

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA Y
DEL MEDIO NATURAL



EFECTO DEL TRATAMIENTO CONTINUADO CON ÁCIDO GIBERÉLICO Y PACLOBUTRAZOL SOBRE LA FLORACIÓN DEL NARANJO DULCE (*Citrus sinensis* L.)

TRABAJO FIN DE MÁSTER
MÁSTER UNIVERSITARIO EN INGENIERÍA AGRONÓMICA

Alumno: Antonio Cervera Cervera
Tutor: Carlos Mesejo Conejos

Curso Académico: 2020-2021

VALENCIA, 23 de Julio de 2021

Resumen:

En los cítricos, la intensidad de floración se puede reducir o aumentar parcialmente aplicando ácido giberélico (AG) o paclobutrazol (PBZ, inhibidor de la síntesis de giberelinas), respectivamente, durante el período de reposo. Sin embargo, en condiciones extremas, tanto de ausencia de cosecha como de exceso de ésta, estos tratamientos son ineficaces, impidiendo resolver los problemas de exceso o ausencia de floración. Mientras en las plantas anuales la floración está regulada por un mecanismo *cualitativo* (florecer o no) de naturaleza genética, en los árboles, además, se acepta la existencia de otro nivel de regulación *cuantitativo*. Éste se basa en la hipótesis de que la presencia de una señal inhibidora se transporta a larga distancia regulando la intensidad de floración.

En los cítricos, el fruto inhibe la floración siguiente a partir de etapas próximas a completar su tamaño. Este momento coincide con la época de sensibilidad del AG para reducir la intensidad de floración, por lo que se ha propuesto a las giberelinas (GAs) como señal inhibidora. Además, el efecto del fruto y el AG es similar: la reducción en el número de flores es, aproximadamente, paralela a la reducción de la brotación sin que el número de hojas y/o flores por brote sea alterado, lo que indica que fruto y AG no alteran el número de flores por yema brotada sino el número de yemas que brotan. La concentración de las giberelinas GA₁ y GA₄ en los brotes con fruto, medido por la concentración en el floema del brote, aumenta a medida que avanza el crecimiento del fruto, lo que podría explicar la acción inhibidora de éste sobre la brotación/floración de las yemas situadas en el mismo brote que lo sustenta. Pero AG y fruto presentan diferencias cuantitativas en su efecto: mientras el AG reduce parcialmente la floración, el fruto la impide, e inhibe el efecto promotor del PBZ, lo que pone en duda el papel de las giberelinas en el proceso. Es posible que la presencia continua del fruto en la rama actúe como una señal inhibidora más eficaz que un único tratamiento exógeno, cuya duración desconocemos.

En este TFM se estudia el efecto de la aplicación continua de AG y PBZ en el control de la floración del naranjo dulce.

PALABRAS CLAVE: Alternancia de cosechas, cítricos, floración, giberelinas, AG, PBZ, *FT*, *MADS*, *CEN*, *LFY*, *API*

Resum:

En els cítrics, la intensitat de floració es pot reduir o augmentar parcialment aplicant àcid giberèl·lic (AG) o paclobutrazol (PBZ, inhibidor de la síntesi de giberel·lines), respectivament, durant el període de repòs. No obstant això, en condicions extremes, tant d'absència de collita com d'excés d'aquesta, aquests tractaments són ineficaços, impeding resoldre els problemes d'excés o absència de floració. Mentre en les plantes anuals la floració està regulada per un mecanisme *qualitatiu* (florir o no) de naturalesa genètica, en els arbres, a més, s'accepta l'existència d'un altre nivell de regulació *quantitatiu*. Aquest es basa en la hipòtesi que la presència d'un senyal inhibidor es transporta a llarga distància regulant la intensitat de floració.

En els cítrics, el fruit inhibeix la floració següent a partir d'etapes pròximes a completar la seua grandària. Aquest moment coincideix amb l'època de sensibilitat del AG per a reduir la intensitat de floració, per la qual cosa s'ha proposat a les giberel·lines (Gas) com a senyal inhibidor. A més, l'efecte del fruit i el AG és similar: la reducció en el nombre de flors és, aproximadament, paral·lela a la reducció de la brotada sense que el nombre de fulles i/o flors per brot siga alterat, la qual cosa indica que fruit i AG no alteren el nombre de flors per gemma brollada sinó el nombre de gemmes que brollen. La concentració de les giberel·lines GA₁ i GA₄ en els brots amb fruit, mesurat per la concentració en el floema del brot, augmenta a mesura que avança el creixement del fruit, la qual cosa podria explicar l'acció inhibidora d'aquest sobre la brotació/floració de les gemmes situades en el mateix brot que el sustenta. Però AG i fruit presenten diferències quantitatives en el seu efecte: mentre el AG redueix parcialment la floració, el fruit la impedeix, i inhibeix l'efecte promotor del PBZ, la qual cosa posa en dubte el paper de les giberel·lines en el procés. És possible que la presència contínua del fruit en la branca actue com un senyal inhibidor més eficaç que un únic tractament exogen, la duració del qual desconeixem.

En aquest TFM s'estudia l'efecte de l'aplicació contínua de AG i PBZ en el control de la floració del taronger dolç.

PALABRAS CLAVE: Alternaça de collites, cítrics, floració, giberel·lines, AG, PBZ, FT, MADS, CEN, LFY, API

Abstract:

In citrus, flowering intensity can be reduced or partially increased by applying gibberellic acid (GA) or paclobutrazol (PBZ, gibberellin synthesis inhibitor), respectively, during the resting period. However, under extreme conditions, both in the absence and excess of harvest, these treatments are ineffective, preventing the problems of excess or absence of flowering from being solved. While in annual plants flowering is regulated by a *qualitative* mechanism (flowering or not) of a genetic nature, in trees, the existence of another level of *quantitative* regulation is also accepted. This is based on the hypothesis that the presence of an inhibitory signal is transported over long distances, regulating the intensity of flowering.

In citrus, the fruit inhibits the next flowering from stages close to full size. This timing coincides with the time of GA sensitivity to reduce flowering intensity, so gibberellins (GAs) have been proposed as the inhibitory signal. Moreover, the effect of fruit and GAs is similar: the reduction in the number of flowers is approximately parallel to the reduction in sprouting without the number of leaves and/or flowers per bud being altered, indicating that fruit and GAs do not alter the number of flowers per bud sprouted but rather the number of buds sprouting. The concentration of gibberellins GA₁ and GA₄ in shoots with fruit, measured by the concentration in the shoot phloem, increases as fruit growth progresses, which could explain the inhibitory action of fruit on the sprouting/flowering of buds located on the same shoot that supports it. But GA and fruit show quantitative differences in their effect: while GA partially reduces flowering, fruit prevents it, and inhibits the promoting effect of PBZ, which casts doubt on the role of gibberellins in the process. It is possible that the continued presence of the fruit on the branch acts as a more effective inhibitory signal than a single exogenous treatment, the duration of which we do not know.

In this TFM we study the effect of the continuous application of GA and PBZ in the control of sweet orange flowering.

PALABRAS CLAVE: Crop alternation, citrus, flowering, gibberellins, AG, PBZ, *FT*, *MADS*, *CEN*, *LFY*, *API*

“Todos tenemos sueños. Pero para convertir los sueños en realidad, se necesita una gran cantidad de determinación, dedicación, autodisciplina y esfuerzo”

(Jesse Owens)

A mis padres y a mis abuelos.

A Manolo y Carlos, por vuestro trabajo, vocación y entrega en la docencia y en la difusión de conocimientos, por vuestros valores como personas y como equipo, y por la oportunidad de haber podido hacer este trabajo junto a vosotros. Gracias.

A Amparo, por tu alegría, ayuda, trabajo y dedicación constante en el laboratorio.

A Andrés y Paco, por vuestro compañerismo, por las sonrisas y por los buenos momentos que nunca nos han faltado juntos.

A mis padres y a mis abuelos, por el gran ejemplo de vida que han sido para mí, por todos los valores que como personas han sabido transmitirme desde pequeño, por su dedicación en la enseñanza de sus hijos y de sus nietos, por su esfuerzo y entrega en el mundo rural, y por cultivar en mí esta pasión y vocación que es la agricultura.

Y, finalmente, a esas estrellas que en noches oscuras siempre iluminan nuestros caminos.

Índices

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. El cultivo de los cítricos en España. Justificación del problema.....	1
2. La brotación y la floración en los cítricos.....	3
2.1 La inducción floral	3
2.2 La diferenciación floral.....	4
2.3. La brotación y los tipos de brotes	5
3. La inhibición de la brotación y floración	6
4. Hipótesis de trabajo y objetivos	9
II. MATERIAL Y MÉTODOS	10
1. Material vegetal y diseño del experimento	10
1.1. Determinaciones de campo	11
1.2. Determinaciones de la expresión génica.....	11
1.2.1. Toma y procesado de muestras	11
1.2.2. Extracción de mRNA	11
1.2.3. Elección de genes de interés y sus cebadores	12
1.2.4. Rt-qPCR.....	13
1.2.5. Análisis estadístico.....	13
III. RESULTADOS	14
1. Efecto de los tratamientos hormonales secuenciados sobre la brotación y la floración	14
1.1 Condiciones ambientales y desarrollo del fruto durante el experimento.....	14
1.2 Brotación y floración.....	16
1.3 Efecto de los tratamientos sobre los tipos de brotes. Diferencias cualitativas y cuantitativas.....	22
2. Efecto de los tratamientos hormonales secuenciados sobre la expresión de los genes de la inducción en las hojas (<i>CiFT3</i> y <i>CcMADS19</i>) y de la diferenciación en las yemas (<i>CEN</i>, <i>CiLFY</i> y <i>CiAPI</i>).....	25
IV. DISCUSIÓN.....	32
V. CONCLUSIONES.....	35
VI. BIBLIOGRAFÍA	36

Índice de Figuras

- FIGURA 1** Tipos de brotes en los cítricos. RF (Ramo Floral), FS (Flor Solitaria), BC (Brote Campanero), BM (Brote Mixto) y BV (Brote Vegetativo) (Agustí, 2003)..... 5
- FIGURA 2** Evolución de la temperatura máxima, la temperatura mínima y la acumulación de horas frío ($< 7,2^{\circ}\text{C}$) en Torrente (Valencia) a lo largo del experimento. La flecha roja indica el día del primer tratamiento y del primer muestreo de ON y OFF; las flechas verdes indican los tratamientos continuos de AG (25 ppm) y PBZ (50 ppm); las flechas moradas indican los muestreos correspondientes a las fases de inducción y diferenciación floral. 14
- FIGURA 3** Efecto de los tratamientos hormonales secuenciados con AG (25 ppm) y PBZ (50 ppm) sobre la evolución del Peso (g) (A), Diámetro (mm) (B) y Color (a/b) (C) en los frutos de árboles de naranja dulce *Chislett Summer Navel*[®] cultivados en Torrente (Valencia). Cada valor es el promedio de 12 frutos. Las barras verticales indican el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (LSD 95%)..... 15
- FIGURA 4** Efecto de los tratamientos hormonales secuenciados con AG (25 ppm) y PBZ (50 ppm) sobre la brotación y floración de los árboles de naranja dulce *Chislett Summer Navel*[®] cultivados en Torrente (Valencia). A: Promedio de brotes cada 100 nudos contados. B: Promedio de nudos múltiples desarrollados cada 100 nudos contados. C: Promedio de flores desarrolladas cada 100 nudos contados. D: Promedio de hojas desarrolladas cada 100 nudos contados. Cada valor representa el promedio de 30 ramas. Las barras verticales indican el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (LSD 95%). 19
- FIGURA 5** Efecto de los tratamientos hormonales secuenciados con AG (25 ppm) y PBZ (50 ppm) sobre los tipos de brotes de los árboles de naranja dulce *Chislett Summer Navel*[®] cultivados en Torrente (Valencia). A: Promedio de inflorescencias cada 100 nudos contados. B: Promedio de flores solitarias cada 100 nudos contados. C: Promedio de brotes mixtos cada 100 nudos contados. D: Promedio de brotes campaneros cada 100 nudos contados. E: Promedio de brotes vegetativos cada 100 nudos contados. Cada valor representa el promedio de 30 ramas. Las barras verticales indican el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (LSD 95%). 21

FIGURA 6 Efecto de la aplicación continuada de AG (25 ppm) y PBZ (50 ppm) sobre la distribución de los tipos de brotes de los árboles de naranjo dulce *Chislett Summer Navel*[®] cultivados en Torrente (Valencia). A: Inflorescencias por cada nudo brotado. B: Flores solitarias por cada nudo brotado. C: Brotes campaneros por cada nudo brotado. D: Brotes mixtos por cada nudo brotado. E: Brotes vegetativos por cada nudo brotado. Cada valor representa el promedio de 30 ramas. Datos expresados en tanto por uno.....22

FIGURA 7 Efecto de la aplicación continuada de AG (25 ppm) y PBZ (50 ppm) en los nuevos brotes de primavera de las ramas de los árboles de naranjo dulce *Chislett Summer Navel*[®] cultivados en Torrente (Valencia). A: Longitud de los brotes. B: Longitud de los entrenudos. C: Longitud de las hojas. D: Ancho de las hojas. Cada valor representa el promedio de al menos 60 nuevos brotes. Las barras verticales indican el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (LSD 95%).24

FIGURA 8 Efecto de la aplicación continuada de AG (25 ppm) y PBZ (50 ppm) sobre la expresión en las hojas del gen promotor de la floración *CiFT3* durante las fases de inducción y diferenciación floral, en árboles de naranjo dulce *Chislett Summer Navel*[®] cultivados en Torrente (Valencia). Cada valor representa el promedio de 3 réplicas biológicas. Las barras verticales indican el error estándar.....27

FIGURA 9 Efecto de la aplicación continuada de AG (25 ppm) y PBZ (50 ppm) sobre la expresión en las hojas del gen represor de la floración *CcMADS19* durante las fases de inducción y diferenciación floral, en árboles de naranjo dulce *Chislett Summer Navel*[®] cultivados en Torrente (Valencia). Cada valor representa el promedio de 3 réplicas biológicas. Las barras verticales indican el error estándar.28

FIGURA 10 Efecto de la aplicación continuada de AG (25 ppm) y PBZ (50 ppm) sobre la expresión en las yemas del gen promotor del crecimiento indeterminado *CEN* durante las fases de inducción y diferenciación floral, en árboles de naranjo dulce *Chislett Summer Navel*[®] cultivados en Torrente (Valencia). Cada valor representa el promedio de 3 réplicas biológicas. Las barras verticales indican el error estándar.29

FIGURA 11 Efecto de la aplicación continuada de AG (25 ppm) y PBZ (50 ppm) sobre la expresión en las yemas del gen promotor de la floración *CiLFY* durante las fases de inducción y diferenciación floral, en árboles de naranjo dulce *Chislett Summer Navel*[®] cultivados en Torrente (Valencia). Cada valor representa el promedio de 3 réplicas biológicas. Las barras verticales indican el error estándar.30

FIGURA 12 Efecto de la aplicación continuada de AG (25 ppm) y PBZ (50 ppm) sobre la expresión en las yemas del gen promotor de la floración *CiAPI* durante las fases de inducción y diferenciación floral, en árboles de naranjo dulce *Chislett Summer Navel*[®] cultivados en Torrente (Valencia). Cada valor representa el promedio de 3 réplicas biológicas. Las barras verticales indican el error estándar. 31

Índice de Tablas

TABLA 1 Cebadores elegidos para el análisis de expresión génica.....13

Índice de Fotografías

FOTOGRAFÍA 1 Efecto del tratamiento hormonal secuenciado con AG (25 ppm) sobre la longitud de los brotes y el tamaño de las hojas respecto al control OFF sin tratar (CT).23

I. INTRODUCCIÓN

1. El cultivo de los cítricos en España. Justificación del problema

España es el sexto país productor de naranjas y segundo de mandarinas en el mundo, siendo, en ambos casos, el mayor productor de la Unión Europea (FAO, 2021). En el año 2019, la producción de naranjas y mandarinas en este país alcanzó 3.342.540 t y 1.893.951 t, respectivamente, lo que supuso una reducción de la producción del 16,94 % en naranjas y del 26,63 % en mandarinas. La superficie de cultivo, 139.971 ha y 105.583 ha, también se redujo un 0,60 % en los naranjos y un 2,87 % en los mandarinos, respecto al año anterior 2018 (MAPA, 2021).

