



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

Caracterización molecular del mecanismo abscisor de la
auxina de síntesis 3,5,6-TPA en los frutos cítricos. (La
utilización del 3,5,6-TPA en jardinería)

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Ingeniería Agronómica

AUTOR/A: Aznar Mena, Raúl Juan

Tutor/a: Agustí Fonfría, Manuel

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA Y
DEL MEDIO NATURAL



CARACTERIZACION MOLECULAR DEL MECANISMO ABSCISOR DE LA AUXINA DE SINTESIS 3,5,6-TPA EN LOS FRUTOS CITRICOS (LA UTILIZACION DEL 3,5,6-TPA EN JARDINERIA)

TRABAJO FIN DE MÁSTER

MÁSTER UNIVERSITARIO EN INGENIERÍA AGRONÓMICA

Alumno: Aznar Mena, Raúl Juan
Tutor: Agustí Fonfría, Manuel

Curso académico: 2023-2024

VALENCIA, febrero de 2024

Título: Caracterización molecular del mecanismo abscisor de la auxina de síntesis 3,5,6-TPA en los frutos cítricos. (La utilización del 3,5,6-TPA en jardinería).

Resumen

En los cítricos, la auxina de síntesis 3,5,6-tricloro-2-piridiloxiacético (3,5,6-TPA) aplicada en pulverización al árbol completo durante la caída fisiológica de frutos, provoca una caída adicional de éstos y reduce el número de los que se desarrollan hasta la recolección.

El aclareo de frutos en los cítricos apenas se utiliza, pero puede llegar a ser de gran interés en algunos casos concretos como, por ejemplo, en los cítricos ornamentales. Así, el naranjo amargo (*Citrus aurantium L.*), cultivado mayoritariamente en jardines y calles de grandes ciudades, representa un problema grave en el momento de la recolección, y la reducción del número de frutos podría mejorar su manejo reduciendo los costes de su conservación y cuidados.

Este efecto aclarante del 3,5,6-TPA ha sido estudiado bajo el punto de vista nutricional, hormonal y agronómico, pero no genético, es decir, los conocimientos actuales no poseen, todavía, un fundamento molecular que ayude a comprender su acción y la secuencia de eventos endógenos.

Este estudio aborda el efecto aclarante de esta auxina bajo un punto de vista agronómico, estudiando su utilidad para reducir los costes de recolección en los cítricos cultivados en jardinería, y fisiológico, estudiando el mecanismo molecular que rige el proceso.

Palabras clave: Auxina de síntesis; aclareo de frutos; carbohidratos; etileno; naranjo amargo.

Alumno: Raúl Juan Aznar Mena

Tutor: Manuel Agustí Fonfría

Valencia, febrero de 2024

Molecular mechanisms underlying 3,5,6-TPA-induced fruitlet abscission in citrus. (The use of 3,5,6-TPA in gardening)

Abstract

In citrus, the synthetic auxin 3,5,6-trichloro-2-pyridyloxyacetic acid (3,5,6-TPA), applied to the entire tree as a foliar spray during the physiological fruitlet abscission, causes an additional fruitlet drop and reduces the number of fruits that reach maturity.

Fruit thinning is hardly used in citrus, but it can be of great interest in some cases such as, for example, in ornamental citrus trees. Thus, sour orange trees (*Citrus aurantium* L.), grown mostly in gardens and streets of cities, represent a serious problem at harvesting, and reducing the number of fruits could improve its management by reducing costs and care.

This thinning effect of 3,5,6-TPA has been studied from a nutritional, hormonal and agronomic point of view, but not genetically, that is, current knowledge does not yet have a molecular basis that helps understand its action and the sequence of endogenous events.

This work studies the thinning effect of this auxin from an agronomic point of view, regarding its usefulness to reduce harvesting costs in garden citrus trees, and a physiological point of view, studying the molecular mechanism that regulates the process.

Key words: Synthesis auxin; carbohydrates; fruit thinning; ethylene, sour orange.

Dedicatorias y agradecimientos

Gracias a Amparo y Carlos por vuestra profesionalidad y ayuda.

Muchas gracias a mi tutor, D. Manuel Agustí por su dedicación, por su tutela, por su profesionalidad, por sus consejos, por sus charlas, por su paciencia y humanidad.

Dedicado a mi familia y amigos y muy especialmente a mis hijas Carmen y Lucía, por “darme vida”.

A mi esposa, Amparo, gracias por su paciencia y comprensión.

A todos, GRACIAS, por ayudarme a cumplir un sueño.

ÍNDICE

1.	Introducción	1
2.	Objetivo	8
3.	Material y métodos	9
	Material vegetal y tratamientos.....	9
	Análisis de expresión génica	10
	Análisis de etileno	13
	Análisis estadístico de los resultados.....	13
4.	Resultados	14
	El efecto abscisor de la auxina de síntesis 3,5,6-TPA.....	14
	Caracterización molecular del mecanismo abscisor.....	15
	Acción del 3,5,6-TPA sobre el metabolismo de la auxina en el fruto tratado.....	19
	La utilización del efecto abscisor del 3,5,6-TPA en los cítricos cultivados en jardinería.....	20
5.	Discusión.....	23
6.	Conclusiones.....	27
7.	Bibliografía.....	28

Índice de Figuras

Figura 1. Síntesis de sacarosa (Sac) y carga en el floema desde las hojas fuente. Tomado de Ruan (2014). Las abreviaturas más relevantes para este trabajo pueden consultarse en el texto.. 5

Figura 2. Descarga, transporte y metabolismo de sacarosa (Suc) en tejidos sumideros. Tomado de Ruan (2014). Las abreviaturas más relevantes para este trabajo pueden consultarse en el texto.. 6

Figura 3. Efecto de la aplicación de 15 mg l^{-1} de 3,5,6-TPA sobre la abscisión de frutos de brotes campaneros de n. dulce 'Navelina' a los que se trató sólo el fruto, sólo las hojas y sin tratar (control) (A), y producción de etileno en los frutos (B). Valores correspondientes a los 25 días después del tratamiento. Cada valor es la media de 10 brotes (A) y de 3 repeticiones biológicas y 3 determinaciones analíticas (B). Las barras verticales indican el ES. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$).. 14

Figura 4. Contenido en clorofilas, medido en unidades SPAD, de hojas de árboles de naranjo dulce 'Navelina' y 'Valencia' tratados con 15 mg l^{-1} de 3,5,6-TPA durante la caída fisiológica de frutos. Valores correspondientes a los 15 días de efectuado el tratamiento. Las barras verticales indican el ES. En ambos casos la diferencia es estadísticamente significativa ($P < 0.05$)..... 15

Figura 5. Efecto de la aplicación de 3,5,6-TPA a árboles de n. dulce 'Navelina' sobre la expresión de la subunidad pequeña de la Rubisco. Las barras verticales indican el ES. *indica diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$). Cada valor es la media de 3 repeticiones biológicas y 3 técnicas de cada una de ellas. ddt: días después del tratamiento. En algún caso el ES es más pequeño que el símbolo..... 15

Figura 6. . Influencia de la aplicación de 15 mg l^{-1} de 3,5,6-TPA a árboles de n. d. 'Navelina' durante la caída fisiológica de frutos sobre la evolución de la expresión de los genes SUCROSE SYNTHASE (SUS1 y SUS4). Las barras verticales indican el ES. *indica diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$). Cada valor es la media de 3 repeticiones biológicas y 3 técnicas de cada una de ellas. ddt: días después del tratamiento. En algún caso el ES es más pequeño que el símbolo 16

Figura 7. Influencia de la aplicación de 15 mg l^{-1} de 3,5,6-TPA a árboles de n. d. 'Navelina' durante la caída fisiológica de frutos sobre la evolución de la expresión de los genes SUCROSE TRANSPORTER (SUT1, SUT2, SUT3 Y SUT4). Las barras verticales indican el ES. *indica diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$). Cada valor es la media de 3 repeticiones biológicas y 3 técnicas de cada una de ellas. ddt: días después del tratamiento. En algún caso el ES es más pequeño que el símbolo..... 17

Figura 8. Influencia de la aplicación de 15 mg l⁻¹ de 3,5,6-TPA a árboles de n. d. ‘Navelina’ durante la caída fisiológica de frutos sobre la evolución de la expresión de los genes CELL WAL INVERTASE (CWIN) y SUCROSE SYNTHSE 1 (SUS1). Las barras verticales indican el ES. *indica diferencia estadísticamente significativa (P<0.05). Cada valor es la media de 3 repeticiones biológicas y 3 técnicas de cada una de ellas. ddt: días después del tratamiento. En algún caso el ES es más pequeño que el símbolo. 18

Figura 9. Influencia de la aplicación de 15 mg l⁻¹ de 3,5,6-TPA a árboles de n. d. ‘Navelina’ durante la caída fisiológica de frutos sobre la evolución de la expresión de la ciclina CYCA1.1. Las barras verticales indican el ES. *indica diferencia estadísticamente significativa (P<0.05). Cada valor es la media de 3 repeticiones biológicas y 3 técnicas de cada una de ellas. ddt: días después del tratamiento. 18

Figura 10. Influencia de la aplicación de 15 mg l⁻¹ de 3,5,6-TPA sobre la tasa de crecimiento del fruto de brotes campaneros de mandarina Satsuma a los que se trató sólo el fruto, sólo las hojas y sin tratar. Las barras verticales indican el ES. Letras diferentes para una misma fecha indica diferencia estadísticamente significativa (P<0.05). Cada valor es la media de 10 frutos. ddt: días después del tratamiento. 19

Figura 11. Influencia de la aplicación de 15 mg l⁻¹ de 3,5,6-TPA sobre la expresión de los genes de la biosíntesis de auxina, TRN2, y su transporte desde el fruto, PIN1. Las barras verticales indican el ES. *indica diferencia estadísticamente significativa (P<0.05). Cada valor es la media de 3 repeticiones biológicas y 3 técnicas de cada una de ellas. ddt: días después del tratamiento 20

Figura 12. Efecto de la fecha de aplicación de 15 mg l⁻¹ de 3,5,6-TPA sobre la producción final (A) y la abscisión de frutos (B) de naranjo amargo en dos zonas ajardinadas separadas entre sí 850 m..... 21

Figura 13. Tiempo de recolección, coste por árbol y ahorro en las labores de recolección por efecto de la aplicación de 15 mg l⁻¹ de 3,5,6-TPA en el naranjo amargo cultivado en jardines públicos. Valores correspondientes a la localización de Tenerías. Cada valor es la media de árboles. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa (P<0.05)..... 22

Índice de Tablas

Tabla 1. Resultados de concentración y calidad del ARN 11

Tabla 2. Lista de cebadores utilizados en el estudio. Número de adhesión del NCBI (Centro Nacional de Información Biotecnológica, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 12

1. Introducción

Las auxinas de síntesis son sustancias obtenidas industrialmente que, aplicadas a las plantas, promueven efectos similares a la auxina (ácido indol-3-acético; AIA).

En los cítricos la aplicación localizada de los ácidos indolbutírico (IBA) y naftalenacético (ANA) promueven el enraizamiento (Morsink y Smith, 1974), el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) aplicado en pulverización al árbol completo reduce la incidencia de *splitting* (Almela *et al.*, 1994), evita la caída del fruto maduro de las naranjas (Reece y Horanic, 1952; Hield *et al.*, 1964) y reduce la floración (Guardiola *et al.*, 1977), los ácidos 2,4-diclorofenoxipropiónico (2,4-DP), y 3,5,6-tricloro-2-piridiloxiacético (3,5,6-TPA), aplicados también en pulverización, aumentan el tamaño final del fruto, y otras auxinas de síntesis son utilizadas con otros objetivos de menor importancia (El-Otmani *et al.*, 2000).

Este último efecto se logra provocando la caída de frutos que inician su desarrollo o promoviendo su crecimiento celular, lo que depende, críticamente, del momento de su aplicación. La reducción del número de frutos se denomina *aclareo* de frutos, que en los cítricos ha de ser muy intensa para que repercuta en su tamaño final (Zaragoza *et al.*, 1992). El aumento del tamaño final promoviendo el crecimiento celular es una técnica de alta eficacia y recibe el nombre de *engorde* (El-Otmani *et al.*, 1993). Para lograr el primer objetivo los tratamientos deben realizarse en plena caída fisiológica de frutos (Agustí *et al.*, 1995); para lograr el segundo debe llevarse a cabo una vez superada ésta y cuando el fruto inicia su fase lineal de engrosamiento (Agustí *et al.*, 1994; Agustí *et al.*, 1995).

