral està reprimida en plantes juvenils, de manera constitutiva, i en arbres adults quan tenen molts fruits. En aquest TFM es planteja la següent hipòtesi de treball: els arbres juvenils i adults amb fruits difereixen en el mecanisme endogen d'inhibició de la floració. per a tal fi, s'estudia l'expressió dels gens d'inducció floral (o temps de floració), els gens d'identitat del meristema (o diferenciació floral) i els gens de organogènesi floral a llemes i fulles de plantes joves i arbres adults durant l'etapa d'inducció-diferenciació floral (novembre-març). A més, l'estudi es completa amb l'anàlisi d'expressió d'aquests gens en arbres adults sense fruita, que floreixen abundantment. Els gens estudiats són *FLOWERING LOCUS T (FT)*, *FLOWERING LOCUS D (FD)*, *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESION OF CONSTANS (SOC1)*, *APETALA1 (AP1)*, *LEAFY (LFY)* *SEPALLATA1 (SEP1)* i *SEPALLATA3 (SEP3)*. Els estudis d'expressió gènica es realitzen amb la tècnica RT-qPCR.

Paraules claus: Citrus, juvenilidad, inhibició floral, , *FT*, *SEP1*, *SEP3*, *FD*, *SOC1*

ÍNDICES

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. LA FLORACIÓN	1
1.1.1. Inducción, diferenciación y organogénesis floral.....	1
1.2. LA FLORACIÓN EN LOS CÍTRICOS.....	6
1.2.1. La juvenilidad	6
1.2.2. La fase adulta. Factores reguladores.....	7
2. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	11
3. MATERIAL Y MÉTODOS	12
3.1. Material vegetal y diseño experimental	12
3.1.1. Experimento I	12
3.1.2. Experimento II	13
3.2. Evaluación de la brotación y floración.....	14
3.3. Análisis de la expresión génica	14
3.3.1. Extracción y purificación de ARN	14
3.3.2. Retrotranscripción	15
3.3.3. qPCR.....	15
3.4. Análisis estadístico.....	17
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
4.1. Evaluación de la floración de plantas adultas y juveniles.	19
4.2. Estudio genético del comportamiento de plantas juveniles y adultas.	19
4.2.1. Expresión relativa de los genes de tiempo de floración.	19
4.2.2. Expresión relativa de los genes de identidad del meristemo	23
4.2.3. Expresión relativa de los genes de identidad del órgano floral	26
4.3. Estudio de la adquisición de la madurez de las plantas juveniles.....	27
5. CONCLUSIONES	30
6. BIBLIOGRAFÍA	31
7. ANEJO I	31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Expresión relativa de los genes de tiempo de floración en las hojas (A, C y E) y en las yemas (B, D, y F) de árboles adultos con y sin capacidad para florecer (FL-ADULTO y NFL-ADULTO, respectivamente) y plantas juveniles (NFL-JUVENIL). Cada valor es la media de 3 réplicas técnicas a partir de una muestra conjunta de 3 réplicas biológicas. El tamaño de los símbolos es mayor que el error estándar. La barra vertical verde indica el valor de la mínima diferencia significativa (LSD) entre árboles. 22

Figura 2. Expresión relativa de los genes de identidad de floración en las yemas de árboles adultos con y sin capacidad para florecer (FL-ADULTO y NFL-ADULTO, respectivamente) y plantas juveniles (NFL-JUVENIL). Cada valor es la media de 3 réplicas técnicas a partir de una muestra conjunta de 3 réplicas biológicas. El tamaño de los símbolos es mayor que el error estándar. La barra vertical verde indica el valor de la mínima diferencia significativa (LSD) entre árboles. 25

Figura 3. Expresión relativa de los genes de organogénesis floral en las yemas de árboles adultos con y sin capacidad para florecer (FL-ADULTO y NFL-ADULTO, respectivamente) y plantas juveniles (NFL-JUVENIL). Cada valor es la media de 3 réplicas técnicas a partir de una muestra conjunta de 3 réplicas biológicas. El tamaño de los símbolos es mayor que el error estándar. La barra vertical verde indica el valor de la mínima diferencia significativa (LSD) entre árboles. 26

Figura 4. Evolución de la expresión de los genes que regulan la floración en el meristemo de yemas laterales de plantas Citrange Carrizo de diferente edad y capacidad para florecer (juveniles en rojo, adultas en azul). 29

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Integración de las distintas rutas génicas implicadas en la inducción floral en *Arabidopsis thaliana* (Fuente: Adaptada de Bernier y Périlleux, 2005 y Seguí-Simarro, 2011). 3

Ilustración 2. Diagrama del modelo ABCDE para la determinación de la identidad de los órganos en las flores de *Arabidopsis thaliana*. (Fuente: Adaptada de Liu et al., 2009). 5

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Listado de los primers usados para RT-qPCR. 16

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LA FLORACIÓN

La floración consiste en el cambio del programa de desarrollo de los meristemos, de modo que cuando un meristemo vegetativo (agrupación de células indiferenciadas que se dividen activamente y originan hojas y ramificaciones) recibe una señal determinada, su programa de desarrollo se ve alterado y se convierte en un meristemo reproductivo con capacidad para producir flores o inflorescencias (Blázquez *et al.*, 2011; Nishikawa *et al.*, 2013). Este fenómeno necesita una interacción coordinada de cambios moleculares y bioquímicos iniciados en las hojas y transmitidos al meristemo apical o lateral (Corbesier *et al.*, 2005).

La floración es la fase inicial del proceso reproductivo de la planta, y se divide, a su vez, en varias etapas sucesivas: 1) la inducción floral, 2) la diferenciación floral, 3) la maduración de los verticilos florales, y por último, 4) la antesis, que da paso al inicio de la segunda fase del proceso reproductivo de la planta, esto es, la fructificación (Zeevaart, 1976; Tadeo *et al.*, 2003; Valiente y Albrigo, 2004; Blázquez *et al.*, 2011).

Debido a que el éxito reproductivo de la planta depende de que la floración se dé en el momento más adecuado de su desarrollo, y cuando las condiciones ambientales sean favorables, las plantas han desarrollado un mecanismo de inducción de la floración que integra señales muy diversas.

1.1.1. Inducción, diferenciación y organogénesis floral.

Los procesos de inducción y diferenciación floral han sido ampliamente estudiados en plantas herbáceas de ciclo corto, y algo menos en las plantas leñosas, ya que su ciclo anual dificulta el estudio.

Davenport (1990) estudió la fenología, morfología y biología de la floración de forma exhaustiva, definiendo la **inducción floral** como el proceso a través del cual las yemas vegetativas son promovidas a florecer. Durante esta etapa se producen cambios endógenos, que Davenport interpretó como una modificación de la distribución y contenido de nutrientes, hormonas y

proteínas en el interior del meristemo apical. La **iniciación floral** es el periodo en el que suceden diversos cambios histológicos sin llegar a observarse diferencias morfológicas, mientras que la **diferenciación floral** es la transición morfológica y anatómica de los meristemos vegetativos a meristemos florales (Davenport, 1990). Los cambios en el meristemo vegetativo comienzan con un ensanchamiento y alisamiento de su porción apical seguido de la aparición de los primordios de sépalos. Las etapas siguientes del proceso morfogenético residen en la diferenciación de los primordios de pétalos, estambres y, por último, los carpelos (Bernier *et al.*, 1993).

La iniciación de la fase reproductiva está regulada por diferentes rutas de señalización floral coordinadas por factores ambientales y endógenos, como el fotoperiodo, la temperatura, el estrés hídrico, factores nutricionales, factores hormonales y factores genéticos, que interactúan entre sí (Ilustración 1) (Blázquez *et al.*, 2011; Sgamma *et al.*, 2014). Estas rutas convergen en los genes que regulan el momento adecuado para florecer (genes de **tiempo de floración**), que se encargan de poner en marcha los grupos de genes ABCDE responsables del desarrollo floral (Blázquez *et al.*, 2011). De esta forma, las plantas se aseguran florecer en el momento en que han acumulado reservas internas suficientes y en el que las condiciones ambientales sean favorables (Seguí-Simarro, 2011).

Según el modelo ABCDE del desarrollo floral, la formación de los verticilos florales, en los que se disponen los órganos florales que constituirán la flor madura, está regulada por la acción de tres clases de genes: **genes de identidad del órgano floral** (implicados en la formación y/o función de los órganos florales), **genes catastrales** (reguladores espaciales de los genes de identidad del órgano floral) y **genes de identidad del meristemo** (reguladores positivos de la identidad de los órganos durante el desarrollo floral) (Taiz y Zeiger, 2006; Blázquez *et al.*, 2011).

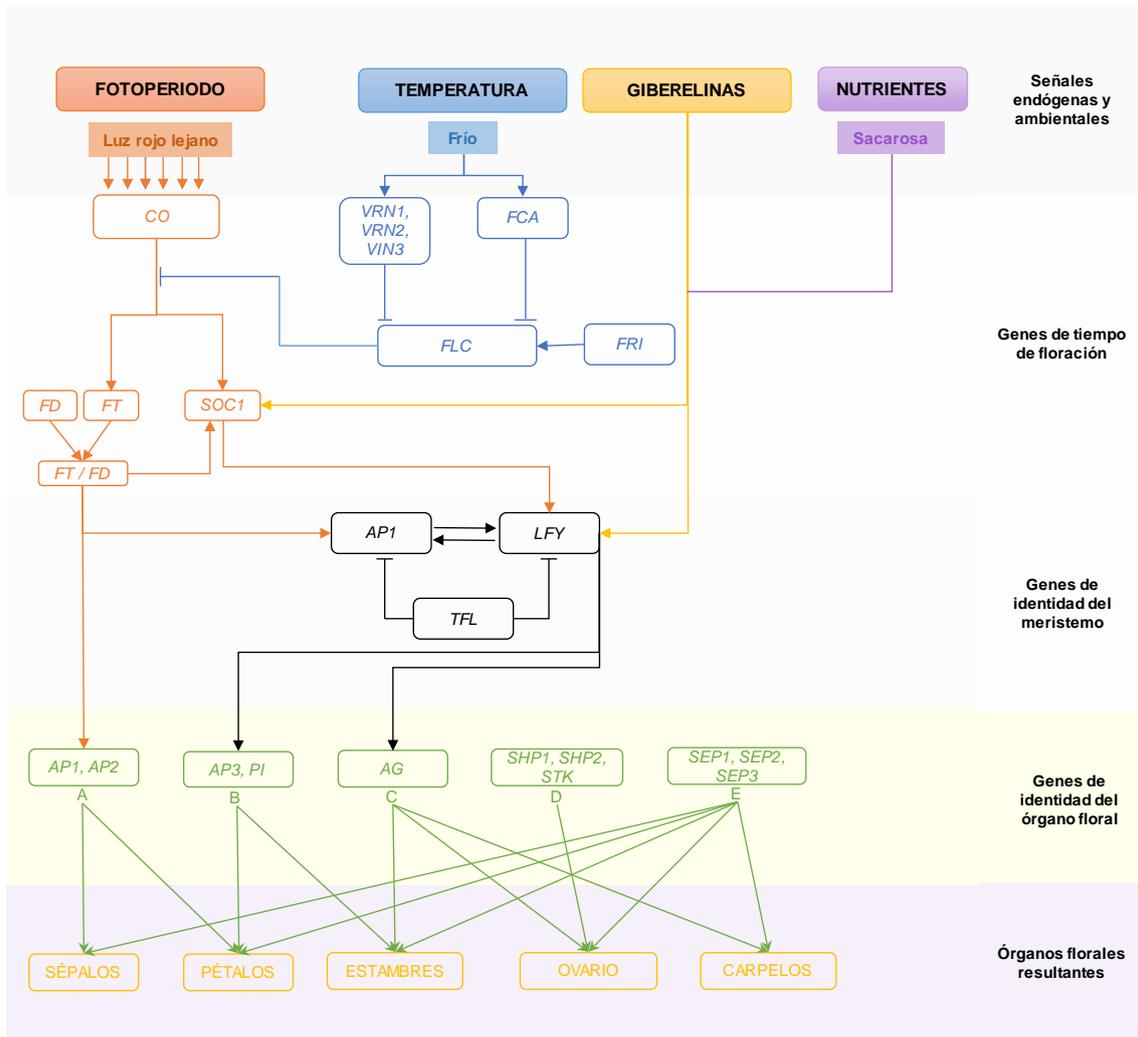


Ilustración 1. Integración de las distintas rutas génicas implicadas en la inducción floral en *Arabidopsis thaliana* (Fuente: Adaptada de Bernier y Périlleux, 2005 y Seguí-Simarro, 2011).

