



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

INSTITUTO DE CONSERVACIÓN Y MEJORA DE LA AGRODIVERSIDAD
VALENCIANA (COMAV)

**Estudio de los Principales Genes
Responsables de la Síntesis de Giberelinas
en el Cuajado del Níspero Japonés
(*Eriobotrya japonica* Lindl.)**

TRABAJO FINAL DE MÁSTER

MÁSTER UNIVERSITARIO EN MEJORA GENÉTICA VEGETAL

Autora:

Helena Gómez Martínez

Directores:

Carmina Reig Valor

Manuel Agustí Fonfría

Tutor Máster:

Jaime Prohens Tomás

Valencia, julio 2018

DATOS PERSONALES

Nombre y apellidos: Helena Gómez Martínez

DATOS DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER

Título: Estudio de los principales genes responsables de la síntesis de giberelinas en el cuajado del níspero japonés (*Eriobotrya japonica* Lindl.)

Lugar de realización: Instituto Agroforestal Mediterráneo (UPV)

Titulación: Máster en Mejora Genética Vegetal

Director: Carmina Reig Valor

Codirector: Manuel Agustí Fonfría

Tutor Máster: Jaime Prohens Tomás

RESUMEN

El níspero japonés (*Eriobotrya japonica* Lindl.) presenta un bajo porcentaje de cuajado que se ha visto agravado en los últimos años debido a la intensificación monovarietal del cultivo. La complejidad de su Biología reproductiva y el sistema gametofítico de incompatibilidad asociado a la mayoría de las especies frutales de esta familia se presentan, entre otros factores, como los principales responsables. Es por ello, que la presencia de polinizadores mejora sustancialmente el rendimiento del cultivo. Estudios previos han demostrado que las giberelinas juegan un papel importante en este proceso y a pesar de que el cuajado de esta especie es sexual, se han obtenido frutos partenocárpicos mediante aplicaciones exógenas de GA₃ en panículas en preantesis y en flores emasculadas. No obstante, no sólo los factores hormonales son importantes en este proceso. Es más, existen otros factores relacionados con el control de este proceso como son los genéticos, nutricionales y ambientales, cuyo conocimiento puede ser clave para una mejora del mismo.

El objetivo de este trabajo es, por tanto, estudiar el papel de las giberelinas en el cuajado del níspero japonés (*Eriobotrya japonica* Lindl.) cv. Algeria y su relación con el ácido indolacético, así como de los genes implicados en el proceso.

Para ello, se emascularon y embolsaron 130 flores en estado de botón floral, la mitad de las cuales se trataron con 10 ppm de GA₃ y se autopolinizaron otras 65 flores en el momento de la antesis. Periódicamente se siguió la evolución del peso de las flores y a los 7, 12 y 25 días después de los tratamientos se muestrearon 10 flores por tratamiento para su análisis hormonal (GAs y AIA) y expresión génica (*GA20ox*, *GA3ox* y *GA2ox*).

A los resultados se les aplicó el análisis de la varianza utilizando la LSD para la comparación de medias.

RESUM

El nysperer (*Eriobotrya japonica* Lindl.) presenta un baix percentatge de quallat que s'ha vist agreujat en els últims anys com a causa de la intensificació monovarietal del cultiu. La complexitat de la seva Biologia reproductiva i el seu sistema gametofític, associat a la majoria d'espècies frutals d'aquesta família es presenten, entre altres factors, com els principals responsables. La presència de pol·linitzadors millora substancialment el rendiment del cultiu. Estudis previs han demostrat que les gibberel·lines juguen un paper important en aquest procés i malgrat que el quallat d'aquesta espècie es sexual, s'han obtingut fruits

partenocàrpics mitjançant aplicacions exògenes de GA₃ en panícules en preantesi i en flors emasculades. No obstant, no solament els factors hormonals son importants també altres factors com el nutricionals, els genètics i els ambientals resulten claus per a una millora del quallat.

L'objectiu d'aquest treball es, per tant, estudiar el paper de les giberel·lines en el quallat del nyesprer (*Eriobotrya japonica* Lindl.) cv. Algerie i la seua relació amb l' àcid idolacètic, així com també els gens implicats en el procés. Per això, s'emascularen i embolsaren 130 flors en botó floral, la meitat de les quals es tractaren amb 10 ppm de GA₃ i s'autopol·linitzaren altres 65 en el moment d'antesi. Periòdicament, es va seguir la evolució del pes de les flors i als 7, 12 i 25 dies després dels tractaments es van mostrejar 10 flors per tractament per al seu anàlisi hormonal (GAs i AIA) i expressió gènica.

Als resultats es va aplicar l'anàlisi de la variança utilitzant LSD per a la comparació de mitjanes.

ABSTRACT

Loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) has a low fruit set percentage. That percentage has worsened in recent years due to the only-varietal crop intensification. Complexity of Reproductive Biology and gametophyte system incompatibility associated with most of the species of fruit trees in this family, are the main factor. Pollinators substantially improves crop yield. Studies have shown that gibberellins play an important role in this process and despite the sexual fruit set, parthenocarpic fruits have been obtained by GA₃ exogenous applications in panicles in preanthesis and emasculated flowers. However, not only hormonal factors are important in this process. Furthermore, it is known that a better knowledge of genetic, nutritional and environmental factors can be the key to improve fruit set.

The objective of this work is to study the role of gibberellins in fruit set in loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) cv. Algerie and how they are related with indolacetic acid and study the genes involved in this process. To do this, 130 flowers in preanthesis were emasculated and bagged and, half of them were treated with GA₃ (10ppm). Other 65 flowers in anthesis were self-pollinated manually.

Periodically, the evolution of flower weight was studied and at 7, 12 and 25 days after the treatments, 10 flowers per treatment were sampled for hormonal analysis (GAs and IAA) and gene expression (*GA20ox*, *GA3ox* and *GA2ox*).

The variance analysis was applied to the results using LSD for the comparison of means.

Agradecimientos

A Carmina y Manolo, por confiar en mí y por su infinita paciencia. Gracias por vuestro cariño y consejos, que tanto me han enriquecido en lo laboral, pero, sobre todo, en lo personal. Vuestro esfuerzo, profesionalidad, dedicación y pasión por la investigación me han hecho sentir como una más del IAM. Muchísimas gracias.

A Amparo, por sus consejos y ayuda en el laboratorio, por hacerlo todo más fácil.

A Vicent, por su ayuda en campo.

A Carlos, por su amabilidad, consejos y apoyo.

A Fran y Natalia, por su apoyo, ayuda, consejos y, especialmente, por su compañerismo.

A mis *breeders* favoritos, por lo bien que nos lo hemos pasado durante el máster y por la buena piña que hemos hecho.

A Maïté y Mari, por ser mis dos puntitos y mi apoyo constante. Gracias por estar siempre ahí, porque un café con vosotras siempre es y será, la mejor de las terapias. Con vosotras, el concepto de amistad cobra sentido.

A la personita que, más que una prima, es una hermana, gracias teta por tanto.

A ti porque te hubiera gustado ver este “librete que he escrito” también. A vosotros cuatro, porque sé lo orgullosos que os sentiríais.

A mis padres, las personas más importantes de mi vida sin las cuales no hubiera llegado hasta aquí. Gracias por apoyarme, por vuestros consejos. Gracias por estar incondicionalmente conmigo.

Índice

<i>INTRODUCCIÓN</i>	7
1 El proceso del cuajado.....	8
1.1 El cuajado sexual	8
1.2 El cuajado asexual	8
1.3 El control del cuajado.....	8
1.4 Control ambiental	9
1.5 Control nutricional	9
1.6 Control hormonal	10
1.7 Control genético.....	11
2 El cuajado en las especies frutales	12
3.1. El caso del níspero japonés	13
<i>OBJETIVO</i>	14
<i>MATERIAL Y MÉTODOS</i>	16
1 Material vegetal	17
2 Tratamientos	17
3 Muestras	17
4 Análisis hormonal	17
5 Análisis de expresión génica	18
5.1 Diseño de cebadores	18
5.2 RT-q PCR	19
6 Análisis estadístico	19
<i>RESULTADOS</i>	20
1 Efecto sobre el peso de la flor	21
2 Efecto sobre el contenido hormonal.....	21
3 Efecto sobre la expresión de los genes de síntesis de las giberelinas.....	24
<i>DISCUSIÓN</i>	27
<i>CONCLUSIONES</i>	30
<i>BIBLIOGRAFÍA</i>	32
<i>ANEJO</i>	36

Índice de Tablas y Figuras

Tabla 1. Lista de genes a analizar, accesiones a partir de las cuales han sido diseñados y cebadores (secuencia 5'-3') empleados.....	19
Figura 1. Influencia de la autopolinización y la emasculación con y sin tratamientos con GA ₃ sobre la evolución del peso fresco de la flor (g) del cv. Algerie de níspero japonés.....	21
Figura 2. Contenido en giberelinas activas (GA ₄ y GA ₁) (A) y en sus respectivos catabolitos (GA ₈ y GA ₃₄) (B)	22
Figura 3. Contenido en giberelinas GA ₂₀ y GA ₉ (A) y en sus respectivos catabolitos (GA ₈ y GA ₃₄) (B) ..	22
Figura 4. Contenido) en AIA en el ovario de la flor a los 12 y 25 días después del tratamiento	23
Figura 5. Expresión relativa de GA _{20ox} en el ovario de la flor a los 7, 12 y 25 días del tratamiento ...	24
Figura 6. Expresión relativa de GA _{3ox} en el ovario de la flor a los 7, 12 y 25 días del tratamiento.	25
Figura 7. Figura 6. Expresión relativa de GA _{2ox} en el ovario de la flor a los 7, 12 y 25 días del tratamiento.	25

INTRODUCCIÓN

1 El proceso del cuajado

El cuajado es el proceso, controlado por factores externos y endógenos a la planta, mediante el cual la flor se transforma en fruto. Se trata de la activación de un programa de desarrollo que transforma un pistilo en un fruto en crecimiento, desencadenándose una síntesis y señalización hormonal. En términos generales, podemos clasificar el cuajado como sexual o asexual en función de si el fruto se genera como consecuencia de la fecundación o en ausencia de la misma, respectivamente.

1.1 El cuajado sexual

El cuajado sexual es cuando el fruto se desarrolla como consecuencia de la fecundación. Ésta se inicia con la polinización, mediante la cual el grano de polen es depositado en el estigma, donde germina y el tubo polínico inicia su desarrollo a través del estilo hasta alcanzar el saco embrionario a través del micropilo. Uno de los dos núcleos espermáticos, se fusiona con la ovocélula y forma el embrión, mientras que el otro se fusiona con el núcleo secundario del saco embrionario y da lugar al endospermo. Finalmente, los tegumentos forman la testa o epispermo que rodea a las semillas.

