

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA
ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



**Capacidad fotosintética del ovario de la flor y su relación
con el cuajado del fruto en los cítricos**

TRABAJO FIN DE MÁSTER

MÁSTER EN SANIDAD Y PRODUCCIÓN VEGETAL

ALUMNA: Maria Alejandra Carreño Vargas

TUTOR: Carlos Mesejo Conejos

Curso Académico: 2016/2017

Valencia, septiembre de 2017

Título: Capacidad fotosintética del ovario de la flor y su relación con el cuajado del fruto en los cítricos.

RESUMEN:

La floración determina el éxito productivo de cualquier cultivo comercial. Por lo tanto, el conocimiento de los factores endógenos y exógenos que determinen su desarrollo y su influencia sobre el cuajado del fruto son de marcada importancia.

Los factores endógenos que condicionan el paso de flor a fruto son de tipo nutricional y hormonal. Los factores nutricionales determinan el abastecimiento de los fotoasimilados necesarios para el desarrollo del fruto, y los factores hormonales influyen en el desarrollo por medio de la activación de la división celular y en la capacidad *sumidero* o de atracción de nutrientes por parte del fruto en crecimiento. En estudios recientes, se ha confirmado que la acumulación de almidón en el ovario de la flor durante el periodo de pre antesis permite la independencia nutricional de la flor respecto de las hojas durante el cuajado inicial. Su hidrólisis aseguraría un nivel mínimo de glucosa para promover la tasa de crecimiento del ovario necesaria para el cuajado del fruto, hasta el momento en que las hojas jóvenes adquieran capacidad exportadora de fotoasimilados.

La síntesis de almidón en órganos fuente (hojas) difiere de la síntesis de almidón en órganos sumidero (semillas o frutos). Se desconoce cómo se origina el almidón del ovario de la flor de los cítricos, por lo que en esta Tesina de Máster se plantea la siguiente **hipótesis de trabajo**:

El almidón acumulado en el ovario durante el periodo de preantesis proviene de la sacarosa generada por su propia capacidad fotosintética y de la movilización de reservas desde fuentes vecinas. Para confirmar la hipótesis, se ha estudiado el efecto de la defoliación de ramas del mandarino Clementino cv. Marisol en el cuajado y desarrollo del ovario, su capacidad fotosintética y el reparto de carbohidratos en la planta.

Palabras clave: Carbohidratos, Citrus, Cuajado, Fotosíntesis

ABSTRACT:

Flowering determines the productive success of any commercial crop. Therefore, factors that determine flowering and its influence on the fruit set are of marked importance. The flower to fruit transition is regulated by nutritional and hormonal factors. Nutritional factors determine the supply of photo-assimilates necessary for fruit development, and hormonal factors influence development through the activation of cell division and the sink strength. In recent studies, it was confirmed that the accumulation of starch in the ovary of the flower during the period of pre-anthesis allows the nutritional independence of the flower with respect to the leaves during the initial fruit set. Its hydrolysis would ensure a minimum level of glucose to promote the growth rate of the ovary necessary for setting a fruit, until the young leaves acquire photo-assimilate export capacity.

The synthesis of starch in source organs (leaves) differs from the synthesis of starch in sink organs (seeds or fruits). It is not known how citrus starch is synthesized in the ovary, and so, the following working hypothesis is proposed:

Starch accumulated in the ovary during the period of preanthesis comes from the sucrose generated by its own photosynthetic capacity and the mobilization of reserves from neighboring sources. To confirm the hypothesis, we have studied the effect of branch defoliation in fruit set of the Clementine mandarin cv. Marisol, the ovary photosynthetic capacity and the distribution of carbohydrates in the plant.

Keywords: Carbohydrates, Citrus, Fruit set, Photosynthesis

ALUMNA: Maria Alejandra Carreño Vargas

DIRECTOR: Carlos Mesejo Conejos

VALENCIA, septiembre de 2017

AGRADECIMIENTOS

A Carlos y Amparo.

ÍNDICE

I. Introducción	1
1. Control del cuajado. Factores Nutricionales	2
1.1 Carbohidratos de reservas: Almidón	2
1.2. Carbohidratos de transporte: Sacarosa	4
2. Fotosíntesis.....	5
2.1 La fijación del CO ₂ y la enzima RubisCO.....	5
2.2 Fotosíntesis en hojas jóvenes y maduras	6
2.3 Fotosíntesis en el fruto	6
3. Transporte de Nutrientes: Relaciones fuente-sumidero	7
4. Hipótesis de trabajo y objetivos	8
II. Material y métodos	10
1. Material vegetal.....	10
2. Experimentos	10
3. Análisis de expresión genética	13
4. Análisis de carbohidratos	14
5. Estudio histológico de cloroplastos y amiloplastos en ovarios de flor	15
6. Análisis estadístico de los resultados.....	15
III. Resultados y discusión.....	16
<i>Efecto de la presencia de hojas jóvenes y viejas sobre el cuajado y peso del fruto</i>	<i>16</i>
<i>Síntesis de almidón en la flor durante la preantesis e hidrólisis durante el cuajado</i>	<i>19</i>
<i>Distribución de carbohidratos en hojas, brotes y ramas</i>	<i>23</i>
<i>Fijación de CO₂ por la flor y el fruto</i>	<i>26</i>
IV. Conclusiones	29
Bibliografía.....	30

I. INTRODUCCIÓN

El proceso que marca la transición del ovario de la flor a fruto en desarrollo se denomina cuajado. Éste tiene lugar durante los 7-15 días después de la antesis, dependiendo de las variedades y condiciones ambientales. Tras el cuajado, se inicia la fase I de crecimiento del fruto, durante la cual se produce la caída fisiológica de los frutos, que determina la cosecha final (Agustí, 2003). Desde el punto de vista agronómico, el cuajado también se conoce como *cuajado inicial*, mientras que el número final de frutos en el árbol que queda tras la caída fisiológica se conoce como *cuajado final*. El cuajado está regulado por factores endógenos, nutricionales, hormonales, y climáticos.

El desarrollo del fruto durante la fase I se caracteriza por una activa división celular en sus tejidos que exige una gran demanda de fotoasimilados desde las hojas. Los carbohidratos, básicamente glucosa y fructosa, son consumidos para sustentar los procesos de duplicación del material genético y la citocinesis, de modo que su disponibilidad es un factor esencial para sustentar el desarrollo. Así, la defoliación de árboles de mandarina Satsuma durante la fase I de desarrollo del fruto provoca la abscisión de los frutos durante la caída fisiológica en intensidad equivalente a la intensidad de la defoliación (Mehouachi et al., 1995). Sin embargo, se ha observado que cuando la defoliación se realiza durante el periodo de preantesis, el porcentaje de cuajado a las 2 semanas de la antesis no se reduce significativamente. Sin embargo, la ausencia de hojas al inicio de la caída fisiológica (35-40 días después de la antesis) de frutos provoca el 100% de abscisión (Mehouachi et al., 1995; Molina, 2016). Lo anterior sugiere que otras fuentes de nutrientes, aparte de las hojas, están siendo determinantes para sustentar el crecimiento del ovario de la flor y su transición a fruto en desarrollo, es decir, desde la preantesis hasta el cuajado. La correlación entre el almidón del ovario y el cuajado ha sido demostrada en frutales de hoja caduca (*Prunus*), que lo acumulan durante el periodo de latencia y maduración de la yema diferenciada (Rodrigo et al., 2000) La ausencia de hojas durante la floración de estas especies pone de manifiesto la importancia de las reservas de la flor. Pero en especies

perennifolias, como el aguacate y los cítricos, también se ha sugerido la importancia del almidón del ovario de la flor en el cuajado (Alcaraz et al., 2013; Mesejo et al., 2013; Molina, 2016), si bien su origen es incierto porque la flor se desarrolla durante la brotación.

1. CONTROL DEL CUAJADO. FACTORES NUTRICIONALES

1.1 CARBOHIDRATOS DE RESERVAS: ALMIDÓN

El almidón es un polímero de residuos de glucosa, y el carbohidrato de reserva más abundante en las plantas (Barceló et al., 2001). Su importancia radica en que es una fuente de abastecimiento de nutrientes para aquellos momentos o fases del cultivo en las que el consumo supera la capacidad de producción de fotoasimilados.

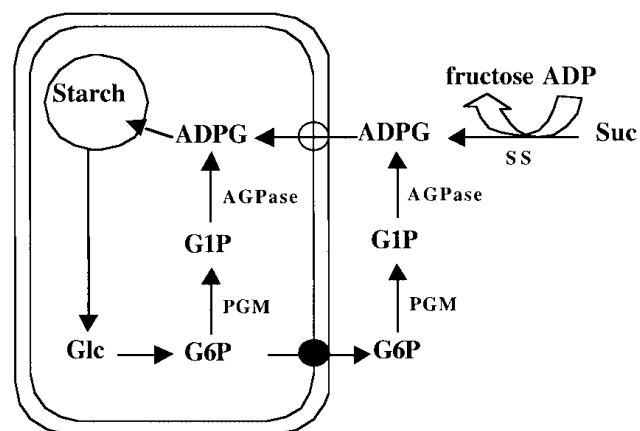
En plantas perennifolias las reservas se concentran mayoritariamente en la corteza del tallo, la raíz, parénquima medular y hojas adultas, (Guardiola et al., 1990), además en algunos órganos reproductivos (Tofino, et al., 2006).