El desarrollo floral ocurre en los meristemos, sin embargo, la inducción se da en las hojas. Debido a esta separación espacial, es necesario un mecanismo que transfiera la señal desde las hojas al meristemo. Desde hace tiempo, se ha asociado la floración con una molécula denominada *florigeno*. Se considera que esta molécula se sintetiza como respuesta al mecanismo de inducción apropiado, según la especie, y se transmite desde las hojas a los meristemos vegetativos para promover la floración. En *Arabidopsis* y otras especies se ha planteado que el gen *FLOWERING LOCUS T (FT)* codifica una proteína (FT) que actúa como una señal de floración móvil y un potente activador de la floración en angiospermas (Blázquez *et al.*, 2011; Nishikawa, 2013). La floración es promovida cuando la proteína FT es transportada a través del floema hasta llegar al meristemo, donde forma un complejo heterodímero con la proteína FD (*FLOWERING LOCUS D*). Este complejo FD/FT activa la expresión de *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS (SOC1)* y *APETALA1 (AP1)*, lo que conduce a la iniciación floral (Blázquez *et al.*, 2011).

El control de la iniciación floral depende de la acción antagonista de dos tipos de genes: los **genes de identidad del meristemo vegetativo** y los **genes de identidad del meristemo floral**. Dentro del grupo de los represores el más relevante es *TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)*. Entre los genes promotores del meristemo floral se encuentran *LEAFY (LFY)*, *APETALA1 (AP1)*, *APETALA2 (AP2)*, *CAULIFLOWER (CAL)*, *FRUITFULL (FUL)* y *UNUSUAL FLORAL ORGANS (UFO)*, siendo *LFY* y *AP1* los que juegan un papel principal en la especificación de los meristemos florales (Seguí-Simarro, 2011).

Por último, una vez determinado el meristemo floral, es necesario la especificación de las características del mismo. Este proceso se lleva a cabo gracias a los **genes de identidad del órgano floral**. La mayor parte de ellos pertenece al grupo denominado **genes MADS-box**, cuya importancia es debida a que determinan parte del desarrollo floral, explicando el modelo ABCDE (Heijmans *et al.*, 2012). Generalmente, los genes de la clase A y B son necesarios para el desarrollo de pétalos, los genes de clase B y C cooperan para controlar el desarrollo de los estambres. Los genes de la clase A y C

están, involucrados en el desarrollo de los sépalos y carpelos, respectivamente. Los genes de clase D tienen su función en el desarrollo del ovario, mientras que las proteínas de la clase E se expresan en los cuatro verticilos florales mediante la formación de complejos de proteínas MADS-box con proteínas de otras clases (Pelaz *et al.*, 2000; Favaro *et al.*, 2003; Pinyopich *et al.*, 2003).

Muchos de estos genes se han identificado en *Arabidopsis thaliana*. Los genes tipo A están representados por *APETALA1* (*AP1*) y *APETALA2* (*AP2*). Los de tipo B por *PISTILLATA* (*PI*) y *APETALA3* (*AP3*), los de tipo C *AGAMOUS* (*AG*), los de tipo D por *SHATTERPROOF1* (*SHP1*), *SHATTERPROOF2* (*SHP2*) y *SEEDSTICK* (*STK*). Y, por último, la clase E está formada por los genes de la familia *SEPALLATA* (*SEP1*, *SEP2* y *SEP3*) (van Mourik *et al.*, 2010). Según la combinación de tipos genes que se expresen a la vez, se desarrollará un verticilo floral u otro (Ilustración 2).

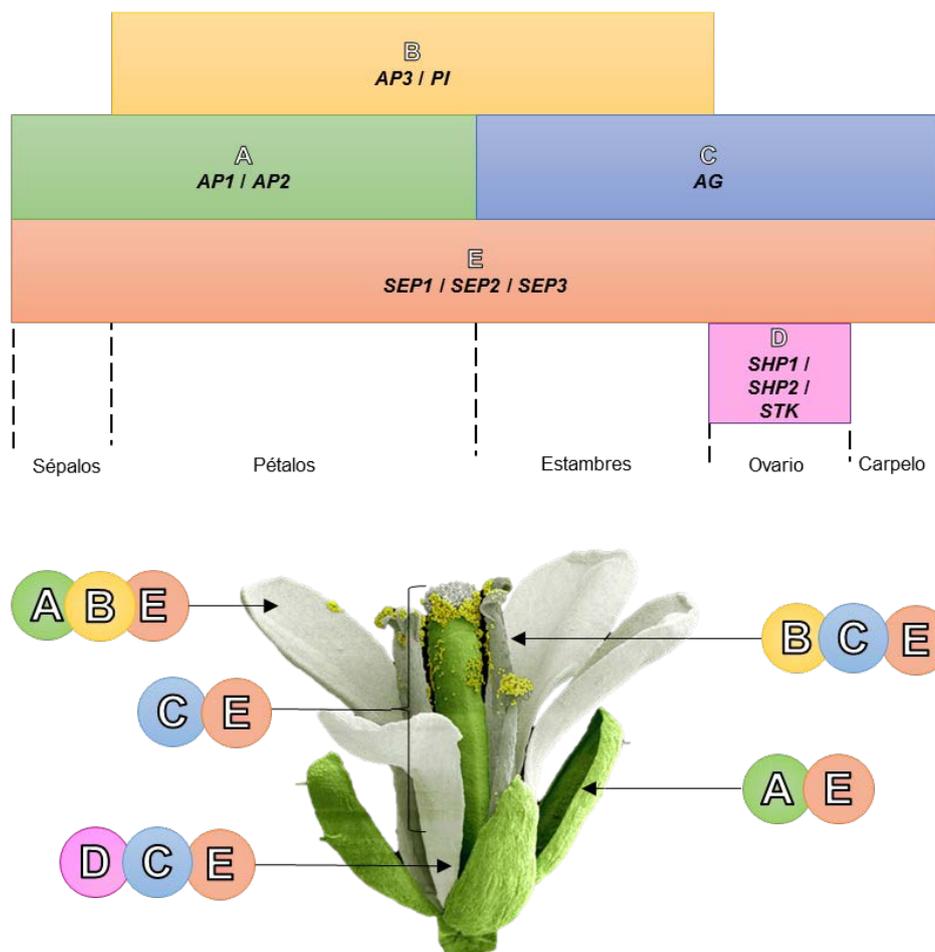


Ilustración 2. Diagrama del modelo ABCDE para la determinación de la identidad de los órganos en las flores de *Arabidopsis thaliana*. (Fuente: Adaptada de Liu *et al.*, 2009).

La inhibición de la floración está regulada, principalmente, por el gen *TFL1* en el meristemo, pero también por los genes *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*) y *TEMPRANILLO1* (*TEM1*). El gen *FLC* bloquea la floración en la planta anual *Arabidopsis thaliana* hasta que tras el periodo de baja temperatura del invierno (Vernalización), su expresión se reprime y la expresión de *FT* se activa (Blázquez *et al.*, 2011). En la planta perenne *Arabis alpina*, el gen homólogo de *FLC*, *PERPETUAL FLOWERING*, (*PEP1*) se activa y reprime según ciclos de desarrollo vegetativo y reproductivo, respectivamente (Wang *et al.*, 2009). Se desconoce su acción precisa en los árboles frutales. Por otra parte, el gen *TEM1* se ha asociado con el control de la juvenilidad en plantas anuales y árboles frutales (Sgamma *et al.*, 2014).

1.2. LA FLORACIÓN EN LOS CÍTRICOS

1.2.1. La juvenilidad

El desarrollo de las plantas superiores tiene dos etapas distintas, la fase juvenil y la fase adulta de madurez reproductiva. Durante la primera fase, las plantas pasan por una etapa de crecimiento en la que se construye el cuerpo de la planta que no es capaz de florecer. El meristemo apical de una planta juvenil no es competente para responder al estímulo floral que procede de las hojas e iniciar así el desarrollo reproductivo (Roldán y Martínez-Zapater, 2008; Castillo *et al.*, 2013). Además, el hecho de que las plantas sean incapaces de florecer durante su etapa juvenil, aun siendo las condiciones ambientales favorables, sugiere que existen mecanismos inhibidores que pueden suprimir la inducción de *FT* durante la juvenilidad, previniendo una floración prematura. Entre ellos, se ha demostrado que el gen *TEM1* actúa como represor de la expresión de *FT* durante la etapa juvenil, siendo su expresión alta durante el inicio del desarrollo y disminuyendo al final del periodo de juvenilidad, dejando así que aumenten los niveles de expresión de *FT* (Castillejo y Pelaz, 2008; Sgamma *et al.*, 2014).

Además de la incapacidad para florecer, la juvenilidad en los cítricos presenta otros caracteres distintivos como son la cantidad de espinas y un crecimiento vigoroso de la planta (Castillo *et al.*, 2013).

Mientras que los meristemos juveniles de plantas herbáceas son capaces de florecer en cuanto son injertados en plantas adultas, los meristemos de plantas leñosas deben atravesar dos etapas de desarrollo. La primera fase es la adquisición de la competencia para florecer. Se dice que un meristemo es competente si es capaz de responder al estímulo floral y por tanto florecer. La siguiente etapa es la determinación, un meristemo determinado puede producir flores incluso si es injertado sobre una planta que no produce ningún estímulo floral (Taiz y Zeiger, 2006).

En los cítricos la duración de este periodo de juvenilidad depende de las condiciones medioambientales, la especie y la variedad. En algunas especies vigorosas, como la lima (*Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle) y el limón (*Citrus limon* (L.) Osbeck), el periodo juvenil dura aproximadamente 2 años, mientras que los mandarinos (*Citrus reticulata* Blanco.), naranjos dulces (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck.) y pomelos (*Citrus paradisi* Macfad.) pueden pasar hasta 10 años sin alcanzar la madurez cuando se cultiva desde semilla (Tadeo *et al.*, 2003; Castillo *et al.*, 2013).

1.2.2. La fase adulta. Factores reguladores.

1.2.2.1. Factores exógenos que controlan la floración: temperatura y estrés hídrico.

Los únicos factores conocidos que inducen la floración en los cítricos durante su etapa adulta son las bajas temperaturas y el estrés hídrico. Estas señales exógenas regulan la expresión de los genes *CiFT*, *CsLFY* y *CsAP1* (Nishikawa *et al.*, 2007; Chica y Albrigo, 2013).

En las regiones subtropicales, la inducción floral en los cítricos está regulada por la **temperatura**. El periodo de inducción se sitúa, en el hemisferio norte, entre los meses de noviembre y diciembre. Se ha comprobado que las temperaturas bajas de esta época del año inducen la floración de la primavera siguiente (Valiente y Albrigo, 2004). La floración no es inducida por temperaturas superiores a 20°C ni inferiores a 5°C, y se consideran óptimas temperaturas entre 10 y 15°C (Chica y Albrigo, 2013).

En planta anuales como *A. thaliana*, el gen *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*) reprime la expresión de genes integradores florales como *FT* y *SOC1*. Al pasar un periodo de temperaturas bajas, se sintetiza un complejo de proteínas, entre las que se encuentran *VERNALIZATION2* (*VRN2*) y *VERNALIZATION-INSENSITIVE 3* (*VIN3*), que se unen al ADN a nivel del gen *FLC*, provocando la condensación de la cromatina e impidiendo por tanto su transcripción (Blázquez *et al.*, 2011). La expresión de este gen en los cítricos no ha sido debidamente caracterizada, pero cabe pensar que la exposición a las bajas temperaturas reduciría la expresión de *FLC-like* provocando un aumento de la expresión de *CiFT* en las hojas, permitiendo así que la floración pueda ser inducida (Nishikawa *et al.*, 2007).

