



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

LA ACCIÓN DE LAS AUXINAS EN LA BROTAÇÃO Y
FLORACIÓN DE LOS CÍTRICOS

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Ingeniería Agronómica

AUTOR/A: Blasco Moncho, Carla

Tutor/a: Mesejo Conejos, Carlos

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA Y
DEL MEDIO NATURAL



LA ACCIÓN DE LAS AUXINAS EN LA BROTAÇÃO Y FLORACIÓN DE LOS CÍTRICOS

TRABAJO FIN DE MÁSTER

MÁSTER UNIVERSITARIO EN INGENIERÍA AGRONÓMICA

Alumna: Carla Blasco Moncho

Tutor: Carlos Mesejo Conejos

Cotutor: Manuel Agustí Fonfría

Curso académico: 2022-2023

VALENCIA, 10 de septiembre de 2023

Título: La acción de las auxinas en la brotación y floración de los cítricos

Resumen

La producción de los cítricos depende de la intensidad de brotación y floración. En ellos la madera más joven brota y florece con mayor intensidad, pero se desconoce el mecanismo que lo regula.

Los estudios sobre los factores fisiológicos que afectan a la brotación y, floración se basan en dos hipótesis, una hormonal y una nutricional. En la hipótesis hormonal se plantea que la brotación de las yemas axilares se ve afectada por la dominancia apical y, por tanto, la posición del nudo en el brote es determinante. La yema apical produce y transporta auxinas que modifica el balance auxinas/citoquininas en las yemas axilares. La eliminación del ápice reduce el contenido en auxina y provoca la brotación de yemas axilares. Los nuevos ápices reinician la dominancia apical y establecen un nuevo balance. previa acumulación de los carbohidratos en la yema provocando la brotación. Pero, además, en los cítricos la intensidad de floración es mayor en las yemas más jóvenes y apicales, que son las que más brotan. Teniendo en cuenta que todas las hojas reciben la señal inductora, las diferencias en la floración de sus yemas axilares deben estar reguladas endógenamente.

La hipótesis de este Trabajo Fin de Máster es la siguiente: en los cítricos, el transporte polar de AIA procedente de las yemas apicales modifica la expresión de *LFY* e inhibe la diferenciación floral de las yemas situadas en posición basal.

Los resultados indican que la intensidad de brotación y floración varía por: 1) la edad de la rama (primavera, verano, otoño), y 2) la posición del nudo en la rama y correlaciona con la expresión en la yema de los genes *LFY* (relacionado con la diferenciación floral) y *PINI* (transportador de auxinas). La concentración de AIA en el floema de los entrenudos aumenta en la parte basal de la rama, lo que se relaciona con una menor brotación. Dado que la expresión del gen *CiFT3* es igual en todos los nudos con independencia de su posición, se concluye que el transporte polar de auxinas modifica la expresión del gen *LFY* y la diferenciación floral de los cítricos.

Palabras clave: cítricos; dominancia apical; auxinas; brotación; floración

Alumno: Carla Blasco Moncho

Tutor: Carlos Mesejo Cornejo

Cotutor: Manuel Agustí Fonfría

Valencia, 10 de septiembre de 2023

Abstract

Citrus production depends on the intensity of bud sprouting and flowering. The younger the wood, the greater the sprouting and flowering, but the mechanism that regulates it is unknown.

Studies on the physiological factors affecting bud sprouting and flowering are based on hormonal and nutritional hypothesis. In the hormonal hypothesis it is proposed that the release of the axillary buds is affected by the apical dominance and, therefore, the position of the node in the shoot is key. The apical bud produces and transports auxins that modify the auxin/cytokinin balance in the axillary bud. Shoot tip removal increases carbohydrates accumulation in the axillary bud, reduces the polar auxin transport, and causes the release of the axillary bud. The new shoot restarts the apical dominance, establishing a new balance. In addition, flowering intensity is also higher in the younger (apical) buds, which sprout in a higher proportion. Since all leaves receive the floral induction signal, differences in flowering of the axillary buds should be under endogenous control.

The following hypothesis was proposed: in citrus, the polar auxin transport from the shoot apical meristem inhibits the floral differentiation of the basal buds.

The results indicate that the intensity of sprouting and flowering varies by 1) the age of the branch (spring, summer, autumn) and 2) the position of the node on the branch which correlate with the expression in the bud of the genes *LFY* (related to floral differentiation) and *PIN1* (auxin transporter). The concentration of IAA in the phloem of the internodes increases in the basal part of the branch, which is related to the lower sprouting. Given that the expression of the *CiFT3* gene was the same in all nodes regardless of their position, it is concluded that the polar auxin transport modifies the expression of *LFY* and thus the floral differentiation process in citrus.

Key words: citrus; apical dominance; auxins; sprouting; flowering

Siempre agradecida...

A mi tutor de TFM, Carlos, por guiarme en este proyecto, por su disposición e implicación en todo momento, por ayudarme con mi desarrollo profesional y personal, por transmitirme el verdadero significado de la palabra esfuerzo y por brindarme la oportunidad de ser su alumna.

A mi cotutor, Manolo, por enseñarme sus conocimientos, por darme su apoyo, por su motivación para seguir estudiando y por ser una persona excelente.

De igual manera, agradezco a Amparo, quien ha estado ayudándome a desarrollar las tareas de laboratorio, gracias por tu alegría y Antonio, quien estuvo a mi lado en las complejidades del proyecto. Vuestra implicación, dedicación y esfuerzo han sido esenciales.

A mis compañeros/as, en los que he encontrado amigos maravillosos, con los que he compartido una etapa increíble, ya que sin ellos esta experiencia habría sido mucho más compleja.

Y, por último, a mis familiares por todo ánimo recibido, en especial a mis padres, por apoyarme, comprenderme, darme los mejores consejos, enseñarme a valorar mi esfuerzo, y acompañarme de forma incondicional durante esta etapa de mi vida, sois un ejemplo a seguir.

ÍNDICES

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	17
1. Situación actual en la citricultura. Justificación del problema	1
2. Brotación y floración en los cítricos.....	2
3. La inducción floral	2
4. La diferenciación floral	3
5. Brotación y tipos de brotes.....	3
6. Regulación de la intensidad de la brotación y floración. La dominancia apical.	4
7. Las auxinas. Síntesis, regulación, biosíntesis y transporte.....	6
II. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	10
III. MATERIAL Y MÉTODOS	10
1. Material vegetal y diseño del experimento.....	11
2. Determinaciones en campo	12
3. Determinación de la expresión génica.....	13
a. Toma y procesado de muestras	13
b. Extracción de ARNm.	13
4. Elección de genes de interés y sus cebadores.....	15
5. Rt-qPCR	16
6. Determinación de la concentración de hormonas.....	16
7. Análisis estadístico	16
IV. RESULTADOS	12
1. Brotación y floración según el tipo de madera y la posición del nudo en la rama.	17
2. Expresión de los genes <i>FT</i> y <i>LFY</i>	20
3. Síntesis, transporte y concentración de auxinas	21
4. Concentración de Cks y GAs en yemas y floema	23
V. DISCUSIÓN.....	17
VI. CONCLUSIONES	24
VII. BIBLIOGRAFÍA	27

Índice de Figuras

- Figura 1.** Modelo simplificado del mecanismo de la dominancia apical. Toda la red de ramificación (A), las etapas involucradas en la producción de una ramificación una vez se ha formado la yema axilar antes y después de la decapitación (B y C), una yema inhibida (B), la liberación de la yema después de la decapitación (C) y la etapa de crecimiento sostenido (D) Fuente: (Beveridge et al. 2023). 5
- Figura 2.** Esquema de una planta joven en la que se indica la dirección del transporte polar de auxina: basípeto en el tallo y la raíz y acrópeto en la raíz. En el extremo apical de la raíz existe un transporte lateral que permite a la auxina entrar en la ruta de transporte basípeto. Fuente: (Azcón-Bieto & Talón, 2008). 8
- Figura 3.** Esquema del transporte polar del AIA según la hipótesis quimiosmótica Fuente: (Azcón-Bieto & Talón, 2008). 9
- Figura 4.** Esquema de los dos tipos de rama seleccionados en el estudio, indicando la edad de la madera del año. 11
- Figura 5.** Fases del proceso de extracción de ARNm. Molido de las yemas hasta conseguir polvo fino (izquierda) y tubos al baño maría (derecha). 14
- Figura 6.** Influencia de la edad de la madera (otoño, verano, primavera del año anterior) en la intensidad de brotación (A) y floración (B) de primavera. Cada valor es la media de 50 ramas de la madera de otoño del naranjo dulce Lanelate. Las barras verticales muestran el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$). 17
- Figura 7.** Influencia de la posición del nudo en la rama y la edad de la madera en la distribución de tipos de brote en ramas con madera de otoño, verano y primavera del año anterior (A) y ramas con madera de verano y primavera (B). (I: inflorescencia sin hojas; FS: flor solitaria; BC: brote campanero; BM: brote mixto; BV: brote vegetativo). Cada valor es la media de 50 ramas de la madera de otoño del naranjo dulce Lanelate. Las barras verticales muestran el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre nudos para cada tipo de brote de la madera joven ($P < 0.05$). 19
- Figura 8.** (A) Distribución de los tipos de brotes a lo largo de las ramas con madera O+V+P y V+P. Cada columna es una rama individual. Se han elegido 21 como muestra de las 100 que se evaluaron de la madera del naranjo dulce Lanelate. La línea roja y el * indican el cambio de madera. (B). Frecuencia de ramas vegetativas, florales y mixtas en las ramas O+V+P y V+P; O: otoño; V: verano; P: primavera. 20
- Figura 9.** Influencia de la posición del nudo en la rama sobre la expresión de los genes FT (A) y LFY (B) en las hojas y yemas, respectivamente, de la madera de otoño del naranjo dulce 'Lanelate'. Mediación realizada en el momento previo a la brotación (enero). Letras diferentes indican la significación estadística ($p < 0.05$). 20

Figura 10. Influencia de la posición del nudo en la rama sobre la expresión de los genes PIN1 (A) y YUCCA (B) y la concentración de AIA en las yemas de la madera apical de otoño (C) y la madera apical de verano (D) de la variedad Lanelate. Mediación realizada en el momento previo a la brotación (enero). Cada valor es la media de 3 réplicas biológicas. Las barras verticales indican el error estándar. Letras diferentes indican la significación estadística ($p < 0.05$)..... 21

Figura 11. Concentración de AIA en el floema de los entrenudos de madera apical de otoño y verano, (A y B) respectivamente, según la posición de los nudos del naranjo dulce ‘Lanelate’. Mediación realizada en el momento previo a la brotación (enero). Cada valor es la media de tres réplicas biológicas. Las barras verticales muestran el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$). 22

Figura 12. Concentración de GA’s y CK’s en las yemas según la posición de los nudos de ramas de otoño del naranjo dulce ‘Lanelate’. Mediación realizada en el momento previo a la brotación (enero). Cada valor es la media de tres réplicas biológicas. Las barras verticales muestran el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$). 23

Figura 13. Concentración de GA’s y CK’s en el floema del entrenudo según su posición en ramas de otoño del naranjo dulce ‘Lanelate’. Mediación realizada en el momento previo a la brotación (enero). Cada valor es la media de tres réplicas biológicas. Las barras verticales muestran el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$). 23

Índice de Tablas

Tabla 1. Cebadores elegidos para el análisis de expresión génica 15

I. INTRODUCCIÓN

1. Situación actual en la citricultura. Justificación del problema

La superficie dedicada al cultivo de cítricos en España es de más de 300.000 ha, lo que corresponde a un 30% de la superficie dedicada a la producción hortofrutícola. Esta se reparte entre la Comunidad Valenciana (52%), Andalucía (29%), Murcia (15%) y Cataluña (4%). La Comunidad Valenciana, por tanto, es la principal región cítrica a nivel nacional, tanto por la superficie dedicada al cultivo (182.000 ha) como por la producción (más de 3 millones de toneladas) (MAPA, 2021).