El almidón está formado por dos tipos de polímeros de glucosa: amilosa (glucosas unidas por los carbonos 1 y 4) y amilopectina (glucosas unidas por los carbonos 1 y 6). La ADP- glucosa pirofosforilasa es la enzima más importante en la regulación de la síntesis de almidón estimulada por 3- fosfoglicerato (3-PGA) e inhibida por el fosfato inorgánico. Al incrementar la asimilación fotosintética, la concentración de 3-PGA aumenta a expensas del fosfato, de modo que la actividad de la enzima se incrementa. (Medrano et al., 2008).

El almidón es sintetizado en órganos fuente a partir de las triosas fosfato generadas en el ciclo de Calvin en los cloroplastos, más concretamente, a partir de fructosa 6-P previo paso a ADP-glucosa, catalizada por almidón sintasa (Barcelo, 2001). En el cloroplasto, el almidón se acumula durante el día para ser movilizado y exportado durante la noche (Medrano et al., 2008). También se acumula, de modo más permanente y abundante, en los tejidos parenquimáticos (Guardiola et al.,1990).

También es posible la síntesis de almidón en órganos sumidero, a partir de azúcares de transporte que llegan por vía floemática (Baroja Fernandez et al., 2003). En estructuras no fotosintéticas, el almidón también es sintetizado por acción de la enzima almidón sintasa. Normalmente, a estas estructuras llega la sacarosa que es hidrolizada por una invertasa en el apoplasto, aunque en algunos casos la sacarosa es degradada en el simplasto por acción de la sacarosa sintasa, con lo que ya se tiene glucosa activada como UDP-glucosa transformándose posteriormente a ADP-glucosa sin gasto energético (Okita, 1992; Barceló, 2001). Otros estudios han señalado que una importante reserva de sacarosa incorporada en la célula es absorbida por endocitosis antes de su posterior conversión en almidón en células heterótrofas (Baroja – Fernández et al., 2006), y, también, la existencia de un mecanismo gluconeogénico a partir del cual la sacarosa sintasa cataliza directamente la producción de ADP-glucosa para la biosíntesis de almidón (Figura 1) (Baroja- Fernandez et al., 2003).

Figura 1: Modelo esquemático de conversión sacarosa-almidón, en el que sacarosa sintetasa (SS) cataliza directamente la producción de ADP-glucosa (ADPG) para la biosíntesis de almidón en tejidos heterotróficos de plantas (Baroja – Fernández et al., 2003).



La expresión de los genes relacionados con la síntesis de almidón en las hojas adultas está influida por la presencia de frutos (Nebauer et al., 2014), porque su contenido varía en función de la cuantía de la cosecha. Así, en el naranjo dulce (*Citrus sinensis* L.) se ha observado que la concentración de carbohidratos en las hojas durante la floración en árboles con muchos frutos (*on*) disminuye en comparación con las reservas almacenadas durante el año de escasa cosecha (*off*) (Bordón et al., 2015).

1.2. CARBOHIDRATOS DE TRANSPORTE: SACAROSA

La sacarosa es un disacárido que resulta de la unión entre la fructosa y la glucosa por sus carbonos 2 y 1, respectivamente (Barceló et al., 2001), siendo la forma principal de carbohidrato de transporte en el floema (Taiz et al., 2006). Se sintetiza a partir de las triosas fosfato generadas en el ciclo de Calvin (Taiz et al., 2006), o por la degradación de almidón de asimilación (Guardiola et al., 1990), y su síntesis tiene lugar en el citosol y en multitud de órganos y tejidos, tanto fotosintéticos como no fotosintéticos (Guardiola et al., 1990). En su síntesis intervienen dos enzimas, sacarosa – fosfato sintasa (SPS) y sacarosa – fosfato fosfatasa (SPP) (Ruan, 2014), cuyo sustrato preferente es UDP Glucosa (Barceló et al., 2001). En las estructuras fotosintéticas el control de la síntesis de sacarosa se establece mediante la activación o inhibición del proceso en función de la concentración de UDP-glucosa, cuya mayor concentración estimula a la SPS, siendo el fosfato un inhibidor potente de esta enzima. Así, al iluminar las hojas, aumenta el nivel de triosas fosfato y disminuye el fosfato libre inhibiéndose la glucólisis y activándose la síntesis de sacarosa en el citoplasma (Barceló et al., 2001).

Aunque la síntesis de sacarosa se produce principalmente en hojas maduras, puede ser resintetizada en tejidos sumideros, donde la descarga de floema se produce apoplásticamente, seguida por la hidrólisis en glucosa y fructosa en el espacio extracelular. Los azúcares solubles en hojas se mantienen un nivel prácticamente constante durante todo el año (Bordón et al., 2015), su acumulación en los tejidos está asociada a procesos de síntesis muy intenso (Guardiola et al., 1990).

2. FOTOSÍNTESIS

2.1 LA FIJACIÓN DEL CO₂ Y LA ENZIMA RUBISCO

La fotosíntesis es un proceso biológico de algunos organismos que utilizan la energía solar para la síntesis de compuestos orgánicos (Taiz et al, 2006). Este proceso se puede separar en dos etapas: la conversión de la energía luminosa en formas químicas de energía (ATP, NADPH) denominada fase luminosa, y la conversión del CO₂ en carbohidratos (fijación y reducción del CO₂), proceso en el que el ATP y NADPH son utilizados como fuente de energía y poder reductor, respectivamente. En plantas superiores, ambas fases tienen lugar en las membranas tilacoidales de los cloroplastos de las hojas (De las Rivas, 2008). La asimilación fotosintética del CO₂ es el primer paso en la producción de nueva biomasa en el que se distinguen tres fases: fijación del CO₂, que tiene lugar por carboxilación de la enzima Rubisco (Ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa/oxigenasa), la reducción del carbono fijado a carbohidratos, que requiere el ATP y NADPH de la fase luminosa, y la regeneración del carbohidrato Ribulosa 1,5 bifosfato (RuBP) (Medrano et al., 2008).

La fijación de CO₂ (carboxilación) se desarrolla en 5 pasos, todos ellos catabolizados por la enzima Rubisco, que constituye alrededor del 50% de la proteína soluble de las hojas. La estructura de Rubisco en las plantas superiores consiste en ocho subunidades grandes (L) y ocho subunidades pequeñas (S). La subunidad L está codificada por un solo gen (*rbcL*) en el genoma cloroplástico, mientras que la subunidad S está codificada por una familia de genes (*RbcS*) del genoma nuclear (Medrano et al., 2008). La proteína RbcS es posteriormente transportada al cloroplasto para que se produzca la fijación del CO₂ (Berry et al., 2013). Shalom et al (2014) y Liao et al (2016) determinaron la expresión de estos genes en los cítricos. La enzima Rubisco activasa (RCA) regula la actividad de la Rubisco, y por ello es también clave en el proceso de fijación del CO₂ (Liao et al., 2015). Mientras no existan limitaciones en la disponibilidad de luz, la velocidad de fijación del CO₂ durante la fotosíntesis suele estar determinada por los siguientes factores: disponibilidad de CO₂, aporte de enzima Rubisco y su estado de activación (Medrano et al., 2008).

2.2 FOTOSÍNTESIS EN HOJAS JÓVENES Y MADURAS

La edad de la hoja y su estado de desarrollo son importantes para determinar algunos procesos fisiológicos en las plantas. En cítricos, su duración en el árbol es de 13-14 meses, y durante los dos primeros meses utilizan las reservas para desarrollarse. Posteriormente cumplen una función netamente exportadora de nutrientes (Reyes et al., 2000).

En estudios realizados en mandarino se ha observado que, 40 días después de antesis, la permanencia del fruto en el árbol, depende significativamente de la presencia de hojas jóvenes (Mehohuachi et al., 1995; Rivas et al., 2007; Molina, 2016), debido a una mayor tasa fotosintética en comparación con las hojas maduras (Pedroso et al., 2013).

Por otra parte, la tasa fotosintética en hojas de brotes con fruto es significativamente mayor que la de las hojas de brotes sin fruto (Rivas et al., 2007), es decir, que ésta varía según la demanda de los sumideros. Mediante los mecanismos de *feed-back* y *feed-forward* se ajusta la fotosíntesis necesaria a la demanda, y, de este modo, la acumulación de carbohidratos (glucosa y almidón) en la hoja limita la tasa fotosintética (Mc Cormick et al., 2009).

2.3 FOTOSÍNTESIS EN EL FRUTO

La fotosíntesis también sucede en el fruto, llegando a representar en algunas especies como el café (*Coffea arabica*) desde el 20 al 30% del total de fotosíntesis realizada por la planta (Hiratzuka et al., 2012). En frutos de mandarino Satsuma (*Citrus unshiu*), se ha observado que existe una alta densidad de estomas en la superficie del fruto joven (10-30 mm), a partir de los cuales se produce un activo intercambio de CO₂. Éste se reduce paralelamente a una deformación continua de los estomas de la corteza, que se inicia a partir de los 85-90 días después de la antesis. El 50% de los estomas del fruto se observan deformados a partir de 150 días después de la antesis, cuando el fruto se encuentra en plena fase de crecimiento lineal (Hiratzuka, 2015). A diferencia de las hojas, la tasa fotosintética del fruto de la mandarina Satsuma no siempre es

proporcional a la cantidad de clorofila (Hiratsuka et al., 2012). La falta de luz afecta negativamente el contenido y actividad de la enzima Rubisco (indicadora de la capacidad fotosintéticas) (Reyes et al., 2000), de modo que en frutos embolsados de mandarina Satsuma, se ha observado una reducción en el contenido de azúcar en la cosecha, producto de una menor asimilación de CO₂ por parte de la corteza del fruto (Hiratsuka et al., 2012).