La Comunidad Valenciana fue en 2019 la principal región productora a nivel nacional, con una superficie de cultivo de 70.344 ha de naranjos y de 73.068 ha de mandarinos (58,40 % de la superficie total en España) y una producción, respectivamente, de 1.526.942 t y 1.168.389 t (51,47 % de la producción total en España) (Conselleria de Agricultura, Medio Ambiente, Cambio Climático y Desarrollo Rural, 2021). La estimación realizada por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación para la campaña 2020-21 muestra, respecto al año anterior, un importante ascenso en la producción de mandarinas (28,0 %) y un aumento relativo en la producción de naranjas (3,6 %). (MAPA, 2021). Estas variaciones abruptas en la producción de mandarinas, en este caso, pero, también, en la de naranjas en otros años, no se deben solamente a las condiciones climáticas y económicas de los lugares de producción, sino que también intervienen factores intrínsecos de cada cultivo y variedad. Entre estos, destacan los problemas de producción relacionados con la floración: 1) la alternancia de cosechas, y 2) la concatenación de ciclos improductivos.

La **alternancia de cosechas** es un problema caracterizado por años de elevada cosecha (año ON) seguidos de años improductivos (año OFF), a causa de la inhibición de la floración provocada por los frutos. Durante el año OFF, la ausencia de frutos permite que la floración al año siguiente sea abundante. Como las variedades que presentan este problema tienen elevada capacidad de cuajado, muchas de las flores cuajan, ocasionando de nuevo un año ON.

Los factores que determinan la inhibición de la floración son la cantidad de frutos y el tiempo de permanencia en el árbol, de modo que existe una relación inversa y exponencial entre estos dos factores y la posterior brotación y floración. Además, la interacción entre la cantidad de frutos y tiempo de permanencia es significativa (Martínez-Fuentes, 2010). La intensidad de la alternancia de cosechas depende de la especie y variedad, siendo particularmente importante en algunos cultivares tardíos de naranjos, mandarinos e híbridos. En la especie Naranja dulce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck], se da la alternancia en las variedades *Salustiana* y *Valencia Late* del grupo Blancas,

y *Navelina* (Martínez-Fuentes *et al.*, 2010) y, en menor medida, *Chislett Summer Navel*[®] o *Navel Lane Late* del grupo Navel. Por otro lado, entre los mandarinos Clementinos (*Citrus clementina* Hort. Ex Tan.), la variedad *Hernandina* presenta un elevado grado de alternancia. Dentro del grupo de los Híbridos, destaca el caso del cultivar *Moncada*, cuya alternancia es del 100 % cuando el árbol alcanza en torno a 80 kg de cosecha. La eliminación parcial de ésta permite un aumento de la floración, pero los árboles de *Moncada* retoman la tendencia alternante de modo natural debido al elevado número de frutos que cuajan (Muñoz-Fambuena *et al.*, 2011). El mandarino *Nadorcott*[®] por su parte, alterna entre el 70-100 % en función de la cosecha (100-150 kg·árbol⁻¹) (Muñoz-Fambuena *et al.*, 2013) y en las variedades *Orrti*[®] o *Spring Sunshine*[®] también se han observado fenómenos alternantes. La poda mecánica durante la floración en grandes superficies de variedades vigorosas permite aliviar el problema, aumentando la producción un 20 % en los años OFF (Mesejo *et al.*, 2020). Pero el problema principal, la falta de floración tras la elevada cosecha, sigue sin estar resuelto.

Por otra parte, la concatenación de ciclos improductivos sucede en variedades con **baja capacidad partenocárpica** en años con floraciones abundantes. Así, en variedades de naranjo dulce como *Navelate* o *Powell Summer Navel*[®], el exceso de floración es la causa principal de la falta de producción (año OFF). La falta de frutos permite una floración abundante en el siguiente año que, de nuevo, es la causa de la falta de producción (otro año OFF), y así sucesivamente. La aplicación de ácido giberélico (AG) durante el reposo invernal permite inhibir parcialmente la floración y con ello, reducir la competencia a la primavera siguiente, mejorando el cuajado (Agustí *et al.*, 1982). Aun así, si el exceso de floración es elevado, la aplicación de AG no consigue resolver el problema.

Por tanto, bien por falta de floración, bien por exceso de ésta, los cítricos presentan problemas de producción que no tienen, de momento, una solución agronómica. Las técnicas utilizadas hasta ahora presentan limitaciones que impiden la resolución del problema. El presente TFM pretende comprender esas limitaciones a través del estudio del efecto de la aplicación continua de AG y PBZ en el control de la floración del naranjo dulce.

2. La brotación y la floración en los cítricos

Con el nombre de **floración** se designa a la etapa del desarrollo con la que se inicia la fase reproductiva de la planta tras la inducción y diferenciación de sus yemas. El éxito reproductivo de una planta depende de que la floración tenga lugar en el momento más adecuado de su desarrollo, cuando las condiciones ambientales sean favorables. En las angiospermas, la intensidad y el tiempo de floración dependen tanto de factores exógenos (fotoperiodo, temperatura y estado hídrico), como endógenos (factores genéticos, hormonales y nutricionales) (Blázquez *et al.*, 2011). En el caso de los cítricos, el fotoperiodo no es un factor inductor de la floración, al tratarse de una especie de día neutro. No obstante, las bajas temperaturas (Nishikawa *et al.*, 2007) y las situaciones de estrés hídrico prolongado (Chica & Albrigo, 2013) son determinantes para desencadenar la señal inductora de la floración. Pero la floración en los cítricos es un proceso represivo, siendo la presencia del fruto un factor endógeno inhibidor (Agustí, 2003). Cada uno de estos factores activa o reprime rutas de señalización que modifican la expresión de los genes que dan lugar a la promoción o represión de la floración.

2.1 La inducción floral

La **inducción floral** es el proceso por el que el programa de desarrollo de un meristemo apical o axilar de las ramas cambia de vegetativo a reproductivo por efecto de señales exógenas y endógenas. El periodo de inducción floral de los cítricos en condiciones de clima mediterráneo se ha situado entre los meses de noviembre y diciembre (Goldschmidt & Monselise, 1972; Sánchez-Capuchino & Casanova, 1973). Se localiza en las hojas (Corbesier *et al.*, 2007) y se divide en una fase reversible, en la que si se modifican las condiciones inductoras óptimas se interrumpe el proceso, y en otra irreversible que, aun modificando las condiciones, el meristemo siempre será floral (Agustí, 2003).

La inducción floral en los cítricos cultivados en climas subtropicales es promovida por las bajas temperaturas (Nishikawa *et al.*, 2007), inferiores a 15°C, que activan la expresión del gen *CiFT*, homólogo del gen *FLOWERING LOCUS T (FT)* en *Arabidopsis thaliana* L., responsable de la floración en esta especie (Muñoz-Fambuena *et al.*, 2011). En cambio, en climas tropicales en los que no existen periodos fríos, la inducción floral es promovida por el estrés hídrico, activando la expresión de *CiFT*. Posteriormente, el restablecimiento de las condiciones hídricas activa la expresión de los genes promotores de la identidad floral del meristemo (Chica & Albrigo, 2013). También se ha demostrado que la aplicación exógena de hormonas como las giberelinas o el paclobutrazol, reprimen o promueven, respectivamente, la expresión de *CiFT* en las hojas durante

la fase de inducción floral (Muñoz-Fambuena *et al.*, 2012). Pero, con independencia de que se presenten las señales inductoras de baja temperatura o estrés hídrico, la presencia del fruto siempre inhibe la floración (Muñoz-Fambuena *et al.*, 2012; Martínez-Fuentes *et al.*, 2013).

2.2 La diferenciación floral

La **diferenciación floral** es un proceso morfológico posterior a la inducción floral durante el cual se inicia la formación de la flor o inflorescencia. En primer lugar, se forman los sépalos, seguidos de los pétalos, luego los estambres y, finalmente, el pistilo (Urbina, 2002). El periodo de diferenciación floral en los cítricos en condiciones de clima mediterráneo sucede con el inicio de la brotación, al final del invierno en los naranjos y al principio de la primavera en los mandarinos (Agustí, 2003). Lord y Eckhardt (1985) propusieron la existencia de un periodo previo de diferenciación microscópica (en diciembre para el naranjo).

Durante la inducción floral, la proteína FT se transporta de las hojas a las yemas por el floema donde forma un dímero junto a la proteína FLOWERING LOCUS D (FD) (Bäurle & Dean *et al.*, 2006) que desencadenará la expresión los genes *CiLFY* y *CiAPI*, homólogos de *LEAFY* (*LFY*) y *APETALLA1* (*API*) en *Arabidopsis thaliana* L., y relacionados con la identidad floral del meristemo (Blázquez *et al.*, 2011). De hecho, el gen *LFY* ejerce una función reguladora sobre *API*: (i) inducir directamente su expresión y (ii) reducir los niveles de GAs activas al activar el catabolismo de las giberelinas (GAs) a través de la enzima *GA2ox1*, permitiendo la acumulación de las proteínas DELLAs que, al unirse a los factores de transcripción *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE* (*SPL*), activan la expresión de *API* (Yu *et al.*, 2012; Yamaguchi *et al.*, 2014). La sobreexpresión de cualquiera de los dos genes florales es condición suficiente para que el meristemo se diferencie en una flor, tanto en *Arabidopsis thaliana* L. (Busch *et al.*, 1999; Wagner *et al.*, 1999; Ng & Yanofsky, 2001) como en los cítricos (Peña *et al.*, 2001).

Por otra parte, en el mantenimiento de la identidad vegetativa del meristemo participan otros genes. La proteína del gen *TERMINAL FLOWER 1* (*TFL1*), actúa como represor de los genes de identidad floral del meristemo *LFY* y *API* (Bradley *et al.*, 1997a; Pillitteri *et al.*, 2001; Conti & Bradley, 2007; Serrano-Mislata *et al.*, 2016) y forma un dímero distinto con la proteína FD que actúa como represor de la floración (Silvestre, 2020). Por otra parte, el gen *CENTRORADIALIS* (*CEN*) es un homólogo de *TFL1* que actúa reprimiendo la expresión del gen *LFY*, manteniendo el meristemo vegetativo y el crecimiento indeterminado (Pnueli *et al.*, 1998; Mohamed *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2021). En *Arabidopsis*, la represión del gen *LFY* genera una acumulación de giberelinas en el meristemo (Yamaguchi *et al.*, 2014), que promueve la degradación de las

proteínas DELLA. Sin *LFY*, tampoco se expresa *API* en el meristemo, lo que ocasiona que éste sea de carácter vegetativo.

2.3 La brotación y los tipos de brotes

La **brotación** en los cítricos está regulada por factores exógenos (temperatura, fundamentalmente) y endógenos (balances nutricionales y hormonales) (Guardiola *et al.*, 1982; Wahl *et al.*, 2013; Mason *et al.*, 2014). En el clima mediterráneo, los cítricos experimentan tres brotaciones: (i) al inicio de la primavera, la más intensa, que produce las flores útiles, y que se detiene los meses de abril y mayo, coincidiendo con el cuajado de frutos debido a la elevada competencia entre órganos en desarrollo, (ii) una segunda brotación, exclusivamente vegetativa, antes del verano que se frenará a causa del aumento de las temperaturas estivales y (iii) una tercera también vegetativa, previa al invierno, la cual se detiene con el descenso térmico y la entrada en reposo del árbol.

La brotación y floración de primavera se origina principalmente sobre las ramas desarrolladas en la brotación de otoño del año anterior y, en menor medida, en las ramas de verano y de primavera. La capacidad de brotación de una yema depende de la edad de la madera, siendo menor cuantos más años tenga la rama (Agustí, 2003). Los brotes que surgen en primavera se clasifican de acuerdo con el número de hojas y flores. Los brotes multiflorales sin hojas reciben el nombre de Ramos de Flor (RF) y los que generan varias hojas, Brotes Mixtos (BM); los uniflorales sin hojas se denominan Flores Solitarias (FS) y con hojas, Brotes Campaneros (BC); y, finalmente, los brotes que solo están formados por hojas son Brotes Vegetativos (BV) (Agustí, 2003):

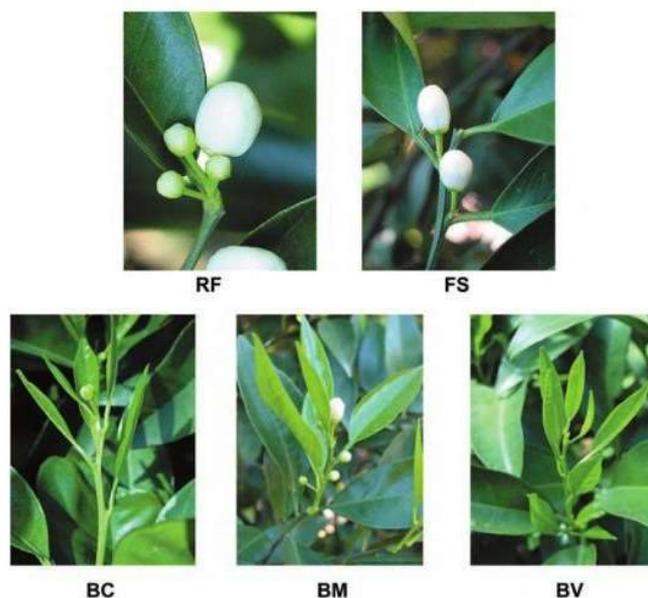


FIGURA 1 Tipos de brotes en los cítricos. RF (Ramo Floral), FS (Flor Solitaria), BC (Brote Campanero), BM (Brote Mixto) y BV (Brote Vegetativo) (Agustí, 2003).

3. La inhibición de la brotación y floración

La **presencia del fruto** en el árbol modifica la intensidad de brotación y floración en los cítricos y redistribuye los tipos de brotes, favoreciendo el desarrollo de estructuras vegetativas sobre las reproductivas y estableciendo un gradiente de brotación que disminuye con el aumento de la cosecha previa. Además, también puede alterarse la intensidad de floración en el árbol a causa de un retraso en la recolección. Todo ello, condiciona la regularidad de las producciones, y es el motivo de la alternancia de cosechas en determinadas variedades (Agustí, 1980; Guardiola *et al.*, 1982; Albrigo & Saucó, 2004; Martínez-Fuentes *et al.*, 2010). La relación entre la productividad y la intensidad de floración es exponencial e inversa, lo que indica, por una parte, que el proceso inhibitorio tiene una componente cuantitativa, que se manifiesta en el árbol con independencia de ramas: en aquellas que tienen un menor número de frutos, la floración se da, aunque sea en baja intensidad, mientras que en aquellas que tienen muchos frutos, el proceso queda inhibido. Pero la inhibición de la floración tiene, además, una componente cualitativa a nivel de meristemo, “*vegetativo o reproductivo*”, que se establece a corta distancia (Bangerth, 2009).

El fruto inhibe la floración en etapas próximas a completar su tamaño final y alcanzar el cambio de color (Martínez-Fuentes *et al.*, 2010). En el proceso de inhibición de la floración, existen dos hipótesis compatibles, no contradictorias, basadas en la competencia por nutrientes y la acción de determinadas hormonas, que tratan de explicar el mecanismo a través del cual el fruto inhibe la floración (Goldschmidt & Sadka, 2021).

La **hipótesis nutricional** asume que el agotamiento de las reservas durante el año de elevada cosecha impide la siguiente brotación y floración (Goldschmidt & Golomb, 1982). Los **carbohidratos** ejercen un papel directo sobre la brotación (Wahl *et al.*, 2013), ya que su acumulación en las yemas axilares en forma de sacarosa constituye una señal endógena que podría desencadenar el proceso (Mason *et al.*, 2014). Además, la brotación en los cítricos está limitada solamente por los niveles de carbohidratos y no por los de nitrógeno, siendo bajos en los años ON y altos en los años OFF debido a la elevada capacidad sumidero de los frutos (Martínez-Alcántara *et al.*, 2015). Sin embargo, la relación entre los carbohidratos y la floración en los cítricos es más controvertida, ya que se desconoce si constituyen una señal *per se* que promueva la floración o simplemente son necesarios como fuente de energía para sustentar la división celular y el desarrollo (García-Luís *et al.*, 1995). En otras especies, la concentración de carbohidratos se ha sugerido como señal inductora de la floración (Wahl *et al.*, 2013; Xing *et al.*, 2015).