1.2 El cuajado asexual

Se entiende por cuajado asexual o partenocarpia cuando el fruto se desarrolla en ausencia de fecundación y, por tanto, de semillas. En este caso son otros factores los que estimulan el desarrollo del fruto y otros tejidos, como las paredes del ovario en el caso de los cítricos, que asumen el papel promotor del crecimiento como fuente o sumidero de sustancias reguladoras de la división celular (Monselise, 1977).

El origen de la partenocarpia puede deberse a múltiples factores como la esterilidad. Así, la esterilidad homocigótica dificulta o impide que los individuos monoicos o hermafroditas se reproduzcan sexualmente sin la intervención de individuos de otra especie o cultivar. La incompatibilidad genética entre los granos de polen y el estigma receptor está ligada a un gen de autoesterilidad con múltiples alelos, de modo que solamente el grano de polen cuyos alelos de autoesterilidad no coincidan con los alelos de los tejidos del estigma o del estilo, penetrará hasta los primordios seminales. De lo contrario, se iniciarán mecanismos (inhibidores del desarrollo del tubo polínico, fallos en el reconocimiento polen-estigma, etc.) que impiden la autogamia (Agustí, 2000). En otros casos, se debe al proceso de dicogamia, la cual puede verse influenciada notablemente por las condiciones climáticas.

Por otro lado, cabe resaltar que la capacidad partenocárpica varía con las especies e incluso entre variedades. Este fenómeno resulta muy habitual entre las especies tropicales, frecuente entre especies subtropicales y de climas templados y muy rara en otras, como las drupáceas.

1.3 El control del cuajado

El proceso del cuajado está determinado tanto por factores nutricionales como por hormonales que, junto con los ambientales y genéticos, juegan un papel esencial en las primeras fases del desarrollo del fruto. Así pues, mientras que los factores nutricionales hacen referencia a la disponibilidad de carbohidratos por parte del fruto en el momento de transición de flor a fruto y los hormonales a la capacidad que este tiene para reclamarlos, los factores ambientales se centran en las condiciones óptimas que se deben establecer durante el proceso de polinización

y fecundación (cuajado sexual) y/o del estímulo de la división celular en frutos desarrollados en ausencia de ella, para garantizar el proceso. El control genético vendría dado, entre otras cosas, por las múltiples reacciones de reconocimiento polen-estigma y por la expresión de genes que regulan el proceso.

1.4 Control ambiental

En el cuajado sexual, las condiciones ambientales que intervienen en el transporte del polen deben ser óptimas para favorecer el vuelo de los insectos polinizadores y garantizar, de este modo, la fecundación y, por tanto, el cuajado.

Condiciones óptimas de humedad relativa y temperatura ambiente en el momento de la anthesis también resultan claves para una correcta polinización, ya que estas influyen de forma notable en la receptividad del estigma y/o viabilidad del polen. Así, mientras humedades relativas bajas no hidratan al estigma lo suficiente como para retener el polen, impidiendo su germinación, las humedades relativas elevadas dificultan la dehiscencia de las anteras o provocan la rotura del tubo polínico durante su desarrollo por el estilo, como consecuencia de una excesiva captación de agua. Por otro lado, la acción de la temperatura puede tener influencia sobre la viabilidad del grano de polen, la eficacia de las abejas en su transporte, así como sobre el crecimiento del tubo polínico, como ocurre en los agrios (Agustí *et al.*, 2003).

Las condiciones climatológicas, también pueden determinar un tipo de cuajado sexual, como es el caso de la estenospermocarpia en la que, como consecuencia de periodos de bajas temperaturas durante el cuajado, los óvulos recién fecundados abortan pero su estímulo es suficiente para que el fruto mantenga su división celular y no se caiga, dando lugar a frutos partenocárpicos (Sukhvibul *et al.*, 2005).

En cuanto al cuajado asexual, las condiciones medioambientales también deben ser las adecuadas para un correcto desarrollo de los frutos, pues tanto la polinización como la germinación del grano de polen o el desarrollo inicial del tubo polínico, sin que en ningún caso se alcance la fecundación, constituyen en ocasiones estímulos suficientes para que se inicie el desarrollo del ovario sin semillas (Agustí *et al.*, 2003).

Las condiciones ambientales como el fotoperiodo y la temperatura, independientemente del tipo de cuajado, pueden alterar la transcripción de los genes de la biosíntesis de giberelinas alterando con ellos los niveles de giberelinas activas (Yamaguchi y Kamiya, 2000) y, por tanto, reduciendo el porcentaje de cuajado. Así pues, estudios en cítricos la alteración del crecimiento inducido por factores ambientales y bióticos está asociado con un cambio en el metabolismo de las giberelinas mediante la modulación en la expresión de genes que codifican la GA20-oxidasa (Vidal *et al.*, 2003).

1.5 Control nutricional

Durante el cuajado o fase de crecimiento exponencial, todos los tejidos de la flor/fruto aumentan su número de células mediante la mitosis, que es un proceso muy exigente en energía. El aporte de carbohidratos al fruto en desarrollo resulta, por tanto, crucial ya que, si la demanda energética no se satisface, se produce la caída fisiológica de frutos.

En las especies leñosas, la intensidad de abscisión de los frutos recién cuajados está ligada a fenómenos de competencia entre ellos, principalmente por carbohidratos, siendo esta mayor a medida que aumenta el número de frutos en desarrollo. Así pues, en el manzano y el peral, la eliminación de las inflorescencias o bien parte de las flores de éstas, reduce la competencia por carbohidratos y, por consiguiente, se produce un aumento en el porcentaje de cuajado. En el níspero japonés, el aclareo de frutos también resulta clave para lograr un mayor porcentaje de cuajado y un tamaño adecuado del fruto (Agustí *et al.*, 2006). Este hecho también puede observarse en el fenómeno de la alternancia de cosechas en los cítricos, en los que el año con abundante floración la planta es incapaz de nutrir a todos los ovarios en desarrollo, por lo que los frutos se desprenden del árbol y se reduce la producción (Moss, 1971). Desde este punto de vista, el cuajado es un proceso de autorregulación fisiológica, de modo que en muchas especies leñosas el número de flores por planta excede en mucho al número de frutos recolectados.

1.6 Control hormonal

La regulación del crecimiento de los frutos depende, en gran medida, de su capacidad de síntesis hormonal, particularmente de giberelinas. En la mayor parte de los casos, las hormonas se sintetizan en las semillas y aunque la excepción más notable son los frutos partenocárpicos también en ellos está regulado hormonalmente. En peras y mandarinas cuando se impide la formación de semillas, el contenido en giberelinas es menor que en aquellos que se han desarrollado tras la fecundación. Sin embargo, los frutos partenocárpicos contienen mayores niveles de giberelinas, lo que explica su tendencia a cuajar en ausencia de fecundación. En estas especies son, por tanto, las giberelinas las que controlan la partenocarpia y el desarrollo inicial del fruto.

La ruta de síntesis de las giberelinas, en las plantas superiores, puede dividirse en tres fases. En la primera, el geranil-geranil-pirofosfato se convierte en ent-kaureno, y en la segunda se transforma en GA₁₂. La última fase se divide en dos rutas paralelas en función de la presencia o ausencia de hidroxilación en el C-13. La GA-20-ox cataliza tres oxidaciones sucesivas en el C-20, generando GA₉ y GA₂₀ y el intermediario es oxidado en el C-3β por la GA3-ox dando lugar a las giberelinas activas GA₄ y GA₁ respectivamente. La acción de la GA2-ox en el C-2β da lugar a los catabolitos GA₃₄ y GA₈ de ambas giberelinas activas, respectivamente (Zhang *et al.*, 2007a; Hedden y Phillips, 2000; Yamaguchi., 2008).

Los niveles de giberelinas activas se regulan mediante complejos mecanismos de control basados en la retroalimentación, positiva o negativa, inducida por los mismos niveles de giberelina activa. Si la planta percibe que posee elevados niveles de giberelinas activas, tiende a reducir los niveles de C₁₉ y a aumentar los precursores de C₂₀. Ello implica la existencia de un control homeostático que regula los niveles de giberelinas bioactivas mediante la retroalimentación de las enzimas finales de la ruta sintética. Dicha retroalimentación parece operar, o al menos en parte, a través del control de la acumulación de los transcritos de estas enzimas (Azcón-Bieto y Talón, 2008). Es más, no existen estudios científicos que relacionen a otras hormonas en las síntesis de giberelinas dada la complejidad de la interrelación hormonal (Barcelo *et al.*, 2000).

Durante el cuajado de la flor y el crecimiento inicial del ovario, el contenido hormonal en ácido indolacético (AIA), ácido abscísico (ABA) y citoquininas es máximo, apareciendo también una

pequeña síntesis de etileno (Ding y Zhang, 1988). Sin embargo, se ha visto que el AIA no induce la partenocarpia en numerosas especies de Rosáceas tales como *Malus pumila*, *Chaenomeles sinensis*, *Cydonia oblonga*, *Pyrus communis* o *Pyrus pyrifolia*, por lo que quizás no sea un factor crítico en el cuajado de dichas Rosáceas (Zhang *et al.*, 2007b). En cuanto al ácido abscísico, se ha visto que es necesario para el desarrollo de la semilla o adaptación a estreses abióticos (Davies, 2004). Sin embargo, el papel del ABA en el desarrollo del fruto sigue sin estar claro, pues se ha visto que tiene un papel antagónico con los procesos regulados por las giberelinas (Zhang, *et al.*, 2007b).

Por otro lado, tratamientos con auxinas de síntesis en ovarios no polinizados de guisante, han promovido el cuajado partenocárpico (García-Martínez y Carbonell, 1980; Ozga y Reinecke, 1999), aunque solo los tratamientos con ácido giberélico resultaron ser iguales que los frutos generados por polinización. Además, en tomate las auxinas son las hormonas que, junto con las giberelinas, tienen una alta capacidad para inducir el cuajado partenocárpico (Homan, 1964; Alabadi *et al.*, 1996). No obstante, otros análisis en procesos moleculares asociados con la acción de las auxinas y las giberelinas durante el cuajado, en plantas modelo como *Arabidopsis*, demuestran que la respuesta de las auxinas es un evento inicial durante el cuajado, siendo además las precursoras de la activación del metabolismo de las giberelinas, especialmente en óvulos fecundados. Además, esta señalización de giberelinas sería suficiente para promover la partenocarpia (Dorcey *et al.*, 2009).

1.7 Control genético

El cuajado también viene determinado por factores genéticos relacionados, entre otras cosas, con la compatibilidad gamética, que se caracteriza por desarrollar complejos mecanismos de incompatibilidad y reconocimiento genético polen-pistilo, que pueden llegar a impedir el desarrollo del tubo polínico y, por tanto, la fecundación. No obstante, en algunas ocasiones, como la partenocarpia estimulada, el propio estímulo de la polinización es suficiente para que se desencadene el desarrollo inicial del fruto, aunque no llegue a darse la fecundación.