Sin embargo, en condiciones climáticas tropicales con temperaturas altas a lo largo de todo el año donde no existen cambios bruscos de temperatura, la inducción floral está controlada por el **estrés hídrico** en la estación seca. Chica y Albrigo (2013) han demostrado que, durante el periodo de déficit de agua durante la estación seca, la expresión en hojas del gen *FT* se ve aumentada. Una vez que cesa el estrés los genes responsables de la identidad del meristemo (*LFY* y *AP1*) aumentan y la expresión de *FT* disminuye, desencadenando el inicio del crecimiento reproductivo de la planta. Según Davies y Albrigo (1994) es necesario un mes de duración aproximadamente de estrés hídrico en campo para poder inducir la diferenciación floral de una cantidad importante de yemas, que comenzarán su desarrollo una vez pasadas entre 3 y 4 semanas después de la lluvia o riego.

1.2.2.2. Factores endógenos que afectan a la floración.

Como se ha descrito en el apartado anterior, la inducción floral en los cítricos se debe principalmente a dos factores exógenos: la temperatura y el estrés hídrico. Sin embargo, la inducción floral puede verse afectada por distintos factores endógenos descritos a continuación.

La **presencia del fruto** en el árbol provoca un efecto inhibitorio de la floración a partir del momento en el que alcanza el 90% su tamaño final (noviembre–diciembre) coincidiendo este momento con el viraje de color (Martínez-Fuentes *et al.*, 2010). A partir de este momento, el fruto provoca la

reducción de la floración de la primavera siguiente, y aunque sea eliminado este efecto no se evita. Este proceso se ha observado en naranja (Martínez-Fuentes *et al.*, 2010), mandarina (Muñoz-Fambuena *et al.*, 2011) y pomelo (Betancourt *et al.*, 2014). En estos casos, una cosecha abundante puede provocar que la floración al año siguiente sea prácticamente nula, pudiendo iniciarse así un problema de alternancia de cosechas. Muñoz-Fambuena *et al.* (2011) han demostrado que el efecto de inhibición de la inducción floral debido a la presencia del fruto se debe a la inhibición de los genes promotores de la floración. El fruto promueve la expresión de los genes inhibidores (*TFL* y *FLC*) e inhibe la expresión de *FT*, por tanto, la expresión de *AP1* y *LFY* también se ve negativamente afectada. Sin embargo, actualmente se desconoce la señal que produce el fruto para reprimir la expresión de los genes promotores y promover la expresión de los inhibidores. Además, según Martínez-Fuentes *et al.* (2010) el efecto inhibitorio de los frutos parece estar también relacionado con la competencia por los carbohidratos y cambios hormonales.

Por otro lado, las **giberelinas** (GAs) son las hormonas vegetales que más influyen en el proceso de floración. En árboles frutales, las GAs actúan inhibiendo la inducción floral, mientras que la promueven en plantas herbáceas (Nishikawa, 2013). Este fenómeno ha sido demostrado en diversos frutales como cítricos, aguacate, melocotonero, ciruelo, cerezo y níspero (Muñoz-Fambuena *et al.*, 2012b) La actividad de estas hormonas se relaciona con el efecto del fruto sobre la floración siguiente. La síntesis de giberelinas por parte de las semillas y su translocación al resto de la planta, se ha sugerido como uno de los factores responsables de la reducción de la floración, ya que actúa inhibiendo el desarrollo floral (Agustí *et al.*, 2003; Martínez-Fuentes *et al.*, 2010). Esta hipótesis ha sido reforzada por la semejanza en la respuesta a la intensidad de floración al eliminar el fruto y aplicar exógenamente ácido giberélico (Agustí, 2003), por lo que se podría decir que las giberelinas exógenas pueden sustituir el efecto inhibitorio del fruto.

En los cítricos existen dos épocas de máxima sensibilidad con respecto a la aplicación de GAs para inhibir la inducción floral: durante el reposo vegetativo, momento durante el cual se está produciendo la inducción floral

(noviembre-diciembre) y al inicio de la brotación, cuando los brotes no han superado los 1-3 mm de longitud (Agustí, 2003).

HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

El estudio de los mecanismos que reprimen la floración en los cítricos es dificultoso, debido a la complejidad de obtener mutantes que no florezcan. Los experimentos realizados hasta ahora para estudiar la represión de la floración en los árboles comparan 1) plántulas sin capacidad de florecer con árboles adultos con capacidad para florecer (Pillitteri *et al.*, 2004; Nishikawa *et al.*, 2007; Castillo *et al.*, 2013; Sgamma *et al.*, 2014), o 2) árboles con carga fructífera (fenotipo no floreciente) con árboles adultos sin frutos (fenotipo floreciente) (Muñoz-Fambuena *et al.*, 2011; Haberman *et al.*, 2016).

En este TFM, se ha diseñado un enfoque diferente que compara la expresión de los genes de tiempo de floración (o inducción floral), los genes de identidad del meristemo y los genes de identidad del órgano floral, durante el curso del tiempo, en hojas y yemas de plántulas de mandarino no florecientes y árboles adultos de mandarino sin capacidad para florecer debido a la carga pesada de frutos. También se han utilizado árboles adultos con capacidad para florecer para comparar. Todo ello, con el fin de confirmar la siguiente **hipótesis de trabajo**: las plantas juveniles y árboles adultos con fruto difieren en el mecanismo endógeno de inhibición de la floración.

Los **objetivos** de este trabajo son:

1. Determinar la expresión de los genes de tiempo de floración (*CiFT2*, *FLC-like*, *TEM1-like*, *FD-like*, *CsSL1* y *CsSL2*), los genes de identidad del meristemo (*CiFUL*, *CsAP1*, *CsLFY*, *CsTFL* y *TFL2-like*) y los genes de identidad del órgano floral (*CiSEP1* y *CiSEP3*) en yemas y hojas de plantas juveniles, árboles adultos sin capacidad de florecer y árboles adultos con capacidad de florecer.

2. Determinar la expresión de los genes de floración en el meristemo de plantas juveniles de diferente edad para conocer la adquisición de la madurez reproductiva.

MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Material vegetal y diseño experimental

3.1.1. Experimento I

Se utilizaron árboles de 12 años de edad (adultos) de la variedad de mandarina 'Moncada' [Clementina cv. 'Oroval' (*Citrus clementina* Hort. ex. Tan.) X mandarina cv. 'Kara' (*C. unshiu* (Yu.Tanaka ex Swingle) Marcow. X *C. nobilis* Lour.)], injertados sobre el patrón Citrange Carrizo (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck. X *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.). También se usaron plántones de 5 meses de edad (juveniles) de la variedad de mandarina 'Cleopatra' (*C. reshni* Hort. ex Tan.).

Los árboles adultos de la variedad de mandarino 'Moncada' utilizados en este experimento, están plantados en condiciones de cultivo homogéneas con un marco de plantación de 5x5 m. Se localizan en la finca experimental del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), situada en el término municipal de Moncada (Valencia). El sistema de riego utilizado es el riego localizado (riego por goteo). El suelo de la parcela presenta una textura franco-arcillosa.

Las plantas juveniles de la variedad 'Cleopatra' empleadas fueron germinadas en maceta a 22°C en un invernadero y tras 5 meses de crecimiento fueron transferidas al campo experimental del IVIA (Moncada, Valencia).

La variedad 'Moncada' presenta una alternancia de cosechas muy pronunciada, floreciendo abundantemente en primavera y, por tanto, dando lugar a una gran carga de fruta (año ON). Por este motivo, los árboles no florecen a la próxima primavera y únicamente presentan crecimiento vegetativo (año OFF) (Muñoz-Fambuena *et al.*, 2011; 2012a).

Los cítricos cultivados en clima mediterráneo florecen una vez al año, en primavera (marzo-abril). La inducción floral ocurre durante el otoño tardío-invierno temprano (noviembre-diciembre) debido a la bajada de las temperaturas (Nishikawa *et al.*, 2007) y, por último, la diferenciación se produce a finales de invierno principios de primavera (febrero-marzo). Por ello, para

estudiar el tiempo de floración y la expresión de los genes de identidad del meristemo y órgano floral, las muestras de hojas y yemas se tomaron en tres fechas clave: septiembre, diciembre y febrero. Además, la brotación y la floración fueron evaluadas en primavera.

Se realizaron tres repeticiones biológicas en cada fecha de muestreo y para cada tipo de planta (ON y OFF), escogiendo un total de seis árboles adultos para el experimento, tres árboles con capacidad para florecer (OFF) y tres árboles sin dicha capacidad (ON). En el caso de los plantones juveniles (sin capacidad de florecer) también se realizaron tres repeticiones biológicas, esta vez formadas por tres plantones cada una, siendo un total de 9 plantones los seleccionados.

Las muestras de hojas y yemas se congelaron inmediatamente con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su posterior análisis.

3.1.2. Experimento II

En el segundo experimento se utilizaron plántulas de un mes, plantas juveniles de distintas edades y 1 árbol adulto de Citrange Carrizo de 18 años (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck. X *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.).

Las semillas de Citrange Carrizo se germinaron en invernadero y las plántulas fueron muestreadas tras un mes de crecimiento, teniendo un tamaño de 5 cm. Las plantas juveniles estaban divididas en cinco grupos en función de sus edades: 1, 2, 3, 4 y 6 años.

Tanto las plántulas como los plantones juveniles se encontraban en un invernadero de la Universidad Politécnica de Valencia (UPV), mientras que el árbol adulto se localizaba en la finca experimental de la misma universidad.

El muestreo de hojas y yemas se realizó en el mes de febrero, antes de la diferenciación de las yemas. Se realizaron tres repeticiones biológicas para cada tipo de planta. En el caso de las plántulas de 1 mes cada repetición biológica estaba formada por 15 de ellas, siendo un total de 45 plántulas seleccionadas. Por otro lado, cada grupo de plantas juveniles estaba formado por 15 ejemplares de la misma edad, formando una repetición biológica con

cada 5 plántones. Por último, dada la independencia biológica de las ramas principales de un árbol para florecer, se seleccionaron tres ramas de modo independiente del árbol de Citrange Carrizo, una por repetición biológica.

Además, la brotación y la floración fueron evaluadas en primavera.

Las muestras de hojas y yemas se congelaron inmediatamente con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su posterior análisis.

3.2. Evaluación de la brotación y floración

La intensidad de floración se evaluó en primavera considerando cuatro ramas por árbol de tres edades (ramas de finales de primavera, de verano y brotes de otoño) con unos 300 nudos por rama. Se contó el número de nudos con brotes nuevos, y las flores por brote. Los resultados se expresan como el número de flores por 100 nudos para compensar las diferencias en tamaño de las ramas seleccionadas.

3.3. Análisis de la expresión génica

3.3.1. Extracción y purificación de ARN

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

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

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

Inmediatamente después, se añadió el mismo volumen de sobrenadante de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Las muestras se agitaron en vórtex y centrifugaron (30 min; 4.000 r.p.m.; 4°C), y una vez separadas las fases, se

recogió la superior donde se añadió LiCl 6M ($\frac{1}{2}$ volumen), dejándolo precipitar toda la noche a -20°C .

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

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

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

3.3.2. Retrotranscripción

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

3.3.3. qPCR

Para la cuantificación relativa mediante PCR se empleó el kit QuantiTect[®] SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen), según las instrucciones del fabricante. El cDNA diluido se emplea como molde para la amplificación en un volumen final de reacción de 25 μl con una concentración de 0,3 μM de cada oligonucleótido y 12,5 μl de la mezcla de los contenidos en el kit.

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

Los valores de intensidad de fluorescencia se tomaron durante la extensión a 72°C y se transformaron en valores relativos de ARNm usando una serie de dilución 10 veces de muestra de ARN como curva estándar. Los niveles relativos de ARNm se normalizaron a las cantidades totales de ARNm (Bustin, 2002). Y en cada caso, se asignó de manera arbitraria un valor de expresión de 1 a la muestra que presentaba menor expresión. Se utilizó la actina como gen de referencia.