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 2022, la producción de naranjas alcanzó un total de 3.604.000 t y la de mandarinas fue de 2.009.520 t, lo que supuso una producción bruta de 1.176.086 € y 900.522 €, respectivamente. Todo ello supuso un incremento de la producción del 7,26% en naranjas y del 5,76% en mandarinas respecto al año anterior.

Las variaciones anuales en la producción pueden ser debidas a las condiciones climáticas y económicas. Pero, además, éstas pueden ser debidas a factores intrínsecos de cada variedad. En algunas variedades aparecen problemas relacionados con la brotación y la floración tras una cosecha elevada, dando lugar al fenómeno de la *alternancia de cosechas*. Este es un problema caracterizado por años de elevada cosecha, con un número elevado de flores y frutos, seguidos de años improductivos debido a la falta de flores. Es decir, tras un ciclo productivo (año ON), el árbol no florece, dando lugar a un ciclo improductivo (año OFF), lo que impide obtener una producción estable a lo largo del tiempo, problema especialmente grave en años de menor producción porque los costes de cultivo para mantener la plantación (riego, fertilización, poda, plagas, etc.) pueden superar los ingresos. En la inhibición de la floración influye la cantidad de frutos, el tiempo de permanencia del fruto en el árbol y la interacción entre ambos factores (Martínez-Fuentes, 2010). Finalmente, con independencia de la presencia del fruto, la edad de las yemas también es un factor determinante en la brotación y la floración, siendo mayor en las yemas más jóvenes y apicales (Agustí, 1980; Guardiola et al., 1982). Por ello, algunos factores como el vigor de la variedad o la poda también resultan importantes en la floración.

En resumen, todos aquellos factores que limitan la floración son determinantes de la producción. Como todas las hojas reciben la misma señal exógena inductora, las diferencias de floración deben ser debidas a factores endógenos que, en general, son desconocidos. En este TFM se estudia la relación de las auxinas con la brotación y la floración de los cítricos.

2. Brotación y floración en los cítricos

Con el nombre de floración se designa a la etapa de desarrollo con la que se inicia la fase reproductiva de la planta. El éxito reproductivo de una planta depende de que la floración tenga lugar en el momento más adecuado de su desarrollo y cuando las condiciones ambientales sean favorables. Además, dentro de una misma área geográfica la floración se produce de manera sincronizada para todos los individuos de la misma especie, con el fin de que se dé un intercambio génico entre ellos. La falta de movilidad de las plantas y sus particulares características de desarrollo han propiciado el establecimiento de mecanismos especializados de control del tiempo de floración que aseguren el éxito reproductivo de la especie (Roldán, & Martínez Zapater, 2008).

El proceso de la floración comprende varias etapas consecutivas: la inducción floral, la diferenciación floral, la morfogénesis floral y la apertura floral o antesis. En el caso de los cítricos, la diferenciación floral es coincidente con la brotación de primavera.

El momento y la intensidad de la brotación y la floración dependen de factores exógenos (fotoperiodo, temperatura y estado hídrico) y endógenos (factores genéticos, hormonales y nutricionales) (Blázquez et al, 2011).

3. 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 proceso se inicia en las hojas, donde se genera una señal, la proteína FLOWERING LOCUS T (FT), que se transporta al meristemo (Corbesier et al., 2007). La inducción se divide en dos fases, una reversible, en la que si se modifican las condiciones que determinan el desarrollo del proceso, se reprime la iniciación floral y la yema continúa vegetativa, y otra irreversible en la que, aunque se modifiquen las condiciones, el proceso de inducción floral se lleva a cabo dando lugar a la iniciación floral (Urbina, 2002).

En los cítricos cultivados en clima subtropical, las bajas temperaturas (inferiores a 15°C) activan la expresión del gen *CiFT* (Nishikawa et al., 2007), (homólogo del gen FLOWERING LOCUS T (FT) en *Arabidopsis thaliana* L). En cambio, en climas en los que no existen periodos fríos, la inducción floral es promovida por el estrés hídrico, que también activa la expresión de *CiFT* (Chica & Albrigo, 2013). Posteriormente, el restablecimiento de las condiciones hídricas activa la expresión de los genes promotores de la identidad floral del meristemo.

4. La diferenciación floral

En los cítricos, después del reposo invernal o tras un periodo de sequía se inicia la formación de flores o inflorescencias, a partir de yemas situadas en el ápice del tallo o las axilas de las hojas. La transformación de ápice vegetativo a yema floral comienza por la formación de sépalos seguido por los pétalos, estambres y, finalmente, el pistilo (Urbina, 2002).

La diferenciación floral, se activa por el transporte de la proteína FT de las hojas a las yemas, donde se forma un dímero con la proteína FLOWERING LOCUS D (FD) (Bäurle et al., 2006). Con ello se estimula la expresión de los genes *CiLFY* y *CiAPI*, homólogos en los cítricos de *LEAFY (LFY)* y *APETALLA1 (API)* de *Arabidopsis thaliana* L., y relacionados con la identidad floral del meristemo (Blázquez et al., 2011). El gen *LFY* ejerce una función reguladora sobre *API*, induciendo directamente su expresión, al reducir los niveles de GAs activas y permitiendo la acumulación de las proteínas DELLA. Estas proteínas se unen a los factores de transcripción SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL), activando la expresión de *API* (Yu et al., 2012; Yamaguchi et al., 2014). Para que el meristemo se diferencie en una flor, es suficiente la sobreexpresión de cualquiera de estos dos genes florales (Busch et al., 1999; Wagner et al., 1999; Ng & Yanofsky, 2001), tanto en *Arabidopsis thaliana* L, como en los cítricos (Peña et al., 2001).

Por otra parte, otros genes son represores de la floración. Entre estos genes se encuentra *TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)*, que actúa en la yema como represor de los genes de identidad floral del meristemo *LFY* y *API*. El gen *CENTRORADIALIS (CEN)*, mantienen la indeterminación del meristemo, o lo que es lo mismo, que el destino del meristemo sea vegetativo (Pnueli et al., 1998; Mohamed et al., 2010). 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.

5. Brotación y tipos de brotes

En los cítricos, las yemas brotan en cualquier época del año cuando la temperatura del suelo supera los 12°C, con independencia de la del aire. Por otro lado, condiciones de día largo reducen el período entre brotaciones, cuya frecuencia e intensidad están reguladas endógenamente (Agustí et al., 2020). Entre los factores endógenos que regulan la brotación destaca la relación entre las auxinas, las citoquininas y los carbohidratos, que determina, entre otros aspectos, la dominancia apical (Mason et al., 2014; Da Cao et al., 2023).

En las condiciones del clima Mediterráneo los cítricos brotan en tres momentos definidos por las estaciones: primavera, principio de verano y final de verano u otoño. En la primavera la brotación

es más intensa, produciendo las flores útiles que dan lugar a la cosecha. Tras el cuajado, la brotación se detiene por la competencia con los frutos en desarrollo. La segunda brotación es al inicio del verano, produce únicamente brotes vegetativos y se paraliza con el aumento de la temperatura estival. Por último, la tercera brotación, que es también vegetativa, se inicia cuando se modera la temperatura estival y se detiene por el descenso de la temperatura al final del otoño.

Los brotes que surgen en primavera se clasifican de acuerdo con el número de hojas y flores que llevan. Los brotes sin hojas multiflorales o uniflorales reciben el nombre de ramos de flor (RF) o flor solitaria (FS), respectivamente. Como la diferenciación floral tiene lugar al mismo tiempo que se inicia la brotación, muchas yemas, inicialmente, dan lugar a brotes vegetativos en los que, en ocasiones, el meristemo apical y los axilares se transforman en flores (Agustí et al., 2020). De este modo, los cítricos también producen brotes mixtos multiflorales (BM) y uniflorales con una flor terminal (brotes campaneros BC); finalmente, los brotes que solo llevan hojas se llaman brotes vegetativos (BV). Este número de flores y hojas de los brotes depende de dos factores: el número de primordios presentes en la yema y la abscisión o falta de desarrollo de algunos órganos (Agustí, 2020).

6. Regulación de la intensidad de la brotación y floración. La dominancia apical.

En los árboles cítricos capaces de florecer, la intensidad de brotación y floración depende de la edad de la madera, de modo que la más joven brota y florece con mayor intensidad. Así, la madera de otoño es la que brota más precozmente, en mayor proporción y produce brotes más largos, seguida de la de verano y esta, a su vez, de la de primavera del año anterior (Agustí, 1980). Además, dentro del brote joven, las yemas más apicales también brotan y florecen con mayor intensidad. La *dominancia apical* es el fenómeno por el cual la yema situada en posición terminal restringe el crecimiento de las yemas laterales y reduce el número de brotes formados. El mecanismo que la regula es complejo, implica factores hormonales (de síntesis y transporte) y nutricionales, y ha sido recientemente explicado utilizando el guisante como planta modelo (Figura 1).