La **hipótesis hormonal** propone que los frutos en desarrollo producen hormonas que interfieren en la inducción floral. Las **auxinas** como el ácido indolacético (AIA) regulan la dominancia apical inhibiendo la acumulación de azúcares en las yemas axilares y, por tanto, inhibiendo la brotación (Mason *et al.*, 2014). Los frutos también producen esta hormona durante el desarrollo, que se transporta basípetamente por el brote, impidiendo la brotación. Dependiendo de la época, la eliminación del fruto reduce la concentración de AIA y promueve la floración (Shalom *et al.*, 2014; Haim *et al.*, 2020). Pero el tratamiento con 2,4-D en diciembre o enero no es eficaz inhibiendo la floración (García-Luís *et al.*, 1986).

Por otra parte, las **giberelinas** (GAs), se han relacionado con la inhibición de la floración a través de aplicaciones exógenas de ácido giberélico (AG) en el momento de reposo vegetativo (Guardiola *et al.*, 1982). El tratamiento con AG reduce la brotación y redistribuye los tipos de brotes en detrimento de los florales, de un modo similar a como sucede cuando se incrementa la cosecha. El AG reprime la expresión del gen promotor de la floración *CiFT2* en las hojas durante la fase de inducción floral (Muñoz-Fambuena *et al.*, 2012). En ese momento, además, las giberelinas de los frutos disminuyen su concentración en el flavedo y su posterior transporte a otras partes del árbol coincide con el cambio de color (Gambetta *et al.*, 2012). Estudios realizados con aplicaciones localizadas de AG en yemas (AGY) y hojas (AGH) durante la inducción floral (diciembre) han demostrado tener un efecto inhibitorio sobre la brotación (AGY) y floración (AGY y AGH), sin activar la expresión del gen represor de *CiFT2*, *CcMADS19*, un homólogo en los cítricos del gen *FLOWERING LOCUS C (FLC)* en *Arabidopsis thaliana* L. (Agustí *et al.*, 2020). Esta discrepancia sugiere, por una parte, que la aplicación de AG y el fruto inhiben la floración a través de mecanismos diferentes y, por otra, que el supuesto efecto inhibitorio del fruto a través de las giberelinas sucedería en las yemas y no en las hojas (Cervera, 2020). Otros estudios realizados con aplicaciones localizadas de AG en yemas durante la diferenciación floral han demostrado tener un efecto sobre la expresión del gen *CEN*, promotor del crecimiento indeterminado (Pascual, 2021).

En los años 80, con la idea de *inhibir al inhibidor de la floración*, se consiguieron buenos resultados en la promoción de la floración aplicando paclobutrazol (Delgado *et al.*, 1986a; 1986b; Harty & Van Staden, 1988a; 1988b), un inhibidor del enzima kaureno-oxidasa que inicia la síntesis de giberelinas (Henry, 1985). En general, el PBZ incrementa la floración en cítricos con producciones bajas o medias, en los que estimula la expresión de *CiFT* (Muñoz-Fambuena *et al.*, 2012). Sin embargo, no es capaz de hacerlo en árboles con muchos frutos (Martínez-Fuentes *et al.*, 2013): el fruto anula la respuesta del paclobutrazol.

El hecho de que el AG y el fruto presenten diferencias cuantitativas en su efecto (mientras el AG reduce parcialmente la floración, el fruto la impide, e inhibe el efecto promotor del PBZ), dificulta la interpretación del papel de las giberelinas en la inhibición de la floración, y sugiere la existencia de otros niveles de regulación aguas arriba del nivel hormonal (Bangerth, 2009). Por ejemplo, la presencia del fruto provoca la activación epigenética del gen inhibidor de la floración *CcMADS19*, que impide la inducción floral a través de la inhibición de la expresión del gen *CiFT2* en las hojas (Agustí *et al.*, 2020). Además, el meristemo vegetativo y su posterior desarrollo reinicia la capacidad de florecer a través de la represión epigenética de *CcMADS19* (Mesejo *et al.*, 2021).

Pero la ausencia de efecto de los tratamientos exógenos también podría ser consecuencia de que la presencia continua del fruto en la rama actúe como una señal inhibidora más eficaz que un único tratamiento exógeno, en el momento de la inducción, cuya duración desconocemos. Monselise (1979) razona la respuesta errática de los reguladores del desarrollo proponiendo que los antagonistas de la síntesis de giberelinas pueden ser efectivos solamente antes de que éstas hayan sido sintetizadas y no cuando están presentes en cantidades elevadas, quedando este tema todavía por resolver.

4. Hipótesis de trabajo y objetivos

La **hipótesis** que se plantea en este Trabajo Final de Máster es la siguiente: “*el efecto de la aplicación continua de AG y PBZ, desde antes de la inducción hasta la diferenciación floral, permite el control de la floración de árboles OFF y ON de naranjo dulce*”.

Los **objetivos** son:

1. Estudiar el efecto de la aplicación continua de AG y PBZ en árboles OFF y ON de naranjo dulce sobre la brotación de la primavera y la floración.
2. Estudiar el efecto del fruto y de la aplicación continua de AG y PBZ en la expresión de los genes *CiFT3* y *CcMADS19*, promotor y represor de la inducción floral, *CiLFY* y *CiAPI*, promotores de la identidad floral del meristemo, y *CEN*, promotor del meristemo indeterminado.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Material vegetal y diseño del experimento

El experimento se realizó en una plantación de naranjo dulce cv. *Chislett Summer Navel*[®] [*Citrus sinensis* (L.) Osb.], injertado sobre patrón citrange Carrizo [*Citrus sinensis* (L.) Osb. x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.], situada en la localidad de Torrente, provincia de Valencia. Los árboles tenían 10 años, se encontraban en óptimas condiciones sanitarias y nutricionales y su cultivo se realizaba según la normativa de producción integrada, utilizando riego localizado y fertirrigación.

Se seleccionaron 6 árboles OFF (cosecha reducida) y 6 árboles ON (cosecha elevada). En los árboles ON, se seleccionaron 60 brotes campaneros (fruto en posición terminal de un brote de primavera) de al menos 5 nudos de longitud. Este tipo de brotes son incapaces de florecer (Muñoz-Fambuena *et al.*, 2011). En los árboles OFF se seleccionaron 60 brotes vegetativos de la brotación de verano con al menos 5 nudos de longitud. Este tipo de brotes florecen abundantemente (Muñoz-Fambuena *et al.*, 2011). Además, en los árboles OFF y ON, se realizaron tratamientos hormonales secuenciados a los brotes. Por una parte, se aplicó ácido giberélico (AG, 25 mg·l⁻¹) para inhibir la brotación y floración y, por otra parte, se aplicó paclobutrazol (PBZ, 50 mg·l⁻¹) para promoverlas. Los tratamientos se iniciaron a finales de octubre (29/10/2020), sobre 60 brotes OFF y ON por árbol, con un mínimo de 5 yemas axilares. La aplicación a los brotes se realizó mediante un pulverizador manual de baja presión, utilizando un mojante no iónico al 0,05 %.

Para conocer el efecto de los tratamientos hormonales secuenciados con AG y PBZ sobre la inhibición y promoción de la brotación y floración se cuantificó la brotación y la floración de primavera en 30 brotes por tratamiento, en comparación con los brotes sin tratar OFF y ON. Para estudiar si el mecanismo de inhibición del fruto en la brotación y floración es el mismo que el de la aplicación secuenciada de AG, se tomaron 12 brotes por tratamiento (3 réplicas biológicas de 4 brotes cada una) en 3 fechas diferentes coincidiendo con el inicio del tratamiento (29/10/2020), la fase de inducción floral (17/12/2020) y la fase de diferenciación floral (19/01/2021). Del mismo modo se procedió con los tratamientos secuenciados de PBZ. Para cada tratamiento se determinó la expresión de los genes responsables de la promoción/represión de la floración (**TABLA 1**).

1.1 Determinaciones de campo

Durante los periodos de inducción y diferenciación floral, se determinó el estado de desarrollo del fruto de los árboles ON. En cada uno de los muestreos realizados, se tomó 1 fruto por brote y tratamiento (36 en total) para cada fecha de muestreo, en los que se midió el peso individual (g) con una balanza de precisión ($\pm 0,001\text{g}$), su diámetro (mm) con un pie de rey (Mitutoyo, Japón), y su color con el colorímetro (Minolta CR-400), expresando los resultados de color según la relación a/b.

La brotación y la floración de primavera se cuantificó en 30 brotes por tratamiento, determinando el porcentaje de nudos brotados en todas las yemas y el número de nudos dobles. Se contaron en cada uno de los nuevos brotes las hojas y las flores y se clasificaron atendiendo al criterio de brotes vegetativos (sin flores), mixtos (varias flores con hojas), campaneros (una flor en posición terminal de un brote con hojas), inflorescencias (varias flores sin hojas) y flor solitaria (Agustí, 2003). El efecto de los tratamientos sobre el desarrollo de los brotes (longitud de brote, entrenudos y tamaño de hoja) se evaluó después del conteo de la floración.

Los valores de temperatura máxima y mínima se obtuvieron de la estación meteorológica de Godolleta, muy cercana a la parcela del experimento y perteneciente a INFORATGE SC. Los datos meteorológicos se descargaron de la página web <https://www.avamet.org/mx-meteoxarxa.php>.

1.2 Determinación de la expresión génica

1.2.1 Toma y procesado de muestras

Los muestreos realizados para evaluar la expresión génica se realizaron siempre a la misma hora, dada la cinética circadiana que presentan algunos de ellos, y se transportaron a 4°C al laboratorio. Se tomaron 3 hojas por brote y todas las yemas, para tener la suficiente cantidad de muestra, se congelaron con N₂ líquido y se conservaron a -80°C. Finalmente, las muestras se molieron a polvo fino, utilizando N₂ líquido, para realizar la extracción de mRNA.

1.2.2 Extracción de mRNA

La extracción de mRNA, consiste en la eliminación de todos aquellos compuestos que actúan como barreras físicas y químicas sobre el mRNA, como polifenoles, polisacáridos, metabolitos secundarios, proteínas y otros contaminantes como el fenol y sales inorgánicas.

El protocolo de extracción se divide en dos partes, con una duración de dos días. La primera parte consiste en pesar 0,5 g de cada muestra que se transfiere a un tubo de 15 ml. Posteriormente, se introduce en el tubo 2 ml de TCES (0.2 Tris ph=8 + 0.2 M NaCl + 50mM EDTA + 2 % SDS),

además de 2 ml de fenol ácido y 40 μ l β - mercaptoetanol. Posteriormente, se homogeniza la muestra en el vórtex durante 1 minuto y se dejan los tubos 5 minutos en el baño a 50 °C, agitando manualmente una vez por minuto. Después, se centrifuga a 4.000 r.p.m. durante 30 minutos (centrifuga grande Ependorf). Una vez terminado el tiempo, se pasa el sobrenadante a otro tubo.

El siguiente paso consiste en añadir 1 volumen de cloroformo alcohol isoamílico (24:1). Se vuelve a pasar por el vórtex y se centrifuga otros 30 minutos a 4.000 r.p.m. Una vez separadas las fases, se separa la fase superior a uno o varios microtubos de 1,5 ml y se vuelve a centrifugar, en este caso a 10.000 r.p.m. durante 15 minutos en microcentrífuga. Con este paso se acaban de eliminar las impurezas. Una vez finalizada la centrifugación, se pasa el sobrenadante a otro microtubo de 1,5 ml y se le añade $\frac{1}{2}$ de volumen de LiCl 6M (DEPC), dejándose precipitar a -20°C toda la noche.

Al inicio del segundo día, se centrifuga a 10.000 r.p.m. unos 30 minutos, en la microcentrífuga, para obtener el precipitado. Este se lava con 200 μ l EtOH 70 % (debe estar a -20°C). El tubo se centrifuga 5 minutos y se elimina el sobrenadante. Se repite el proceso hasta que el pellet quede limpio. Posteriormente, se deja secar al aire unos 20 minutos y se vuelve a suspender con 100 μ l de agua.

Finalmente, se pasa a la fase de purificación por columnas, empleando para ello el kit RNeasy[®] Plant Mini Kit (Qiagen, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. También, se cuantifico la calidad y cantidad del mRNA libre obtenido. Para ello, se utilizó un equipo NanoDrop ND-100 (NanoDrop Technologies).

1.2.3 Elección de genes de interés y sus cebadores

Con el fin de determinar el efecto de los tratamientos sobre los genes reguladores del proceso de floración se cuantificaron la expresión de (i) los genes *CiFT3* (promotor, anteriormente denominado *CiFT2*) y *CcMADS19* (represor), responsables de la inducción floral en las hojas, (ii) los genes de *CiLFY* y *CiAPI* promotores de la identidad floral en las yemas, y (iii) el gen *CEN* promotor del meristemo vegetativo y el crecimiento indeterminado en las yemas.

TABLA 1 Cebadores elegidos para el análisis de expresión génica

Gen (HOJAS)	ID EST code ^a	Descripción	5'-3' Forward primer	5'-3' Reverse primer	Reference
<i>CiFT3</i>	MT602515 Ciclev10012905m	Promotor de la inducción	AGACTGTTTATGCACCGGGG	AGTTGAAGTAGACAGCGGCC	Muñoz-Fambuena <i>et al.</i> , 2011
<i>CcMADS19</i>	Ciclev10033420m	Represor de la inducción	GGCAACTGAAGGTCCAAAC	GCCCAATGAGCATAGGAATG	Agusti <i>et al.</i> , 2020
Actina	Ciclev10025866m	Gen de referencia	CCGACCGTATGAGCAAGGAAA	TTCCTGTGGACAATGGATGGA	Guo <i>et al.</i> , 2016

Gen (YEMAS)	ID EST code ^a	Descripción	5'-3' Forward primer	5'-3' Reverse primer	Reference
<i>CEN</i>	Ciclev10029782m	Represor de la diferenciación	CCAGCTTCAAGGATCGGTT	GAGCAGCAGTCTCCCTTGT	Zhang <i>et al.</i> , 2021
<i>CiLFY</i>	aC34107C06EF_c	Promotor de la diferenciación	AGACTGTTTATGCACCGGGG	AGTTGAAGTAGACAGCGGCC	Muñoz-Fambuena <i>et al.</i> , 2011
<i>CiAPI</i>	aCL9055Contig1	Promotor de la diferenciación	CAAAACCAGGTTCCCAACAC	ACGAACATACGGGTCAAGG	Muñoz-Fambuena <i>et al.</i> , 2011
<i>LYC</i>	MJ136 MJ137	Gen de referencia	GAACCAGGAGCTTAGGTCT	GCTAGGTCTACAACAAGGCC	Alquezar <i>et al.</i> , 2009

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

1.2.4 Rt-qPCR

Para la cuantificación relativa mediante PCR se utilizó el kit QuantiTect[®] SYBR[®] Green PCR Kit (Qiagen), según las instrucciones del fabricante. Se utilizó 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 réplicas 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. La cuantificación de mRNA se realizó en 3 réplicas biológicas por tratamiento, procedentes de la mezcla del material vegetal de 4 brotes individuales.

1.2.5 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.). A los valores porcentuales se le aplicó la transformación arcsen (\sqrt{p}).

III. RESULTADOS

1. Efecto de los tratamientos hormonales secuenciados sobre la brotación y la floración

1.1 Condiciones ambientales y desarrollo del fruto durante el experimento

En Torrente (Valencia), y para las condiciones ambientales del experimento, la reducción de la temperatura mínima por debajo de 15°C (temperatura de inducción floral en los cítricos) sucedió a partir de la última semana de septiembre. La acumulación de horas frío (horas por debajo de 7,2°C) se inició el 16 de octubre, pero se detuvo hasta, prácticamente, mediados de noviembre, momento en el que experimentó un crecimiento exponencial que, finalmente, se estabilizó durante el mes de febrero (FIGURA 2). Los tratamientos hormonales secuenciados se iniciaron el 29/10/2020, 30 días después del momento en que la temperatura mínima fue consistentemente inferior a 15°C y, además, antes del momento de cambio de color del fruto (FIGURA 3), repitiéndolos periódicamente (FIGURA 2).