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

Todos los genes estudiados, excepto *FLC-like* y *TEM1-like*, ya se encuentran caracterizados o relacionados en cítricos, por lo que, para el estudio de estos genes, se utilizaron los descritos en *Arabidopsis*. Para el resto, se buscaron las secuencias homologas en la base de datos Phytozome v12.1, seleccionando la especie *Citrus clementina*, y se diseñaron los correspondientes *primers*. Para el diseño de los cebadores se utilizó la página web <http://frodo.wi.mit.edu/>. Los detalles de los cebadores se dan en la siguiente tabla:

Tabla 1. Listado de los primers usados para RT-qPCR

GEN	CÓDIGO EST	5' -Direct primer- 3'	Referencia/ Amplicón (pb)
		5' -Reverse primer- 3'	
<i>ACTIN</i>	Ciclev10025866m	TTAACCCCAAGGCCAACAGA	141
		TCCCTCATAGATTGGTACAGTATGAGAC	
<i>CIFT2</i>	Ciclev10012905m	TCTAGCAGGGACAGAGATCCT	53
		AGAACATCACCAACAACGCG	
<i>CsAP1</i>	Ciclev10032490m	CAAAACCAGGTTCCCAACAC	Muñoz-Fambuena <i>et al.</i> (2011)
		ACGAACATACGGGTTCAAGG	
<i>CsLFY</i>	Ciclev10033942m	TCTTGATCCAGGTCCAGAACATC	Pillitteri <i>et al.</i> (2004)
		TAGTCACCTTGTTGGGCATT	

CsSL1	Ciclev10022568m	TCAGCTTCTTCCATTTTGG	Muñoz-Fambuena <i>et al.</i> (2012b)
		AAGGTGACTTGCCTGCTTGT	
CsSL2	Ciclev10006217m	CTGGAAGACAATGCCAGGTTA	111
		GTCTGAACTCTGGCCACTTTG	
CsTFL	Ciclev10013475m	TCCGTCCACAGTTGTTTCAA	Muñoz-Fambuena <i>et al.</i> (2011)
		TCACTAGGGCCAGGAACATC	
CiFUL	Ciclev10022479m	CCTTGAACGATATGAGAGGTATTGTTAT	Endo <i>et al.</i> (2006)
		TATTCCAATGTCCAGTTTCCATTTG	
CiSEP1	Ciclev10012593m	TGGAAGTCAATAAGCCAGCAAA	Nishikawa <i>et al.</i> (2009)
		GCAAGGACTCAAATCTTGTTTTCA	
CiSEP3	Ciclev10032507m	GCAGGCCCGAGTCTGAATAA	Endo <i>et al.</i> (2006)
		TGCCCGCCGCTCTCT	
FD-like	Ciclev10003845m	TGGAAGAAGTTTGGCAGGA	Muñoz-Fambuena <i>et al.</i> (2012b)
		TGTTTGGGATGGCAGTGTT	
FLC-like	Ciclev10033420m	GGCAACTTGAAGGTCCAAAC	124
		GCCCAATGAGCATAGGAATG	
TEM1-like	Ciclev10031846m	GCAAATGTCTTGTGCTGGAA	104
		TGTGCTTCCTCAGCATATCG	
TFL2-like	Ciclev10031549m	GCGGCCGAAGCTTGATGAAGGATT	Muñoz-Fambuena <i>et al.</i> (2012b)
		TGCGAACCCCTTTTCCGACGAATGG	

3.4. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se evaluaron estadísticamente mediante un análisis de la varianza (ANOVA), utilizando la mínima diferencia significativa (LSD) para la separación de las medias. Los datos experimentales se analizaron con el software Statgraphics Centurion XVI (Gráficos estadísticos, Englewood Cliffs, NJ, EE.UU.). Los resultados de los ANOVAS y análisis de separación de medias se muestran en el Anejo I.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Evaluación de la floración de plantas adultas y juveniles.

Con el fin de comprobar el fenotipo de las plantas utilizadas en los experimentos, se evaluó la floración durante la primavera. Los árboles adultos sin frutos y, por ello, con capacidad para florecer (FL-ADULTO) mostraron una intensidad de floración muy elevada (145 flores 100 nudos⁻¹) compuesta por brotes mixtos, inflorescencias sin hojas y flores solitarias. Por el contrario, los árboles adultos con muchos frutos y, por ello, sin capacidad para florecer (NFL-ADULTO) mostraron una intensidad de floración muy baja (0,5 flores 100 nudos⁻¹), compuesta por alguna flor solitaria y algún brote campanero. Las plantas juveniles no produjeron flores en ningún caso.

4.2. Estudio genético del comportamiento de plantas juveniles y adultas.

4.2.1. Expresión relativa de los genes de tiempo de floración.

La expresión del gen *CiFT2* en las hojas fue significativamente mayor en las hojas de los árboles adultos con capacidad para florecer (FL-ADULTO) que en las hojas de los árboles que no tenían dicha capacidad, es decir, los adultos con una alta carga de frutos (NFL-ADULTO) y las plantas juveniles de cinco meses (NFL-JUVENIL) (Fig. 1A). Estos resultados coinciden con los resultados obtenidos por Muñoz-Fambuena *et al.* (2011, 2012a) y por Nishikawa (2013), que demuestran que los árboles con capacidad para florecer presentan una transcripción de *CiFT2* superior a los que no presentan dicha capacidad, bien sea debido a una alta carga de fruta, o bien a su estado juvenil. La comparación de la expresión de *CiFT2* entre las plantas incapaces de florecer adultas y juveniles muestra resultados novedosos. Mientras en los árboles NFL-ADULTO la expresión de *CiFT2* se encuentra totalmente impedida durante el periodo inductivo, y solamente después de la cosecha (enero) se observa un aumento de la transcripción, los árboles juveniles muestran la capacidad para transcribir este gen (x400) aunque no hasta el nivel de transcripción de los árboles que sí florecen (Fig. 1A). Estos resultados sugieren que la capacidad

para impedir la transcripción de *CiFT2* es mayor por efecto del fruto que por la juvenilidad.

En los árboles FL-ADULTO, la expresión de *CiFT2* aumentó coincidiendo con el descenso de la temperatura, coincidiendo con estudios anteriores (Nishikawa *et al.*, 2007, 2013; Muñoz-Fambuena *et al.*, 2011, 2012a).

La expresión de los genes inhibidores de la floración ***FLC-like*** (Fig. 1C) y ***TEM1-like*** (Fig. 1E) mostró diferencias significativas entre los árboles incapaces de florecer (NFL-ADULTO y NFL-JUVENIL). La expresión de ***FLC-like*** (Fig. 1C) en las plantas juveniles es muy pequeña, incluso menor que en los árboles adultos que sí florecen, y permanece prácticamente invariable, mientras que, como ya demostró Muñoz-Fambuena (2015), la alta carga de frutos promueve la expresión de este gen en los árboles NFL-ADULTO. Su transcripción aumenta progresivamente hasta llegar a su máxima expresión en marzo. En los árboles FL-ADULTO, la expresión de *FLC-like* también aumenta a partir del periodo de inducción floral, pero sin llegar a los niveles de transcripción de los árboles NFL-ADULTO.

Por otro lado, ***TEM1-like*** (Fig. 1E) tuvo una expresión mínima, como era de esperar, durante todo el periodo de estudio en las hojas de los árboles FL-ADULTO, pero no en las hojas de las plantas juveniles y de los árboles adultos no florecientes. La expresión de *TEM1-like* fue máxima en el mes de septiembre, y disminuyó a lo largo del tiempo. *TEM1-like* presentó una mayor transcripción en las plantas juveniles hasta que finaliza el periodo de inducción floral (Fig. 1E). Estos resultados concuerdan con los obtenidos recientemente por Sgamma *et al.* (2014) que proponen a *TEM1-like* como uno de los reguladores principales de la juvenilidad, mientras que *FLC-like* inhibiría la expresión foliar de *CiFT2* en las hojas de árboles adultos con elevada cosecha (Muñoz-Fambuena, 2015).

En cuanto a los genes estudiados en las **yemas**, se observa que en las plantas juveniles no existe apenas transcripción de ninguno de los genes de tiempo de floración estudiados (*FD-like*, *CsSL1* y *CsSL2*), mientras que sí se

detectó su expresión en los árboles adultos, independientemente de su capacidad de floración, teniendo estos una evolución muy similar a lo largo del tiempo (Fig. 1B,1D y 1F).

Los resultados de este estudio obtenidos para las plantas juveniles coinciden con los observados en *Arabidopsis*, donde los genes de tiempo de floración en el meristemo tienen una transcripción prácticamente nula durante la fase juvenil en comparación con plantas adultas que florecen (Sgamma *et al.*, 2014; Valentim *et al.*, 2015). Pero la comparación con plantas adultas que no florecen revela resultados novedosos que sugieren que los meristemas de las plantas juveniles (cinco meses) son incompetentes para transcribir los genes de tiempo de floración (*FD-like* y *CsSL1*).

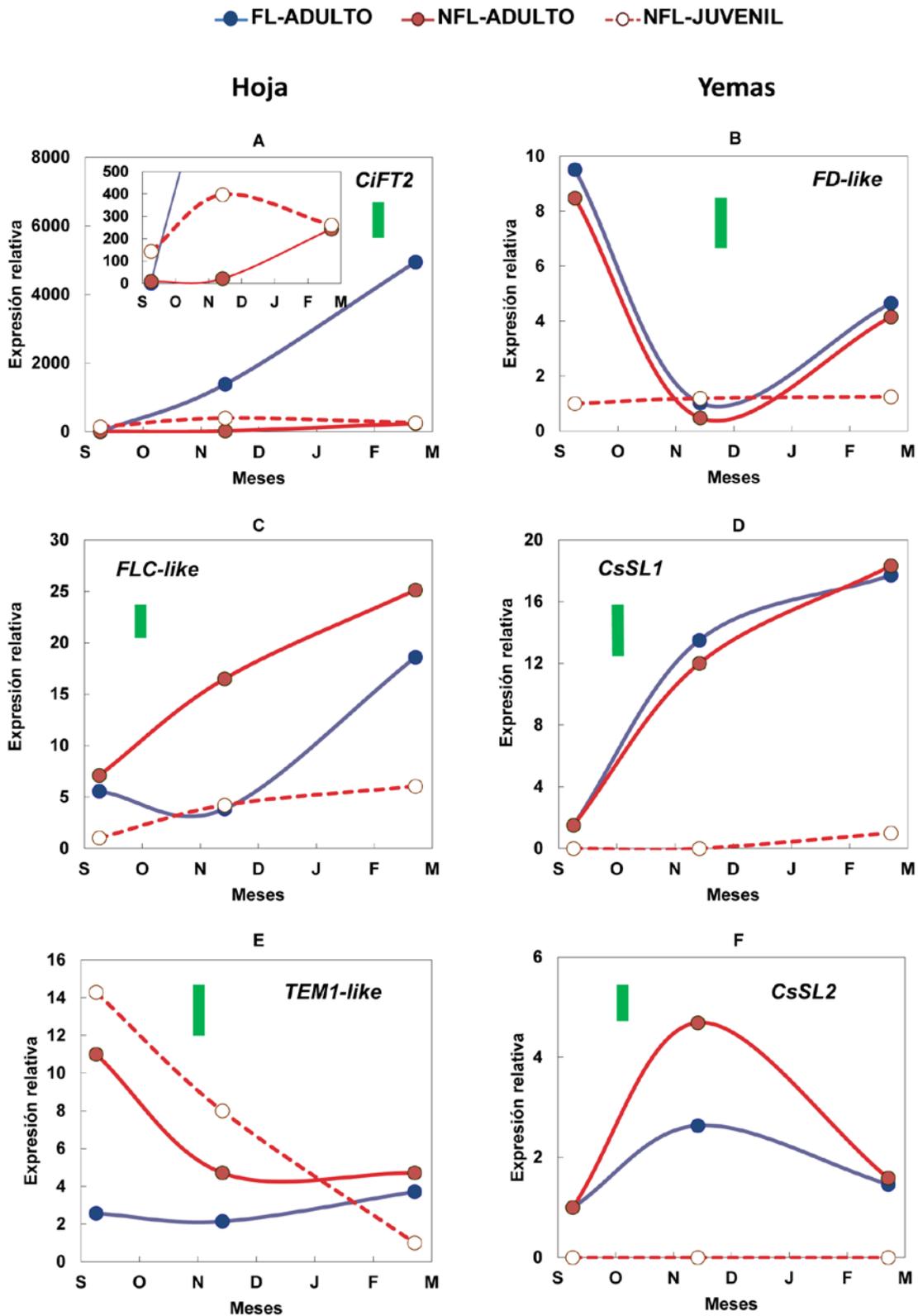


Figura 1. Expresión relativa de los genes de tiempo de floración en las hojas (A, C y E) y en las yemas (B, D, y F) de árboles adultos con y sin capacidad para florecer (FL-ADULTO y NFL-ADULTO, respectivamente) y plantas juveniles (NFL-JUVENIL). Cada valor es la media de 3 réplicas técnicas a partir de una muestra conjunta de 3 réplicas biológicas. El tamaño de los símbolos es mayor que el error estándar. La barra vertical verde indica el valor de la mínima diferencia significativa (LSD) entre árboles.