Las condiciones atmosféricas en el momento del tratamiento, tanto las propias del día (nubosidad, lluvia, viento, ...) como las de la hora de ejecución (temperatura, luminosidad, y HR), determinan, también, la respuesta (Jing *et al.*, 2023). De este modo, cuando las condiciones climáticas favorecen la rápida evaporación del agua de la solución aplicada, la concentración de ésta aumenta paulatinamente. Así, la respuesta a las aplicaciones durante las horas centrales de un día soleado suele ser más intensas que las llevadas a cabo a primeras horas de un día nuboso, y en condiciones de elevada temperatura pueden llegar a ser fitotóxicas. Por otro lado, algunas auxinas de síntesis aumentan la sensibilidad de las plantas a la luz, modificando, de este modo, su eficacia (Shinkle y Briggs, 1985). Todos estos factores quedan, parcial o totalmente, integrados en las recomendaciones de la concentración a aplicar y de las técnicas de aplicación.

El aclareo de frutos en los cítricos no es la técnica más adecuada para aumentar su tamaño final, salvo que se elimine, aproximadamente, el 60% de los frutos (Zaragoza *et al.*, 1992). En estos casos, la auxina de síntesis más eficaz es el 3,5,6-TPA, que se aplica a una concentración óptima de 15 mg l⁻¹ y puede llegar a provocar la caída de hasta el 80% de los frutos que inician el

desarrollo (Agustí *et al.*, 1995), lo que conlleva una reducción, indeseable, de la cosecha. La razón por la que hay que eliminar un porcentaje tan elevado de frutos es porque la función que correlaciona ambas variables es potencial, de modo que sólo cuando el número de frutos es inferior a un determinado umbral, distinto según la variedad, la pendiente de la curva es muy elevada y pequeñas variaciones en el número de frutos provocan diferencias significativas en su tamaño; por el contrario, por encima de dicho umbral, es decir, para un número elevado de frutos, la pendiente es muy baja y su tamaño apenas disminuye, aunque aumente o disminuya el número de frutos (Agustí *et al.*, 2020).

Esta relación, número de frutos por árbol *vs* tamaño de los mismos, se atribuye a la competencia entre los órganos reproductivos que se establece desde la floración hasta el final del desarrollo de los frutos (Agustí *et al.*, 1982). Consecuentemente, cuanto mayor es el número de estos órganos más fuerte es la competencia entre ellos por fotoasimilados; la restricción del suministro de nutrientes al fruto, como consecuencia de dicha competencia, limita las posibilidades de desarrollo del mismo y, por tanto, su tamaño final. No obstante, el aclareo de frutos se utiliza, en algunos casos, finalizando su caída fisiológica, para eliminar los más pequeños, lo que, aunque sean pocos en número, contribuye a mejorar el aspecto de la cosecha y a reducir el porcentaje de destrío.

Sin embargo, eligiendo adecuadamente la auxina, la concentración y el estado fenológico del fruto en el momento de la aplicación puede lograrse la abscisión (*aclareo*) de un número elevado de frutos recién cuajados y, en estas condiciones, el *aclareo* de frutos puede llegar a ser de gran interés en algunos casos concretos como, por ejemplo, en los cítricos ornamentales. En efecto, el naranjo amargo (*Citrus aurantium* L.), cultivado mayoritariamente en jardines y calles de grandes ciudades, representa un problema grave de manejo, particularmente en el momento de la recolección. Ésta, en dichas condiciones, es dificultosa porque la mayor parte de los árboles se encuentran aislados en jardines y glorietas, por una parte, y en largas filas a lo largo de las aceras de las calles, por otra. Todo ello conlleva graves inconvenientes, ya que la recolección no puede ser inmediata ni rápida y su retraso se traduce en caída de frutos que llenan aceras y viales, frutos que se pudren, manchan las calles y producen malos olores, etc., y, al mismo tiempo, supone un número muy elevado de horas de trabajo que encarece notablemente su mantenimiento. La eliminación de un número elevado de frutos, pues, mejoraría la integración en las ciudades de estos árboles ornamentales, facilitaría, en gran medida, su manejo, y podría reducir los costes de su conservación y cuidados.

No obstante, el fin de estos árboles es la ornamentación de las ciudades y, por tanto, se requiere de floraciones abundantes que cumplan con este fin. Pero el naranjo amargo es una especie autocompatible y, por tanto, la capacidad de cuajado de sus flores es muy elevada, de modo que

ambas circunstancias, floración elevada y autocompatibilidad, aseguran un elevado número de frutos, lo que conlleva el problema antes citado.

Esta técnica, además, asegura la presencia continuada de flores con los años. En efecto, el fruto es el principal factor inhibidor de la floración, lo que, en algunas especies tendentes a la alternancia de cosechas, como es el naranjo amargo, provoca la ausencia de flores el año siguiente a una producción de frutos elevada (Muñoz-Fambuena *et al.*, 2011). Con el aclareo de frutos se reduce el número de puntos represores de la floración y, en consecuencia, la planta, aunque menos que después de un año de escasa cosecha, puede florecer adecuadamente, al menos bajo un punto de vista ornamental, y producir frutos en cuantía suficiente para cumplir con este papel. La opción más recomendable, por tanto, para cumplir con todos los objetivos deseables en jardinería, es la eliminación de gran cantidad de frutitos recién cuajados tras la floración.

El efecto aclarante de las auxinas de síntesis ha sido estudiado en profundidad. Se conoce su acción bajo el punto de vista nutricional (Mauk *et al.*, 1986; Agustí *et al.*, 2007; Mesejo *et al.*, 2012), hormonal (Iwahori y Oohata, 1976; Hirose, 1981; Okuda e Hirabayashi, 1998; Agustí *et al.*, 2007; Mesejo *et al.*, 2012) y agronómico (Agustí *et al.*, 1995), pero no genético, es decir, los conocimientos actuales, si bien están eficientemente demostrados, no poseen, todavía, un fundamento molecular que ayude a comprender su acción y la secuencia de eventos endógenos.

Actualmente, el proceso aceptado implica un efecto fitotóxico de las auxinas sobre las hojas que afecta a la funcionalidad de las clorofilas y al transporte electrónico del PSII (Φ PSII), lo que reduce la síntesis de carbohidratos y su transporte al fruto, éste pierde la tasa de crecimiento, promueve la síntesis de etileno, y el fruto cae (Agustí *et al.*, 2007; Mesejo *et al.*, 2012). Algunos de estos aspectos, como es la síntesis de carbohidratos y la producción de etileno alteradas por las auxinas de síntesis, están bien demostrados en relación con la abscisión (Iwahori y Oohata, 1976; Hirose, 1981; Shiraiishi, 1981; Blanusa *et al.*, 2005; Agustí *et al.*, 2007; Mesejo *et al.*, 2012), pero la descarga de sacarosa en el floema, su transporte, descarga al fruto e hidrólisis, y su efecto sobre la división celular no han sido demostrados.

La síntesis de azúcares se inicia con la acepción de CO_2 para la síntesis de triosas. La ribulosa 1,5-difosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco) cataliza su fijación a la ribulosa 1,5 difosfato en el cloroplasto formando un azúcar intermediario de 6C que, inmediatamente, rinde 2 moléculas de ácido 3-fosfoglicérico. La energía de la luz captada por las clorofilas se utiliza para generar un gradiente de protones que sirve para generar ATP a partir de ADP y Pi (fosfato inorgánico). Pero dicha energía también se utiliza para escindir el H_2O y generar poder reductor, NADPH, a partir de NADP⁺. El ATP y el NADPH generados se utilizan para la síntesis gliceraldehído 3-fosfato, o triosa-fosfato, a partir del ác. 3-fosfoglicérico, del CO_2 fijado y del H_2O , reacción que no precisa de luz y se incluye en la denominada fase oscura de la fotosíntesis (ciclo de Calvin). La Rubisco

se activa mediante la enzima Rubisco activasa (RCA), que se considera un efector de la actividad de Rubisco (Borland *et al.* 2011). La transcripción de los genes *Rca* se expresa y continúa durante todo el día, activando la capacidad de carboxilación de Rubisco. Por la noche, la transcripción *Rca* se detiene y la enzima activasa se degrada. La RCA está compuesta de varias formas (al menos IV); la forma I Rubisco es un complejo cilíndrico compuesto por ocho subunidades grandes (RbcL) que están cubiertas por cuatro subunidades pequeñas (RbcS) (Tabita *et al.*, 2007; Joshi *et al.*, 2015). La RbcS está directamente relacionada con la fijación fotosintética del C, de modo que se codifica *de novo* en el núcleo y se transporta al cloroplasto para fijar el CO₂ (Berry *et al.*, 2013).

La triosa-fosfato que se sintetiza en el ciclo de Calvin es utilizada en la síntesis de sacarosa y almidón. La sacarosa se sintetiza en el citosol mediante un mecanismo de intercambio de la triosa fosfato con el Pi, originado durante la síntesis de sacarosa en el citosol, a través de un transportador de la membrana interna del cloroplasto, el translocador de fosfato. Una molécula de gliceraldehído 3-P se combina con una de dihidroxiacetona fosfato y origina una molécula de fructosa 1,6-difosfato (reacción reversible), y ésta da lugar a una molécula de fructosa 6-fosfato (reacción irreversible), ésta, a su vez, origina glucosa 6-fosfato, de ella glucosa 1-fosfato, y, finalmente, uridin difosfato de glucosa (UDP Glc); la reacción de ésta con fructosa 6-fosfato origina sacarosa, reacción catalizada por la sacarosa sintasa (*SUS*). La triosa fosfato que no se utiliza en la síntesis de sacarosa se convierte en almidón, y se almacena en el cloroplasto durante el día para ser exportado durante la noche, de modo que éste se convierte en un organelo de reserva capaz de proporcionar C a la planta tanto de día como de noche.

En los cítricos, la sacarosa (Suc, del Inglés *sucrose*) es el producto final de la fotosíntesis para el transporte de azúcares desde la fuente (hoja) a los sumideros heterótrofos (fruto, en nuestro estudio) a través del complejo células cribosas/células acompañantes (SE/CC) del floema. La carga de Suc en el floema, desde la fuente, y su descarga en el sumidero, generan un efecto osmótico que se traduce en una diferencia de presión de turgencia que impulsa el flujo masivo de agua, transportando fotoasimilados, otros nutrientes y moléculas de señalización desde la fuente hasta el sumidero (Figuras 1 y 2). En las células, la Suc es la fuente clave de carbono para el crecimiento, el desarrollo y la defensa. Su metabolismo produce hexosas (Hex) necesarias para generar energía y sintetizar celulosa, almidón, fructanos, proteínas y compuestos antioxidantes.

En la Fig. 1 (Ruan, 2014) se muestra la síntesis de sacarosa y su carga en el floema. Las hojas fotosintéticas (la fuente) utilizan energía solar para fijar CO₂ y producir triosa-fosfato (triosa-P) en el cloroplasto. La triosa-P se exporta al citoplasma o se convierte en adenosin difosfato de glucosa (ADP-Glc) para la síntesis de almidón en el propio cloroplasto; por la noche, como se ha dicho, el almidón se hidroliza en Glc o maltosa y es exportado al citoplasma. La fosforilación de

la Glc por acción de la hexoquinasa genera Glc-6-fosfato (Glc-6-P), que se puede convertir en fructosa-6-fosfato (Fru-6-P) mediante la Glc-6-P isomerasa. La sacarosa-fosfato sintasa (SPS) utiliza Fru-6-P y UDP Glc como sustratos para producir sacarosa-fosfato (Suc-P), que, más tarde, se convierte en Suc mediante la sacarosa-fosfato fosfatasa (SPP). La carga de Suc en el floema se lleva a cabo ya sea apoplásmica o simplásticamente. En el primer caso, el eflujo al apoplasto y la absorción desde éste por el floema (SE/CC) se lleva a cabo por los respectivos transportadores de azúcar; en el segundo, se produce un transporte a través de los plasmodesmos (PD) que conectan la célula con el SE/CC. La acumulación de Suc en el floema atrae el agua osmóticamente, creando una alta presión de turgencia que impulsa el flujo masivo de asimilados hacia los sumideros (frutos). Paralelamente a la síntesis de Suc, también se puede sintetizar una pequeña cantidad de trealosa 6-P (T6P) que, eventualmente, puede rendir dos moléculas de Glc.