Especial interés tienen los genes relacionados con la ruta de síntesis de las giberelinas, por el papel que estas ejercen en el cuajado de la mayoría de las especies frutales. Actualmente, se conocen los enzimas que intervienen en la ruta de biosíntesis de las giberelinas y se han aislado y caracterizado los genes de ellos, como el de la GA20-oxidasa que cataliza todas las reacciones implicadas en las sucesivas etapas de oxidación del carbono 20 entre GA₅₃ y GA₂₀, la GA3-oxidasa que funciona como una 3B-hidroxilasa añadiendo un grupo hidroxilo al carbono 3 para formar GA₁ y, por último, la GA2-oxidasa, que inactiva a la GA₁ al catalizar la acción del grupo hidroxilo al carbono 2 (Taiz y Zeger, 2006).

Además, las giberelinas regulan su propio metabolismo activando o inhibiendo la transcripción de los genes que codifican la biosíntesis (retroalimentación) y degradación de las giberelinas (regulación positiva). Por ejemplo, la aplicación de giberelinas provoca una reducción de los genes relacionados con la síntesis, *GA20ox* y *GA3ox*, y un aumento de la expresión del gen encargado de la degradación (*GA2ox*) (Hedden y Philips, 2000; Elliot *et al.* 2001). Por otro lado, también se ha visto que los niveles de transcritos que codifican la GA20-oxidasa, así como los de la GA3-oxidasa, están sujetos a la retroalimentación, mientras que la expresión de genes que

codifican la GA2-oxidasa está sujeta a una regulación hacia adelante (Hedden y Kamiya, 1997; Thomas *et al.*, 1999).

2 El cuajado en las especies frutales

En la naturaleza, la vía sexual es la forma más común de reproducción entre especies siendo la flor el órgano encargado de llevar a cabo este proceso, ya que tras la fecundación de sus óvulos se inicia el proceso de transformación en fruto o cuajado.

Este proceso es consecuencia de numerosos factores y se caracteriza, a su vez, por una elevada tasa de división celular (mitosis), que induce de una gran demanda energética que la planta satisface con el aporte de carbohidratos, gracias a la acción de las giberelinas sintetizadas por el embrión recién formado, aumentando la capacidad sumidero. Esto es aprovechado por los tejidos restantes del fruto para acumular carbohidratos y agua y desarrollarse (Agustí, 2003).

En el cuajado asexual o partenocárpico, las hormonas juegan un papel fundamental. Se ha visto que en *P.pyrifolia* las giberelinas que son C-13 desoxidadas, como la GA₄ y la GA₇ son más probables de ser los factores endógenos responsables de la inducción del cuajado partenocárpico en variedades que son naturalmente partenocárpicas, que las giberelinas GA₁ y GA₃ (Zhang *et al.*, 2008).

Por tanto, los factores nutricionales y hormonales, junto con los ambientales juegan un papel importante en el control del cuajado del fruto. Mientras los primeros hacen referencia a la disponibilidad de carbohidratos, los segundos determinan la capacidad sumidero del fruto, esto es, a su capacidad para atraerlos. De manera que, si uno o ambos factores son deficitarios durante el cuajado, la capacidad sumidero del fruto y su aporte de carbohidratos se reducen, el fruto detiene su crecimiento y se cae.

Actualmente, se aplican técnicas para la mejora del cuajado. En el níspero japonés, cuando la falta de cuajado se debe a problemas de autoincompatibilidad, la solución radica en favorecer la polinización cruzada, ya que con ella se mejora la producción entre un 15 y un 20% (Agustí, 2006). Si, además, la polinización de la especie es entomófila, la suelta de insectos polinizadores suele favorecer el número de frutos cuajados.

Otra manera de solucionar expectativas de cuajado bajo, en este caso por un exceso de competencia, es realizar un aclareo químico de las flores. En el caso del manzano, los tratamientos más empleados en el grupo Delicious son el ácido giberélico, mientras que en el grupo Reinetas son la naftalenacetamida y el ácido naftalenacético (Iglesias *et al.* 2000). En este sentido, en el naranjo dulce Navelate, para evitar floraciones intensas que comprometen el cuajado y disminuyen considerablemente la cosecha, se practican tratamientos hormonales con ácido giberélico en la época de inducción floral (otoño) para reducir la floración. Este efecto de la intensidad de floración también pone de manifiesto la capacidad de la planta para nutrir a las flores que han iniciado su desarrollo como frutos (Agustí *et al.*, 1982). La acción que las giberelinas tienen en la inhibición de la floración ha sido demostrada en la mayoría de las especies frutales, como cítricos (Monselise y Halevy, 1964), melocotonero (Reig *et al.*, 2006) o manzano (Luckwill, 1977). No obstante, otras hormonas, tales como la auxina de síntesis 2,4-D,

también tienen un efecto inhibitorio de la floración del naranjo dulce si se aplican durante el reposo vegetativo de la planta (Guardiola *et al.*, 1977).

Por otro lado, cuando el problema de cuajado radica en un problema de competencia por carbohidratos, una técnica alternativa a la inhibición de la floración la constituye el rayado de ramas.

3.1. El caso del níspero japonés

En el níspero japonés, la autoincompatibilidad parcial de sus flores hace necesaria una vía para la polinización cruzada o alogamia para mejorar los bajos índices de cuajado (del 10 al 15% de las flores) que presenta. En este sentido y, debido a que la polinización es entomófila, la suelta de polinizadores, mayoritariamente de abejas durante la antesis, contribuye a mejorar el porcentaje de cuajado, que en esta especie es fundamentalmente sexual.

A pesar de ello, se han encontrado plantas triploides ($3n=51$) por partenocarpia natural y, por lo tanto, infértiles. La triploidía natural del níspero japonés se debe, entre otras cosas, a la autopolinización o a la ovogénesis en ausencia de meiosis (Liang *et al.*, 2006). Otros estudios han analizado la ploidía de más de 45000 semillas de 21 variedades distintas encontrando 311 poliploides estables de los cuales el 73% son triploides, el 16% tetraploides y el resto pentaploides y mixoploides.

No obstante, la aplicación exógena de GA_3 a flores emasculadas durante la preantesis promueve el cuajado partenocárpico en esta especie (Pardo, 2014). Aplicaciones de GA_3 a 25 y 1000 $mg\ l^{-1}$ antes de la antesis también consiguen la formación de frutos de níspero japonés partenocárpico (Sadamatsu *et al.*, 2004; Goubran y El-Zeftawi, 1986). Estos resultados también se han observado en el cv. Algerie mediante tres aplicaciones consecutivas de GA_3 a 100ppm a flores en estado de botón floral cerrado (Mesejo *et al.*, 2010).

También se han encontrado casos de estenospermocarpia en esta especie, como consecuencia de periodos de bajas temperaturas y baja humedad relativa durante el proceso de cuajado que provocan el aborto de los embriones en los primeros estados del desarrollo, pero siendo el estímulo de la fecundación suficiente para permitir el desarrollo del fruto (Pardo, 2014). En este caso, la fecundación es suficiente para que el fruto complete la fase I de división celular y el fruto siga su desarrollo quedando, las semillas reducidas a rudimentos seminales.

OBJETIVO

El objetivo de este Trabajo Fin de Máster es estudiar el papel de las giberelinas en el cuajado del níspero japonés (*Eriobotrya japonica* Lindl.) y su relación con el ácido indolacético, así como de los genes implicados en el proceso.

MATERIAL Y MÉTODOS

1 Material vegetal

Los experimentos se realizaron en árboles adultos de níspero japonés (*Eriobotrya japonica* Lindl), cv. Algerie sobre patrón franco, de entre 20 y 25 años de edad y situados en la parcela de Fruticultura de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural (ETSIAMN), de la Universitat Politècnica de València (UPV).

Los árboles se encontraban en plena producción, con fertirrigación y en adecuadas condiciones fitosanitarias.

2 Tratamientos

Se seleccionaron al azar 65 flores en estado de botón floral (estado 509 de la escala BBH) a las que se les eliminó, con ayuda de unas pinzas, todos los estambres sin dañar el resto de estructuras florales. Tras la emasculación, se embolsaron con muselina y se marcaron con cintas de color. Otras 65 flores se emascularon y se trataron con 10 ppm de (GA₃) al que se le añadió un tensoactivo.

Finalmente, otras 65 flores en plena antesis (estado 605 de la escala BBCH), se autopolinizaron manualmente con la ayuda de un pincel.

3 Muestreos

De cada tratamiento se muestrearon 10 flores, a los 7, 12, y 25 días después de la realización de estos, para posteriores análisis hormonales y genéticos que se congelaron con nitrógeno líquido y se guardaron -80°C. Paralelamente se muestrearon de manera periódica flores de todos los tratamientos para seguir la evolución del peso.

4 Análisis hormonal

El material vegetal recogido se liofilizó y trituró manualmente hasta polvo fino. Se tomaron alícuotas (50 mg) duplicadas de cada muestra y se extrajeron con metanol 80%: ácido acético 1% (v/v) en presencia de diferentes estándares internos que permitieron la cuantificación de cada una de las giberelinas consideradas (hormonas marcadas con Deuterium [proporcionadas por Prof. L Mander- Camberra, OlChemim Ltd - Olomouc, o Cambridge Isotope Lab- Andover]).

Para la recuperación de la fracción ácida de las muestras donde se localizan las giberelinas, éstas se pasaron consecutivamente a través de columnas HLB (fase reversa), MCX (intercambio catiónico) y WAX (intercambio iónico) (Oasis 30 mg. Waters) como se describe en Seo *et al.* (2011). Las muestras se llevaron a sequedad en rotovapor.

El residuo seco se disolvió en CH₃CN 5%: ácido acético 1% y las hormonas se separaron por ultracromatografía en fase reversa (UHPLC) mediante una columna RP-MS Accuore 2.6 µm (50 mm x 2.1 mm i.d.: Thermo Fisher Scientific) con un gradiente de acetonitrilo (5-50%). Las hormonas se detectaron y analizaron en un espectrómetro masas/masas (Q-exactive Orbitrap detector, Thermo Fisher Scientific). La concentración de las hormonas en los extractos se determinó según

las curvas de calibración realizadas previamente. La interpretación de los resultados se realizó mediante los programas Xcalibur 2.2 SP1 y TraceFinder.

5 Análisis de expresión génica

El protocolo de extracción de RNA empleado fue el descrito por Martínez-Fuentes et al. (2015).

El material vegetal congelado se trituró en un mortero preenfriado con nitrógeno líquido hasta conseguir un polvo fino. Se utilizó entre 0,5 y 0,2 gramos de cada muestra, que se transfirió a tubos de polipropileno estéril mantenidos en hielo.

