

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA Y
DEL MEDIO NATURAL



LA ACCIÓN DE LAS GIBERELINAS EN LA DIFERENCIACIÓN FLORAL DE LOS CÍTRICOS (Citrus spp.)

TRABAJO FIN DE MÁSTER
MÁSTER UNIVERSITARIO EN INGENIERÍA AGRONÓMICA

Alumno: Vicente Pascual Quesada
Tutor: Carlos Mesejo Conejos

Curso académico: 2020-2021

VALENCIA, 15 de Junio de 2021

LA ACCIÓN DE LAS GIBERELINAS EN LA DIFERENCIACIÓN FLORAL DE LOS CÍTRICOS (*Citrus spp.*)

Resumen:

La producción de cítricos sufre variaciones debido a factores exógenos como los climáticos, a factores económicos en los lugares de producción y, principalmente, a factores fisiológicos que determinan la relación entre la floración y la cosecha. Esto último es debido a dos tipos de problemas: 1) variedades que presentan un exceso de floración y baja capacidad de cuajado, dando lugar a ciclos improductivos (OFF), y 2) variedades que presentan una falta de floración tras una cosecha elevada, dando lugar a ciclos bianuales de producción conocidos como **alternancia de cosechas** o **vecería**, lo cual se da con mayor intensidad en variedades de recolección tardía. Esto ocurre ya que la presencia del fruto durante el periodo de inducción floral (noviembre) activa el gen inhibidor de la floración *CcMADS19* en las hojas, provocando la represión del gen promotor de la floración *FLOWERING LOCUS T (CiFT3)*. Después, en el momento de la diferenciación floral, el fruto inhibe la brotación y la expresión de los genes responsables de la diferenciación, *LEAFY (CsLFY)* y *APETALLA1 (CsAPI)*, en las yemas. Todo ello anula la floración, iniciando el año OFF.

Los tratamientos agronómicos que reducen la intensidad de floración fallan en estas situaciones extremas, de exceso de flores, lo que dificulta resolver el problema. La técnica empleada para regular el exceso de floración se basa en la aplicación de ácido giberélico (AG). El género citrus presenta dos momentos de sensibilidad: el primero, durante la inducción floral, el AG interfiere en la expresión del gen *CiFT3* pero sin activar al gen inhibidor *CcMADS19*. El segundo, y menos estudiado, durante la diferenciación floral, el AG reduce la brotación y la floración de un modo similar a como lo hace el fruto.

Para avanzar en el conocimiento del control de la floración en los cítricos, en este TFM, se ha estudiado el efecto de la aplicación de AG en la diferenciación floral, del naranjo y el mandarino. Para ello, se han realizado aplicaciones localizadas de AG a yemas de brotes sin fruto, y se ha determinado el efecto inhibitorio sobre la brotación, la floración, y sobre la expresión de los genes de la diferenciación floral, la división celular y los genes relacionados con el mantenimiento del meristemo vegetativo y crecimiento indeterminado, en comparación con ramas sin tratar y ramas con fruto.

Palabras clave: cítricos, floración, *CEN*, giberelinas, diferenciación, *LFY*, *API*

Alumno: D. Vicente Pascual Quesada

Tutor: D. Carlos Mesejo Conejos

Valencia, 15 de Junio de 2021

THE ACTION OF THE GIBBERELINES IN THE FLORAL DIFFERENTIATION OF CITRUS (*Citrus spp.*)

Abstract:

Citrus production suffer variations due to exogenous factors such as climatic, economic and, mainly, physiological factors that determine the relationship between flowering and harvest. The latter is due to two types of problems: 1) varieties that present excessive flowering and low fruit set capacity, leading to unproductive cycles (OFF), and 2) varieties that present a lack of flowering after a high harvest, giving rise to biannual production cycles known as alternation bearing, which occurs with greater intensity in late-harvest varieties. This occurs since the presence of the fruit during the floral induction period (November) activates the flowering inhibitor gene *CcMADS19* in the leaves, causing the repression of the flowering promoter gene *FLOWERING LOCUS T (CiFT3)*. Later, at the time of floral differentiation, the fruit inhibits bud sprouting and the expression of the genes responsible for differentiation, *LEAFY (CsLFY)* and *APETALLA1 (CsAPI)*, in the buds. All this cancels the flowering ability, starting the year OFF.

Agronomic treatments that reduce flowering intensity fail in these extreme situations, with excess flowers, making it difficult to solve the problem. The technique used to regulate excess flowering is based on the application of gibberellic acid (GA). The genus *Citrus* presents two moments of sensitivity: the first, during floral induction, the GA interferes in the expression of the *CiFT3* gene but without activating the inhibitor gene *CcMADS19*. The second, and less studied, during floral differentiation, GA reduces bud sprouting and flowering in a similar way to how the fruit does.

In order to advance in the knowledge of the control of flowering in citrus, in this TFM, the effect of the application of GA on flower differentiation of orange and mandarin trees has been studied. To do so, localized applications of GA have been made to buds of shoots without fruit, and studied the inhibitory effect on bud sprouting, flowering, and on the expression of cell division and meristem identity genes, those related with flowering, and others related with the maintenance of the vegetative meristem and indeterminate growth. Untreated branches and branches with fruit were used as flowering and non-flowering controls, respectively.

Key words: citrus, flowering, *CEN*, gibberellins, differentiation, *LFY*, *API*

Student: Vicente Pascual Quesada

Tutor: Carlos Mesejo Conejos

Valencia, 15 June 2021

Índices

ÍNDICE

I. Introducción	1
1. La producción de los cítricos. Justificación del problema	1
2. La floración en los cítricos	2
3. Factores promotores de la floración	4
4. Factores inhibidores de la floración. Las giberelinas	5
5. Hipótesis del trabajo y objetivos	8
II. Material y métodos	9
1. Material vegetal y diseño del experimento	9
2. Determinación de la expresión génica	10
2.1. Toma y procesado de muestras.....	10
2.2. Extracción de mRNA	10
2.3. Elección de genes de interés y sus cebadores.....	11
2.4. Rt-qPCR	12
2.5. Análisis estadístico	12
III. Resultados	13
1. Efecto de la aplicación de AG sobre la brotación y la floración del naranjo ‘Chislett’	13
2. Efecto de la aplicación de AG sobre la expresión de los genes de la diferenciación en las yemas del naranjo ‘Chislett’.....	16
3. Efecto de la aplicación de AG sobre la brotación y floración del mandarino ‘Nadorcott’.....	19
4. Efecto de la aplicación de AG sobre la expresión de los genes de la diferenciación en las yemas del mandarino ‘Nadorcott’.....	22
5. Estado fenológico de las yemas en el momento del tratamiento y su evolución.....	25
IV. Discusión.....	30
V. Conclusiones	34
VI. Bibliografía.....	35

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. El control de la floración en Cítricos está regulado por la carga de frutos, el control epigenético y el control hormonal (GA). CT: árboles control; PBZ: árboles tratados con paclobutrazol; GA: árboles tratados con GA₃; ON: árboles de alto rendimiento de frutos; OFF: árboles de bajo rendimiento de frutos; FLC: FLOWERING LOCUS C. Fuente: Tesis Doctoral Muñoz-Fambuena, 2015..... 8
- Figura 2. Aplicación localizada de ácido giberélico (AG) a yemas..... 9
- Figura 3. Efecto de la aplicación localizada de AG (25 mg l⁻¹) a las yemas de ramas sin fruto (OFF) sobre la intensidad de brotación y floración del naranjo cv. 'Chislett'. El efecto inhibitorio se compara con ramas con fruto (ON). Los tratamientos se realizaron el 15/1. Cada valor es la media de entre 25 y 46 ramas por tratamiento. Las barras verticales indican la mínima diferencia significativa (LSD). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (P<0,05). 14
- Figura 4. Efecto de la aplicación localizada de AG (25 mg l⁻¹) a las yemas de ramas sin fruto (OFF) sobre los tipos de brotes formados en el naranjo cv. 'Chislett'. El efecto inhibitorio se compara con ramas con fruto (ON). Los tratamientos se realizaron el 15/1. Cada valor es la media de entre 25 y 46 ramas por tratamiento. Las barras verticales indican la mínima diferencia significativa (LSD). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (P<0,05). 15
- Figura 5. Efecto de la aplicación localizada de AG (25 mg l⁻¹) a las yemas de ramas sin fruto (OFF) sobre el número de flores y brotes por nudo, en función de su posición en la rama del naranjo cv. 'Chislett'. Los tratamientos se realizaron el 15/1. Cada valor es la media de entre 25 y 46 ramas por tratamiento. Las barras verticales indican el error estándar. 15
- Figura 6. Efecto de la aplicación localizada de AG (25 mg l⁻¹) a las yemas de ramas sin fruto (OFF) sobre la distribución de tipos de brotes por nudo brotado del naranjo cv. 'Chislett'. El efecto inhibitorio se compara con ramas con fruto (ON). Los tratamientos se realizaron el 15/1. Cada valor es la media de entre 25 y 46 ramas por tratamiento. Las barras verticales indican el error estándar. 16
- Figura 7. Efecto de la presencia del fruto (ON) y la aplicación localizada de AG (25 mg l⁻¹) a las yemas de ramas sin fruto (OFF) sobre la expresión de los genes responsables de la identidad floral, API (A) y LFY (B), en la época de diferenciación floral del naranjo cv. 'Chislett'. Cada valor representa el promedio de 3 réplicas biológicas. Las barras verticales indican el error estándar. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre tratamientos. 17
- Figura 8. Efecto de la presencia del fruto (ON) y la aplicación localizada de AG (25 mg l⁻¹) a las yemas de ramas sin fruto (OFF) sobre la expresión de los genes reguladores del meristemo CEN y TFL1 en el naranjo cv. 'Chislett'. Cada valor representa el promedio de 3 réplicas biológicas. Las barras verticales indican el error estándar. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre tratamientos. 18
- Figura 9. Efecto de la presencia del fruto (ON) y la aplicación localizada de AG (25 mg l⁻¹) a las yemas de ramas sin fruto (OFF) sobre la expresión del gen CYCB2, regulador de la división celular, en el naranjo cv. 'Chislett'. Cada valor representa el promedio de 3 réplicas biológicas. Las barras verticales indican el error estándar. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre tratamientos. 18
- Figura 10. Efecto de la aplicación localizada de AG (25 mg l⁻¹) a las yemas de ramas sin fruto (OFF) sobre la intensidad de brotación y floración del mandarino cv. 'Nadorcott'. El efecto inhibitorio se compara con ramas con fruto (ON). Los tratamientos se realizaron el 18/1. Cada valor es la media de entre 25 y 46 ramas por tratamiento. Las barras verticales indican la mínima diferencia significativa (LSD). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (P<0,05). 20
- Figura 11. Efecto de la aplicación localizada de AG (25 mg l⁻¹) a las yemas de ramas sin fruto (OFF) sobre los tipos de brotes formados en el mandarino cv. 'Nadorcott'. El efecto inhibitorio se compara con ramas con fruto (ON). Los tratamientos se realizaron el 18/1. Cada valor es la media de entre 25 y 46 ramas por tratamiento. Las barras verticales indican la mínima diferencia significativa (LSD). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (P<0,05). 21

Figura 12. Efecto de la aplicación localizada de AG (25 mg l⁻¹) a las yemas de ramas sin fruto (OFF) sobre el número de flores y brotes por nudo, en función de su posición en la rama del mandarino cv. 'Nadorcott'. Los tratamientos se realizaron el 18/1. Cada valor es la media de entre 25 y 46 ramas por tratamiento. Las barras verticales indican el error estándar. 21

Figura 13. Efecto de la aplicación localizada de AG (25 mg l⁻¹) a las yemas de ramas sin fruto (OFF) sobre la distribución de tipos de brotes por nudo brotado del mandarino cv. 'Nadorcott'. El efecto inhibitorio se compara con ramas con fruto (ON). Los tratamientos se realizaron el 15/1. Cada valor es la media de entre 25 y 46 ramas por tratamiento. Las barras verticales indican el error estándar. 22

Figura 14. Efecto de la presencia del fruto (ON) y la aplicación localizada de AG (25 mg l⁻¹) a las yemas de ramas sin fruto (OFF) sobre la expresión de los genes reguladores de la identidad floral, AP1 (A) y LFY (B), en la época de diferenciación floral en el mandarino cv. 'Nadorcott'. Los tratamientos se realizaron el 18/1. Cada valor representa el promedio de 3 réplicas biológicas. Las barras verticales indican el error estándar. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre tratamientos. 23

Figura 15. Efecto de la presencia del fruto (ON) y la aplicación localizada de AG (25 mg l⁻¹) a las yemas de ramas sin fruto (OFF) sobre la expresión de los genes reguladores del meristemo CEN y TFL1, en la época de diferenciación floral, en el mandarino cv. 'Nadorcott'. Los tratamientos se realizaron el 18/1. Cada valor representa el promedio de 3 réplicas biológicas. Las barras verticales indican el error estándar. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre tratamientos. 24

Figura 16. Efecto de la presencia del fruto (ON) y la aplicación localizada de AG (25 mg l⁻¹) a las yemas de ramas sin fruto (OFF) sobre la expresión del gen CYCB2, regulador de la división celular, en el mandarino cv. 'Nadorcott'. Los tratamientos se realizaron el 18/1. Cada valor representa el promedio de 3 réplicas biológicas. Las barras verticales indican el error estándar. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre tratamientos. 24

Figura 17. Evolución de la temperatura máxima, mínima y la acumulación de frío en las fincas del naranjo cv. 'Chislett' (A) y del mandarino cv. 'Nadorcott' (B). 26

Figura 18. Microfotografías del estado de las yemas en el momento del tratamiento. A y B: yemas de naranjo 'Chislett' de un brote con fruto (ON); C, D y E: yemas de naranjo 'Chislett' de la parte apical (C) y la parte basal (D y E) de un brote sin fruto (OFF); F: yema apical de mandarino 'Nadorcott' de un brote con fruto (ON); G y H: yemas de mandarino 'Nadorcott' de la parte apical (G) y la parte basal (H) de un brote sin fruto OFF. Microfotografías del estado de las yemas en el momento del muestreo. I y J: yemas de naranjo 'Chislett' de un brote sin fruto (OFF) (I) y de un brote tratado con AG (J); K y L: yemas del mandarino 'Nadorcott' de un brote con fruto (ON) (K) y sin fruto (OFF) (L). M: inicio de la brotación en los brotes ON del naranjo 'Chislett'. 28

Figura 19. Efecto de la presencia del fruto (ON) en la evolución temporal de la expresión del gen regulador de la identidad floral LFY y el gen regulador del meristemo CEN, en las yemas, en comparación a ramas sin fruto (OFF), en el naranjo cv. 'Chislett' (A y C) y en el mandarino cv. 'Nadorcott' (B y D). 29

Figura 20. (A) Los nudos de los cítricos son múltiples y poseen varias yemas axilares, una principal de mayor tamaño y otras menores (Tomado de Lord y Eckard, 1985). (B) Las diferencias en su estado fenológico podrían influir en la respuesta al tratamiento con AG. Si la yema principal ya ha iniciado la brotación el AG puede estimular su desarrollo a través de un aumento de la división celular. Las yemas menores pueden verse inhibidas bien directamente, por el efecto del AG, bien indirectamente, por el estímulo de la yema principal. AB: axillary bud; s: sépalo. 32

ÍNDICE DE TABLAS

I. Introducción

1. La producción de los cítricos. Justificación del problema

Los cítricos se cultivan en la mayoría de regiones tropicales y subtropicales de ambos hemisferios del planeta. Los principales productores del mundo son China, Brasil, y Estados Unidos, en los cuales se destina la mayoría de la producción al consumo interno, y a la industria del zumo y demás derivados de los frutos agrios. España se sitúa entre los cinco mayores productores de cítricos en el mundo, con una producción de 6,3 millones de toneladas en 2019/20, y como primer productor en la Unión Europea, siendo, además, el primer exportador de fruta para consumo en fresco. La producción total de cítricos exportados durante la campaña 2019/20 ascendió a 3,7 millones de toneladas, lo que supone el 60% de la producción total. Por especies, destaca la producción de naranjas dulces (*Citrus sinensis* L.), con 3,35 millones de toneladas, suponiendo cerca del 54% de la producción total, seguido de las mandarinas (*Citrus clementina* Hort ex Tan, *Citrus unshiu* Marc., *Citrus reticulata*, etc.) con una producción de 1,89 millones de toneladas, que representa el 30% del total, y, por último, el limón (*Citrus limon*) ocupando el 15% de la producción total.

