

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALENCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE
INGENIERÍA AGRONÓMICA Y DEL MEDIO
NATURAL



**Relación entre la síntesis de giberelinas y la
activación de la división celular en el ovario de
la flor del mandarino 'Clemenules' durante la
fase de cuajado.**

TRABAJO FIN DE MÁSTER

MÁSTER UNIVERSITARIO EN INGENIERÍA AGRONÓMICA

Alumna: Dña. María Navarro Consuelo

Tutor: Prof. D. Carlos Mesejo Conejos

Cotutor: Prof. D. Manuel Agustí Fonfria

Curso Académico: 2017-2018

VALENCIA, Enero de 2018.

Relación entre la síntesis de giberelinas y la activación de la división celular en el ovario de la flor del mandarino 'Clemenules' durante la fase de cuajado.

RESUMEN

La partenocarpia se produce cuando un ovario se desarrolla sin la fecundación de sus óvulos y, por tanto, sin sus semillas. Este fenómeno es común en muchas especies y variedades de cítricos.

En las variedades sin semillas la transición de flor a fruto en desarrollo depende de la capacidad partenocárpica, y ésta, a su vez, de la síntesis de giberelinas (GAs) en la pared del ovario. En variedades con baja capacidad partenocárpica, como la variedad 'Clemenules', la concentración de GAs en el ovario y su tasa de crecimiento, determinada por la división celular en los tejidos del pericarpo, es muy reducida durante la antesis floral y hasta la caída de pétalos. Por ello, la transición de flor a fruto en desarrollo es deficiente. La aplicación exógena de ácido giberélico (GA_3) en ese momento estimula el desarrollo inicial del ovario, aumentando el porcentaje de frutos cuajados, y, por tanto, mejorando la cosecha final.

Se desconoce si el cuajado deficiente se debe a una incapacidad para activar la división celular y con ello la síntesis endógena de giberelinas que mantendría la tasa mitótica necesaria para el cuajado o si, por el contrario, el bloqueo de la síntesis endógena de giberelinas impide la reactivación de la división celular.

Por ello, el objetivo de este TFM es determinar la relación causa-efecto entre síntesis endógena de GAs y división celular en la variedad 'Clemenules'. Se estudió el efecto de la aplicación de GA_3 , PBZ y GA_3 +PBZ sobre el desarrollo del ovario, el cuajado, la división celular y el metabolismo de las GAs. Para cuantificar la división celular se estudió la expresión de los genes que intervienen en el ciclo celular y su relación con la tasa de división celular en el pericarpo, determinada mediante histología. Por su parte, la síntesis de GAs se determinó mediante el estudio de expresión génica de las enzimas *GA20ox*, *GA3ox* y *GA2ox* relacionadas con la síntesis y catabolismo de las GAs.

Los resultados indican que la aplicación exógena de GA_3 presenta efecto sobre la división celular independientemente de la síntesis endógena de GAs.

Sin embargo, ese efecto se pospone varias semanas debido, probablemente, a la incapacidad del ovario para activar el ciclo celular hasta que no alcanza un estado fenológico determinado.

Palabras clave: Citrus, división celular, giberelinas, cuajado, partenocarpia CDKA, CDKB y CDKD.

Alumna: Dña. María Navarro Consuelo.

Valencia, Enero de 2018.

Tutor: Prof. D. Carlos Mesejo Conejos

Cotutor: Prof. D. Manuel Agustí Fonfria

Gibberellin - cell division relationship during Clemenules mandarin fruit set

ABSTRACT:

Parthenocarpy occurs when an ovary develops without fertilization of their ovules and therefore without seeds. This phenomenon is common in many citrus species and varieties.

In seedless varieties, the transition from flower to fruit in development depends on the parthenocarpic ability, and this, in turn of the synthesis of gibberellins (GAs) in the ovary walls. In low-parthenocarpic ability varieties, such as the Clementine mandarin 'Clemenules', the GA concentration in the ovary and their growth rate, its determined by cell division in the pericarp tissues and it is reduced during anthesis and until the fall of petals.

Therefore, the transition of flower to developing fruit is deficient. The exogenous application of GA₃ at that time, stimulate the onset development of ovary, increasing the percentage fruits set and, thus, improving the final harvest.

It is unknown whether the poor fruit set is due to an inability to activate cell division and thus, the endogenous synthesis of gibberellins would maintain the mitotic rate necessary for fruit set or, on the contrary, the blocking of endogenous synthesis gibberellins prevent the reactivation of ovary cell division.

Therefore, the objective of this TFM is to determine the cause-effect between relationship of endogenous synthesis of GAs and ovary cell division in the 'Clemenules' variety. In this work was studied the effect of the application of GA₃, PBZ and GA₃ + PBZ on the development of ovary, fruit set, cell division and metabolism of GAs.

Cell division will be quantified by studying the genetic expression of genes involved in the cell cycle and their relationship with rate of cell division in pericarp determined by histology. On the other hand, the synthesis of GAs was determined through the study of gene expression of *GA20ox*, *GA3ox* y *GA2ox* enzymes, which are related to the synthesis and catabolism of GAs. .

Results indicate that exogenous application of GA₃ affects cell division independently of the endogenous synthesis of GAs. However, this effect is observed after several weeks, probably due to the inability of ovary to activate the cell cycle until it reaches a certain phenological stage.

Keywords: Citrus, cell division, gibberellins, fruit set, parthenocarpy,, CDKA, CDKB, CDKD.

Student: Ms. María Navarro Consuelo.

Valencia, January 2018.

Tutor: Teacher Mr. Carlos Mesejo Conejos.

Cotutor: Teacher Mr. Manuel Agustí Fonfria.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradecerle a Carlos mi tutor, por transmitirme desde el inicio del Grado su pasión por la Citricultura, por enseñarme la metodología adecuada para enfrentarme a resolver importantes problemas de las Agronomía. Por transmitirme su entusiasmo y dedicación para que todo saliese a la perfección. Por toda la confianza que depositaste en mí siempre, mi más sincero agradecimiento.

Por todo lo que he aprendido de él, su capacidad de transmitir al alumno su mayor devoción, la Fruticultura, y haberme ayudado siempre que lo he necesitado, a ti Manuel Agustí.

A Amparo por todo el ánimo que me has regalado durante mi instancia en el IAM.

A todos los miembros y amigos del IAM (Torris Agrosience) que me llevo para siempre, y en especial a ti Natalia, por cuidarme y ayudarme en todo lo que he necesitado.

A todos mis compañeros de Agrónomos, no hubiera sido lo mismo sin vosotros.

Y a mi mayor apoyo incondicional durante este tramo, a mis PIÑAS. Por todos y cada uno de sus consejos y motivaciones constantes para que viera el lado positivo siempre de las cosas.

En especial a mi familia, Mamá, Papá ,gracias de corazón por la paciencia que habéis demostrado y los continuos ánimos.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. CUAJADO DE LOS CÍTRICOS.....	2
1.2. ORIGEN GENÉTICO DE LA PARTENOCARPIA.....	3
1.3. CONTROL HORMONAL DE LA PARTENOCARPIA.....	4
1.4. DIVISIÓN CELULAR.....	6
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	9
3. MATERIAL Y MÉTODOS	10
3.1. MATERIAL VEGETAL.....	10
3.2. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	10
3.3. TÉCNICAS EMPLEADAS.....	11
3.3.1. <i>Diámetro y peso del fruto</i>	11
3.3.2. <i>Microscopía</i>	11
3.3.3. <i>Análisis expresión genética mediante RT-PCR</i>	12
3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	16
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
4.1. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE EL DESARROLLO DEL OVARIO Y EL CUAJADO.....	17
4.2. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE LA DIVISIÓN CELULAR EN EL OVARIO.....	21
4.3. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES DE LA SÍNTESIS DE GAS Y EL CICLO CELULAR.....	24
4.3.1. <i>GAs</i>	24
4.3.2. <i>Caracterización de secuencias homólogas de proteínas CYC y CDK en el genoma de Citrus clementina</i>	26
4.3.3. <i>Evolución de la expresión de los genes CYCA, CDKA, CDKB y CDKD</i>	27
5. CONCLUSIONES	31
6. BIBLIOGRAFIA	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Control del cuajado en la mandarina ‘Clemenules’. Evolución del peso (A), la tasa diaria de abscisión (B), porcentaje de frutos cuajados (C) y cuajado final (D), en el experimento realizado en 2016; Evolución del peso (E) y porcentaje final de frutos cuajados (F) en el experimento realizado en 2017. Los tratamientos se realizaron en antesis (2016) o 7 días después (caída de pétalos, 2017) con GA₃ (5 mg l⁻¹) y PBZ (1000 mg l⁻¹). Cada valor de cuajado y abscisión es la media de 4 ramas por árbol y 6 árboles por tratamiento. Las barras verticales indican el error estándar. Cada valor de peso del ovario es la media de 10 frutos tomados de 3 árboles por tratamiento. La barra vertical azul indica el LSD (P<0,05) y las letras diferentes indican diferencias significativas (P<0,05). 19

Figura 2: Control del desarrollo del ovario de mandarina ‘Clemenules’ al inicio de la fructificación. Los tratamientos se realizaron cuando las flores habían perdido los pétalos con AG (5 mg l⁻¹) y PBZ (1000 mg l⁻¹). Evolución de la anchura del pericarpo (A), la anchura del mesocarpo (B), la anchura del exocarpo (C), el número de filas en el mesocarpo (D), el área media celular del mesocarpo (E) y la anchura de los septos (F) en el experimento realizado en 2017. Cada valor es la media de 3 ovarios. La barra azul indica el valor de LSD (P<0,05) y las barras verticales indican el error estándar. 23

Figura 3: Evolución de la expresión relativa de los genes *GA20ox2*, *GA3ox1*, *GA2ox2* y *GA2ox3* en ovarios de mandarina Clementina cv. ‘Clemenules’. Los tratamientos se realizaron cuando las flores habían perdido los pétalos con AG (5 mg l⁻¹) y PBZ (1000 mg). Cada valor es la media de 3 réplicas técnicas, realizadas a partir de una muestra homogénea de 10 frutos por tratamiento en cada fecha. Las barras verticales muestran los errores estándar. 25

Figura 4: Árbol filogenético de los genes CDK A, CDKB y CDKD del genoma de *C. clementina*. Toda la información detallada de las secuencias se muestra en Anejo I. En este árbol se resaltan las tres secuencias escogidas (ESTs), Ciclev10008533m (*CcCDKD*), Ciclev10012320m (*CcCDKA*) y Ciclev10012202m (*CcCDKD*) y su relación con los genes homólogos en *A. thaliana* y *M. domestica*. 27

Figura 5: Correlación entre la expresión de las secuencias CYC y CDK analizadas con el número de filas de células en el mesocarpo. Los modelos ajustados para CYCA y CDKD son estadísticamente significativos con un valor de P de 0.01, 0.02, y un coeficiente de correlación r de 0.65 y 0.60, respectivamente. Los modelos ajustados para *CDKB* y *CDKA* no son estadísticamente significativos (P (*CDKB*) = 0.11; r (*CDKB*) = -0,43; P (*CDKA*) = 0.40; r (*CDKA*) = -0.24). Las tablas del ANOVA se muestran en el anejo I. 29

Figura 6: A) Esquema del ciclo celular (Adaptado de Scofield et al., 2014). (B-E): Efecto de la aplicación de GA3, GA3+PBZ y PBZ sobre la expresión de los genes CYCA1;1 , CDKA, CDKB y CDKD en ovarios de mandarina Clementina cv. 'Clemenules'. Los tratamientos se se realizaron cuando las flores habían perdido los pétalos con AG (5 mg l⁻¹) y PBZ (1000 mg). Cada valor es la media de 3 réplicas técnicas, realizadas a partir de una muestra homogénea de 10 frutos por tratamiento en cada fecha. Las barras verticales muestran los errores estándar.30

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla1. Listado de oligonucleótidos usados en PCR.	
Tabla 1. Listado de oligonucleótidos usados en PCR.....	14

1. INTRODUCCIÓN

Los cítricos son el principal cultivo frutal en expansión en el mundo. En 2016, la producción total de naranjas, mandarinas, limones y pomelos fue de 26397.1 miles de toneladas (FAO, 2018). Los objetivos de producción y calidad varían en función del destino final de la fruta y de la situación de la citricultura en cada país. La citricultura española, y en particular la valenciana, tiene una fuerte vocación exportadora, fundamentalmente de productos destinados al consumo en fresco y con unos elevados estándares de calidad (IVIA, 2017). Actualmente en España, se cultivan en torno a 35 variedades con cierta importancia comercial, de las cuales destacan las naranjas 'Navelina', 'Laneelate' y 'Valencia Late', y las mandarinas 'Clemenules', 'Nova' y 'Nadorcott', entre otras. Las clementinas han sido, y todavía siguen siendo, el cultivo más representativo de la citricultura Valenciana debido a su elevada calidad. Las variedades de clementina más importantes son 'Marisol', 'Fina', 'Clemenules' y 'Hernandina'. Las clementinas son autoincompatibles por lo que en áreas en las que se cultivan aisladas, los frutos obtenidos no tienen semilla, son partenocárpicas.