Se añadieron 5 ml de tampón de extracción precalentado a 65°C (3% CTAB, NaCl 1,4M, EDTA 200mM, Tris-HCl 100mM pH 8), 0,4 g de PVPP y β-mercaptoetanol (4%). Los tubos fueron incubados en un baño a 65°C durante 20 minutos agitando ocasionalmente. Transcurrido ese tiempo se añadió 1 ml de acetato potásico (3M y pH 5.5) y se incubaron las muestras en hielo durante 30 minutos.

Transcurrido el tiempo, se le añadió un volumen (5mL) de phenol:chloroformo:isoamylalcohol (25:24:1), se centrifugó durante 10 minutos a 4°C y 10000 rpm y se recogió el sobrenadante. La re-extracción del sobrenadante se repitió 3 veces.

Pasada esta fase, se agregó un volumen de chloroformo:isoamylalcohol (24:1) y se centrifugó durante 10 minutos a 4°C y 100000 rpm. Recuperado el sobrenadante, se adicionó un volumen de isopropanol frío y se incubó toda la noche a -80°C.

Tras la incubación, se centrifugó (10 minutos a 4°C y 10.000 rpm) y se desechó el sobrenadante. A continuación, se lavó el pellet con 200 µL etanol al 70%, se volvió a centrifugar nuevamente en las mismas condiciones eliminándose el etanol. Una vez seco el pellet se resuspendió en 1mL de Tris-HCL (10mM a pH7,5) y se transfirió a un eppendorf esterilizado al que se adicionó 250µL de LiCl (10M), dejándolo de 2 a 3 horas a -80°C. Transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugó (30 minutos a 11000 rpm y 4°C), se eliminó el sobrenadante y se lavó con 100µL de etanol 70%. Tras centrifugar (5 minutos a 11000 rpm y 4°C) se desechó el sobrenadante y se dejó secar el pellet. Una vez seco, se resuspendió en agua libre de RNA_{asas}

Los extractos de RNA fueron purificados mediante el kit RNeasy® (Qiagen), según las instrucciones del fabricante.

5.1 **Diseño de cebadores**

Para el análisis de la expresión génica, debido a que el genoma del níspero japonés no se encuentra secuenciado, se diseñaron cebadores a partir de secuencias de especies pertenecientes al género *Malus*, *Pyrus* o *Prunus*, por ser especies cercanas filogenéticamente al mismo.

Para ello se partió inicialmente de accesiones de *Malus domestica* (Zhao et al.; 2010), que tras comprobarse con herramientas bioinformáticas (NCBI y Phytozome), se seleccionaron para el diseño de cebadores con ayuda de ClustalW.

Sin embargo, para el diseño de los cebadores del gen de la GA3-oxidasa, se procedió a un alineamiento de secuencias de *Malus domestica*, *Pyrus pyrifolia* y *Prunus persica* ya que, en pruebas previas, se tuvo problemas de amplificación con cebadores únicamente diseñados a partir de *Malus*. Para ello, se contó con ayuda de algoritmo ClustalW.

Tabla 1. Lista de genes a analizar, accesiones a partir de las cuales han sido diseñados y cebadores (secuencia 5'-3') empleados.

Enzima	Gen	Accesión	Forward diseñado
GA2-oxidasa	<i>GA2ox1</i>	NCBI: MDP0000137705	TTTGTGACCAAATCAGCCAGTGAAC
	<i>GA2ox2</i>	NCBI: MDP0000185333	TTTGTGACCAAACCACCTAATGAGA
GA3-oxidasa	<i>GA3ox</i>	NCBI: XM_007215494.1 (<i>Prunus pérsica</i>)	GGCTCACCAGTTGACCATT
		GenBank: LC013247.1 (<i>Pyrus pyrifolia</i>)	
		NCBI: MDP0000716315 (<i>Malus domestica</i>)	
GA20-oxidasa	<i>GA20ox2</i>	NCBI: MDP0000248981 (<i>Malus domestica</i>)	CGGGAGGGTTACCAAGATTATAGTG

5.2 RT-q PCR

Para la evaluación de la expresión génica se realizó una PCR con transcriptasa inversa, que permite amplificar y cuantificar simultáneamente el ADN. Para ello se emplea un molde de ARN.

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 min a 95°C para la activación de la Hotstart Taq polimerasa seguidos de 40 ciclos de 15 s a 94°C (desnaturalización), 30 s a 60°C (alineamiento o anillamiento de los cebadores) y 30 s a 72°C (extensión). La fluorescencia se midió al final de la etapa de alineamiento. Los cebadores 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 formación de dímeros. Los valores de expresión génica se calcularon mediante el método $\Delta\Delta C_t$ tras comprobar que la eficiencia de los cebadores podía considerarse del 100%.

6 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.)

RESULTADOS

1 Efecto sobre el peso de la flor

La aplicación exógena de ácido giberélico (GA_3) a flores recién emasculadas permitió que éstas siguieran creciendo y aumentando progresivamente de peso, hasta los 0,17 g a los 22 días del tratamiento y favoreciendo, de esta manera, su permanencia en el árbol o cuajado asexual. Las flores emasculadas que no se trataron, por el contrario, perdieron el ritmo de crecimiento y se desprendieron del árbol en su totalidad, aproximadamente 1 mes después del tratamiento. Las flores autopolinizadas y, por tanto, de cuajado natural, crecieron a mayor velocidad alcanzando un peso mayor (0,25 g) (Fig. 1). El efecto de la hormona fue rápido y a los 10 días de su aplicación ya se observaban diferencias en el peso de las flores (0,13 g) frente a los (0,11 g) de las flores sólo emasculadas, aunque sin alcanzar el de las flores autopolinizadas que fue superior (0,15 g). Esta tendencia se mantuvo a lo largo de todo el periodo de estudio (Fig. 1).

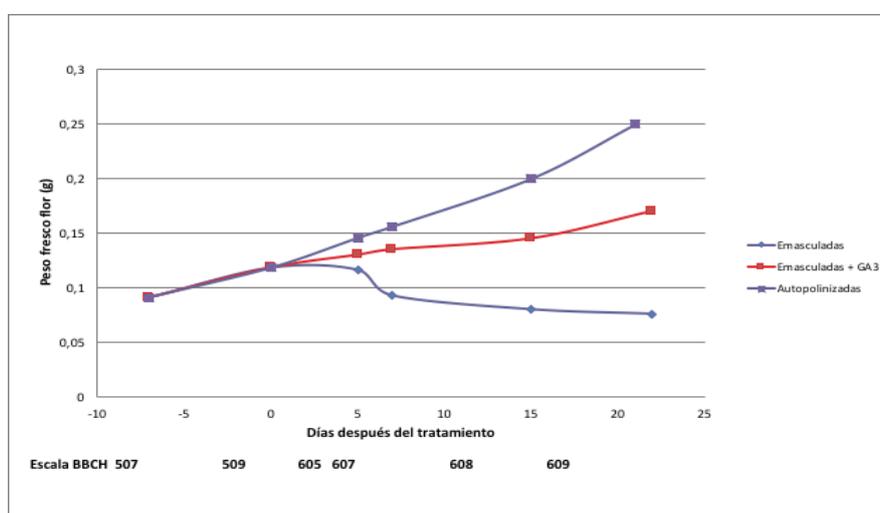


Figura 1. Influencia de la autopolinización y la emasculación con y sin tratamientos con GA_3 sobre la evolución del peso fresco de la flor (g) del cv. Algerie de níspero japonés. Cada valor es la media de 5 flores. La concentración de GA_3 fue de 10 ppm. La autopolinización se realizó a flores en antesis (605 BBCH) y la emasculación a botón floral (509 BBCH).

2 Efecto sobre el contenido hormonal

La ausencia de fecundación mediante la emasculación redujo significativamente el contenido de giberelinas activas (GA_1 y GA_4) en la flor, independientemente de si las flores emasculadas se trataron o no con GA_3 . Así, en pleno periodo de fecundación, esto es, 12 días después de la antesis, mientras las flores autopolinizadas y, por tanto, fecundadas, tenían una concentración de giberelinas activas ($GA_1 + GA_4$) de $17,5 \text{ ng g}^{-1} \text{ PS}$, las emasculadas y, por tanto, no fecundadas lo tenían de 5,2 y $6,7 \text{ ng g}^{-1} \text{ PS}$, sin tratar y tratadas con GA_3 , respectivamente (Fig. 2A). La aplicación inmediata de GA_3 a las flores emasculadas no consiguió modificar, sin embargo, el contenido endógeno de estas hormonas.

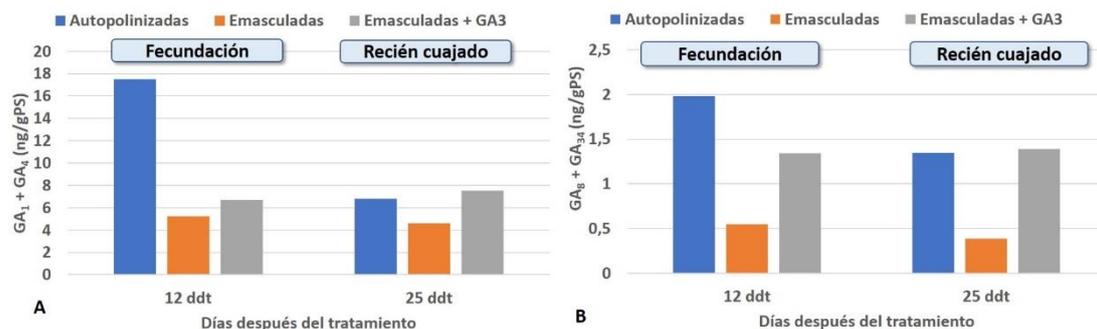


Figura 2. Contenido en giberelinas activas (GA₄ y GA₁) (A) y en sus respectivos catabolitos (GA₈ y GA₃₄) (B) en el ovario de la flor a los 12 y 25 días después del tratamiento. La concentración de GA₄ y GA₁ en el momento del tratamiento fue de 10,6 ng/gPS y 14,4 ng/gPS para la emasculación y autopolinización, respectivamente. La concentración de GA₈ y GA₃₄ fue de 1,3 ng/g PS y 1,9 ng/gPS para la emasculación y autopolinización, respectivamente.

Este efecto se perdió con el tiempo y, aproximadamente 15 días después de la fecundación (25 días después de la antesis), cuando los frutos ya habían iniciado el cuajado, el contenido endógeno de giberelinas activas de las flores autopolinizadas descendió significativamente igualándose al de las flores emasculadas y tratadas con GA₃ (7,1 ng g⁻¹PS por término medio). Las flores emasculadas que no se trataron presentaron 2.5 ng g⁻¹ PS menos de estas hormonas (Fig. 2A). En este caso, la aplicación de GA₃ sí que modificó el contenido endógeno de giberelinas en las flores emasculadas hasta de 1.6 veces más respecto de las que sólo se emascularon.