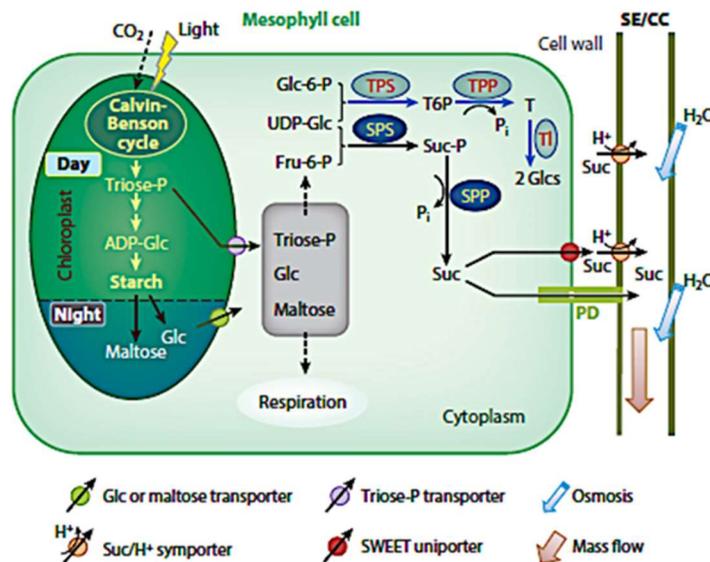


Fig. 1. Síntesis de sacarosa (Sac) y carga en el floema desde las hojas fuente. Tomado de Ruan (2014). Las abreviaturas más relevantes para este trabajo pueden consultarse en el texto

En el genoma de los cítricos se han identificado 6 genes de la familia de *SUCROSE SYNTHASE* (*SUS*), síntesis de sacarosa, de los cuales *SUS1* y *SUSA* se expresan durante el cuajado y desarrollo inicial del fruto, y cuatro *SUCROSE TRANSPORTER* (*SUT1*, *SUT2*, *SUT3*, *SUT4*) implicados en su transporte.

Una vez el fluido floemático alcanza el sumidero, la Suc se descarga, también, apoplásmica o simplásticamente (Ruan, 2014; Fig. 2). En el primer caso, la Suc puede ser hidrolizada por la invertasa de la pared celular (*CWIN*) en Glc y Fru antes de ser absorbida por el citoplasma de las células del órgano sumidero. Esta Glc apoplásmica es detectada por un receptor acoplado a una

proteína (RGS) para la señalización. La Suc importada simplásticamente, a través de plasmodesmos (PD) o absorbida por transportadores específicos, es degradada por la invertasa citoplasmática (CIN) y la Suc sintasa (Sus), o por las vacuolas para su hidrólisis mediante la invertasa vacuolar (VIN). Las actividades de *CWIN* y *VIN* están limitadas por sus respectivos inhibidores (INH). Las hexosas intracelulares (Hex) se utiliza para la glucólisis y la síntesis de polímeros de azúcar como almidón, celulosa y fructano. Los niveles o flujos de Hex también pueden ser detectados por la hexoquinasa localizada en el núcleo (HXK) u otras proteínas para regular la expresión genética. Además, Hex y Suc pueden modular directamente la transcripción de genes que contienen elementos sensibles al azúcar, incluso aquellos que codifican factores de transcripción. El gen *CWIN* se ha identificado en los cítricos (Hussain *et al.*, 2020).

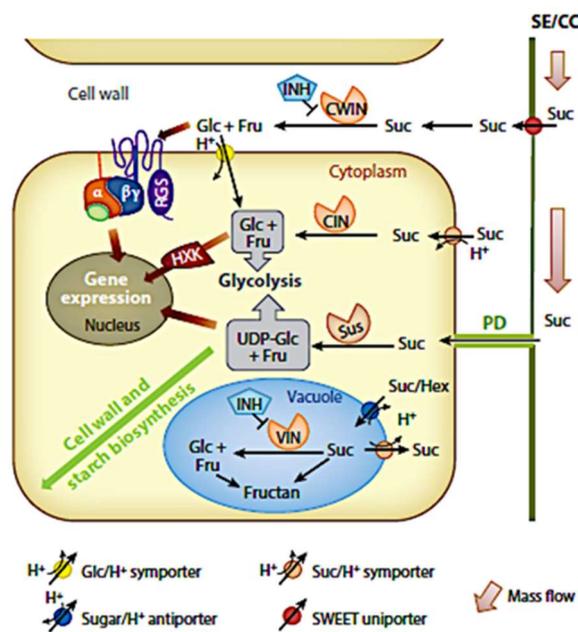


Fig. 2. Descarga, transporte y metabolismo de sacarosa (Suc) en tejidos sumideros. Tomado de Ruan (2014). Las abreviaturas más relevantes para este trabajo pueden consultarse en el texto

El aporte de azúcares al fruto es, por tanto, un factor decisivo en el desarrollo de éste, de modo que cuando es restringido, bien por factores ambientales o endógenos, como una competencia muy elevada entre los que inician el crecimiento, reduce su tasa de crecimiento y abscinde. En estos casos, el rayado de ramas se ha mostrado eficaz para reducir la abscisión y su acción se ha demostrado a través de un incremento en la expresión del gen *PIN-FORMED1* (*PINI*) que regula el eflujo de AIA desde el fruto; ello protege la capa de abscisión (ZA-C), mantiene los haces vasculares funcionales, los azúcares pueden llegar al fruto y éste no cae, como lo demuestra el aumento de la expresión de la ciclina *CcCYCA1-1* que controla la transición de la fase G2 a la mitosis en el ciclo celular (Mesejo *et al.*, 2022). Esta ciclina se expresa preferentemente durante

la caída fisiológica de los frutos, es decir, al tiempo que el fruto inicia su crecimiento, mientras que la de tipo B *CcCYCB2* lo hace durante el cuajado de la flor, es decir, durante las primeras divisiones de las células del ovario.

La síntesis de AIA en el fruto regula, por tanto, su desarrollo. Esta hormona se sintetiza en la mayor parte de órganos en crecimiento como, meristemos vegetativos, hojas jóvenes, cambium, frutos, semillas, etc., y una de sus vías de síntesis parte del triptófano como precursor. Pero existen otras rutas independientes de este aminoácido, como la regulada por el gen *TORNADO (TRN2)*. El papel de esta fitohormona en el crecimiento del fruto ha sido ampliamente estudiado desde tiempos lejanos (Gustafson, 1939); investigaciones recientes han comenzado a dilucidar los mecanismos moleculares mediante los cuales se producen y transportan las auxinas en el fruto y a entender la complejidad de su señalización durante el desarrollo del fruto (Patisson *et al.*, 2014). En los cítricos, se ha demostrado la interacción entre el ácido abscísico y la señalización de auxinas y se han identificado los genes clave implicados en la acumulación de sacarosa (Feng *et al.*, 2021).

2. Objetivo

El objetivo de este estudio es valorar el efecto abscisor de la auxina 3,5,6-TPA en el naranjo amargo utilizado en jardinería y abordar, bajo el punto de vista molecular, su acción sobre el aparato fotosintético, la fotosíntesis, el transporte de azúcares al fruto, su metabolismo, y su efecto sobre la división celular como factores determinantes de su acción aclarante de frutos.

3. Material y métodos

Material vegetal y tratamientos.

El experimento se llevó a cabo en árboles adultos, de 18 años de edad, de naranjo amargo (*Citrus aurantium* L.) cultivados en dos jardines, Tenerías y Auditorio, de la ciudad de Castellón de la Plana, separados en línea recta 800 m. Se seleccionaron 75 árboles en cada uno de ellos, de aspecto, floración, estado vegetativo similares, y libres de plagas y enfermedades.

El ácido 3,5,6-tricloro-2-piridiloxiacético (3,5,6-TPA), en formulación ácido libre, se aplicó a una concentración de 15 mg l⁻¹, mediante pulverización foliar al árbol completo, utilizando para ello un tanque a presión, con una presión de 40 atm, mojando completamente las hojas y los frutos en crecimiento hasta el goteo. A la solución de la auxina se le añadió un agente tensoactivo no-iónico a la concentración recomendada por el fabricante.

Para determinar la época más adecuada del tratamiento, la auxina se aplicó en plena caída fisiológica de frutos (16 de mayo) y 15 días más tarde (31 de mayo) en 2022. Para determinar la hora más adecuada del tratamiento, y puesto que las características climáticas eran las mismas, el tratamiento se realizó, en ambas fechas, a las 07 a.m. en el parque de Tenerías, y a las 12 a.m. en el del Auditorio.

En cada localización se diseñó un experimento de bloques de 25 árboles por tratamiento y fecha, dejando 25 sin tratar como controles, y 10 árboles guarda entre tratamientos para evitar la posible deriva en el momento del tratamiento.

Desde el día del tratamiento, día 0, y a los días 3, 8 y 20 siguientes se contaron los frutos caídos de 3 de los árboles de cada grupo, elegidos al azar, y se tomaron 10 frutos, también al azar, de cada uno de ellos. Éstos se congelaron con N líquido y se trasladaron al laboratorio para su posterior análisis genético.

En el momento de la maduración se evaluó la cosecha contando el número de frutos por m² de copa de los 3 árboles seleccionados.

En 2023, se llevó a cabo el seguimiento de la expresión génica relacionada con la fotosíntesis y transporte de azúcares realizando un tratamiento con la auxina, a la misma concentración, en árboles adultos de naranjo dulce 'Navelina' [*C. sinensis* L. (Osb.)] en condiciones de cultivo, localizados en el término municipal de Valencia. El tratamiento se llevó a cabo en plena caída fisiológica de frutos y se efectuó a las 12 a.m. A las 24 h del tratamiento y a los 5, 9 y 20 días siguientes se tomaron de 5 árboles, elegidos al azar, 3-5 hojas de un brote campanero elegido, asimismo, al azar. Las hojas se congelaron con N líquido y se llevaron al laboratorio para su posterior análisis.

A los 15 días del tratamiento se determinó el valor SPAD de 25 hojas de brotes campaneros por cada uno de los 5 árboles seleccionados. Esta evaluación también se realizó en 5 árboles de n. dulce ‘Valencia’ situados en la misma parcela y tratados con la misma auxina y en las mismas condiciones con dicho fin.

En esta parcela, y sólo en el n. dulce ‘Navelina’, se realizaron, además, tratamientos localmente a hojas de brotes campaneros y localmente a sus frutos, con la misma auxina, a la misma concentración y a la misma hora. Para ello se eligieron 30 brotes campaneros por árbol, tratando en 10 de ellos las hojas, en 10 los frutos, y se dejaron los 10 restantes sin tratar, como controles. A los 25 días se contaron los brotes que habían perdido los frutos. Adicionalmente, en otros tres árboles se trataron por árbol localmente las hojas de 10 brotes campaneros y se marcaron otros 10 como controles. De éstos se midió, cada 5 días, su diámetro para determinar la tasa de crecimiento, y a los 10 días se recolectaron para evaluar su producción de etileno.

Análisis de expresión génica

Las muestras de hojas y frutos se molieron hasta polvo fino en mortero de N, y se almacenaron a -80°C hasta la extracción de ARN. Para ello, se pesaron 0,5 g de la muestra molida, se depositaron en tubos de 30 ml y se les añadieron 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. La muestra se homogeneizó en vórtex durante 1 min, aproximadamente, se pasó a un baño termostático, a 50°C , durante 20 min, rehomonizándola cada 5 min, se centrifugó a 10.000 rpm durante 20 min, se recogió el sobrenadante, y se pasó a otro tubo.

Al sobrenadante se le añadió 1 volumen de cloroformo alcohol isoamílico (24:1), se homogeneizó y se centrifugó de nuevo, durante 25-30 min a 10.000 rpm. Una vez separadas las diferentes fases, la superior se extrajo y se introdujo en nuevos tubos para volver a centrifugarla a 10.000 rpm durante 15 min. Se recogió el sobrenadante, al que se le añadió la mitad del volumen extraído (1:2) de LiCl 6M y se dejó precipitar a -20°C durante toda la noche.

Al día siguiente, se descongelaron las muestras y se centrifugaron durante 20 min a 11.500 rpm. Se desecharon los restos de LiCl y el precipitado se lavó añadiendo 200 μl de EtOH 70% y se volvió a centrifugar durante 5 min a 11.500 rpm. Se eliminó el EtOH, se dejaron secar al aire los sedimentos, se suspendieron en 100 μl de agua libre de RNases, y se purificaron por columnas, empleando para ello el kit RNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez finalizado el proceso, se cuantificó la calidad y cantidad del mRNA libre obtenido utilizando un equipo NanoDrop ND-100 (NanoDrop Technologies).