4.2.2. Expresión relativa de los genes de identidad del meristemo

Los genes de identidad del meristemo floral determinan si los meristemos desarrollarán flores en vez de hojas o ramas. Los genes que desarrollan un papel principal promoviendo la determinación de los meristemos florales son *CsAP1* y *CsLFY*, mientras que *CiFUL* juega un papel secundario, y en ocasiones relacionado también con el tiempo de floración de un modo coordinado con *SOC1* (Balanzà *et al.*, 2014). Por otro lado, TERMINAL FLOWER 1 (*CsTFL1*) es el gen que determina la identidad vegetativa del meristemo, e impide la expresión de los genes promotores de identidad del meristemo floral, *CsAP1* y *CsLFY* (Seguí-Simarro, 2011).

La expresión de los principales genes promotores de identidad del meristemo floral, ***CsAP1*** y ***CsLFY*** es significativamente superior en los árboles capacitados para florecer (FL-ADULT) en comparación con los no capacitados (NFL-ADULT y NFL-JUVENIL) (Fig. 2B-C). Estos resultados se asemejan a los obtenidos por Nishikawa (2013) quienes comprobaron que existe una mayor expresión de *CsLFY* y *CsAP1*, tanto en hoja como en rama, en plantas juveniles de 4 meses de mandarina Satsuma en comparación con árboles adultos que sí florecen. A diferencia de lo observado en los genes de tiempo de floración (*FD-like*, *CsSL1* y *CsSL2*) (Fig. 1B, 1D y 1F), los meristemos de plantas adultas incapaces de florecer y juveniles no difirieron significativamente respecto de la expresión de *CsLFY* y *CsAP1*.

Por otro lado, la expresión de ***CiFUL*** (Fig. 2A) se comportó de forma similar a la de *CsSL1*, esto es, sin diferencias entre los árboles adultos e incapaz de transcribirse en la planta juvenil. Este resultado sugiere que *CiFUL* podría estar más relacionado con el tiempo de floración como se ha indicado en *Arabidopsis* (Balanzà *et al.*, 2014). Castillo *et al.* (2013) encontraron resultados similares respecto de *CiFUL* al comparar plantas juveniles con adultos capaces de florecer. Los resultados hallados apoyan la idea de que *CsAP1* y *CsLFY* juegan un papel principal en el proceso de determinación del meristemo floral, mientras que *CiFUL* juega un papel secundario (Seguí-Simarro, 2011).

Por último, los genes represores de la floración, **CsTFL** (Fig. 2D) y **TFL2-like** (Fig. 2E), tuvieron una expresión significativamente más alta en los meristemas de los árboles no florecientes, tanto juvenil (NFL-JUVENIL) como adulto (NFL-ADULTO). Estos resultados concuerdan con estudios previos que relacionan *CsTFL* con la juvenilidad en cítricos, coincidiendo con una mayor expresión de este gen en plantas juveniles (Pillitteri *et al.*, 2004). No obstante, a la vista de los resultados obtenidos no se puede correlacionar *TFL* únicamente con la juvenilidad, ya que la expresión de *CsTFL* y *TFL2-like* fue también abundante en los adultos sin capacidad para florecer, como han observado Haberman *et al.* (2016) recientemente en manzano. *CsTFL* presentó su máxima expresión en las yemas de las plantas juveniles en septiembre, siendo hasta un 60% superior que en los árboles adultos, y disminuyó hasta llegar a los niveles de expresión de los árboles adultos no florecientes en marzo, siendo la expresión de ambos ligeramente superior a la de los adultos florecientes (Fig. 2D). A su vez, la expresión de *TFL2-like* siguió la misma tendencia en todos los árboles estudiados, hasta que a partir de noviembre su expresión se incrementó en las yemas de los árboles no florecientes (NFL-ADULTO y NFL-JUVENIL), obteniéndose finalmente una mayor transcripción en las plantas juveniles (Fig. 2E).

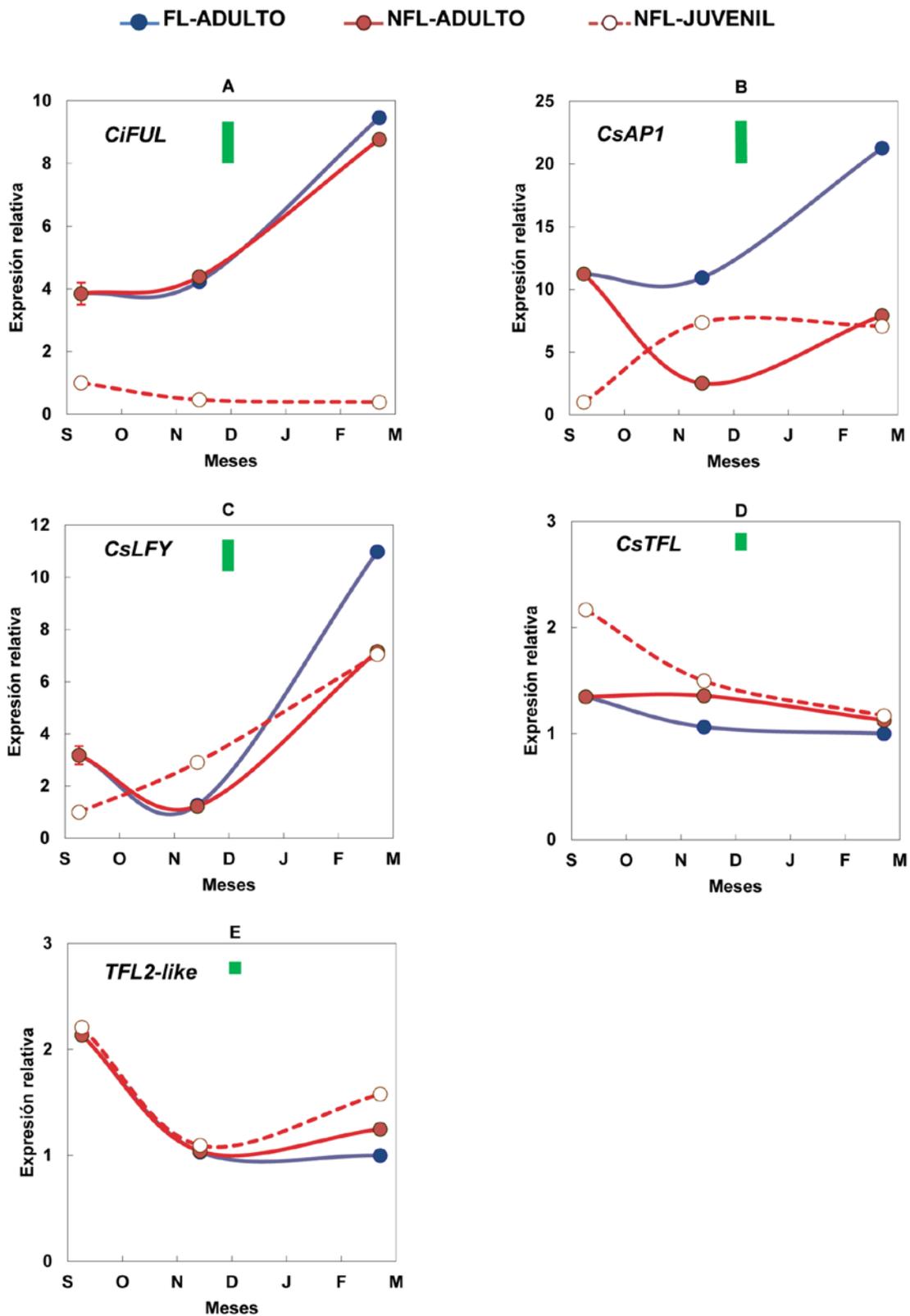


Figura 2. Expresión relativa de los genes de identidad de floración en las yemas de árboles adultos con y sin capacidad para florecer (FL-ADULTO y NFL-ADULTO, respectivamente) y plantas juveniles (NFL-JUVENIL). Cada valor es la media de 3 réplicas técnicas a partir de una muestra conjunta de 3 réplicas biológicas. El tamaño de los símbolos es mayor que el error estándar. La barra vertical verde indica el valor de la mínima diferencia significativa (LSD) entre árboles.

4.2.3. Expresión relativa de los genes de identidad del órgano floral

La transcripción de **CiSEP1** y **CiSEP3** (Fig. 3A-B) se ha visto severamente afectada por la edad de la planta, siendo nula para ambos genes en las plantas juveniles (NFL-JUVENIL). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Castillo *et al.* (2013) que encontraron una menor expresión de **CiSEP1** en el meristemo de plantas juveniles de distintas especies de cítricos (naranja dulce, mandarina, pomelo y limón rugoso) en comparación con plantas adultas capaces de florecer. A partir del mes de noviembre la expresión aumentó considerablemente llegando a alcanzar unos valores máximos de 28 y 130 unidades relativas de expresión para **CiSEP1** y **CiSEP3** respectivamente en los adultos florecientes (FL-ADULTO). Pese a que en las yemas de los adultos sin capacidad para florecer la expresión de **CiSEP1** también aumenta en el momento de la diferenciación, su expresión fue significativamente inferior a la de los adultos capacitados para florecer (Fig. 3A). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Nishikawa *et al.* (2007) en el mandarina Satsuma, pero aportan la diferente capacidad de transcripción entre plantas juveniles y adultas que no florecen.

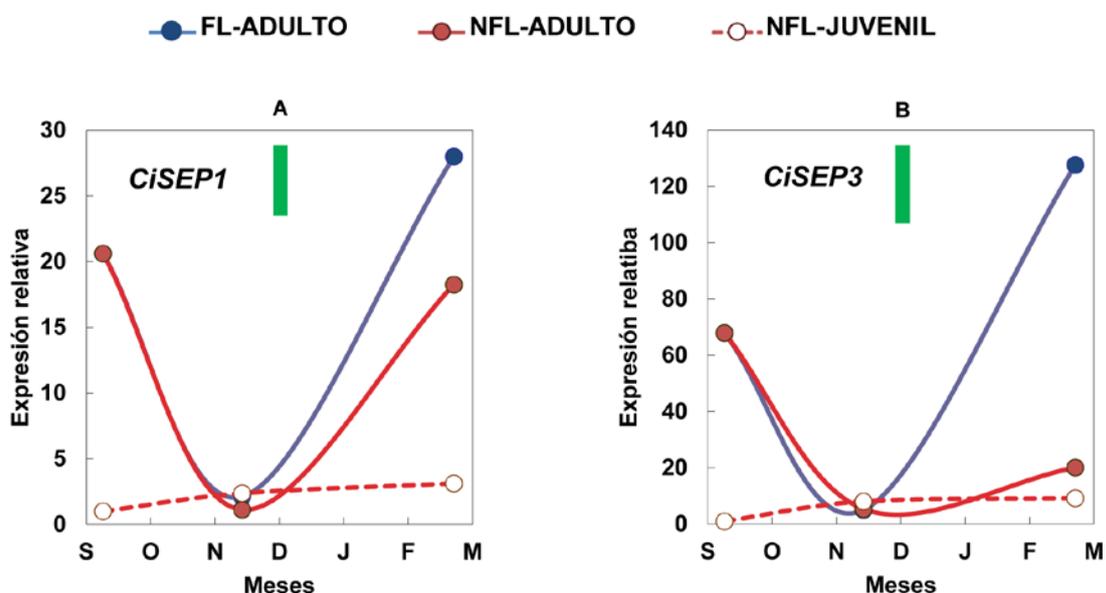


Figura 3. Expresión relativa de los genes de organogénesis floral en las yemas de árboles adultos con y sin capacidad para florecer (FL-ADULTO y NFL-ADULTO, respectivamente) y plantas juveniles (NFL-JUVENIL). Cada valor es la media de 3 réplicas técnicas a partir de una muestra conjunta de 3 réplicas biológicas. El tamaño de los símbolos es mayor que el error estándar. La barra vertical verde indica el valor de la mínima diferencia significativa (LSD) entre árboles.