Teniendo en cuenta que el 50% de los tubos polínicos comienzan a llegar a los óvulos de la flor entre la primera y segunda semana tras la polinización, es importante destacar que el contenido de giberelinas activas es más relevante durante el proceso de fecundación de la flor, que una vez iniciado el cuajado, como indican nuestros resultados (Fig. 2A).

Algo similar se observó en el comportamiento de los catabolitos (GA₈ y GA₃₄), aunque con concentraciones notablemente menores que las de las giberelinas activas, independientemente del tratamiento realizado. Así, durante el periodo de fecundación la concentración de los primeros llegó a ser hasta del 80.5%, por término medio, inferior a la de los segundos. Estas diferencias se mantuvieron prácticamente 15 días más tarde, cuando el fruto ya había iniciado el cuajado (Fig. 2B).

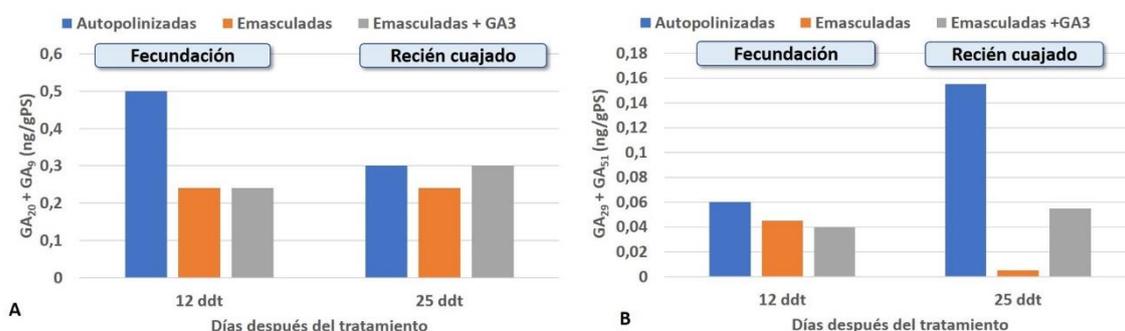


Figura 3. Contenido en giberelinas GA₂₀ y GA₉ (A) y en sus respectivos catabolitos (GA₂₉ y GA₅₁) (B) en el ovario de la flor a los 12 y 25 días después del tratamiento. La concentración de GA₂₀ y GA₉ en el momento del tratamiento fue de 2,55 y 5,84ng/gPS para la emasculación y autopolinización respectivamente. La concentración de GA₂₉ y GA₅₁ en el momento del tratamiento fue de 18,57 y 0,31ng/gPS para la emasculación y autopolinización, respectivamente.

Tampoco se encontraron diferencias notables en el comportamiento de los precursores de síntesis de las giberelinas activas (GA_{20} y GA_9) y éstas últimas, cuya tendencia fue en consonancia, pero con diferencias cuantitativas importantes (Figs. 2A y 3A). Así, mientras durante el proceso de fecundación (12 ddt), la concentración de los primeros en las flores autopolinizadas era de $0.5 \text{ ng g}^{-1} \text{ PS}$, la de los segundos era 35 veces superior ($17.5 \text{ ng g}^{-1} \text{ PS}$). En el caso de las flores emasculadas sin tratar y tratadas con GA_3 la concentración de $GA_{20}+GA_9$ fue 22 y 28 veces inferior, respectivamente, a la de las giberelinas activas GA_1+GA_4 . Quince días más tarde (25 ddt), cuando ya se había iniciado el cuajado del fruto, la concentración de los primeros ($GA_{20}+GA_9$) fue, por término medio para los tres tratamientos, hasta 23 veces inferior a la de los segundos (GA_1+GA_4) (Figs. 2A y 3A).

Tampoco la tendencia de los catabolitos de los precursores de síntesis de giberelinas ($GA_{29}+GA_{51}$) mostró grandes diferencias respecto del resto de giberelinas estudiadas, comportándose en coherencia con ellos a pesar de las bajas concentraciones alcanzadas en todos los tratamientos (Fig. 3B). Merece la pena destacar que el máximo valor de estos catabolitos encontrado ($0.15 \text{ ng g}^{-1} \text{ PS}$), fue hasta 2.6 veces inferior al mínimo encontrado en el resto de giberelinas estudiadas ($0.39 \text{ ng g}^{-1} \text{ PS}$ para GA_8+GA_{34}).

La síntesis de ácido indolacético (AIA) también se vio alterada por los tratamientos. Al igual que en las giberelinas activas, la ausencia de fecundación mediante la emasculación redujo notablemente el contenido AIA en la flor, independientemente de si las flores emasculadas se trataron o no con GA_3 .

Así, en pleno periodo de fecundación (12 ddt), mientras las flores autopolinizadas tenían una concentración de AIA de $59 \text{ (ng g}^{-1} \text{ PS)}$, las emasculadas, sin tratar y tratadas con GA_3 , lo tenían de 23.4 y $38.1 \text{ (ng g}^{-1} \text{ PS)}$, respectivamente (Fig. 4). Ahora bien, la aplicación inmediata de GA_3 a las flores emasculadas consiguió aumentar hasta en 1.6 veces el contenido endógeno de AIA respecto de las que no se trataron, llegando a ser hasta de 3 veces, 15 días más tarde (Fig. 4).

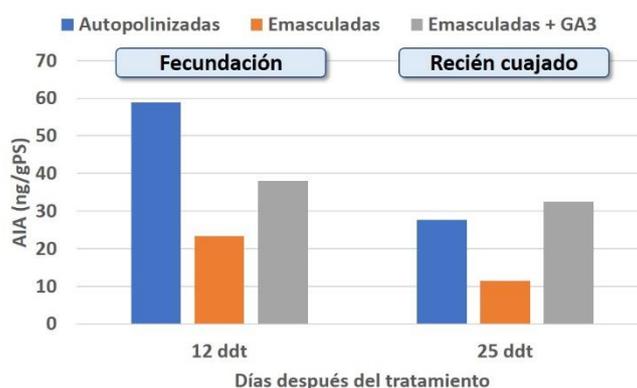


Figura 4. Contenido en AIA en el ovario de la flor a los 12 y 25 días después del tratamiento. La concentración en el momento del tratamiento fue de $33,3$ y $40,8 \text{ ng/gPS}$ para la emasculación y autopolinización, respectivamente.

El contenido de esta auxina fue marcadamente superior en todos los tratamientos durante el proceso de la fecundación (12 ddt) que durante el cuajado del fruto (25 ddt). Diferencias del 53%, 51% y 15% del contenido de AIA en las flores autopolinizadas, emasculadas y emasculadas tratadas con GA_3 , respectivamente, se observaron en nuestros resultados durante el primero

respecto del segundo (Fig. 4). Algo similar se observó en el contenido endógeno de giberelinas activas, que también fue cuantitativamente más importante durante la fecundación que en el fruto recién cuajado.

3 Efecto sobre la expresión de los genes de síntesis de las giberelinas.

La ausencia de fecundación por la emasculación de las flores, independientemente de si se trataron o no con GA₃, alteró notablemente la expresión relativa del gen de la *GA20-oxidasa* (*GA20ox*), a los 7 días del tratamiento, que fue prácticamente nula, respecto a las flores que se polinizaron que fue hasta 9 veces mayor (Fig. 5). El efecto fue inmediato, pero disminuyó con el tiempo y, 7 y 15 días más tarde, aunque la expresión de este gen en las flores polinizadas seguía siendo superior, no se apreciaron diferencias significativas con la del resto de tratamientos. Teniendo en cuenta el periodo de polinización efectiva de esta especie, la máxima expresión relativa del gen *GA20ox* encontrada 7 días después de los tratamientos, es decir, una semana después de la antesis en este caso, se correspondería con el estímulo de la polinización. Estos resultados están en consonancia con los obtenidos en el contenido endógeno de las giberelinas que regulan la ruta de síntesis, es decir, de la GA₂₀+GA₉, que fue máximo en estas flores 7 días más tarde, una vez iniciada la fecundación (Fig. 3A).

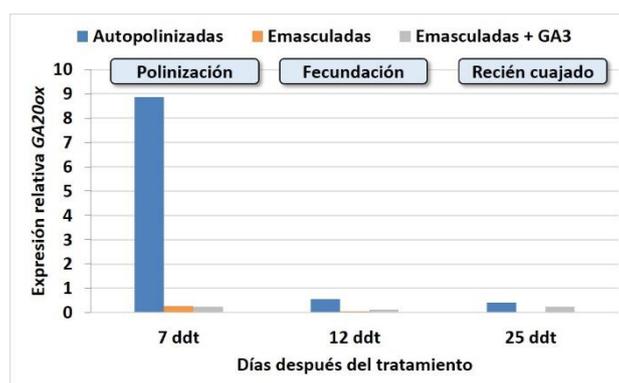


Figura 5. Expresión relativa de *GA20ox* en el ovario de la flor a los 7, 12 y 25 días del tratamiento.

La expresión del gen de la *GA3-oxidasa* (*GA3ox*), responsable de la síntesis de las giberelinas activas (GA₁+GA₄), también se vio significativamente alterado por la ausencia de fecundación. Así, en las flores polinizadas, la expresión de este gen fue significativamente superior, hasta 28 veces más por término medio que en el resto de los tratamientos, en todos los periodos estudiados (Fig. 6). En coherencia con ello, la concentración de giberelinas activas también fue significativamente superior en las flores fecundadas (autopolinización) que en las que no se fecundaron (emasculación con y sin aplicación de GA₃) (Fig. 2A).

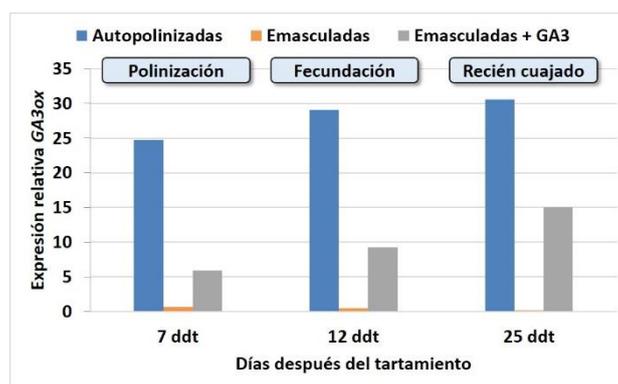


Figura 6. Expresión relativa de *GA3ox* en el ovario de la flor a los 7, 12 y 25 días del tratamiento.

La aplicación de GA_3 a las flores emasculadas sí que modificó, en este caso, la expresión del gen *GA3ox* respecto de las que no se trataron, aumentándola hasta 5.5 veces, por término medio, en todas las etapas estudiadas. En este sentido, aunque de manera menos notable, también el contenido de (GA_1+GA_4) fue mayor en las primeras que en las segundas (Figs. 6 y 2A).