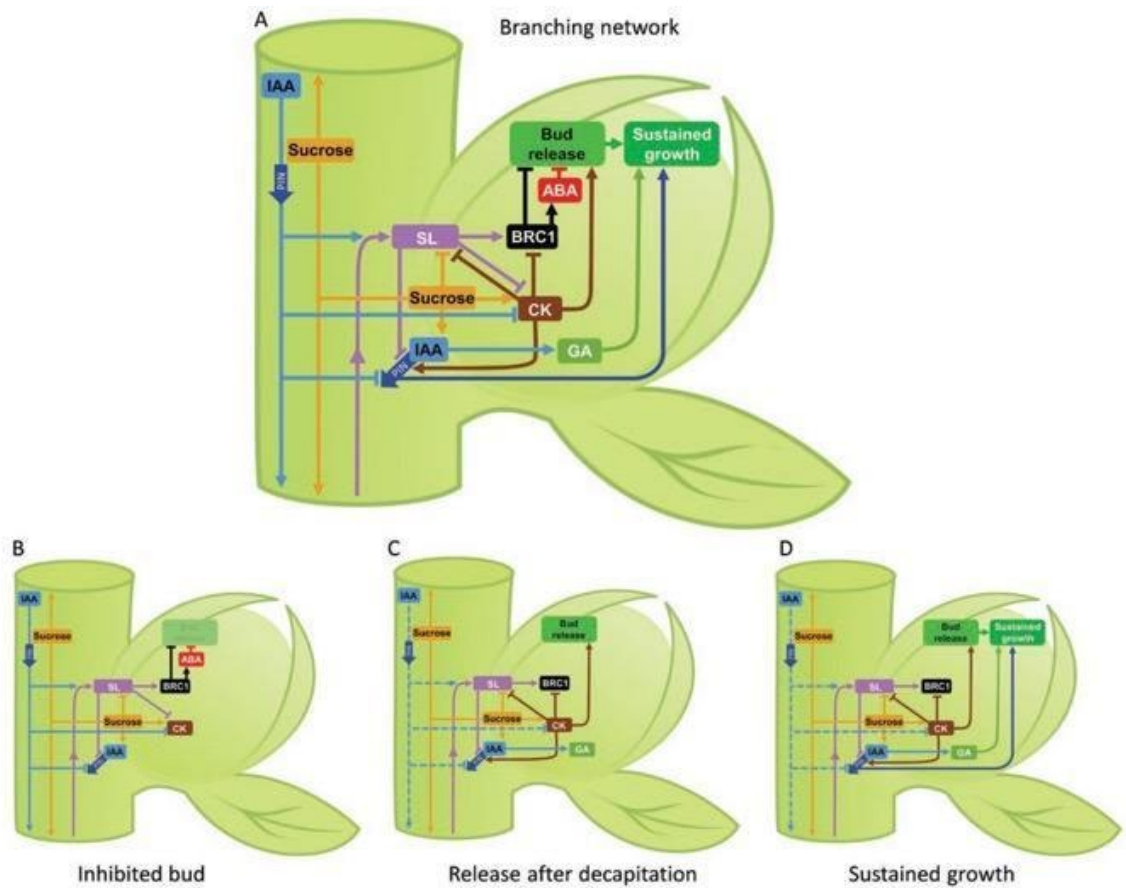


Figura 1. Modelo simplificado del mecanismo de la dominancia apical. Toda la red de ramificación (A), las etapas involucradas en la producción de una ramificación una vez se ha formado la yema axilar antes y después de la decapitación (B y C), una yema inhibida (B), la liberación de la yema después de la decapitación (C) y la etapa de crecimiento sostenido (D) Fuente: (Beveridge et al. 2023).

La hipótesis hormonal plantea que la auxina (AIA) de origen apical estimula la biosíntesis de estrigolactonas (SL), reduce los niveles de citocininas (CK) y reprime la exportación de AIA desde la yema axilar (Figura 1.A). La SL aumentan la expresión del gen represor de la brotación *BRANCHED1* (*BRC1*), y también reprimen la exportación de AIA desde la yema axilar, al actuar sobre la polaridad del transportador de auxina *PINI* en la membrana plasmática. Las SL también pueden actuar por vía(s) independiente(s) de *BRC1*. Las CKs tienen el papel opuesto a las SL, y hay cierta retroalimentación entre ellas. El gen *BRC1* actúa para inhibir la brotación de yemas axilares, y puede actuar en parte a través del ácido abscísico (ABA), aunque el papel de esta hormona no está precisado con claridad.

La hipótesis nutricional plantea que los carbohidratos, en particular la sacarosa, ejercen un papel directo sobre la liberación de las yemas. La sacarosa inhibe la acción de las SL, promueve la síntesis de CK y el transporte de AIA desde la yema axilar. El menor nivel de AIA y el transporte

desde el primordio del brote axilar promueven el crecimiento sostenido, al menos en parte a través de la síntesis de giberelinas (GA).

La brotación se inhibe, principalmente, debido a los altos niveles de AIA apical, y al bajo suministro de sacarosa (Figura 1 B), que se acumula en la yema apical (Mason et al., 2014). Por ello, la decapitación de la yema apical (Figura 1.C) induce la liberación de yemas axilares, al reducir el AIA del tallo y mejorar el suministro de sacarosa, reducir la concentración de SL y mejorar la concentración de CK en la yema axilar. El crecimiento sostenido del primordio del brote axilar (Figura 1.D) seguirá incluso si se restauran el AIA del tallo y la sacarosa, siempre que los niveles de GA, estimulados por el AIA, provoquen el alargamiento del primordio y el transporte mejorado de auxina continúe desde la yema, lo que reinicia el nuevo balance.

En los cítricos, la aplicación de auxinas de síntesis (2,4-D) reduce la floración sin alterar el porcentaje de nudos brotados. El tratamiento reduce los brotes florales sin hojas y aumenta los brotes vegetativos (Lozano, 2022; Carbonell, 2022).

Otro factor endógeno a la planta que modifica la intensidad de brotación y floración es la presencia del fruto. En los cítricos, el fruto favorece el desarrollo de estructuras vegetativas sobre las estructuras reproductivas, estableciendo a su vez un gradiente de brotación que disminuye a medida que aumenta la cantidad de frutos presentes en el árbol. Un retraso en la recolección también puede alterar la intensidad de floración, afectando a la regularidad en las producciones (Agustí, 1980; Guardiola et al., 1982; Albrigo & Saucó, 2004; Martínez-Fuentes et al., 2010). Se desconoce el mecanismo a través del cual el fruto modifica la brotación y la floración.

La eliminación de un alto porcentaje (>40%) de frutos durante un año de gran cosecha es eficaz para inducir la floración solo si se realiza unos meses antes del inicio del periodo de inducción de la floración. La eliminación del fruto reduce el contenido y el transporte polar de AIA en el tallo, y permite la liberación de auxina de la yema, apoyando la hipótesis de que la presencia del fruto genera una señal de auxina en la yema que puede afectar la inducción de la floración (Bangerth, 2009; Haim et al, 2021).

7. Las auxinas. Síntesis, regulación, biosíntesis y transporte.

A finales del siglo XIX, en Alemania, se planteó la existencia de sustancias morfogenéticas que se moverían de forma polarizada a través de la planta y que determinarían la forma definitiva de cada órgano. Con ello, comenzaron estudios en los que se pretendía aislar e identificar químicamente el compuesto que se movía a través de la planta, las auxinas (del griego, hacer crecer, aumentar). Las moléculas con propiedades auxínicas tienen un anillo cíclico con al menos un doble enlace y un grupo funcional carboxílico u otro análogo (Acosta et al., 2008).

El compuesto natural más abundante que se acepta como auxina es el AIA, cuya síntesis principal es a partir del aminoácido triptófano, pero también puede ser independiente de éste. Los lugares más importantes donde se produce la biosíntesis del AIA en la planta son los ápices de coleótilos, los tallos y las hojas jóvenes, el cámbium y las semillas en desarrollo. Aun así, se ha demostrado que otros órganos, como las hojas adultas, también pueden sintetizar AIA. Aunque las raíces contienen AIA, poseen una capacidad limitada para sintetizarlo, y se considera que la mayor parte del AIA procede del tallo (Acosta et al., 2008).

El AIA participa en numerosos procesos del desarrollo de las plantas, pero, dependiendo de su concentración en el tejido se modifica la intensidad de la respuesta. La planta tiene mecanismos que regulan eficazmente la concentración de hormona, con el fin de mantener la concentración óptima en cada momento. La velocidad de biosíntesis, la conjugación, la hidrólisis de conjugados y oxidación (descarboxilativa y no descarboxilativa), la intensidad del transporte de llegada (importación) y de salida (exportación) son factores importantes a la hora de regular la concentración de la auxina. Cada órgano de la planta presenta una sensibilidad diferente a la auxina. Teniendo en cuenta la concentración de hormona que produce la máxima respuesta, dependiendo del lugar en el que se localice, se puede concluir que las raíces son más sensibles que las yemas, y éstas más sensibles que los tallos.

En cuanto al transporte, todas las hormonas vegetales pueden recorrer distancias cortas (entre células próximas) y llegar a los diferentes órganos a través de los tejidos vasculares (xilema y floema). El AIA, además, puede ser transportado por células no vasculares, como las células del cámbium y las células asociadas al floema, mediante un proceso diferente que se denomina transporte polar. Las principales características del transporte polar son la velocidad y la dirección. La velocidad de transporte es de unos 10 mm h^{-1} , unas 100 veces menor que la del floema, mientras que la dirección del transporte está polarizada. Se produce desde el ápice hacia la base del tallo (transporte basípeto), con independencia de que el tallo se mantenga en posición normal (extremo apical hacia arriba) o invertida; en la raíz, la dirección es preferentemente acrópeta (desde la base hacia el ápice), aunque también existe transporte basípeto (desde el ápice hacia la base) y lateral (desde las células próximas al cilindro vascular hacia la corteza externa) (Figura 2).

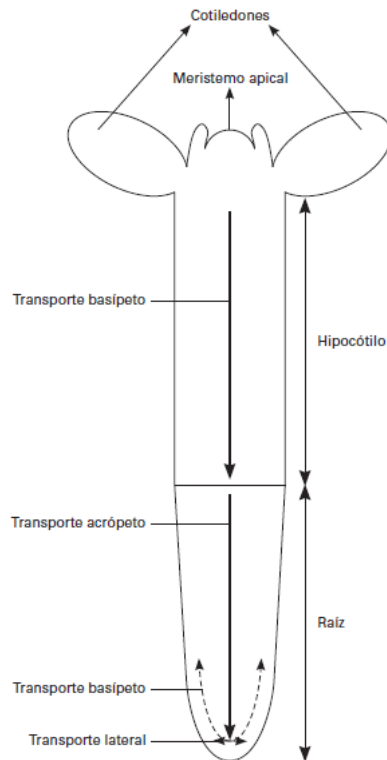


Figura 2. Esquema de una planta joven en la que se indica la dirección del transporte polar de auxina: basípeto en el tallo y la raíz y acrópeto en la raíz. En el extremo apical de la raíz existe un transporte lateral que permite a la auxina entrar en la ruta de transporte basípeto. Fuente: (Azcón-Bieto & Talón, 2008).