4.3. Estudio de la adquisición de la madurez de las plantas juveniles.

Con la finalidad de conocer cómo adquiere un meristemo juvenil el estado de madurez y, con ello, la capacidad para florecer durante la transición de juvenil a adulto, se han estudiado la expresión de genes que no mostraron capacidad de transcripción en la planta juvenil en comparación con la planta adulta, esto es, *FD-like* y *CsSL1*, *CiFUL* y *CiSEP1*. Además, dada su importancia en el proceso de diferenciación floral, se estudió la expresión de *CsLFY* y *CsTFL*. Todo ello se realizó en árboles adultos con capacidad para florecer y en plantas juveniles de 1 mes de edad y 1, 2, 3 y 6 años de Citrange Carrizo. Debido a que no se incluyeron plantas entre 7 y 15 años la expresión génica ha sido simulada usando un ajuste de regresión.

A la vista de los resultados obtenidos, podemos observar que existen dos tipos de evolución en la transcripción de los distintos genes estudiados. La transcripción de los genes *FD-like*, *CsLFY* y *CiSEP1* (Fig. 4A, 4C y 4F) presenta una función de crecimiento exponencial, en la que no existen diferencias significativas en la expresión de los meristemos de las plantas juveniles (NFL-JUVENIL) hasta los 72 meses de edad, mientras que el árbol adulto manifiesta una transcripción superior, siendo en el caso de *CiSEP1* de hasta 24 veces mayor. La tendencia exponencial obtenida para la expresión de los genes *FD-like* y *CsLFY* en las plantas de cítrico objeto de estudio presenta una gran similitud a la descrita por Valentim *et al.* (2015) para plantas de tipo silvestre de *Arabidopsis*.

Por otro lado, los genes *CsSL1* y *CiFUL* (Fig. 4B-D) presentan una función de crecimiento potencial, es decir, las plantas juveniles son capaces de transcribir prácticamente hasta niveles de expresión similares al adulto capaz de florecer, pero no florecen debido a la falta de expresión de otros genes clave. Los genes con crecimiento exponencial, sobre todo *FD-like* y *CsLFY*, se pueden considerar genes determinantes. Hasta que estos genes no se expresen el meristemo es incapaz de responder a estímulos inductivos y, por tanto, no hay floración. Es por eso que, aunque las plantas juveniles sean

capaces de transcribir *CsSL1* y *CiFUL*, su meristemo aún no está capacitado para responder a las señales y por tanto no florecen.

En cítricos, la sobreexpresión de los genes de *Arabidopsis LFY* y *AP1* en plantas juveniles transgénicas de Citrange Carrizo fue suficiente para reducir tanto rasgos juveniles como el tiempo de floración de varios años a 12-20 meses (Peña *et al.*, 2001). Pero las plantas transgénicas de Carrizo necesitaron que apareciera el estímulo exógeno inductivo (bajas temperaturas) para poder florecer. Sin embargo, Endo *et al.* (2005) lograron una floración extratemprana (16 semanas) y continuada, independientemente de las condiciones inductivas exógenas, al sobreexpresar *CiFT* en plántulas de citrange, lo que pone de manifiesto la importancia del programa genético que regula el tiempo de floración en las plantas juveniles, como demuestran los resultados de esta investigación.

Por último, el gen represor de la floración ***CsTFL1*** (Fig. 4E) presenta su máxima expresión en las plántulas de un mes de edad. Como se puede observar en la figura 4, la elevada transcripción de *CsTFL1* en las plántulas de 1 mes reprime a los promotores de la floración estudiados en este experimento. Estos resultados apoyan el trabajo realizado por Flachowsky *et al.* (2012) quienes demostraron que los genes *TFL1* desempeñan un papel muy importante en el mantenimiento del crecimiento vegetativo en manzano. A medida que aumenta la edad de la planta, la expresión de este gen disminuye hasta niveles similares al árbol adulto, sin embargo, aunque no existen diferencias significativas entre las juveniles lignificadas y el adulto, al no expresarse los genes fundamentales para la floración (*FD-like* y *CsLFY*) en plantas juveniles lignificadas, estas no tienen la capacidad para florecer, a diferencia del adulto que sí que tiene dicha capacidad.

Por otra parte, teniendo en cuenta únicamente la población de plantas juveniles, la expresión de *FD-like* y *CsLFY* no muestra relación con la edad de la planta al menos hasta los 6 años de edad, sin embargo, la expresión de *CsSL1*, *CiFUL*, *CsSEP1* y *CsTFL1* tiene una gran correlación con la edad de la planta, mostrando un coeficiente de determinación $r^2=0,80$, $r^2=0,66$, $r^2=0,98$ y $r^2=0,91$ respectivamente para cada gen (Fig. 4). Estos resultados sugieren que

la maduración del meristemo se logra de manera progresiva, pero existen genes que tienen un papel clave en la decisión final de florecer.

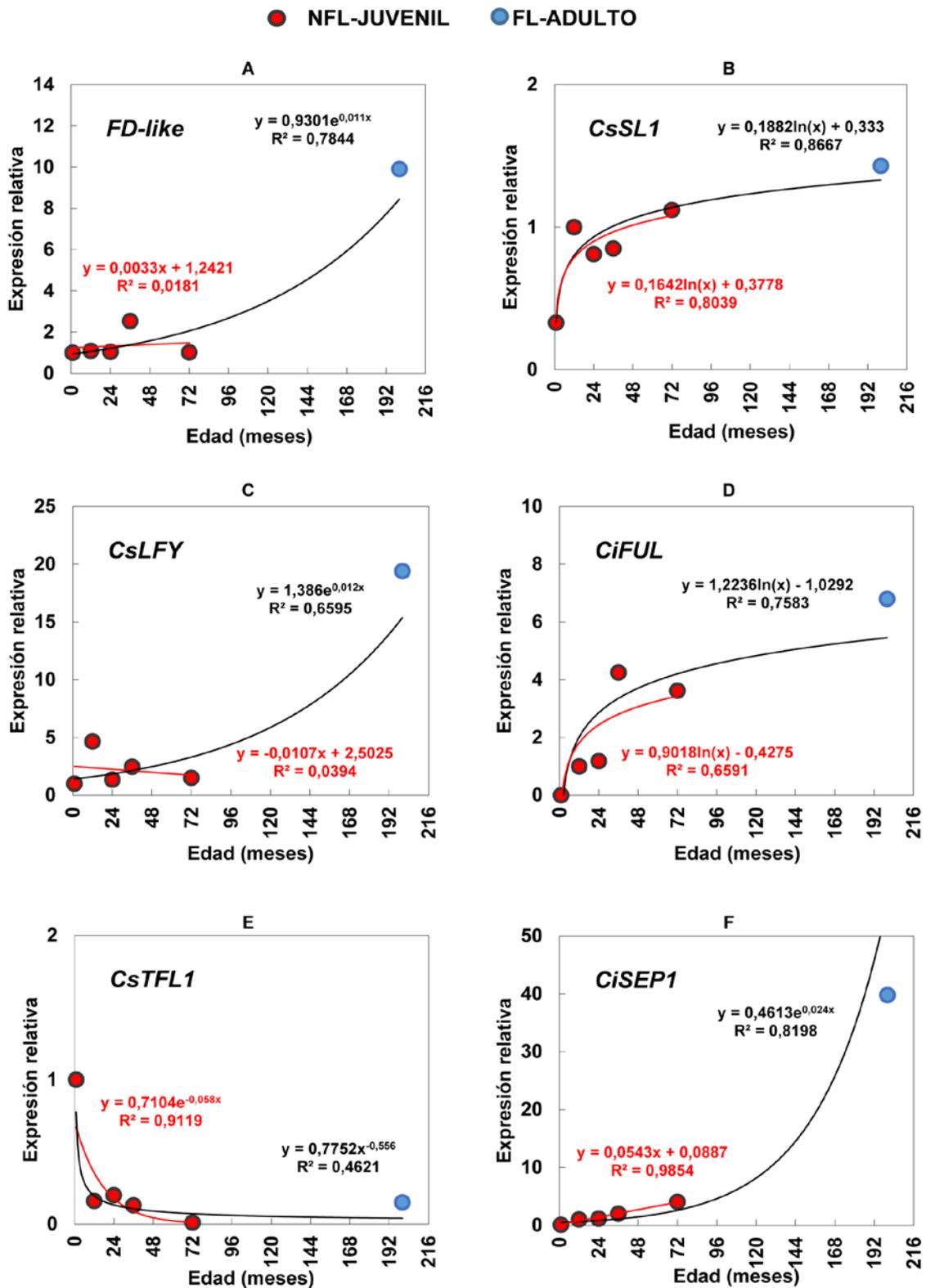


Figura 4. Evolución de la expresión de los genes que regulan la floración en el meristemo de yemas laterales de plantas Citrange Carrizo de diferente edad y capacidad para florecer (juveniles en rojo, adultas en azul).

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

Las conclusiones que se pueden obtener de este trabajo son las siguientes:

1. La transcripción de los genes de tiempo de floración y organogénesis floral está obstaculizada en el meristemo juvenil debido a su inmadurez, mientras que el meristemo vegetativo adulto es capaz de hacerlo aunque no alcanza el nivel necesario para poder florecer, debido a la represión de la expresión de *CiFT2* en la hoja.

2. El meristemo de las plantas juveniles es capaz de comenzar a transcribir paulatinamente algunos genes de floración como *CsSL1*, *CiFUL* y *CiSEP1*, sin embargo, es incapaz de transcribir *FD-like* y *CsLFY*, genes fundamentales para que se lleve a cabo la floración, por lo que no puede florecer hasta adquirir la madurez.

BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

- AGUSTÍ, M. 2003. *Citricultura*. Editorial Mundi-Prensa. 2ª Edición. Madrid, España. 423.
- AGUSTÍ, M., MARTÍNEZ-FUENTES, A., MESEJO, C., JUAN, M. Y ALMELA, V. 2003. *Cuajado y desarrollo de los frutos cítricos*. Serie Divulgación Técnica Nº 55. Editorial Generalitat Valenciana. Consellería de Agricultura, Pesca y Alimentación. 80.
- BALANZÀ, V., MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, I. Y FERRÁNDIZ, C. 2014. Sequential action of *FRUITFULL* as a modulator of the activity of the floral regulators *SVP* and *SOC1*. *Journal of experimental botany*. 65(4): 1193-1203.
- BERNIER, G., HAVELANGE, A., HOUSSA, C., PETITJEAN, A. Y LEJEUNE, P. (1993). Physiological signals that induce flowering. *The Plant Cell*. 5(10): 1147.
- BERNIER, G. Y PÉRILLEUX, C. 2005. A physiological overview of the genetics of flowering time control. *Plant Biotechnology Journal*. 3(1): 3-16.
- BETANCOURT, M., SISTACHS, V., MARTINEZ-FUENTES, A., MESEJO, C., REIG, C., & AGUSTI, M. 2014. Influence of harvest date on fruit yield and return bloom in 'Marsh' grapefruit trees (*Citrus paradisi* Macf.) grown under a tropical climate. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 89(4): 435-440.
- BLÁZQUEZ, M. A., PIÑEIRO, M. Y VALVERDE, F. 2011. Bases moleculares de la floración. *Investigación y Ciencia*. 29-36.
- BUSTIN, S. A. 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of molecular endocrinology*. 29(1): 23-39.
- CASTILLEJO, C. Y PELAZ, S. 2008. The balance between *CONSTANS* and *TEMPRANILLO* activities determines *FT* expression to trigger flowering. *Current Biology*. 18(17): 1338-1343.
- CASTILLO, M. C., FORMENT, J., GADEA, J., CARRASCO, J. L., JUAREZ, J., NAVARRO, L. Y ANCILLO, G. 2013. Identification of transcription factors potentially involved in the juvenile to adult phase transition in *Citrus*. *Annals of botany*. 112(7): 1371-1381.
- CHICA, E. J. Y ALBRIGO, L. G. 2013. Expression of flower promoting genes in sweet orange during floral inductive water deficits. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 138(2): 88-94.