3. TRANSPORTE DE NUTRIENTES: RELACIONES FUENTE-SUMIDERO

En las plantas, podemos definir como fuente a cualquier órgano de exportación, normalmente hojas, capaz de producir fotoasimilados en exceso, respecto a sus necesidades. Otro tipo de fuente es un órgano de reserva de los productos durante su fase de exportación. Los sumideros incluyen cualquier órgano no fotosintético de la planta, así como los órganos que no producen suficientes productos fotosintéticos como para mantener su propio crecimiento o sus necesidades de almacenamiento (Tayz et al., 2006). La capacidad potencial del órgano sumidero para utilizar los fotoasimilados provenientes de las fuentes estará determinada por su tamaño, su tasa de crecimiento y actividad hormonal, y por la capacidad fotosintética de la fuente (Venkateswarlu et al., 1987). Los fotoasimilados son transportados vía floema, mediante procesos activos o pasivos, de forma prioritaria a las zonas de rápido crecimiento (Barcelo et al., 2001).

En los cítricos, las giberelinas regulan la capacidad de crecimiento del ovario de la flor durante el cuajado (Talón et al., 1992), por lo que juegan un papel importante en las relaciones fuente-sumidero. Pero la síntesis de giberelinas en las hojas en crecimiento también influyen en la distribución de fotoasimilados, por medio del aumento de las enzimas fotosintéticas, aumentando los niveles de sacarosa, así como, induciendo la invertasa extracelular y la carga y descarga del floema, que estará influyendo en la distribución de asimilados mediante mecanismos de suministros de carbohidratos a los tejidos sumideros (Iqbal et al, 2011).

4. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

Los tejidos en división celular, como los del ovario de la flor en su transición a fruto, requieren glucosa y fructosa para 1) satisfacer la demanda energética de la respiración y 2) la síntesis de nuevas membranas (fragmoplasto y pared celular) en las nuevas células (Hartig et al., 2006). Además, el nivel intracelular de glucosa sirve de señal para mantener y/o activar los procesos de desarrollo. Por debajo de un nivel umbral, el programa de desarrollo queda inhibido (Lastdrager et al., 2014). La concentración de glucosa en el ovario puede variar por cuatro vías metabólicas: 1) hidrólisis de la sacarosa (a través de la reacción irreversible de la invertasa o a través de la sacarosa sintasa que genera fructosa y UDP-glucosa o ADP-glucosa); 2) hidrólisis de almidón; 3) fijación de CO₂ y síntesis de glucosa; 4) conversión en glucosa-6-P por la hexoquinasa para satisfacer la demanda respiratoria. En el trabajo realizado por Molina (2016) se determinó, mediante experimentos de defoliación 40 días antes de la antesis, que la presencia de hojas no es determinante en 1) el contenido en almidón y glucosa del ovario de la flor durante su transición a fruto en desarrollo (cuajado) y 2) el porcentaje de cuajado (7-15 días después de la antesis). En cambio, las hojas son el factor determinante durante la fase I del desarrollo de los frutos cuajados (30-60 días después de la antesis), regulando la intensidad de la caída fisiológica de frutos. Todo ello sugiere la siguiente **hipótesis de trabajo**:

En los cítricos, el ovario de la flor posee un grado de independencia nutricional durante el cuajado, a través de la síntesis e hidrólisis de almidón. El almidón acumulado en el ovario durante el periodo de preantesis proviene de la sacarosa generada por su propia capacidad fotosintética y de la movilización de reservas desde fuentes vecinas.

Con el fin de determinar el origen de los carbohidratos necesarios para la síntesis de almidón de la flor (síntesis de tipo autótrofa o de tipo heterótrofa) y su papel en el cuajado, se plantean los siguientes objetivos:

1. Estudiar la evolución de la presencia de amiloplastos y cloroplastos en el ovario de la flor durante su transición a fruto.
2. Determinar la capacidad de fijación de CO₂ del ovario a través de la expresión génica de la enzima Rubisco.
3. Determinar la influencia de la defoliación en preantesis sobre la disponibilidad de carbohidratos en los brotes jóvenes y ramas.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL VEGETAL

Los experimentos se realizaron en las primaveras de 2016 y 2017, en una plantación comercial de mandarina clementina (*Citrus reticulata* Blanco) cv. Marisol, bajo condiciones normales de cultivo, con riego localizado y fertirrigación, situada en Casinos (Valencia, España, 39° 42' N, 0° 42' W).

Los árboles adultos, de entre veinte y veinticinco años de edad, estaban injertados sobre patrón Citrange carrizo (*Citrus sinensis* L. Osb. X *Poncirus trifoliata* L.Raf.), podados en vaso, con un marco de plantación de 3x4 m.

2. EXPERIMENTOS

Experimento 1

En la primavera de 2016, se seleccionaron 7 árboles con similares características de condición y vigor de copa, y en cada uno de ellos se seleccionaron 3 ramas principales. Cada rama del árbol se utilizó para realizar los siguientes tratamientos: 1) eliminación de las hojas viejas del brote (DV), 2) eliminación de hojas viejas y jóvenes del brote (DVJ) y 3) tratamiento control (CT). Los tratamientos fueron ejecutados en el estado fenológico 55 de la escala BBCH (botón floral verde visible), 40 días antes de la antesis. Durante las siguientes 14 semanas, se evaluó el número de flores y frutos, y el peso del ovario, y se calculó el cuajado (evaluado por Molina, 2016). Además, se muestrearon flores y frutos para determinar el efecto de la defoliación en preantesis sobre su contenido, síntesis e hidrólisis de carbohidratos (evaluado por Molina, 2016), y se muestrearon hojas jóvenes y viejas, brotes jóvenes sin hojas, y corteza de las ramas de 1 año para determinar la disponibilidad de carbohidratos (en este TFM).

Para los estudios endógenos, hasta el momento de antesis, se muestreó el botón floral completo. A partir de este momento solo se evaluó el ovario.

Experimento 2

En la primavera de 2017, se seleccionaron 9 arboles de la misma plantación, y, en cada uno de ellos, se muestrearon 30 brotes campaneros en los que se separó el botón floral, las hojas jóvenes y las hojas viejas. El muestreo se realizó en los siguientes estados fenológicos de la escala BBCH: Botón blanco (56), botón blanco cerrado forma hueca y alargada (59), Antesis (65), caída de pétalos (67), Fruto cuajado (71), Fruto cuajado (72), que coincidieron con los momentos, 15 y 7 días preantesis, antesis, y 7, 17, y 27 días post antesis, respectivamente. Las muestras recolectadas, se congelaron con nitrógeno líquido en el campo, se transportaron al laboratorio y se mantuvieron a -80°C hasta su análisis, en el que se determinó la expresión del gen *RbcS*, que codifica la subunidad S de la enzima Rubisco, como medida indirecta de la fijación de CO_2 en el ovario de la flor, las hojas jóvenes y las hojas maduras en cada momento fenológico.



Figura 2: Estado fenológicos muestreados de izquierda a derecha; arriba: botón blanco cerrado (56), botón blanco (59), Floración (65); abajo: caída de pétalos (67) y fruto cuajado en dos estados de crecimiento (71 y 72).

3. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GENÉTICA

Los tejidos previamente mantenidos a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, se molieron hasta polvo fino en Nitrógeno líquido y se extrajo el RNA total mediante RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, USA). Las muestras de RNA fueron tratadas con RNase free Dnase Kit (Qiagen) a través de columnas de purificación según instrucciones del fabricante. La concentración y calidad de RNA fueron evaluadas en espectrofotómetro UV/VIS (NanoDrop ND-2000, Thermo Fisher, USA) mediante los ratios OD260/280 y gel de electroforesis.

La primera cadena de cDNA fue sintetizada a partir de $1\text{ }\mu\text{g}$ de RNA total con el kit QuantiTect[®] Reverse transcription Kit (Qiagen) en un volumen de $20\text{ }\mu\text{g}$. El cDNA diluido (alícuotas de $2,5\text{ }\mu\text{g}$) fue empleado como molde para la amplificación en un volumen final de reacción de $25\text{ }\mu\text{g}$, con una concentración $0,3\text{ }\mu\text{M}$ de cada oligonucleótido y $12,5\text{ }\mu\text{g}$ de la mezcla de QuantiTect[®] SYBRGreen PCR Master Mix (Qiagen). El proceso de amplificación consistió en un periodo de incubación de 15 min a 95°C , 40 ciclos de 15 s a 94°C para desnaturalización, 30 s a 60°C para anillamiento y 30 s a 72°C de extensión, durante esta fase fueron tomados los valores de intensidad de fluorescencia y transformados en valores de expresión relativa de mRNA según las curvas de calibrado realizadas previamente mediante series de dilución (1:2). El valor de expresión relativa igual a 1 fue atribuido a la muestra tomada el primer día. Se empleó un equipo Rotor Gene Q 5 –Plex (Qiagen) y los resultados fueron evaluados mediante el software RotorGene 2.0.2. Al menos tres replicas técnicas de cada muestra biológica fueron empleadas para el análisis RT-PCR. La expresión relativa del gen considerado se calculó a partir de los valores Ct (Threshold cycle values) obtenidos de cada muestra mediante el método $2^{-\text{DDCt}}$ (Livak y Schmittgen, 2001).