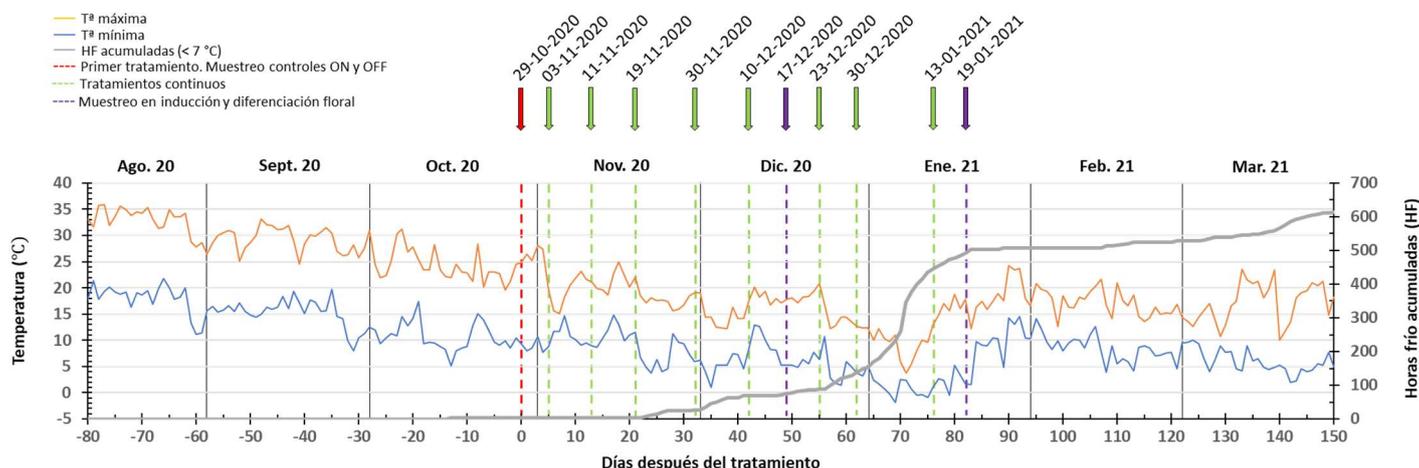


FIGURA 2 Evolución de la temperatura máxima, la temperatura mínima y la acumulación de horas frío (< 7,2°C) en Torrente (Valencia) a lo largo del experimento. La flecha roja indica el día del primer tratamiento y del primer muestreo de ON y OFF; las flechas verdes indican los tratamientos continuos de AG (25 ppm) y PBZ (50 ppm); las flechas moradas indican los muestreos correspondientes a las fases de inducción y diferenciación floral.

El tratamiento hormonal secuenciado con AG no modificó ni el peso ni el diámetro de los frutos, pero sí lo hizo el tratamiento con PBZ, que redujo significativamente el peso (-11,0 %) y el diámetro (-3,5 %) respecto al control y al tratamiento con AG (FIGURAS 3 A y B). Por otra parte, en los frutos control, el cambio de color sucedió a finales de noviembre, alcanzando su color definitivo a finales de este mes. El tratamiento hormonal secuenciado con PBZ no modificó el color de los frutos respecto al control, pero sí lo hizo el tratamiento con AG, que retrasó significativamente el cambio de color (FIGURA 3 C).

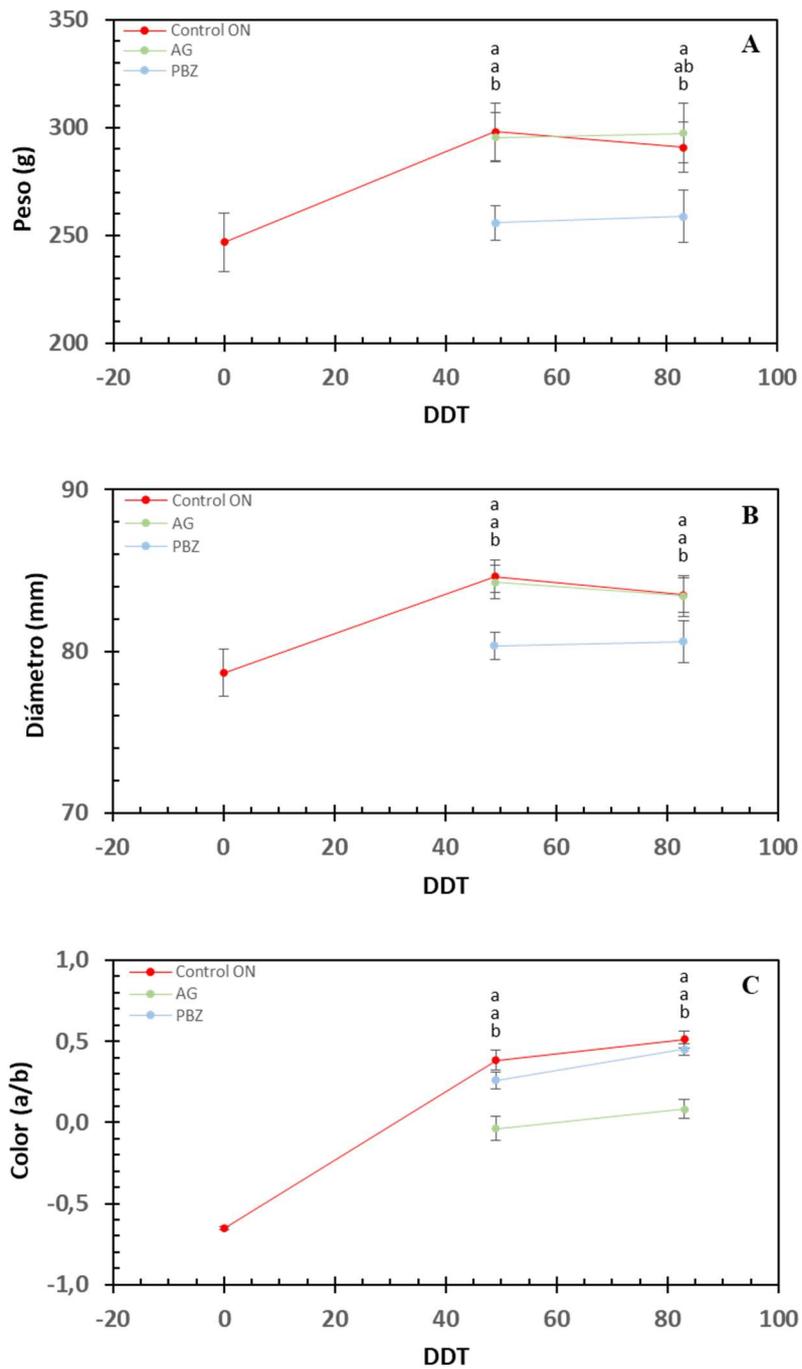


FIGURA 3 Efecto de los tratamientos hormonales secuenciados con AG (25 ppm) y PBZ (50 ppm) sobre la evolución del Peso (g) (A), Diámetro (mm) (B) y Color (a/b) (C) en los frutos de árboles de naranjo dulce *Chislett Summer Navel*[®] cultivados en Torrente (Valencia). Cada valor es el promedio de 12 frutos. Las barras verticales indican el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (LSD 95%).

1.2 Brotación y floración

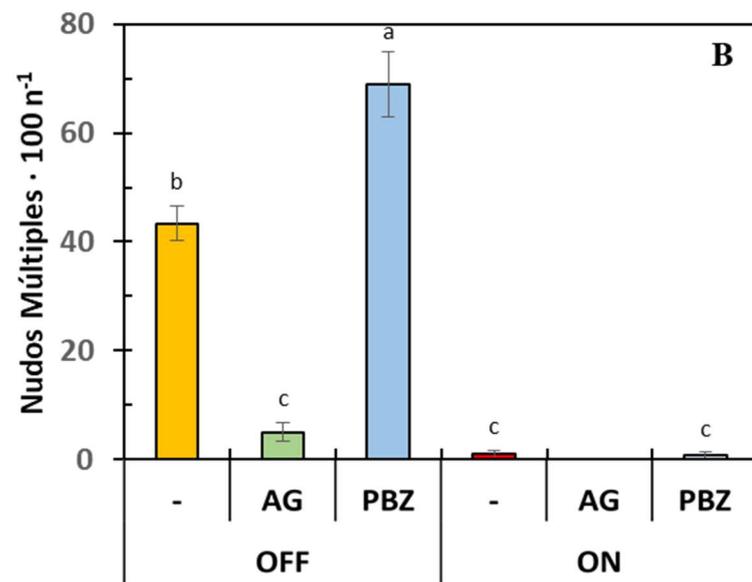
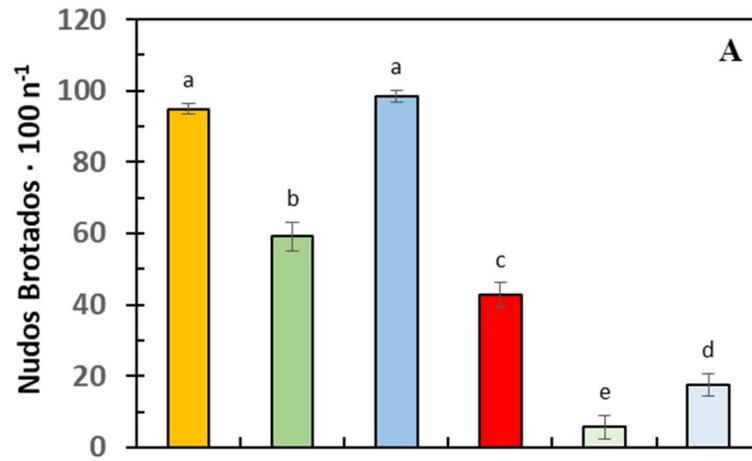
La brotación de los árboles OFF fue abundante, alcanzando el 95 % de nudos brotados y con un elevado porcentaje ($> 40\%$) de nudos múltiples. Además, la intensidad de floración fue muy intensa, promediando $660 \text{ flores} \cdot 100 \text{ nudos}^{-1}$. Por el contrario, la presencia del fruto en los árboles ON redujo, en comparación con los árboles OFF y de forma significativa, un -56% la brotación (**FIGURA 4 A**), un -98% la presencia de nudos múltiples (**FIGURA 4 B**) y un -100% la floración (**FIGURA 4 C**). El número de hojas por cada 100 nudos no varió significativamente (**FIGURA 4 D**).

La evaluación de la floración, atendiendo al número total de brotes formados cada 100 nudos, muestra que la floración de las ramas OFF se caracterizó por la presencia de un gran número de brotes mixtos (34 brotes cada 100 nudos contados) y, en menor medida, de inflorescencias sin hojas (16 brotes cada 100 nudos contados). La presencia de brotes vegetativos (2 brotes cada 100 nudos contados), brotes campaneros (0,9 brotes cada 100 nudos contados) y flores solitarias (0,4 brotes cada 100 nudos contados) fue escasa. El efecto del fruto sobre la floración se manifestó a través de un cambio significativo de la población de tipo de brotes desarrollados, favoreciendo los vegetativos sobre los reproductivos. Así, los ramos florales (**FIGURA 5 A y B**) y los brotes mixtos y campaneros (**FIGURAS 5 C y D**) se redujeron de forma significativa un -100% mientras que los brotes vegetativos aumentaron de forma significativa un $+1740\%$ (**FIGURA 5 E**), en comparación con las ramas OFF.

El tratamiento hormonal secuenciado con AG redujo la brotación de forma significativa un -38% respecto a las ramas OFF sin tratar, y un -87% respecto de las ramas ON sin tratar. En cuanto al tratamiento hormonal secuenciado con PBZ, la brotación aumentó ligeramente un $+3\%$ respecto de las ramas OFF sin tratar y disminuyó de forma significativa un -59% respecto de las ramas ON sin tratar (**FIGURA 4 A**). El tratamiento con AG redujo los nudos múltiples de forma significativa un -766% respecto a las ramas OFF sin tratar, y los anuló respecto a las ramas ON sin tratar, mientras que el tratamiento con PBZ los aumentó de forma significativa un $+58\%$ respecto de las ramas OFF sin tratar, pero los redujo un -38% respecto de las ramas ON sin tratar (**FIGURA 4 B**). El tratamiento con AG redujo la floración de forma significativa un -287% respecto a las ramas OFF sin tratar y no tuvo ningún efecto en las ramas ON sin tratar, ya que la presencia del fruto ya la había anulado por completo. En cambio, el tratamiento con PBZ sí promovió la floración de forma significativa un $+11\%$ respecto a las ramas OFF sin tratar y, además, en las ramas ON sin tratar, también lo hizo, aunque de forma muy escasa (solamente en dos brotes del total, con un promedio de $21 \text{ flores} \cdot 100 \text{ nudos}^{-1}$; **FIGURA 4 C**). El número de hojas por cada 100 nudos aumentó significativamente un $+25\%$ en los tratamientos con AG respecto a las ramas OFF

sin tratar y, en cambio, se redujo significativamente un -1010 % respecto a las ramas ON sin tratar. El tratamiento con PBZ redujo el número de hojas un -49 % respecto a las ramas OFF sin tratar y, de forma significativa, un -219 % respecto a las ramas ON sin tratar (**FIGURA 4 D**).

El tratamiento con AG redujo las inflorescencias de forma significativa mientras que el tratamiento con PBZ las aumentó ligeramente, respecto a las ramas OFF sin tratar (**FIGURA 5 A**). Ambos tratamientos (AG y PBZ) redujeron los brotes mixtos de forma significativa un -23 % (AG) y un -66 % (PBZ), respecto a las ramas OFF sin tratar. Se observó, además, un ligero aumento relativo de este tipo de brotes en el tratamiento con PBZ respecto a las ramas ON sin tratar (**FIGURA 5 C**). El tratamiento con AG aumentó de forma significativa los brotes campaneros hasta un +1813 % respecto a las ramas OFF sin tratar, mientras que el tratamiento con PBZ los anuló por completo (**FIGURA 5 D**). Finalmente, el tratamiento con AG aumentó de forma significativa un +253 % los brotes vegetativos mientras que el tratamiento con PBZ los anuló por completo respecto de las ramas OFF sin tratar. En el caso de las ramas ON, el AG redujo de forma significativa un -594 % los brotes vegetativos y el PBZ un -212 % respecto a las ramas no tratadas (**FIGURA 5 E**).