En la Tabla 1 se muestran todos los resultados de concentración y calidad de ARN conseguidos:

FECHA MUESTRA	Nº MUESTRA	TIPO MUESTRA	CODIGO	FECHA EXTRACCIO N ARN	260/280	260/230	ng/ul	Vol muestra	Vol H2O
03/05/2023	1	Control	X1A	14-15/09/23	2,14	2,12	467,8	1,1	5,4
	2	Control	X1B	14-15/09/23	2,16	2,23	423,1	1,2	5,3
	3	Control	X1C	14-15/09/23	2,16	2,22	316,5	1,6	4,9
	1	Tratamiento	X2A	14-15/09/23	2,13	2,07	466,5	1,1	5,4
	2	Tratamiento	X2B	14-15/09/23	2,16	2,19	478,9	1,0	5,5
	3	Tratamiento	X2C	14-15/09/23	2,16	2,16	448,8	1,1	5,4
05/05/2023	1	Tratamiento	X3A	19-20/09/23	2,14	2,21	471,4	1,1	5,4
	2	Tratamiento	X3B	19-20/09/23	2,14	2,18	476,3	1,0	5,5
	3	Tratamiento	X3C	19-20/09/23	2,07	2,11	471	1,1	5,4
	1	Control	X4A	19-20/09/23	2,16	2,37	297,4	1,7	4,8
	2	Control	X4B	19-20/09/23	2,16	2,31	221,4	2,3	4,2
	3	Control	X4C	19-20/09/23	2,13	2,13	477,5	1,0	5,5
09/05/2023	1	Control	X5A	25-26/09/23	2,14	2,23	471,3	1,1	5,4
	2	Control	X5B	25-26/09/23	2,12	2,11	451,8	1,1	5,4
	3	Control	X5C	25-26/09/23	2,05	1,93	488,3	1,0	5,5
	1	Tratamiento	X6A	25-26/09/23	2,13	2,17	346,2	1,4	5,1
	2	Tratamiento	X6B	25-26/09/23	2,12	2,1	179,1	2,8	3,7
	3	Tratamiento	X6C	25-26/09/23	2,12	1,99	305,1	1,6	4,9
15/05/2023	1	Control	X9A	25-26/09/23	2,1	2,07	181,9	2,7	3,8
	2	Control	X9B	25-26/09/23	2,12	2,04	325,5	1,5	5,0
	3	Control	X9C	25-26/09/23	2,13	2,11	193,1	2,6	3,9
	1	Tratamiento	X0A	25-26/09/23	2,13	2,07	178,9	2,8	3,7
	2	Tratamiento	X0B	25-26/09/23	2,13	2,13	215,3	2,3	4,2
	3	Tratamiento	X0C	25-26/09/23	2,09	1,99	322,3	1,6	4,9

Tabla 1: Resultados de concentración y calidad del ARN

En la Tabla 2 se muestran los genes seleccionados para analizar su expresión génica con sus correspondientes *cebadores*.

Nombre del gen	Número de adhesión o referencia	Descripción	Orientación del cebador	Secuencia (5'-3')
Actina	Ciclev10025866m	Gen de referencia	F	CCGACCGTATGAGCAAGGA AA
			R	TTCCTGTGGACAATGGATGG A
Licopeno	MJ136 MJ137	Gen de referencia	F	GCTCTAGCCTTGTAGGAAAG CCATGG
			R	GCGAATTCGCTGTGCACCTT AATCTGTAT
CIN	Ciclev10003220m	Invertasa citosólica	F	TGAAGCACGATGGGAGGAA C
			R	GACTGGCCAAGAACCTCCAT
CYCA1-1	Ciclev10003984m	Ciclina	F	CCAGTTTTGTGCAACCATTG
			R	TGGACCCTCTCCATGAAGTC
CWIN	Ciclev10025259m	Invertasa de pared celular	F	ACCATTTCCAGCTCCCAAG
			R	GTTGCCCCATACTGCTCCTT
PIN	Cs2g16620.1	Componente portador de flujo de auxinas 1	F	CTCTCTTGCAGTCCCCTTG
			R	CCCTTTTGCTCAACTTGCTC
RbACT	Ciclev10013735m	Rubisco Activase	F	CTTTGGTGCCGAGCTCAGTA
			R	AAATCCTCTGCTGGCTGACC
RbcS	Ciclev10012893m	Ribulosa bifosfato carboxilasa de cadena pequeña	F	CACCAACTGGCTTGAAGAAG
			R	CACCCATCCTTTCTCCAAC
SUC S1	AB022092	Sacarosa sintasa 1	F	TGAGCCATTCAATGCCTCGT
			R	TGGATGCATGCTCTCCTTGT C
SUC SA	AB021745	Sacarosa sintasa 3	F	TTGTGGACTTCCGACATTG
			R	TGACGCACCATGCTCGATAA
SUT1	Cs3g22560	Transportador de sacarosa	F	TCTTTACTTAGCGGACCCTTT G
			R	GTTCCGGCTTCAGTTATCGG
SUT2	Cs7g04100	Transportador de sacarosa	F	TCAGACCGAAGCAGTGTAGC
			R	CAAGGCCTGTAATAGGGCCA
SUT3	Cs3g16640	Transportador de sacarosa	F	CGTTTATTGTCTGCGGTGCC
			R	GGCCGAAAATCGCCTCTATC
SUT4	Cs3g16640	Transportador de sacarosa	F	ACGTGCAAGAGCTCGGAATT
			R	GGCCACAGAGCCAGATGAT AC
TRN2	Ciclev10032401m	Proteína tetraspanina	F	ACTCTACCTCGTTGCCATGC
			R	AGCTCTACTGGGTGGAAGGT

Table 2. Lista de cebadores utilizados en el estudio. Número de adhesión del NCBI (Centro Nacional de Información Biotecnológica, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Análisis de etileno

La producción de etileno se determinó de los 10 frutos de los brotes campaneros con las hojas tratadas al efecto con 15 mg l⁻¹ de 3,5,6-TPA y de brotes control. El análisis se llevó a cabo 10 días después del tratamiento. Los frutos se desprendieron del árbol manualmente, tirando de ellos, se pesaron y se incubaron las tres réplicas biológicas de frutos, correspondientes a cada árbol, en frascos de 200 ml, realizando, a su vez, tres réplicas analíticas. Después de 2 h de incubación a 20°C, se extrajo una muestra de aire de 1 ml del espacio superior del frasco con una jeringa hipodérmica y se inyectó en un cromatógrafo de gases Finnigan Trace GC Ultra (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, MA, EE. UU.) equipado con un detector de ionización de llama y una columna de alúmina. Los resultados se expresan en nl de etileno producido por g de peso fresco y hora.

Análisis estadístico de los resultados

A los resultados se les aplicó el análisis de la varianza (ANOVA), utilizando el test de Newman-Keuls para la separación de las medias. A los valores porcentuales se les aplicó la transformación \sqrt{p} para normalizar la muestra. Los datos experimentales se analizaron con el software Startgraphics Centurion XVI (Gráficos estadísticos, Englewood Cliffs, NJ, EE. UU).

4. Resultados

El efecto abscisor de la auxina de síntesis 3,5,6-TPA.

El efecto abscisor de la auxina de síntesis 3,5,6-TPA está mediado por la hoja. Así, en nuestro experimento, su aplicación individual a las hojas de brotes campaneros de n. dulce ‘Navelina’ provocó que casi el 50% de éstos perdieran su fruto, mientras que cuando sólo se aplicó al fruto el porcentaje de los que abscindieron apenas superó el 13% y no difirió estadísticamente de los controles sin tratar (18%) (Fig. 3 A). La caída de frutos estuvo acompañada de una producción de etileno que fue un 53% superior en los frutos situados en los brotes a los que se les trataron sólo las hojas respecto de los situados en brotes sin tratar (Fig. 3 B).

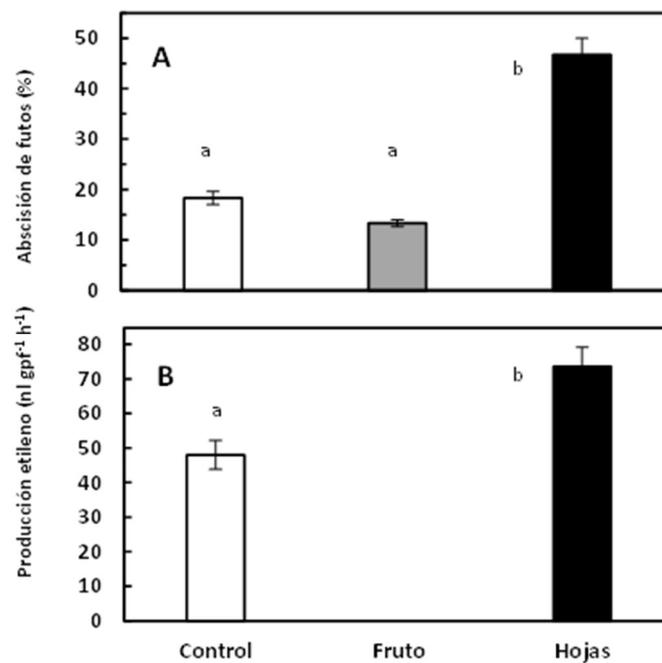


Fig. 3. Efecto de la aplicación de 15 mg l⁻¹ de 3,5,6-TPA sobre la abscisión de frutos de brotes campaneros de n. dulce ‘Navelina’ a los que se trató sólo el fruto, sólo las hojas y sin tratar (control) (A), y producción de etileno en los frutos (B). Valores de abscisión correspondientes a los 25 días después del tratamiento, y de etileno a los 10 días. Cada valor es la media de 10 brotes (A) y de 3 repeticiones biológicas y 3 determinaciones analíticas (B). Las barras verticales indican el ES. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa (P<0.05).

Es más, las hojas tratadas vieron reducido su contenido en clorofilas, medido en unidades SPAD. Quince días después del tratamiento, las hojas de árboles de n. dulce ‘Navelina’ y ‘Valencia’ tenían valores SPAD un 10% y un 15% inferiores, respectivamente, al de las hojas de los árboles control (Fig. 4).

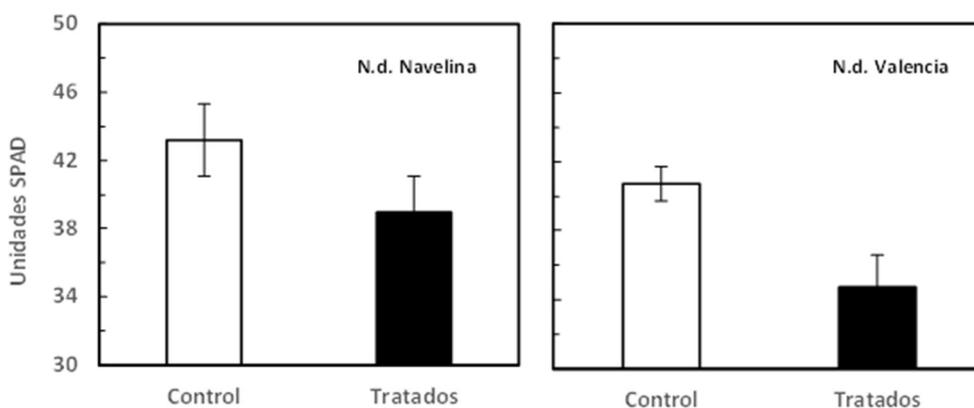


Fig. 4. Contenido en clorofilas, medido en unidades SPAD, de hojas de árboles de naranjo dulce ‘Navelina’ y ‘Valencia’ tratados con 15 mg l^{-1} de 3,5,6-TPA durante la caída fisiológica de frutos. Valores correspondientes a los 15 días de efectuado el tratamiento. Cada valor es la media de 5 árboles y 25 hojas de brotes campaneros por árbol. Las barras verticales indican el ES. En ambos casos la diferencia es estadísticamente significativa ($P < 0.05$).

Caracterización molecular del mecanismo abscisor.

El efecto de la auxina de síntesis 3,5,6-TPA sobre el contenido en clorofila de las hojas se ve acompañado de una reducción de la actividad de la subunidad pequeña de la Rubisco. En efecto, 5 días después del tratamiento la expresión del gen *RbcS*, que codifica su síntesis, fue reprimida por la auxina, alcanzando la máxima diferencia 4 días después (9 ddt), y aunque el efecto se fue perdiendo con el tiempo, permaneció hasta, al menos, 15 ddt (Fig. 5), coincidiendo con la mayor diferencia en la tasa de crecimiento del fruto con respecto a los control sin tratar.