No obstante, la necesidad de responder a la demanda de mandarinas tardías de los mercados internacionales hizo que, en el caso de la citricultura española, se introdujeran los mandarinos híbridos. Éstos también son autoincompatibles, pero resultan compatibles entre ellos y con las clementinas, por lo que si se produce la polinización cruzada entre grupos compatibles se producen abundantes frutos, pero con semillas y, por ello, con menor calidad comercial. Actualmente, la citricultura en España se basa en el cultivo de variedades partenocárpicas, pues son muy apreciadas comercialmente para el consumo en fresco.

Sin embargo, no todas las variedades de cítricos sin semillas poseen la misma capacidad de cuajado partenocárpico (Talón *et al.*, 1992). La aplicación de ácido giberélico (GA_3) resuelve el problema en algunas variedades del grupo Clementinas, pero no en otras variedades. El estudio de los factores endógenos que promueve el tratamiento con GA_3 resulta de elevado interés para comprender su mecanismo de acción y las razones del escaso cuajado partenocárpico de las mandarinas. Por ello, se va a estudiar el efecto de la aplicación de GA_3 sobre los factores endógenos que promueven el cuajado de la mandarina Clementina cv. 'Clemenules', de baja capacidad partenocárpica.

1.1. CUAJADO DE LOS CÍTRICOS.

Se denomina cuajado al proceso que determina la transición del ovario de la flor a fruto en desarrollo. Durante la antesis floral, el crecimiento del ovario se detiene temporalmente, y tras la reactivación de la división celular en sus tejidos, el ovario se convierte en fruto en desarrollo. Este proceso está regulado por factores exógenos y endógenos (nutricionales y hormonales).

En los cítricos, el cuajado se puede producir de modo sexual, a través de la fecundación, o de un modo asexual, a través de la partenocarpia. En el cuajado sexual, el desarrollo del fruto depende de la polinización. El grano de polen es transportado hasta el estigma, donde germina, emite el tubo polínico que desciende por el estilo, penetra en el ovario y llega hasta el óvulo al que finalmente fecunda. En las variedades con semillas, el estímulo que controla el inicio del desarrollo del fruto es la síntesis de giberelinas (GAs) que tiene lugar en los óvulos recién fecundados (Ben-Cheikh *et al.*, 1997; Bermejo *et al.*, 2016). Cuando el polen proviene de la misma planta o de otra idéntica genéticamente se llama autopolinización. La polinización cruzada tiene lugar cuando la fecundación ocurre entre el polen y los óvulos de plantas genéticamente diferentes (Schneider, 1968).

El cuajado asexual o partenocárpico es común en muchas especies y variedades de cítricos. Este fenómeno conocido como partenocarpia, ocurre cuando el ovario es capaz de desarrollarse sin la fecundación de sus óvulos y, por tanto, sin sus semillas. La principal causa alternativa a la fecundación es la esterilidad de origen genético, gamética (e.g. mandarina Satsuma o naranja navel), homocigótica (e.g. mandarina Clementina) o citológica (e.g. triploides). Las variedades partenocárpicas, al no poseer semillas, son muy apreciadas comercialmente para consumo en fresco. Su eficacia para desarrollar los frutos depende de la capacidad de síntesis de GAs en las paredes del ovario, que se relaciona con el control de la división celular (Bermejo *et al.*, 2016; Mesejo *et al.*, 2016).

En resumen, en ambos casos, se asume que es la síntesis de GAs es el estímulo para que el fruto se desarrolle, y la disponibilidad de carbohidratos (CHs) es esencial para satisfacer la demanda energética del ovario durante el cuajado y desarrollo del fruto (Mehouachi *et al.*, 1995).

1.2. ORIGEN GENÉTICO DE LA PARTENOCARPIA

Existen dos tipos de partenocarpia: autónoma y estimulada. Esta última, necesita de un estímulo externo para poder desarrollar el ovario. Este papel se atribuye, principalmente, a la germinación del grano de polen o al desarrollo del tubo polínico, sin que se produzca la fecundación. Varias especies autoincompatibles con esterilidad homogenética presentan este tipo de partenocarpia, tales como la manzana (*Malus pumila*) (Saito *et al.*, 2007), agracejo común (*Berberis vulgaris* L. cv. Asperma) (Ebadi *et al.*, 2010), la uva (*Vitis vinífera* L.) (Bonanda, 2011) y líneas transgénicas de tomate (*Solanum lycopersicum*) (Schijlen *et al.*, 2007). De momento se desconoce si ocurre en alguna variedad del género Citrus. Concretamente, en la mandarina Clementina, cvs 'Marisol' y 'Clemenules', la autopolinización no estimula el desarrollo inicial del ovario (Mesejo *et al.*, 2012).

Por otro lado, el desarrollo del ovario sin ningún estímulo se conoce como partenocarpia autónoma. La principal razón es la esterilidad gamética. La esterilidad gamética masculina ocurre cuando la planta es incapaz de producir polen funcional, mientras que la esterilidad gamética femenina ocurre cuando el saco embrionario degenera y/o tiene oosferas incapaces de ser fecundadas. Ejemplos de cítricos con este tipo de esterilidad son el naranjo dulce navel [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] y las mandarinas Satsuma (*Citrus unshiu*, Marcovitch). Estas especies tienen partenocarpia obligada (Vardi *et al.*, 2008) por lo que no contienen semillas independientemente de que se evite o no la polinización.

Por otro lado, la incompatibilidad homogenética impide que las plantas monoicas o hermafroditas se reproduzcan sexualmente sin la intervención de otra planta. Cuando no se puede realizar la autogamia, el fenómeno recibe el nombre de autoincompatibilidad, mientras que si está imposibilitado el cruzamiento con otras plantas se denomina incompatibilidad de cruce. La mandarina Clementina [*Citrus reticulata* (Hort.) Ex. Tanaka], y otras mandarinas de origen híbrido, son autoincompatibles y con esterilidad homogenética gametofita. Esto quiere decir que aunque el polen es capaz de germinar en el estigma, días después, los óvulos abortan porque el tubo polínico se detiene en el estilo (McClure *et al.*, 1990), y el tiempo transcurrido es dependiente del periodo de polinización efectiva (Mesejo *et al.*, 2007) y de las condiciones climáticas (Sanzol y Herrero 2001). En condiciones de polinización cruzada, entre híbridos y clementinas, se producen frutos con semilla de baja calidad y depreciados comercialmente.

Existen diferencias entre el desarrollo de frutos partenocárpicos, de modo que la mandarina Satsuma tiene alta capacidad de producir frutos partenocárpicos y alto porcentaje de frutos cuajados, mientras que en la mandarina Clementina, sin polinización cruzada, la capacidad de producir frutos es muy baja. La capacidad de cuajado de frutos partenocárpicos está determinada por el contenido endógeno de GAs (Talón *et al.*, 1990a, b, 1992), y ello en la capacidad de síntesis de las mismas (Mesejo *et al.*, 2016). Es por ello que, variedades que tienen baja capacidad de síntesis de GAs, como la mandarina Clementina cv. 'Clemenules' no alcanzan a producir un buen rendimiento de fruta sin técnicas de mejora de cuajado.

1.3. CONTROL HORMONAL DE LA PARTENOCARPIA

La fase más temprana del desarrollo del fruto consiste en la decisión de abortar o continuar con la división celular en la pared del ovario, por lo que la inhibición de la división celular impide el cuajado (Mesejo *et al.*, 2014). Generalmente, el crecimiento del ovario y la división celular se detienen momentáneamente durante el período de antesis hasta que ocurre la polinización y la fecundación, ya que la presencia de óvulos fecundados reactiva la división celular, desencadenando el desarrollo del fruto (Gillaspy *et al.*, 1993). Los óvulos en desarrollo sintetizan hormonas confiriendo al fruto la capacidad sumidero para demandar carbohidratos y consecuentemente, agua para crecer. En variedades que contienen semillas existe relación positiva entre el número de semillas por fruto, y el tamaño final del fruto.

En los cítricos con semillas, la reactivación del desarrollo del fruto está coordinada a través de la acción de las auxinas y las giberelinas (Bermejo *et al.*, 2017), de modo que el incremento endógeno de GAs en las paredes del ovario, mediado por la síntesis de auxinas en la semilla, permite el cuajado de los frutos. De este modo, la emasculación de estas variedades detiene el desarrollo y provoca la abscisión de la fruta, debido a su incapacidad partenocárpica (García-Papi y García-Martínez, 1984; Ben-Cheikh *et al.*, 1997).

Por otro lado, en las variedades partenocárpicas no se necesita la fecundación para el cuajado, aunque sí mejora en condiciones de polinización cruzada; en ausencia de ello, el cuajado depende estrictamente de la capacidad de síntesis endógena de GAs en las paredes del ovario (Bermejo *et al.*, 2016; Mesejo *et al.*, 2016). El incremento endógeno de GA₁ en el ovario durante la antesis es el estímulo responsable del desarrollo partenocárpico del ovario en cítricos, independientemente de la especie (Talón *et al.*,

1990, 1992). Por lo tanto, cuanto mayor sea la síntesis de GA₁ en el ovario durante la antesis mayor será el cuajado de frutos (Talón *et al.*, 1992). El contenido de GAs en las paredes del ovario (exocarpo y mesocarpo) y en el endocarpo, estimulan la división celular y, por tanto, la tasa de crecimiento del pericarpo y de las vesículas de zumo (Mesejo *et al.*, 2016).

En particular, los estudios de Talón *et al.* (1992) y Mesejo *et al.* (2016) comparan la capacidad partenocárpica de dos especies (Satsuma y Clementina) en relación a su síntesis y contenido en GAs. El contenido endógeno de GAs es más bajo en los genotipos autoincompatibles (Clementina) que en los que presentan partenocarpia estricta (Satsuma) (Talón *et al.*, 1992). La ruta biosintética de las GAs ocurre en tres etapas. La primera etapa ocurre en los cloroplastos y consiste en las reacciones de ciclación que convierten el geranil difosfato (GGPP) en ent-kaureno. La segunda etapa situada en el retículo endoplasmático, un grupo metilo de ent-kaureno se oxida a ácido carboxílico, y se produce la contracción del anillo B disminuyendo en número de átomos de carbono de 6 a 5, para dar el aldehído de la GA₁₂, que se oxida dando GA₁₂. Todas las especies tienen en común los primeros pasos, siendo la GA₁₂ la primera en formarse y la precursora del resto de GAs.