El transporte polar de AIA es un proceso complejo, regulado por una serie de proteínas localizadas en la membrana plasmática y la pared celular (Acosta-Echeverría et al., 2008). Las ATPasas de la membrana plasmática mantienen el pH del apoplasto en un rango ácido. En esas condiciones, el AIA se protona (AIAH). El AIAH puede difundir de un modo pasivo a través de la membrana plasmática al ser más lipofílico. Pero, además, los transportadores AUX1/LAX se encargan de realizar transporte activo de auxina desde el apoplasto hasta el citosol. Una vez ahí (pH neutro) AIAH se desprotona y ejerce su acción a través de factores de transcripción de respuesta a auxina (ARFs) en el núcleo. Las proteínas AUX/AIA reprimen la respuesta a auxinas. Finalmente, la auxina que ha entrado en la célula sale por el lado opuesto (para mantener el transporte polar unidireccional) gracias a la acción y localización de las proteínas PIN1 (Vanneste y Friml, 2009; Acosta et al., 2008). Estas se localizan en la base de las células transportadoras del tallo, lo que concuerda con la localización de los transportadores de salida prevista en la hipótesis quimiosmótica (Figura 3).

Teniendo en cuenta la capacidad que tienen para transportarse por el floema, así como los lugares en los que se produce su biosíntesis, se puede decir que las auxinas están implicadas en muchos procesos de desarrollo vegetal, afectando a la división, el crecimiento y la diferenciación de las células, lo que a su vez influye en la brotación y la floración.

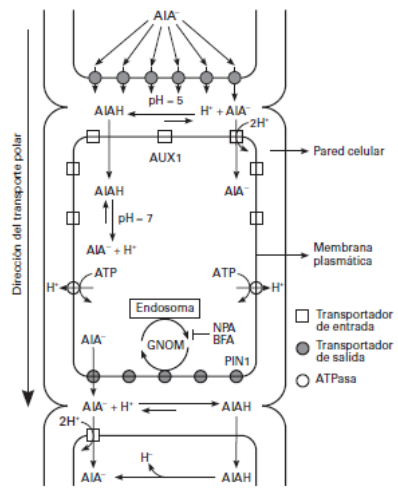


Figura 3. Esquema del transporte polar del AIA según la hipótesis quimiosmótica Fuente: (Azcón-Bieto & Talón, 2008).

II. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

La hipótesis que se plantea en este Trabajo Final de Máster es la siguiente: en los cítricos, el transporte polar de AIA procedente de las yemas apicales modifica la expresión de LFY e inhibe la diferenciación floral de las yemas situadas en posición basal.

Los objetivos son:

1. Estudiar la influencia de la edad de la madera y la posición del nudo en la rama sobre la brotación y floración.
2. Relacionar la concentración y transporte de auxinas a lo largo de la rama con la expresión de los genes de la inducción (*CiFT3*) y diferenciación floral (*CsLFY*), y la brotación y floración.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Material vegetal y diseño del experimento

El experimento se realizó en una explotación de naranjo dulce cv Lanelate [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck], injertada sobre patrón citrange Carrizo, situada en el término municipal de Calicanto, provincia de Valencia. El marco de plantación utilizado es de 4 m x 6 m y el manejo del cultivo se lleva a cabo mediante riego localizado, fertirrigación y control de plagas y enfermedades acorde con la normativa de producción integrada.

La variedad Lanelate procede de Australia, y se originó por mutación de una yema de "Washington navel". Es un árbol vigoroso, de follaje denso (entrenudos cortos) y hojas de color verde oscuro, y presenta espinas pequeñas en los nudos. Es una variedad perteneciente al grupo navel, con esterilidad gamética masculina y femenina y, por tanto, produce frutos partenocárpicos. Éstos son maduración tardía, por lo que cuando la producción es elevada tiene tendencia a la alternancia.

Se seleccionaron 20 árboles con condiciones sanitarias y nutricionales óptimas en los que se estableció, como unidad experimental la rama. En cada rama se identificó la edad de la madera (otoño, verano o primavera) y la posición de los nudos en cada rama (desde la yema apical hasta el nudo 7-8). En los cítricos es sencillo identificar la edad de la madera porque 1) en cada brotación se produce un pequeño cambio de ángulo en la dirección del brote, 2) cambia el color de la rama y 3) la madera más joven tiene sección triangular y la más adulta tiene sección circular. Concretamente en enero de 2023 se marcaron 160 ramas de dos tipos, con madera procedente de tres brotaciones del año, *otoño+verano+primavera* (O+V+P), y con madera procedente de dos brotaciones del año, *verano+primavera* (V+P), para determinar la capacidad de floración según la edad de la madera.

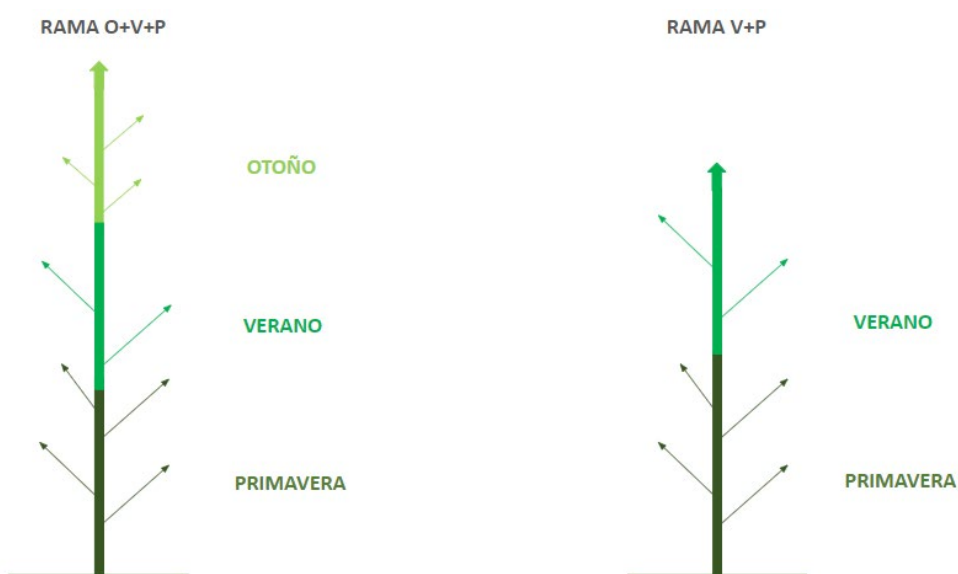


Figura 4. Esquema de los dos tipos de rama seleccionados en el estudio, indicando la edad de la madera del año.

En el momento previo a la brotación, entre los estados 01 ('comienzan a hincharse las yemas') y 03 ('escamas verdes ligeramente separadas') de las yemas axilares según la escala BBCH, se muestrearon las ramas y separaron en función de la madera en otoño, verano y primavera, en las ramas O+V+P, y verano y primavera en las ramas V+P (Figura 4). Las ramas se seleccionaron de modo que cada tipo de madera tuviera un mínimo de 8 nudos.

Inmediatamente después de la recogida de muestras, en el laboratorio, se separaron los tejidos según fueran hojas, yemas y floema, ordenándolos según su posición en la rama (nudo 1, 2, 3, etc., para hojas y yemas, y entrenudo 1, 2, 3 etc., para floema), para determinar la influencia de la dominancia apical en la intensidad de floración. Para tener tejido suficiente para el análisis, se definió cada réplica biológica como el conjunto de tejido procedente de 6 ramas. Se obtuvo 3 réplicas biológicas de cada tipo de muestra, para llevar a cabo, posteriormente, la determinación de la expresión de los genes relacionados con la diferenciación floral (*LFY*), la inducción floral (*FT*), la síntesis y el transporte de auxinas y la concentración de auxinas, giberelinas y citoquininas.

Finalmente, la evaluación de la brotación y floración en primavera (21/03/23) se realizó en 50 ramas de cada tipo (O+V+P y V+P).

2. Determinaciones en campo

Tras la recogida de muestras en el mes de enero, se evaluó la brotación y floración de 100 ramas en las que se cuantificó:

- El número de nuevos brotes de cada nudo
- El número de hojas y flores de cada brote nuevo

Con todo ello, se calculó la intensidad de brotación y floración por cada 100 nudos en cada tipo de rama, y se determinó el tipo de brote formado, es decir, 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 et al., 2020).

3. Determinación de la expresión génica.

a. Toma y procesamiento de muestras

El material vegetal se transportó en una nevera a 4°C hasta la llegada al laboratorio, donde se separaron los tejidos con ayuda de un bisturí, teniendo en cuenta la edad de la madera y la posición del nudo en la rama. Las muestras se congelaron con N₂ líquido se molieron en un mortero hasta obtener un polvo fino (Figura 5) y se almacenaron en el congelador de -80°C.

b. Extracción de ARNm.

Para la extracción de ARNm se realizan todos los procesos necesarios para llevar a cabo la eliminación de compuestos que actúen como barreras físicas y químicas sobre el ARNm, como son polisacáridos, polifenoles, metabolitos secundarios, proteínas y otros contaminantes como las sales inorgánicas y el fenol.

La extracción de ARNm se realizó según el protocolo de extracción de RNA cítricos consta de dos partes:

Primera parte

Se pesan 0,5 g de muestra molida en tubos de 15 ml, se le añade posteriormente 2 ml de TCES (0.2 Tris ph=8 + 0.2M NaCl + 50 mM EDTA + 2% SDS), 2 ml de fenol ácido y 40 µl β-mercaptoetanol para que la muestra molida pase a estar líquida. Posteriormente, para homogeneizar la muestra se pasa por un vórtex durante 1 minuto y se deposita al ``baño maría`` con agua a 50°C durante 20 minutos, agitando manualmente una vez por minuto (Figura 5). Después se centrifuga a 4000 rpm 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) al sobrenadante. A continuación, se pasa por el vórtex para homogeneizar la muestra y se centrifuga otros 30 minutos a 4000 rpm. En este proceso se separan las fases, la fase superior se deposita en tubos de 15 ml y se vuelve a centrifugar, esta vez a 10000 rpm durante 15 minutos. Finalmente, al sobrenadante resultante tras la centrifuga, se le añade la mitad del volumen extraído (1:2) de LiCl 6M y dejarlo precipitar a -20°C durante toda la noche.