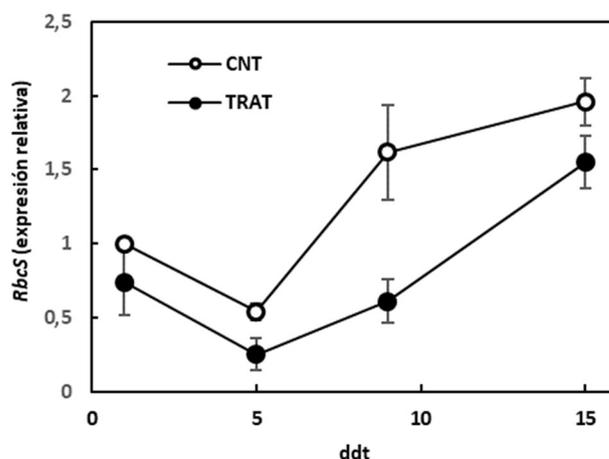


Fig. 5. Efecto de la aplicación de 3,5,6-TPA a árboles de n. dulce ‘Navelina’ sobre la expresión de la subunidad pequeña de la Rubisco. Las barras verticales indican el ES. *indica diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$). Cada valor es la media de 3 repeticiones biológicas y 3 técnicas de cada una de ellas. ddt: días después del tratamiento. En algún caso el ES es más pequeño que el símbolo.

Paralelamente a ello, y en coherencia con una menor fijación de CO₂ a su aceptor en la hoja, ribulosa 1,5 bifosfato, la síntesis de azúcares se reduce. Este efecto es particularmente importante en la síntesis de sacarosa, por ser éste el azúcar de transporte más importante en los cítricos. Así, la disponibilidad del enzima sacarosa sintasa se ve marcadamente reducida, como lo demuestra la menor expresión de los genes *SUS1* y *SUSA* por acción del 3,5,6-TPA (Fig. 6).

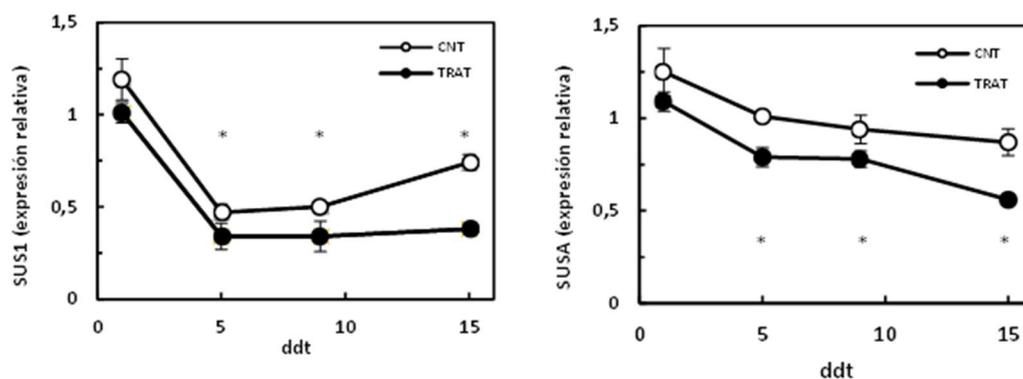


Fig. 6. Influencia de la aplicación de 15 mg l⁻¹ de 3,5,6-TPA a árboles de n. d. 'Navelina' durante la caída fisiológica de frutos sobre la evolución de la expresión de los genes SUCROSE SYNTHASE (*SUS1* y *SUSA*). Las barras verticales indican el ES. *indica diferencia estadísticamente significativa (P<0.05). Cada valor es la media de 3 repeticiones biológicas y 3 técnicas de cada una de ellas. ddt: días después del tratamiento. En algún caso el ES es más pequeño que el símbolo.

Cinco días después del tratamiento las hojas de los árboles tratados ya mostraban una expresión significativamente inferior a las de los árboles sin tratar, y 10 días más tarde (15 ddt) el efecto persistía.

Ante la reducción de sustrato a transportar, la síntesis de transportadores de sacarosa (*SUT*) también se reduce, si bien no todos ellos son igualmente afectados. Así la expresión de los genes SUCROSE TRANSPORTER *SUT1* y *SUT2* apenas es alterada por la acción del 3,5,6-TPA y se mantiene en niveles constitutivos, mientras que *SUT3* y *SUT4* ven reducida su expresión constante y significativamente a lo largo de los 15 días siguientes al tratamiento (Fig. 7).

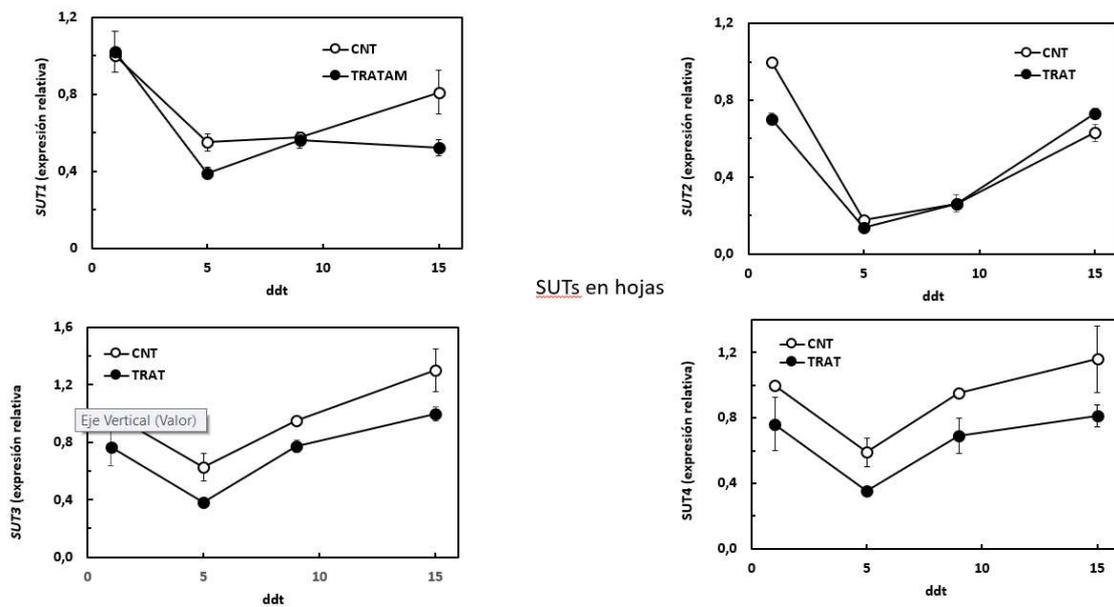


Fig. 7. Influencia de la aplicación de 15 mg l^{-1} de 3,5,6-TPA a árboles de n. d. 'Navelina' durante la caída fisiológica de frutos sobre la evolución de la expresión de los genes SUCROSE TRANSPORTER (SUT1, SUT2, SUT3 Y SUT4). Las barras verticales indican el ES. *indica diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$). Cada valor es la media de 3 repeticiones biológicas y 3 técnicas de cada una de ellas. ddt: días después del tratamiento. En algún caso el ES es más pequeño que el símbolo.

La sacarosa es transportada vía floema desde su fuente de síntesis, la hoja, hasta los sumideros heterótrofos, los frutos, donde es descargada para alcanzar, apoplástica o simplásticamente, sus células y ser metabolizada.

Una vez en el apoplasto, la invertasa de la pared celular puede hidrolizarla a fructosa y glucosa y ser transportada, así, al interior del citoplasma. Esta vía no es inicialmente alterada por la auxina, que solamente reduce la expresión del gen que la codifica, *CWIN*, 20 días después del tratamiento (Fig. 8 A).

La sacarosa que alcanza el citoplasma del sumidero vía simplasto, mediante transportadores específicos o a través de plasmodesmos, es hidrolizada inmediatamente para su consumo por acción de la *SUS1*. Este gen, considerado el responsable más importante de la acumulación de hexosas en las células de los sacos de zumo, es marcadamente alterado por la acción del 3,5,6-TPA, siendo su expresión significativamente más baja en los frutos de los árboles tratados respecto de los de los árboles sin tratar (Fig. 8 B). Su acción ya es detectable a los 3 días de efectuado el tratamiento, siendo máxima a los 9 días y persistente durante, al menos, 20 días

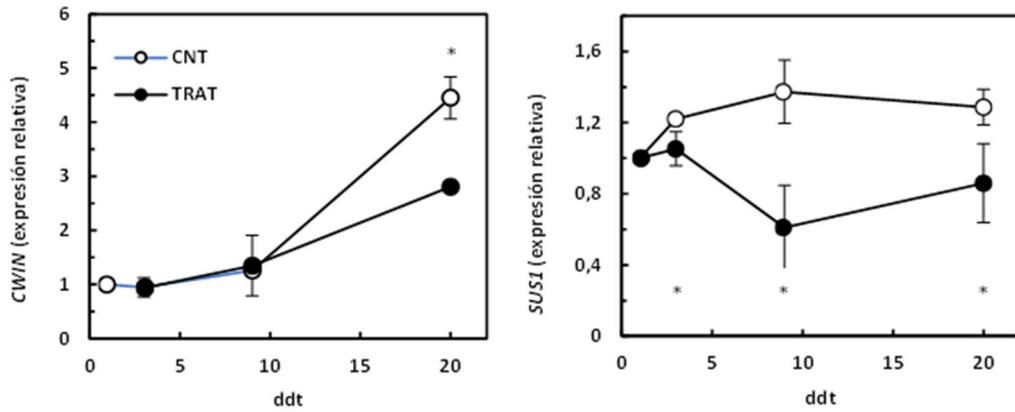


Fig. 8. Influencia de la aplicación de 15 mg l^{-1} de 3,5,6-TPA a árboles de n. d. 'Navelina' durante la caída fisiológica de frutos sobre la evolución de la expresión de los genes CELL WAL INVERTASE (CWIN) y SUCROSE SYNTHSE 1 (SUS1). Las barras verticales indican el ES. *indica diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$). Cada valor es la media de 3 repeticiones biológicas y 3 técnicas de cada una de ellas. ddt: días después del tratamiento. En algún caso el ES es más pequeño que el símbolo.

El resultado de este déficit de hexosas en las células de los frutos de los árboles tratados es una reducción de la división celular, que ya es detectable a las 48 h del tratamiento, y alcanza la significación estadística 3 días después de efectuado (Fig. 9).

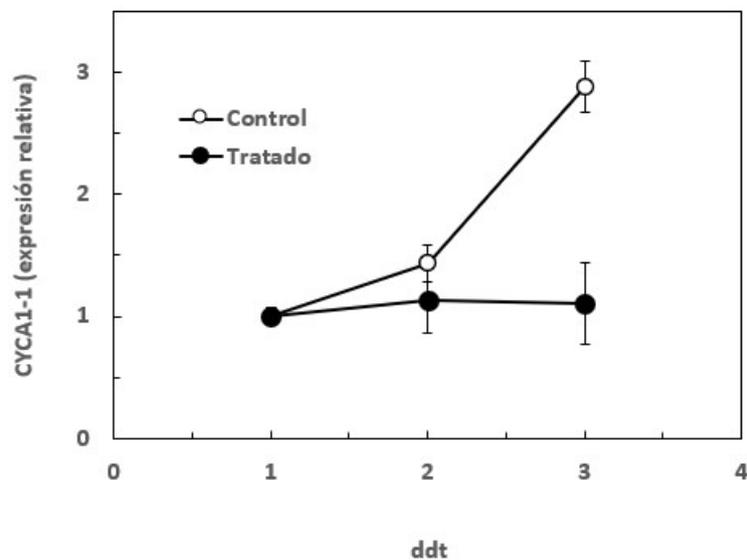


Fig. 9. Influencia de la aplicación de 15 mg l^{-1} de 3,5,6-TPA a árboles de n. d. 'Navelina' durante la caída fisiológica de frutos sobre la evolución de la expresión de la ciclina CYCA1.1. Las barras verticales indican el ES. *indica diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$). Cada valor es la media de 3 repeticiones biológicas y 3 técnicas de cada una de ellas. ddt: días después del tratamiento.

Como consecuencia de ello, la tasa de crecimiento del fruto se reduce. Dado que el efecto de la auxina es, preferentemente, a través de las hojas (ver Figs. 3 y 4), durante los 20 días siguientes al tratamiento los frutos situados en brotes a los que se trataron sólo las hojas crecieron más lentamente que aquellos que se trataron individualmente, dejando las hojas sin tratar, o que no se trataron (control) (Fig. 10). Los frutos tratados individualmente no difirieron estadísticamente de los control hasta los 20 días, cuando su tasa crecimiento fue más baja; en esta fecha, los frutos de los brotes con las hojas tratada y los tratados individualmente tenían la misma tasa de crecimiento (Fig. 10).