Seguidamente, mediante la hidroxilación del carbono 13 se forma GA₅₃ a partir de GA₁₂. En la última etapa, que ocurre en el citosol, GA₁₂ y GA₅₃ son oxidadas a otras C20-GAs y C19-GAs dando lugar a dos rutas: ruta de la 13-hidroxilación y la ruta de la 13-no hidroxilación, que finalizan en la síntesis de GA₁ y GA₄ (Taiz y Zeiger, 2006). Tanto la mandarina Clementina como la mandarina Satsuma presentan las 2 rutas de síntesis de GAs. Las GAs que poseen actividad biológica son GA₁ y GA₄, mientras que las restantes actúan promoviendo o degradando las GAs activas (Kobayashi *et al.*, 2000). La GA₁ es la GA responsable del cuajado en los cítricos y su síntesis endógena es la responsable de la partenocarpia. Así, en antesis y hasta 5-7 días después de la caída de pétalos, la concentración de GA₁ es superior en Satsuma en comparación con Clementina, y, por ello, el cuajado (Talón *et al.*, 1992).

Las rutas de la 13-hidroxilación y la ruta de la 13-no hidroxilación se catalizan por medio de tres enzimas: GA 20-oxidasa (GA20ox), GA3-oxidasa (GA3ox) y GA2-oxidasa (GA2ox). El crecimiento partenocárpico en el ovario de *Arabidopsis thaliana* se ve incrementado por la inactivación de las cinco enzimas de GA2ox, que catalizan GA₁ y GA₄ (Rieu *et al.*, 2008). La GA3ox cataliza la síntesis de GA₁ a partir de GA₂₀, y la GA2ox se

encargan de su inactivación (Ross *et al.*, 1994). La enzima *GA20ox* cataliza múltiples pasos de las GAs precursoras.

La actividad hormonal se explica a través de la acción que ejercen sobre la expresión de algunos genes, o sobre la actividad enzimática. En los cítricos, la transcripción de *GA20ox2* se observa en los tejidos donde está activa la división celular. En el caso de la mandarina Satsuma, ello sucede en todo el pericarpo en antesis y sólo el endocarpo 30 días después. Por el contrario, en la mandarina 'Clemenules', no se encuentra transcripción en los tejidos del pericarpo en antesis, que además, tampoco presentan división celular (Mesejo *et al.*, 2016). La expresión de los genes que regulan la biosíntesis de GA_1 y sus precursores se inicia durante la preantesis en la mandarina Satsuma coincidiendo con el inicio de la división celular y el crecimiento del ovario, mientras que en la mandarina Clementina este proceso está reprimido hasta después de la caída de pétalos, lo que dificulta su cuajado (Mesejo *et al.*, 2016). Por ello, el tratamiento con GA_3 resulta imprescindible para obtener cosechas económicamente rentables en la mandarina Clementina (Agustí, 2004).

1.4. DIVISIÓN CELULAR

La regulación del ciclo celular tiene un papel importante en el crecimiento de las plantas y su desarrollo. El ciclo celular consiste en la secuencia de eventos bioquímicos y morfológicos (síntesis de DNA y replicación de los cromosomas, mitosis y citocinesis) que conducen a la generación de dos células hijas (Segura, 2000). El ciclo celular se divide en mitosis (M) e interfase, que, a su vez se subdivide en 3 fases diferenciadas: síntesis del DNA (S), fase de presíntesis (G1) y fase de postsíntesis (G2) (Segura, 2000). Entre las 4 fases existen, al menos, 2 puntos de control interno: 1) la transición de la fase G1 a la S, que determina si la célula inicia una nueva replicación del DNA o abandona el ciclo para iniciar la elongación o diferenciación, y 2) la transición de la fase G2 a M, es decir, si las células entran o no en mitosis.

La maquinaria del ciclo celular está compuesta por 2 clases de proteínas reguladoras del proceso, las ciclinas (CYCs) y las kinasas dependientes de ciclina (CDKs). Las CYCs y las CDKs se sintetizan a partir de protooncogenes (genes cuya presencia o activación provocan que la célula pierda el control de la división y se mantenga proliferando), y

trabajan en cooperación para regular el ciclo positivamente. En particular, la actividad de las CDKs es esencial en la regulación del ciclo celular, debido a que, cambios en su actividad, en lugar de su especificidad, determina el inicio de las fases S y M (Stern y Nurse, 1996). La función que desencadenan las CDKs es la transición desde la etapa G1 y G2 hasta S (fase de síntesis) y M (fase de mitosis), respectivamente, y su actividad está regulada por la unión de las CYCs mediante una relación de CDK-CYC. La subunidad catalítica de CDK en el ciclo celular, es responsable de reconocer el motivo diana (una serina o treonina seguido de una prolina) presente en las proteínas del sustrato (Keaton, 2007). Una vez reconocidas, la actividad principal de las CDKs es la fosforilación en los puntos de transición de G1 a S y G2 a M (Inzé y De Veylder, 2006). La fosforilación de Thr160 (o el residuo equivalente) de las CDKs induce un cambio conformacional que permite el reconocimiento apropiado de los sustrato y se realiza mediante las quinasas activadoras de CDK (CAK)(Inzé y De Veylder, 2006). Se conoce que una de las kinasas activadoras es la *CDKD* y juega un papel importante en la regulación del ciclo celular debido a que controla los niveles de actividad de las CDKs(Inzé y De Veylder, 2006).

La ausencia de fosforilación del sustrato (RBR), proteínas relacionadas con el retinoblastoma, mantiene la transcripción de los complejos inhibidores de la actividad de CYC-CDK, y por lo tanto, actúa disminuyendo la fase de S, bloqueando la replicación del DNA (Inzé, 2007).

Las CDKs de tipo A actúan en todas las fases del ciclo celular, en la transición de ambos puntos de control G1/S y G2/M. Pero su papel es fundamental en la transición de G1 a S, ya que niveles elevados se han demostrado que pueden llegar a bloquear la replicación del DNA en manzano (Malladi y Johnson, 2011). Por otro lado, las CDKs de tipo B están involucradas en la regulación de la progresión de la fase G2/M (Menges *et al.*, 2005). En estudios realizados en raíces en desarrollo en *A.thaliana*, el nivel de la actividad de *CDKB₂* es capaz de mantener la actividad mitótica, controlado principalmente, por aplicaciones exógenas de auxinas que mantienen el nivel de una ligasa concreta del núcleo celular (HPY2) que favorece la actividad mitótica Okushima *et al.*, 2014

La proteína CYC de tipo A, por lo general, facilita la progresión de las fases S y G2/M, y la *CYCB* regula la progresión celular de la fase G2/M. Además, controlan la transición de la fase G1/S y no muestran expresión cíclica típica. La expresión del gen específico *CYCA1,1* correlaciona positivamente con la tasa de división celular encontrada en el pericarpo durante el cuajado de los cítricos (Mesejo *et al.*, 2016). Resultados

similares se han obtenido en frutos de tomate partenocárpico (Wang *et al.*, 2009), y además, la aplicación exógena de GA₃ se relaciona con la expresión de CYCA1,1 en arroz (Fabian *et al.*, 2000).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Los factores responsables del cuajado deficiente en las mandarinas con baja capacidad partenocárpica son la deficiente síntesis de giberelinas y la reducida tasa de crecimiento en el ovario durante la antesis floral. Se desconoce si el cuajado deficiente se debe a una incapacidad para activar la división celular y con ello la síntesis endógena de giberelinas que mantendría la tasa mitótica necesaria para el cuajado o si, por el contrario, el bloqueo de la síntesis endógena de giberelinas impide la reactivación de la división celular.

Por todo ello, se plantea la siguiente hipótesis de trabajo: La aplicación de GA₃ inicia la división celular en el ovario, que, a su vez, estimula la síntesis endógena de GAs y el desarrollo. El estudio se realiza en la mandarina Clementina cv. Clemenules, que es deficiente en la síntesis de GAs en antesis.

Los objetivos de este TFM son:

Estudiar la influencia de la aplicación de GA₃ y de paclobutrazol (PBZ, inhibidor de la síntesis de GAs) sobre:

1. La división celular y el desarrollo del ovario.
2. La síntesis y catabolismo de GAs, determinada por la expresión de los genes *GA20ox2*, *GA3ox1*, *GA2ox2* y *GA2ox3*.
3. La activación de las fases S y M del ciclo celular, determinada por la expresión de las kinasas dependientes de ciclina (CDKs) específicas de cada fase (*CDKB* y *CDKD*, respectivamente).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL VEGETAL

El experimento se realizó con 6 árboles adultos de mandarina Clementina cv. Clemenules (*Citrus reticulata* Hort. ex. Tan.) injertados sobre patrón citrange Carrizo (*Citrus sinensis* (L.) Osb. x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.). Los árboles se encuentran en la parcela experimental del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (I.V.I.A.), en Moncada (Valencia, España). Los árboles estaban en perfectas condiciones fitosanitarias, con riego a goteo, en suelo arcilloso y bajo condiciones culturales estándar del manejo del cultivo.

3.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se llevaron a cabo tratamientos a ramas principales con ácido giberélico (GA_3 5 mg l⁻¹; ProGibb 40%, Valent, Canadá), paclobutrazol (PBZ, 1,000 mg l⁻¹; Cultar, Syngenta), y ambos (GA_3 + PBZ). Además, se seleccionaron ramas control sin tratar para la comparación. Los 4 tratamientos se realizaron en las 4 ramas principales de los 6 árboles. Las aplicaciones hormonales se realizaron mediante spray de mano, con un consumo medio de 2 l. por rama, que, en todos los casos, incluyó un mojante no iónico al 0,05%. Los tratamientos se realizaron cuando el 90% de las flores habían perdido los pétalos, coincidiendo con el estado fenológico 69 de la escala BBCH. El experimento se realizó en las primaveras del 2016 y 2017, y los días 10/04 y 18/04, respectivamente, se realizaron los tratamientos. El día del tratamiento, y con anterioridad a éste, se determinó el número total de flores de cada rama y se tomó una muestra de 5 flores por rama. Las ramas seleccionadas tenían entre 250 y 300 flores cada una. Los muestreos se prolongaron semanalmente durante los 2 meses siguientes.

Se determinó la evolución del desarrollo del ovario (2016 y 2017) y la evolución del porcentaje de cuajado (2016). En la primavera de 2017 solamente se determinó el cuajado final. En cada uno de los muestreos se evaluó diámetro del fruto (mm), el peso del fruto (g), la división celular de los tejidos del ovario, la expresión del gen responsable de la síntesis y catabolismo de GA_1 (*GA20ox2*, *GA3ox1*, *GA2ox2* y *GA2ox3*), la transición G1-S del ciclo celular (*CDKD* y *CDKA*) y de la transición G2-M del ciclo celular (*CDKB* y *CDKA*), y la ciclina *CYCA*, que actúa entre la Fase S y la fase G2.

3.3. TÉCNICAS EMPLEADAS

3.3.1. Diámetro y peso del fruto

El diámetro del fruto se midió mediante un pie de rey (Mitutoyo, Japón), expresando el resultado en milímetros. Para la medición del peso del fruto se utilizó una balanza analítica de precisión (Sartorius Basic, modelo B 120S). Los resultados obtenidos se expresaron en gramos.