La superficie dedicada al cultivo de cítricos en España es de 296.477 ha, lo que supone el 15% de la superficie dedicada a la producción hortofrutícola (MAPAMA., 2019). La Comunidad Valenciana es la comunidad autónoma con mayor superficie destinada a la producción de cítricos de España, alcanzando, en la campaña 2019/20, una superficie en producción de 140.159 ha, seguida de Andalucía con 81.314 ha y la Región de Murcia con 36.608 ha.

Las estimaciones realizadas por el Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente de producción de la cosecha 2020, campaña 2020/21, indican, respecto de la anterior, un ascenso en todos los cultivos en el documento “Avance, Superficies y Producciones de Cultivos”. El grupo de las mandarinas se sitúa en (+28,6%), debido sobre todo al fuerte ascenso de la clementina (+44,2 %). También asciende el limón (14,2 %), el pomelo (+12,9 %) y la naranja (+1,3 %). El problema de las variaciones en la producción de cítricos se deben a factores exógenos como los climáticos, a factores económicos en los lugares de producción y, principalmente, a factores fisiológicos que determinan la relación entre la floración y la cosecha. En este sentido, los cítricos

presentan dos tipos de problemas: 1) variedades que presentan un exceso de floración y baja capacidad de cuajado, dando lugar a ciclos improductivos, y 2) variedades que presentan una falta de floración tras una cosecha elevada, dando lugar a ciclos bianuales de producción conocidos como **alternancia de cosechas o vecería**. Tras un ciclo productivo (año ON), el árbol no florece, dando lugar a un ciclo improductivo (año OFF), e impidiendo obtener una producción estable a lo largo del tiempo. Además, cuando la producción es elevada, el excesivo número de frutos que llegan a desarrollarse no alcanzan un tamaño comercial, mientras que cuando son escasas los frutos presentan un tamaño excesivo y baja calidad comercial (Moss et al., 1977).

Los tratamientos agronómicos que aumentan o reducen la intensidad de floración en los cítricos fallan en estas situaciones extremas, exceso o ausencia de flores, lo que dificulta la resolución de los problemas de producción. La razón de ello es el complejo mecanismo endógeno de control de la floración, que consiste en la interacción entre múltiples niveles de regulación, genéticos, hormonales y nutricionales. Su estudio, por tanto, es necesario para la obtención de técnicas eficaces que controlen la floración en condiciones de campo. En la actualidad, ya es posible modificar temporalmente la expresión de genes con fines agronómicos, sin modificar el genoma, mediante la aplicación de tecnología RNA (Torti et al., 2021), lo que supone un cambio de paradigma de las técnicas agronómicas, que ha evolucionado del nivel nutricional al hormonal, durante el S.XX, y al genético en el S.XXI. En este TFM se estudia el efecto de la aplicación de ácido giberélico en la inhibición de la brotación y la diferenciación floral, y los genes que regulan el proceso.

2. La floración en los cítricos

Los meristemos axilares tienen 3 destinos posibles: 1) pueden quedar latentes (no brotar), o brotar, dando 2) brotes vegetativos (crecimiento indeterminado) o 3) brotes florales (crecimiento determinado). Que el meristemo alcance un destino u otro, depende, de condiciones ambientales y de la expresión de ciertos genes que pueden regular directamente el destino del mismo. Entre estos genes se encuentran *TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)* y *CENTRORADIALIS (CEN)*, los cuales actúan para mantener la indeterminación del meristemo, o lo que es lo mismo, que el destino del meristemo sea vegetativo (Pnueli et al., 1998; Mohamed et al., 2010). La floración implica la transición

de la etapa vegetativa a la reproductiva del meristemo apical o axilar en el momento más adecuado para su desarrollo. Para ello, se ha de producir la inducción y la diferenciación floral. En los cítricos, la inducción floral ocurre a finales del otoño, mientras que la diferenciación ocurre a finales del invierno, coincidiendo con la brotación (Lord y Eckhart, 1985). Los estudios moleculares recientes distinguen entre genes que regulan la inducción de la floración (el tiempo de floración) y aquellos que regulan los procesos de diferenciación floral (la identidad del meristemo) (Blázquez et al., 2006).

La **inducción floral** es el proceso a través del cual las yemas vegetativas son promovidas a florecer (Davenport, 1990). El proceso se localiza en las hojas, donde se genera una señal, el gen promotor de la floración *FLOWERING LOCUS T (FT)*, que se transporta al meristemo (Corbesier et al., 2007). El proceso se divide en dos fases: 1) una fase reversible en la que si se modifican las condiciones que determinan el desarrollo del proceso, no se da la iniciación floral y la yema continúa vegetativa, y 2) otra irreversible durante la cual, aunque se modifiquen las condiciones, el proceso de inducción floral se lleva a cabo dando lugar a la iniciación floral (Urbina, 2002).

La **diferenciación floral** es la transición anatómica y morfológica de los meristemas vegetativos a meristemas florales (Davenport, 1990). La proteína FT constituye una señal que se exporta de la hoja al meristemo, vía floema, donde tiene lugar la diferenciación floral (Notaguchi et al., 2008). Una vez llega al meristemo, forma un complejo heterodímero con la proteína *FLOWERING LOCUS D (FD)* y con ello activa los genes responsables de la diferenciación floral, *LEAFY (LFY)* y *APETALLA1 (API)*.

Los cambios en el meristemo vegetativo comienzan con un ensanchamiento y alisamiento de su porción apical seguido de la aparición de los primordios de sépalos. Las etapas siguientes del proceso morfogénico residen en la diferenciación de los primordios de pétalos, estambres y, por último, los carpelos (Bernier et al., 1993).

La **brotación** de los agrios en regiones subtropicales se concentra en tres periodos, separados por las estaciones de primavera, verano y otoño. La brotación de primavera es la que mayor importancia tiene por el desarrollo de flores útiles (a excepción de los limoneros). Se origina sobre ramas desarrolladas el año anterior, en las que la madera de otoño es la que brota más precozmente, en mayor proporción y produce brotes más largos,

seguida de la de verano y esta de la primavera del año anterior (Agustí, 2020). Un nudo brotado puede desarrollar un brote o más, dependiendo del número de yemas axilares que se desarrollen en cada nudo. Pero también puede no brotar y quedar latente, lo que ocurre con más frecuencia cuanto mayor es la edad de la rama en la que se encuentran (Guardiola et al., 1982).

Los brotes se pueden clasificar de acuerdo con el número de hojas y flores que contengan. Aquellos brotes multiflorales sin hojas reciben el nombre de Ramos de Flor (RF), y los que llevan varias hojas, Brotes Mixtos (BM); los uniflorales sin hojas se denominan Flores Solitarias (FS) y con hojas, Brotes Campaneros (BC); por último, los que solo contienen hojas se denominan Brotes Vegetativos (BV) (Agustí et al., 2020a).

3. Factores promotores de la floración

La floración en los cítricos es inducida por la baja temperatura y el estrés hídrico, mientras que la duración del día no tiene efecto (Lord y Eckart, 1985). Estas señales exógenas regulan la expresión de los genes *FT*, *LFY* y *API* (Nishikawa et al., 2007; Chica y Albrigo, 2013).

En cítricos, las bajas temperaturas durante el otoño inducen la floración de la primavera siguiente en condiciones de clima Mediterráneo (Valiente y Albrigo, 2004). Para ello, se han de presentar temperaturas no superiores a 20°C ni inferiores a 5°C, situándose las óptimas entre 10 y 15°C (Chica y Albrigo, 2013). El estímulo provocado por las bajas temperaturas se ha asociado con un aumento estacional en la expresión de *FT* en las hojas, lo que promueve la floración (Nishikawa et al., 2007). Más tarde, cuando vuelven a elevarse las temperaturas, el aumento de la expresión de los genes de identidad floral, *LFY* y *API* promueven la diferenciación (Nishikawa et al., 2007).

Por otro lado, en las zonas tropicales la floración es inducida por el estrés hídrico (Cassin et al., 1969). Durante la estación seca, aumenta la expresión en hojas de *FT* y una vez cesa el estrés, aquellos genes responsables de la diferenciación floral (*LFY* y *API*) aumentan, dándose lugar a la floración (Chica y Albrigo, 2013). Para que con el estrés hídrico se induzcan una gran cantidad de yemas, es necesario, aproximadamente, un mes

de duración de estrés (Davies y Albrigo, 1994). La rotura del estrés hídrico mediante el riego activa la expresión de *LFY* y *API* y la diferenciación (Chica y Albrigo, 2013).

4. Factores inhibidores de la floración. Las giberelinas

De acuerdo con los conocimientos actuales, todas las yemas de un árbol tienen la información suficiente para brotar y florecer; si no lo hacen es por la existencia de factores inhibidores que impiden su desarrollo floral (Goldschmidt et al., 1997; Martínez-Fuentes et al., 2004). Entre ellos, la carga de frutos, y su tiempo de permanencia en el árbol, actúan como fuertes inhibidores de la floración y brotación en numerosas especies de cítricos, aunque la respuesta varía entre cultivares (Monselise y Goldschmidt, 1982; Valiente y Albrigo, 2004 ; Martínez-Fuentes, 2010).

En cuanto a la brotación, la presencia de frutos reduce el número de yemas que brotan y el desarrollo vegetativo (Monselise y Goldschmidt, 1982). En cítricos que presentan alternancia de cosechas, el alto rendimiento de frutos inhibe el número de brotes y el crecimiento durante las tres brotaciones (primavera, verano y otoño), mientras que el bajo rendimiento de frutos (incluso cuando los frutos se eliminan artificialmente durante el desarrollo) restaura el crecimiento vegetativo (Verreynne y Lovatt, 2009; Martínez-Fuentes et al., 2010). Asimismo, los niveles de carbohidratos (azúcares solubles y almidón) en hojas, ramas y raíces son más bajos al final de los años ON que al final de los años OFF (Jones et al., 1975; Goldschmidt y Golomb, 1982). Estos dos efectos sugieren que los órganos vegetativos y reproductivos compiten por las reservas de nutrientes disponibles. La presencia del fruto pueden influir en la floración al reducir las reservas de carbohidratos (Goldschmidt y Golomb, 1982), no obstante, no se ha encontrado una correlación consistente entre los niveles de carbohidratos y la floración en los cítricos (Goldschmidt et al., 1985; García-Luis et al., 1988; Martínez-Fuentes et al., 2010).

El fruto comienza a ejercer un efecto inhibitorio sobre la floración desde el momento en que completa su desarrollo, e inicia el cambio de color, coincidiendo con el período de inducción floral (noviembre) (Martínez-Fuentes et al., 2010; Muñoz-Fambuena et al., 2011). La fruta que permanece en el árbol durante el período de inducción floral se correlaciona con niveles reducidos de expresión del gen *FT* (Muñoz-Fambuena et al.,

2011). Esto se debe al aumento de la expresión del gen *CcMADS19* (homólogo en los cítricos de *FLOWERING LOCUS C*, inhibidor de la floración en *Arabidopsis thaliana* (Seo et al., 2009)) que regula negativamente la expresión de *FT* en las hojas en el momento de la inducción floral (Agustí et al., 2020b); como consecuencia de lo anterior, el fruto interfiere en la expresión en las yemas de los genes *API* y *LFY*, responsables de la diferenciación floral.

Las giberelinas (GAs) son fitohormonas que desempeñan y regulan diversas funciones en el desarrollo de las plantas, tales como la germinación de las semillas, el alargamiento del tallo, la expansión de las hojas, el desarrollo del fruto y la floración (Achard y Genschik 2009, Daviere y Achard 2013, Wang et al., 2020). Desde que se descubrieron, en 1930, se han identificado más de 130 estructuras de giberelinas de las cuales la mayoría se encuentran inactivas en las plantas y solo unas pocas son bioactivas, como GA₁, GA₃, GA₄ y GA₇ (Yamaguchi, 2008). Las formas bioactivas desencadenan la transducción de señales que involucran a dos conjuntos de reguladores, las proteínas DELLA y los receptores de GAs (Olszewski et al., 2002). Las GAs bioactivas se unen al receptor de las mismas, GA-INTENSITIVE DWARF1 (GID1), y a continuación tras una serie de sucesos se degradan las proteínas DELLA y se desencadenan la respuesta de las GAs (McGinnis et al., 2003, Sasaki et al., 2003).

Tradicionalmente, las GAs, se han considerado inhibidores esenciales de la floración desde que Monselise y Halevy (1964) lograron reducir la floración en naranjo dulce cv. 'Shamouti'. La aplicación de ácido giberélico (AG) en cítricos muestra dos momentos de sensibilidad reduciendo la floración, espaciados temporalmente, e interfiriendo en dos procesos distintos de la misma. En ambos momentos se muestra una reducción en la brotación de yemas que originan inflorescencias. El primer momento de sensibilidad coincide con el periodo de inducción floral, durante el reposo invernal, de finales de noviembre a principios de diciembre, en el cual se impide la translocación desde la hoja al meristemo del gen promotor de la floración (*FT*). El segundo, y más corto, ocurre previo a la brotación, en el momento en el que comienzan a diferenciarse los primordios foliares (Monselise y Halevy, 1964; Guardiola et al., 1982). Su antagonista, el paclobutrazol (PBZ), un inhibidor sintético de la biosíntesis de GAs (Rademacher, 2000), promueve la floración en agrios (Delgado et al., 1986; Harty y Van Staden, 1988; Martínez-Fuentes et al., 2004; Monteiro da Cruz et al., 2008; Ogata et al., 1996). Esto

sugiere que las aplicaciones exógenas de GA₃ disminuyen los niveles de floración mediante la modificación del balance hormonal endógeno, como lo demuestra la aplicación de paclobutrazol aumentando la floración (Martínez-Fuentes et al. 2004). La aplicación de GA₃ promueve el crecimiento vegetativo a expensas del desarrollo reproductivo (Guardiola et al., 1982), llevándose a cabo una redistribución de los tipos de brotes, aumentando la proporción de brotes florales con hojas y disminuyendo aquellos brotes florales sin hojas (Agustí et al., 2020a). Además, el GA₃ reduce el número de yemas que brotan. Por el contrario, el PBZ aumenta significativamente el porcentaje de nudos brotados y el número de brotes florales, y reduce el número de brotes vegetativos (Mártinez-Fuentes et al., 2013). La coincidencia temporal del momento de inhibición del fruto y del GA₃ ha planteado la hipótesis de que el fruto inhibe la floración a través del metabolismo de las GAs.

No obstante, la efectividad de los tratamientos es limitada en condiciones extremas, precisamente, cuando es necesario dar una respuesta agronómica al exceso o falta de flores. Así, tratamientos con 25 mg l⁻¹ de GA₃ a árboles de mandarina ‘Fortune’ o tanger ‘Elendalle’ con una intensidad de floración muy elevada (de 200 flores por 100 nudos, cuando 30 flores por 100 nudos dan una cosecha óptima) redujeron la floración escasamente (a 180-190 flores por 100 nudos). El tratamiento con el doble de concentración tampoco resultó eficaz (Martínez-Fuentes et al., 2004). La aplicación de PBZ depende, también, del momento y tipo de tratamiento. Monselise y Goldschmidt (1982) sugirieron que el antagonista de las GAs debe llegar al sitio de síntesis de las mismas antes de que se produzcan. Además, el PBZ aumenta la floración en árboles OFF, pero a partir de un umbral de carga de fruta no es capaz de promover la floración a pesar de modificar la fecha de tratamiento. El decir, la presencia de muchos frutos (árboles ON) anula la respuesta del PBZ (Martínez-Fuentes et al, 2013). La hipótesis que pretende dar respuesta a este fenómeno indica, por un lado, que en árboles con rendimiento medio, la señal inhibidora del fruto no llega a muchas de las yemas del árbol, o llega con menor intensidad (*control cuantitativo*). Por lo tanto, en esas condiciones intermedias, se puede promover la floración (PBZ) aunque en menor medida que en los árboles OFF, y también reducirla eficazmente (con GA₃) (**Figura 1**) (Martínez-Fuentes et al., 2004; Muñoz-Fambuena, 2015). Pero, además, se ha sugerido otro *control cualitativo*, en el que el varios niveles de regulación endógena, nutricional, hormonal, genético y epigenético, están coordinados para determinar por un lado el *tiempo de floración* y, por otro, *la*

identidad del meristemo. La presencia del fruto activa la represión, por completo, de la floración en las yemas próximas, mientras que un tratamiento con GA₃ la reduce parcialmente, pero no la anula.