- CORBESIER, L. Y COUPLAND, G.** 2005. Photoperiodic flowering of *Arabidopsis*: integrating genetic and physiological approaches to characterization of the floral stimulus. *Plant, Cell & Environment*. 28(1): 54-66.
- DAVENPORT, T. L.** 1990. Citrus flowering. *Horticultural Reviews*. 12: 349-408.
- DAVIES, F. S. Y ALBRIGO, L. G.** 1994. Citrus. CAB International, Wallingford, UK. 254.
- ENDO, T., SHIMADA, T., FUJII, H. Y OMURA, M.** 2006. Cloning and characterization of 5 MADS-box cDNAs isolated from citrus fruit tissue. *Scientia horticulturae* 109(4): 315-321.
- ENDO, T., SHIMADA, T., FUJII, H., KOBAYASHI, Y., ARAKI, T. Y OMURA, M.** 2005. Ectopic expression of an *FT* homolog from *Citrus* confers an early flowering phenotype on trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.). *Transgenic research*. 14(5): 703-712.
- FAVARO, R., PINYOPICH, A., BATTAGLIA, R., KOOIKER, M., BORGHINI, L., DITTA, G., YANOFKY, M., KATER, M. Y COLOMBO, L.** 2003. MADS-box protein complexes control carpel and ovule development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 15(11): 2603-2611.
- FLACHOWSKY, H., SZANKOWSKI, I., WAIDMANN, S., PEIL, A., TRÄNKNER, C Y HANKE, M. V.** 2012. The *MdTFL1* gene of apple (*Malus domestica* Borkh.) reduces vegetative growth and generation time. *Tree physiology*. 32(10): 1288-1301.
- HABERMAN, A., ACKERMAN, M., CRANE, O., KELNER, J. J., COSTES, E., Y SAMACH, A.** 2016. Different flowering response to various fruit loads in apple cultivars correlates with degree of transcript reaccumulation of a *TFL1* - encoding gene. *The Plant Journal*. 87(2): 161-173.
- HEIJMANS, K., MOREL, P. Y VANDENBUSSCHE, M.** 2012. MADS-box genes and floral development: the dark side. *Journal of experimental botany*. 63(15): 5397-5404.
- LIU, C., THONG, Z., Y YU, H.** 2009. Coming into bloom: the specification of floral meristems. *Development*. 136(20): 3379-3391.
- MARTÍNEZ - FUENTES, A., MESEJO, C., REIG, C. Y AGUSTÍ, M.** 2010. Timing of the inhibitory effect of fruit on return bloom of 'Valencia' sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 90(11): 1936-1943.

- MUÑOZ-FAMBUENA, N.** 2015. Fruit inhibits flowering in alternate bearing citrus varieties. Hormonal, genetic and epigenetic regulation. Tesis Doctoral. Università Degli Studi di Palermo. 189.
- MUÑOZ-FAMBUENA, N., MESEJO, C., GONZÁLEZ-MAS, M. C., PRIMO-MILLO, E., AGUSTÍ, M. Y IGLESIAS, D. J.** 2011. Fruit regulates seasonal expression of flowering genes in alternate-bearing 'Moncada' mandarin. *Annals of Botany*. 108(3): 511-519.
- MUÑOZ-FAMBUENA, N., MESEJO, C., GONZÁLEZ-MAS, M. C., PRIMO-MILLO, E., AGUSTÍ, M. Y IGLESIAS, D. J.** 2012a. Fruit load modulates flowering-related gene expression in buds of alternate-bearing 'Moncada' mandarin. *Annals of botany*. 110(6): 1109-1118.
- MUÑOZ-FAMBUENA, N., MESEJO, C., GONZÁLEZ-MAS, M. C., IGLESIAS, D. J., PRIMO-MILLO, E. Y AGUSTÍ, M.** 2012b. Gibberellic acid reduces flowering intensity in sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] by repressing *CiFT* gene expression. *Journal of Plant Growth Regulation*. 31(4): 529-536.
- NISHIKAWA, F.** 2013. Regulation of floral induction in citrus. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*. 82(4): 283-292.
- 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.). *Journal of experimental botany*. 58(14): 3915-3927.
- NISHIKAWA, F., ENDO, T., SHIMADA, T., FUJII, H., SHIMIZU, T. Y OMURA, M.** 2009. Differences in seasonal expression of flowering genes between deciduous trifoliolate orange and evergreen Satsuma mandarin. *Tree physiology*. 29(7): 921-926.
- PELAZ, S., DITTA, G. S., BAUMANN, E., WISMAN, E. Y YANOFSKY, M. F.** 2000. B and C floral organ identity functions require SEPALLATA MADS-box genes. *Nature*. 405(6783): 200-203.
- PEÑA, L., MARTÍN-TRILLO, M., JUÁREZ, J., PINA, J. A., NAVARRO, L. Y MARTÍNEZ-ZAPATER, J. M.** 2001. Constitutive expression of Arabidopsis LEAFY or APETALA1 genes in citrus reduces their generation time. *Nature biotechnology*. 19(3): 263-267.

- PILLITTERI, L. J., LOVATT, C. J. Y WALLING, L. L. 2004. Isolation and characterization of a *TERMINAL FLOWER* homolog and its correlation with juvenility in citrus. *Plant Physiology*. 135(3): 1540-1551.
- PINYOPICH, A., DITTA, G. S., SAVIDGE, B., LILJEGREN, S. J., BAUMANN, E., WISMAN, E. Y YANOFSKY, M. F. 2003. Assessing the redundancy of MADS-box genes during carpel and ovule development. *Nature*. 424(6944): 85-88.
- SEGUÍ-SIMARRO, J. M. 2011. Biología y biotecnología reproductiva de las plantas. *Universidad Politécnica de Valencia*. 464.
- ROLDÁN, M. Y MARTÍNEZ-ZAPATER, J.M. 2008. "Floración y su control ambiental". En: *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Azcón-Bieto, J. y Talón, M. 2ª Edición. Editorial McGRAW-HILL. Madrid, España. 499-518.
- SGAMMA, T., JACKSON, A., MULEO, R., THOMAS, B. Y MASSIAH, A. 2014. TEMPRANILLO is a regulator of juvenility in plants. *Scientific reports*. 4: 3704.
- TADEO, F. R. 2003. *Histología y citología de cítricos*. Editorial Generalitat Valenciana, Consellería de Agricultura, Pesca y Alimentación. 99.
- TAIZ, L. Y ZEIGER, E. 2006. "El control de la floración". En: *Fisiología vegetal*. Editorial *Universitat Jaume I*. Volumen II. 1070-1127.
- VALENTIM, F. L., VAN MOURIK, S., POSÉ, D., KIM, M. C., SCHMID, M., VAN HAM, R. C. H. J., BUSSCHER, M., SANCHEZ-PEREZ, G. F., MOLENAAR, J., ANGENENT G. C., IMMINK, R. G. H. Y VAN DIJK, A. D. J. 2015. A quantitative and dynamic model of the *Arabidopsis* flowering time gene regulatory network. *PLoS ONE*. 10(2): e0116973.
- VALIENTE, J. I. Y ALBRIGO, L. G. 2004. Flower bud induction of sweet orange trees [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]: effect of low temperatures, crop load, and bud age. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 129(2): 158-164.
- VAN MOURIK, S., VAN DIJK, A. D., DE GEE, M., IMMINK, R. G., KAUFMANN, K., ANGENENT, G. C., VAN HAM, R. C. Y MOLENAAR, J. 2010. Continuous-time modeling of cell fate determination in *Arabidopsis* flowers. *BMC Systems Biology*. 4(1): 101.
- WANG, R., FARRONA, S., VINCENT, C., JOECKER, A., SCHOOF, H., TURCK, F., ALONSO-BLANCO, C., COUPLAND, G Y ALBANI, M. C. 2009. *PEP1* regulates perennial flowering in *Arabidopsis thaliana*. *Nature*. 459(7245): 423-427.

ZEEVAART, J. A. 1976. Physiology of flower formation. *Annual Review of Plant Physiology*. 27(1): 321-348.

ANEJO I

7. ANEJO I. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.

7.1. Análisis de la Varianza y separación de medias para la expresión de CiFT2.

Análisis de Varianza para CiFT2 - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:DÍA	1,47098E7	2	7,35492E6	6,58	0,0058
B:ÁRBOL	2,25604E7	2	1,12802E7	10,09	0,0008
RESIDUOS	2,45943E7	22	1,11792E6		
TOTAL (CORREGIDO)	6,18646E7	26			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Pruebas de Múltiple Rangos para CiFT2 por DÍA

Método: 95,0 porcentaje LSD

DÍA	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
S	9	50,8547	352,44	x
N	9	601,419	352,44	x
F	9	1817,54	352,44	x

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
F - N	*	1216,13	1033,67
F - S	*	1766,69	1033,67
N - S		550,564	1033,67

* indica una diferencia significativa.

Pruebas de Múltiple Rangos para CiFT2 por ÁRBOL

Método: 95,0 porcentaje LSD

ÁRBOL	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
NFL	9	90,9524	352,44	x
J	9	266,862	352,44	x
FL	9	2112,0	352,44	x

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
FL - J	*	1845,14	1033,67
FL - NFL	*	2021,05	1033,67
J - NFL		175,909	1033,67

* indica una diferencia significativa.

7.2. Análisis de la Varianza y separación de medias para la expresión de FLC-like.

Análisis de Varianza para FLC-like - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:ÁRBOL	704,308	2	352,154	32,28	0,0000
B:DÍA	686,472	2	343,236	31,46	0,0000
RESIDUOS	240,027	22	10,9103		
TOTAL (CORREGIDO)	1630,81	26			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Pruebas de Múltiple Rangos para FLC-like por DÍA

Método: 95,0 porcentaje LSD

DÍA	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
S	9	4,56075	1,10103	x
N	9	8,18276	1,10103	x
F	9	16,5978	1,10103	x

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
F - N	*	8,41508	3,22921
F - S	*	12,0371	3,22921
N - S	*	3,62201	3,22921

* indica una diferencia significativa.

Pruebas de Múltiple Rangos para FLC-like por ÁRBOL

Método: 95,0 porcentaje LSD

ÁRBOL	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
J	9	3,76	1,10103	x
FL	9	9,33469	1,10103	x
NFL	9	16,2467	1,10103	x

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
FL - J	*	5,57468	3,22921
FL - NFL	*	-6,91198	3,22921
J - NFL	*	-12,4867	3,22921

* indica una diferencia significativa.

7.3. Análisis de la Varianza y separación de medias para la expresión de *FD-like*.

Análisis de Varianza para *FD-like* - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:DÍA	133,214	2	66,6069	20,02	0,0000
B:ÁRBOL	78,6025	2	39,3013	11,81	0,0003
RESIDUOS	73,1829	22	3,32649		
TOTAL (CORREGIDO)	284,999	26			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Pruebas de Múltiple Rangos para *FD-like* por DÍA

Método: 95,0 porcentaje LSD

DÍA	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
N	9	0,897826	0,607956	x
F	9	3,35	0,607956	x
S	9	6,33015	0,607956	x

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
F - N	*	2,45217	1,78308
F - S	*	-2,98015	1,78308
N - S	*	-5,43233	1,78308

* indica una diferencia significativa.

Pruebas de Múltiple Rangos para *FD-like* por ÁRBOL

Método: 95,0 porcentaje LSD

ÁRBOL	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
J	9	1,14638	0,607956	x
NFL	9	4,36957	0,607956	x
FL	9	5,06204	0,607956	x

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
FL - J	*	3,91566	1,78308
FL - NFL		0,692471	1,78308
J - NFL	*	-3,22319	1,78308

* indica una diferencia significativa.