Figura 5. Fases del proceso de extracción de ARNm. Molido de las yemas hasta conseguir polvo fino (izquierda) y tubos al baño maría (derecha).

Segunda parte

Al día siguiente, se dejan los tubos en el exterior para descongelar las muestras y se centrifugan durante 20 minutos a 10000 rpm para que precipite en el fondo del tubo. Se desecha el sobrenadante de LiCl y el precipitado se lava añadiendo 200 μ l de EtOH 70% (almacenado a -20°C) y se centrifuga de nuevo 5 minutos a 10000 rpm. El sobrenadante de EtOH se elimina, dejando secar al aire los pellets en los tubos durante 30 minutos y se vuelven a suspender con 100 μ l de agua.

Por último, 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 debe cuantificar la calidad y cantidad del mRNA libre obtenido para comprobar que las extracciones se han realizado con éxito. Para ello, se utilizó un equipo NanoDrop ND-100 (NanoDrop Technologies).

4. Elección de genes de interés y sus cebadores

Con el fin de determinar el efecto de la dominancia apical y la edad de la madera en la brotación y floración se seleccionaron los siguientes genes reguladores de la floración y del metabolismo de auxinas (Tabla 1):

1. La expresión en yemas del gen *LFY* implicado en la diferenciación floral
2. La expresión en yemas y el floema de genes implicados en la síntesis y transporte de auxinas (*YUCCA*; *PINI*).
3. La expresión en las hojas del gen *FT* implicado en la inducción floral.

Como genes de referencia se utilizaron la *actina* y la β -licopeno ciclasa (*LYC*).

Tabla 1. Cebadores elegidos para el análisis de expresión génica

Gen	ID	Description	Primer orientation	Sequence (5'-3')
PIN	Cs2g16620.1	Auxin efflux carrier component 1	F	CTCTCTTTGCAGTCCCCTTG
			R	CCCTTTTGCTCAACTTGCTC
CiFT3	MT602515 Ciclev10012905m	FLOWERING LOCUS T (FT)	F	AGACTGTTTATGCACCGGGG
			R	AGTTGAAGTAGACAGCGGCC
CsLFY	Ciclev10033942m	Flowering process	F	TCTTGATCCAGGTCCAGAACATC
			R	TAGTCACCTTGGTTGGGCATT
YUC4	Ciclev10008466m	síntesis de triptófano y producción de IAA	F	GGAAAGACGCCGGTACTTGA
			R	TCTTTCACACCACCCACCAC
Actin	Ciclev10025866m	Reference gene	F	CCGACCGTATGAGCAAGGAAA
			R	TTCTGTGGACAATGGATGGA
LYCOPEN	MJ136 MJ137	Reference gene	F	GCTCTAGCCTTGTAGGAAAGCCATGG
			R	GCGAATTCGGTGTGCACCTTAATCTGTAT

5. Rt-qPCR

Para la cuantificación relativa mediante PCR se utilizó el kit QuantiTect® SYBR® Green PCR Kit (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó para cada muestra 2,5 µl provenientes de la reacción de retrotranscripción anterior (extracción de ARN). 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 para que se lleve a cabo la desnaturalización, 30 segundos a 60 °C para el alineamiento y 30 segundos a 72 °C para la 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 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.

6. Determinación de la concentración de hormonas

Para determinar la concentración hormonal de los tejidos se seleccionan 3 réplicas biológicas de cada tipo de muestra (hojas, yemas y floema). El primer paso es reducir la humedad de las muestras mediante un liofilizador a baja temperatura y una reducción de presión. Posteriormente, se realiza una molienda en seco, hasta conseguir un polvo fino. El siguiente paso consiste en pesar 0,05 g de muestra molida en tubos de 5ml. La muestra pesada se llevó al servicio de cuantificación de hormonas vegetales del IBMCP.

7. Análisis estadístico

Los resultados se evaluaron estadísticamente mediante un análisis de la varianza (ANOVA), utilizando la mínima diferencia significativa (LSD) para la separación de las medias. Los datos experimentales se analizaron con el software Startgraphics Centurion XVI (Gráficos estadísticos, Englewood Cliffs, NJ, EE. UU), y el software Superplotsof data. A los valores porcentuales se le aplicó la transformación $\arcsen(\sqrt{p})$.

IV. RESULTADOS

1. Brotación y floración según el tipo de madera y la posición del nudo en la rama.

Con independencia de la edad de la madera (otoño, verano, primavera), la brotación y la floración fue significativamente más intensa en la zona apical de las ramas. Así, mientras en la rama O+V+P la mayor brotación se registró en la madera de otoño (45%), la mayor brotación de la rama V+P se registró en la madera de verano (60%) (Figura 6A). La intensidad de floración mostró un patrón similar y, también fue mayor en la madera de verano de la rama V+P que en la de otoño de la rama O+V+P. Así, mientras la rama O+V+P desarrolló 85 flores por 100 nudos (N) en la zona apical, en promedio, la rama de tipo V+P desarrolló 200 flores por 100 N (Figura 6B) esto es, un 42,5% más de flores.

En ambos casos, la madera basal de las ramas mostró una brotación y floración significativamente menor. En la rama de tipo O+V+P, la brotación y floración de la madera de primavera fue prácticamente nula (datos no mostrados).

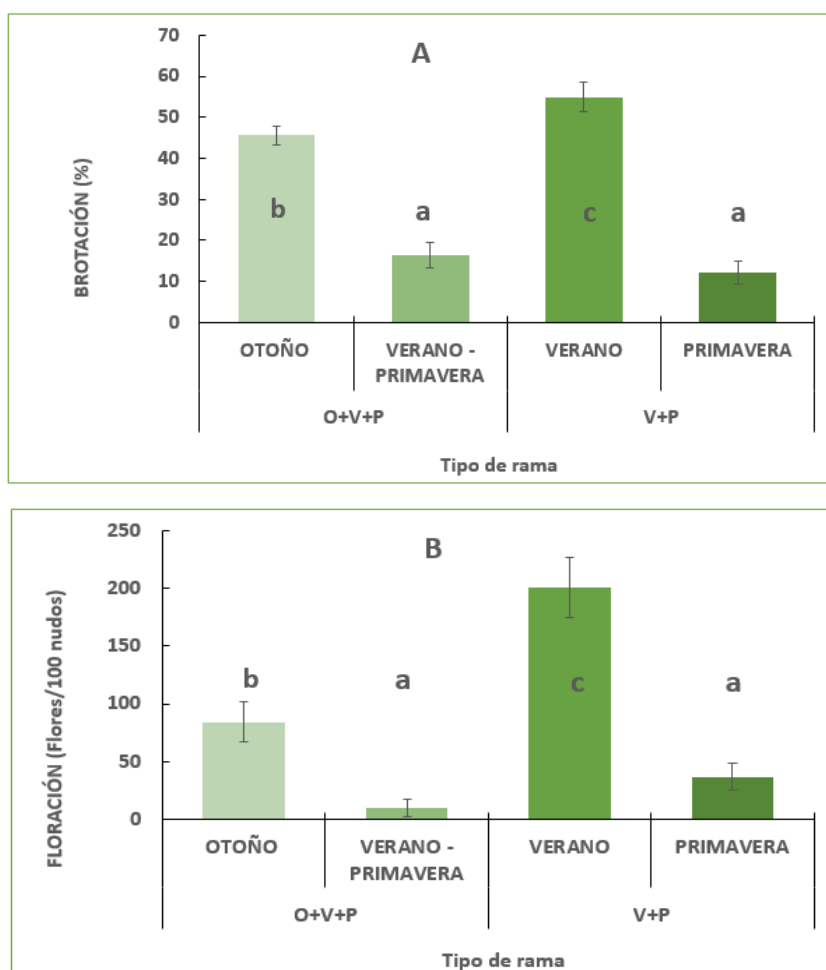


Figura 6. Influencia de la edad de la madera (otoño, verano, primavera del año anterior) en la intensidad de brotación (A) y floración (B) de primavera. Cada valor es la media de 50 ramas de la madera de otoño del naranjo dulce Lanelate. Las barras verticales muestran el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Un análisis más detallado de la influencia de la posición del nudo en la madera apical (la de otoño en la rama O+V+P y la de verano en la rama V+P) indica que los nudos 1-4 presentan mayor brotación y floración que los nudos 5-8 (Figura 7). Por término medio, se observó un mayor desarrollo de brotes vegetativos en la madera de otoño de la rama O+V+P que en la de verano de la rama V+P que, principalmente desarrolló inflorescencias (Figura 7). En ambos casos, la madera basal de la rama desarrolló menos brotes en todos los nudos. Así, tomando como ejemplo la rama O+V+P, mientras en la madera apical se desarrollaron 50 brotes vegetativos por 100 N en los nudos apicales, en la madera basal solamente se desarrollaron 28 brotes vegetativos cada 100 N. Los restantes tipos de brotes, como el brote mixto y la inflorescencia, también se desarrollaron más en la madera apical, con 18 brotes cada 100 N y 14 brotes cada 100 N, respectivamente. Finalmente, la flor solitaria o campanera se desarrollaron en menor medida en ambos tipos de madera (Figura 7A).

En la madera apical de los dos tipos de rama, el tipo de brote (vegetativo o floral) no dependió de la posición del nudo en la rama, sino de si la rama completa se indujo a flor o no. Así, tanto en la rama O+V+P como en la V+P se observó ramas completamente florales (todos los nudos apicales de la madera apical eran florales), y ramas completamente vegetativas (Figura 8A). Al partir del quinto nudo aumentó el porcentaje de nudos latentes, y vegetativos, que fue significativamente mayor en la madera basal. Por ello, la diferencia en la intensidad de floración entre las ramas O+V+P y V+P (ver Figuras 6 y 7) fue por el número de ramas que se indujeron a flor. Así, mientras el 52% de las ramas O+V+P fueron vegetativas, en las ramas V+P solamente lo fueron el 27% (Figura 8B).