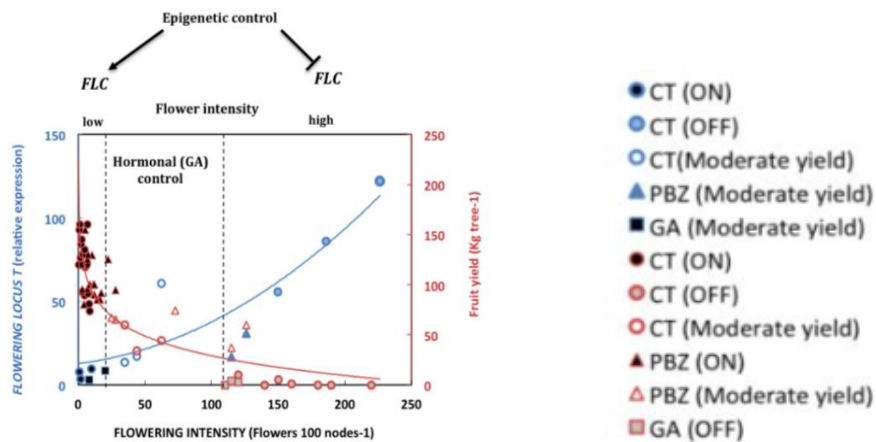


Figura 1. El control de la floración en Cítricos está regulado por la carga de frutos, el control epigenético y el control hormonal (GA). CT: árboles control; PBZ: árboles tratados con paclobutrazol; GA: árboles tratados con GA₃; ON: árboles de alto rendimiento de frutos; OFF: árboles de bajo rendimiento de frutos; FLC: FLOWERING LOCUS C. Fuente: Tesis Doctoral Muñoz-Fambuena, 2015.

5. Hipótesis del trabajo y objetivos

Por todo lo expuesto, y con el fin de ampliar el conocimiento de los mecanismos de inhibición de la floración de los cítricos, este TFM estudia el papel de las giberelinas en la identidad del meristemo durante la diferenciación. La hipótesis de trabajo es la siguiente: “El mecanismo de interferencia del ácido giberélico en la diferenciación floral se basa en el mantenimiento del meristemo vegetativo, y su eficacia depende del estado endógeno de las yemas en el momento del tratamiento”.

Los objetivos del presente Trabajo Final de Máster son:

1. Estudiar el efecto de la aplicación de AG, localizada en la yema, sobre la diferenciación floral del naranjo y el mandarino.
2. Estudiar la expresión de los genes que regulan la identidad floral del meristemo, la división celular y los genes relacionados con el mantenimiento del meristemo vegetativo y el crecimiento indeterminado, para explicar el efecto del tratamiento con AG, en comparación con ramas sin tratar (que florecen) y ramas con fruto (que no florecen).

II. Material y métodos

1. Material vegetal y diseño del experimento

El experimento se realizó en una explotación de naranjo dulce cv. 'Chislett' [*Citrus sinensis* (L.) Osb.], variedad de recolección tardía, injertado sobre patrón citrange Carrizo [*Citrus sinensis* (L.) Osb. x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.], situada en el término municipal de Torrent, provincia de Valencia, y en una explotación de mandarino híbrido cv. 'Nadorcott', también una variedad tardía, injertado sobre citrange Carrizo en la localidad de Pedralba, provincia de Valencia. En ambas plantaciones, el marco de plantación utilizado es de 6x4 metros con orientación norte-sur, y el manejo del cultivo se lleva a cabo mediante riego localizado, fertirrigación y control de plagas y enfermedades acorde a la normativa de producción integrada.

Se seleccionaron aleatoriamente 6 árboles con una cosecha elevada (ON) y 6 árboles con una cosecha escasa (OFF). En cada uno de los árboles ON se marcaron 10 brotes campaneros, es decir, con el fruto en posición terminal de un brote de primavera, con un mínimo de 5 nudos de longitud. En los árboles OFF, se seleccionaron 10 brotes vegetativos por árbol, de la brotación de verano-otoño con al menos 5 nudos de longitud. Además, en los árboles OFF se seleccionaron otros 10 brotes por árbol en los que se realizaron tratamientos localizados con ácido giberélico (AG, 25 mg·l⁻¹) a la yema con el fin de inhibir la floración. La aplicación a la yema se llevo a cabo con ayuda de un pincel fino depositando una gota en cada una de las yemas del brote (**Figura 2**). El tratamiento se realizó en enero, previamente a la diferenciación floral en el estado de desarrollo de yemas hinchadas (el 15/01/2021 en el caso del cv. 'Chislett' y el 18/01/2021 en el cv. 'Nadorcott').



Figura 2. Aplicación localizada de ácido giberélico (AG) a yemas.

Una vez transcurrida la brotación de primavera (16/02/2021 en el naranjo y el 24/02/2021 en el mandarino), se cuantificó la brotación y la floración de cada uno de los brotes, contando el número de brotes formados por cada nudo y distinguiendo los tipos de brotes: flor solitaria (una flor sin hojas), inflorescencia (una inflorescencia sin hojas), brote mixto (una inflorescencia con hojas), brote campanero (un brote con hojas y una flor en posición terminal) y brote vegetativo (sin flores). Los datos se expresan como

brotos o flores por 100 nudos contados con el fin de eliminar la variabilidad de tamaño entre las ramas elegidas.

Para estudiar el mecanismo de inhibición de la floración del tratamiento con AG, se llevaron a laboratorio, el mismo día de la aplicación de AG y 8-10 días después, 12 brotes de cada tratamiento para determinar la expresión de los genes relacionados con la brotación y la identidad floral o vegetativa del meristemo.

2. Determinación de la expresión génica

2.1. Toma y procesado de muestras

Los muestreos de campo se realizaron a la misma hora del día en ambas fechas, y las muestras se transportaron al laboratorio en una nevera a 4°C. Una vez allí, se separaron con un bisturí las yemas de las hojas, y se establecieron al azar tres réplicas biológicas por cada tratamiento, formadas por las yemas de cuatro brotes. Las réplicas, debidamente clasificadas y etiquetadas, se congelaron con N₂ líquido y se almacenaron a -80°C hasta el momento de la extracción del mRNA.

Finalmente, las muestras se molieron a polvo fino, con ayuda de N₂ líquido para conservar el material vegetal congelado en todo momento, y evitar la degradación del material génico, para llevar a cabo la extracción de mRNA.

2.2. Extracción de mRNA

La extracción de mRNA comprende todos los procesos necesarios para llevar a cabo la eliminación de compuestos que actúen como barreras físicas y químicas sobre el mRNA, tales como polifenoles, polisacáridos, proteínas, metabolitos secundarios y otros contaminantes como las sales inorgánicas y el fenol.

El protocolo de extracción de mRNA tiene una duración de dos días. La primera parte, realizada durante el primer día, consiste en pesar 0,5 gramos del material vegetal, en este caso yemas, ya molidas en polvo fino. Los 0,5 gramos de muestra se introducen en un tubo de 15 ml, al que también se añade 2 ml de TCES (0.2 Tris ph=8 + 0.2M NaCl + 50 mM EDTA + 2% SDS), 2 ml de fenol ácido y 40 µl β-mercaptoetanol. Seguidamente, se

homogeniza con ayuda del vórtex durante 1 minuto aproximadamente y se deposita en un baño con agua a 50°C durante 20 min, homogenizando la mezcla con el vórtex cada 5 minutos. Después, se centrifuga durante 20 minutos a 10.500 r.p.m y posteriormente se extrae el sobrenadante, con ayuda de una pipeta, y se deposita en otro tubo de 15 ml. Tras ello, se añade el mismo volumen al extraído de sobrenadante de cloroformo isoamílico (24:1), se pasa por el vórtex para homogenizar la solución, y se centrifuga 5 minutos a 10.500 r.p.m. El último paso del primer día es extraer el sobrenadante resultante tras la centrifuga, añadir la mitad del volumen extraído de LiCl 6M (DEPC), y dejarlo precipitar a -20°C durante toda la noche.

La segunda parte de la extracción de mRNA, realizada al día siguiente, comienza centrifugando la muestra durante 20 minutos a 10.500 r.p.m para obtener el precipitado en el fondo del tubo. El sobrenadante de LiCl se desecha y el precipitado se lava añadiendo 200 µl de EtOH 70% (a -20°C) y centrifugando, de nuevo, 5 minutos a 10.500 r.p.m. El sobrenadante de EtOH se elimina y se deja secar en aire durante 1 hora, y finalmente se suspende en con 100 µl de agua.

En último lugar, con ayuda del kit RNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen, USA), se pasa a la fase de purificación por columnas, siguiendo las instrucciones aportadas por el fabricante. Para cuantificar la calidad y la cantidad del mRNA libre obtenido, se utilizó un equipo NanoDrop ND-100 (NanoDrop Technologies).

2.3. Elección de genes de interés y sus cebadores

Los genes seleccionados para estudiar el modo de acción del AG en la inhibición de la floración son (**Tabla 1**):

1. los genes relacionados con la identidad floral del meristemo *LFY* y *API* (Blázquez et al., 2006).
2. los genes relacionados con el mantenimiento del meristemo vegetativo y el crecimiento indeterminado *TFL1* y *CEN* (Zhang et al., 2021).
3. el gen *CYCB2*, relacionado con la fase de mitosis del ciclo celular (Malladi and Johnson, 2011).

Tabla 1. Cebadores elegidos para el análisis de expresión génica.

Gen (YEMAS)	ID EST code ^a	Descripción	5'-3' Forward primer	5'-3' Reverse primer	Referencia
<i>CsLFY</i>	aC34107C06EF_c	Promotor de la diferenciación	TCTTGATCCAGGTCCAGAACATC	TAGTCACCTTGGTTGGGCATT	Blázquez et al., 2006
<i>CsAP1</i>	aCL9055Ccontig1	Promotor de la diferenciación	CAAAACCAGGTTCCCAACAC	ACGAACATACGGGTTCAAGG	
<i>CYCB2</i>	Ciclev10025564m	División celular	GAAAGCAGCAACAGGGAAGC	TCCAAAAGAAATTGCGCCGG	Malladi and Johnson, 2011
<i>CsTFL1</i>	Ciclev10013475m CDS	Identidad del meristemo	CCTCGCTGTTGGAAGAGTCA	AGAGCTCGTGCCATTGCAA	Zhang et al., 2021
<i>CsCEN</i>	Ciclev10029782m CDS	Identidad del meristemo	CCAGCTTCAAGGGATCGGTT	GAGCAGCAGTCTCCCTTTGT	
Gen (Referencia)					
Actina		Gen de referencia	CCGACCGTATGAGCAAGGAAA	TTCTGTGGACAATGGATGGA	Guo et al., 2016

^aEST code refers to the database entry available in Citrus Functional Genomics Project (CFGP; <http://bioinfo.ibmcp.upv.es/genomics/cfgrpDB/>)

2.4.Rt-qPCR

Para la cuantificación relativa mediante PCR se utilizó el kit QuantiTect[®] SYBR[®] Green PCR Kit (Qiagen), según las instrucciones del fabricante. Se utilizaron para cada muestra 2,5 µl provenientes de la reacción de retrotranscripción anterior. El programa utilizado fue de 15 minutos a 95 °C para la activación de la Hotstar Taq polimerasa, seguidos de 40 ciclos de 15 segundos a 94 °C (desnaturalización), 30 segundos a 60 °C (alineamiento) y 30 segundos a 72 °C (extensión). La fluorescencia se midió al final de la etapa de alineamiento. Los oligonucleótidos específicos para la amplificación de cada gen se emplearon a una concentración de 0,3 µM. Al final de cada qPCR se incluyó un paso final de análisis de la curva del punto de fusión, para detectar la presencia de dímeros o de amplificaciones inespecíficas. Se realizaron tres replicas técnicas de cada muestra de cDNA, incluyéndose por duplicado controles en los que el molde de cDNA se sustituyó por agua para detectar la posible presencia de contaminación o de formación de dímeros.

2.5.Análisis estadístico

Los resultados fueron evaluados 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), y el software Superplotsof data (<https://huygens.science.uva.nl/SuperPlotsOfData/>). A los valores porcentuales se le aplicó la transformación arcsen (\sqrt{p}).

III. Resultados

1. Efecto de la aplicación de AG sobre la brotación y la floración del naranjo ‘Chislett’

Las ramas OFF del naranjo ‘Chislett’ brotaron y florecieron intensamente a principios de febrero. Prácticamente el 100% de los nudos de las ramas seleccionadas brotaron (**Figura 3 A**), alcanzando una intensidad de floración de 660 flores · 100 nudos⁻¹ (**Figura 3 B**). Cuarenta de cada 100 nudos fueron múltiples (brotan varias yemas axilares) (**Figura 3 C**). Los tipos de brotes formados fueron mayoritariamente brotes multiflorales con hojas (75 brotes 100 nudos⁻¹) y sin hojas (60 brotes 100 nudos⁻¹) (**Figura 4 A y C**). Por otra parte, la presencia de flores solitarias, brotes campaneros y brotes vegetativos fue escasa (**Figura 4 B, D y E**).

La presencia del fruto (ramas ON) redujo significativamente el número de nudos brotados a la mitad y anuló los nudos múltiples y la floración (**Figura 3**), de modo que los nuevos brotes fueron exclusivamente vegetativos (**Figura 4 E**).

El tratamiento realizado con AG (25 mg l⁻¹), directamente sobre las yemas, provocó una reducción de la brotación y la floración similar al efecto del fruto (**Figura 3**). El número total de flores (107 flores · 100 nudos⁻¹) se redujo significativamente un 92% con respecto a las ramas OFF (**Figura 3 B**). Sin embargo, no consiguió impedirlo como sí hizo el fruto. Por otro lado, el AG también redujo significativamente el número de nudos brotados (59%) y el número de nudos múltiples (95%), con respecto a las ramas OFF, sin diferir significativamente del efecto del fruto (**Figura 3 A y C**). El efecto del AG sobre la floración no difirió significativamente en función de la posición del nudo en la rama, en los 6 primeros nudos (**Figura 5 A**). Los nudos que se encontraban en la parte basal no florecieron. El efecto del AG sobre la brotación también fue más intenso en la parte basal de la rama (**Figura 5 B**).

Atendiendo al efecto sobre los tipos de brotes, se observa, por una parte, que el tratamiento con AG redujo las inflorescencias sin hojas, con respecto a las ramas sin tratar (**Figura 4 A**). Pero fue el número de inflorescencias con hojas el más afectado por el tratamiento, que se redujo significativamente en un 90% (**Figura 4 C**). Las flores campaneras y las solitarias no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre

las ramas tratadas con AG y las ramas sin tratar (**Figura 4 B y D**). Finalmente, el tratamiento aumentó el número de brotes vegetativos, aunque sin alcanzar el efecto provocado por el fruto, que difirió significativamente de las ramas OFF y tratadas con AG (**Figura 4 E**).