Los oligonucleótidos necesarios para la reacción se tomaron de Liao et al (2015) y se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Oligonucleóticos utilizados en la RT-PCR.

Gen	Secuencia
B- actin	F GTCTGGTCCATTGTCCA
	R CAATGGCCCAACTTAGC
RbcS	F CACCAACTGCCTTGAAGAAG
	R CACCCATCCTTTCTCCAAC

4. ANÁLISIS DE CARBOHIDRATOS

El análisis de carbohidratos se realizó mediante HPLC y según el protocolo de Eshghi et al (2007). Los tejidos; hojas, tallos y floema, previamente liofilizados y molidos se dosificaron en tubos de centrifuga a una medida de 0,1 g, a los que se añadió 5 ml de Petroleum ether, (40-60°) con el objetivo de desechar lípidos, clorofilas y otros contaminantes, pasando por el proceso de filtrado por 5 minutos a 4 °C y 4500 RPM para posteriormente agregar 100 µl de Fucosa, un azúcar no existente en los tejidos vegetales y que será útil como estándar interno para cuantificar las pérdidas del resto de azúcares durante el proceso de extracción y purificación. Posteriormente los tubos se pasan a calentar a baño maria por 20 minutos a una temperatura de 65°C para llevar a un segundo centrifugado por 5 minutos a 4 °C y 4500 RPM.

Posteriormente a este centrifugado se traspasa el sobrenadante a tubos de centrifugado para reducir a sequedad en Speed Vac Concentrator (Savant ®), con el sedimento que ha quedado en los tubos se realiza una re- extracción aplicando 4 ml de etanol al 80% y llevando nuevamente a centrifugado por 5 minutos a 4 °C y 4500 RPM, posteriormente unimos este sobrenadante al anteriormente extraído para terminar el proceso de reducción a sequedad en Speed Vac Concentrator (Savant ®).

Terminado el proceso de reducción de sequedad de sobrenadante se disuelven los azúcares agitando en 4 ml H₂ O desionizada y se añade 10 mg de Activated Charcoal, utilizado para purificante debido a su capacidad porosa y filtrante, se mezcla bien con la solución y se pasa por un nuevo centrifugado por 10 minutos a 4 °C y 4500 RPM,

cuyo sobrenadante se filtrará con filtro de Nylon de 0,45 μm para luego inyectar por HPLC (Thermo Fisher, USA), para la medición de los azúcares. Se utilizó una solución de acetitrilo:agua (80:20) como fase móvil a un flujo de 1 ml/min y equipado con una columna de APS-2 hypersil (250x4,6 mm), un refractómetro diferencial R150, una bomba de vacío P2000 y un sistema de procesamiento de datos Chrom Quest.

Los azúcares se cuantificaron en unidad de mg/g de peso seco, según el área obtenida y tiempos de retención.

5. ESTUDIO HISTOLÓGICO DE CLOROPLASTOS Y AMILOPLASTOS EN OVARIOS DE FLOR

Para estudiar la presencia de cloroplastos y amiloplastos se seleccionaron flores campaneras en los estados de flor cerrada, anthesis y caída de pétalos. Una vez en el laboratorio, se separó por la zona de abscisión estilo-ovario y ovario-cáliz para obtener solo el ovario de los frutos. Las muestras se fijaron en tetróxido de osmio y se enviaron al Servicio de Microscopía de la Universitat de València para su procesado y montaje en un microscopio electrónico de transmisión (TEM), según el protocolo de Lado et al., (2015). Una vez preparadas las muestras, se estudió 2 preparaciones, al azar, de cada estado fenológico en el TEM.

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

El análisis estadístico se realizó mediante análisis de la varianza, con un nivel de significancia de $P \leq 0,05$. Para la separación de medias se empleó el test de Student-Newman-Keuls de comparaciones múltiples.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

EFFECTO DE LA PRESENCIA DE HOJAS JÓVENES Y VIEJAS SOBRE EL CUAJADO Y PESO DEL FRUTO

La presencia de hojas resulta decisiva en el número de frutos que al final se recolectan, de modo que los frutos situados en brotes del año con hojas (brotes campaneros) cuajan en mayor proporción que los situados en brotes sin hojas (solitarios) (Mehouachi et al., 1995, Rivas et al 2007). La eliminación de las hojas cuando las flores están en antesis produce una reducción de los carbohidratos del ovario a los 30-40 días, durante la fase I de crecimiento del fruto, y, por ello, se caen (Mehouachi et al., 1995).

En el experimento realizado en 2016, se eliminaron las hojas jóvenes y viejas del brote al inicio de la brotación (40 días antes de la antesis), y se determinó el cuajado de las flores y los frutos de brotes campaneros y solitarios. Los tratamientos de defoliación no modificaron el porcentaje de cuajado 17 DDA en ninguna de las dos poblaciones de flores. Así, el cuajado del fruto sucedió con independencia de la presencia de hojas jóvenes y viejas (Figura 3A). Pero tres semanas más tarde (a los 40 DDA), la abscisión de frutos en desarrollo sí dependió significativamente de la presencia de hojas, particularmente las hojas jóvenes (Figura 3B) Así, el porcentaje de frutos que alcanzó la etapa de crecimiento rápido fue significativamente mayor en aquellos brotes en los que había presencia de hojas jóvenes que en aquellos en los que no las había, ya fuese por tratarse de flores solitarias o por haber sido defoliadas, lo que sugiere un papel relevante de las hojas jóvenes en el desarrollo de los frutos. La presencia de hojas viejas no supuso diferencias adicionales y significativas en el porcentaje final de frutos en desarrollo (Figura 3B), como ya mostraron anteriormente Rivas et al (2007).

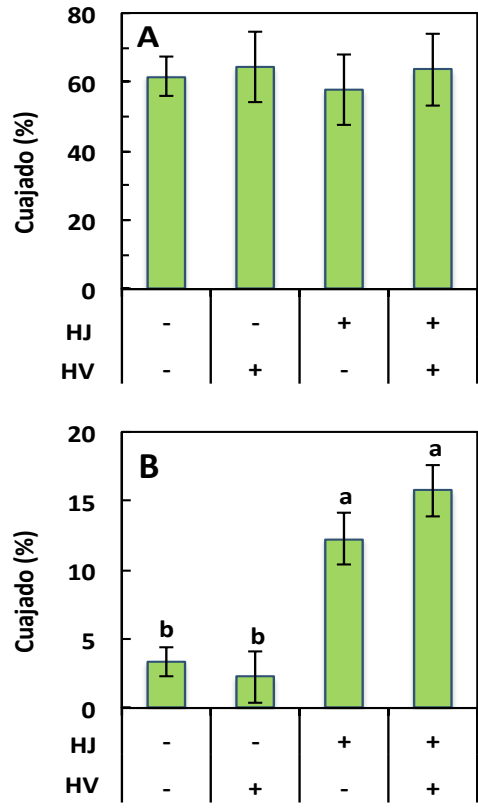


Figura 3: Influencia de la presencia y el tipo de hoja sobre el cuajado del fruto 17 DDA (A) y 40 DDA (B). HJ: Hoja joven, HV: Hoja vieja, Letras distintas indican diferencias significativas. Las barras verticales indican el Error Estándar. Cada valor es la media de 7 ramas (tomado de Molina, 2016).

Con el fin de determinar los factores endógenos responsables de esta independencia de las hojas, se estudió el desarrollo del fruto, la disponibilidad nutricional y la actividad fotosintética de los 2 tratamientos extremos; control (CT) y defoliado de hoja joven y adulta (DJV).

En relación a la evolución del peso de fruto, se puede observar un aumento progresivo de éste en ambos tratamientos (figura 4) hasta los 17 DDA, que sustentan los resultados en las tasas de cuajado (figura 3A). Durante la etapa I de crecimiento, los frutos entran en fase de crecimiento exponencial que supone un elevado gasto energético, y por lo tanto la ausencia de hojas y el gasto de reservas no permite el crecimiento del fruto (Mehouachi et al., 1995). La reducción significativa del peso del fruto provocada por la defoliación, a partir de la tercera semana después de la antesis, corrobora este efecto (Figura 4).