3.3.2. Microscopía

3.3.2.1. Medidas histológicas

Las frutas muestreadas en diferentes etapas de crecimiento se fijaron en campo en una solución de FPA (900 cm³ de etanol al 70%, 50 cm³ de ácido propiónico y 50 cm³ de formaldehído) y se transportaron a 4°C hasta el laboratorio. Se mantuvieron 24 h en FPA, y tras ese tiempo se procedió a su conservación en etanol al 70% a -20°C.

3.3.2.2. Seccionamiento, fijación e incrustación del ovario

Se procedió a la deshidratación de las muestras con 3 etapas en etanol 70% cada 90 min y se seleccionaron 3 ovarios por tratamiento. Se realizó un corte transversal del ovario, de ese mismo uno longitudinal, consiguiendo un triángulo de ovario. Se incluyeron en parafina en el procesador de tejido automático (Leica TP 1020) y la estación de inclusión (Leica EG1150H) para reemplazar el contenido en agua del tejido celular por parafina, y así endurecer la muestra para realizar cortes sin romper los tejidos. El material embebido en parafina se solidifica en una placa de frío y se deja solidificar. Seguidamente, se secciona en cortes de 8 mm en el micrótopo rotatorio (Microm HM330) y las secciones se adhirieron a portaobjetos de Polisina (Menzel-Glaser).

3.3.2.3. Tinción en Azul de Metileno

Se incrementa el contraste celular para su visualización en microscopía tiñendo las secciones en azul de Metileno (C.I. 52015). En primer lugar, para poder hidratar las secciones se eliminó primero los restos de parafina y se siguieron pases en las cubetas en el siguiente orden.

- 7 min en Xileno.
- 6 min en Xileno + Etanol absoluto (50 v/v).
- 6 min en Etanol absoluto.
- 6 min en Etanol diluido al 96 %.
- 6 min en Etanol diluido al 70%.
- 6 min en Etanol diluido al 50%.
- 6 min en Etanol diluido al 30%.
- 5 min en Azul de metileno (1 g en 1000 ml de Agua destilada).

De seguido, se lavaron los portaobjetos con agua destilada y se cubrieron con un cubreobjetos para conservar las muestras en el tiempo.

3.3.2.4. Análisis de la división celular y parámetros morfológicos de los ovarios

Los efectos de los tratamientos sobre los tejidos del ovario han sido estudiados mediante la evaluación de las células a lo largo de la sección transversal del ovario y el tamaño medio de las células individuales de 3 ovarios seccionados para cada tratamiento. Se evaluó el crecimiento celular midiendo la anchura del pericarpo (exocarpo y mesocarpo) del ovario, la anchura entre los septos, área celular media y el número de células.

Las preparaciones han sido observadas y fotografiadas con un microscopio de campo brillante (NIKON, E600). Las imágenes se fotografiaron usando la cámara fotográfica digital unida al microscopio.

3.3.3. Análisis expresión genética mediante RT-PCR

3.3.3.1. Extracción y purificación de RNA

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

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

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

Inmediatamente después, se añadió el mismo volumen de sobrenadante de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Las muestras se agitaron en vórtex y centrifugado (30 min; 4.000 r.p.m.; 4°C), y una vez separadas las fases, se recogió la parte superior donde se añadió LiCl 6M (½ volumen), dejándolo precipitar toda la noche a -20°C.

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

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

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

3.3.3.2. Diseño de oligonucleótidos.

Para el estudio de los efectos de los tratamientos sobre la división celular se analizan los genes CDK tipo A, B y D, que regulan diferentes fases del ciclo celular. Dado que estos genes no están descritos en el genoma de *Citrus clementina* se realizó un estudio filogenético previo. Para ello se seleccionaron las proteínas descritas en *Arabidopsis thaliana* (www.arabidopsis.org). Seguidamente, se realizó una búsqueda de los posibles genes candidatos por homología con la secuencia original de *Arabidopsis* dentro del genoma de *Citrus clementina* usando la herramienta TBLASTN de la base de datos Phytozome v12.1 (www.phytozome.net). Se seleccionaron además las secuencias proteicas de otras 2 especies leñosas *Vitis vinifera* y *Malus domestica*, obtenidas en la base de datos de NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/).

El árbol filogenético se obtuvo introduciendo las secuencias proteicas de *Citrus clementina*, *A.thaliana*, *Malus domestica* y *Vitis vinifera*, en el programa 'clustal omega w' en la página (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

Una vez identificados los genes a estudiar debido a la por homología respecto a *A.thaliana*, *Malus domestica*, se diseñan los oligonucleótidos de los CDKs que presentaban mayor similitud en la página web de Primer3web version 4.0.0 - Pick primers from a DNA sequence (<http://primer3.ut.ee>), los cuales se muestran en la Tabla 1. En la tabla, además, se muestran los oligonucleótilos utilizados para la cuantificación de la expresión de los genes de la síntesis de GAs (Yuste, 2015; Mesejo *et al.*, 2016).

Tabla1. Listado de oligonucleótidos usados en PCR.Tabla 1. Listado de oligonucleótidos usados en PCR.

GEN	CÓDIGO EST	QC (%)	Identidad A. thaliana/M. domestica (%)	Forward primer (5'-3') Reverse primer (5'-3')
<i>CYCA</i>	Ciclev10003984m	96	54/61	CCAGTTTTGTGCAACCATTG TGGACCCTCTCCATGAAGTC
<i>CDKA</i>	Ciclev10012320m	99	83/89	GCCTTTCCTAAATGGCCTTC ACAACAGTCCCCAACTCCTG
<i>CDKB</i>	Ciclev10012202m	99	83/85	CTCGAAATGGACGAAGAAGG GGACGACGTAAAGGGATTGA
<i>CDKD</i>	Ciclev10008533m	97	74/87	AGCAACTAAGCGGGCATCTA CATTCCCTTCAAACCCTTCA
<i>GA20ox2</i>	Ciclev10020694m	95	65/73	GGTGACACCTCCGAACAACT AATGCGTTGAGGGTTTTTCA
<i>GA3ox1</i>	Ciclev10027153m	98	60/78	CAACGCAAGATGTCAAATGG CAGGCCGGGTAGTAATTCAA

<i>GA2ox3</i>	Ciclev10015817m	96	60/75	ACACATCTGGCCTCCAAATC ATGGGACTGAAACCCAAGTG
<i>GA2ox2</i>	Ciclev10024433m	94/97	46/65	GAAACATCGGCTTCAATGGT GCGCGACTGAATTTTAAAGG

3.3.3.3. Retrotranscripción

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

3.3.3.4. qPCR

Para la cuantificación relativa mediante PCR se empleó el kit QuantiTect® SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen), según las instrucciones del fabricante. El cDNA diluido se emplea como molde para la amplificación en un volumen final de reacción de 2,5 µl con una concentración de 0,3 µM de cada oligonucleótido y 12,5 µl de la mezcla de los contenidos en el kit.

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

La fluorescencia se midió al final de la etapa de alineamiento y se transformaron en valores relativos de ARNm usando una serie de dilución 10x de muestra de ARN como curva estándar. Los niveles relativos de ARNm se normalizaron a las cantidades totales de ARNm (Bustin, 2002). Y en cada caso, se asignó de manera arbitraria un valor de expresión de 1 a la muestra del control en la fecha inicial de muestreo. Se utilizó la actina y el gen β -licopeno ciclasa (β -LYC) como genes de referencia, ya que muestran expresión constitutiva

en los ovarios de flor de cítricos (Mesejo *et al.*, 2016). 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 empleó un equipo RotorGene® Q 2-Plex (Qiagen) y los resultados fueron evaluados mediante el software RotorGene 2.0.2. Se realizan tres réplicas técnicas de cada muestra biológica para emplearlas en el análisis RT-qPCR.

3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

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

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE EL DESARROLLO DEL OVARIO Y EL CUAJADO.

La caída de flores y frutos se da en todas las especies cultivadas de un modo continuo pero no uniforme. En los cítricos, la caída se produce en 3 momentos claramente identificados (Agustí *et al.*, 1982): antes de la antesis, inmediatamente después y cuando se inicia el desarrollo inicial del fruto. Cuanto mayor es la intensidad de la floración, la abscisión de órganos se anticipa y se intensifica. En la mandarina 'Clemenules', las 2 caídas post antesis se producen antes y después del mes siguiente a la antesis (Mesejo *et al.*, 2012). En los experimentos realizados en este TFM, se observó el mayor porcentaje de caída a los 20 días después de la antesis (Figura 1B).

La aplicación de GA₃ incrementa el número de frutos que inician el desarrollo, pero si éste es muy elevado, consecuencia de una floración intensa, la abscisión no se evita, aunque se pospone; por el contrario, si el número de flores es reducido, tras la aplicación de GA₃, el número de frutos que inicia el desarrollo no sólo aumenta sino que persiste, en un mayor porcentaje, hasta la recolección (Agustí *et al.*, 1982). La mandarina 'Clemenules', de baja capacidad partenocárpica, necesita la aplicación exógena de GA₃ antes, durante o después de la antesis para inducir el crecimiento partenocárpico. En la primavera de 2016 se estudió el efecto de GA₃ aplicado en el momento de la antesis, mientras que en la primavera de 2017 la aplicación se retrasó 7 días, cuando las flores habían perdido los pétalos.

Las flores tratadas el día de la antesis con GA₃ (experimento 2016), alcanzaron un mayor tamaño que las flores control (CT), pero no mostraron diferencias significativas en el peso del ovario respecto del CT hasta pasados 25 días después del tratamiento (DDT) (Figura 1A). Sin embargo, la aplicación de PBZ sí redujo significativamente el desarrollo, respecto del CT, desde 15 DDT en adelante (Figura 1A). La flor de la mandarina 'Clemenules' presenta una tasa reducida de división celular en los tejidos del ovario en antesis, y hasta pasados unos días no se reinicia el crecimiento (Mesejo *et al.*, 2016). A partir de ese momento, los frutos tratados con GA₃ tienen un desarrollo exponencial, creciendo a mayor velocidad que el resto y, por ello, adquieren el doble de peso que los frutos CT (Fig. 1A). La abscisión después de antesis se observa desde 10 DDT hasta 20 DDT, y es significativamente mayor en el tratamiento con PBZ (Fig.1B). El pico de

abscisión coincide con el inicio del desarrollo inicial del crecimiento del ovario, es decir, con la división celular.

Los resultados sugieren que mientras la inhibición de la síntesis de GAs (aunque sea escasa de modo natural en la mandarina 'Clemenules') tiene un efecto prácticamente inmediato sobre la detención del desarrollo y el estímulo de la abscisión (Talón *et al.*, 1992), el efecto de la aplicación de AG es mayor cuando el fruto presenta 20-25 días después de la antesis. Además, independientemente de ello, los resultados confirman el papel regulador de la aplicación de GA₃ en el desarrollo inicial del ovario de especies partenocárpicas como la mandarina Clementina (García-Martínez y García Papí, 1979; Talón *et al.*, 1992), u otras especies, como el tomate, en el que la aplicación de un inhibidor de la síntesis de GAs (PBZ) a frutos polinizados inhibe su desarrollo, efecto que se revierte por la aplicación de GA₃ (Fos *et al.*, 2000, 2001).

En la primavera de 2017 se retrasó la época de tratamiento con GA₃ a la caída de pétalos (7 días después de la antesis), con el fin de determinar si el efecto de la aplicación de GA₃ responde a un estado fisiológico concreto. Además, se realizó el tratamiento GA₃+PBZ, con el fin de determinar si la acción promotora del desarrollo la realiza el GA₃ per se, o si, por el contrario, ésta sucede a través del estímulo de la síntesis endógena de GAs en el ovario, proceso que queda restringido por el efecto del PBZ desde las etapas iniciales de la ruta.