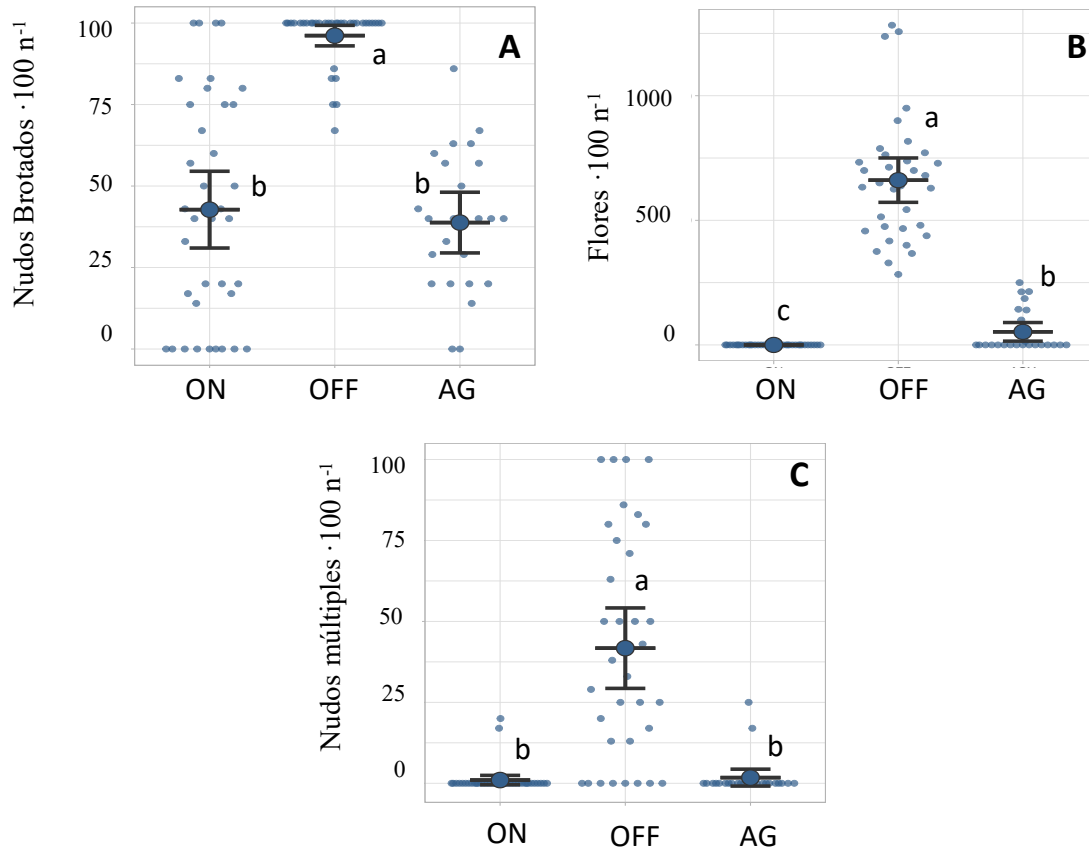
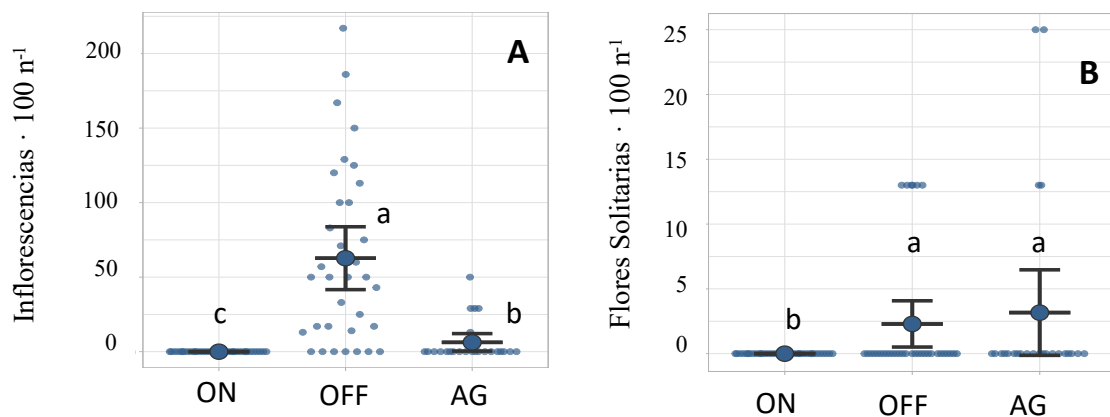


Figura 3. Efecto de la aplicación localizada de AG (25 mg l⁻¹) a las yemas de ramas sin fruto (OFF) sobre la intensidad de brotación y floración del naranjo cv. 'Chislett'. El efecto inhibitorio se compara con ramas con fruto (ON). Los tratamientos se realizaron el 15/1. Cada valor es la media de entre 25 y 46 ramas por tratamiento. Las barras verticales indican la mínima diferencia significativa (LSD). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (P<0,05).



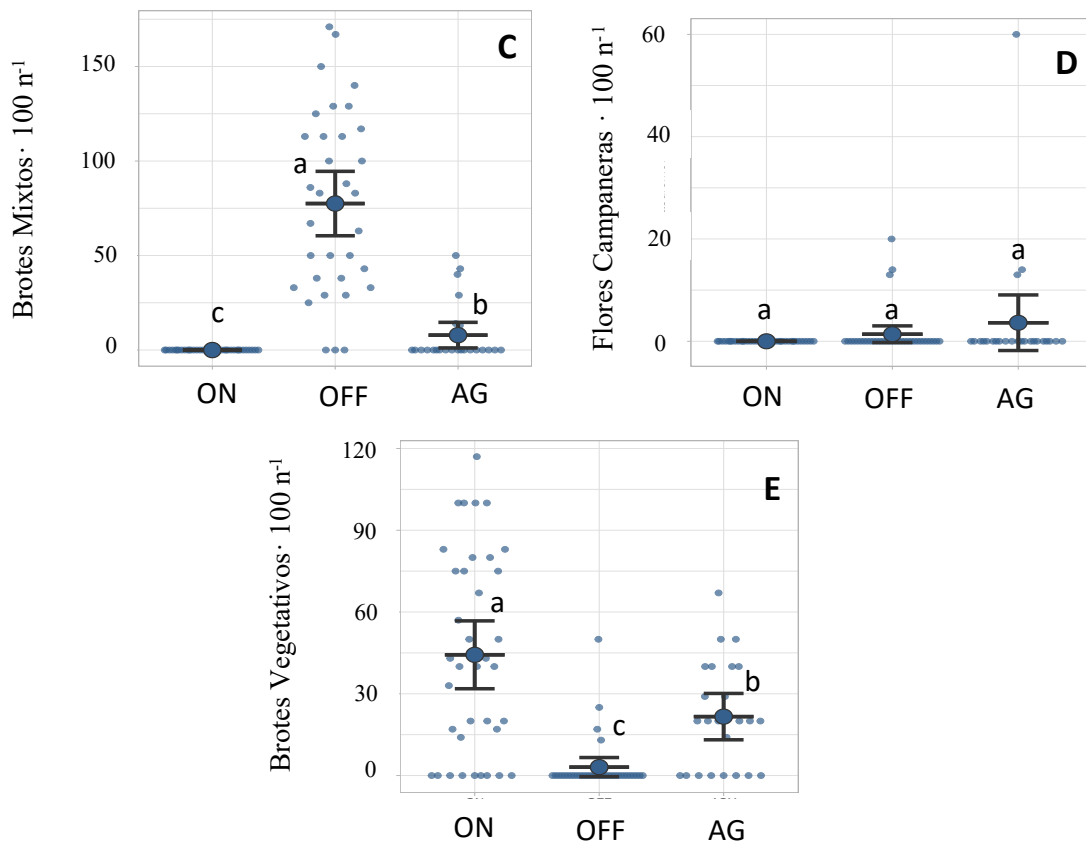


Figura 4. Efecto de la aplicación localizada de AG (25 mg l^{-1}) a las yemas de ramas sin fruto (OFF) sobre los tipos de brotes formados en el naranjo cv. 'Chislett'. El efecto inhibitorio se compara con ramas con fruto (ON). Los tratamientos se realizaron el 15/1. Cada valor es la media de entre 25 y 46 ramas por tratamiento. Las barras verticales indican la mínima diferencia significativa (LSD). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

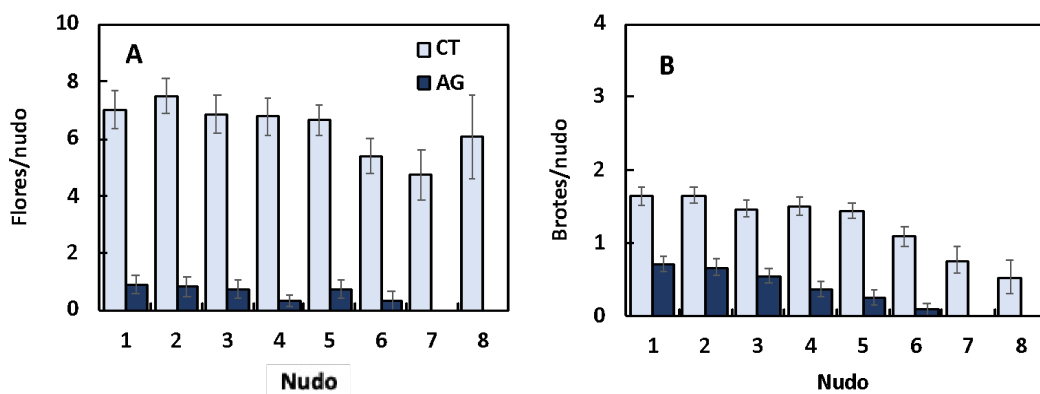


Figura 5. Efecto de la aplicación localizada de AG (25 mg l^{-1}) a las yemas de ramas sin fruto (OFF) sobre el número de flores y brotes por nudo, en función de su posición en la rama del naranjo cv. 'Chislett'. Los tratamientos se realizaron el 15/1. Cada valor es la media de entre 25 y 46 ramas por tratamiento. Las barras verticales indican el error estándar.

Los resultados, en términos absolutos, indican que el efecto inhibitorio del AG es doble, reduciendo el número de yemas brotadas y el número de flores por nudo, al reducir las inflorescencias (con y sin hojas) y aumentar el número de brotes vegetativos. El análisis de la floración en términos relativos a los nudos brotados, para independizarlo del efecto sobre la brotación, confirma el efecto sobre la redistribución de los tipos de brote por efecto del tratamiento, y su similitud al efecto del fruto. Así, mientras en la población de tipos de brotes de las ramas OFF predominaron las inflorescencias (0,6 por nudo brotado) y los brotes mixtos (0,8 por nudo brotado), en las ramas tratadas con AG la población se modificó, disminuyendo estos tipos de brotes (0,15 y 0,12, respectivamente), y aumentando los brotes vegetativos por nudo brotado (0,6), hasta un nivel similar al del fruto (0,7) (**Figura 6**).

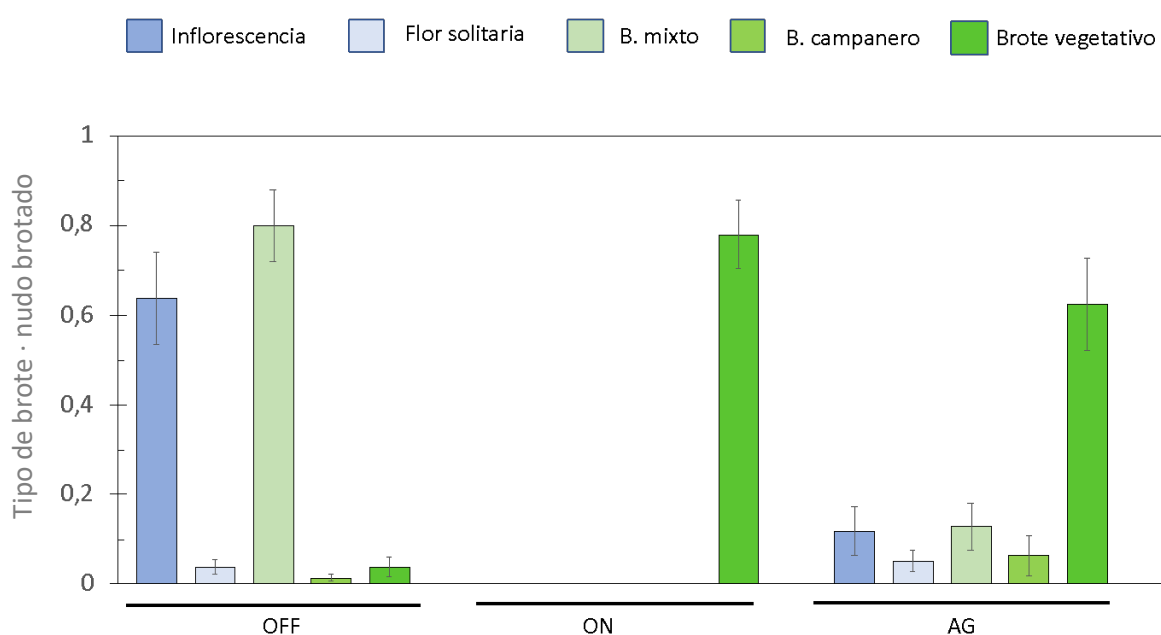


Figura 6. Efecto de la aplicación localizada de AG (25 mg l^{-1}) a las yemas de ramas sin fruto (OFF) sobre la distribución de tipos de brotes por nudo brotado del naranjo cv. 'Chislett'. El efecto inhibitorio se compara con ramas con fruto (ON). Los tratamientos se realizaron el 15/1. Cada valor es la media de entre 25 y 46 ramas por tratamiento. Las barras verticales indican el error estándar.

2. Efecto de la aplicación de AG sobre la expresión de los genes de la diferenciación en las yemas del naranjo 'Chislett'.

Para determinar el mecanismo de acción de AG sobre la reducción de la floración, y sus similitudes con el efecto represivo del fruto, se cuantificó la expresión de genes clave del proceso de la diferenciación floral en dos momentos, el día del tratamiento (0

DDT) y diez días después. El día del tratamiento, los genes responsables de la identidad floral del meristemo y que participan en la diferenciación, *API* y *LFY*, mostraron una expresión relativa significativamente menor en las yemas ON que en las yemas OFF, pero esa diferencia no se mantuvo 10 días después (**Figura 7**). En las ramas tratadas con AG la expresión relativa de ambos genes se redujo significativamente con respecto a las yemas OFF, en particular la del gen *API*, que mostró un nivel similar al de las yemas en brotes ON el día del tratamiento.

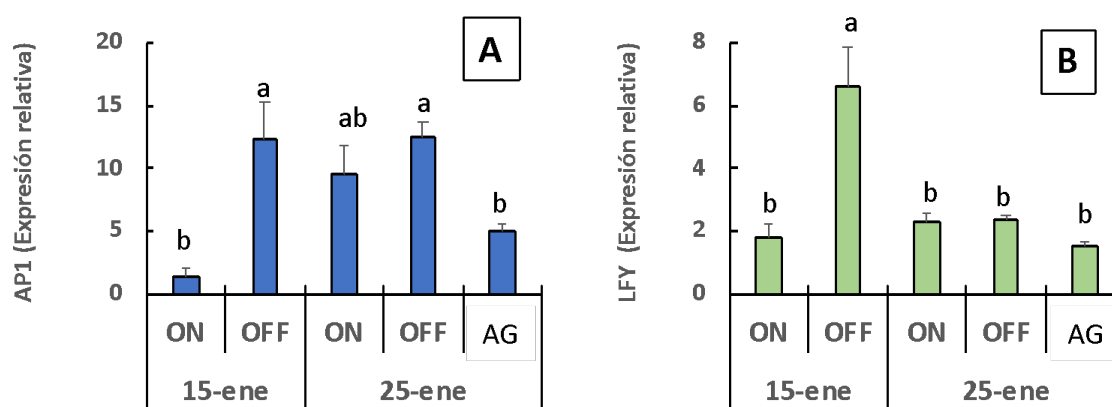


Figura 7. Efecto de la presencia del fruto (ON) y la aplicación localizada de AG (25 mg l^{-1}) a las yemas de ramas sin fruto (OFF) sobre la expresión de los genes responsables de la identidad floral, *API* (A) y *LFY* (B), en la época de diferenciación floral del naranjo cv. 'Chislett'. Cada valor representa el promedio de 3 réplicas biológicas. Las barras verticales indican el error estándar. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre tratamientos.

Los genes *CEN* y *TFL1*, encargados de mantener el meristemo indeterminado y que su destino sea un brote vegetativo, mostraron un comportamiento opuesto. Mientras el gen *TFL1* mostró una reducción de su expresión entre las dos fechas estudiadas, la expresión del gen *CEN* aumentó. Por otra parte, la expresión relativa del gen *TFL1* en las yemas de ramas con fruto fue significativamente mayor que la de las yemas de ramas OFF y AG (**Figura 8 A**). El efecto del tratamiento con AG sobre la expresión del gen *CEN* fue similar al del fruto (**Figura 8 B**).

Con el fin de explicar la reducción de la brotación por efecto del AG se estudió la expresión de uno de los genes relacionados con la fase de mitosis del ciclo celular, *CYCB2*. Sorprendentemente, la expresión de *CYCB2* no mostró diferencias entre las yemas de las ramas ON y OFF, y, además, el tratamiento con AG la aumentó, aunque sin alcanzar la diferencia estadística (**Figura 9**).