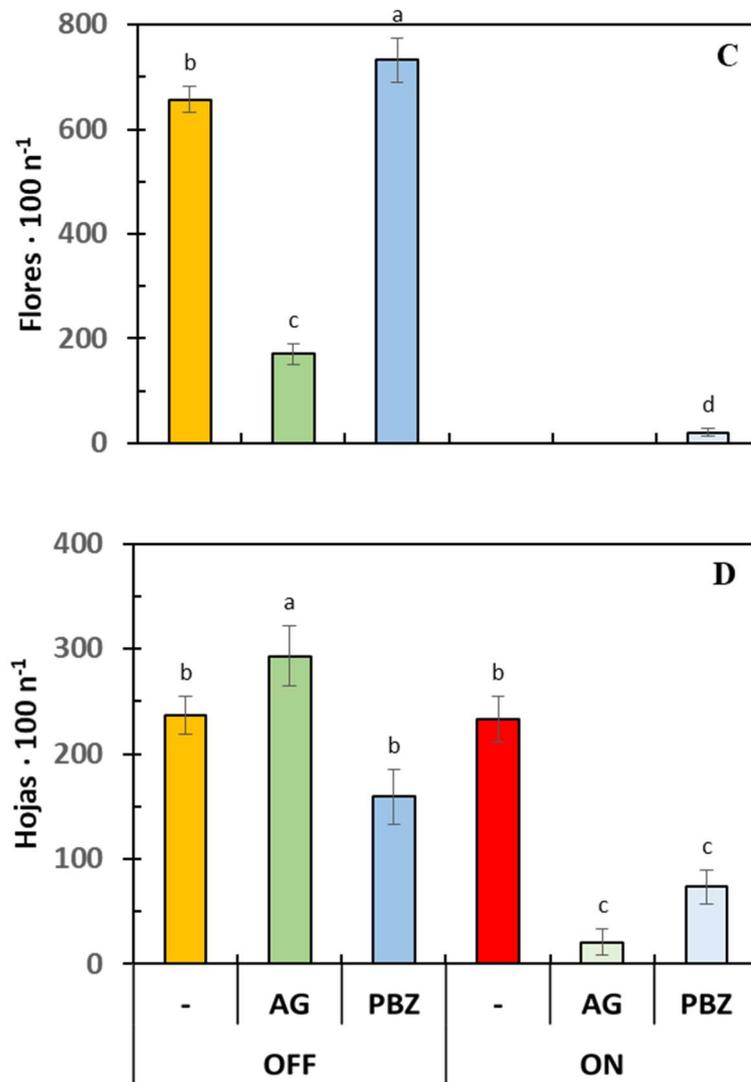
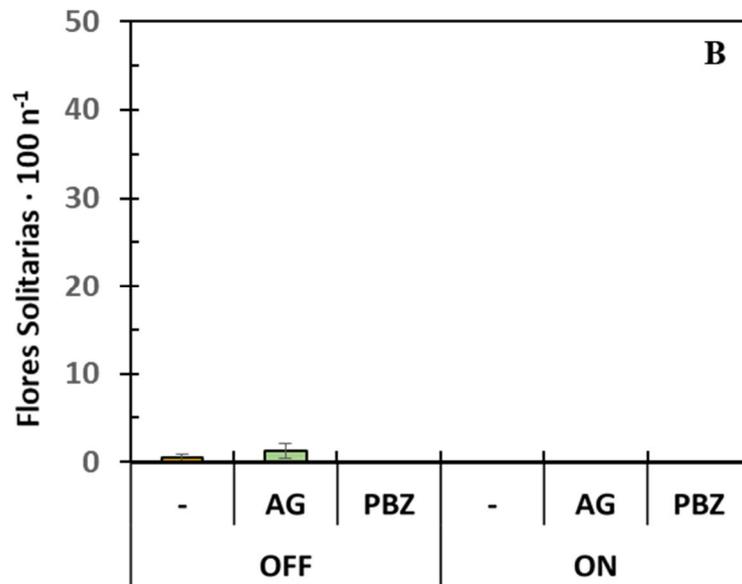
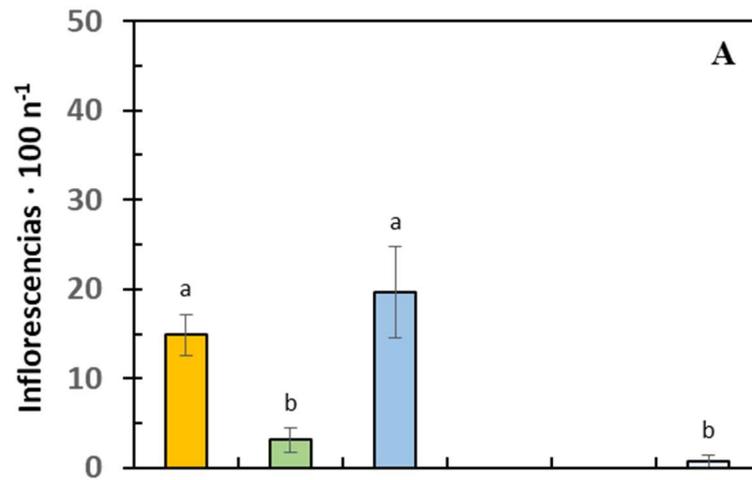


FIGURA 4 Efecto de los tratamientos hormonales secuenciados con AG (25 ppm) y PBZ (50 ppm) sobre la brotación y floración de los árboles de naranjo dulce *Chislett Summer Navel*[®] cultivados en Torrente (Valencia). A: Promedio de brotes cada 100 nudos contados. B: Promedio de nudos múltiples desarrollados cada 100 nudos contados. C: Promedio de flores desarrolladas cada 100 nudos contados. D: Promedio de hojas desarrolladas cada 100 nudos contados. Cada valor representa el promedio de 30 ramas. Las barras verticales indican el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (LSD 95%).



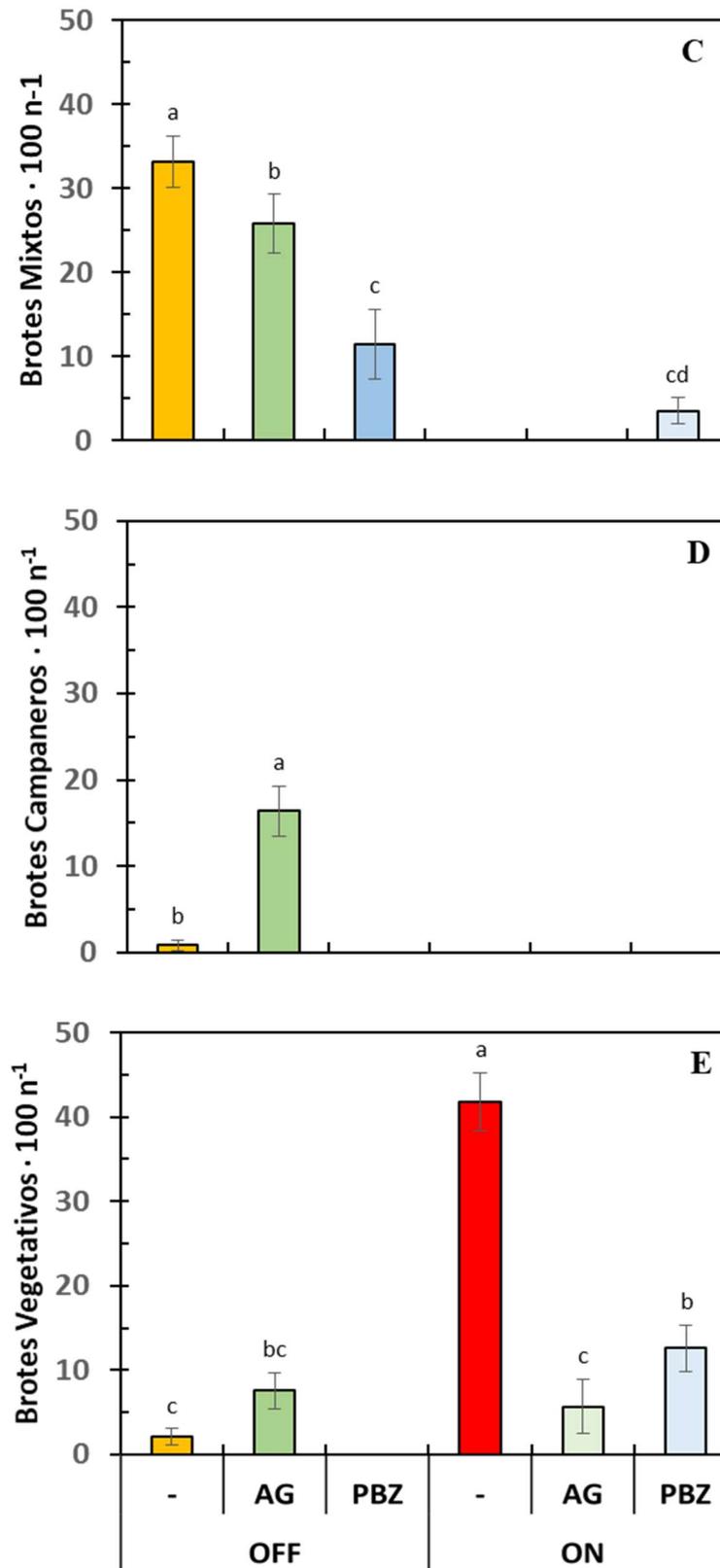


FIGURA 5 Efecto de los tratamientos hormonales secuenciados con AG (25 ppm) y PBZ (50 ppm) sobre los tipos de brotes de los árboles de naranjo dulce *Chislett Summer Navel*[®] cultivados en Torrente (Valencia). A: Promedio de inflorescencias cada 100 nudos contados. B: Promedio de flores solitarias cada 100 nudos contados. C: Promedio de brotes mixtos cada 100 nudos contados. D: Promedio de brotes campaneros cada 100 nudos contados. E: Promedio de brotes vegetativos cada 100 nudos contados. Cada valor representa el promedio de 30 ramas. Las barras verticales indican el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (LSD 95%).

1.3 Efecto de los tratamientos sobre los tipos de brotes. Diferencias cualitativas y cuantitativas

Para separar el efecto de los tratamientos a través de la reducción de la brotación, se estudió la distribución porcentual de los tipos de brotes, atendiendo exclusivamente a los nudos brotados. Con ello, se confirmó que el efecto de la presencia del fruto es más importante que el efecto de los tratamientos, cualitativa y cuantitativamente. Así, el efecto inhibitorio del fruto sobre la floración se produjo sobre todos los tipos de brotes florales, modificando la distribución de la población de brotes en favor de los vegetativos, que alcanzaron el 98 % de los nudos brotados. En las ramas ON tratadas con PBZ, destaca la aparición de brotes mixtos e inflorescencias en los nudos brotados, aun por escasa que sea, a costa de los vegetativos (FIGURA 6). En este tratamiento, el efecto más importante fue la drástica reducción de la brotación (FIGURA 3 A).

Por otra parte, los tratamientos hormonales secuenciados con AG y PBZ en las ramas OFF modificaron la frecuencia de brotes por cada nudo brotado respecto a los no tratados, sin modificar significativamente la distribución (FIGURA 6).

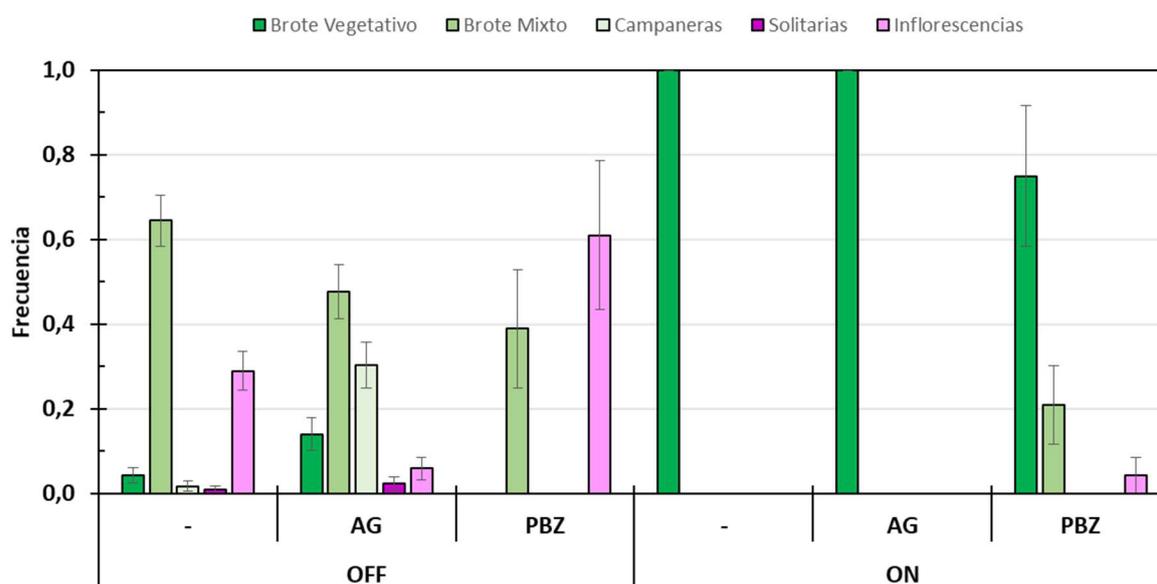


FIGURA 6 Efecto de la aplicación continuada de AG (25 ppm) y PBZ (50 ppm) sobre la distribución de los tipos de brotes de los árboles de naranjo dulce *Chislett Summer Navel*® cultivados en Torrente (Valencia). A: Inflorescencias por cada nudo brotado. B: Flores solitarias por cada nudo brotado. C: Brotes campaneros por cada nudo brotado. D: Brotes mixtos por cada nudo brotado. E: Brotes vegetativos por cada nudo brotado. Cada valor representa el promedio de 30 ramas. Datos expresados en tanto por uno.

Los tratamientos hormonales secuenciados con AG aumentaron significativamente la longitud de los brotes reproductivos sin hojas (+137 %), de los brotes mixtos (+138 %) y de los brotes vegetativos (+125 %) respecto a los mismos brotes de las ramas OFF sin tratar (**FOTOGRAFÍA 1; FIGURA 7**). En cambio, los tratamientos hormonales secuenciados con PBZ redujeron la longitud de los brotes reproductivos sin hojas (-93 %) y con hojas (-63 %), de forma no significativa, y la longitud de los brotes vegetativos (-164 %) de forma significativa, respecto a los brotes respectivos de las ramas OFF sin tratar (**FIGURA 7 A**).



FOTOGRAFÍA 1 Efecto del tratamiento hormonal secuenciado con AG (25 ppm) sobre la longitud de los brotes y el tamaño de las hojas respecto al control OFF sin tratar (CT).

Lógicamente, el efecto sobre la longitud de los entrenudos fue similar al efecto sobre la longitud de los brotes (**FIGURA 7 B**).

En los tratamientos hormonales secuenciados con AG, la longitud de las hojas aumentó significativamente en los brotes mixtos (+43 %) y en los brotes vegetativos (+37 %), respecto a los mismos brotes de las ramas OFF sin tratar. La anchura de las hojas aumentó significativamente en los brotes mixtos (+56 %) y en los brotes vegetativos (+38 %) por efecto del AG, respecto a los brotes respectivos de las ramas OFF sin tratar. En cambio, en los tratamientos secuenciados con PBZ, la longitud y anchura de las hojas solamente disminuyó significativamente en los brotes vegetativos (-39% y -35%, respectivamente) de forma significativa (**FIGURA 7 C y D**).

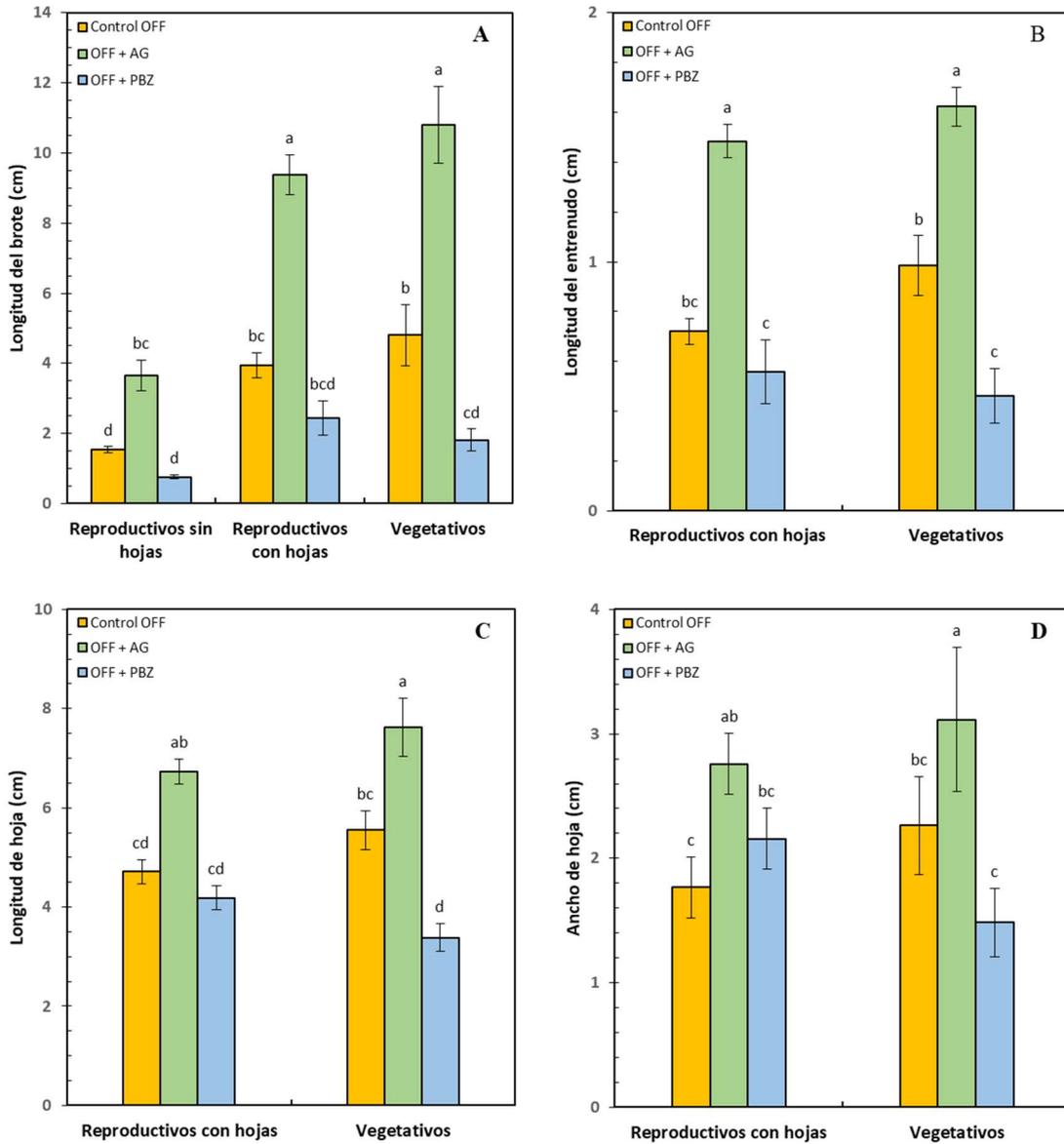


FIGURA 7 Efecto de la aplicación continuada de AG (25 ppm) y PBZ (50 ppm) en los nuevos brotes de primavera de las ramas de los árboles de naranjo dulce *Chislett Summer Navel*[®] cultivados en Torrente (Valencia). A: Longitud de los brotes. B: Longitud de los entrenudos. C: Longitud de las hojas. D: Ancho de las hojas. Cada valor representa el promedio de al menos 60 nuevos brotes. Las barras verticales indican el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (LSD 95%).