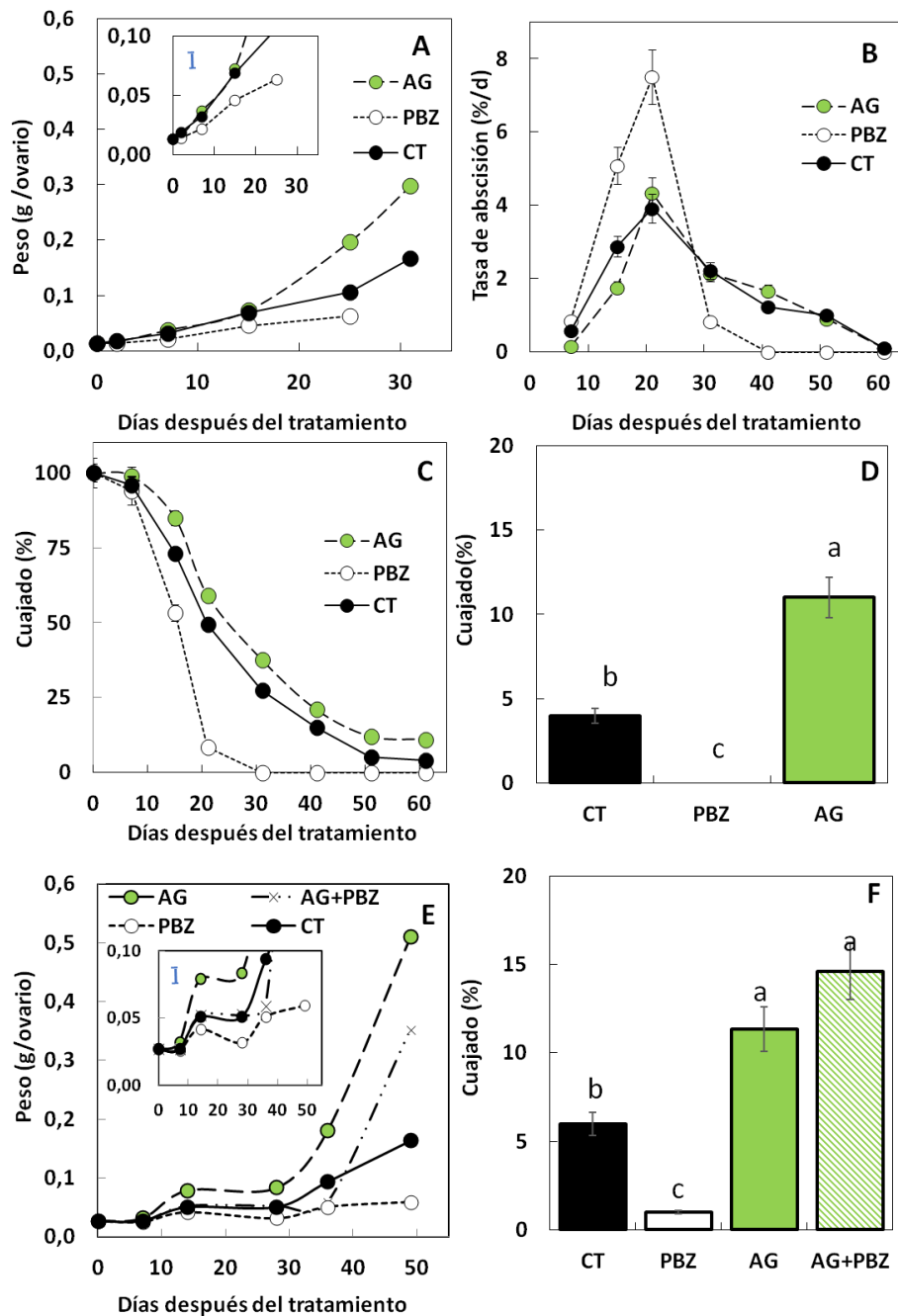


Figura 1: Control del cuajado en la mandarina 'Clemenules'. Evolución del peso (A), la tasa diaria de abscisión (B), porcentaje de frutos cuajados (C) y cuajado final (D), en el experimento realizado en 2016; Evolución del peso (E) y porcentaje final de frutos cuajados (F) en el experimento realizado en 2017. Los tratamientos se realizaron en antesis (2016) o 7 días después (caída de pétalos, 2017) con GA₃ (5 mg l⁻¹) y PBZ (1000 mg l⁻¹). Cada valor de cuajado y abscisión es la media de 4 ramas por árbol y 6 árboles por tratamiento. Las barras verticales indican el error estándar. Cada valor de peso del ovario es la media de 10 frutos tomados de 3 árboles por tratamiento. La barra vertical azul indica el LSD (P<0,05) y las letras diferentes indican diferencias significativas (P<0,05).

Los resultados muestran, por un parte, que el GA₃ tuvo un efecto significativo sobre el peso del fruto a partir de 14 DDT (Figura 1E), es decir, entre 20 y 25 días después de la antesis, como ocurrió realizando el tratamiento 7 días antes (experimento 2016). Este resultado suscita varias preguntas: ¿Por qué razón se pospone el efecto del GA₃, sobre el estímulo del desarrollo, especialmente cuando se realiza el tratamiento en antesis? ¿Qué necesita el ovario para iniciar la división celular? Además, la aplicación de PBZ también redujo significativamente el peso del ovario. Pero la aplicación de GA₃+PBZ consiguió restaurar el crecimiento del ovario al nivel del tratamiento control, de modo que a partir de 30 DDT se observa un incremento significativo de la velocidad de crecimiento de los frutos tratados con GA₃ o GA₃+PBZ, en comparación a la de los frutos tratados con PBZ y los CT (Fig. 1E).

El cuajado final aumentó significativamente en los 2 años de experimentos por efecto del tratamiento con GA₃, consiguiendo una mejora respecto al CT de un 5% por término medio. En los árboles tratados con PBZ la abscisión fue del 99-100%, pero la aplicación de GA₃+PBZ recuperó el cuajado hasta en nivel del tratamiento con GA₃ (Figs. 1D y 1F).

Los resultados sugieren, por tanto, 2 cuestiones: 1) que la acción del GA₃ exógeno sobre el desarrollo del ovario se concreta a partir de un estado fenológico determinado, y 2) que la aplicación de GA₃ exógeno es suficiente para estimular la división celular y el cuajado, independientemente de la síntesis endógena de GAs. Para dar respuesta a estas hipótesis, se estudió el efecto de los tratamientos en la tasa de división celular, mediante histología, y la expresión de los genes *GA20ox2*, *GA3ox1* y *GA2ox2* cuyas proteínas catalizan las reacciones de la síntesis de GAs en el ovario de Citrus clementina (Mesejo *et al.*, 2016), y la expresión de genes tipo *CDKA*, *CDKB* y *CDKD*, que actúan en diferentes momentos del ciclo celular.

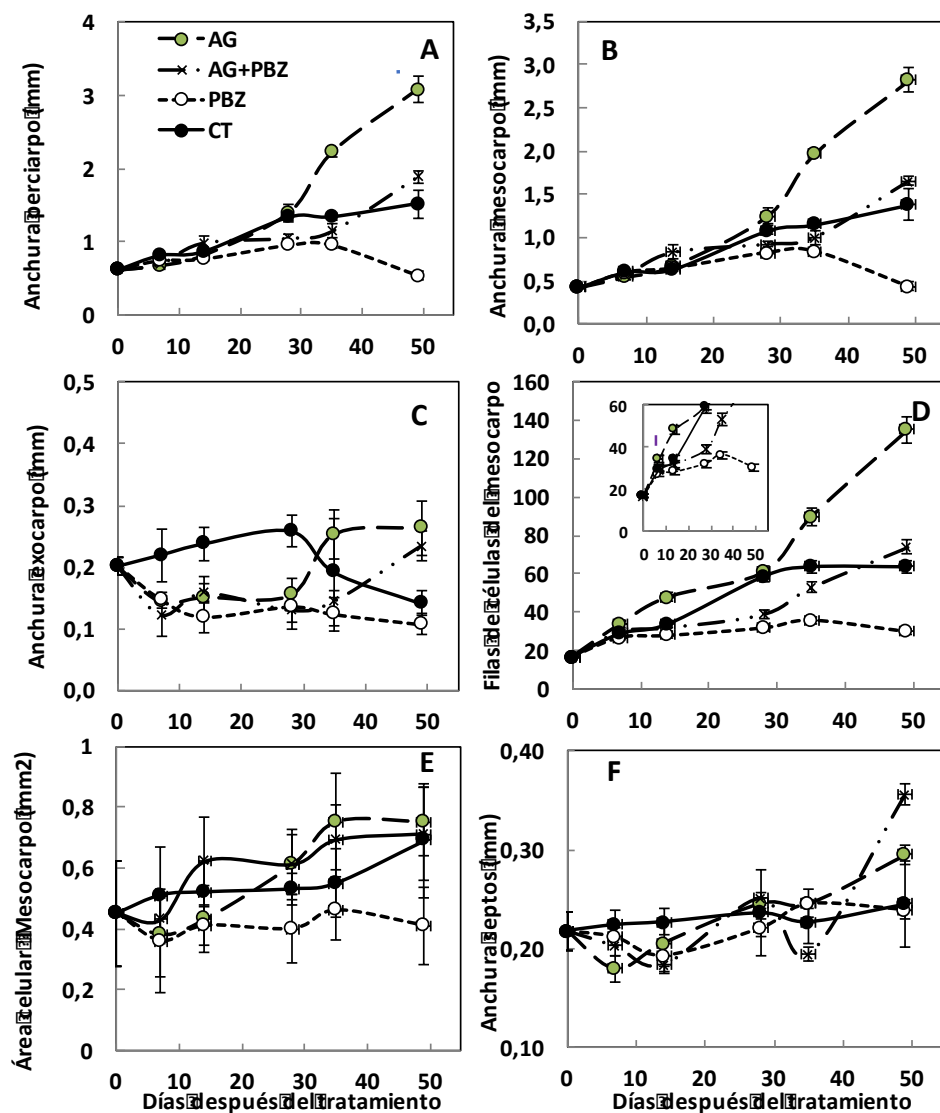
4.2. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE LA DIVISIÓN CELULAR EN EL OVARIO.

La velocidad de crecimiento del ovario en el mandarino 'Clemenules' es escasa hasta pasados 14 DDT (Fig. 1E). A partir de ese momento, el desarrollo del ovario en las ramas CT se incrementa significativamente. Así, por ejemplo, la anchura del pericarpo aumentó de 0,87 mm a 1,34 mm (x1,5) entre 14 y 35 DDT (Figura 2A). Este crecimiento se debió, principalmente, a la división celular en el mesocarpo (Figuras 2B y 2D). No obstante, a partir de 35 DDT, aunque el aumento del peso del ovario es lineal (Fig. 1.E) la anchura del pericarpo no aumenta, y ello se debió a que el tejido del mesocarpo no aumentó el número de células (Figs.2 A y D).

Los frutos tratados con GA_3 presentaron un crecimiento del mesocarpo significativamente mayor que el resto de tratamientos a partir de 30 DDT, de modo que el número de filas de células se duplicó por efecto del tratamiento en comparación con el CT (Fig. 2D). Por otra parte, la aplicación de PBZ detuvo por completo la división celular, y el número de filas de células se mantuvo prácticamente constante durante 50 DDT (Fig. 2D), lo que concuerda con la detención inmediata del crecimiento y, consecuentemente, la abscisión final del porcentaje de frutos cuajados (Figs. 1 E y F). Los resultados del efecto del PBZ sobre la detención del desarrollo son comparables con lo estudiado previamente por Early y Martin (1989). Pero la aplicación conjunta de GA_3 +PBZ consiguió restaurar la división celular al nivel de los frutos CT (Fig. 2D). Es de destacar que ese efecto no se produjo hasta 30 DDT, momento a partir del cual se observó un incremento de la división celular. Por otra parte, los tratamientos no modificaron ni el tamaño de las células del mesocarpo ni la anchura de los septos (Figuras. 2E y 2F).