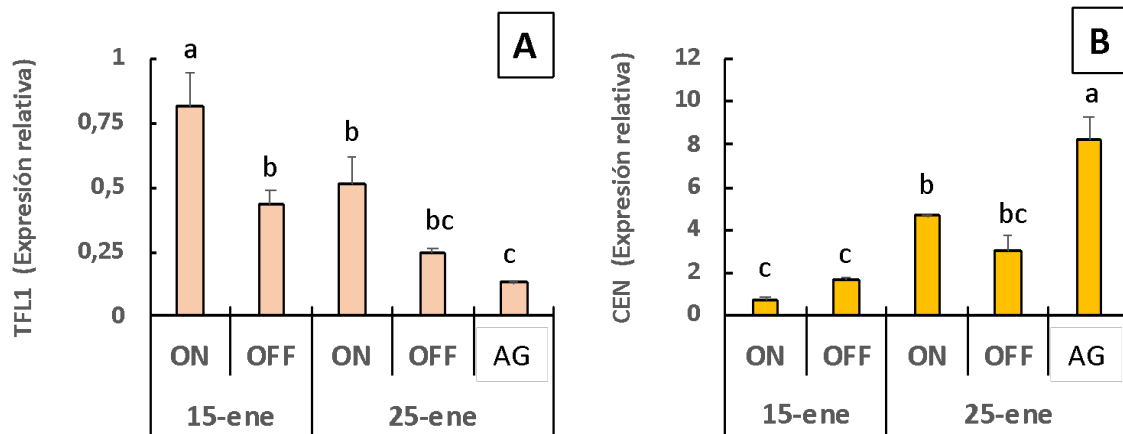


Figura 8. Efecto de la presencia del fruto (ON) y la aplicación localizada de AG (25 mg l^{-1}) a las yemas de ramas sin fruto (OFF) sobre la expresión de los genes reguladores del meristemo CEN y TFL1 en el naranjo cv. 'Chislett'. Cada valor representa el promedio de 3 réplicas biológicas. Las barras verticales indican el error estándar. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre tratamientos.

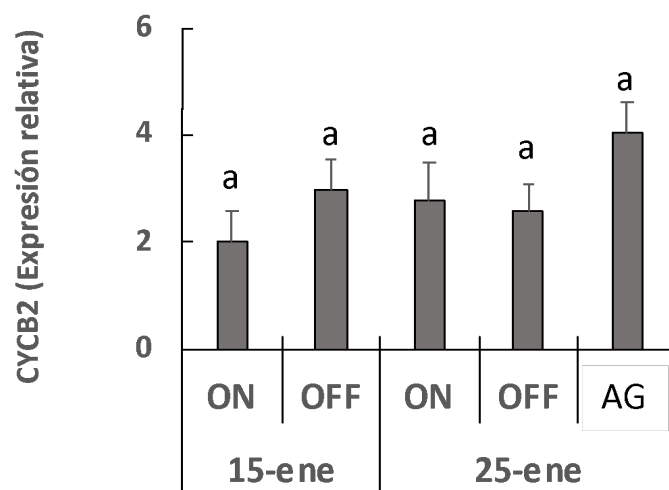


Figura 9. Efecto de la presencia del fruto (ON) y la aplicación localizada de AG (25 mg l^{-1}) a las yemas de ramas sin fruto (OFF) sobre la expresión del gen CYCB2, regulador de la división celular, en el naranjo cv. 'Chislett'. Cada valor representa el promedio de 3 réplicas biológicas. Las barras verticales indican el error estándar. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre tratamientos.

3. Efecto de la aplicación de AG sobre la brotación y floración del mandarino 'Nadorcott'.

Las ramas OFF del mandarino 'Nadorcott' brotaron y florecieron intensamente a finales de febrero. La brotación ocurrió en el 100% de los nudos (**Figura 10 A**) mostrando una gran cantidad de nudos múltiples (80 por cada 100 nudos) (**Figura 10 C**), y entre 3 y 2 brotes por nudo en función de su posición en la rama, apical y basal, respectivamente (**Figura 12 B**). La intensidad de floración fue de 400 flores 100 nudos⁻¹ (**Figura 10 B**), un 43% menor con respecto al naranjo. A diferencia del cv. 'Chislett', los brotes multiflorales sin hojas no fueron predominantes; en este caso, lo fueron las flores solitarias (150 por cada 100 nudos), seguidas de los brotes mixtos (90 brotes 100 nudos⁻¹) (**Figura 11 B y C**). La presencia de brotes vegetativos fue escasa.

La presencia del fruto redujo el número de nudos brotados y anuló la presencia de nudos múltiples y la floración, como en el cv. 'Chislett', de modo que los nuevos brotes fueron exclusivamente vegetativos (**Figuras 10 y 11**).

La respuesta del mandarino al tratamiento realizado con AG (25 mg l⁻¹) directamente sobre las yemas difirió significativamente de los resultados obtenidos en el naranjo. En este caso, el número total de flores se redujo en menor medida (40%), con respecto a las ramas OFF, por efecto del tratamiento (**Figura 10 B**). El número de nudos brotados prácticamente no se redujo (8%) con respecto a las ramas OFF, aunque alcanzó la significación estadística (**Figura 10 A**). Pero el AG sí tuvo efecto sobre los nudos múltiples, que los redujo a 50 por cada 100 nudos (**Figura 10 C**).

El efecto de la aplicación de AG sobre los tipos de brotes solamente modificó significativamente el número de brotes florales sin hojas respecto a las ramas sin tratar, siendo mayor el efecto sobre las flores solitarias, que las redujo en un 67% (**Figura 11 B**). Por otra parte, en el número de brotes mixtos, flores campaneras y brotes vegetativos no se obtuvieron diferencias significativas con respecto a las ramas sin fruto (**Figura 11 C, D y E**).

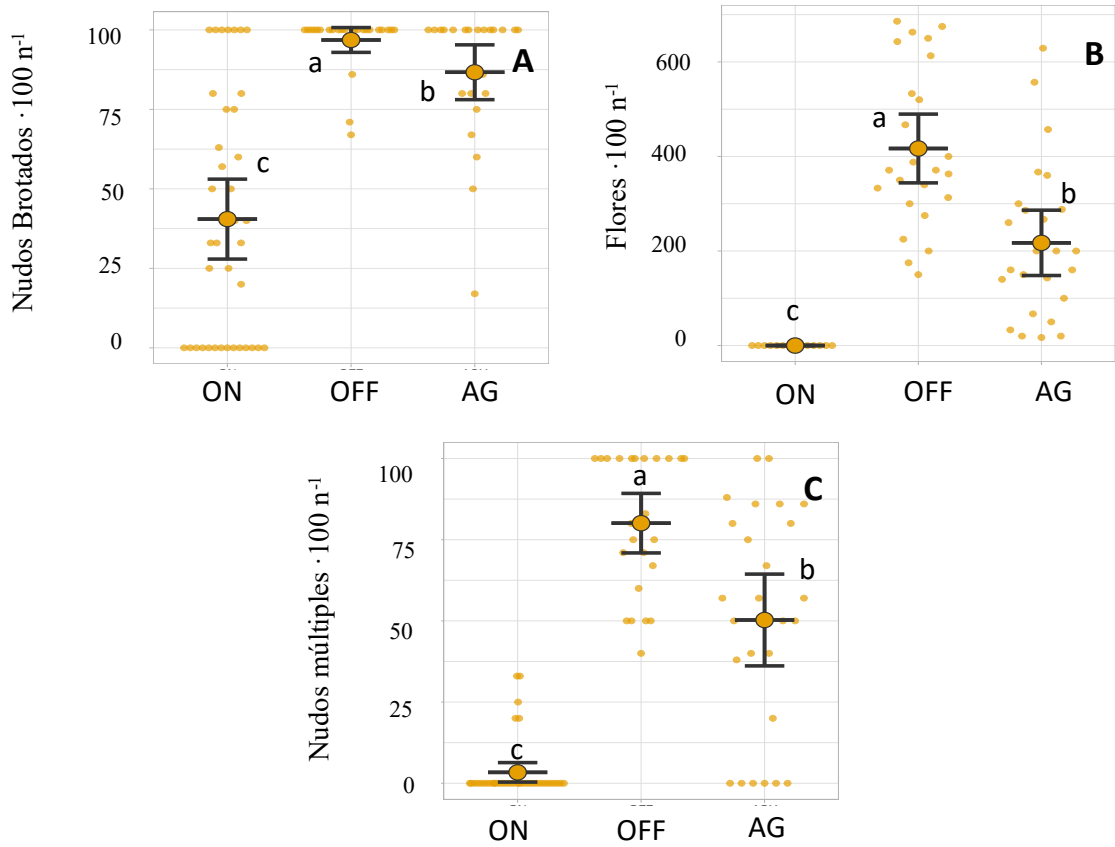
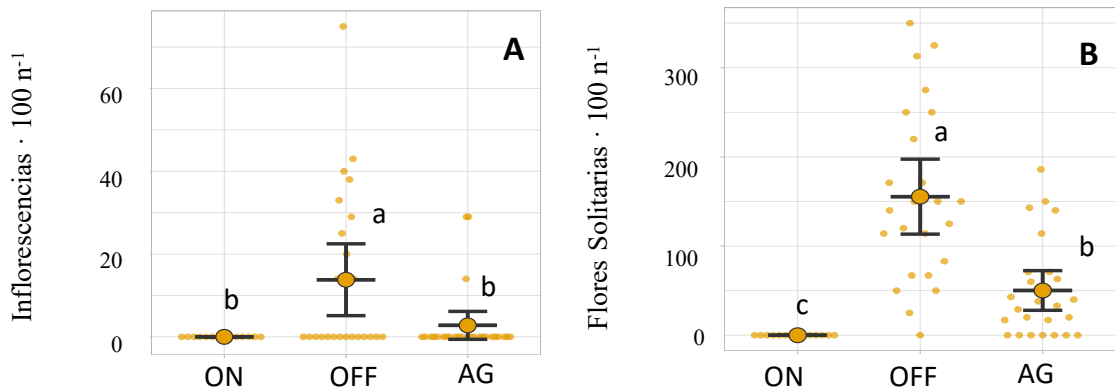


Figura 10. Efecto de la aplicación localizada de AG (25 mg l^{-1}) a las yemas de ramas sin fruto (OFF) sobre la intensidad de brotación y floración del mandarino cv. 'Nadorcott'. El efecto inhibitorio se compara con ramas con fruto (ON). Los tratamientos se realizaron el 18/1. Cada valor es la media de entre 25 y 46 ramas por tratamiento. Las barras verticales indican la mínima diferencia significativa (LSD). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).



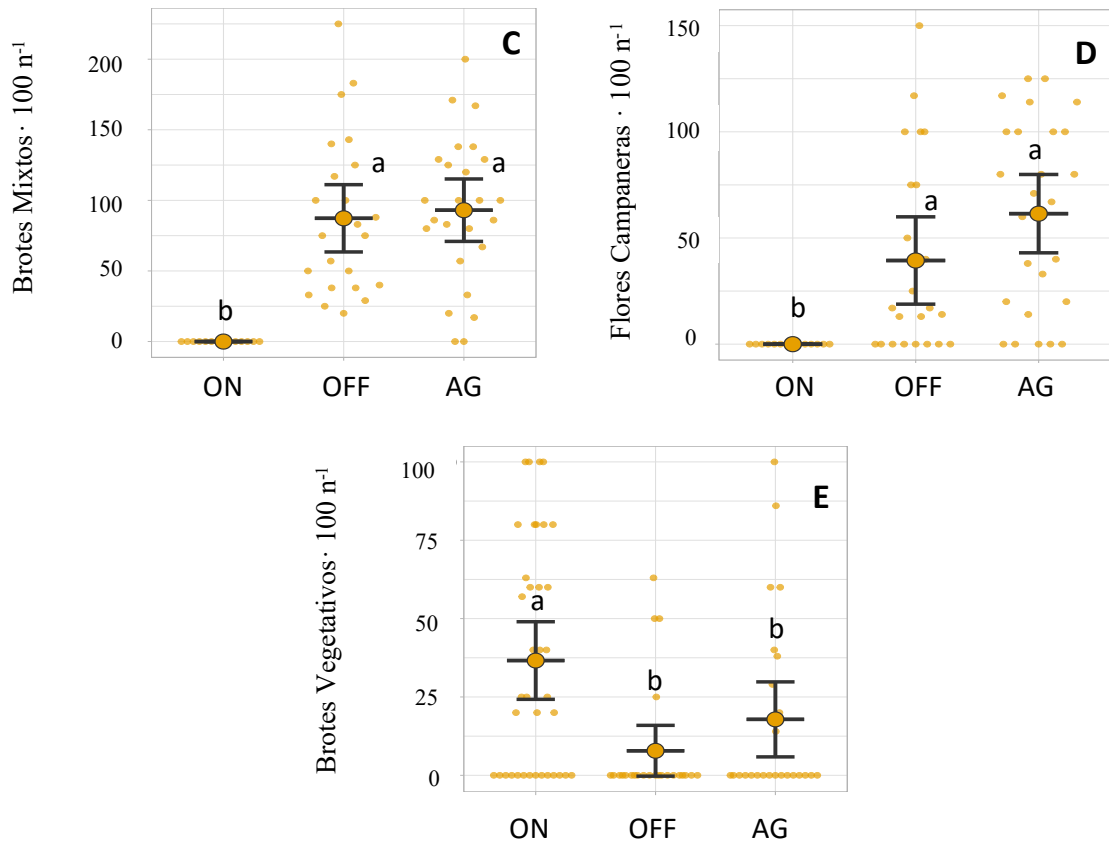


Figura 11. Efecto de la aplicación localizada de AG (25 mg l⁻¹) a las yemas de ramas sin fruto (OFF) sobre los tipos de brotes formados en el mandarino cv. 'Nadorcott'. El efecto inhibitorio se compara con ramas con fruto (ON). Los tratamientos se realizaron el 18/1. Cada valor es la media de entre 25 y 46 ramas por tratamiento. Las barras verticales indican la mínima diferencia significativa (LSD). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (P<0,05).

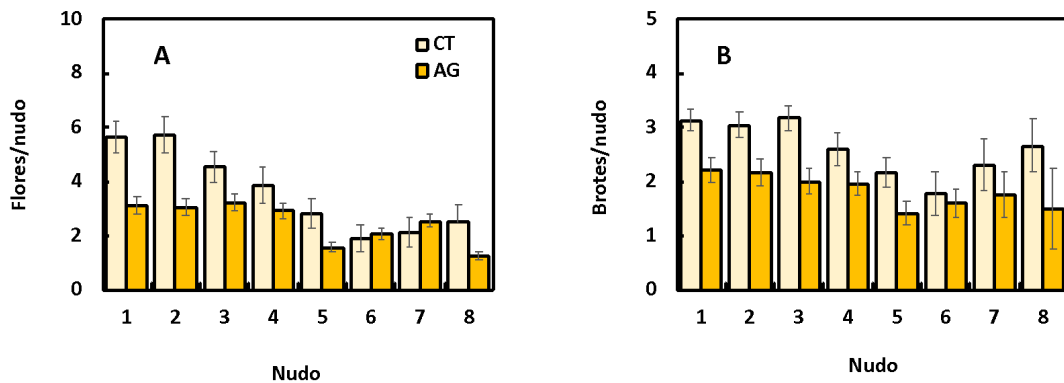


Figura 12. Efecto de la aplicación localizada de AG (25 mg l⁻¹) a las yemas de ramas sin fruto (OFF) sobre el número de flores y brotes por nudo, en función de su posición en la rama del mandarino cv. 'Nadorcott'. Los tratamientos se realizaron el 18/1. Cada valor es la media de entre 25 y 46 ramas por tratamiento. Las barras verticales indican el error estándar.

Los resultados en términos absolutos indican que el efecto del AG en el mandarino fue menor que en el naranjo, ya que prácticamente no redujo el número de yemas brotadas. El análisis de la formación de tipos de brotes en términos relativos a los nudos brotados confirma que la población de tipos de brotes de las ramas tratadas con AG fue muy similar a la de las ramas OFF, y que la reducción de la floración se produjo por una disminución del principal tipo de brote floral (la flor solitaria), sin que aumentara significativamente la formación de brotes vegetativos (**Figura 13**), como sí produjo el tratamiento en el naranjo (**Figura 6**).