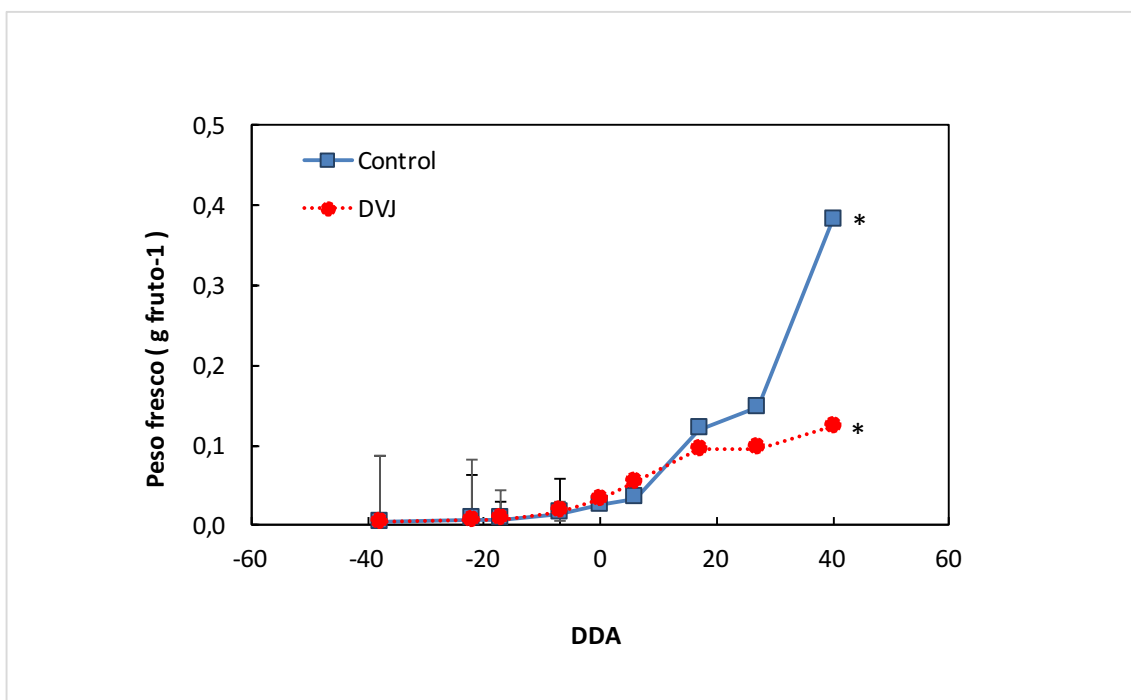


Figura 4. Efecto de la defoliación de hojas jóvenes y viejas (DJV) sobre la evolución del peso fresco de ovario- fruto (g fruto^{-1}) desde 40 días antes de antesis hasta 40 días después de antesis. CT: ramas control. Cada valor es la media de 15 frutos procedentes de 7 ramas (adaptado de Molina 2016). * muestra diferencias significativas.

El cuajado del fruto de las ramas totalmente defoliadas (DJV) se pueden explicar por los contenidos de glucosa y almidón observados en el ovario hasta el momento de antesis. Molina (2016) determinó que la defoliación no modifica el contenido en glucosa y almidón hasta la antesis, pero sí a partir de 17 DDA, que aumenta en los frutos de ramas control. Con el fin de precisar el papel del almidón en el desarrollo inicial del ovario, se estudió la presencia de amiloplastos en el exocarpo y mesocarpo de ovarios de flores cerradas (Figura 5), en antesis (Figura 6) y caída de pétalos (Figura 7).

SÍNTESIS DE ALMIDÓN EN LA FLOR DURANTE LA PREANTESIS E HIDRÓLISIS DURANTE EL CUAJADO

Durante la organogénesis floral, la flor acumula almidón en el estigma, las anteras y el ovario. El almidón del ovario se localiza en cloroplastos activos del mesocarpo externo y en amiloplastos del mesocarpo interno. Durante la transición de ovario de flor a fruto en desarrollo, tanto los cloroplastos como los amiloplastos van perdiendo progresivamente el almidón (Martínez-Alcántara et al., 2015). En los ovarios de flores cerradas, las células del mesocarpo son pequeñas, presentan paredes delgadas y aparecen en disposición compacta (Figura 5). Las células del mesocarpo presentaron mayor cantidad de amiloplastos en el citoplasma (figura 5) en las flores cerradas que en antesis (Figura 6) y caída de pétalos (Figura 7), de modo que los amiloplastos perdieron progresivamente los acúmulos de almidón y redujeron su tamaño. En los tres estados de desarrollo, se observaron cloroplastos, de mayor tamaño en la antesis y caída de pétalos.

Las células mostraron una tasa elevada de división celular (Figura 7), generando nuevas paredes celulares, pero también, debido al crecimiento celular, engrosan las paredes ya formadas (Figura 7). Los resultados sugieren que el almidón acumulado en el ovario sustenta el crecimiento inicial de la corteza del fruto, y que esa tasa de crecimiento es suficiente para permitir el cuajado. De hecho, la fase de división celular de la corteza del ovario finaliza a los pocos días de la antesis (10-15 días). Posteriormente, el crecimiento por división celular se intensifica en el endocarpo, para la formación de las vesículas de zumo (Mesejo et al., 2016).

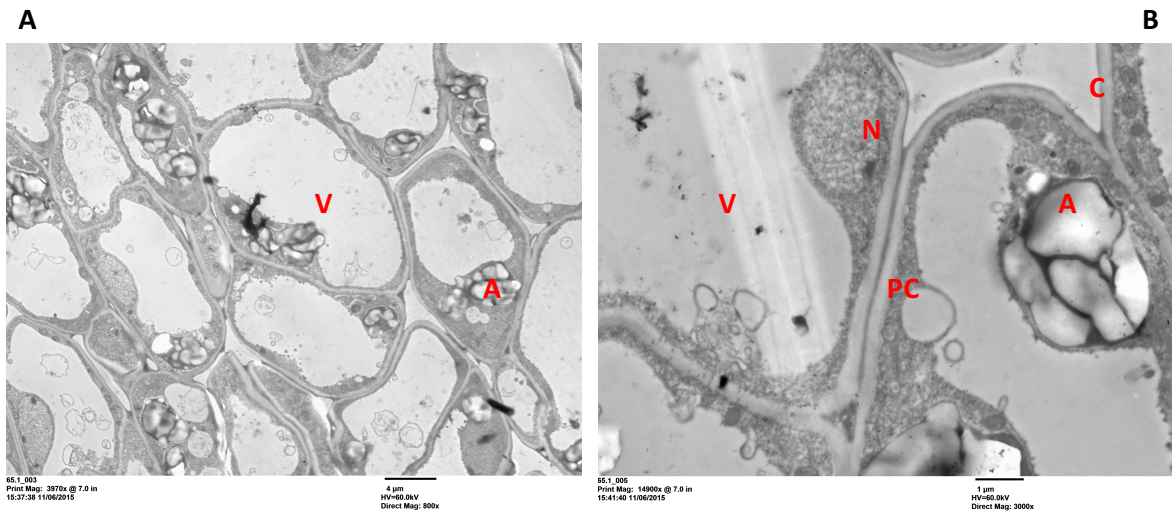


Figura 5. Presencia de almidón en amiloplastos observadas en flor cerrada. A: amiloplastos; C: cloroplastos; N: núcleo; PC: pared celular; V: Vacuola

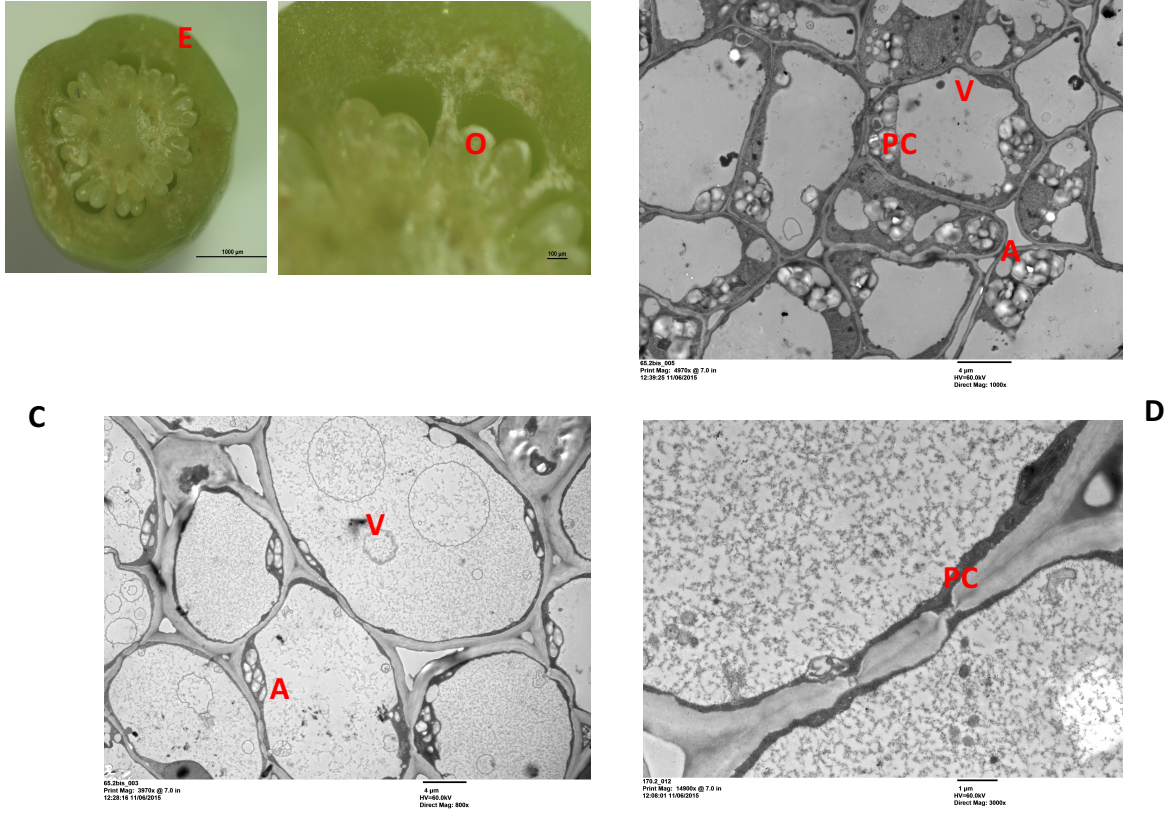


Figura 6. Almidón en amiloplastos observados en exocarpo y mesocarpo de ovarios de mandarinos al momento de antesis. A: amiloplastos; E: exocarpo; N: núcleo; PC: pared celular; V: Vacuola; O: Ovulo.