El gen responsable de la síntesis de los catabolitos de las giberelinas activas y de los catabolitos de sus precursores (*GA2ox*), también vio modificada su expresión por los tratamientos. Así, a los 7 días del tratamiento, durante la polinización, la expresión de este gen fue significativamente mayor (hasta 2 veces) en las flores en las que este proceso tuvo lugar (autopolinizadas) que en las que no ocurrió (emasculadas con y sin tratar con GA_3), en las cuales fue igual (Fig. 7). Sin embargo, 7 y 15 días más tarde, durante la fecundación e inicio del cuajado del fruto, respectivamente, sólo se encontraron diferencias significativas en las flores emasculadas y tratadas con GA_3 cuya expresión aumentó espectacularmente, hasta ser 6 veces superior que en el resto de tratamientos (Fig. 7).

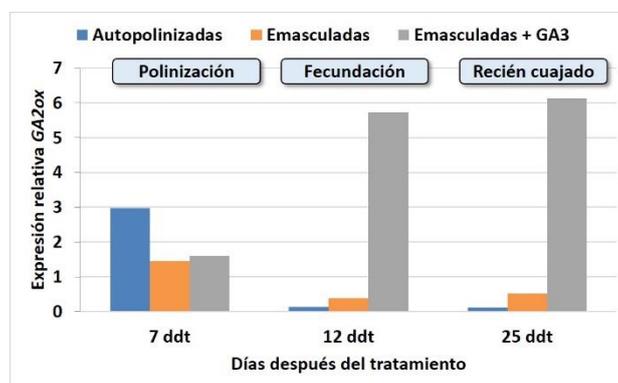


Figura 7. Expresión relativa de *GA2ox* en el ovario de la flor a los 7, 12 y 25 días del tratamiento.

Aunque el gen *GA2ox* regula la síntesis de los catabolitos, tanto de las giberelinas activas (GA_8+GA_{34}) como los de sus precursores ($GA_{29}+GA_{51}$), cuantitativamente son más importantes los primeros que los segundos (Figs. 2B y 3B). En este sentido, resulta lógico el desfase temporal entre el aumento de la concentración de catabolitos de las giberelinas activas (GA_8+GA_{34}) durante la fecundación y el de la expresión del gen regulador de su síntesis (*GA2ox*) durante la polinización. Sin embargo, este desfase entre la expresión génica y el contenido endógeno de giberelinas permaneció difuso en etapas posteriores. Así, mientras al inicio del cuajado del fruto el contenido endógeno de los catabolitos (GA_8+GA_{34}) de las flores autopolinizadas y emasculadas

tratadas era el mismo ($1.3 \text{ ng g}^{-1} \text{ PS}$), el de la expresión del gen regulador (*GA2ox*), por el contrario, difería significativamente, siendo hasta 6 veces superior en las segundas respecto de las primeras durante la etapa anterior, es decir, durante la fecundación (Figs. 2B y 7), indicando la existencia de un proceso de feed-back en la regulación endógena del contenido en giberelinas activas.

DISCUSIÓN

En el níspero japonés, la transición de los órganos extracarpelares de la flor a fruto en desarrollo, esto es, el cuajado, se realiza de manera natural por la fecundación de algunos de sus óvulos. Sin embargo, aunque de manera menos frecuente, también se ha encontrado partenocarpia natural, generalmente en plantas triploides ($3n=51$), por la ovogénesis en ausencia de meiosis (Liang *et al.*, 2006), o en tetraploides y mixoploides (Guo *et al.*, 2006). En cualquier caso, las hormonas implicadas en el control de ambos procesos, fecundación o partenocarpia, son las giberelinas en la mayoría de las especies frutales, como los cítricos (Talón *et al.*, 1992), el cerezo (Beppu *et al.*, 2001) o el nashi (Zhang *et al.*, 2008), entre otras, pudiéndose obtener frutos partenocárpicos con aplicaciones exógenas, como se consigue en nuestro experimento. En este caso, el contenido endógeno en giberelinas de los frutos partenocárpicos inducidos por la emasculación y la aplicación de GA₃ fue menor que en los frutos con semillas, como ocurre en la mayor parte de los frutales, pero mayor que en las flores emasculadas. Esta podría ser la razón por la cual el peso de las flores emasculadas y tratadas con GA₃ fue mayor que el de las emasculadas que ni siquiera consiguieron cuajar, debido, entre otros factores, al papel regulador que esta hormona tiene en la división celular y, en consecuencia, en la alta demanda energética.

Por otra parte, en general, en frutos partenocárpicos espontáneos, los niveles de giberelinas son similares o superiores a los frutos con semilla de la misma especie, lo cual explica su tendencia a cuajar sin fecundación. En coherencia con ello, en las flores autopolinizadas, cuyo cuajado depende de la fecundación, el contenido de giberelinas activas, así como el de sus precursores, durante este periodo fue mayor que en el resto de tratamientos y que el suyo propio 15 días más tarde, cuando el fruto ya había cuajado. Esto, junto al notable aumento de los catabolitos de los precursores de su síntesis en esta etapa ponen de manifiesto el papel regulador que estas hormonas tienen en este proceso y no en las primeras fases de desarrollo del fruto cuyo contenido en giberelinas activas se ve reducido por la catabolización de sus precursores. También en otras especies frutales, como el naranjo 'Pineapple' (Ben-Cheikh *et al.*, 1997) y las mandarinas Satsuma y Clementina (Talón *et al.*, 1992), el mayor contenido de giberelinas activas se registró durante las primeras fases de transición del ovario de la flor a fruto en desarrollo.

En cultivares con semilla, la polinización y fecundación de los óvulos son necesarias para el cuajado y posterior desarrollo del fruto (Wang *et al.*, 2009), como ocurre en esta especie. La elevada expresión de los 3 genes reguladores de la síntesis de GAs en las flores cuyos frutos presentarán semillas (autopolinizadas) durante la polinización y fecundación, pone de relevancia la participación de estas hormonas en su cuajado.

Por otra parte, teniendo en cuenta que en esta especie la ausencia de fecundación mediante la emasculación provoca la abscisión del fruto (Gómez-Martínez, 2014), y que la aplicación de GA₃ a éstas induce su cuajado asexual, el aumento en la concentración de catabolitos podría indicar la existencia de un mecanismo de feed-back en la regulación endógena del contenido en giberelinas activas estimulado por la aplicación de la GA₃. Estos resultados estarían en consonancia con el estímulo partenocárpico conseguido mediante aplicaciones de GA₄ y GA₇ en variedades de manzana como 'Wealthy' (Nakagawa *et al.*, 1967), 'Golden Delicious', 'Jonagold' y 'Fuji' (Bangerth y Schröder, 1994).

La expresión relativa del gen GA3ox de las flores emasculadas y tratadas fue notablemente superior a la de las flores emasculadas, pero esto no se tradujo en un mayor contenido de

giberelinas activas. Ello se justifica por el aumento de la expresión del gen *GA2ox* que favorece su catabolismo y estaría de acuerdo con el mecanismo de feed-back propuesto.

En cualquier caso, el mecanismo mediante el cual la GA_3 induce el cuajado en esta especie es diferente al realizado por la fecundación. Así lo reflejan nuestros resultados, en los que la aplicación de GA_3 estimuló la síntesis de los catabolitos (GA_8 y GA_{34}) de las giberelinas activas y la del AIA, durante la fecundación, coincidiendo con el incremento en la expresión de los genes *GA3ox* y *GA2ox*. Algo parecido se encontró en las mandarinas Satsuma y Clementina, de alta y baja capacidad partenocárpica, respectivamente, en las que la aplicación de GA_3 también alteró la ruta de síntesis de las GAs (Yuste, 2015).

Por otra parte, el mayor contenido de AIA en las flores autopolinizadas durante la fecundación (12 ddt), y marcadamente superior al de las giberelinas activas (59 y 17.5 ng g⁻¹PS, respectivamente), sugiere un papel previo de la auxina al de la acción de las giberelinas en el proceso del cuajado del níspero japonés. Este papel mensajero de la auxina ha sido también señalado en otras especies como *Arabidopsis*, tomate o cítricos. De hecho, en *Arabidopsis* el AIA regula la biosíntesis de GA_1 a través del control de la expresión de los genes que codifican las enzimas envueltas en la síntesis de las giberelinas (Desgagne-Penix y Sponsel, 2008; Frigerio *et al.*, 2006) y en tomate (Serrani *et al.*, 2007) atribuyen el papel regulador del AIA a la represión de la expresión de la *GA2ox*. De hecho, consiguen promover el cuajado partenocárpico en tomate mediante aplicaciones de AIA y 2,4D. Por el contrario, cuando el AIA se aplicó conjuntamente con paclobutrazol (PBZ), un inhibidor de la síntesis de GAs, el cuajado del tomate se redujo drásticamente (Serrani *et al.*, 2008). Otros autores como Talón *et al.* (1990) consideran que el AIA también es un factor regulador del cuajado del naranjo. Así, Bermejo *et al.* (2018) demostraron que la aplicación de AIA a flores emasculadas de naranjo dulce 'Pineapple' aumentó la expresión de los genes *GA20ox*, *GA3ox*, la síntesis de GAs, y el cuajado respecto de las flores emasculadas y sin tratar, alcanzando los niveles de las flores control sin emasculadas. El papel del AIA como factor intermedio en la activación de la biosíntesis de GAs, sin embargo, debe ser estudiado con mayor detalle.

CONCLUSIONES

1. El porcentaje de cuajado partenocárpico conseguido con la aplicación de GA₃ es el mismo que el cuajado natural.
2. La acción del GA₃ no es a través de la síntesis endógena de las giberelinas activas, como la que promueve la autopolinización.
3. Esta reducción de la concentración de giberelinas activas junto con el aumento de expresión de la *GA2ox* sugiere un mecanismo de feed-back de autorregulación asociado al estímulo partenocárpico provocado por la aplicación de GA₃.