2. Efecto de los tratamientos hormonales secuenciados sobre la expresión de los genes de la inducción en las hojas (*CiFT3* y *CcMADS19*) y de la diferenciación en las yemas (*CEN*, *CiLFY* y *CiAPI*)

Para determinar el efecto de los tratamientos y la presencia del fruto en la expresión de los genes responsables de la inducción floral (*CiFT3* y *CcMADS19*) y la diferenciación floral (*CEN*, *CiLFY* y *CiAPI*), y su variación temporal, se realizó un análisis de la varianza múltiple con tres factores (Presencia del Fruto, Tratamiento y Fecha del Tratamiento). Las muestras se tomaron los días 29/10/2020 (el día del primer tratamiento), en las ramas OFF y ON sin tratar, 17/12/2020 (tras 6 tratamientos hormonales) y 19/01/2021 (tras 9 tratamientos hormonales). El muestreo de octubre se realizó al inicio del periodo de frío, tras 30 días con la temperatura mínima por debajo de 15°C, el de diciembre se realizó en pleno periodo de frío, y el de enero al final del periodo de frío, unos días antes del inicio de la brotación (30/01/2021) (**FIGURA 2**).

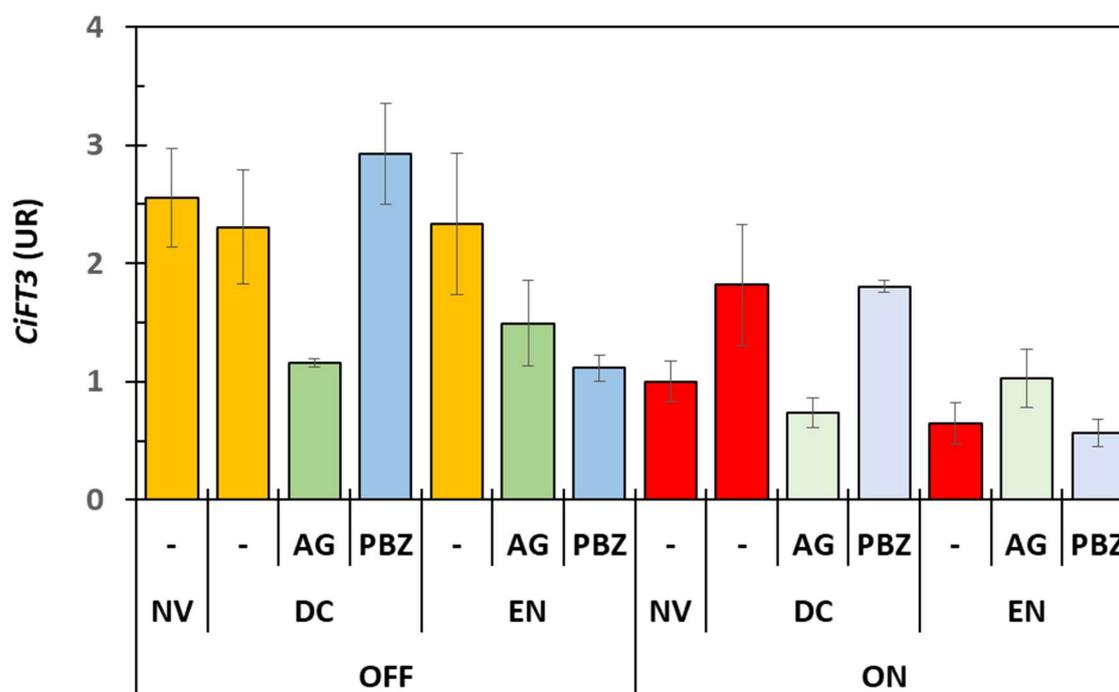
La expresión del gen *CiFT3* en las hojas varió significativamente por efecto de los tres factores: fue mayor en las ramas OFF que en las ON, fue mayor en diciembre que en noviembre y enero, y se redujo por efecto de la aplicación de AG (**FIGURA 8**). La aplicación de AG reprimió la expresión de *CiFT3* particularmente en diciembre, tanto en las ramas OFF como en las ON. La aplicación de PBZ fue menos eficaz, de modo que solo en las ramas OFF promovió la expresión de *CiFT3* en diciembre, aunque sin alcanzar diferencias significativas (**FIGURA 8**). Pero la expresión de *CcMADS19* fue insensible a los tratamientos hormonales con AG y PBZ, y no la modificaron significativamente. Sin embargo, la presencia del fruto estimuló significativamente la expresión de este gen respecto de las ramas OFF (**FIGURA 9**).

La expresión del gen *CEN*, promotor del meristemo vegetativo y del crecimiento indeterminado, fue sensible a los tres factores, pero, especialmente, a la aplicación de AG. Así, en las ramas OFF, la expresión de *CEN* en diciembre y enero se duplicó por efecto del AG, que incluso incrementó la expresión de este gen en las yemas de ramas ON. El PBZ, sin embargo, no modificó su expresión. La expresión de *CEN* en las yemas OFF durante los meses de noviembre y diciembre fue mayor que en las yemas de ramas ON, pero se igualó en el momento próximo a la diferenciación (**FIGURA 10**).

La expresión del gen *CiLFY*, promotor de la diferenciación floral, mostró su pauta habitual, aumentado significativamente entre los meses de noviembre y enero (x3 en las ramas OFF), y con menor intensidad en las ramas ON. El tratamiento con AG reprimió significativamente la

expresión de *LFY* en las yemas de ramas OFF pero también en las yemas de ramas ON. El tratamiento con PBZ también redujo la expresión de *LFY*, pero con mayor intensidad en las ramas ON (**FIGURA 11**).

Finalmente, la expresión del gen *CiAPI*, promotor de la diferenciación floral junto con *CiLFY*, también aumentó con el tiempo en las yemas de las ramas OFF mientras que fue reprimido en las ON. Los tratamientos con AG reprimieron la expresión de este gen en enero, aunque en su conjunto no se mostró como un factor significativo porque no difirió de los controles en ninguna de las otras situaciones (**FIGURA 12**).



Análisis de Varianza para la Expresión relativa de *CiFT3* - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Presencia del Fruto	8,44212	1	8,44212	20,21	0,0001
B: Tratamiento	2,92371	2	1,46185	3,50	0,0408
C: Fecha de Tratamiento	3,17434	2	1,58717	3,80	0,0318
RESIDUOS	15,0377	36	0,417713		
TOTAL (CORREGIDO)	29,985	41			

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

Pruebas de Múltiple Rangos para la Expresión relativa de *CiFT3*

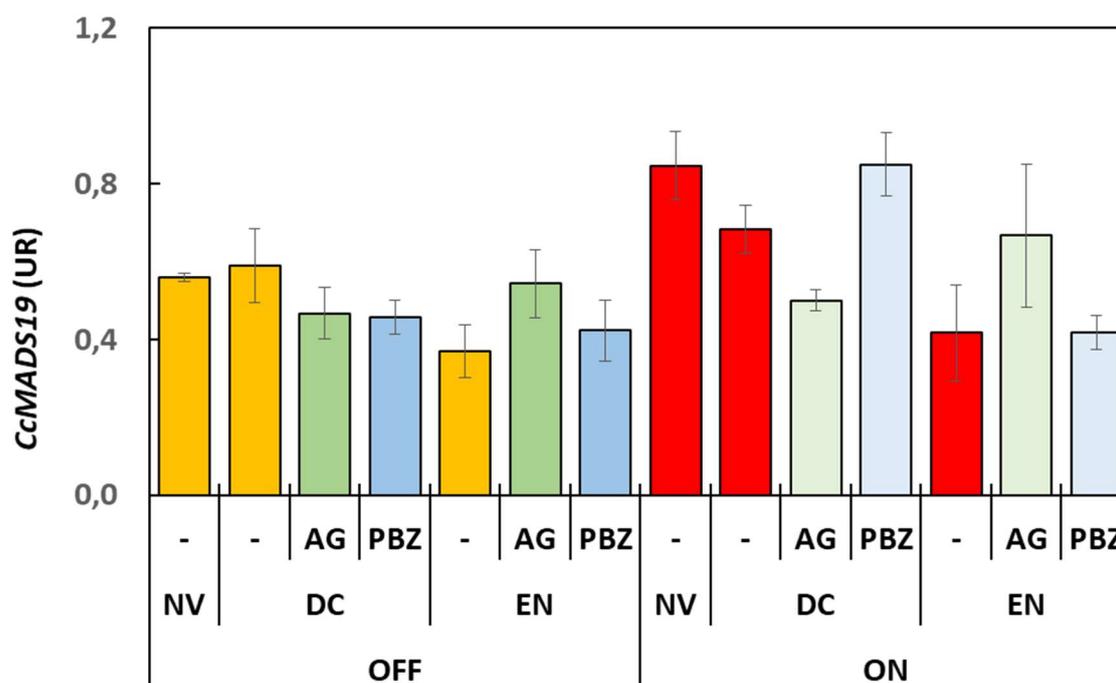
Método: 95,0 porcentaje LSD

Presencia del Fruto	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
ON	21	1,04667	0,159425	X
OFF	21	1,94333	0,159425	X

Tratamiento	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
AG	12	1,10472	0,215436	X
PBZ	12	1,60306	0,215436	XX
C	18	1,77722	0,152336	X

Fecha de Tratamiento	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
EN	18	1,19833	0,152336	X
NV	6	1,49444	0,304672	XX
DC	18	1,79222	0,152336	X

FIGURA 8 Efecto de la aplicación continuada de AG (25 ppm) y PBZ (50 ppm) sobre la expresión en las hojas del gen promotor de la floración *CiFT3* durante las fases de inducción y diferenciación floral, en árboles de naranjo dulce *Chislett Summer Navel*[®] cultivados en Torrente (Valencia). Cada valor representa el promedio de 3 réplicas biológicas. Las barras verticales indican el error estándar.



Análisis de Varianza para la Expresión relativa de *CcMADS19* - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Presencia del Fruto	0,201621	1	0,201621	6,73	0,0136
B: Tratamiento	0,00550556	2	0,00275278	0,09	0,9124
C: Fecha del Tratamiento	0,267903	2	0,133951	4,47	0,0184
RESIDUOS	1,07795	36	0,0299429		
TOTAL (CORREGIDO)	1,56216	41			

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

Pruebas de Múltiple Rangos para la Expresión relativa de *CcMADS19*

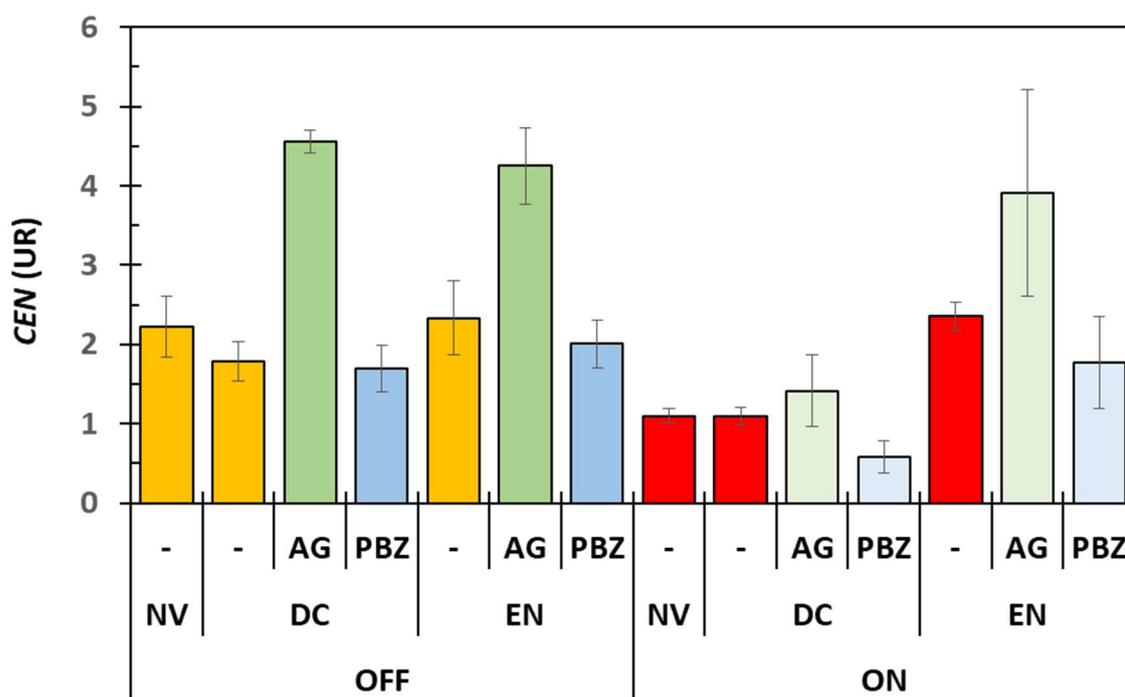
Método: 95,0 porcentaje LSD

Presencia del Fruto	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
OFF	21	0,525437	0,042684	X
ON	21	0,664008	0,042684	X

Tratamiento	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
C	18	0,577778	0,040786	X
PBZ	12	0,599444	0,0576801	X
AG	12	0,606944	0,0576801	X

Fecha de Tratamiento	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
EN	18	0,472778	0,040786	X
NV	18	0,591111	0,040786	X
DC	6	0,720278	0,0815719	X

FIGURA 9 Efecto de la aplicación continuada de AG (25 ppm) y PBZ (50 ppm) sobre la expresión en las hojas del gen represor de la floración *CcMADS19* durante las fases de inducción y diferenciación floral, en árboles de naranjo dulce *Chislett Summer Navel*[®] cultivados en Torrente (Valencia). Cada valor representa el promedio de 3 réplicas biológicas. Las barras verticales indican el error estándar.