Los resultados sugieren, nuevamente, que la inhibición de la síntesis de GAs con PBZ (aunque sea escasa de modo natural en la mandarina 'Clemenules') tiene un efecto prácticamente inmediato sobre la detención del programa de desarrollo, que puede ser restaurado por la aplicación exógena de GA_3 . Es decir, la aplicación conjunta de GA_3 +PBZ pone en evidencia el efecto directo del GA_3 exógeno sobre la división celular independientemente de la síntesis endógena de GAs. Las diferencias observadas entre los tratamientos GA_3 y GA_3 +PBZ y CT indican que, al menos en el largo plazo, la síntesis endógena de GAs debe ser necesaria para permitir el desarrollo del ovario.

Pero la reactivación del desarrollo del fruto requiere de la síntesis o acción conjunta no solo de GAs, sino también de otros reguladores del crecimiento como las auxinas o las citokininas (Nitsch y Ohyama, 1971; Goodwin *et al.*, 1978; Pharis y King, 1985), como se ha puesto en evidencia en el cuajado de cítricos no partenocárpico (Bermejo *et al.*, 2017). Como la mandarina 'Clemenules' es incapaz de reactivar endógenamente el desarrollo del ovario, y el efecto del GA₃ sobre la división celular sucede a largo plazo, los resultados sugieren que esta mandarina presenta un déficit en la síntesis de otras hormonas relacionadas con la división celular, además de las GAs. Los resultados obtenidos por García-Martínez y García-Papí (1979), en los que aplicando 2,4-D y benziladenina estimulaban el desarrollo partenocárpico, y los estudios de Talón *et al.* (1990), sobre el contenido endógeno de AIA y ABA de las mandarinas Satsuma y Clementina, apoyan esta hipótesis. En cualquier caso, los resultados confirman la relación entre las GAs y la división celular durante el cuajado partenocárpico (Mesejo *et al.*, 2016).



4.3. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES DE LA SÍNTESIS DE GAs Y EL CICLO CELULAR.

4.3.1. GAs

En las mandarinas con alta capacidad partenocarpica, la biosíntesis de las enzimas *GA20ox* y *GA3ox* aumenta antes y durante la antesis, coincidiendo con el inicio de la división celular y el crecimiento del ovario, mientras que, en el ovario de la mandarina 'Clemenules' esta síntesis es escasa entre la antesis y 15 días después, es decir, unos 7 días después de la caída de pétalos (Mesejo *et al.*, 2016). En el experimento de 2017, la expresión del gen *GA20ox2* en los ovarios control se mantuvo baja entre 7 y 14 días después de la caída de pétalos. Dos semanas después (30 DDT), la expresión relativa se multiplicó (x2.5) (Fig. 3A), a su vez coincidiendo con el aumento de peso del ovario (Fig. 1E). La aplicación de GA_3 o GA_3+PBZ mantuvo baja la expresión de este gen durante los 50 días del experimento (Fig. 3A). En otras especies lejanas a los cítricos, la aplicación de GA_3 también mejora el cuajado del fruto sin alterar significativamente la síntesis endógena de GAs en el corto plazo (entre 2 y 48h después del tratamiento) (Dorcey *et al.*, 2009).

El tratamiento con PBZ redujo la expresión de *GA20ox2* respecto del CT solamente en los pocos ovarios que consiguieron alcanzar los 30 DDT (Fig.3A), cuyo desarrollo era muy limitado (Fig. 1E). Este tratamiento, además, aumentó el catabolismo de GAs a través de un aumento de la expresión del parálogo *GA2ox2* entre 7 y 14 DDT, lo que podría estar relacionado con la detención inicial del desarrollo del ovario y la promoción de la abscisión (Fig. 3C). Destacar que, en el tratamiento GA_3+PBZ , la expresión de este gen se reduce desde 7 DDT en adelante (Fig. 3C). Por otra parte, la expresión del parálogo *GA2ox3* (Fig. 3D), también responsable del catabolismo de GAs, mostró un incremento entre 14 y 28 DDT en todos los tratamientos, pero mayor en los tratamientos en los que más aumentó la tasa de crecimiento (Fig. 1E). La familia de enzimas *GA2ox* se divide en 2 grupos en función de su sustrato: el grupo más numeroso cataliza la oxidación del carbono 2 de las GAs-C19, pero algunas *GA2ox* también inactivan GAs-C20 como la GA_{12} o la GA_{53} , que inician las 2 ramas de síntesis que concluyen en GA_4 y GA_1 , respectivamente (Yamaguchi, 2008). Todo ello genera especificidad respecto de los órganos de síntesis y su acción fisiológica (Gou *et al.*, 2011), de la que por el momento nada se sabe en los cítricos.

Atendiendo a los resultados obtenidos, la *GA2ox2* podría estar relacionada con la inactivación de la GA_{53} (inicio de la ruta), lo que explicaría la inmediata detención del

desarrollo y la abscisión por efecto del PBZ, y la ausencia de efecto sobre la *GA20ox2*. Por otra parte, la *GA20ox3* podría estar relacionada con la inactivación de parte de las GAs activas cuando el crecimiento del órgano está activo y la concentración de GAs está próxima a la saturación (Gou *et al.*, 2011).

Solamente la aplicación de GA₃ aumentó significativamente la expresión del gen *GA3ox1* 28 DDT (Fig3. B), coincidiendo con el aumento de la tasa de crecimiento del ovario (Fig. 1E), y explicando el mayor desarrollo obtenido por los frutos de este tratamiento.

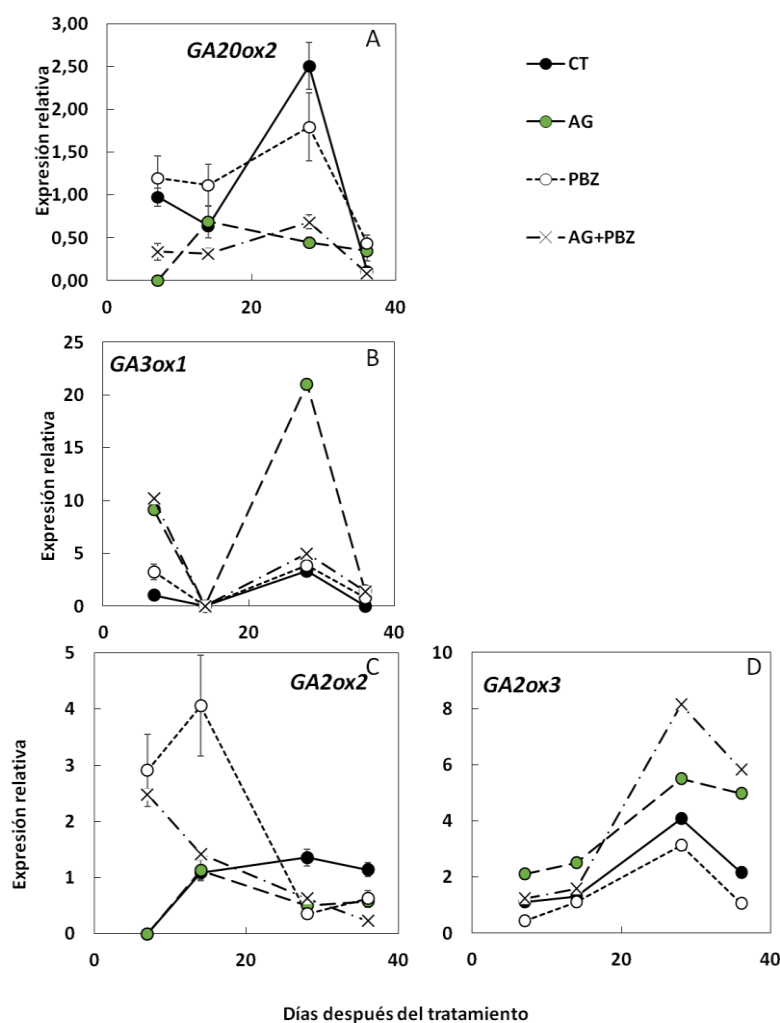


Figura 3: Evolución de la expresión relativa de los genes *GA20ox2*, *GA3ox1*, *GA2ox2* y *GA2ox3* en ovarios de mandarina Clementina cv. 'Clemenules'. Los tratamientos se realizaron cuando las flores habían perdido los pétalos con AG (5 mg l⁻¹) y PBZ (1000 mg). Cada valor es la media de 3 réplicas técnicas, realizadas a partir de una muestra homogénea de 10 frutos por tratamiento en cada fecha. Las barras verticales muestran los errores estándar.

4.3.2. Caracterización de secuencias homólogas de proteínas CYC y CDK en el genoma de *Citrus clementina*.

Con el fin de determinar con precisión el efecto de la aplicación de GA₃ sobre la división celular, se realizó un estudio previo de caracterización de secuencias de genes candidatos homólogos a los genes CYC A, B y D y CDK A, B y D de otras especies. Se realizó un análisis por homología de las secuencias en *Citrus clementina*, respecto a la secuencia proteica descrita en *A.thaliana*, *Malus domestica* y *Vitis vinifera*. Se construyó un árbol filogenético para evaluar las relaciones evolutivas entre las secuencias de aminoácidos de proteínas CYC tipo A, B y D, y de proteínas CDK tipo A, B y D. Se encontraron 8 proteínas descritas en *A.thaliana*, 22 proteínas en *M. domestica* y 30 de la especie *V. vinifera*. Los posibles genes candidatos por homología con la secuencia original de *A.rabidopsis* dentro del genoma de *Citrus clementina* fueron 1543 secuencias (Anejo I). Entre todas ellas, se seleccionaron aquellas que presentaban una relación evolutiva más próxima a las proteínas de *M.domestica* y *A.thaliana*, y entre estas, se seleccionaron una CDK de cada tipo con el fin de relacionar el efecto de los tratamientos con GA₃ sobre cada una de las etapas del ciclo celular. Del tipo *CDKA* se seleccionó la secuencia Ciclev10012320m (99% de probabilidad de ser *CDKA*, 89% de similitud), del tipo *CDKB* se seleccionó la secuencia Ciclev10012202m (99% de probabilidad de ser *CDKB*, 85% de similitud), y del tipo *CDKD* se seleccionó la secuencia Ciclev10008533m (99% de probabilidad de ser *CDKD*, 87% de similitud) (Figura 4).