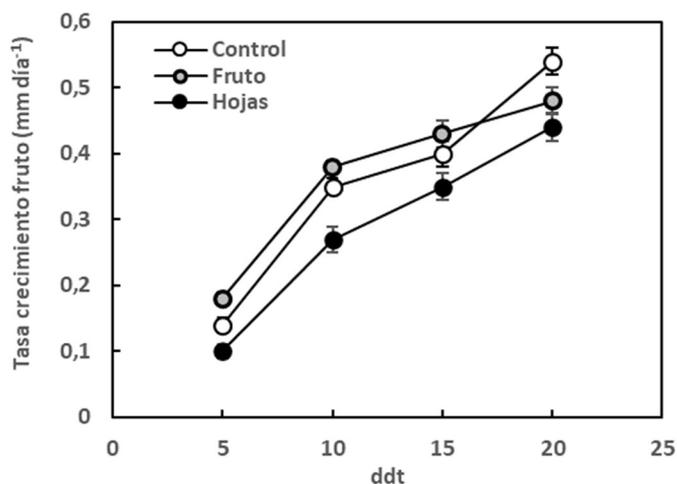


Fig. 10. Influencia de la aplicación de 15 mg l⁻¹ de 3,5,6-TPA sobre la tasa de crecimiento del fruto de brotes campaneros de n. dulce 'Navelina' a los que se trató sólo el fruto, sólo las hojas y sin tratar. Las barras verticales indican el ES. Letras diferentes para una misma fecha indica diferencia estadísticamente significativa (P<0.05). Cada valor es la media de 10 frutos. ddt: días después del tratamiento.

Acción del 3,5,6-TPA sobre el metabolismo de la auxina en el fruto tratado.

La aplicación de 3,5,6-TPA redujo la síntesis de auxina. Ocho días después del tratamiento, la expresión del gen *TORNADO* (*TRN2*) era significativamente más baja en los frutos tratados que en los frutos control (Fig. 11 A).

Además, en la misma fecha, el eflujo de auxina desde el fruto a través del pedúnculo fue, asimismo, reducido por acción del 3,5,6-TPA, como lo demuestra la expresión significativamente más baja del gen *PIN-FORMED 1* (*PINI*), responsable de este proceso (Fig. 11 B).

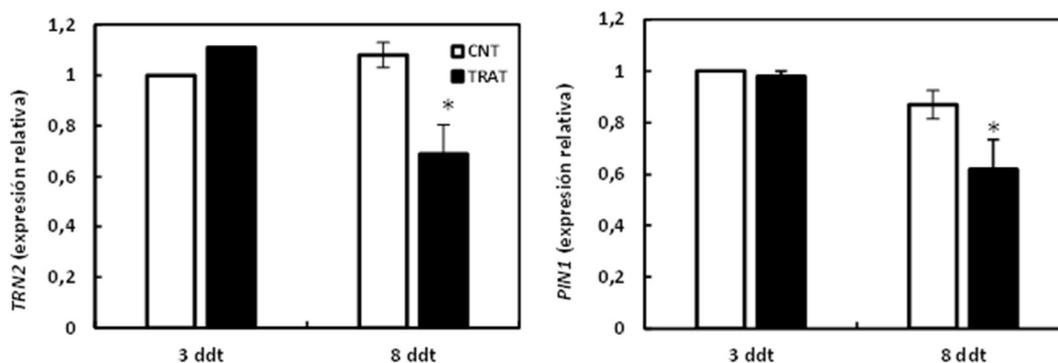


Fig. 11. Influencia de la aplicación de 15 mg l^{-1} de 3,5,6-TPA sobre la expresión de los genes de la biosíntesis de auxina, TRN2, y su transporte desde el fruto, PIN1. Las barras verticales indican el ES. *indica diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$). Cada valor es la media de 3 repeticiones biológicas y 3 técnicas de cada una de ellas. ddt: días después del tratamiento.

La utilización del efecto abscisor del 3,5,6-TPA en los cítricos cultivados en jardinería.

EL 3,5,6-TPA, aplicado a una concentración de 15 mg l^{-1} durante la caída fisiológica de frutos, redujo el número de los que completaron su desarrollo en el naranjo amargo bajo condiciones de cultivo de jardinería. En los árboles de las dos localizaciones en las que se llevó a cabo el experimento, Tenerías y Auditorio, y en el momento de la recolección, el número de frutos por m^2 se redujo de 50 y 49 frutos, respectivamente, en los árboles sin tratar, a 18 y 11 en los tratados en plena caída fisiológica (16 de mayo), y a 28 y 25, respectivamente, cuando se realizó 15 días después (Fig. 12 A). Este efecto es consecuencia de la mayor abscisión de frutos que iniciaban el desarrollo cuando el tratamiento, en ambas localizaciones, se efectuó en la primera fecha respecto de la segunda. Así, 2 días después del tratamiento mientras en los árboles tratados en plena caída fisiológica de frutos la abscisión fue de más de 300 y de 100 frutos por árbol, en Tenerías y Auditorio, respectivamente, en los tratados 15 días más tarde no fue superior a 200 y 60 frutos, respectivamente (Fig. 12 B). Una semana más tarde el número de frutos caídos por árbol fue marcadamente inferior, 55 y 12 frutos por árbol para la primera fecha de tratamiento, y 22 y 5 para la segunda, respectivamente.

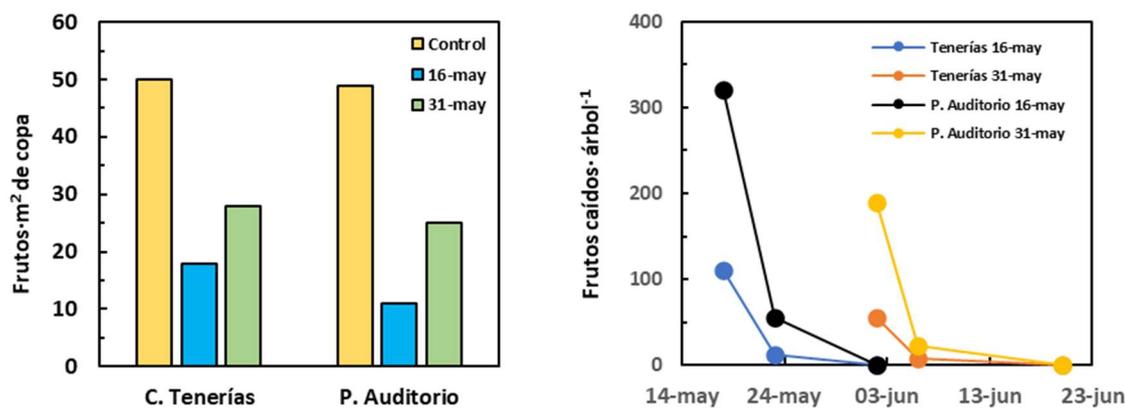


Fig. 12. Efecto de la fecha de aplicación de 15 mg l⁻¹ de 3,5,6-TPA sobre la producción final (A) y la abscisión de frutos (B) de naranjo amargo en dos zonas ajardinadas separadas entre sí 850 m.

Esta reducción del número de frutos supuso un descenso del tiempo de recolección. En Tenerías, mientras de los árboles control, sin tratar, se recolectaron, en promedio, 10 árboles por día y operario, de los tratados en plena caída fisiológica se recolectaron 15.8, con un tiempo de recolección de 48 y 31 min·árbol⁻¹, respectivamente (Fig. 13). El retraso en el tratamiento, 15 días más tarde, supuso una pérdida de eficacia del mismo y, en consecuencia, el número de árboles recolectados por día y operario fue de 12.5, con un tiempo medio de recolección de 39 min·árbol⁻¹.

Ello supuso, por término medio, un coste de 10.1 € y 12.8 € por árbol en la recolección de los tratados en plena caída fisiológica y 15 días después, respectivamente, frente a 16.0 € por árbol control sin tratar (Fig. 13). Conjuntamente, y para todos los árboles tratados, el primer tratamiento ahorró un 36.7% de los costes de recolección y el segundo un 20.0%. (Fig. 13).

En el parque Auditorio los resultados fueron prácticamente idénticos, y puesto que no suponen información adicional no se presentan.

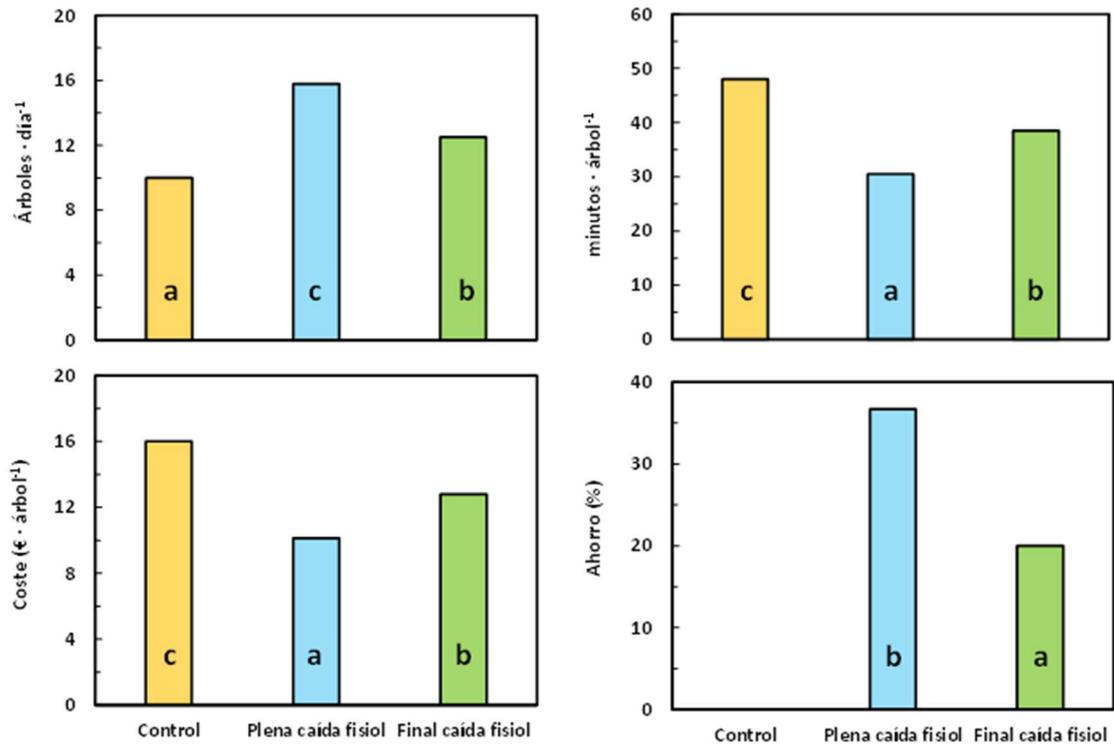


Fig. 13. Tiempo de recolección, coste por árbol y ahorro en las labores de recolección por efecto de la aplicación de 15 mg l⁻¹ de 3,5,6-TPA en el naranjo amargo cultivado en jardines públicos. Valores correspondientes a la localización de Tenerife. Cada valor es la media de 25 árboles. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa (P<0.05).

5. Discusión

La capacidad de división celular de los tejidos del ovario es un factor esencial del cuajado de un fruto (Gillaspy *et al.*, 1993). Ésta se halla regulada por la capacidad de síntesis de giberelinas en el óvulo tras su fecundación, promovida por la auxina, que son transportadas al pericarpo promoviendo el cuajado (Dorcey *et al.*, 2009; Bermejo *et al.*, 2018). En ausencia de fecundación, son las paredes del ovario las responsables de su síntesis (Monselise, 1977). En todo caso, la influencia de las giberelinas en el proceso del cuajado del fruto en los cítricos se ha demostrado tanto en variedades autocompatibles como partenocárpicas (Wiltbank y Krezdorn, 1969; García-Martínez y García-Papí, 1984), mediado por su capacidad de promover la división celular en los tejidos del ovario (Mesejo *et al.*, 2016).