Análisis de Varianza para la Expresión relativa de CEN - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Presencia del Fruto	9,44777	1	9,44777	11,53	0,0017
B: Tratamiento	27,6106	2	13,8053	16,85	0,0000
C: Fecha de Tratamiento	7,72228	2	3,86114	4,71	0,0152
RESIDUOS	29,4977	36	0,819381		
TOTAL (CORREGIDO)	76,2626	41			

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

Pruebas de Múltiple Rangos para la Expresión relativa de CEN

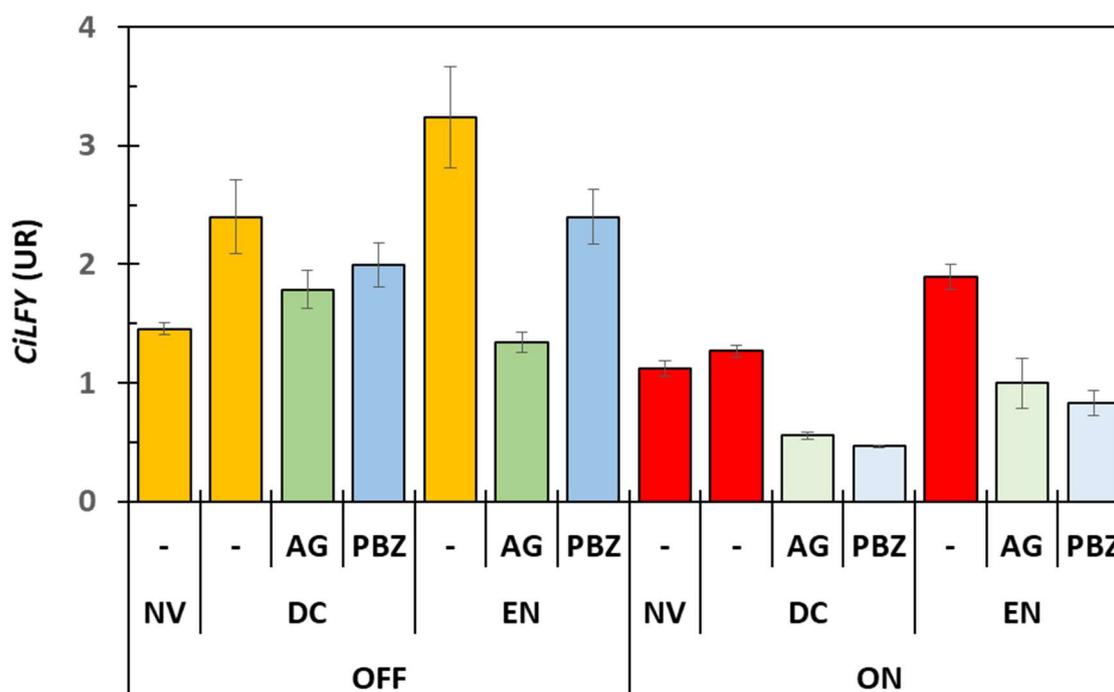
Método: 95,0 porcentaje LSD

Presencia del Fruto	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
ON	21	1,76238	0,223286	X
OFF	21	2,71095	0,223286	X

Tratamiento	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
PBZ	12	1,43944	0,301732	X
C	18	1,81444	0,213357	X
AG	12	3,45611	0,301732	X

Fecha de Tratamiento	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
DC	18	1,85722	0,213357	X
NV	6	2,08222	0,426714	XX
EN	18	2,77056	0,213357	X

FIGURA 10 Efecto de la aplicación continuada de AG (25 ppm) y PBZ (50 ppm) sobre la expresión en las yemas del gen promotor del crecimiento indeterminado CEN durante las fases de inducción y diferenciación floral, en árboles de naranjo dulce *Chislett Summer Navel*® cultivados en Torrente (Valencia). Cada valor representa el promedio de 3 réplicas biológicas. Las barras verticales indican el error estándar.



Análisis de Varianza para la Expresión relativa de *CiLFY* - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Presencia del Fruto	12,0429	1	12,0429	71,01	0,0000
B: Tratamiento	6,89607	2	3,44803	20,33	0,0000
C: Fecha de Tratamiento	4,5668	2	2,2834	13,46	0,0000
RESIDUOS	6,10556	36	0,169599		
TOTAL (CORREGIDO)	26,7878	41			

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

Pruebas de Múltiple Rangos para la Expresión relativa de *CiLFY*

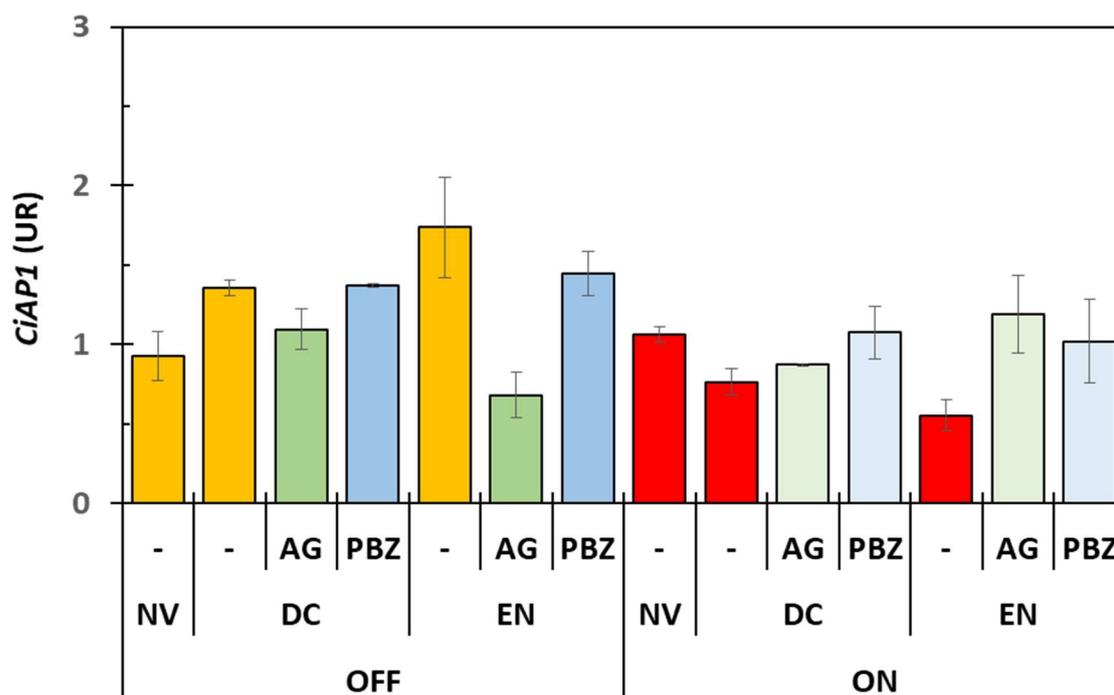
Método: 95,0 porcentaje LSD

Presencia del Fruto	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
ON	21	0,757857	0,101585	X
OFF	21	1,82881	0,101585	X

Tratamiento	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
AG	12	0,866667	0,137275	X
PBZ	12	1,11833	0,137275	X
C	18	1,895	0,0970678	X

Fecha de Tratamiento	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
NV	6	0,686667	0,194136	X
DC	18	1,41	0,0970678	X
EN	18	1,78333	0,0970678	X

FIGURA 11 Efecto de la aplicación continuada de AG (25 ppm) y PBZ (50 ppm) sobre la expresión en las yemas del gen promotor de la floración *CiLFY* durante las fases de inducción y diferenciación floral, en árboles de naranjo dulce *Chislett Summer Navel*® cultivados en Torrente (Valencia). Cada valor representa el promedio de 3 réplicas biológicas. Las barras verticales indican el error estándar.



Análisis de Varianza para la Expresión relativa de *CiAP1* - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Presencia del Fruto	0,927086	1	0,927086	7,00	0,0120
B: Tratamiento	0,435439	2	0,217719	1,64	0,2073
C: Fecha de Tratamiento	0,0501694	2	0,0250847	0,19	0,8282
RESIDUOS	4,76596	36	0,132388		
TOTAL (CORREGIDO)	6,18531	41			

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

Pruebas de Múltiple Rangos para la Expresión relativa de *CiAP1*

Método: 95,0 porcentaje LSD

Presencia del Fruto	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
ON	21	0,911151	0,0897516	x
OFF	21	1,20829	0,0897516	x

Tratamiento	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
AG	12	0,921944	0,121284	x
C	18	1,06611	0,0857606	x
PBZ	12	1,19111	0,121284	x

Fecha de Tratamiento	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
NV	6	0,986944	0,171521	x
DC	18	1,08778	0,0857606	x
EN	18	1,10444	0,0857606	x

FIGURA 12 Efecto de la aplicación continuada de AG (25 ppm) y PBZ (50 ppm) sobre la expresión en las yemas del gen promotor de la floración *CiAP1* durante las fases de inducción y diferenciación floral, en árboles de naranjo dulce *Chislett Summer Navel*® cultivados en Torrente (Valencia). Cada valor representa el promedio de 3 réplicas biológicas. Las barras verticales indican el error estándar.

IV. DISCUSIÓN

La efectividad de los tratamientos con GAs y PBZ para reprimir o promover la floración es limitada (Martínez-Fuentes *et al.*, 2004; Martínez-Fuentes *et al.*, 2013). Los tratamientos fallan cuando los árboles presentan condiciones extremas de cosecha, precisamente, cuando es necesario dar una respuesta agronómica al exceso o la falta de flores. Los resultados de este TFM, a pesar de la aplicación reiterada de AG y PBZ, son similares a los de estudios anteriores con tratamientos simples. Por ejemplo, la aplicación de 25 mg·l⁻¹ de GA₃ a árboles OFF de mandarina, cuando la intensidad de floración de los árboles control era muy elevada (> 200 flores por 100 nudos), redujo la floración escasamente (a 180-190 flores por 100 nudos), y un aumento de la concentración no mejoró la respuesta (Martínez-Fuentes *et al.*, 2004). La falta de efectividad también se observa con el PBZ, pues la aplicación de elevadas concentraciones (2500 mg·l⁻¹) a árboles ON de naranja o mandarina, no promueve la floración (Martínez-Fuentes *et al.*, 2013). Esta falta de eficacia de los tratamientos se ha tratado de explicar a través del balance entre promotores/inhibidores de la floración (Martínez-Fuentes *et al.*, 2004), y a través de la existencia de varios niveles de regulación endógena de la floración: un nivel *cualitativo* (como en las plantas anuales) y otro *cuantitativo* (Bangerth, 2009).

La presencia del fruto reprime por completo la floración a partir del momento en que alcanza el máximo tamaño, mientras que un tratamiento con AG reduce parcialmente la floración, pero no la anula (Guardiola *et al.*, 1982; Martínez-Fuentes *et al.*, 2010). Es posible que la presencia continua del fruto en la rama actúe como una señal inhibidora más eficaz que un único tratamiento exógeno, cuya duración desconocemos. El (los) regulador (es) endógeno (s) es (son) más eficaz que el (los) exógeno (s) (Martínez-Fuentes *et al.*, 2004). Ni siquiera los nueve tratamientos consecutivos de AG realizados en este TFM, desde el momento en que el fruto alcanza el máximo tamaño hasta la diferenciación (**FIGURA 2**), consiguieron reprimir la floración como lo hace el fruto: a pesar de los 9 tratamientos, brotaron el 60 % de los nudos, que produjeron 200 flores por 100 nudos, principalmente como brotes mixtos (**FIGURAS 4 y 5**). Más ineficaz resultó el efecto de los nueve tratamientos de PBZ sobre la floración. La dosis (50 mg·l⁻¹) es muy inferior a la habitualmente utilizada en otros experimentos de floración (1000-2000 mg·l⁻¹), pero mostró actividad fisiológica al detener el crecimiento del fruto (**FIGURA 3**), como ya demostraron Hadlow y Allan (1988). Ahora bien, la dosis acumulada de PBZ (4500 mg·l⁻¹) fue muy superior a la utilizada en experimentos anteriores (Martínez-Fuentes *et al.*, 2013). Tal vez por ello, el PBZ aumentó ligeramente la floración de las ramas OFF a través del aumento de la brotación de yemas (nudos múltiples), pero en las ramas ON redujo la brotación, y no aumentó la floración.

Los resultados de expresión génica apoyan la hipótesis de la existencia de algún mecanismo de regulación endógena que actúa aguas arriba del metabolismo de las giberelinas de modo cualitativo (*floración activada/floración reprimida*). Si analizamos el efecto del fruto (*floración reprimida*) comparándolo con el del AG (*floración reducida*) aplicado sobre las ramas OFF (*floración activada*) (**FIGURA 4**), se observa que: 1) a pesar de que el AG consigue reducir la expresión de *CiFT3*, *LFY* y *API* al mismo nivel que el fruto (**FIGURAS 8, 11 y 12**), no anula la floración; 2) además, la aplicación de AG sobreexpresó el gen *CEN* (que promueve el crecimiento indeterminado), incluso en los brotes con fruto (**FIGURA 10**); pero, 3) el gen *CcMADS19* se mostró insensible a los tratamientos y dependiente de la presencia/ausencia del fruto (**FIGURA 9**).

CcMADS19 es un factor de transcripción ortólogo de *FLC* (en *Arabidopsis thaliana* L., monocárpica) y *PEP1* (en *Arabis alpina* L., policárpica), con un papel esencial en el control global de la floración porque reprime, directamente, la transcripción de genes como *FT*, *SOC1*, *SPL15* y *SEP3* (revisado en Andrés y Coupland, 2012 y Soope *et al.*, 2021). En las plantas herbáceas monocárpicas, que requieren vernalización para inducir la floración, la baja temperatura durante 6-8 semanas reduce progresivamente la expresión de *FLC* promoviendo la transición del meristemo apical de vegetativo a floral (Sheldon *et al.*, 1999). En plantas herbáceas policárpicas, la vernalización también reprime a *PEP1*, pero otros factores también participan en la regulación de *PEP1* para determinar qué yemas florecen y cuáles no, con el fin de mantener el desarrollo vegetativo en parte de las ramas para perpetuar la polycarpia (Lázaro *et al.*, 2018). En los cítricos, la expresión de *CcMADS19* difiere en función de la presencia del fruto (**FIGURA 9**), y no de la baja temperatura, de modo que su expresión se activa en las hojas del brote ON impidiendo la floración (Agustí *et al.*, 2020), pero no se activa en las yemas, de las que surge un nuevo brote vegetativo (OFF) con *CcMADS19* silenciado y, de este modo con la capacidad para florecer *activada* (Mesejo *et al.*, 2021). En los tres casos, la regulación de *FLC-PEP1-MADS19* es epigenética, a través de cambios en la metilación de las histonas de DNA.

¿Y cuál es entonces el papel de las GAs en todo el proceso? Seguramente, la hipótesis más probable es que las GAs participen en el mantenimiento del meristemo indeterminado, y la sobreexpresión del gen *CEN* por efecto del AG (**FIGURA 10**) así lo refuerza. *CEN* y *TFL1* son dos genes parálogos relacionados con el mantenimiento del meristemo indeterminado. En *Arabidopsis*, la expresión del gen *TFL1* en el centro del meristemo apical del tallo (MAT) impide su conversión en flor, y permite desarrollar una inflorescencia indeterminada. Para ello, es necesario que la expresión de *TFL1* quede confinada al centro del MAT, para impedir su determinación, mientras que la expresión de *API* y *LFY* ha de quedar confinada a sus flancos, que es donde se formarán las

flores (Fernández-Nohales, 2011). El mantenimiento del meristemo indeterminado de las yemas axilares de los cítricos parece estar controlado por *CEN*, más que por *TFL1* (Zhang *et al.*, 2021). En cualquier caso, sea uno u otro gen, todo ello explica el efecto selectivo del AG reduciendo la formación de flores solitarias e inflorescencias sin hojas (determinadas), a favor de la formación de brotes mixtos, campaneros y vegetativos (FIGURA 5), que aseguran el crecimiento indeterminado.

Finalmente, resulta difícil explicar por qué el AG no afecta a todas las yemas por igual (*efecto cuantitativo*). El hecho de que el AG reduzca significativamente los brotes múltiples, como sucede en un árbol ON (FIGURA 4), indica que todas las yemas del nudo están afectadas por el tratamiento. Cuando se trata con AG al inicio de la brotación, se reduce el número de brotes generativos, en cuantía variable, en función del grado de diferenciación de la yema: si ya estaba iniciando la diferenciación, no le afecta, y si aún no, la mantiene vegetativa (Guardiola *et al.*, 1982). Pero el hecho de haber realizado nueve tratamientos consecutivos, desde finales de octubre hasta el momento previo a la brotación, requiere una explicación adicional. Esta podría ser la interacción entre el tratamiento con AG/PBZ y el estado de la yema en el momento del tratamiento (edad de la yema). Si bien todas las ramas OFF se eligen de la parte externa del árbol, éstas pueden proceder de la brotación de principio del verano (julio) o de la de final del verano (septiembre). La capacidad para florecer, brotar y formar inflorescencias determinadas es mayor en las ramas de septiembre que en las de julio (Guardiola *et al.*, 1982), y, de hecho, la variabilidad encontrada en los tipos de brotes ha sido mayor entre ramas que entre nudos (datos no mostrados). También la sensibilidad al tratamiento con AG varía en función de la edad de la yema (Guardiola *et al.*, 1982), de modo que en las ramas de mayor edad el efecto del AG también es mayor, lo que podría explicar las diferencias cuantitativas del efecto del AG en este TFM.

V. CONCLUSIONES

Las **principales conclusiones** son:

1. La aplicación continua de AG en árboles OFF de naranjo dulce reduce la brotación de primavera, actuando principalmente sobre las inflorescencias determinadas, pero no impide la floración tal y como lo hace el fruto.
2. La aplicación continua de PBZ en árboles ON de naranjo dulce no promueve la floración.
3. La expresión del gen *CcMADS19* es insensible a los tratamientos hormonales con AG y PBZ.
4. El efecto del AG se relaciona con el mantenimiento del meristemo indeterminado, a través del estímulo de la expresión del gen *CEN*.