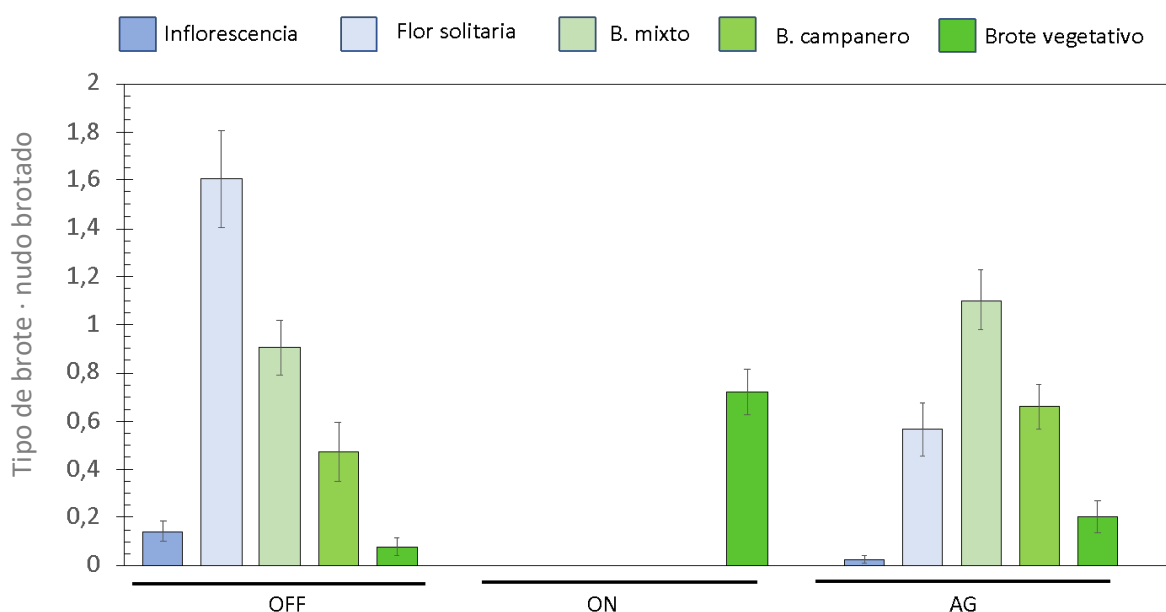


Figura 13. Efecto de la aplicación localizada de AG (25 mg l^{-1}) a las yemas de ramas sin fruto (OFF) sobre la distribución de tipos de brotes por nudo brotado del mandarino cv. 'Nadorcott'. El efecto inhibitorio se compara con ramas con fruto (ON). Los tratamientos se realizaron el 15/1. Cada valor es la media de entre 25 y 46 ramas por tratamiento. Las barras verticales indican el error estándar.

4. Efecto de la aplicación de AG sobre la expresión de los genes de la diferenciación en las yemas del mandarino 'Nadorcott'.

Para determinar el mecanismo de acción del tratamiento con AG sobre la diferenciación del mandarino 'Nadorcott' se cuantificó la expresión de los mismos genes evaluados en las yemas del naranjo 'Chislett', *LFY*, *API*, *TFL1*, *CEN* y *CYCB2*, el día del tratamiento (0 DDT) y 8 días después (8 DDT).

En el momento del tratamiento del cv. 'Nadorcott', la diferencia entre las ramas ON y OFF en la expresión de los genes de identidad floral, *LFY* y *API*, fue similar a los

resultados obtenidos en el naranjo, es decir, significativamente mayor en las ramas que florecen (OFF). Como también ocurrió en el naranjo ‘Chislett’, la expresión relativa de *API* se mantuvo alta en las ramas OFF y aumentó en las ramas ON 8 DDT, mientras que la expresión relativa de *LFY* se redujo significativamente en las ramas OFF y no se modificó en las ON. El efecto de la aplicación de AG sobre la expresión relativa de *LFY* y *API* 8 DDT fue nulo, y no difirió de la expresión relativa de las ramas OFF (**Figura 14**).

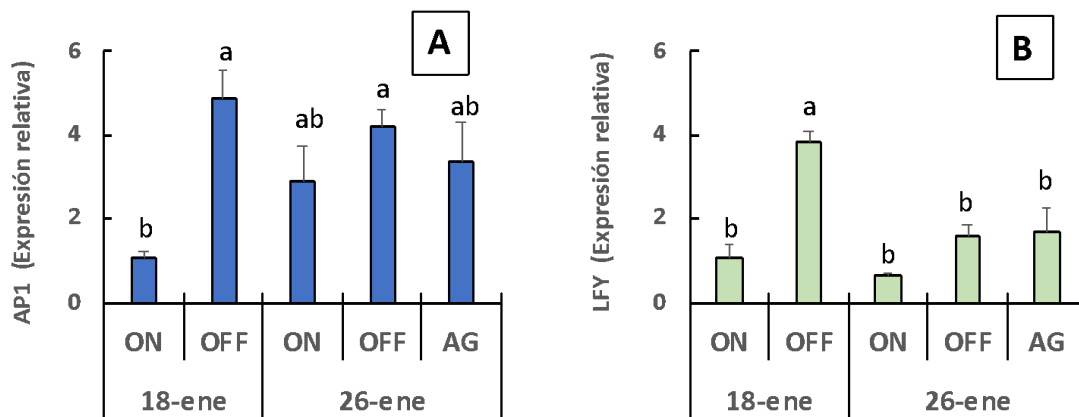


Figura 14. Efecto de la presencia del fruto (ON) y la aplicación localizada de AG (25 mg l⁻¹) a las yemas de ramas sin fruto (OFF) sobre la expresión de los genes reguladores de la identidad floral, AP1 (A) y LFY (B), en la época de diferenciación floral en el mandarino cv. 'Nadorcott'. Los tratamientos se realizaron el 18/1. Cada valor representa el promedio de 3 réplicas biológicas. Las barras verticales indican el error estándar. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre tratamientos.

En cuanto a los genes encargados de mantener la indeterminación del meristemo y que su destino sea un brote vegetativo, *CEN* y *TFL1*, los resultados difieren a los obtenidos en el naranjo (**Figura 8**). En el caso del mandarino ‘Nadorcott’, la expresión relativa de los genes *TFL1* y *CEN* no difirió entre las yemas de ramas ON y OFF en el momento del tratamiento (**Figura 15 A y B**). Por otra parte, el tratamiento con AG no modificó significativamente la expresión de estos genes, aunque en ambos casos aumentó ligeramente (**Figura 15 B**).

Sin embargo, la expresión del gen relacionado con la división celular, *CYCB2*, sí mostró diferencias significativas entre las yemas ON y OFF, y también las yemas tratadas con AG. El día del tratamiento, la expresión de *CYCB2* era significativamente mayor en las ramas OFF (x10) que en las ramas ON. Ocho días más tarde, la diferencia se mantuvo,

y el tratamiento con AG la redujo significativamente respecto de las ramas OFF (**Figura 16**).

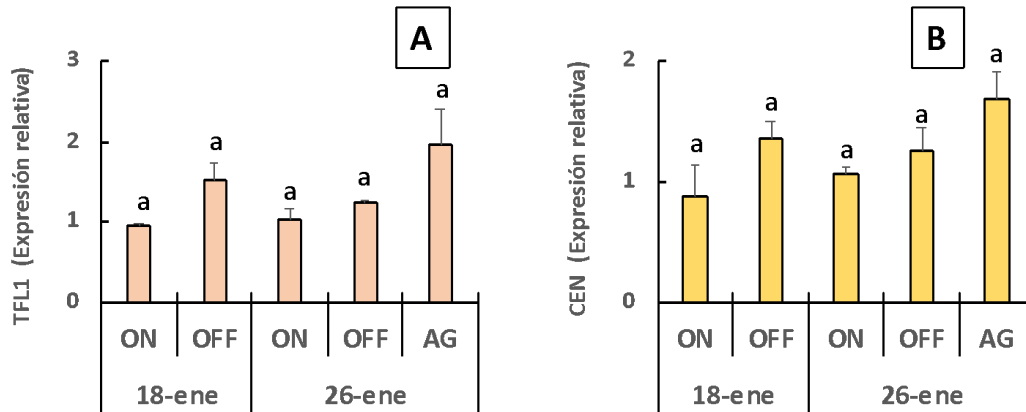


Figura 15. Efecto de la presencia del fruto (ON) y la aplicación localizada de AG (25 mg l^{-1}) a las yemas de ramas sin fruto (OFF) sobre la expresión de los genes reguladores del meristemo CEN y TFL1, en la época de diferenciación floral, en el mandarino cv. 'Nadorcott'. Los tratamientos se realizaron el 18/1. Cada valor representa el promedio de 3 réplicas biológicas. Las barras verticales indican el error estándar. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre tratamientos.

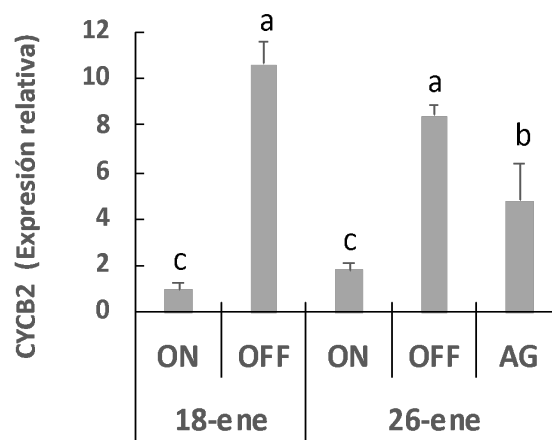


Figura 16. Efecto de la presencia del fruto (ON) y la aplicación localizada de AG (25 mg l^{-1}) a las yemas de ramas sin fruto (OFF) sobre la expresión del gen CYCB2, regulador de la división celular, en el mandarino cv. 'Nadorcott'. Los tratamientos se realizaron el 18/1. Cada valor representa el promedio de 3 réplicas biológicas. Las barras verticales indican el error estándar. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre tratamientos.

5. Estado fenológico de las yemas en el momento del tratamiento y su evolución.

El tratamiento con AG se realizó en el momento de sensibilidad previo a la diferenciación floral. Una vez esta transcurre, y los primordios florales son visibles, el proceso es irreversible (Estado 09 de la escala BBCH) (Guardiola et al., 1982). La diferenciación floral tiene lugar en el momento en el que comienza a subir la temperatura, en enero-febrero, tras el periodo de frío que promueve la inducción floral, en noviembre-diciembre. En las condiciones del experimento, ese aumento de la temperatura se registró a partir del 10 de enero (**Figura 17**). El día del tratamiento en el mandarino ‘Nadorcott’ (18/1) la mayoría de yemas OFF se encontraban en el estadio de desarrollo 03 de la escala BBCH, en el que ha finalizado el hinchamiento de las yemas y las escamas verdes están ligeramente separadas (**Figura 18 H**). Por otro lado, el día del tratamiento en el naranjo ‘Chislett’ (15/1) la mayoría de las yemas OFF se encontraban en el estadio de desarrollo 07 de la escala BBCH, es decir, cuando empieza la apertura de yemas (**Figura 18 C y E**), por tanto, en un estado fenológico ligeramente más avanzado que el del cv. ‘Nadorcott’. No obstante, en ambos cultivares, todas las yemas de la rama OFF no se encontraban en el mismo estadio de desarrollo, de modo que las yemas situadas en posición basal se encontraban ligeramente más retrasadas que las situadas en posición apical, es decir en el estadio 03 y 02 (las yemas se encuentran aún hinchándose), en el naranjo y el mandarino, respectivamente (**Figura 18**). El adelanto de las yemas OFF del naranjo se observó también el día del muestreo para el estudio de la expresión génica. Por ello, la brotación y la floración del naranjo se adelantó 10 días respecto de la del mandarino (**Figura 17**). En las dos especies, las yemas de brotes ON mostraron un retraso significativo respecto de las de brotes OFF. Pero, aun así, las del naranjo iniciaron la brotación con anterioridad (11 días), incluso antes de la recolección del fruto (**Figura 18 M**), mientras que las de ‘Nadorcott’ no brotaron hasta después de la recolección (11/2) (**Figuras 17 y 18**).

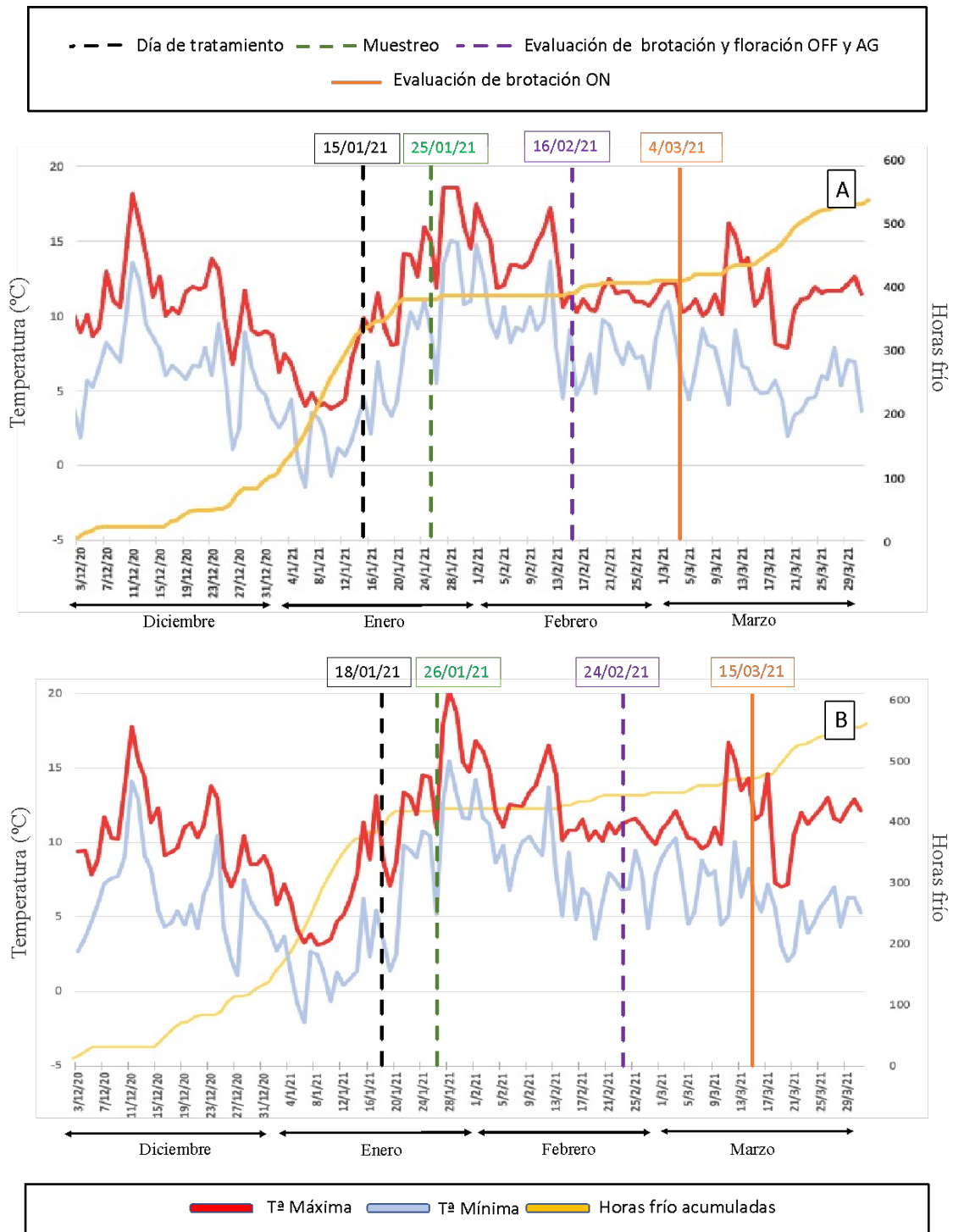
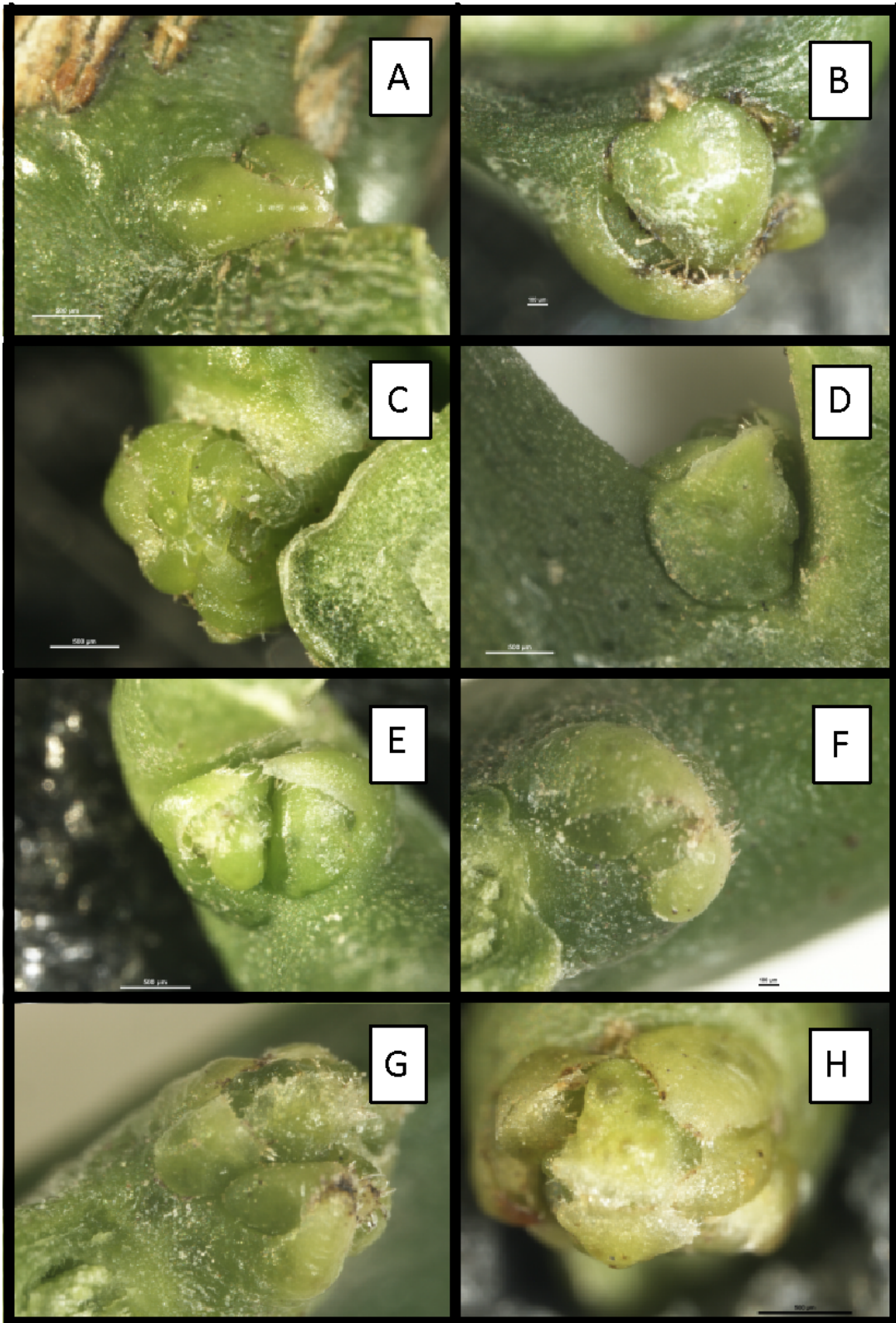