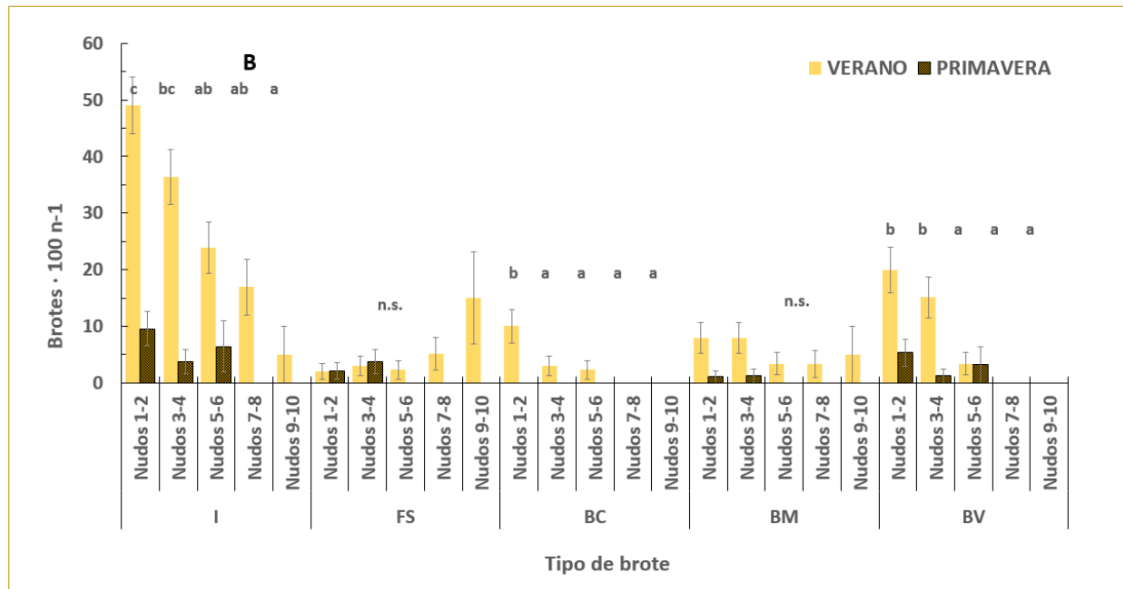
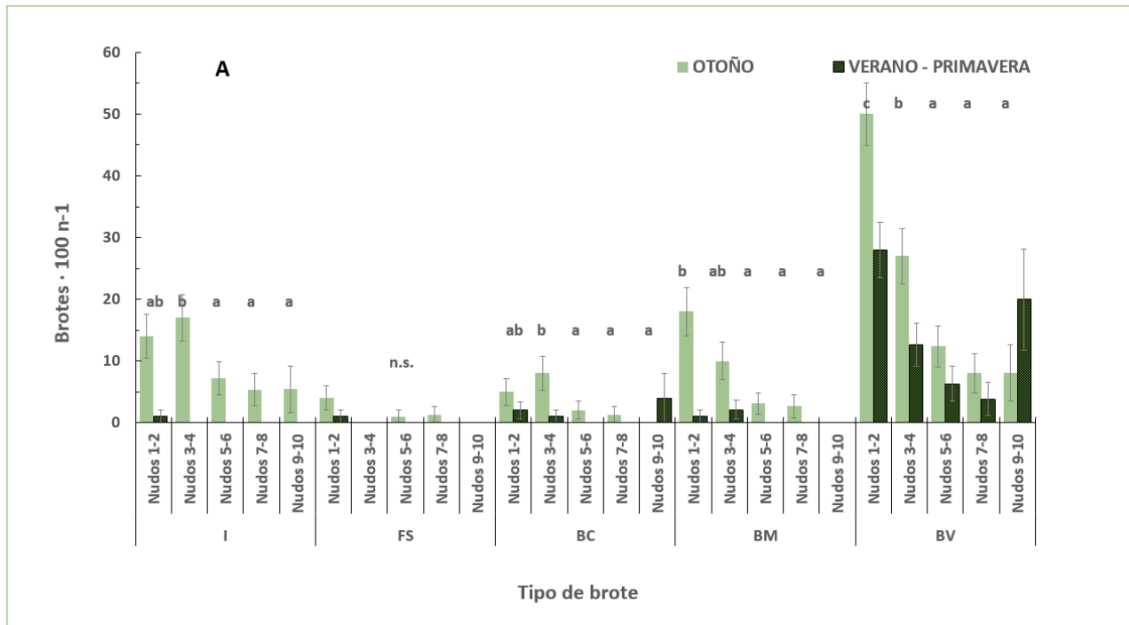
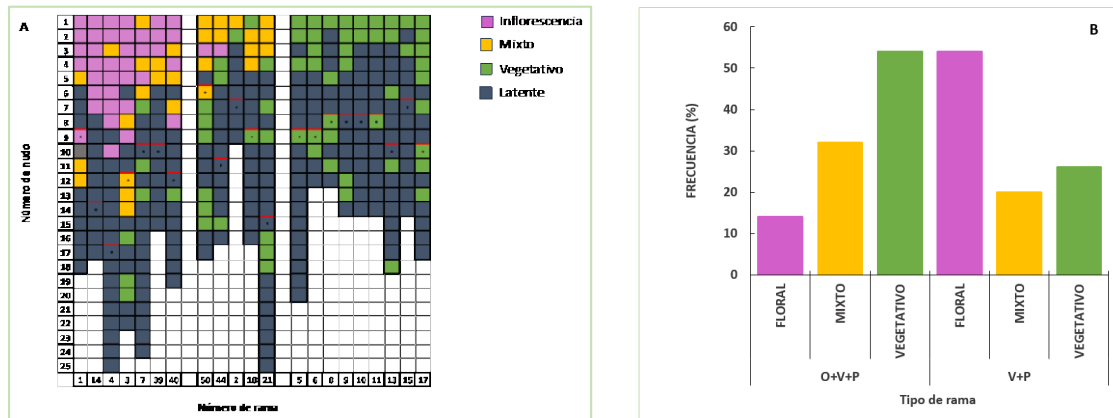


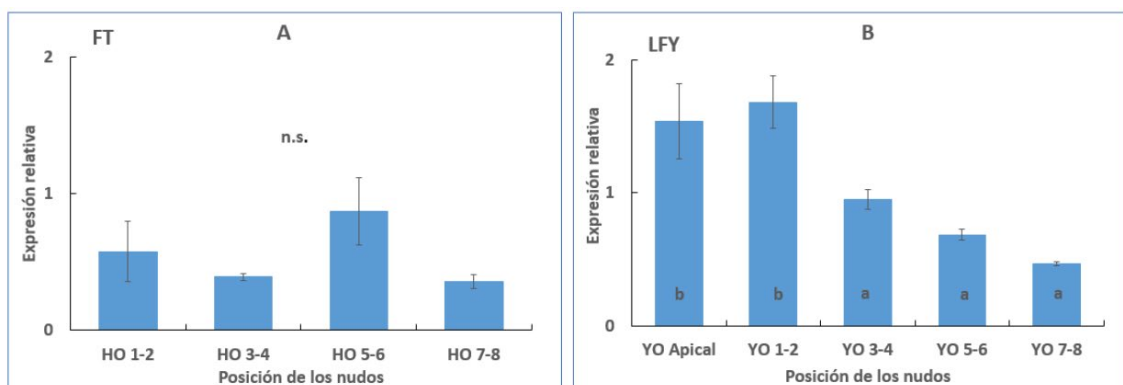
Figura 7. Influencia de la posición del nudo en la rama y la edad de la madera en la distribución de tipos de brote en ramas con madera de otoño, verano y primavera del año anterior (A) y ramas con madera de verano y primavera (B). (I: inflorescencia sin hojas; FS: flor solitaria; BC: brote campanero; BM: brote mixto; BV: brote vegetativo). Cada valor es la media de 50 ramas de la madera de otoño del naranjo dulce Lanelate. Las barras verticales muestran el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre nudos para cada tipo de brote de la madera joven ($P < 0.05$).



2. Expresión de los genes *FT* y *LFY*

Con el fin de determinar si las diferencias en la formación de las flores se deben a factores relacionados con la inducción floral o con la diferenciación floral se estudió la expresión de los genes *FT* y *LFY* en la madera de otoño de las ramas O+V+P. La expresión en las hojas del gen responsable de la inducción floral (*FT*) indica que todas las hojas, independientemente de la posición de los nudos, reciben la señal inductora (Figura 9A).

En cambio, la expresión del gen *LFY*, que regula la diferenciación floral, fue significativamente mayor en los nudos más apicales y disminuyó progresivamente con la posición del nudo en la rama (Figura 9B), lo que correlaciona significativamente con la intensidad de floración ($r = 0.98$; P -valor = 0.004) y, particularmente, con el mayor número de inflorescencias ($r = 0.97$; P -valor = 0.006), brotes campaneros ($r = 0.96$; P -valor = 0.008) y, algo menos, brotes mixtos ($r = 0.86$; P -valor = 0.06) (Figuras 8 y 9).



3. Síntesis, transporte y concentración de auxinas

La elevada influencia de la posición del nudo en el brote en la expresión de *LFY* y la floración sugiere un papel determinante de la dominancia apical en el proceso de diferenciación. Por ello, se estudió el metabolismo de las auxinas en las yemas, entrenudos y hojas de la madera de otoño de la rama tipo O+V+P.

La expresión relativa del gen implicado en el transporte de auxinas (*PIN1*) fue significativamente mayor en las yemas de los nudos con posición apical (nudos 1-2) y, disminuyó progresivamente a medida que las yemas se localizaban en una posición más basal, llegando a una reducción del 70% en las yemas de los nudos 7-8 (Figura 10A). Sin embargo, la relación entre la expresión del gen *YUCCA*, implicado en la síntesis de auxinas, y de la posición de los nudos no fue tan clara, porque la yema apical y los nudos 1-6 mostraron una expresión relativa similar. Solamente en las yemas de los nudos basales (7-8) la expresión de *YUCCA* se redujo significativamente (Figura 10B). La concentración de auxinas (*AIA*) en las yemas correlacionó significativamente con la expresión del gen de transporte (*PIN1*), de modo que la concentración fue mayor en las yemas de los nudos apicales (26,11 ng g⁻¹) y disminuyó progresivamente a medida que la posición de la yema era más próxima a la base (Figura 10C). En las yemas de la madera apical de verano, cuya floración fue mayor (Figura 7), la concentración de AIA fue significativamente menor (13,2 ng g⁻¹), y también se observó una reducción a medida que la posición de la yema era más próxima a la base (Figura 10D).