BIBLIOGRAFÍA

- Agustí, M.; García-Marí, F. & Guardiola, J. L. 1982. Gibberellic acid and fruit set in sweet orange. *Sci. Hort.*: 17:257-264.
- Agustí, M. 2000. Crecimiento y Maduración del fruto. En: *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. J. Azcón-Bieto y M. Talón (Eds.), McGraw-Hill Interamericana de España SAU y Ed. Univ. Barcelona. Madrid, España. pp. 419-433.
- Agustí, M. y Reig, C. 2006. Fisiología. En: *El cultivo del Níspero Japonés*, M. Agustí, C. Reig y P. Undurraga (Eds.), Gráficas Alcoy, España, pp97-129.
- Agustí, M.; Martínez-Fuentes, A. Mesejo, C.; Juan, M. y Almela, V. 2003. Cuajado y desarrollo de los frutos cítricos. Instituto Agroforestal Mediterráneo. Universidad Politécnica de Valencia. Edición de Generalitat Valenciana; Conselleria d'Agricultura, Peixca i Alimentació. Sèrie divulgació Tècnica nº55.
- Alabadi, D.; Aguero, M. S.; Perez-Amador, M.A. y Carbonell, J. 1996. Arginase, Arginine Decarboxylase, Ornithine Decarboxylase, and Polyamines in tomato ovaries. Changes in Unpollinated ovaries and parthenocarpic fruits induced by auxin or gibberellin. *Plant Physiol.* 112, 1237-1244.
- Azcón-Bieto, J. y Talón, M. 2008. *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Ed. McGraw-Hill.
- Bangerth, F. and M. Schröder. 1994. Strong synergistic effects of gibberellins with the synthetic cytokinin N-(2-chloro-4-pyridyl)-N-phenylurea on parthenocarpic fruit set and some other fruit characteristics of apple. *Plant Growth Reg.* 15:293-302.
- Barceló, J.; Nicolás, G.; Sabater, B. y Sánchez, R. 2000. *Fisiología Vegetal*. Capítulo 23. Ediciones Pirámide. Madrid.
- Ben-Cheikh, W.; Perez-Botella, J.; Tadeo, F.R.; Talón, M.; Primo-Millo, E. 1997. Pollination Increases Gibberellin Levels in Developing Ovaries of Seeded Varieties of Citrus. *Plant Physiol.* 114:557-564.
- Beppu, K., T. Suehara and I. Kataoka. 2001b. Embryo sac development and fruit set of 'Satohnishiki' sweet cherry as affected by temperature, GA₃ and paclobutrazol. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 70: 157-162.
- Bermejo, A.; Granero, B.; Mesejo, C.; Reig, C.; Tejedo, V.; Agustí, M.; Primo-Millo, E.; Iglesias, D.J. 2018. Auxin and Gibberellin Interact in Citrus Fruit Set. *Plant Growth Regul.* 37: 491-501.
- Davies, P.J. (Ed). 2004. *Plant hormones: Biosynthesis, signal transduction, action!*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.
- Desgagné-Penix, I. y Valerie M. Sponsel. 2008. Expression of *gibberellin 20-oxidase1 (AtGA20ox1)* in *Arabidopsis* seedlings with altered auxin status is regulated at multiple levels. *Journal of Experimental Botany*, Volume 59, Issue 8, 1. P: 2057-2070.
- Ding, C.K. y Zhang, H. Z. 1988. Effects of hormones on growth and development of loquat fruits. *Acta Horticulturae Sinica*, 15:148-153.
- Dorcey, E.; Urbez, C.; Blázquez, M.A.; Carbonell, J. Perez-Amador, M.A. 2009. Fertilization-dependent auxin response in ovules triggers fruit development through the modulation of gibberellin metabolism in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 58, 318-332.
- Elliot, R. C.; Ross J.J.; Smith J.J. y Lester, D. R. 2001. Feed-forward regulation of gibberellin deactivation in pea. *J. Plant Growth Regul.* 20: 87-94.
- Frigerio, M.; Alabadi, D.; Pérez-Gómez, J.; García-Cárcel, L.; Phillips, A.L.; Hedden, P. y Blázquez M. A. 2006. Transcriptional Regulation of Gibberellin Metabolism Genes by Auxin Signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. Vol. 142, pp. 553-563.
- García-Martínez, J.L. y Carbonell, J. 1980. Fruit-set of Unpollinated ovaries of *Pisum sativum* L. Influence of plant growth regulators. *Planta*, 147, 451-456.
- Gómez-Martínez, H. 2014. Control hormonal y nutricional en el cuajado del níspero japonés (*Eriobotrya japonica* Lindl.) Trabajo Fin de Carrera. Universitat Politècnica de València.
- Goubran, F.H. y El-Zeftawi, B.M.. 1986. Induction of seedless loquat. *Acta Hort.* 179, 381-384.
- Guardiola J.L, Agustí M y García-Marí F. 1977. Gibberellic acid and flower bud development in sweet orange. *Proc. Int. Soc. Citriculture*, 2: 696-699.

- Guo, Q.G.; Li, X.L.; Xing, W.W; He, Q; Liang, G.L. 2006. Occurrence of natural triploids in loquat. ISHS Acta Horticulturae 750: II International Symposium on Loquat.
- Hedden, P. y Kamiya, Y. 1997. Gibberellin biosynthesis: enzymes, genes and its regulation. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48:431-460.
- Hedden, P y Phillips, A.L. 2000. Gibberellin metabolism: New insights revealed by the genes. *Trends Plant Sci.* 5: 523-530.
- Homan, D.H. 1964. Auxin transport in the physiology of fruit development. *Plant Physiol.* 39, 320-336.
- Iglesias I., Carbó, J., Bonany, J., Dalmau, Ricard., Guanter, G., Montserrat, R., Moreno, Antoni y Pagès, J.M. 2000. Manzano. Las variedades de más interés. Instituto de Investigación y Tecnologías Agroalimentarias de Cataluña (IRTA).
- Liang, G.L.; Wang, S.Q.; Xiang, S.Q.; Guo, Q.G. y Li, X.L. 2006. GISH identification of the origin of natural triploid loquat. II International Symposium of Loquat, Abstract:22, O10.
- Luckwill, L.C. 1970. The control of growth and fruitfulness of apple trees. En: *Physiology of tree crops*, L. C. Luckwill y C.V. Cutting (Eds.). Academic Press, NY, EEUU. pp 237-254.
- Mesejo, C; Reig, C; Martínez -Fuentes, A; Agustí, M. 2010. Parthenocarpic fruit production in loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) by using gibberellic acid. *Scientia Horticulturae* 126, 37-41.
- Martinez Fuentes, A.; Mesejo Conejos, C.; Agustí Fonfría, M. y Reig Valor, C. 2015. Toward a more efficient isolation of total RNA from loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) tissues. *Fruits.* 70(1):47-51
- Monselise, S.P. y Halevy, A.H. 1964. Chemical inhibition and promotion of *Citrus* flower bud induction. *Proc. Am. Soc- Hort- Sci.* 84, 141-146.
- Monselise, S.P. 1977. Citrus fruit development: endogenous systems and external regulation. *Proc. Int. Soc. Citriculture*, 2:664-668.
- Moss G.I. 1971. Effect of fruit flowering in relation to biennial bearing in sweet orange (*Citrus sinensis*). *J Hort Sci.* 46: 177-184.
- Nakagawa, S., M. J. Bukovac, N. Hirata and H. Kurooka. 1967. Morphological studies of gibberellin-induced parthenocarpic and asymmetric growth in apple and Japanese pear fruits. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 37: 9-19.
- Ozga, J.A. y Reinecke, D.M. 1999. Interaction of 4-chloroindol-3-acetic acid and gibberellins in early pea fruit development. *Plant growth Regul.* 27, 33-38.
- Pardo, A. 2014. Inducción del cuajado asexual en el níspero japonés (*Eriobotrya japonica* Lindl.). El papel de las giberelinas. Trabajo Fin de Carrera. Universitat Politècnica de València
- Reig, C., González-Rossia, D., Juan, M. y Agustí, M. 2006. Effects of fruit load on flower bud initiation and development in peach. *J. Hort. Sci. Biotechnol.*, 81: 1079-1085.
- Sadamatsu, M.; Keawladagorn, V.; Ohara, H.; Ohkawa, K. y Matsui, H. 2004. Induction of parthenocarpic fruit growth with endogenous gibberellins of loquat. *Proc. 9th IS on Plant Bioregulators. Acta Hort.* 653, 67-70.
- Serrani, J. C.; Sanjuán, R.; Ruiz-Rivero, O.; Fos, M.; y García-Martínez, J. L. 2007. Gibberellin regulation of fruit set and growth in tomato. *Plant Physiology*, 145(1), 246-257.
- Serrani, J. C.; Sanjuán, R.; Ruiz-Rivero, O.; Fos, M.; y García-Martínez, J. L. 2008. Auxin-induced fruit-set in tomato is mediated in part by gibberellins. *The Plant Journal*, 56(6), 922-934.
- Sukhvilul, N.; Wibley, A.W.; Smith, M.K. 2005. Effect of temperature on seed and fruit development in three mango (*Mangifera indica* L.) cultivars. *Sci. Hort.* 105(4):467-474.
- Taiz, L. y Zeger, E. 2006. Fisiología vegetal. Col·lecció Ciències Experimentals. Núm 10. Volumen II. Capítol 20. Publicacions de la Universitat Jaume I. Castelló de la Plana, España.
- Talón M.; Hedden P.; Primo-Millo E. 1990. Gibberellins in *Citrus sinensis*: A comparison between seeded and seedless varieties. *J. Plant Growth Regul.* , 9: 201-206.
- Talón, M.; Zacarías, L.; Primo-Millo, E. 1992. Gibberellins and parthenocarpic ability in developing ovaries of seedless mandarins. *Plant Physiol.*, 99:1575-1581.

- Thomas, S.G.; Phillips, A.L.; Hedden, P. 1999. Molecular cloning and functional expression of gibberellin 2-oxidases, multifunctional enzymes involved in gibberellin deactivation. *Proc Natl Acad Sci. USA*, 96:4698-4703.
- Vidal, A.M.; Ben-Cheikh, W.; Talón, M.; García-Martínez, J.L. 2003. Regulation of gibberellin 20-oxidase gene expression and gibberellin content in citrus by temperature and citrus exocortis viroid. *Planta*, 217:442-448.
- Wang, H.; Schauer, N.; Usadel, B.; Frasse, P.; Zouine, M.; Hernould, M.; Latche, A.; Pech, J.C.; Fernie, A.R.; Bouzayen, M. 2009. Regulatory features underlying pollination-dependent and -independent tomato fruit set revealed by transcript and primary metabolite profiling. *The Plant Cell*. vol. 21:1428-1452.
- Yamaguchi, S. y Kamiya, Y. 2000. Gibberellin biosynthesis: Its regulation by endogenous and environmental signals. *Plant Cell Physiol.* 41: 251-257.
- Yamaguchi, S. 2008. Gibberellin Metabolism and its Regulation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2008.59:225-251.
- Yuste, R. 2015. Gibberellins regulate cell division and parthenocarpic fruit set in *Citrus*. Tesis Doctoral. Università degli Studi di Palermo.
- Zhang, C.; Tanabe, K.; Tamura, F.; Itai, A. y Yoshida, M. 2007 a. Role of gibberellins in increasing sink demand in Japanese pear fruit during rapid fruit growth. *Plant Growth Regul.* 52:161-172.
- Zhang, C.; Tanabe, K.; Tani, H.; zhajima, H.; Mori, M. y Sakuno, E. 2007b. Biologically active gibberellins and Abscisic acid in fruit of two late-maturing Japanese pear cultivars with contrasting fruit size. *Hort. Sci.* 132(4):452-458.
- Zhang, C.; Lee, U. y Tanabe, K. 2008. Hormonal regulation of fruit set, parthenogenesis induction and fruit set expansion in Japanese Pear. *Plant Growth Regul.* 55:231-240.
- Zhao, H.; Dong, J. y Wang, T. 2010. Function and Expression Analysis of Gibberellin Oxidases in Apple *Plant Mol Biol Rep.*, 28:231-238.