Figura 17. Evolución de la temperatura máxima, mínima y la acumulación de frío en las fincas del naranjo cv. 'Chislett' (A) y del mandarino cv. 'Nadorcott' (B).



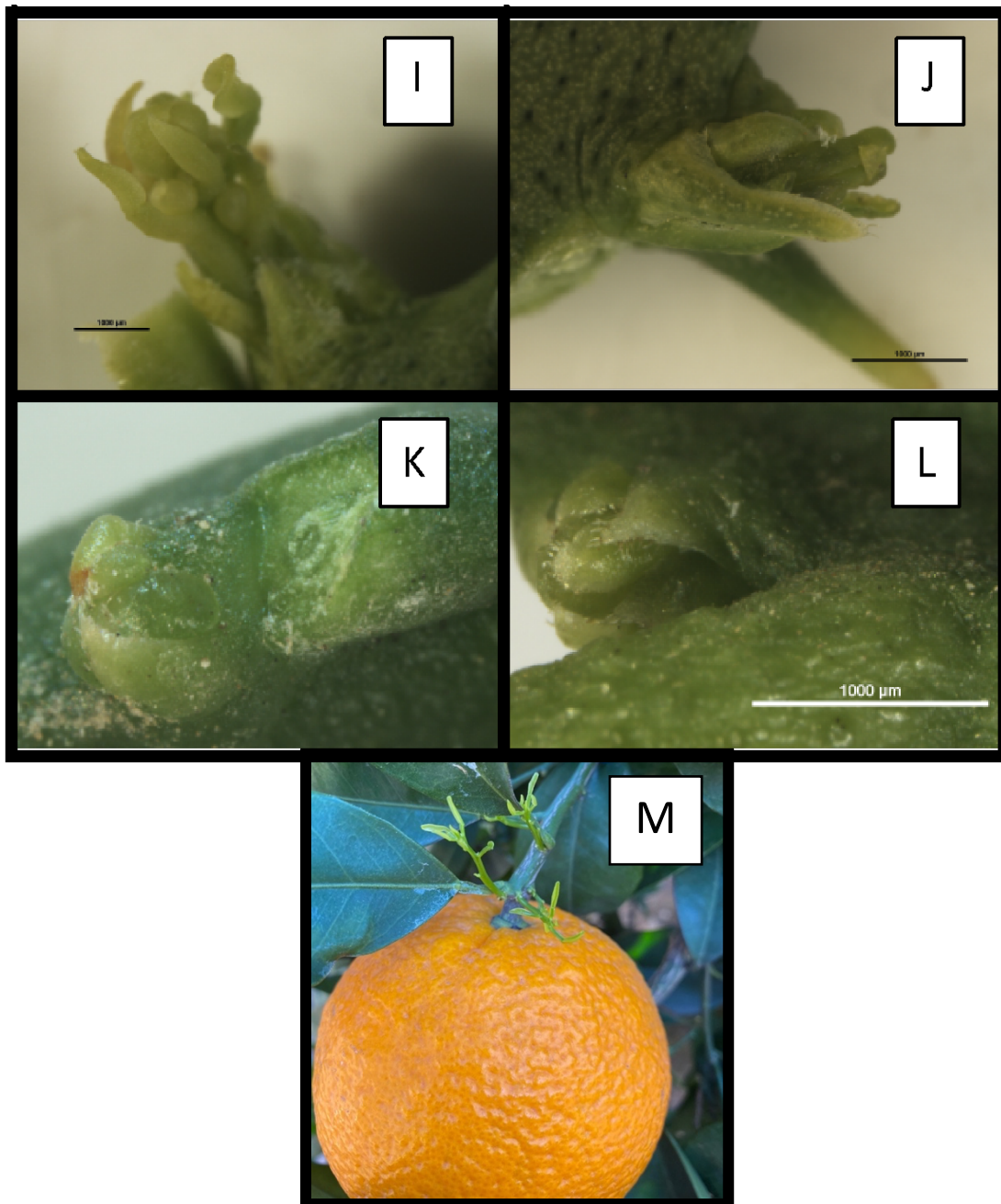


Figura 18. Microfotografías del estado de las yemas en el momento del tratamiento. A y B: yemas de naranjo 'Chislett' de un brote con fruto (ON); C, D y E: yemas de naranjo 'Chislett' de la parte apical (C) y la parte basal (D y E) de un brote sin fruto (OFF); F: yema apical de mandarina 'Nadorcott' de un brote con fruto (ON); G y H: yemas de mandarina 'Nadorcott' de la parte apical (G) y la parte basal (H) de un brote sin fruto OFF. Microfotografías del estado de las yemas en el momento del muestreo. I y J: yemas de naranjo 'Chislett' de un brote sin fruto (OFF) (I) y de un brote tratado con AG (J); K y L: yemas del mandarina 'Nadorcott' de un brote con fruto (ON) (K) y sin fruto (OFF) (L). M: inicio de la brotación en los brotes ON del naranjo 'Chislett'.

Para determinar con precisión las diferencias fenológicas entre el naranjo y el mandarino en el momento del tratamiento, se estudió la evolución de la expresión de los genes *LFY* y *CEN* en yemas de ramas ON y OFF, tomadas durante los meses previos a la diferenciación (**Figura 19**).

La expresión de *LFY* fue significativamente mayor en las yemas OFF que en las yemas ON, durante todo el periodo estudiado y en ambos cultivares. La expresión de este gen mostró un pico de expresión a mediados del mes de enero (**Figura 19 A y B**) pero en el naranjo, el incremento en la expresión de *LFY* se anticipó a mediados de diciembre, casi un mes respecto del cultivar 'Nadorcott'. La expresión del gen *CEN* mostró dos picos de expresión: uno en septiembre, coincidiendo con la brotación de otoño, y otro a finales de enero, previamente a la brotación de primavera (**Figura 19 C y D**). En ambos, la expresión de *CEN* fue mayor en las yemas de ramas ON que en las yemas de ramas OFF.

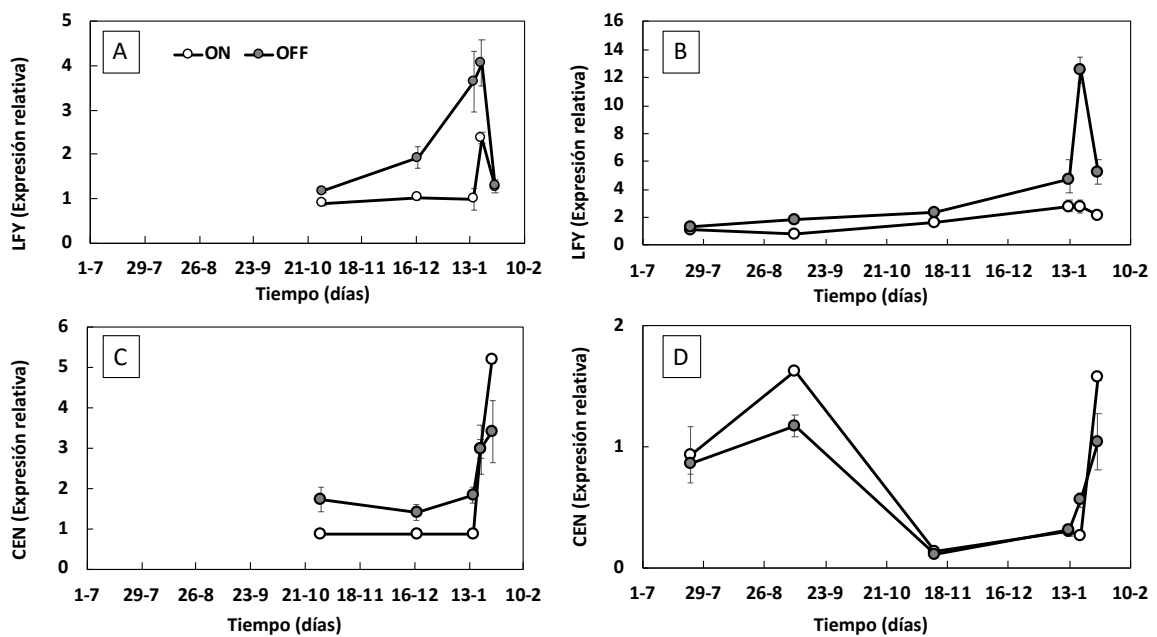


Figura 19. Efecto de la presencia del fruto (ON) en la evolución temporal de la expresión del gen regulador de la identidad floral *LFY* y el gen regulador del meristemo *CEN*, en las yemas, en comparación a ramas sin fruto (OFF), en el naranjo cv. 'Chislett' (A y C) y en el mandarino cv. 'Nadorcott' (B y D).

IV. Discusión

El efecto de la aplicación localizada de AG (25 mg l⁻¹) a la yema sobre la reducción de la floración fue similar al efecto obtenido en experimentos previos, en los que se estudió la influencia del AG a concentraciones entre 10 y 100 mg l⁻¹, aplicado a árboles de naranjo dulce cvs. ‘Whashington navel’, Navelate’ (Guardiola et al., 1982) y ‘Salustiana’ (Muñoz-Fambuena et al., 2012), y de mandarinos ‘Clementino’, ‘Satsuma’ (Guardiola et al., 1982), y ‘Orri’ (Goldberg-Moller et al., 2012). Los resultados de este TFM también son similares a los del experimento realizado por García-Luís et al (1986) con la aplicación localizada a la yema de 200 mg l⁻¹ de AG en el mandarino ‘Satsuma’.

Si bien la sensibilidad de la yema al tratamiento difiere en función de la época de aplicación del AG, entre los momentos de inducción y diferenciación floral (desde noviembre hasta febrero) (Guardiola et al., 1982; García-Luís et al., 1986), el fenotipo obtenido es, en general, similar. Este hecho motivó la propuesta de un mecanismo común con independencia de la época (Guardiola et al., 1982). El mecanismo principal sería la reducción de la brotación de las yemas, con mayor sensibilidad en aquéllas que producen brotes florales sin hojas (inflorescencias en el naranjo , **Figura 4**, y flores solitarias en el mandarino, **Figura 12**). Pero como no todas las yemas se ven afectadas por el tratamiento, el efecto del AG sobre la brotación también depende del estado endógeno de la yema.

El mecanismo secundario sería una reducción de la floración, que implica un aumento de los brotes vegetativos y una reducción de las inflorescencias. Este efecto se consigue con mayor intensidad cuando el tratamiento con AG se realiza próximo a la brotación de la yema, tanto en el mandarino como en el naranjo (Guardiola et al., 1982). Los resultados de formación de tipos de brotes por nudo brotado (**Figuras 6 y 14**) sugieren que el efecto inhibitorio sobre la floración se produjo en el naranjo pero no en el mandarino. El hecho de que el AG haya reducido la expresión de *API* en el naranjo (**Figura 7**) pero no en el mandarino (**Figura 15**), apoya esta hipótesis. En el naranjo, la reducción significativa de los brotes mixtos coincidió con un aumento paralelo de los brotes vegetativos. El brote mixto es un brote con hojas que diferencia flores axilares a la vez que brota y se desarrolla (Lord y Eckard, 1985), por lo que es posible que el tratamiento con AG haya impedido la diferenciación de esas flores y haya transformado el brote mixto en vegetativo. El aumento de la expresión del gen *CEN* (**Figura 8**), que promueve el crecimiento indeterminado en el meristemo axilar de los cítricos (Zhang et al., 2021), también apoya esta hipótesis.

Pero la técnica de cuantificación de la expresión génica de las yemas presenta limitaciones para explicar de un modo completo el efecto del AG sobre la brotación y la floración. Éstas derivan, entre otros aspectos, de la naturaleza múltiple del nudo, que se compone de una yema axilar principal, con un meristemo apical, y otras yemas axilares menores. En el naranjo se formaron 1,7 brotes por nudo (**Figura 5**) y en el mandarino 3,1 brotes por nudo (**Figura 13**). El muestreo de yemas proporciona la concentración de mRNA en el nudo, pero no discrimina entre yemas principales y menores; su diferente estado de desarrollo podría dar lugar a falsas interpretaciones.

Un ejemplo de ello, es la diferente respuesta del gen de la división celular *CYCB2* al tratamiento con AG. En el mandarino ‘Nadorcott’ el AG redujo la expresión de *CYCB2* (**Figura 17**), lo que explicaría el efecto sobre la reducción de la brotación. Pero en el naranjo ‘Chislett’ la aumentó (**Figura 9**), y, sin embargo, la reducción del número de nudos brotados fue significativamente mayor que en el mandarino (**Figuras 3 y 11**). La yema más grande de cada nudo es la primera en brotar y florecer, y su mantenimiento como meristemo vegetativo por efecto del AG puede variar en función de su estado fenológico (Nir et al., 1972). Así, el efecto del tratamiento con AG, podría estar asociado a la supresión del desarrollo de las yemas menores del nudo, pero no de la yema principal si ya ha iniciado la brotación. Al contrario, en ésta, el AG provoca un crecimiento de los entrenudos (datos no mostrados). La supresión del desarrollo de las yemas axilares menores podría ser debida a un efecto directo del AG, o a un efecto indirecto, a través del estímulo de la yema principal, quien inhibiría por competencia la brotación de las otras (**Figura 20**).