Esta capacidad de división celular exige del aporte de carbohidratos al ovario en desarrollo, regulado, también, por las giberelinas, y dotándole de su capacidad sumidero (Mauk *et al.*, 1986). En los cítricos las flores situadas en brotes con hojas cuajan en mayor proporción que las de brotes áfilos (Moss *et al.*, 1972; Powell y Krezdorn, 1977), y ello se ha relacionado con el mayor aporte de carbohidratos que reciben las primeras y su desarrollo inicial más rápido (Hoffman, 1988). Asimismo, la competencia por carbohidratos entre flores en desarrollo (Guardiola *et al.*, 1977) y entre flores y hojas jóvenes (Iglesias *et al.*, 2003; Rivas *et al.*, 2007) son determinantes del cuajado en variedades de baja capacidad partenocárpica (Agustí *et al.*, 1982), y esta dependencia perdura hasta el inicio de la caída fisiológica de frutos, cuando la mayoría de los ovarios presentan una alta tasa de división celular y respiración (Blanke y Bower, 1991), indicando la exigencia energética del proceso. Es más, si durante dicho periodo se restringe el aporte de carbohidratos, los ovarios se desprenden de la planta y la intensidad de abscisión correlaciona con la intensidad de la restricción (Mehouachi *et al.*, 1995).

Por tanto, en variedades con semillas o de alta capacidad partenocárpica el mantenimiento del fruto en el árbol o su abscisión dependen de la disponibilidad o carencia de carbohidratos por el ovario que inicia el desarrollo, respectivamente. La restricción de éstos durante el desarrollo inicial del ovario por cualquier circunstancia, bien sea climática o de cultivo, conlleva la abscisión de ovarios. Y ello, aun pudiendo tener un efecto negativo sobre la cosecha, puede ser utilizado con fines positivos, como el aclareo de frutos para mejorar su tamaño (Agustí *et al.*, 1995). Con este fin se han utilizado las auxinas de síntesis, aplicándolas durante el periodo de división celular.

En este estado del desarrollo del fruto, las auxinas de síntesis provocan un efecto fitotóxico. Así, el 3,5,6-TPA induce daños fotosintéticos a través de clorosis en las hojas (Mesejo *et al.*, 2012), lo que es coincidente con los bajos valores SPAD encontrados en nuestro experimento. Este daño fotosintético: 1) reduce el rendimiento cuántico efectivo o eficiencia cuántica del fotosistema II

(ΦPSII), es decir, su transporte electrónico, 2) reduce el denominado *quenching* *qP* o *quenching* fotoquímico, que indica la proporción de centros de reacción del fotosistema II (PSII) abiertos, con lo que su reducción indica un aumento de la tasa de transporte de electrones fuera del PSII, 3) aumenta el *quenching* no fotoquímico *qN*, que indica la tasa de disipación térmica del exceso de energía en el PSII, y 4) reduce la asimilación de CO₂ (Mesejo *et al.*, 2012). Esta disminución del transporte electrónico del PSII provocado por el estrés fitotóxico del 3,5,6-TPA no está vinculado a daños en el aparato fotosintético, sino que se trata de un proceso que puede ser revertido cuando se supera la situación de estrés (Lawlor, 2002), de ahí que la auxina cuando se aplica tras la caída fisiológica de frutos provoque una reducción temporal de la tasa de crecimiento del fruto que tras ser superada revierte en un incremento de su crecimiento (Mesejo *et al.*, 2012) que alcanza hasta la maduración, aumentando el volumen celular (El-Otmani *et al.*, 1993) y el aporte de carbohidratos y agua al fruto, produciendo frutos de mayor tamaño (Agustí *et al.*, 1994; 2001).

El efecto fitotóxico de las auxinas de síntesis ha sido demostrado también en el guisante (*Pisum sativum* L.), en el que la aplicación de elevadas concentraciones de ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) inducen daños estructurales y estrés oxidativo en las células del mesófilo y en los cloroplastos de las hojas, interfiriendo con su tasa fotosintética (Romero-Puertas *et al.*, 2004). Y en el manzano (*Malus domestica* Borkh.), en el que la aplicación de ácido naftalenacético (NAA) aumenta la respiración en la oscuridad y reduce el intercambio de CO₂ y la fotosíntesis, lo que se ha señalado como requisito para un aclareo eficaz de frutos (Untiedt y Blanke, 2001). También en la mandarina Clausellina (*C. unshiu* Marc.) han sido demostrado estos efectos aplicando 3,5,6-TPA localmente a las hojas (Agustí *et al.*, 2007), y son coincidentes con nuestros resultados en *C. aurantium* y *C. sinensis*.

El efecto de la auxina sobre el rendimiento fotosintético, unido a la reducción en la asimilación de CO₂, conlleva una disminución de la síntesis de carbohidratos, y la abscisión del fruto está relacionada con la disponibilidad de éstos (Schaffer *et al.*, 1985). La baja fijación de CO₂ provocada por la aplicación de 3,5,6-TPA explica la represión del gen *RbcS* en las hojas tratadas y, asimismo, ante la reducción de sustratos para la síntesis de sacarosa, la de los genes de su síntesis *SUS1* y *SUSA* (Ruan, 2014; Hussain *et al.*, 2020).

El resultado es un menor contenido de sacarosa en las hojas de los árboles tratados, tanto en las adultas como en las jóvenes y en las de los brotes vegetativos como en las que soportan frutos (Mesejo *et al.*, 2012). En ambos casos las diferencias con las hojas de los árboles control no tratados aparecen a los pocos días de efectuado el tratamiento, 5 días en nuestro experimento y 3 en la mandarina Clementina (Mesejo *et al.*, 2012). Como consecuencia de ello, el transporte de sacarosa hacia los órganos sumidero se ve también reducido. En efecto, la expresión de los genes

de transporte de sacarosa *SUT3* y *SUT4* (Ruan, 2014; Hussain *et al.*, 2020), se ve significativamente reducido en las hojas tratadas. La expresión de los genes *SUT1* y *SUT2* es constitutiva y por eso no presenta diferencias significativas entre las hojas tratadas y control (Hussain *et al.*, 2020).

En consecuencia, el contenido en sacarosa disminuye en el fruto de los árboles tratados (Mesejo *et al.*, 2012), así como su hidrólisis. En efecto, la expresión del gen de la invertasa *SUS1* en el fruto se encuentra significativamente reducida en los frutos de los árboles tratados desde las 24 h siguientes al tratamiento, siendo la diferencia marcadamente más importante a los 5 días, como ocurre con la expresión de los genes de transporte. Aunque se ha señalado que la invertasa *SUS1* tiene escasa relevancia en la acumulación de hexosas y que es la *SUS3* la más íntimamente relacionado con la acumulación de glucosa y fructosa en las fases iniciales del desarrollo del fruto (Deng *et al.*, 2019), en la mandarina Clementina se ha demostrado una elevada expresión de *SUS1* durante los 40 días siguientes a la antesis (Mesejo *et al.*, 2019). La invertasa de la pared celular, *CWIN*, no reduce su expresión hasta 20 días después del tratamiento, lo que indica que la descarga de los azúcares en el fruto durante las primeras etapas de su desarrollo debe ser vía simplasto (Deng *et al.*, 2019; Hussain *et al.*, 2020).

Paralelamente a este descenso en la descarga de carbohidratos en el fruto se observa una reducción de su tasa de crecimiento, que es probablemente la razón del aumento de su tasa de abscisión y, por tanto, del aclareo de frutos (Mauk *et al.* 1986; Agustí *et al.* 1995; 2007); este efecto es más importante cuando se tratan las hojas que si se trata el fruto, lo que ratifica que ello es consecuencia del efecto fitotóxico de la auxina sobre la actividad fotosintética.

El mecanismo por el que las auxinas sintéticas provocan el aclareo de los frutos que han iniciado el desarrollo se ha correlacionado con un aumento en su producción de etileno (Iwahori y Oohata, 1976; Agustí *et al.*, 2007). Y ello se debe a la reducción del transporte basípeto de ácido indol-3-acético (IAA) a lo largo del pedúnculo (Okuda e Hirabayashi, 1998; Bangerth, 2000). El IAA es un elemento esencial en la diferenciación del tejido vascular (Aloni, 2015), y se ha demostrado que las auxinas de síntesis promueven el desarrollo de estos tejidos en el pedúnculo cuando se aplican localmente sobre éste (Mesejo *et al.*, 2003). Nuestros resultados son coherentes con ello ya que la aplicación de 3,5,6-TPA reduce, por una parte, la expresión de *TRN2* en el fruto, es decir, de la síntesis de AIA, y, por otra, de *PINI*, es decir, de su eflujo hacia el pedúnculo. Ambos efectos conllevan que la capa de abscisión quede desprotegida y los haces vasculares pierdan su capacidad de transporte. La aplicación al pedúnculo de ácido triiodobenzoico (TIBA), un inhibidor del transporte de AIA, reduce en éste su contenido y provoca la abscisión del fruto (Okuda e Hirabayashi, 1998), y el rayado de ramas durante la caída fisiológica de frutos aumenta la expresión de *PINI* en el fruto, lo que permite que el fruto siga nutriéndose y evitando, así, su

caída (Mesejo *et al.*, 2022). La reducción de la expresión de *TRN2* y *PINI* en nuestro experimento explica la reducción del contenido en carbohidratos del fruto y, por tanto, de la expresión de *CYCA1-1*, es decir, de la tasa de división celular. La consecuencia es la producción de etileno, lo que provoca, finalmente, su caída (Iwahori y Oohata, 1976; Agustí *et al.*, 2007; Mesejo *et al.*, 2012).

Esta caída de frutos se ha utilizado con éxito, por primera vez en este trabajo, en el naranjo amargo en jardinería. La eficacia del tratamiento, como en especies/variedades en cultivo comercial, depende del momento de aplicación, siendo máxima en plena caída fisiológica y reduciéndose con el tiempo (Agustí *et al.*, 1995). En correspondencia con ello, se redujo marcadamente el número de frutos a recolectar, en mayor cuantía para el primer tratamiento, y, por tanto, los costes de mantenimiento.

Debe destacarse que la presencia del fruto es un potente inhibidor de la floración en los árboles frutales (Haim *et al.*, 2021; Garner y Lovatt, 2008; Spinelli *et al.*, 2009; Rosenstock *et al.*, 2010), y también en los cítricos (Monselise y Goldschmidt, 1982; Muñoz-Fambuena *et al.*, 2011; Agustí *et al.*, 2022). En este estudio, la reducción del número de frutos que alcanzó la maduración permitió una floración intensa, exigible tratándose de árboles ornamentales que, en la época de floración, deben lucir en calles y jardines. Asimismo, y tratándose de una especie de cuajado sexual y que exige, por tanto, de fecundación, la producción del año siguiente al tratamiento se presentó abundante y, por tanto, el tratamiento propuesto con la auxina de síntesis 3,5,6-TPA debe llevarse a cabo todos los años si se quiere mantener el ahorro obtenido con ella y una floración anual adecuada.

6. Conclusiones

En conclusión, el efecto abscisor de la auxina de síntesis 3,5,6-tricloro-2-piridiloxiacético (3,5,6-TPA), puede ser utilizado en jardinería para reducir la cosecha de los árboles cítricos y, con ello, los costes de recolección. En los árboles tratados, la actividad fotosintética de sus hojas es alterada por la aplicación de esta auxina. El estudio molecular demuestra una reducción de la síntesis de sacarosa en la hoja, de su transporte al fruto y de su hidrólisis en éste, con lo que la tasa de división celular también decae. En estas condiciones el fruto desencadena la producción de etileno, su capa de abscisión ovario-cáliz se sensibiliza y se produce su abscisión.

Este trabajo está alineado con los siguientes Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS):



- ODS 8: Trabajo decente y crecimiento económico.
- ODS 11: Ciudades y comunidades sostenibles

7. Bibliografía

Agustí M., Almela, V., Aznar, M., El-Otmani, M., y Pons, J. 1994. Satsuma mandarin fruit size increased by 2, 4-DP. Hort. Sci., 29: 279-281.

Agustí, M., El-Otmani, M., Aznar, M., Juan, M., y Almela, V. 1995. Effect of 3, 5, 6-trichloro-2-pyridyloxyacetic acid on clementine early fruitlet development and on fruit size at maturity. J. Hort. Sci., 70: 955-962.

Agustí, M., García-Marí, F. y Guardiola, J.L. 1982. The influence of flowering intensity on the shedding of reproductive structures in sweet orange. Sci. Hort. 17: 343-352.

Agustí, M., Juan, M. y Almela, V. 2007. Response of 'Clausellina' Satsuma mandarin to 3,5,6-trichloro-2-pyridyloxyacetic acid and fruitlet abscission. Plant Growth Regul. 53: 129–135.

Agustí, M., Mesejo, C. y Reig, C. 2020. *Citricultura*. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, España. 488 pp.

Agustí, M., Reig, C., Martínez, Fuentes, A., Mesejo, C. 2022. Advances in citrus flowering: A review. Front. Plant Sci. 13:868831.