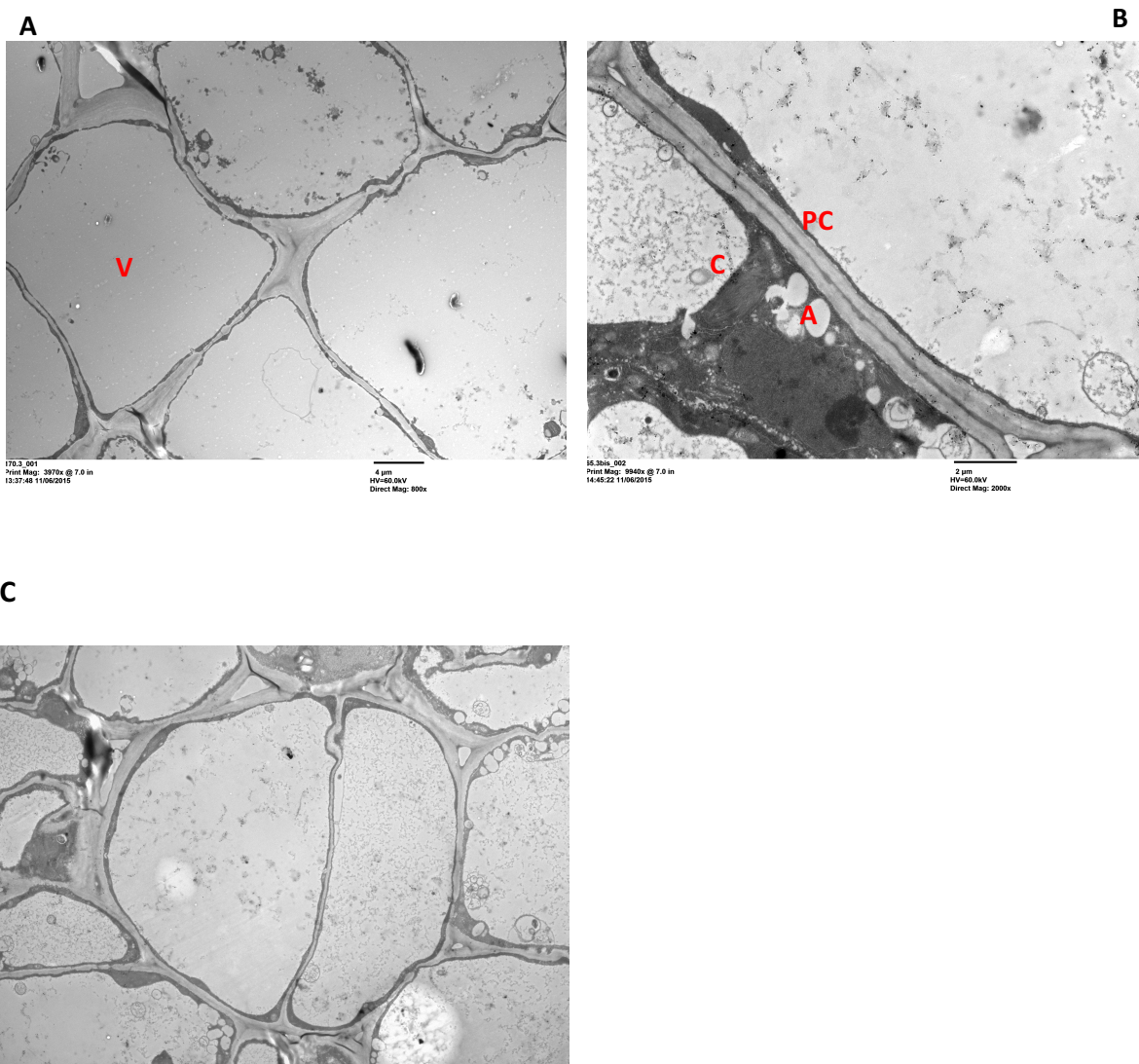


Figura 7. Almidón observado en exocarpo y mesocarpo de ovarios al momento de caída de pétalos (A y B), célula en división celular (C). A: amiloplastos; C: cloroplastos; PC: pared celular; V: Vacuola.

La defoliación de las hojas viejas y jóvenes 40 días antes de la antesis no redujo significativamente el contenido de almidón en la flor en preantesis, ni en el ovario después de la antesis, en comparación con las flores de ramas control (Molina, 2016). La síntesis de almidón en los órganos sumidero (órganos no productores de C o heterótrofos) se produce a través de una ruta metabólica diferente a la de las hojas (órganos productores de C o autótrofos). Así, Baroja-Fernández et al., (2003) sugieren que la síntesis de almidón en los órganos heterótrofos se produce a través de la síntesis de ADP-glucosa (precursor del almidón) en el citosol, a partir de la hidrólisis de la sacarosa mediante la acción de la sacarosa sintasa (SUS). Posteriormente, el ADP-glucosa es transportado al cloroplasto/amiloplasto. Por otra parte, en los órganos productores de C, la síntesis de almidón sucede a través de la vía de las triosas fosfato y la enzima ADP-glucosa pirofosforilasa (ADPGP), que sintetiza ADP-glucosa en el cloroplasto (Azcón Bieto et al., 2008). Los resultados obtenidos por Molina (2016) sugieren que la síntesis de almidón en la flor-ovario de los cítricos sucede tanto por la ruta de los órganos heterótrofos (por ser un órgano sumidero) como por la ruta de los órganos fijadores de C. Esta hipótesis se apoya en que, durante la preantesis y antesis, la expresión de *SUS3* (*vía de la síntesis heterótrofa*) y *ADPGP* (*vía de la síntesis autótrofa*) aumentó tanto en flores de ramas control como en flores de ramas defoliadas (Molina, 2016). Para confirmar la hipótesis se evaluó la evolución del contenido en carbohidratos en los órganos cercanos y la capacidad fotosintética del ovario.

DISTRIBUCIÓN DE CARBOHIDRATOS EN HOJAS, BROTES Y RAMAS

El contenido en sacarosa y hexosas de las hojas viejas en las ramas control se redujo el 35% y 30%, respectivamente, entre -20 DDA y la antesis (Figura 8A), lo que sugiere que las hojas viejas sustentan el crecimiento del brote campanero. Guardiola et al (1990) y Ruiz et al (2001) obtuvieron resultados similares. En consecuencia, aumentó el contenido en hexosas del brote de las ramas control (Figura 8D), lo que supone una buena disponibilidad de carbohidratos para las flores en desarrollo, como muestra la reducción de sacarosa en el brote joven (Figura 8E). Por el contrario, la disponibilidad

de carbohidratos se redujo significativamente en los brotes de las ramas defoliadas (Figura 8). En el tratamiento defoliado, el contenido en hexosas llegó a su punto mínimo a los 17 DDA, momento en que se incrementa significativamente la tasa de crecimiento del fruto en las ramas control, pero no en las ramas defoliadas, por el déficit de carbohidratos (Figura 4). Lo anterior resulta lógico, al no existir aporte de carbohidratos por la ausencia de hojas en el tratamiento defoliado, y la reducción de hexosas por consumo de carbohidratos necesarios para el desarrollo de la flor. No sucede así en el tratamiento control, en el que existe un aumento progresivo de hexosas y mayor contenido en sacarosa en el ovario, con diferencias significativas a los 17 días después de antesis (Molina, 2016), que procederían de las hojas jóvenes.

El nivel de sacarosa en los brotes jóvenes es mayor en el tratamiento defoliado en comparación con el control, durante todo el periodo de evaluación, reduciéndose a su punto mínimo en ambos tratamientos a los 17 DDA (figura 8E). El resultado puede interpretarse por 2 vías: 1) un menor transporte a la flor en desarrollo de ramas defoliadas durante la preantesis, cuando la tasa de crecimiento de la flor es baja y 2) un mayor consumo por parte de las hojas en crecimiento de ramas control, que podrían estar disminuyendo la concentración relativa de sacarosa en relación a tratamiento defoliado. En resultados preliminares, se ha observado que la invertasa ácida de la pared celular, que hidroliza en el apoplasto la sacarosa que llega vía floema, aumenta en las flores/frutos de ramas defoliadas (Molina, 2016), lo que sugiere que el ovario en crecimiento a partir de la antesis es capaz de movilizar las reservas próximas. Ello se constata al evaluar el contenido en carbohidratos en la corteza (floema) de las ramas 27 DDA (Figura 9).