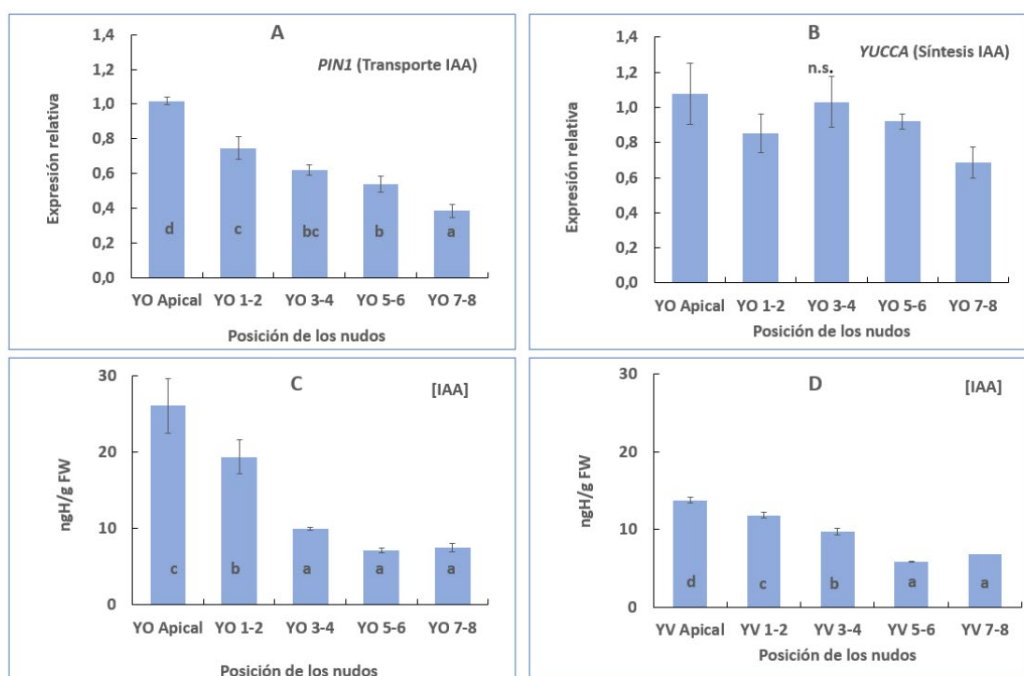


Figura 10. Influencia de la posición del nudo en la rama sobre la expresión de los genes *PIN1* (A) y *YUCCA* (B) y la concentración de AIA en las yemas de la madera apical de otoño (C) y la madera apical de verano (D) de la variedad Lanelate. Mediación realizada en el momento previo a la brotación (enero). Cada valor es la media de 3 réplicas biológicas. Las barras verticales indican el error estándar. Letras diferentes indican la significación estadística ($p < 0.05$).

Es de gran interés destacar que la concentración de auxina en el floema de los entrenudos de la madera de otoño mostró una respuesta inversa a la de las yemas (Figuras 10C y 11A), de modo que las mayores concentraciones de AIA se cuantificaron en las posiciones más basales. Entre los nudos 1-2 la concentración fue de $9,3 \text{ ng/g}^{-1}$ mientras que entre los nudos 7-8 fue de $14,7 \text{ ng/g}^{-1}$ (Figura 11A). En los entrenudos de la zona basal de la rama de verano no se observó el aumento de la concentración de AIA (Figura 11B).

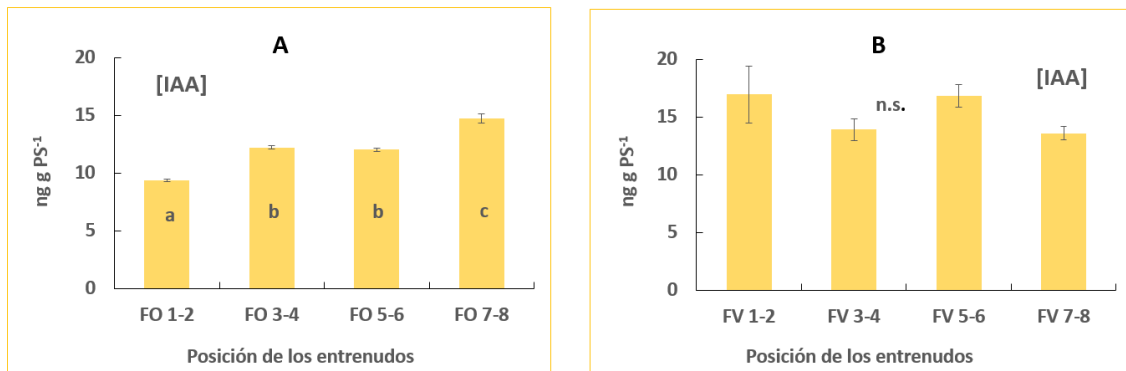


Figura 11. Concentración de AIA en el floema de los entrenudos de madera apical de otoño y verano, (A y B) respectivamente, según la posición de los nudos del naranjo dulce 'Lanelate'. Mediación realizada en el momento previo a la brotación (enero). Cada valor es la media de tres réplicas biológicas. Las barras verticales muestran el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

4. Concentración de Cks y GAs en yemas y floema

La concentración de CKs (isopentil adenina: iP) en yemas (Figura 12E) fue alta en los nudos apicales, hasta el nudo 2, y significativamente menor en los nudos basales (nudos 3 a 8). El contenido en el floema de los entrenudos fue similar al de las yemas (Figura 13). En cuanto a las GAs no se observó una relación clara entre la posición de la yema o el entrenudo y la concentración de las hormonas precursoras, GA₉ y GA₁₉, y las GAs activas GA₄ y GA₁ (Figuras 12 y 13).

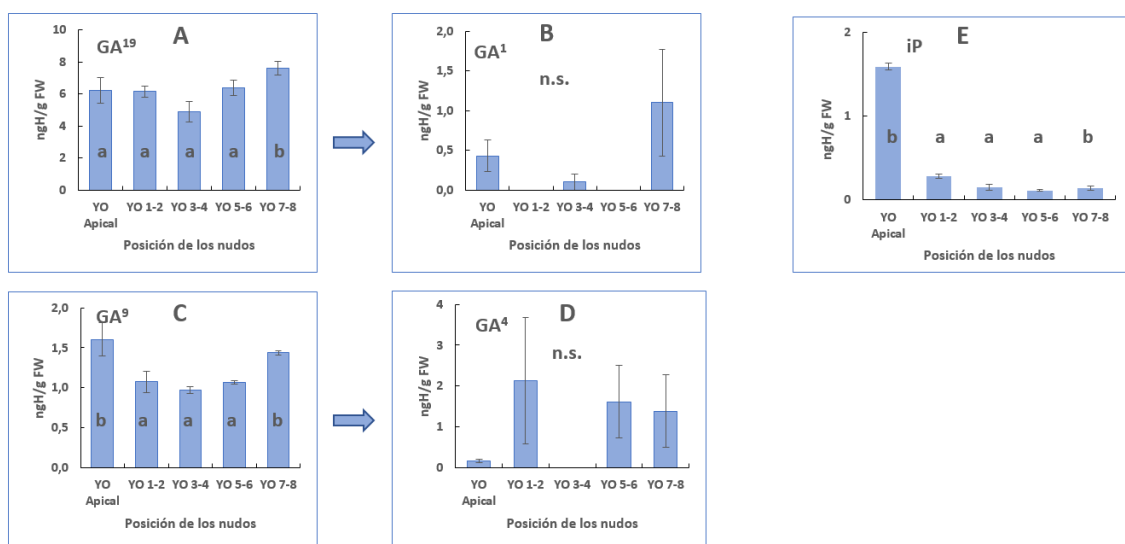


Figura 12. Concentración de GA's y CK's en las yemas según la posición de los nudos de ramas de otoño del naranjo dulce 'Lanelate'. Mediación realizada en el momento previo a la brotación (enero). Cada valor es la media de tres réplicas biológicas. Las barras verticales muestran el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

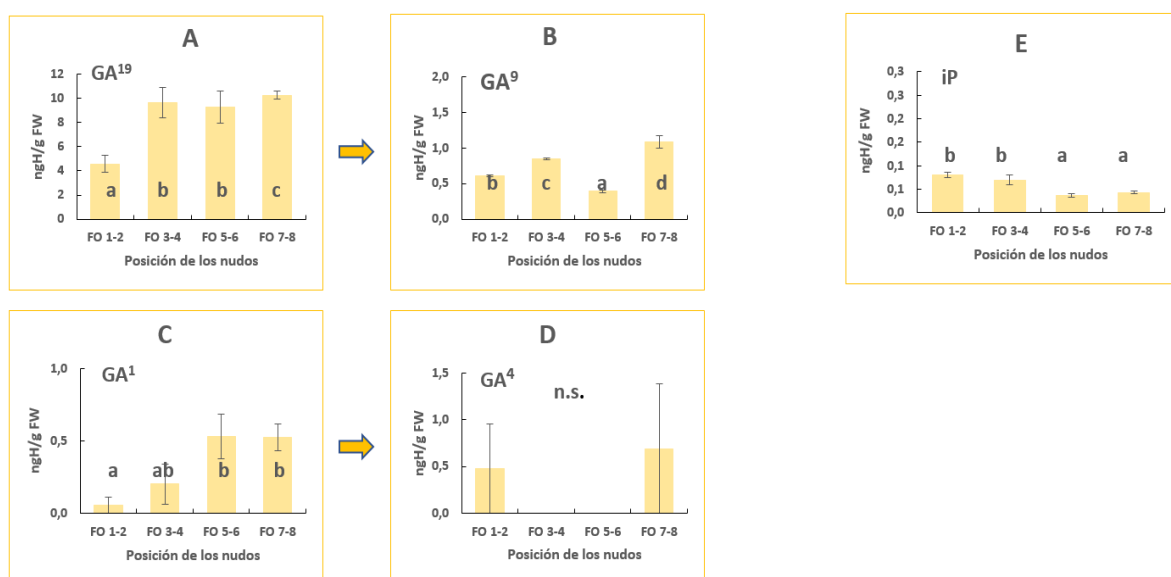


Figura 13. Concentración de GA's y CK's en el floema del entrenudo según su posición en ramas de otoño del naranjo dulce 'Lanelate'. Mediación realizada en el momento previo a la brotación (enero). Cada valor es la media de tres réplicas biológicas. Las barras verticales muestran el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

V. DISCUSIÓN

Mientras en las plantas anuales todos los meristemos se inducen a flor tras el estímulo ambiental adecuado, en las plantas policárpicas, sean perennes o caducifolias, un gran número de meristemos apicales y axilares se mantienen en estado vegetativo, y, o no brotan, o producen brotes vegetativos (Albani & Coupland, 2010). Para explicar este comportamiento, Bangerth (2006; 2009) propuso que las plantas policárpicas tienen un modelo de inducción floral fundamentado en el transporte de señales a larga distancia (*long distance signals; LDS*), en el que los promotores endógenos, a pesar de su activación por un potente estímulo externo (*p.e.* la baja temperatura en el caso de los cítricos), no son capaces de transformar todos los meristemos vegetativos en reproductivos. Este mecanismo de inhibición de la floración difiere entre especies, en cuanto al momento y al órgano (yema, hoja, etc.) se refiere, pero Bangerth propuso que el transporte polar de AIA puede ser la ‘LDS’ que interfiera en la floración de las plantas leñosas, con independencia de la especie. Esta hipótesis requiere confirmación.