7.4. Análisis de la Varianza y separación de medias para la expresión de *CsSL1*.

Análisis de Varianza para *CsSL1* - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:DÍA	599,229	2	299,615	25,29	0,0000
B:ÁRBOL	652,163	2	326,081	27,53	0,0000
RESIDUOS	260,596	22	11,8453		
TOTAL (CORREGIDO)	1511,99	26			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Pruebas de Múltiple Rangos para *CsSL1* por DÍA

Método: 95,0 porcentaje LSD

DÍA	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
S	9	1,0	1,14723	x
N	9	8,5	1,14723	x
F	9	12,345	1,14723	x

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
F - N	*	3,845	3,36472
F - S	*	11,345	3,36472
N - S	*	7,5	3,36472

* indica una diferencia significativa.

Pruebas de Múltiple Rangos para *CsSL1* por ÁRBOL

Método: 95,0 porcentaje LSD

ÁRBOL	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
J	9	0,333333	1,14723	x
NFL	9	10,6083	1,14723	x
FL	9	10,9033	1,14723	x

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
FL - J	*	10,57	3,36472
FL - NFL		0,295	3,36472
J - NFL	*	-10,275	3,36472

* indica una diferencia significativa.

7.5. Análisis de la Varianza y separación de medias para la expresión de CsSL2.

Análisis de Varianza para CsSL2 - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:DÍA	15,9239	2	7,96194	14,62	0,0001
B:ÁRBOL	27,9203	2	13,9601	25,64	0,0000
RESIDUOS	11,9797	22	0,544534		
TOTAL (CORREGIDO)	55,8239	26			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Pruebas de Múltiple Rangos para CsSL2 por DÍA

Método: 95,0 porcentaje LSD

DÍA	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
S	9	0,666667	0,245975	x
F	9	1,0173	0,245975	x
N	9	2,44254	0,245975	x

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
F - N	*	-1,42523	0,721422
F - S		0,350637	0,721422
N - S	*	1,77587	0,721422

* indica una diferencia significativa.

Pruebas de Múltiple Rangos para CsSL2 por ÁRBOL

Método: 95,0 porcentaje LSD

ÁRBOL	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
J	9	0	0,245975	x
FL	9	1,69977	0,245975	x
NFL	9	2,42674	0,245975	x

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
FL - J	*	1,69977	0,721422
FL - NFL	*	-0,726964	0,721422
J - NFL	*	-2,42674	0,721422

* indica una diferencia significativa.

7.6. Análisis de la Varianza y separación de medias para la expresión de CsLFY.

Análisis de Varianza para CsLFY - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:DÍA	237,571	2	118,785	77,51	0,0000
B:ÁRBOL	11,8163	2	5,90814	3,86	0,0367
RESIDUOS	33,7134	22	1,53243		
TOTAL (CORREGIDO)	283,101	26			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Pruebas de Múltiple Rangos para CsLFY por DÍA

Método: 95,0 porcentaje LSD

DÍA	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
N	9	1,80303	0,412637	x
S	9	2,45455	0,412637	x
F	9	8,39591	0,412637	x

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
F - N	*	6,59288	1,21023
F - S	*	5,94136	1,21023
N - S		-0,651515	1,21023

* indica una diferencia significativa.

Pruebas de Múltiple Rangos para CsLFY por ÁRBOL

Método: 95,0 porcentaje LSD

ÁRBOL	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
J	9	3,65152	0,412637	x
NFL	9	3,85606	0,412637	x
FL	9	5,14591	0,412637	x

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
FL - J	*	1,49439	1,21023
FL - NFL	*	1,28985	1,21023
J - NFL		-0,204545	1,21023

* indica una diferencia significativa.

7.7. Análisis de la Varianza y separación de medias para la expresión de CiFUL.

Análisis de Varianza para CiFUL - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:DÍA	63,1992	2	31,5996	17,23	0,0000
B:ÁRBOL	158,726	2	79,3629	43,26	0,0000
RESIDUOS	40,3594	22	1,83452		
TOTAL (CORREGIDO)	262,284	26			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Pruebas de Múltiple Rangos para CiFUL por DÍA

Método: 95,0 porcentaje LSD

DÍA	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
S	9	2,89744	0,451481	x
N	9	3,02564	0,451481	x
F	9	6,20513	0,451481	x

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
F - N	*	3,17949	1,32415
F - S	*	3,30769	1,32415
N - S		0,128205	1,32415

* indica una diferencia significativa.

Pruebas de Múltiple Rangos para CiFUL por ÁRBOL

Método: 95,0 porcentaje LSD

ÁRBOL	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
J	9	0,615385	0,451481	x
NFL	9	5,66667	0,451481	x
FL	9	5,84615	0,451481	x

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
FL - J	*	5,23077	1,32415
FL - NFL		0,179487	1,32415
J - NFL	*	-5,05128	1,32415

* indica una diferencia significativa.

7.8. Análisis de la Varianza y separación de medias para la expresión de CsTFL.

Análisis de Varianza para CsTFL - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:DÍA	1,2479	2	0,62395	20,36	0,0000
B:ÁRBOL	1,06863	2	0,534317	17,43	0,0000
RESIDUOS	0,674242	22	0,0306474		
TOTAL (CORREGIDO)	2,99078	26			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Pruebas de Múltiple Rangos para CsTFL por DÍA

Método: 95,0 porcentaje LSD

DÍA	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
F	9	1,09773	0,0583546	x
N	9	1,3055	0,0583546	x
S	9	1,62067	0,0583546	x

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
F - N	*	-0,207771	0,171149
F - S	*	-0,52294	0,171149
N - S	*	-0,315169	0,171149

* indica una diferencia significativa.

Pruebas de Múltiple Rangos para CsTFL por ÁRBOL

Método: 95,0 porcentaje LSD

ÁRBOL	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
FL	9	1,13678	0,0583546	x
NFL	9	1,27624	0,0583546	x
J	9	1,61088	0,0583546	x

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
FL - J	*	-0,474105	0,171149
FL - NFL		-0,13946	0,171149
J - NFL	*	0,334645	0,171149

* indica una diferencia significativa.

7.9. Análisis de la Varianza y separación de medias para la expresión de *TFL2-like*.

Análisis de Varianza para *TFL2-like* - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:DÍA	6,1499	2	3,07495	211,23	0,0000
B:ÁRBOL	0,262709	2	0,131354	9,02	0,0014
RESIDUOS	0,320266	22	0,0145575		
TOTAL (CORREGIDO)	6,73288	26			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Pruebas de Múltiple Rangos para *TFL2-like* por DÍA

Método: 95,0 porcentaje LSD

DÍA	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
N	9	1,05633	0,0402182	x
F	9	1,27533	0,0402182	x
S	9	2,16032	0,0402182	x

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
F - N	*	0,219003	0,117956
F - S	*	-0,884989	0,117956
N - S	*	-1,10399	0,117956

* indica una diferencia significativa.

Pruebas de Múltiple Rangos para *TFL2-like* por ÁRBOL

Método: 95,0 porcentaje LSD

ÁRBOL	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
FL	9	1,38966	0,0402182	x
NFL	9	1,47434	0,0402182	x
J	9	1,62798	0,0402182	x

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
FL - J	*	-0,238316	0,117956
FL - NFL	*	-0,0846797	0,117956
J - NFL	*	0,153637	0,117956

* indica una diferencia significativa.

7.10. Análisis de la Varianza y separación de medias para la expresión de *CsAP1*.

Análisis de Varianza para *CsAP1* - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:DÍA	136,241	2	68,1206	5,63	0,0106
B:ÁRBOL	432,166	2	216,083	17,86	0,0000
RESIDUOS	266,176	22	12,0989		
TOTAL (CORREGIDO)	834,583	26			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Pruebas de Múltiple Rangos para *CsAP1* por DÍA

Método: 95,0 porcentaje LSD

DÍA	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
N	9	6,93677	1,15945	x
S	9	7,81818	1,15945	x
F	9	12,0811	1,15945	x

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
F - N	*	5,14434	3,40055
F - S	*	4,26293	3,40055
N - S		-0,881414	3,40055

* indica una diferencia significativa.

Pruebas de Múltiple Rangos para *CsAP1* por ÁRBOL

Método: 95,0 porcentaje LSD

ÁRBOL	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
J	9	5,14141	1,15945	x
NFL	9	7,2201	1,15945	x
FL	9	14,4745	1,15945	x

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
FL - J	*	9,33313	3,40055
FL - NFL	*	7,25444	3,40055
J - NFL		-2,07869	3,40055

* indica una diferencia significativa.

7.11. Análisis de la Varianza y separación de medias para la expresión de CiSEP1.

Análisis de Varianza para CiSEP1 - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:DÍA	1102,07	2	551,036	18,63	0,0000
B:ÁRBOL	1065,29	2	532,646	18,01	0,0000
RESIDUOS	650,763	22	29,5801		
TOTAL (CORREGIDO)	2818,13	26			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Pruebas de Múltiple Rangos para CiSEP1 por DÍA

Método: 95,0 porcentaje LSD

DÍA	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
N	9	1,875	1,81292	x
S	9	14,0833	1,81292	x
F	9	16,4583	1,81292	x

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
F - N	*	14,5833	5,31713
F - S		2,375	5,31713
N - S	*	-12,2083	5,31713

* indica una diferencia significativa.

Pruebas de Múltiple Rangos para CiSEP1 por ÁRBOL

Método: 95,0 porcentaje LSD

ÁRBOL	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
J	9	2,16667	1,81292	x
NFL	9	13,3333	1,81292	x
FL	9	16,9167	1,81292	x

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
FL - J	*	14,75	5,31713
FL - NFL		3,58333	5,31713
J - NFL	*	-11,1667	5,31713

* indica una diferencia significativa.

7.12. Análisis de la Varianza y separación de medias para la expresión de CiSEP3.

Análisis de Varianza para CiSEP3 - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:DÍA	11210,4	2	5605,2	6,88	0,0048
B:ÁRBOL	16790,6	2	8395,3	10,31	0,0007
RESIDUOS	17915,4	22	814,339		
TOTAL (CORREGIDO)	45916,4	26			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Pruebas de Múltiple Rangos para CiSEP3 por DÍA

Método: 95,0 porcentaje LSD

DÍA	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
N	9	6,14815	9,51221	x
S	9	45,6296	9,51221	x
F	9	52,3333	9,51221	x

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
F - N	*	46,1852	27,8984
F - S		6,7037	27,8984
N - S	*	-39,4815	27,8984

* indica una diferencia significativa.

Pruebas de Múltiple Rangos para CiSEP3 por ÁRBOL

Método: 95,0 porcentaje LSD

ÁRBOL	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
J	9	6,09877	9,51221	x
NFL	9	31,142	9,51221	x
FL	9	66,8704	9,51221	x

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
FL - J	*	60,7716	27,8984
FL - NFL	*	35,7284	27,8984
J - NFL		-25,0432	27,8984

* indica una diferencia significativa.

7.13. Análisis de la Varianza y separación de medias para la expresión de *TEM1-like*.

Análisis de Varianza para TEM1-like - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:DÍA	179,361	2	89,6803	11,69	0,0003
B:ÁRBOL	124,299	2	62,1497	8,10	0,0023
RESIDUOS	168,731	22	7,66957		
TOTAL (CORREGIDO)	472,39	26			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Pruebas de Múltiple Rangos para TEM1-like por DÍA

Método: 95,0 porcentaje LSD

DÍA	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
F	9	3,14286	0,923133	x
N	9	4,95238	0,923133	x
S	9	9,28571	0,923133	x

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
F - N		-1,80952	2,70746
F - S	*	-6,14286	2,70746
N - S	*	-4,33333	2,70746

* indica una diferencia significativa.

Pruebas de Múltiple Rangos para TEM1-like por ÁRBOL

Método: 95,0 porcentaje LSD

ÁRBOL	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
FL	9	2,80952	0,923133	x
NFL	9	6,80952	0,923133	x
J	9	7,7619	0,923133	x

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
FL - J	*	-4,95238	2,70746
FL - NFL	*	-4,0	2,70746
J - NFL		0,952381	2,70746

* indica una diferencia significativa.