ANEJO

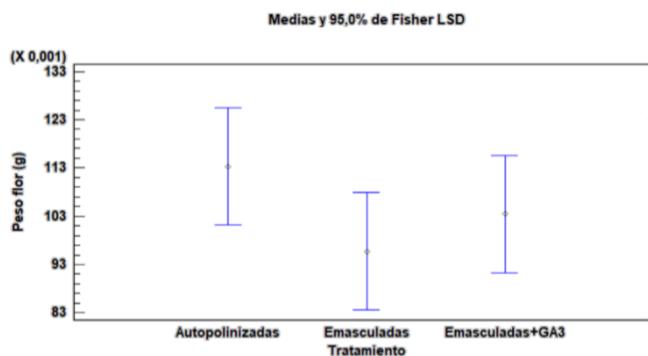
1. Análisis estadístico de los datos de peso de flores

1.1. Análisis de la varianza y separación de medias para el peso de la flor.

Análisis de Varianza para Peso flor (g) - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Tratamiento	0,000925224	2	0,000462612	1,30	0,3152
B: Días después tratamiento	0,00288771	5	0,000577543	1,62	0,2409
RESIDUOS	0,00356235	10	0,000356235		
TOTAL (CORREGIDO)	0,00737528	17			

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



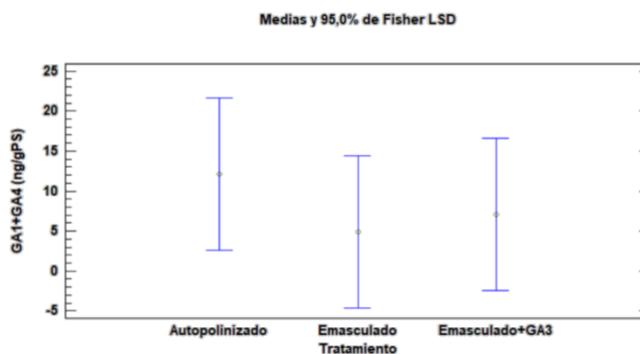
2. Análisis estadístico de los datos hormonales

2.1. Análisis de la varianza y separación de medias para las giberelinas activas (GA₁+GA₄).

Análisis de Varianza para GA₁+GA₄ (ng/gPS) - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Tratamiento	54,9558	2	27,4779	1,40	0,4165
B: Días después tratamiento	18,5504	1	18,5504	0,95	0,4334
RESIDUOS	39,2258	2	19,6129		
TOTAL (CORREGIDO)	112,732	5			

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

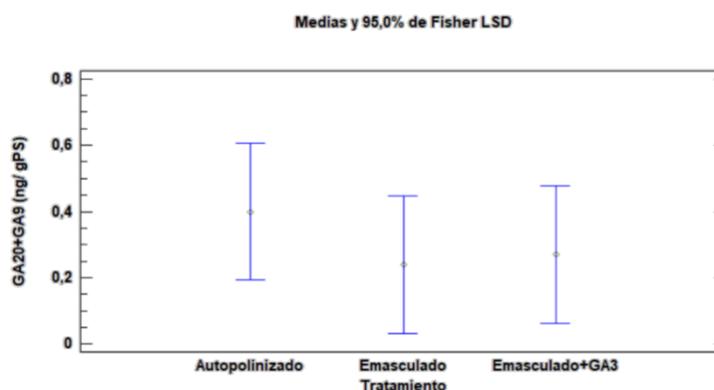


2.2. Análisis de la varianza y separación de medias para los precursores de las giberelinas activas (GA₂₀+GA₉).

Análisis de Varianza para GA₂₀+GA₉ (ng/ gPS) - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Tratamiento	0,0289333	2	0,0144667	1,56	0,3904
B: Días después tratamiento	0,00326667	1	0,00326667	0,35	0,6129
RESIDUOS	0,0185333	2	0,00926667		
TOTAL (CORREGIDO)	0,0507333	5			

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

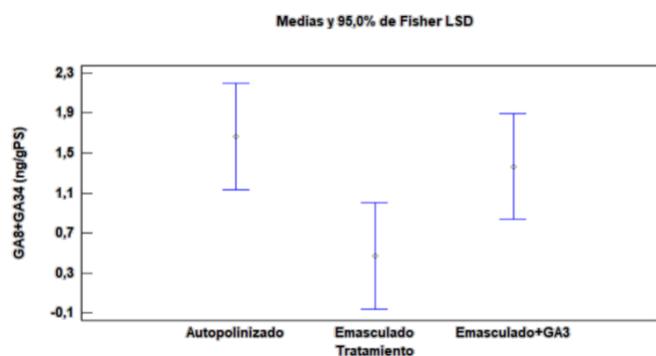


2.3. Análisis de la varianza y separación de medias para los catabolitos de las giberelinas activas (GA₈+GA₃₄).

Análisis de Varianza para GA₈+GA₃₄ (ng/gPS) - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Tratamiento	1,54603	2	0,773017	12,75	0,0727
B: Días después tratamiento	0,0912667	1	0,0912667	1,51	0,3446
RESIDUOS	0,121233	2	0,0606167		
TOTAL (CORREGIDO)	1,75853	5			

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

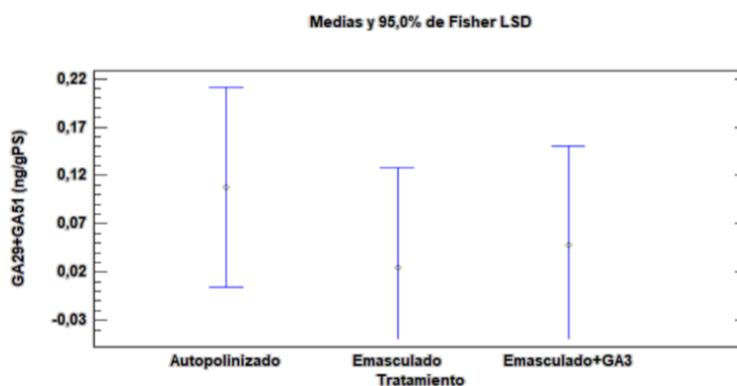


2.4. Análisis de la varianza y separación de medias para los catabolitos de los precursores de las giberelinas activas (GA₂₉+GA₅₁).

Análisis de Varianza para GA₂₉+GA₅₁ (ng/gPS) - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Tratamiento	0,007275	2	0,0036375	1,58	0,3878
B: Días después tratamiento	0,000816667	1	0,000816667	0,35	0,6120
RESIDUOS	0,00460833	2	0,00230417		
TOTAL (CORREGIDO)	0,0127	5			

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

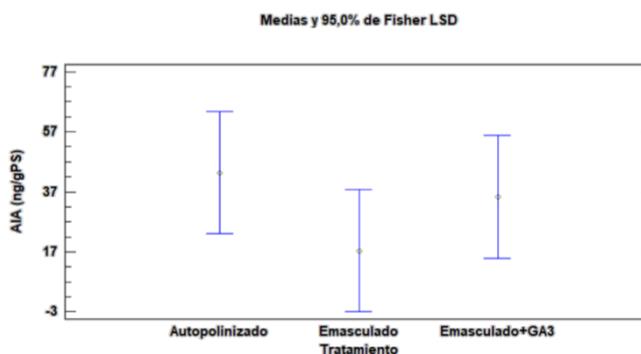


2.5. Análisis de la varianza y separación de medias para el AIA.

Análisis de Varianza para AIA (ng/gPS) - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Tratamiento	705,743	2	352,872	3,94	0,2023
B: Días después tratamiento	398,535	1	398,535	4,45	0,1693
RESIDUOS	178,99	2	89,495		
TOTAL (CORREGIDO)	1283,27	5			

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



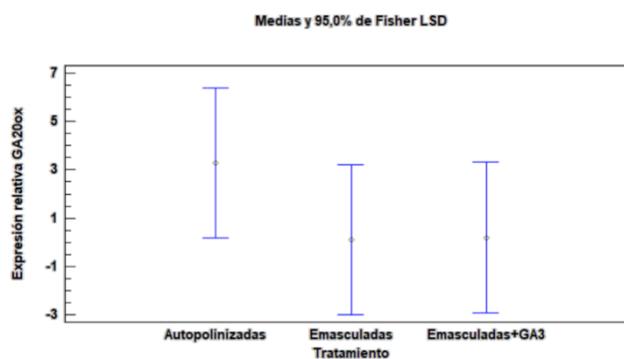
3. Análisis estadístico de datos de expresión génica

3.1. Análisis de la varianza y separación de medias para la expresión relativa de GA20ox.

Análisis de Varianza para Expresión relativa GA20ox - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Tratamiento	19,5453	2	9,77263	1,30	0,3667
B: Días después tratamiento	16,7629	2	8,38143	1,12	0,4116
RESIDUOS	30,0033	4	7,50082		
TOTAL (CORREGIDO)	66,3114	8			

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

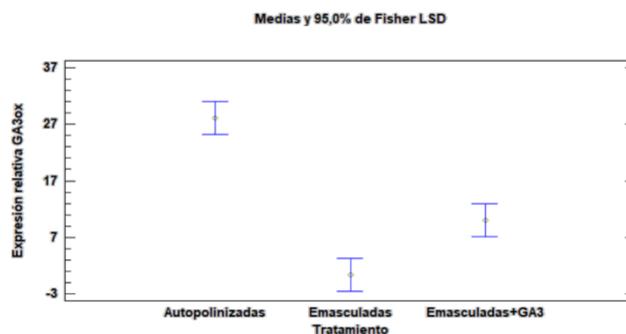


3.2. Análisis de la varianza y separación de medias para la expresión relativa de GA3ox.

Análisis de Varianza para Expresión relativa GA3ox - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Tratamiento	1184,36	2	592,18	90,50	0,0005
B: Días después tratamiento	34,6899	2	17,3449	2,65	0,1849
RESIDUOS	26,1725	4	6,54312		
TOTAL (CORREGIDO)	1245,22	8			

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



3.3. Análisis de la varianza y separación de medias para la expresión relativa de GA2ox.

Análisis de Varianza para Expresión relativa GA2ox - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Tratamiento	25,4971	2	12,7485	2,74	0,1777
B: Días después tratamiento	0,0934889	2	0,0467444	0,01	0,9900
RESIDUOS	18,5828	4	4,64569		
TOTAL (CORREGIDO)	44,1734	8			

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