En el caso de los cítricos, la hipótesis resulta especialmente apropiada, en particular para el momento de la **diferenciación floral**, porque ésta es coincidente con la brotación. Un factor determinante de la brotación y floración de los cítricos es la edad de las yemas, de modo que las más jóvenes y apicales brotan con mayor intensidad (Guardiola et al., 1982), y los árboles florecen principalmente en la parte externa de la copa. Los resultados de este TFM lo corroboran, tanto para las ramas O+V+P como para las ramas V+P. En ambos casos, la madera más joven **dentro de cada tipo de rama** brotó y floreció más, y cuanto más próximo al ápice está el nudo mayor es la brotación y la floración (**Figuras 6 y 7**). Por ello, la hipótesis del transporte polar de AIA de Bangerth, basada en el fenómeno de la dominancia apical, resulta tan apropiada. Así, la capacidad de la yema para transportar AIA (*PINI*) (**Figura 10A**) correlacionó con la intensidad de brotación de los nudos (**Figura 7**), como describen Mason et al. (2014) y Beveridge et al. (2023) en el guisante. Pero como en los cítricos la diferenciación floral es coincidente con la brotación, también se detectó correlación entre *PINI* y la capacidad del nudo para diferenciarse a flor (a través de la expresión de *LFY*; **Figura 9B**). La alta concentración de AIA en el floema de los entrenudos basales, procedente de las yemas apicales, reduce la expresión de *PINI* en las yemas basales, y las incapacita para liberarse del AIA, lo que inhibe el proceso de brotación, como explica Beveridge et al (2023), y, en el caso de los cítricos, también inhibe la floración (**Figura 7**).

Como todas las hojas, con independencia de la posición del nudo, han producido la señal de inducción (expresión de *FT*) por igual (**Figura 9A**), pero sus yemas no han sido capaces de producir por igual la señal de diferenciación (*LFY*), los resultados sugieren que, en los cítricos, el transporte polar de AIA procedente de las yemas apicales inhibe la **diferenciación floral** de las yemas situadas en posición basal, a pesar de que todas hayan recibido la señal de inducción desde la hoja.

Pero ¿podría valer la hipótesis de Bangerth para explicar también la inhibición de la **inducción floral** en los cítricos? En este TFM no hay suficientes resultados como para explicarlo. Sin embargo, es posible sugerir que la hipótesis de Bangerth podría ser cierta en base a lo siguiente. Al comparar la brotación y floración **entre las ramas O+V+P** y las ramas V+P no se cumplió el dogma de que la madera más joven brota y florece con mayor intensidad. Al contrario, la brotación y floración fue mayor en la madera apical de verano (8 meses de edad en el momento de la floración) que en la madera apical de otoño (5 meses de edad en el momento de la floración) (**Figuras 6 y 7**). La aplicación de auxinas de síntesis reduce significativamente la intensidad de la floración (Guardiola et al., 1977; García-Luís et al., 1986) y la expresión del gen *FT* y *LFY* en naranjos, mandarinos y limoneros (datos sin publicar), y los resultados de este TFM indican que hay una mayor concentración de AIA en los brotes de la rama O+V+P (que florecen menos) que en los brotes de la rama V+P (que florecen más) (**Figura 10 C y D**). Por tanto, aunque de manera preliminar, los resultados también sugieren una relación inversa entre las auxinas y la inducción floral de los cítricos. Una posible explicación de ello sería que, en aquellos brotes en crecimiento que llegaran al momento de la inducción floral (noviembre) con hojas todavía en estado juvenil, su mayor producción hormonal (auxinas) impediría la expresión de *FT* (Reig et al., 2017), y sus yemas serían, por tanto, vegetativas. Aunque la madera de otoño mostró mayor proporción de ramas vegetativas que la madera de verano (Figura 8B), apoyando la hipótesis, se requieren nuevos experimentos para demostrarla.

VI. CONCLUSIONES

1. El transporte polar de auxinas procedente de las yemas apicales inhibe la expresión de *LFY* y la diferenciación floral en las yemas basales.
2. La expresión del gen *FT* en las hojas no depende del transporte polar de auxinas.
3. La brotación y floración fue mayor en la madera apical de verano (8 meses de edad en el momento de la floración) que en la madera apical de otoño (5 meses de edad en el momento de la floración).

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, M., Bañón, A., & Sánchez, J** (2008). “Auxinas”, en **Azcón-Bieto, J., & Talón, M.,** (2008), *Fundamentos de fisiología vegetal*. Editorial Mc Graw Hill. Madrid, España, 377-398.
- Agustí, M.** (1980). *Biología y control de la floración en el género Citrus*. Tesis doctoral. València: Universitat Politècnica de València.
- Agustí, M.** (2010). *Fruticultura*. Ed. Mundi-Prensa. 2a Ed. Madrid. 507 pp.
- Agustí, M., y Primo-Millo, E.** (2020). “Flowering and fruit set,” in *The Genus Citrus*. eds. M. Talón, M. Caruso and F. G. Gmitter (Cambridge, UK: Woodhead Publishing), 219–244.
- Agustí, M., Mesejo, C., y Reig, C.** (2020). *Citricultura*. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, Spain, 488.
- Albani, M., Coupland, G.** (2010). Comparative Analysis of Flowering in Annual and Perennial Plants. *Current topics in developmental biology*, 91, 323-348.
- Albrigo, L.G. & Saucó, 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.
- 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. *Sci. Hortic.* 122, 153–163.
- Bäurle et al.,** (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.
- Busch, M., Bomblies, K. & Weigel, D.** (1999). Activation of a floral homeotic gene in *Arabidopsis*. *Science*, 285(5427), 585-587.
- Cao, D., Chabikwa, T., Barbier, F., Dun, E. A., Fichtner, F., Dong, L., Kerr, S. C., Beveridge, C. A.** (2023). Auxin-independent effects of apical dominance induce changes in phytohormones correlated with bud outgrowth. *Plant Physiology*, 192(2), 1420–1434.
- Corbesier, I., 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.
- García-Luis, A., Almela, V., Monerri, C., Agustí, M., y Guardiola, J. L.** (1986). Inhibition of flowering “in vivo” by existing fruits and applied growth regulators in *Citrus unshiu*. *Physiol. Plant.* 66, 515–520.
- García-Luis, A., Santamarina, P., and Guardiola, J. L.** (1989). Flower formation from *Citrus unshiu* buds cultured in vitro. *Ann. Bot.* 64, 515–519.
- García-Luis, A., Fornes, F., & Guardiola, J. L.** (1995). Leaf carbohydrates and flower formation in citrus. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. American Society for Horticultural Science, 120(2), 222–227.

- Guardiola, J. L., Agustí, M., y García-Marí, F.** (1977). Gibberellic acid and flower bud development in sweet orange. *Proc. Int. Soc. Citricult.* 2, 696–699.
- Guardiola, j.l., Monerri, c. & Agusti, m.** (1982). The inhibitory effect of gibberellic acid on flowering in Citrus. *Physiologia Plantarum*, 55(2), 136-142.
- Haim, D., Shalom, I., Simhon, Y., Ahlizerman, L., Kamara, I., Morozov, M., et al.** (2021). Alternate bearing in fruit trees: fruit presence induces polar auxin transport in citrus and olive stem and represses AIA release from the bud. *J. Exp. Bot.* 72, 2450–2462.
- Hussain, S. B., Guo, L.-X., Shi, C.-Y., Khan, M. A., Bai, Y.-X., Du, W., & Liu, Y.-Z.** (2020). Assessment of sugar and sugar accumulation-related gene expression profiles reveal new insight into the formation of low sugar accumulation trait in a sweet orange (*Citrus sinensis*) bud mutant. *Molecular Biology Reports*, 47(4), 2781–2791.
- 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).
- 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 of the United States of America*, 111(16), 6092–6097.
- 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.
- 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 temperature in Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.). *Journal of Experimental Botany*, 58(14), 3915-3927.
- Ng, M. & Yanofsky, M. F.** (2001). Activation of the Arabidopsis B class homeotic genes by APETALA1. *The Plant Cell*, 13(4), 739-753.
- Reig, C., Gil-Muñoz, F., Vera-Sirera, F., García-Lorca, A., Martínez-Fuentes, A., Mesejo, C., ... & Agustí, M.** (2017). Bud sprouting and floral induction and expression of FT in loquat [*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.]. *Planta*, 246, 915-925.
- Roldán, M., & Zapater, J. M. M.** (2008). Floración y su control ambiental. In *Fundamentos de fisiología vegetal* (pp. 499-517). McGraw-Hill Interamericana de España.
- Ruan, Y.-L.** (2014). Sucrose metabolism: gateway to diverse carbon use and sugar signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 65(1), 33–67.
- 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.
- Urbina, V.** (2002). La fructificación de los frutales. Paperkite Editorial. España.
- Vanneste, S., & Friml, J.** (2009). Auxin: a trigger for change in plant development. *Cell*, 136(6), 1005-1016.

Wagner, D., Sablowski, R.W.M. & Meyerowitz, E.M. (1999). Transcriptional activation of APETALA1 by LEAFY. *Science*, 285(5427), 582-584.

Citricultura valenciana. (s/f), Visto el 27 de Abril de 2023
(<http://gipcitricos.ivia.es/citricultura-valenciana>)

FAO. (2000). Faostat: FAO Statistical Databases. Food & Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Visto el 2 de Mayo de 2023
([https://www.fao.org/faostat/es/#rankings/countries by commodity](https://www.fao.org/faostat/es/#rankings/countries_by_commodity))

Frutas y hortalizas. (s/f), Visto el 28 de Abril de 2023
([https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/frutas-y-hortalizas/informacion general.aspx](https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/frutas-y-hortalizas/informacion_general.aspx))