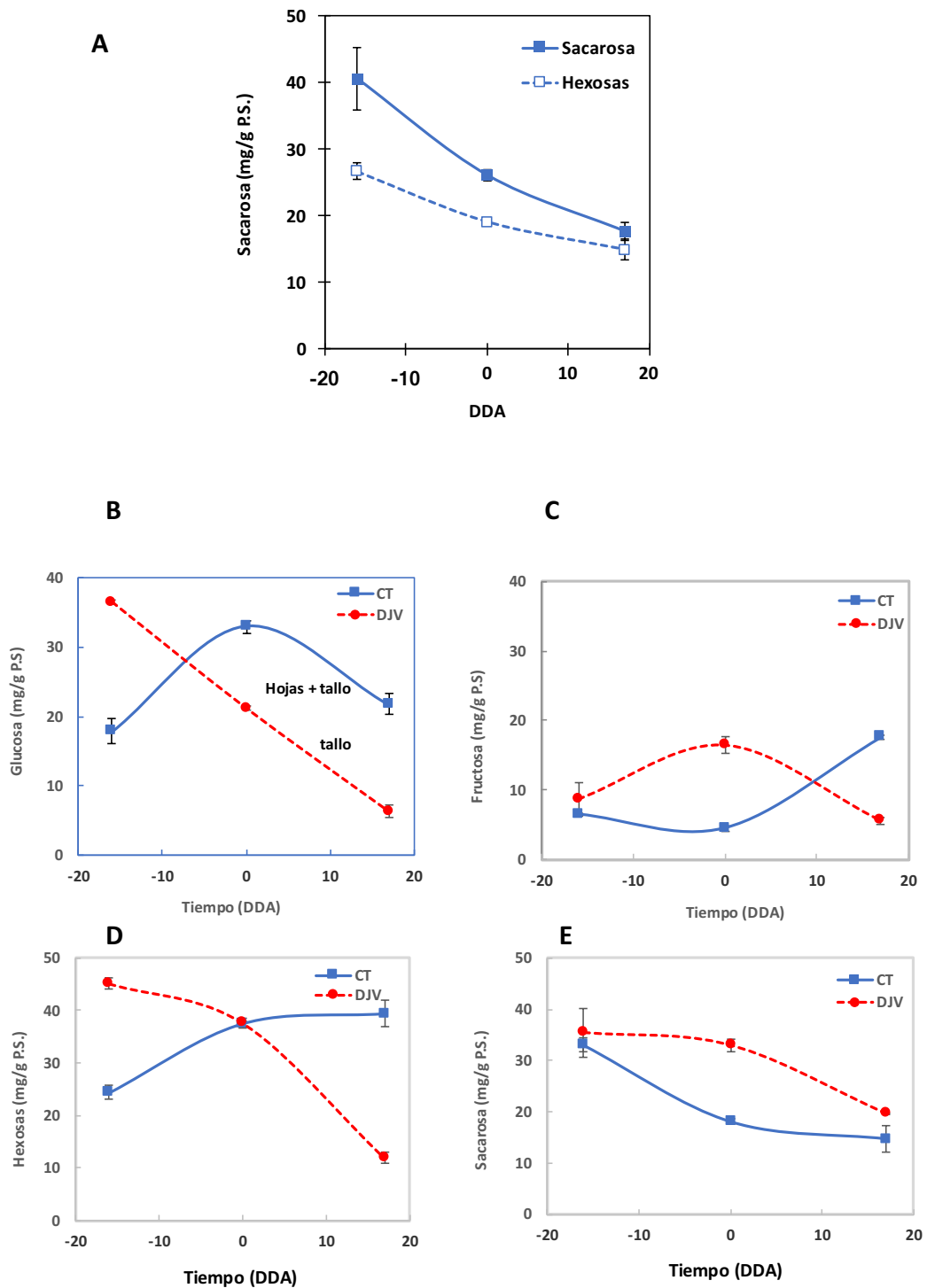


Figura 8. Evolución del contenido en carbohidratos en las hojas viejas de las ramas control (A), y (B) los brotes jóvenes de las ramas control (CT) y defoliadas (DJV).

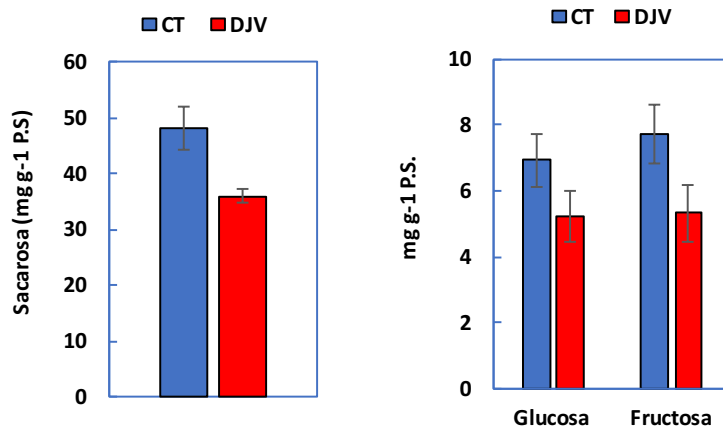


Figura 9. Contenido de Sacarosa, glucosa y fructosa en tejido floemático de las ramas en tratamiento control (CT) y defoliado(DJV) a los 27 DDA. Las barras verticales indican el error estándar.

FIJACIÓN DE CO₂ POR LA FLOR Y EL FRUTO

La expresión del gen *RbcS* (subunidad S de la enzima Rubisco) en el ovario de la flor de ramas control aumentó, en las muestras de las 2 primaveras (2016 y 2017), en el momento de la antesis (Figura 10), lo que sugiere que la fuente principal de sacarosa durante la preantesis para la síntesis de almidón serían las hojas. El aumento de expresión del gen *RbcS* en la flor de ramas defoliadas 22 días antes de la antesis (Figura 10) apoyaría esta hipótesis.

Las hojas tienen, como era de esperar, una mayor expresión del gen *RbcS* que los ovarios, siendo, a su vez, mayor en las hojas jóvenes que en las hojas maduras, confirmándose la mayor eficiencia fotosintética de las primeras (Pedroso et al, 2013). En el experimento de este TFM, no se ha podido registrar el aumento de la tasa fotosintética característico de las hojas jóvenes de ramas control cuando llegan a su estado adulto (post antesis) (Figura 10). Pero Rivas et al (2007) observaron que las hojas jóvenes incrementan la eficiencia fotosintética del fotosistema II entre 7 y 30

días después de la antesis. Todo ello sugiere que el incremento de la expresión del gen *RbcS* en el ovario de flores control es constitutivo, sin un papel relevante en el cuajado, por la presencia de pequeños cloroplastos en el ovario y la entrada de luz cuando abren los pétalos. Pero en condiciones de déficit de carbohidratos, ramas defoliadas, el ovario (y otros tejidos verdes de la flor) incrementaron en la medida de lo posible su tasa fotosintética (Figura 10) para suplir el déficit de carbohidratos. Mientras la tasa de crecimiento de la flor es baja (preantesis), la activación de la fotosíntesis en sus tejidos verdes podría ayudar a sustentar su desarrollo, generando carbono y acumulando almidón para el posterior cuajado del ovario (Figura 3). Pero cuando la tasa de crecimiento del ovario es muy elevada (Post antesis) (Figura 4), la ausencia de hojas impide su crecimiento y el fruto cae (Figura 3).

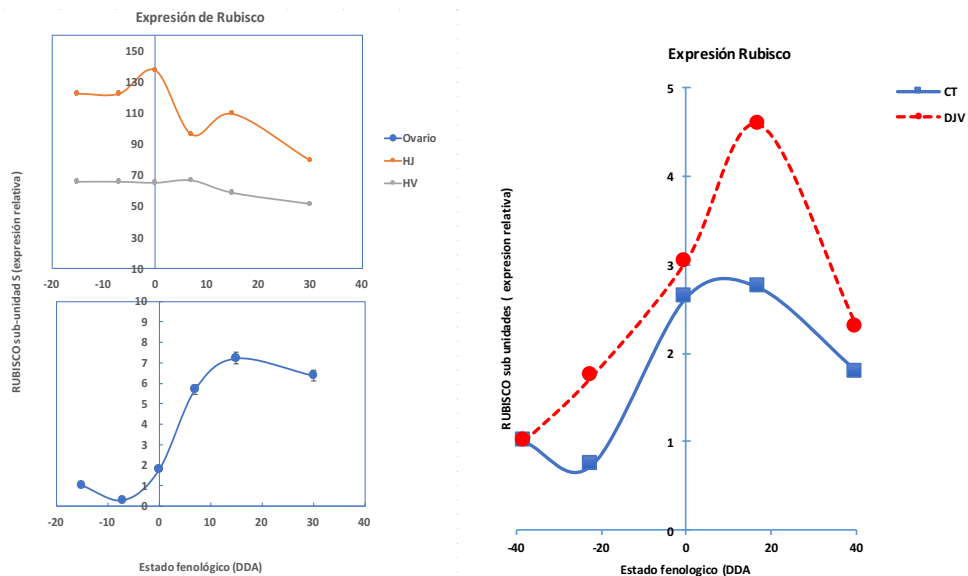


Figura 10. Expresión relativa del gen *RbcS* (Rubisco Sub-unidad S), en el ovario, hojas jóvenes y hojas maduras durante las primaveras 2017 (izquierda) y 2016 (derecha). Los valores son el promedio de 3 réplicas técnicas. El error estándar es menor que el símbolo.