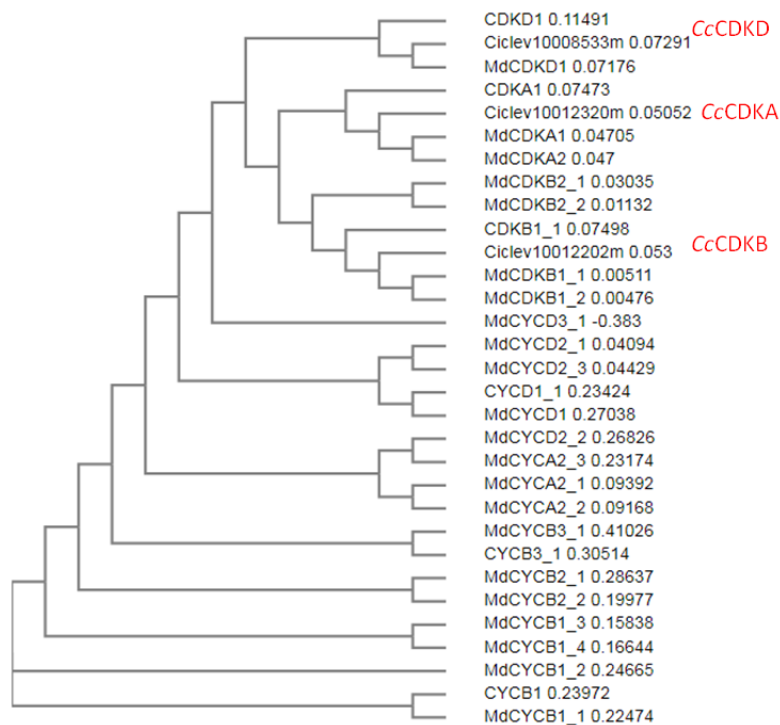


Figura 4: Árbol filogenético de los genes CDK A, CDKB y CDKD del genoma de *C. clementina*. Todo la información detallada de las secuencias se muestra en Anejo I. En este árbol se resaltan las tres secuencias escogidas (ESTs), Ciclev10008533m (*CcCDKD*), Ciclev10012320m (*CcCDKA*) y Ciclev10012202m (*CcCDKB*) y su relación con los genes homólogos en *A. thaliana* y *M. domestica*.

4.3.3. Evolución de la expresión de los genes *CYCA*, *CDKA*, *CDKB* y *CDKD*.

En el experimento de 2017, la expresión de los genes *CYCA* y *CDKD* muestra una relación positiva y significativa ($P=0.01$; $P=0.02$, respectivamente) con el número de filas de células en el mesocarpo, independientemente del tratamiento realizado (Fig. 5A y 5B). Por el contrario, la expresión de los genes *CDKB* y *CDKA* no correlaciona significativamente con el número de filas de células (Fig. 5C y 5D).

El efecto particular de los tratamientos se muestra en la figura 6. La expresión de *CYCA*, entre 7 y 14 DDT, no presentó diferencias significativas entre los frutos CT y los frutos tratados con GA_3 cuando las flores habían perdido los pétalos (Fig. 5B). Estos

resultados difieren de los obtenidos en estudios similares, en los que la aplicación de GA₃, en antesis, esto es, 7 días antes, incrementó la expresión de *CYCA1.1* a los 7 días del tratamiento (Mesejo *et al.*, 2016). Pero el efecto del PBZ, disminuyendo significativamente la expresión de *CYCA*, sugiere que las GAs endógenas se relacionan con la expresión de este gen (Fig. 6B). En ese sentido, cuando los frutos CT y tratados con GA₃ presentaban diferencias en el número de filas de células en el mesocarpo (Fig. 2D), la expresión de *CYCA* fue ligeramente superior en aquellos tratados con GA₃ (Fig. 6B). También se observó un incremento progresivo en los frutos tratados con GA₃+PBZ, lo que sugiere un efecto estimulador del GA₃ exógeno sobre la expresión de este gen.

La expresión del gen *CDKD* entre 7 y 14 DDT no presenta diferencias significativas respecto al CT. Sin embargo, tanto a los 28 como a los 49 DDT, la expresión de *CDKD* se ajustó tanto al número de filas de células como al peso del ovario mostrado por los tratamientos CT, GA₃ y GA₃+PBZ (Fig.6E), lo que sugiere un efecto estimulador no inmediato, probablemente indirecto, del GA₃ exógeno sobre la expresión de este gen. Los genes de tipo *CDKD* son kinasas activadoras del complejo *CDKA-CYCD* por fosforilación, y que actúan activando la fase S (Inzé y De Veylder, 2006). Los resultados no permiten indicar que el GA₃ estimule, directamente, este proceso.

Por otro lado, la expresión del gen *CDKB*, pese a que su expresión no correlacionó significativamente con el número de filas de células, sugiere una relación estrecha con las GAs, tanto endógenas (por la inmediata disminución de su expresión por efecto del PBZ), como exógena (por el aumento de su expresión por efecto de la aplicación de GA₃) (Yoshizumi *et al.*, 1999; Fabian *et al.*, 2000; Świątek *et al.*, 2004). La actividad del gen *CDKB* se estimula además por acción de otras hormonas vegetales, como las citoquininas (Gutierrez *et al.*, 2004), por la hormona vegetal brassinoidea (Yoshizumi *et al.*, 1999), pero en el arroz se estimula por GA₃ (Fabian *et al.*, 2000).

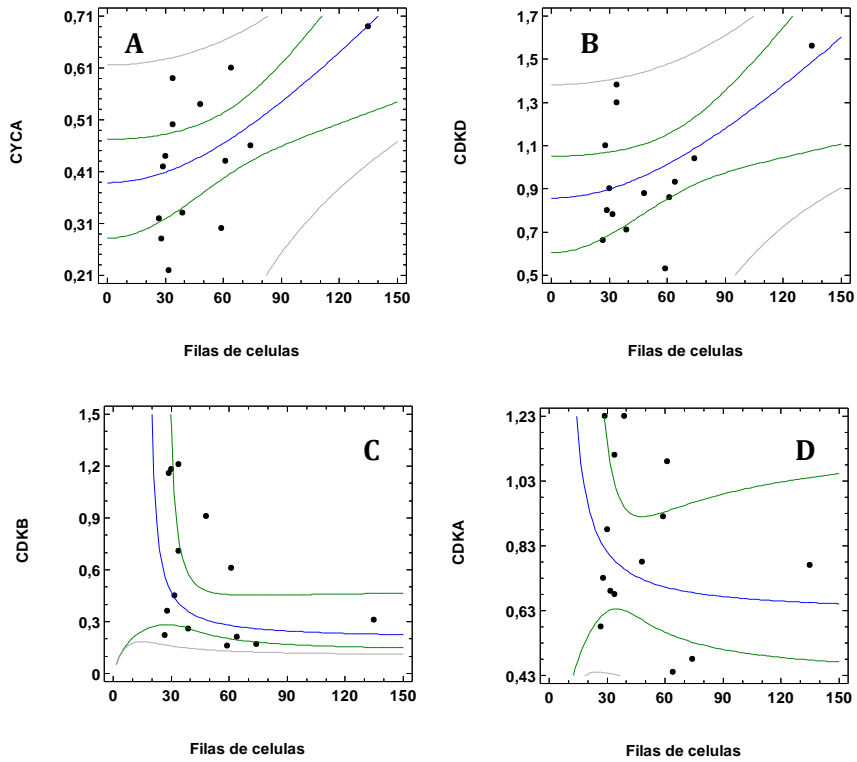


Figura 5: Correlación entre la expresión de las secuencias CYC y CDK analizadas con el número de filas de células en el mesocarpo. Los modelos ajustados para CYCA y CDKD son estadísticamente significativos con un valor de P de 0.01, 0.02, y un coeficiente de correlación r de 0.65 y 0.60, respectivamente. Los modelos ajustados para *CDKB* y *CDKA* no son estadísticamente significativos ($P (CDKB) = 0.11$; $r (CDKB) = -0,43$; $P (CDKA) = 0.40$; $r (CDKA) = -0.24$). Las tablas del ANOVA se muestran en el anejo I.

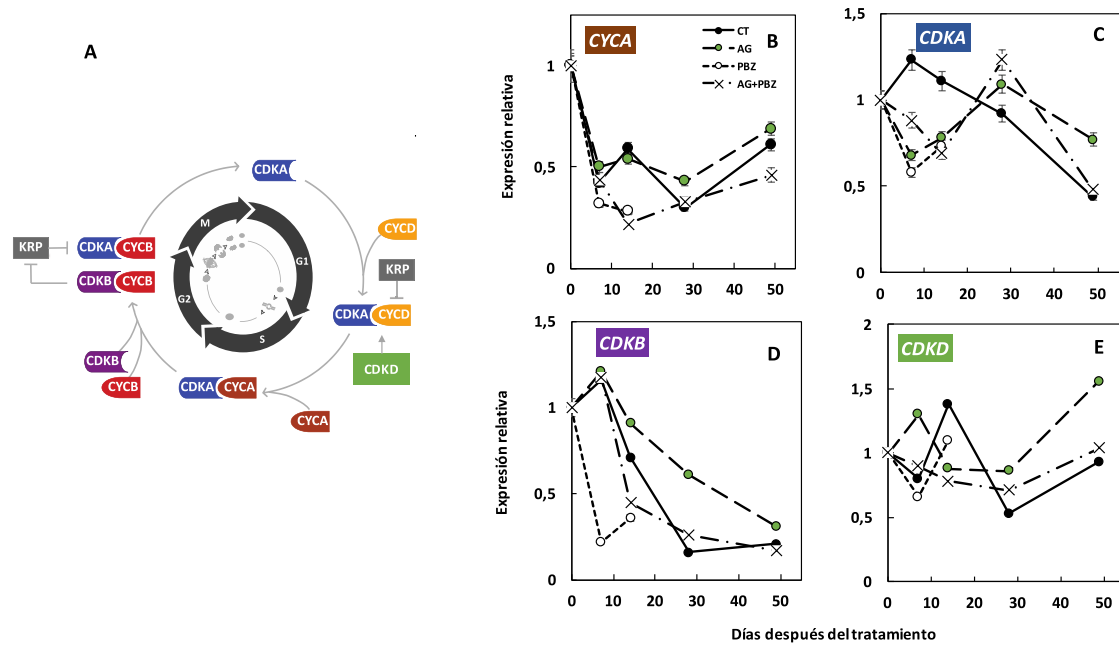


Figura 5: A) Esquema del ciclo celular (Adaptado de Scofield et al., 2014). (B-E): Efecto de la aplicación de GA3, GA3+PBZ y PBZ sobre la expresión de los genes CYCA1;1, CDKA, CDKB y CDKD en ovarios de mandarina Clementina cv. 'Clemenules'. Los tratamientos se realizaron cuando las flores habían perdido los pétalos con AG (5 mg l⁻¹) y PBZ (1000 mg). Cada valor es la media de 3 réplicas técnicas, realizadas a partir de una muestra homogénea de 10 frutos por tratamiento en cada fecha. Las barras verticales muestran los errores estándar.

5. CONCLUSIONES

Atendiendo a la hipótesis de trabajo y los objetivos principales de este TFM, las conclusiones obtenidas son las siguientes:

1. La aplicación exógena de GA_3 estimula la división celular y el peso del ovario 2 semanas después del tratamiento, pero su efecto principal se pospone 4 semanas.
2. Cuatro semanas después del tratamiento, el GA_3 reprime la expresión del gen *GA20ox2* y estimula la expresión de los genes *GA3ox1* y *GA2ox3*. La inhibición del inicio de la ruta de síntesis de GAs mediante PBZ no impide que el GA_3 realice su acción.
3. La evolución de la expresión de los genes *CYCA* (Ciclev10003984m) y *CDKD* (Ciclev10008533m) correlaciona positivamente con la división celular, y se estimula 4 semanas después del tratamiento con GA_3 .