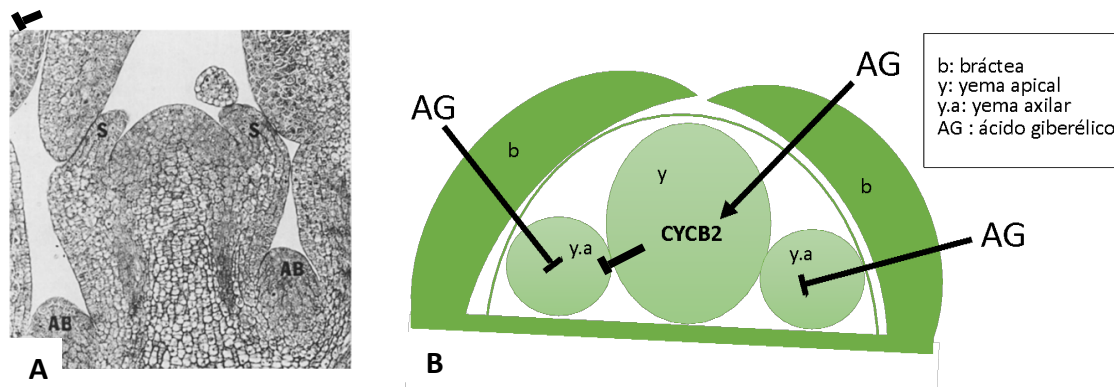


Figura 20. (A) Los nudos de los cítricos son múltiples y poseen varias yemas axilares, una principal de mayor tamaño y otras menores (Tomado de Lord y Eckard, 1985). (B) Las diferencias en su estado fenológico podrían influir en la respuesta al tratamiento con AG. Si la yema principal ya ha iniciado la brotación el AG puede estimular su desarrollo a través de un aumento de la división celular. Las yemas menores pueden verse inhibidas bien directamente, por el efecto del AG, bien indirectamente, por el estímulo de la yema principal. AB: axillary bud; s: sépalo.

A la vista de los resultados, el estado fenológico de la yema en el momento del tratamiento con AG resulta crucial. Guardiola et al., (1982) pusieron de manifiesto la existencia de dos momentos de sensibilidad máxima (finales de noviembre y finales de enero, en el naranjo dulce, inicio de febrero en el mandarino), con un periodo entre medias en el que la sensibilidad al tratamiento se reduce. La hipótesis mayormente aceptada, respecto del estado de la yema, indica que la yema es vegetativa por defecto, y se transforma a floral promovida por señales exógenas. Así, los eventos para la formación de un meristemo floral son 1) el tiempo de floración (controlado por el gen *FT*, que se activa por la baja temperatura), 2) la identidad del meristemo (controlada por los genes *LFY*, *API* y *TFL1*, entre otros) y 3) la organogénesis (Blázquez et al., 2006). Lord y Eckard, (1985), en base a sus observaciones en el naranjo dulce, establecieron que el periodo de *diferenciación floral microscópica* se sitúa a finales de noviembre mientras que la *diferenciación floral macroscópica* se produce a finales de enero (en las condiciones climáticas de California). Los resultados de este TFM apoyan esa hipótesis, y muestran que el inicio de la expresión del gen de identidad floral *LFY* se localiza a mediados de diciembre en el naranjo, pero que se retrasa a mediados de enero en el mandarino (**Figura 19**). El tratamiento se realizó en el momento en que la transición a meristemo floral ya estaba iniciada, en el punto máximo de expresión de *LFY*. Por tanto, el tratamiento con AG pudo haber actuado de 2 modos respecto de la floración: o bien manteniendo el estado de meristemo vegetativo e impidiendo su transición a meristemo floral, o bien afectando el inicio de la organogénesis floral, en función del estado

fenológico de la yema axilar. En el naranjo, la expresión del gen *TFL1* no aumentó por efecto del AG pero sí la de *CEN*, que promueve el crecimiento indeterminado, lo que sugiere un mantenimiento del meristemo vegetativo. En el mandarino, el AG no modificó ni *TFL1*, ni *CEN*, ni *LFY* ni *API*, coincidiendo con la pérdida de sensibilidad descrita por Guardiola et al (1982). Estas diferencias en la sensibilidad podrían estar relacionadas con las interacciones regulatorias mutuas que se establecen entre genes de identidad del meristemo, que proporcionan flexibilidad y robustez frente a las variaciones ambientales y evitan la reversión una vez tomada la decisión de florecer (Blázquez et al., 2006).

V. Conclusiones

- 1) La aplicación exógena de AG, localizada a la yema, en la época de diferenciación floral en el naranjo ha reducido eficazmente la brotación y la floración en el naranjo cv. 'Chislett' y con menor eficacia en el mandarino 'Nadorcott'
- 2) El estado de la yema en el momento del tratamiento ha resultado clave, porque:
 - a. En el naranjo cv. 'Chislett', próximo a la brotación, la aplicación de AG ha provocado un aumento de la expresión de CEN, que promueve el crecimiento indeterminado, y ha reducido la expresión de LFY y AP1, genes reguladores de la identidad floral, efectos que correlacionan con el mantenimiento del meristemo vegetativo.
 - b. En el mandarino cv. 'Nadorcott', con la yema más retrasada, el AG únicamente disminuyó CYCB2, efecto que correlaciona con la reducción, escasa, de la brotación.

VI. Bibliografía

Achard, P., & Genschik, P. (2009). Releasing the brakes of plant growth: how GAs shutdown DELLA proteins. *Journal of experimental botany*, 60(4), 1085-1092.

Agustí, M., Mesejo, C., y Reig, C. (2020a). *Citricultura*. Editorial Mundi-Prensa. 2a Edición. Madrid, España. 423.

Agustí, M., Mesejo, C., Muñoz-Fambuena, N., Vera-Sirera, F., de Lucas, M., Martínez-Fuentes, A., ... & Blázquez, M. A. (2020b). Fruit-dependent epigenetic regulation of flowering in Citrus. *New Phytologist*, 225(1), 376-384.

Bernier, G., Havelange, A., Houssa, C., Petitjean, A. y Lejeune, P. (1993). Physiological signals that induce flowering. *The Plant Cell*. 5(10): 1147.

Blázquez, M. A., Ferrandiz, C., Madueno, F. and Parcy, F. (2006). How floral meristems are built. *Plant molecular biology*, 60(6), 855-870.

Cassin J, Bourdeaut J, Fougue A, Furon V, Gaillard JP, LesBourdelles J, Montagut and Moureil C. (1969). The influence of climate upon blooming of citrus in tropical areas. *Proc. 1st Intl. Citrus Symp.*1: 315-323.

Chica, E. J. and Albrigo, L. G. (2013). Expression of flower promoting genes in sweet orange during floral inductive water deficits. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 138(2), 88-94.

Corbesier, L., Vincent, C., Jang, S. H., Fornara, F., Fan, Q. Z., Searle, I., Giakountis, A., Farrona, S., Gissot, L., Turnbull, C. and Coupland, G. (2007). FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. *Science* 316, 1030-1033.

Davenport, T. L. (1990). Citrus flowering. *Horticultural Reviews*. 12: 349-408.

Davière, J. M., & Achard, P. (2013). Gibberellin signaling in plants. *Development*, 140(6), 1147-1151.

Davies, F. S. y Albrigo, L. G. (1994). *Citrus*. CAB International, Wallingford, UK. 254.

Delgado P, Casamayor R, Rodriguez J O, Cruz P y Fajardo R. (1986). Paclobutrazol effects on oranges under tropical conditions. *Acta Horticulturae* 179: 537-544.

García-Luís A, Fornes F, Sanz A and Guardiola J L. (1988). The regulation of flowering and fruit set in Citrus: relationship with carbohydrate levels. *Israel Journal of Botany* 37: 189-201.

Goldschmidt E E, Aschkenazi N, Herzano Y, Schaffer A A and Monselise S P. (1985). A role for carbohydrate levels in the control of flowering in citrus. *Scientia Horticulturae* 26: 159-166.

Goldschmidt E E and Golomb A. (1982). The carbohydrate balance of alternate-bearing citrus trees and the significance of reserves for flowering and fruiting. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 107(2): 206-208.

Goldschmidt E E, Tamim M and Goren R. (1997). Gibberellins and flowering in citrus and other fruit trees: A critical analysis. *Acta Horticulturae*, 463: 201-208.

Guardiola, J.L., Monerri, C. & Agustí, M. (1982) The inhibitory effect of gibberellic acid on flowering in Citrus. *Physiologia Plantarum*, 55, 136-142.

Harty A R and van Staden J. (1988b). Paclobutrazol and temperature effects on lemon. Proceedings. 6th Int. *Citrus Congress* 1: 343-353.

Jones W W, Embleton T W and Coggins C W. (1975). Starch content of roots of 'Kinnow' mandarin trees bearing fruits in alternate years. *Hortscience* 10: 514.

Lord, E. M., y Eckard, K.J. (1985). Shoot development in Citrus sinensis L. (Washington Navel Orange). 1. *Floral and inflorescence ontogeny*, Bot. Graz. 146 (1985) 320-326.

Malladi, A., & Johnson, L. K. (2011). 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.

Martínez-Fuentes, A. (2010). *El tiempo de permanencia del fruto en el árbol y su relación con la floración en los cítricos*. [Tesis Doctoral, Dirección M. Agustí], Universidad Politécnica de Valencia, 138 p.

Martínez-Fuentes, A., Mesejo, C., Reig, C. and Agustí, M. (2010). Timing of the inhibitory effect of fruit on return bloom of 'Valencia' sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(11), 1936-1943.

Martínez-Fuentes, A., Mesejo, C., Juan, M. Almela, V. & Agustí, M. (2004). Restrictions on the exogenous control of flowering in Citrus. *Acta Horticulturae*, 632, 91-98.

Martínez-Fuentes, A., Mesejo, C., Muñoz-Fambuena, N., Reig, C., González-Mas, M. C., Iglesias, D. J., Primo-Millo E., y Agustí, M. (2013). Fruit load restricts the flowering promotion effect of paclobutrazol in alternate bearing *Citrus spp.* *Scientia Horticulturae*, 151: 122-127.

McGinnis, K.M., Thomas, S.G., Soule, J.D., Strader, L.C., Zale, J.M., Sun, T.P., et al. (2003) The *Arabidopsis SLEEPY1* gene encodes a putative F-box sub-unit of an SCF E3 ubiquitin ligase. *Plant Cell* 15: 1120–1130.

Mohamed, R., Wang, C.-T., Ma, C., Shevchenko, O., Dye, S.J., Puzey, J.R., Etherington, E., Sheng, X., Meilan, R., Strauss, S.H., and Brunner, A.M. (2010). Populus CEN/TFL1 regulates first onset of flowering, axillary meristem identity and dormancy release in Populus. *Plant J.* 62, 674–688.

Monselise S P and Goldshmidt E E. (1982). Alternating bearing in fruit trees. *Horticultural reviews*, 4, 128- 73.

Monselise S P and Halevy A H. (1964). Chemical inhibition and promotion of citrus flower bud induction. *Proceedings of the American Society Horticulture Sci* 84: 141-146.

Monteiro da Cruz, M. D., Siqueira, D. L. D., Salomão, L. C. C., and Cecon, P. R. (2008). Influência do paclobutrazol e da temperatura ambiente sobre o florescimento e frutificação da limeira ácida'Tahiti'. *Ciência Agrotec*, 32(4), 1148-1153.

Moss G I, Bevington K B, Gallasch P T, El-Zeftawi B M, Thornton I R, Bacon P and Freeman B. (1977) . Methods to control alternate cropping of 'Valencia' orange trees in Australia. *International Citrus Congress*, Florida USA, 2: 704-708.

Muñoz-Fambuena, N. (2015). *Fruit inhibits flowering in alternate bearing citrus varieties. Hormonal, genetic and epigenetic regulation.* Tesis Doctoral. Università Degli Studi di Palermo. 189.

Muñoz-Fambuena, N., Mesejo, C., González-Mas, M.C., Primo-Millo, E., Agustí, M. y Iglesias, D. J. (2011). Fruit regulates seasonal expression of flowering genes in alternate-bearing 'Moncada' mandarin. *Annals of Botany.* 108(3): 511- 519.

Muñoz-Fambuena, N., Mesejo, C., González-Mas, M.C., Primo-Millo, E., Agustí, M. y Iglesias, D. J. (2012a). Fruit load modulates flowering-related gene expression in buds of alternate-bearing 'Moncada' mandarin. *Annals of botany.* 110(6): 1109-1118.

Muñoz-Fambuena, N., Mesejo, C., González-Mas, M. C., Iglesias, D. J., Primo-Millo, E. y Agustí, M. (2012b). Gibberellic acid reduces flowering intensity in sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] by repressing *CiFT* gene expression. *Journal of Plant Growth Regulation.* 31(4): 529-536.

Nir, I., Goren, R. & Leshem, B. (1972). Effects of water stress, gibberellic acid and 2-chloroethyltrimethylammoniumchloride CCC on flower differentiation in eureka lemon trees. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 97, Ž .774–778

Nishikawa, F., Endo, T., Shimada, T., Fujii, H., Shimizu, T., Omura, M. and Ikoma, Y. (2007). Increased *CiFT* abundance in the stem correlates with floral induction by low

temperature in Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.). *Journal of experimental botany*, 58(14), 3915-3927.

Notaguchi, M., Abe, M., Kimura, T., Daimon, Y., Kobayashi, T., Yamaguchi, A., Tomita, Y., Dohi, K., Mori, M., & Araki, T. (2008). Long-distance, graft-transmissible action of Arabidopsis *FLOWERING LOCUS T* protein to promote flowering. *Plant & cell physiology*, 49(11), 1645–1658.

Ogata, T., Hasukawa, H., Shiozaki, S., Horiuchi, S., Kawase, K., Iwagaki, I., and Okuda, H. (1996). Seasonal changes in endogenous gibberellin contents in satsuma mandarin [*Citrus reticulata*] during flower differentiation and the influence of paclobutrazol on gibberellin synthesis. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* (Japan).

Pnueli, L., Carmel-Goren, L., Hareven, D., Gutfinger, T., Alvarez, J., Ganal, M., Zamir, D., and Lifschitz, E. (1998). The SELF-PRUNING gene of tomato regulates vegetative to reproductive switching of sympodial meristems and is the ortholog of *CEN* and *TFL1*. *Development* 125, 1979–1989.

Rademacher W. (2000). Growth retardants: effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 51: 501.

Sasaki, A., Itoh, H., Gomi, K., Ueguchi-Tanaka, M., Ishiyama, K., Kobayashi, M., et al. (2003) Accumulation of phosphorylated repressor for gibberellin signaling in an F-box mutant. *Science* 299: 1896–1898.

Seo E, Le H, Jeon J, et al. (2009). Crosstalk between cold response and flowering in Arabidopsis is mediated through the flowering-time gene *SOC1* and its upstream negative regulator *FLC*. *The Plant Cell* 21: 3185–3197.

Torti, S., Schlesier, R., Thümmler, A., Bartels, D., Römer, P., Koch, B., Werner, S., Panwar, V., Kanyuka, K., Wirén, N., Hause, G., Giritch, A., and Gleba, Y. (2021). Transient reprogramming of crop plants for agronomic performance. *Nature Plants*, 7(2), 159-171.

Urbina, V. (2002). *La fructificación de los frutales*. Monografías de fruticultura nº6. España.

Valiente J L and Albrigo L G. (2004). Flower bud induction of sweet orange trees (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck): effect of low temperatures, crop load, and bud age. *Journal American Society Horticultural Science* 129(2): 158-164.

Verreyne JS and Lovatt C J. (2009) .The effect of crop load on budbreak influences return bloom in alternate bearing. *Journal American Society Horticultural Science* 134: 299-307.

Wang, B., Fang, R., Chen, F., Han, J., Liu, Y. G., Chen, L., & Zhu, Q. (2020). A novel CCCH-type zinc finger protein SAW1 activates OsGA20ox3 to regulate gibberellin homeostasis and anther development in rice. *Journal of integrative plant biology*, 62(10), 1594-1606.

Yamaguchi, S. (2008) Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 225–251.

Zhang, F., Wang, Y., & Irish, V. F. (2021). *CENTRORADIALIS* maintains shoot meristem indeterminacy by antagonizing *THORN IDENTITY1* in Citrus. *Current Biology* 31: 2237-2242.e4.

Páginas web:

MAPAMA. *Avances, superficies y producciones de cultivos*. <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/cuaderno_enero2021_tcm30-559744.pdf> [Consulta: 07 de mayo de 2021]

MAPAMA. *Encuesta sobre superficies y rendimientos de cultivos*. <<https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/agricultura/superficies-producciones-anuales-cultivos/>> [Consulta: 07 de mayo de 2021]