VI. BIBLIOGRAFÍA

AGUSTÍ, M. (1980). *Biología y control de la floración en el género Citrus*. Tesis doctoral. València: Universitat Politècnica de València.

AGUSTÍ, M. (2003). *Citricultura 2ª ed.* Editorial Mundi-Prensa Libros. España.

AGUSTÍ, M., GARCÍA-MARÍ, F. & GUARDIOLA, J.L. (1982). Gibberellic acid and fruit set in sweet orange. *Scientia Horticulture*, 17(3), 257-264.

AGUSTÍ, M., MESEJO, C., MUÑOZ-FAMBUENA, N., VERA-SIRERA, F., LUCAS, M., MARTÍNEZ-FUENTES, A., REIG, C., IGLESIAS, D.J., PRIMO-MILLO, E. & BLÁZQUEZ, M.A. (2020). Fruit-dependent epigenetic regulation of flowering in *Citrus*. *New Phytologist*, 225(1), 376-384.

AGUSTÍ, M., MESEJO, C., REIG, C. (2020). *Citricultura 3ª ed.* Editorial Mundi-Prensa Libros. España.

ALBRIGO, L.G. & SAUCO, V.G. (2004). Flower bud induction, flowering and fruit-set of some tropical and subtropical fruit tree crops with special reference to *Citrus*. In *XXVI International Horticultural Congress: Citrus and Other Subtropical and Tropical Fruit Crops: Issues, Advances and 632*, 81-90.

ANDRÉS, F. & COUPLAND, G. (2012). The genetic basis of flowering responses to seasonal cues. *Nature Reviews Genetics*, 13(9), 627-639.

BANGERTH, K.F. (2009). Floral induction in mature, perennial angiosperm fruit trees: similarities and discrepancies with annual/biennial plants and the involvement of plant hormones. *Scientia Horticulturae*, 122(2), 153-163.

BÄURLE, I. & DEAN, C. (2006). The timing of developmental transitions in plants. *The Plant Cell*, 125(4), 655-664.

BLÁZQUEZ, M.A., PIÑEIRO, M. Y VALVERDE, F. (2011). Bases moleculares de la floración, *Investigación y Ciencia*, 416, 29-36.

BRADLEY, D., RATCLIFFE, O., VINCENT, C., CARPENTER, R. & COEN, E. (1997). Inflorescence commitment and architecture in *Arabidopsis*. *Science*, 275(5296), 80-83.

BUSCH, M., BOMBLIES, K. & WEIGEL, D. (1999). Activation of a floral homeotic gene in *Arabidopsis*. *Science*, 285(5427), 585-587.

CERVERA, A. (2020). *Estudio del mecanismo de inhibición del ácido giberélico en la floración del naranjo dulce (Citrus sinensis L.)*. (Trabajo Final de Máster. Tutor C. Mesejo. Universitat Politècnica de València).

CHICA, E.J. & 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.

CONTI, L. & BRADLEY, D. (2007). TERMINAL FLOWER1 is a mobile signal controlling *Arabidopsis* architecture. *The Plant Cell*, 19(3), 767-778.

CORBESIER, L., VINCENT, C., JANG, S., FORNARA, F., FAN, Q., SEARLE, I. & COUPLAND, G. (2007). FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. *Science*, 316(5827), 1030-1033.

DELGADO, R., CASAMAYOR, R., RODRIGUEZ, J.L., CRUZ, P. & FAJARDO, R. (1985, September). Paclobutrazol effects on oranges under tropical conditions. In *V International Symposium on Growth Regulators in Fruit Production 179* (pp. 537-544).

FERNÁNDEZ NOHALES, P. (2011). *Papel de TERMINAL FLOWER 1 en el control de la arquitectura vegetal. Análisis de los genes que regulan su expresión* (Tesis Doctoral. Director F. Madueño, Universitat Politècnica de València).

FUJII, H., SHIMADA, T., SUGIYAMA, A., ENDO, T., NISHIKAWA, F., NAKANO, M., IKOMA, Y., SHIMIZU, T. & OMURA, M. (2008). Profiling gibberellin (GA3)-responsive genes in mature mandarin fruit using a citrus 22K oligoarray. *Scientia horticulturae*, 116(3), 291-298.

GAMBETTA, G., MARTÍNEZ-FUENTES, A., BETANCUR, O., MESEJO, C., REIG, C., GRAVIANA, A. & AGUSTÍ, M. (2012). Hormonal and nutritional changes in the flavelo regulating rind color development in sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). *Journal of Plant Growth Regulation*, 31(3), 273-282.

GARCÍA-LUÍS, A., ALMELA, V., MONERRI, C. & GUARDIOLA, J.L. (1986). Inhibition of flowering in vivo by existing fruits and applied growth-regulators in *Citrus unshiu*. *Physiologia Plantarum*, 66(3), 515-520.

- GARCÍA-LUIS, A., FORNES, F. & GUARDIOLA, J.L.** (1995). Leaf Carbohydrates and Flower Formation in *Citrus*. *Journal of the American Society for Horticulture Science*, 120(2), 222-227.
- GOLDSCHMIDT, E.E. & GOLOMB, A.** 1982. The carbohydrate balance of alternate-bearing citrus trees and the significance of reserves for flowering and fruiting. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 107:206–208.
- GOLDSCHMIDT, E.E. & MONSELISE, S.P.** (1972). Hormonal control of flowering in citrus and some other woody perennials. In *Plant growth substances 1970* (pp. 758-766). Springer, Berlin, Heidelberg.
- GOLDSCHMIDT, E.E. & SADKA, A.** (2021). Yield Alternation: Horticulture, Physiology, Molecular Biology, and Evolution. *Horticultural Reviews*, 48, 363-418.
- GUARDIOLA, J.L., MONERRI, C. & AGUSTI, M.** (1982). The inhibitory effect of gibberellic acid on flowering in *Citrus*. *Physiologia Plantarum*, 55(2), 136-142.
- HADLOW, A.P. & ALLAN, P.** (1988). Effect of paclobutrazol on vegetative growth in citrus nursery trees. *South African Journal of Plant and Soil*, 6(1), 50-52.
- HAIM, D., SHALOM, L., SIMHON, Y., SHLIZERMAN, L., KAMARA, I., MOROZOV, M., MOREO, A., RIVERO, R.M. & SADKA, A.** (2020). Fruit presence induces polar auxin transport in citrus and olive stem and represses hormone release from the bud. *bioRxiv*.
- HARTY, A. R. & VAN STADEN, J.** (1988). Paclobutrazol and temperature effects on lemon. In *Citriculture: proceedings of the Sixth International Citrus Congress: Middle-East, Tel Aviv, Israel, March 6-11, 1988/scientific editors, R. Goren and K. Mendel, editor, N. Goren*. Rehovot, Israel: Balaban, c1989.
- HENRY, M.J.** (1985). Plant growth regulating activity of sterol and gibberellin biosynthesis inhibitors. *Bull Plant Growth Regul Soc Am*, 13, 9-11.
- LAZARO, A., OBENG-HINNEH, E. & ALBANI, M.C.** (2018). Extended vernalization regulates inflorescence fate in *Arabis alpina* by stably silencing PERPETUAL FLOWERING1. *Plant physiology*, 176(4), 2819-2833.
- LORD, E.M. & ECKARD, K.J.** (1985). Shoot development in *Citrus sinensis* L. (Washington navel orange). I. Floral and inflorescence ontogeny. *Botanical Gazette*, 146(3), 320-326.

MARTÍNEZ-ALCÁNTARA, B., IGLESIAS, D. J., REIG, C., MESEJO, C., AGUSTÍ, M., & PRIMO-MILLO, E. (2015). Carbon utilization by fruit limits shoot growth in alternate-bearing citrus trees. *Journal of plant physiology*, 176, 108-117.

MARTÍNEZ-FUENTES, A. (2010). *El tiempo de permanencia del fruto en el árbol y su relación con la floración en los cítricos.* (Tesis Doctoral. Director M. Agustí. Universitat Politècnica de València).

MARTÍNEZ-FUENTES, A., MESEJO, C., JUAN, M., ALMELA, V. & AGUSTÍ, M. (2002, August). Restrictions on the exogenous control of flowering in citrus. In *XXVI International Horticultural Congress: Citrus and Other Subtropical and Tropical Fruit Crops: Issues, Advances and 632* (pp. 91-98).

MARTÍNEZ-FUENTES, A., MESEJO, C., MUÑOZ-FAMBUENA, N., REIG, C., GONZÁLEZ-MAS, M.C., IGLESIAS, D.J., PRIMO-MILLO E. & AGUSTÍ, M. (2013). Fruit load restricts the flowering promotion effect of paclobutrazol in alternate bearing *Citrus* spp. *Scientia Horticulturae*, 151, 122-127.

MASON, M.G., ROSS, J.J., BABST, B.A., WIENCLAW, B.N. & BEVERIDGE, C.A. (2014). Sugar demand, not auxin, is the initial regulator of apical dominance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(16), 6092-6097.

MASON, M.G., ROSS, J.J., BABST, B.A., WIENCLAW, B.N. & BEVERIDGE, C.A. (2014). Sugar demand, not auxin, is the initial regulator of apical dominance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(16), 6092-6097.

MESEJO, C., MARTÍNEZ-FUENTES, A., REIG, C., BALASCH, S., PRIMO-MILLO, E. & AGUSTÍ, M. (2020). Mechanical pruning attenuates alternate bearing in *Nadorcott* mandarin. *Scientia Horticulturae*, 261, 108993.

MESEJO, C., MARZAL, A., MARTÍNEZ-FUENTES, A., REIG, C.M, DE LUCAS, M., IGLESIAS, D., PRIMO-MILLO, E., BLÁZQUEZ, M. & AGUSTÍ, M. (2021). Vegetative growth resets fruit-dependent inhibition of flowering through epigenetic reprogramming of CcMADS19 in Citrus. *New Phytologist* (En Revisión).

MOHAMED, R., WANG, C.T., MA, C., SHEVCHENKO, O., DYE, S.J., PUZEY, J.R., ETHERINGTON, E., SHENG, X., MEILAN, R., STRAUSS, S.H. & BRUNNER, A.M. (2010). Populus CEN/TFL1 regulates first onset of flowering, axillary meristem identity and dormancy release in Populus. *The Plant Journal*, 62(4), 674-688.

MONSELISE, S.P. & GOLDSCHMIDT, E.E. (1982). Alternate bearing in fruit trees. *Horticultural reviews*, 4(1), 128-173.

MUÑOZ-FAMBUENA, N., MESEJO, C., CARMEN GONZÁLEZ-MAS, M., PRIMO-MILLO, E., AGUSTÍ, M. & 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., IGLESIAS, D.J., PRIMO-MILLO, E. & AGUSTÍ, M. (2012). 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.

MUÑOZ-FAMBUENA, N., MESEJO, C., GONZÁLEZ-MAS, M.C., PRIMO-MILLO, E., AGUSTÍ, M. & 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. & IGLESIAS, D. J. (2012). 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., IGLESIAS, D. J., REIG, C., MARTÍNEZ-FUENTES, A., GONZÁLEZ-MAS, M. C. Y AGUSTÍ, M. (2013). La alternancia de cosechas en los cítricos. Control genético y técnicas para reducirla. *Levante Agrícola*, (419), 322-328.

NG, M. & YANOFSKY, M. F. (2001). Activation of the Arabidopsis B class homeotic genes by APETALA1. *The Plant Cell*, 13(4), 739-753.

NISHIKAWA, F., ENDO, T., SHIMADA, T., FUJII, H., SHIMIZU, T., OMURA, M. & IKOMA, Y. (2007). Increased CiFT abundance in the stem correlates with floral induction by low temperatura in *Satsuma* mandarin (*Citrus unshiu* Marc.). *Journal of Experimental Botany*, 58(14), 3915-3927.

PASCUAL, V. (2021). *La acción de las giberelinas en la diferenciación floral de los cítricos (Citrus spp.)*. (Trabajo Final de Máster. Tutor C. Mesejo. Universitat Politècnica de València).

PEÑA, L., MARTÍN-TRILLO, M., JUÁREZ, J., PINA, J.A., NAVARRO, L. & MARTÍNEZ-ZAPATER, J.M. (2001). Constitutive expression of *Arabidopsis* LEAFY or APETALA1 genes in *Citrus* reduces their generation time. *Nature biotechnology*, 19(3), 263-267.

PILLITTERI, L.J., LOVATT, C.J. & WALLING, L.L. (2004). Isolation and characterization of a TERMINAL FLOWER homolog and its correlation with juvenility in citrus. *Plant Physiology*, 135(3), 1540-1551.

PNUELI, L., CARMEL-GOREN, L., HAREVEN, D., GUTFINGER, T., ALVAREZ, J., GANAL, M., ZAMIR, D. & 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(11), 1979-1989.

SÁNCHEZ-CAPUCHINO, J.A. Y CASANOVA, R. (1973). Inducción floral en mandarinos Clementina sin hueso y Satsuma. In *First International Congress Citriculture* (Vol. 2, pp. 223-225).

SERRANO-MISLATA, A., FERNÁNDEZ-NOHALES, P., DOMÉNECH, M. J., HANZAWA, Y., BRADLEY, D. & MADUEÑO, F. (2016). Separate elements of the TERMINAL FLOWER 1 cis-regulatory region integrate pathways to control flowering time and shoot meristem identity. *Development*, 143(18), 3315-3327.

SHALOM, L., SAMUELS, S., ZUR, N., SHLIZERMAN, L., DORON-FAIGENBOIM, A., BLUMWALD, E. & SADKA, A. (2014). Fruit load induces changes in global gene expression and in abscisic acid (ABA) and indole acetic acid (AIA) homeostasis in *Citrus* buds. *Journal of Experimental Botany*, 65(12), 3029-3044.

SHELDON, C.C., BURN, J.E., PEREZ, P.P., METZGER, J., EDWARDS, J.A., PEACOCK, W.J. & DENNIS, E.S. (1999). The FLF MADS box gene: a repressor of flowering in *Arabidopsis* regulated by vernalization and methylation. *The Plant Cell*, 11(3), 445-458.

SOPPE, W.J., VINEGRA DE LA TORRE, N. & ALBANI, M.C. (2021). The Diverse Roles of FLOWERING LOCUS C in Annual and Perennial Brassicaceae Species. *Frontiers in Plant Science*, 12, 188.

- URBINA, V.** (2002). *La fructificación de los frutales*. Paperkite Editorial. España.
- WAGNER, D., SABLÓWSKI, R.W.M. & MEYEROWITZ, E.M.** (1999). Transcriptional activation of APETALA1 by LEAFY. *Science*, 285(5427), 582-584.
- WAHL, V., PONNU, J., SCHLERETH, A., ARRIVAUULT, S., LANGENECKER, T., FRANKE, A. & SCHMID, M.** (2013). Regulation of flowering by trehalose-6-phosphate signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Science*, 339(6120), 704-707.
- WAHL, V., PONNU, J., SCHLERETH, A., ARRIVAUULT, S., LANGENECKER, T., FRANKE, A., FEIL, R., LUNN J.E., STITT, M. & SCHMID, M.** (2013). Regulation of flowering by trehalose-6-phosphate signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Science*, 339(6120), 704-707.
- XING, L.B., ZHANG, D., LI, Y.M., SHEN, Y.W., ZHAO, C.P., MA, J.J., AN, N. & HAN, M.Y.** (2015). Transcription profiles reveal sugar and hormone signaling pathways mediating flower induction in apple (*Malus domestica* Borkh.). *Plant and Cell Physiology*, 56(10), 2052-2068.
- YAMAGUCHI, N., WINTER, C.M., WU, M.F., KANNO, Y., YAMAGUCHI, A., SEO, M. & WAGNER, D.** (2014) Gibberellin acts positively then negatively to control onset of flower formation in *Arabidopsis*. *Science*, 344(6184), 638-641.
- YU, S., GALVÃO, V.C., ZHANG, Y.C., HERRER, D., ZHANG, T.Q., HAO, Y.H., FENG, Y.Q., WANG, S., SCHMID, M. & WANG, J. W.** (2012). Gibberellin regulates the Arabidopsis floral transition through miR156-targeted SQUAMOSA PROMOTER BINDING-LIKE transcription factors. *The Plant Cell*, 24(8), 3320-3332.
- ZHANG, F., WANG, Y. & IRISH, V.F.** (2021). CENTRORADIALIS maintains shoot meristem indeterminacy by antagonizing THORN IDENTITY1 in Citrus. *Current Biology*, 31(10), 2237-2242.