6. BIBLIOGRAFIA

- Agustí, M., García-Marí, F., y Guardiola, J. L. (1982). Gibberellic acid and fruit set in sweet orange. *Scientia horticulturae*, 17(3), 257-264.
- Agustí, M., García-Marí, F., y Guardiola, J. L. (1982). The influence of flowering intensity on the shedding of reproductive structures in sweet orange. *Scientia Horticulturae*, 17(4), 343-352.
- Agustí, M. (2003). *Citricultura* (No. 634.3 A3).
- Asahina, M., Iwai, H., Kikuchi, A., Yamaguchi, S., Kamiya, Y., Kamada, H., y Satoh, S. (2002). Gibberellin produced in the cotyledon is required for cell division during tissue reunion in the cortex of cut cucumber and tomato hypocotyls. *Plant Physiology*, 129(1), 201-210.
- Ben-Cheikh, W., Perez-Botella, J., Tadeo, F. R., Talon, M., y Primo-Millo, E. (1997). Pollination increases gibberellin levels in developing ovaries of seeded varieties of citrus. *Plant Physiology*, 114(2), 557-564.
- Bermejo, A., Granero, B., Mesejo, C., Reig, C., Tejedo, V., Agustí, M., y Iglesias, D. J. (2017). Auxin and Gibberellin Interact in Citrus Fruit Set. *Journal of Plant Growth Regulation*, 1-11.
- Bermejo, A., Martínez-Alcántara, B., Martínez-Cuenca, M. R., Yuste, R., Mesejo, C., Reig, C., y Iglesias, D. J. (2016). Biosynthesis and Contents of Gibberellins in Seeded and Seedless Sweet Orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) Cultivars. *Journal of Plant Growth Regulation*, 35(4), 1036-1048.
- Bondada, B. R. (2011). Anomalies in structure, growth characteristics, and nutritional composition as induced by 2, 4-dichlorophenoxy acetic acid drift phytotoxicity in grapevine leaves and clusters. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 136(3), 165-176.
- Cheng, Y., Liu, H., Cao, L., Wang, S., Li, Y., Zhang, Y., ... y Wang, H. (2015). Down-regulation of multiple CDK inhibitor ICK/KRP genes promotes cell proliferation, callus induction and plant regeneration in Arabidopsis. *Frontiers in plant science*, 6, 825.
- De Veylder, L., Beeckman, T., Inze, D., Van Camp, W., y Krols, L. (2007). *U.S. Patent No. 7,265,267*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Dorcey, E., Urbez, C., Blázquez, M. A., Carbonell, J., y 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(2), 318-332.
- Early, J. D., y Martin, G. C. (1988, July). Transport and accumulation of paclobutrazol in peach seedlings. In *VI International Symposium on Growth Regulators in Fruit Production* 239 (pp. 73-76).
- Ebadi, A., Rezaei, M., y Fatahi, R. (2010). Mechanism of seedlessness in Iranian seedless barberry (*Berberis vulgaris* L. var. asperma). *Scientia horticulturae*, 125(3), 486-493.

Fabian, T., Lorbiecke, R., Umeda, M., y Sauter, M. (2000). The cell cycle genes *CYCA1; 1* and *cdc2Os-3* are coordinately regulated by gibberellin in planta. *Planta*, 211(3), 376-383.

Fos, M., Nuez, F., y García-Martínez, J. L. (2000). The gene *pat-2*, which induces natural parthenocarpy, alters the gibberellin content in unpollinated tomato ovaries. *Plant physiology*, 122(2), 471-480.

Fos, M., Proaño, K., Nuez, F., y García-Martínez, J. L. (2001). Role of gibberellins in parthenocarpic fruit development induced by the genetic system *pat-3/pat-4* in tomato. *Physiologia plantarum*, 111(4), 545-550.

García-Papi, M. A., y García-Martínez, J. L. (1984). Endogenous plant growth substances content in young fruits of seeded and seedless Clementine mandarin as related to fruit set and development. *Scientia horticultrae*, 22(3), 265-274.

Gillaspy, G., Ben-David, H., y Gruissem, W. (1993). Fruits: a developmental perspective. *The Plant Cell*, 5(10), 1439.

Goodwin, J. S., Messner, R. P., y Peake, G. T. (1978). Prostaglandin suppression of mitogen-stimulated lymphocytes in vitro: changes with mitogen dose and preincubation. *The Journal of clinical investigation*, 62(4), 753-760.

Gou, X., Wang, G., Kong, X., Wexler, D., Horvat, J., Yang, J., y Park, J. (2008). Flutelike Porous Hematite Nanorods and Branched Nanostructures: Synthesis, Characterisation and Application for Gas-Sensing. *Chemistry-A European Journal*, 14(19), 5996-6002.

Gutierrez, C. (2005). Coupling cell proliferation and development in plants. *Nature Cell Biology*, 7(6), 535.

<http://www.fao.org/economic/est/est-commodities/citricos/es/>

Inzé, D., y De Veylder, L. (2006). Cell cycle regulation in plant development. *Annu. Rev. Genet.*, 40, 77-105.

John, P. C. (1996). The plant cell cycle: conserved and unique features in mitotic control. In *Progress in cell cycle research* (pp. 59-72). Springer, Boston, MA.

Keaton, M. A., Bardes, E. S., Marquitz, A. R., Freel, C. D., Zyla, T. R., Rudolph, J., y Lew, D. J. (2007). Differential susceptibility of yeast S and M phase CDK complexes to inhibitory tyrosine phosphorylation. *Current Biology*, 17(14), 1181-1189.

Kobayashi, M., MacMillan, J., Phinney, B., Gaskin, P., Spray, C. R., y Hedden, P. (2000). Gibberellin biosynthesis: metabolic evidence for three steps in the early 13-hydroxylation pathway of rice. *Phytochemistry*, 55(4), 317-321.

Malladi, A., y Johnson, L. K. (2010). Expression profiling of cell cycle genes reveals key facilitators of cell production during carpel development, fruit set, and fruit growth in apple (*Malus domestica* Borkh.). *Journal of experimental botany*, 62(1), 205-219.

McClure, B. A., Gray, J. E., Anderson, M. A., y Clarke, A. E. (1990). Self-incompatibility in *Nicotiana glauca* involves degradation of pollen rRNA. *Nature*, 347(6295), 757.

- Mehouachi, J., Serna, D., Zaragoza, S., Agusti, 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 Science*, 107(2), 189-197.
- Menges, M., De Jager, S. M., Gruissem, W., y Murray, J. A. (2005). Global analysis of the core cell cycle regulators of Arabidopsis identifies novel genes, reveals multiple and highly specific profiles of expression and provides a coherent model for plant cell cycle control. *The Plant Journal*, 41(4), 546-566.
- Mesejo, C., Martínez-Fuentes, A., Reig, C., y Agustí, M. (2007). The effective pollination period in 'Clemenules' mandarin, 'Owari' Satsuma mandarin and 'Valencia' sweet orange. *Plant science*, 173(2), 223-230.
- Mesejo, C., Rosito, S., Reig, C., Martínez-Fuentes, A., y Agustí, M. (2012). Synthetic auxin 3, 5, 6-TPA provokes citrus clementina (Hort. ex Tan) fruitlet abscission by reducing photosynthate availability. *Journal of plant growth regulation*, 31(2), 186-194.
- Mesejo, C., Muñoz-Fambuena, N., Reig, C., Martínez-Fuentes, A., y Agustí, M. (2014). Cell division interference in newly fertilized ovules induces stenospermocarpy in cross-pollinated citrus fruit. *Plant Science*, 225, 86-94.
- Mesejo, C., Yuste, R., Reig, C., Martínez-Fuentes, A., Iglesias, D. J., Muñoz-Fambuena, N., y Agustí, M. (2016). Gibberellin reactivates and maintains ovary-wall cell division causing fruit set in parthenocarpic Citrus species. *Plant Science*, 247, 13-24.
- Mironov, V., De Veylder, L., Van Montagu, M., y Inzé, D. (1999). Cyclin-dependent kinases and cell division in plants—the nexus. *The Plant Cell*, 11(4), 509-521.
- Nigg, E. A. (1995). Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioessays*, 17(6), 471-480.
- Nitsch, J. P., y Ohyama, K. (1971). Obtention de plantes à partir de protoplastes haploïdes cultivés in vitro. *Acad Sci Paris CR Ser D*.
- Okushima, Y., Shimizu, K., Ishida, T., Sugimoto, K., y Umeda, M. (2014). Differential regulation of B2-type CDK accumulation in Arabidopsis roots. *Plant cell reports*, 33(7), 1033-1040.
- Pharis, R. P., y King, R. W. (1985). Gibberellins and reproductive development in seed plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 36(1), 517-568.
- Rieu, I., Eriksson, S., Powers, S. J., Gong, F., Griffiths, J., Woolley, L., ... y Phillips, A. L. (2008). Genetic analysis reveals that C19-GA 2-oxidation is a major gibberellin inactivation pathway in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 20(9), 2420-2436.
- Ross, C., y Salisbury, F. (1994). Fisiología vegetal. *Iberoamericana, México*. 759pp.
- Saito, A., Fukasawa Akada, T., Igarashi, M., Sato, T., y Suzuki, M. (2007). Self-compatibility of 3 apple [*Malus pumila*] cultivars and identification of S-allele genotypes in their self-pollinated progenies. *Horticultural Research (Japan)*.

- Sanzol, J., y Herrero, M. (2001). The “effective pollination period” in fruit trees. *Scientia Horticulturae*, 90(1), 1-17.
- Schneider, H. (1968). The anatomy of Citrus. *The citrus industry*, 1-85.
- Schijlen, E. G., de Vos, C. R., Martens, S., Jonker, H. H., Rosin, F. M., Molthoff, J. W., ... y Bovy, A. G. (2007). RNA interference silencing of chalcone synthase, the first step in the flavonoid biosynthesis pathway, leads to parthenocarpic tomato fruits. *Plant Physiology*, 144(3), 1520-1530.
- Segura, J. (2000). Introducción al desarrollo. Concepto de hormona vegetal, en: *Fundamentos Fisiología Vegetal*, 233-265.
- Stern, B., y Nurse, P. (1996). A quantitative model for the cdc2 control of S phase and mitosis in fission yeast. *Trends in Genetics*, 12(9), 345-350.
- Swiatek, W., Tsai, I. C., Klimowski, L., Pepler, A., Barnette, J., Yost, H. J., y Virshup, D. M. (2004). Regulation of casein kinase I ϵ activity by Wnt signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 279(13), 13011-13017.
- Taiz, L., y Zeiger, E. (2006). *Fisiología vegetal* (Vol. 10). Universitat Jaume I.
- Talón, M., Hedden, P., y Primo-Millo, E. (1990a). Gibberellins in Citrus sinensis: A comparison between seeded and seedless varieties. *Journal of Plant Growth Regulation*, 9(1), 201-206.
- Talón, M., Zacarias, L., y Primo-Millo, E. (1990b). Hormonal changes associated with fruit set and development in mandarins differing in their parthenocarpic ability. *Physiologia Plantarum*, 79(2), 400-406.
- Talón, M., Zacarias, L., y Primo-Millo, E. (1992). Gibberellins and parthenocarpic ability in developing ovaries of seedless mandarins. *Plant physiology*, 99(4), 1575-1581.
- Vardi, A., Levin, I., y Carmi, N. (2008). Induction of seedlessness in citrus: from classical techniques to emerging biotechnological approaches. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 133(1), 117-126.
- Wang, H., Schauer, N., Usadel, B., Frasse, P., Zouine, M., Hernould, M., ... y Bouzayen, M. (2009). Regulatory features underlying pollination-dependent and-independent tomato fruit set revealed by transcript and primary metabolite profiling. *The Plant Cell*, 21(5), 1428-1452.
- Yamaguchi, S. (2008). Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59, 225-251.
- Yoshizumi, T., Nagata, N., Shimada, H., y Matsui, M. (1999). An Arabidopsis cell cycle-dependent kinase-related gene, CDC2b, plays a role in regulating seedling growth in darkness. *The Plant Cell*, 11(10), 1883-1895.