Agustí, M., Zaragoza, S., Iglesias, D.J., Almela, V., Primo-Millo, E., Talón, M. 2001. The synthetic auxin 3,5,6-TPA stimulates carbohydrate accumulation and growth in citrus fruit. Plant Growth Regul. 36: 141-147.

Almela, V., Zaragoza, S., Primo-Millo, E., Agustí, M. 1994. Hormonal control of splitting in 'Nova' mandarin fruit. J. Hort. Sci. 69: 969-973.

Aloni, R. 2015. Ecophysiological implications of vascular differentiation and plant evolution. Trees 29: 1-16.

Bangerth, F. 2000. Abscission and thinning of young fruit and their regulation by plant hormones and bioregulators. Plant growth Regul. 31: 43-59.

Bermejo, A., Granero, B., Mesejo, C., Reig, C., Tejedo, V., Agustí, M., Primo-Millo, E., Iglesias, D.J. 2018. Auxin and gibberellin interact in citrus fruit set. J. Plant Growth Regul. 37: 491-501.

- Berry, J.O., Yerramsetty, P., Zielinski, A.M. y Mure, C.M.** 2013. Photosynthetic gene expression in higher plants. *Photosynth. Res.* 117: 91-120.
- Blanke, M.M., Bower, J.P.** 1991. Small fruit problem in citrus trees. *Trees* 5: 239–243.
- Blanusa, T., Else, M.A., Atkinson, C.J. y Davies, W.J.** 2005. The regulation of sweet cherry fruit abscission by polar auxin transport. *Plant Growth Regul.* 45: 189–198.
- Borland, A.M., Zambrano, V.A.B., Ceusters, J. y Shorrocks, K.** 2011. The photosynthetic plasticity of crassulacean acid metabolism: an evolutionary innovation for sustainable productivity in a changing world. *New Phytol.*, 191: 619-633.
- Deng, S., Mai, Y., Niu, J.** 2019. Fruit characteristics, soluble sugar compositions and transcriptome analysis during the development of *Citrus maxima* “seedless”, and identification of *SUS* and *INV* genes involved in sucrose degradation. *Gene* 689: 131-140.
- Dorcey, E., Urbez, C., Blázquez, M.A., Carbonell, J., Perez-Amador, M.A.** 2009. Fertilization-dependent auxin response in ovules triggers fruit development through the modulation of gibberellin metabolism in *Arabidopsis*. *Plant J.* 58: 318-332.
- El-Otmani, M., Agustí, M., Aznar, M., y Almela, V.** 1993. Improving the size of ‘Fortune’ mandarin fruits by the auxin 2, 4-DP. *Sci. Horti.*, 55: 283-290.
- El-Otmani, M., Coggins Jr., C.W., Agustí, M., Lovatt, C.J.** 2000. Plant Growth Regulators in Citriculture: World Current Uses. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 19: 395-447.
- Feng, G., Wu, J., Xu, Y., Lu, L., Yi, H.** 2021. High-spatiotemporal-resolution transcriptomes provide insights into fruit development and ripening in *Citrus sinensis*. *P. Biotechnol. J.* 19: 1337-1353.
- García-Papí, M.A., García-Martínez, J.L.** 1984. Endogenous plant growth substances content in young fruits of seeded and seedless Clementine mandarin as related to fruit set and development. *Sci. Hortic.* 22: 265–274.
- Garner, L.C., Lovatt, C.J.** 2008. The relationship between flower and fruit abscission and alternate bearing of ‘Hass’ avocado. *J. Amer. Soc. Hortic. Sci.* 133: 3–10.

- Gillaspy, G., Ben-david, H., Gruissem, W., Darwin, C.** 1993. Fruits: a developmental perspective. *Plant Cell* 5: 1439-1451.
- Gustafson, F.G.** 1939. Auxin distribution in fruits and its significance in fruit development. *Amer. J. Bot.* 26: 189-194.
- Guardiola, J.L., Agustí, M., y García-Marí, F.** 1977. Gibberellic acid and flower bud development in sweet orange. *Proc. Int. Soc. Citriculture*, 2: 696-699.
- Haim, D., Shalom, I., Simhon, Y., Ahlizerman, L., Kamara, I., Morozov, M., Albacete, A., Rivero, R.M., Sadka, A.** 2021. Alternate bearing in fruit trees: fruit presence induces polar auxin transport in citrus and olive stem and represses IAA release from the bud. *J. Exp. Bot.* 72: 2450-2462.
- Hield, H.Z., Burns, R.M. and Coggins, C.W., Jr.** 1964. Preharvest use of 2,4-D on citrus. *Calif. Agric. Exp. Stn., Circular* 528, 10 pp.
- Hirose, K.** 1981. Development of chemical thinners for commercial use for Satsuma mandarin in Japan. *Proc. Int. Soc. Citriculture* 1: 256-260.
- Hofman, P.J.** 1988. Abscisic acid and gibberellins in the fruitlets and leaves of the Valencia orange in relation to fruit growth and retention. *Proc. 6th Int. Citrus Congress* 1: 355-362.
- 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. *Mol. Biol. Rep.*, 47: 2781-2791.
- Iglesias, D.J., Tadeo, F.R., Primo-Millo, E., Talón, M.** 2003. Fruit set dependence on carbohydrate availability in citrus trees. *Tree Physiol.* 23: 199–204.
- Iwahori, S. y Oohata, J.T.** 1976. Chemical thinning of ‘Satsuma’ mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) fruit by 1 naphthalene acetic acid: role of ethylene and cellulase. *Sci Hort.* 4: 167–174.
- Jing, H., Wilkinson, E.G., Sageman-Furnas, K. y Strader, L.C.** 2023. Auxin and abiotic stress responses. *J. Exp. Bot.*, 74: 7000-7014.

- Joshi, J., Mueller-Cajar, O., Tsai, Y-C.C., Hartl, F.U. y Hayer-Hartl, M.** 2015. Role of small subunit in mediating assembly of red-type form I Rubisco. *J. Biol. Chem.*, 290: 166-1074.
- Lawlor, D.W.** 2012. Limitation to photosynthesis in water-stressed leaves: stomata vs. metabolism and the role of ATP. *Ann. Bot.*, 89: 871-885.
- Mauk, C.S., Bausher, M.G. y Yelenosky, G.** 1986. Influence of growth regulator treatments on dry matter production, fruit abscission, and ¹⁴C-assimilate partitioning in *Citrus*. *J Plant Growth Regul* 5: 111–120.
- Mehouachi, J., Serna, D., Zaragoza, S., Agustí, M., Talón, M., Primo-Millo, E.** 1995. Defoliation increases fruit abscission and reduces carbohydrate levels in developing fruits and woody tissues of *Citrus unshiu*. *Plant Sci.* 107: 189-197.
- Mesejo, C., Martínez-Fuentes, A., Juan, M., Almela, V., Agustí, M.** 2003. Vascular tissues development of citrus fruit peduncle is promoted by synthetic auxins. *Plant Growth Regul.* 39: 131-135.
- Mesejo, C., Martínez-Fuentes, A., Reig, C., Agustí, M.** 2019. The flower to fruit transition in *Citrus* is partially sustained by autonomous carbohydrate synthesis in the ovary. *Plant Sci.* 285:224-229.
- Mesejo, C., Martínez-Fuentes, A., Reig, C. y Agustí, M.** 2022. Ringing branches reduces fruitlet abscission by promoting *PINI* expression in ‘Orri’ mandarin. *Sci. Hortic.*, 306: 111451.
- Mesejo, C., Rosito, S., Reig, C., Martínez-Fuentes, A. y Agustí, M.** 2012. Synthetic auxin 3,5,6-TPA provokes *Citrus clementina* (Hort. ex Tan) fruitlet abscission by reducing photosynthate availability. *J. Plant Growth Regul.* 31: 186-194.
- Mesejo, C., Yuste, R., Reig, C., Martínez-Fuentes, A., Iglesias, D.J., Muñoz-Fambuena, N., Bermejo, A., Germaná, A., Primo-Millo, E., Agustí, M.** 2016. Gibberellin reactivates and maintains ovary-wall cell division causing fruit set in parthenocarpic *Citrus* species. *Plant Sci.* 247: 13-24.
- Monselesse, S.P.** 1977. *Citrus* fruit development: endogenous systems and external regulation. *Proc. Int. Soc. Citriculture* 2: 664-668.

- Monselesse, S.P., Goldschmidt, E.E.** 1982. Alternating bearing in fruit trees. *Hortic. Rev.* 4: 128–173.
- Morsink, W.A.G y Smith, V.G.** 1974. Root and shoot development on cuttings of basswood (*Tilia americana* L.) as affected by auxin treatments and size of cuttings. *Can. J. For. Res.*, 4: 246–249.
- Moss, G.I., Steer, B.T., Kriedemann, P.E.** 1972. The regulatory role of inflorescence leaves in fruit-setting by sweet orange (*Citrus sinensis*). *Physiol. Plant.* 27: 432-438.
- Muñoz-Fambuena, N., Mesejo, C., González-Mas M.C., Primo-Millo, E., Agustí, M. y Iglesias, D.J.** 2011. Fruit regulates seasonal expression of flowering genes in alternate-bearing ‘Moncada’ mandarin. *Ann. Bot.*, 108: 511-519.
- Okuda, H. y Hirabayashi, T.** 1998. Effect of IAA gradient between the peduncle and branch on physiological drop of citrus fruit (*Kiyomi tangor*). *J Hort. Sci. Biotechnol.* 73: 618-621.
- Patison, R., Csukasi, F., Catalá, C.** 2014. Mechanisms regulating auxin action during fruit development. *Physiol. Plant.* 151: 62-72.
- Powell, A.A., Krezdorn, A.H.** 1977. Influence of fruit-setting treatment on translocation of ¹⁴C-metabolites in citrus during flowering and fruiting. *J. Amer. Soc. Hortic. Sci.* 102: 709-714.
- Reece, P.C. y Horanic, G.E.** 1952. Some varietal responses of Florida oranges to pre-harvest spray. *Fla. State Hortic. Soc.*, 65: 88—91.
- Rivas, F., Gravina, A., Agustí, M.** 2007. Girdling effects on fruit set and quantum yield efficiency of PSII in two Citrus cultivars. *Tree Physiol.* 27: 527–535.
- Romero-Puertas, M.C., McCarthy, I., Gómez, M., Sandalio, L.M., Corpas, F.J., Del Río, L.A., Palma, J.M.** 2004. Reactive oxygen species-mediated enzymatic systems involved in the oxidative action of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Plant Cell Environ.* 27: 1135–1148.
- Rosenstock, T.S., Rosa, U.A., Plant, R.E., Brown, P.H.** 2010. A reevaluation of alternate bearing in pistacchio. *Sci. Hortic.* 124: 149–152.

Ruan, Y-L. 2014. Sucrose metabolism: gateway to diverse carbon use and sugar signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 65: 33–67.

Schaffer, A.A., Goldschmidt, E.E., Goren, R. Galili, E. 1985. Fruit set and carbohydrate status in alternate and non-alternate bearing Citrus cultivars. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 110: 574–578.

Shinkle, J.R. y Briggs, W.R. 1985. Physiological mechanism of the auxin-induced increase in light sensitivity of phytochrome-mediated growth responses in *Avena* coleoptile sections. *Plant Physiol.*, 79: 349-356.

Shiraishi, M. 1981. Abscission of Satsuma (*Citrus unshi* Marc.) fruit caused by application of ethylchlozate (ethyl 5-chloro-1H-3-indazolylacetate). *Proc. Int. Soc. Citriculture*, 1: 275–278.

Spinelli, F., Fiori, G., Noferini, M., Sprocatti, M., Costa, G. 2009. Perspectives on the use of a seaweed extract to moderate the negative effects of alternate bearing in apple trees. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 84: 131–137.

Tabita F.R., Hanson, T.E., Li, H., Satagopan, S., Singh, J. y Chan, S. 2007. Function, structure, and evolution of the RubisCO-like proteins and their RubisCO homologs. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 71: 576-599.

Untiedt, R. y Blanke, M. 2001. Effects of fruit thinning agents on apple tree canopy photosynthesis and dark respiration. *Plant Growth Regul.* 35:1–9.

Wiltbank, W. J., Krezdorn, A. H. 1969. Determination of Gibberellins in Ovaries and Young Fruits of Navel Oranges and their Correlation with Fruit Growth1. *J.Amer. Soc. Hortic. Sci.* 94: 195-201.

Zaragoza, S., Trenor, I., Alonso, E., Primo-Millo, E. and Agusti, M. 1992. Treatments to increase the final fruit size on satsuma Clausellina. *Proc. Int. Soc. Citriculture*, 2: 725-728.