IV. CONCLUSIONES

- El ovario de los cítricos acumula almidón en amiloplastos situados en el exocarpo y mesocarpo, que sustenta el desarrollo inicial de la corteza confiriéndole la tasa de crecimiento suficiente para el cuajado.
- El ovario muestra la capacidad de fijar CO₂, de modo constitutivo, durante las primeras semanas después de la antesis. En condiciones de deficiencia de carbohidratos por ausencia de hojas, los tejidos de la flor incrementan dicha capacidad fotosintética para suplir la deficiencia nutricional.
- La fuente principal de sacarosa para la síntesis de dicho almidón durante la preantesis son las hojas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Agustí, M. (2003). *Citricultura*. 156, Ed. Mundi Prensa, Madrid.
2. Agustí, M. (2010). *Fruticultura*. 137, Ed. Mundi Prensa, Madrid.
3. Alcaraz ML, Hormaza JI, Rodrigo J (2013) Pistil Starch reserves at anthesis Correlate with Final Flower Fate in Avocado (*Persea americana*) PLoS ONE 8 (10): e78467. Doi: 10.1371/journal.pone.0078467. Ive De Smet, university of Nottingham, United Kingdom.
4. Barceló, J., Nicolás., Sabater, B., Sánchez. (2001). Fisiología vegetal. Pp 208-213 *Ed Piramide*, Madrid.
5. Baroja-Fernández, E., Muñoz, F.J., Saikusa, T., Rodríguez-López, M., Akazawa, T. y Pozueta-Romero, J. (2003). Sucrose Synthase Catalyzes the de novo Production of ADPglucose Linked to Starch Biosynthesis in Heterotrophic Tissues of Plants. *Plant Cell Physiol*. 44: 500–509.
6. Baroja-Fernández, E., Etxeberria., Muñoz,F., Moran- Zorzano, M.T., Alonso – Casajús, N.A., Gonzalez.P y Pozueta- Romero.J.(2006). An important Pool of Sucrose Linked to Starch Biosynthesis is Taken up by Endocytosis in Heterotrophic Cells. *Plant Cell Physiol*. 44, 500–509.
7. Berry, J.O., Yerramsetty, P., Zielinski, A.M., Mure, C.M. (2013). Photosynthetic gene expression in higher plants. *Photosynth Res* 117: 91-120.
8. Bordon,Y.(2015): Influencia de la presencia del fruto y relación con la floración, Universidad Politécnica de Valencia.
9. Bordon, Y., Molina, R., Nebauer,S.(2015): Variación anual de la fotosíntesis y del contenido en carbohidratos en la variedad alternante Salustiana de naranjo dulce (*citrus cinensis*). Influencia de la presencia del fruto y su relación con la floración. Universidad Politécnica de Valencia.
10. De Las Rivas, J. (2008). La luz y el aparato fotosintético. En: J. Azcón-Bieto y M. Talón (Eds.), *Fundamentos de fisiología vegetal (2a ed)*. McGraw-Hill y Ed. UB., Madrid., pp 167, 187.
11. Eshghi,S.,Tafazoli,E.,Dokhani,S.,Rahemi,M.yEmam,Y.(2007).Changes in carbohydrate contents in shoot tips, leaves and roots of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) during flower-bud differentiation. *Sci. Hortic*. 113: 255-260.

12. Guardiola, J.L., y García Luis, A. (1990). *Fisiología vegetal I: nutrición y transporte*. Pp 125,126,351, Ed. Síntesis, Madrid.
13. Hartig, K and Beck, E. (2006). Crosstalk between Auxin, Cytokinins, and Sugars in the Plant Cell Cycle. *Plant Biol.* 8: 389–396.
14. Hiratzuka, S., Yokoyama, Y., Nishimura, H., Miyazaki, T. And Nada,K. (2012); Fruit Photosynthesis and Phosphoenolpyruvate Carboxylase Activity as affected by Lightproof Fruit Bagging in Satsuma Mandarin. *J.Amer.Soc. Hort. Sci.*137(4):215-220.
15. Hiratzuka, S., Suzuki, M., Nishimura,H., Nada, K. (2015);Fruit photosynthesis in Stasuma mandarin. *J.Amer.Soc. Hort. Sci.*241:65-69.
16. Iqbal, N., Nazar, R., Khan,M.I.R., Masood,A and Khan.(2011).Role of gibberellins in regulation of source – sink relation under optimal and limiting environmental conditions. *Current Science* 7: 998-1007.
17. Lastdrager, J., Hanson, J. y Smeekens, S. (2014). Sugar signals and the control of plant growth and development. *J. Exp. Bot.* (65) 3: 799–807.
18. Liao, L., Cao, S.Y., Rong. Y and Wang, Z.H. (2015); Effects of grafting on key photosynthetic enzymes and gene expression in the citrus cultivar Huangguogan. *Genet . Mol.Res.*15(1): gmr.15017690.
19. Livak,K.J.ySchmittgen,T.D.(2001).Analysis ofrelative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^[-Delta Delta C(T)] Method. *Methods* 25, 402–408.
20. Martínez-Alcántara,B.,Tadeo,F.R.,Mesejo,C.,Martínez-Cuenca,M.R.,Ruiz-Valdés, M., Reig, C. y Forner, M.Á. (2015). Anatomía de los Cítricos. Autoeditado. Impresión: Gráficas Agulló, S.L., Cocentaina, Spain.
21. Mc Cormick, A.J., Watt, A. D and Cramer, M. D (2009). Supply and demand: sink regulation of sugar accumulation in sugarcane. *Journal of experimental Botany*, 60, 2 :357-364.
22. Medrano, H., Galmés, J. y Flexas, J. (2008). Fijación del dióxido de carbono y biosíntesis de fotoasimilados. En: J. Azcón-Bieto y M. Talón (Eds.), *Fundamentos de fisiología vegetal (2a ed)*. McGraw-Hill y Ed. UB., Madrid., pp 213, 216, 218-219, 221, 223-224.

23. Mehouchi, J., Serna, D., Zaragoza, S., Agustí, M., Talon, M. y Primo-Millo, E. (1995). Defoliation increases fruit abscission and reduces carbohydrate levels in developing fruits and woody tissues of Citrus unshiu. *Plant Sci.* 107: 189-197.
24. Mesejo, C., Yuste, R., Martínez-Fuentes, A., Reig, C., Iglesias, D.J., Primo-Millo, E. y Agustí, M. (2013). Self-pollination and parthenocarpic ability in developing ovaries of self-incompatible Clementine mandarins (*Citrus clementina*). *Physiologia Plantarum* 148: 87–96.
25. Mesejo, C., Yuste, R., Reig, C., Martínez-Fuentes, A., Iglesias, D., Muñoz-Fambuena, N., Bermejo, A., Germanà, M.A., Primo-Millo, E. y Agustí, M. (2016). Gibberellin reactivates and maintains ovary-wall cell division causing fruit set in parthenocarpic Citrus species. *Plant Sci.* 247, 13–24.
26. Molina, L. (2016): Metabolismo de los carbohidratos durante el desarrollo floral en los cítricos. Influencia en el cuajado, Universidad Politécnica de Valencia.
27. Okita, T.W. (1992). Is there an alternative pathway for starch synthesis. *Plant physiol.* 100: 560-564.
28. Pedroso, Fernanda K.J.V., Prudente, Danielle A, Bueno, Ana Carolina R., Machado, Eduardo C. Machado., Ribeiro, Rafael V. (2013); Drought tolerance in citrus trees is enhanced by rootstock-dependent changes in root growth and carbohydrate availability. *Environmental and Experimental Botany* 101: 26-35.
29. Reyes, M.I., Villegas, A., Colinas, M.T., Calderón, G. (2000). Peso específico, contenido de proteína y de clorofila en hojas de naranjo y tangerino. *Agrociencia* . 34: 49-55.
30. Rivas, F., Gravina, A., Agustí, M. (2007) Girdling effects on fruit set and quantum yield efficiency of PSII in two Citrus cultivars, *Tree Physiology*. 27: 527–535.
31. Rodrigo, J., Hormaza, J. I. And Herrero, M. (2000). Ovary starch reserves and flower development in apricot (*Prunus armeniaca*). *Physiologia Plantarum*, 108,1: 35-41.
32. Ruan, Y. (2014). Sucrose Metabolism: Gateway to Diverse Carbon Use and Sugar Signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* 65: 33-67.
33. Ruiz, R., García-Luis, A., Monerri, C., Guardiola, J.L (2001) Carbohydrate Availability in Relation to Fruitlet Abscission in Citrus, *Annals of Botany*. 87: 805–812.

34. Shalom,L., Samuels,S., Zur, N., Shlizerman,L., Doron-Faigenboim,A., Blumwald,E and Sadka,A. (2014). Fruit load induces changes in global gene expression and in abscisic acid (ABA) and indole acetic acid (IAA) homeostasis in citrus buds. *Journal of Experimental Botany*. Doi: 10.1093/jxb/eru 148.
35. Taiz,L., y Zeiguer, E.(2006).*Fisiología vegetal Vol 1 (3^{era} ed)*. Ed. Publicacions de la Universitat Jaume I, Castello de la plana. pp 301,205.
36. Talon,M., Zacarias, L.,andPrimo–Millo,E.(1992).Gibberellins and Parthenocarpic Ability in Developing Ovaries of Seedless Mandarins. *Plant Physiol*. 99:1575-1581.
37. Tofino, A., Fregene,M., Ceballos, H., Cabal, D. (2006): Regulación de la biosíntesis de almidón en plantas terrestres: perspectivas de modificación. artículo de revisión derivado del seminario II, doctorado en ciencias agrarias, énfasis en fisiología vegetal, Universidad nacional de Colombia- Bogotá.
38. Venkateswarlu, B and Visperas, R.M. (1987). Source- Sink relation ships in crop plants . Irri research paper series.125.