

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



CONTROL HORMONAL DE LA BROTACIÓN EN LOS CÍTRICOS: DOMINANCIA DEL FRUTO

TRABAJO FIN DE GRADO EN INGENIERIA AGROALIMENTARIA Y DEL
MEDIO RURAL

ALUMNA: M^a JOSÉ MARTÍNEZ MONTAGUD

TUTOR: CARLOS MESEJO CONEJOS
CO-TUTOR: MANUEL AGUSTÍ FONFRÍA

Curso Académico: 2014-2015

VALENCIA, 6 de julio de 2015

TÍTULO: Control hormonal de la brotación: dominancia del fruto.

RESUMEN:

En los cítricos, el fruto inhibe la brotación de las yemas axilares y el desarrollo vegetativo. Este efecto se relaciona, fundamentalmente, con factores nutricionales (Martínez-Alcántara *et al.*, 2015) y hormonales. El fruto es un mayor sumidero de carbono que el brote vegetativo, lo que limita el desarrollo de éste (Martínez-Alcántara *et al.*, 2015). Bangerth *et al.*, (2000) propusieron la hipótesis de la autoinhibición del transporte de auxinas (*ATA, auxin-transport-autoinhibition*) entre órganos en crecimiento dominantes y dominados: el transporte anterior y más intenso desde el órgano dominante (fruto) inhibe el transporte basípeto del órgano dominado (yemas) en la zona de confluencia del tallo, restringiendo su desarrollo. Como las auxinas no actúan directamente sobre la yema se ha propuesto la acción de un mensajero secundario (Agustí y Greb, 2013). Por otra parte, la regulación del crecimiento secundario del tallo (promovido por las auxinas) está estrechamente relacionada con la restricción de la brotación axilar (Agustí y Greb., 2013). El fruto también regula el desarrollo de los haces vasculares del brote que lo sustentan a través de las auxinas (Mesejo *et al.*, 2003), y, por ello inhibe, directa o indirectamente, la brotación axilar.

En este trabajo se plantea la siguiente hipótesis: la reducción de la disponibilidad de CHs del fruto en crecimiento, mediante la interrupción del transporte floemático entre el fruto y el brote, modifica el balance hormonal en las yemas permitiendo la brotación.

Con el fin de determinar la influencia del fruto en la distribución hormonal a lo largo del brote se seleccionaron 100 brotes campaneros de mandarino Nadorcott en plena fase II del crecimiento del fruto. En 50 de ellos se realizó un anillado en el pedúnculo del fruto (RYD) y el resto se utilizaron como control (ON). Además, la brotación de brotes con fruto, RYD y ON, también se comparó con la brotación de brotes sin fruto (OFF). Once días después del tratamiento y justo antes del inicio de la

brotación se muestrearon brotes para evaluar el contenido en ácido indol-acético (AIA), *trans*-Zeatina (*t*-Z), giberelinas activas (GA₁ y GA₄), ácido abscísico (ABA) y ácido jasmónico (JA).

Los resultados revelan que la interrupción del transporte por el floema en el pedúnculo del fruto permitió la brotación inmediata de las yemas adyacentes, independientemente de las condiciones ambientales. Los brotes ON no brotaron, mientras que los brotes OFF lo hicieron cuando disminuyó la temperatura ambiental coincidiendo con el inicio del otoño. En ambos tipos de brotes, los nudos que más brotaron fueron los más cercanos al extremo apical. El rayado modificó el balance hormonal en los nudos, disminuyendo la concentración de AIA y *t*-Z y aumentando la concentración de GA₁. Por otra parte, el rayado no modificó ni el ABA ni el JA.

Los frutos de brotes rayados fueron más pequeños y verdes que los frutos control en el momento de la recolección. En los brotes ON, por efecto del fruto, se redujo la brotación de primavera y se impidió la floración. Sin embargo, el RYD permitió la floración, pero indirectamente a través de la brotación de otoño.

Palabras clave: AIA Brotación, Cítricos, Dominancia apical, Floema, Floración, GAs

ABSTRACT:

In citrus, fruit inhibits sprouting of axillary buds and the development of shoots. This effect is mainly related with nutritional factors (Martinez-Alcántara *et al.*, 2015) and hormonal factors. The fruit is a major carbon sink which limits bud development (Martinez-Alcántara *et al.*, 2015). Bangerth *et al.*, (2000) proposed the ATA (*auxin-transport-autoinhibition*) hypothesis between dominant and dominated growing organs: the earlier and stronger IAA basipetal transport from the dominant organ (fruit) inhibits growth of the dominated organ (buds) in the area of confluence of the stem. As auxins do not act directly on the bud, the action of a secondary messenger has been proposed (Agusti and Greb, 2013). On the other hand, the regulation of the secondary growth of the stem (promoted by auxins) is closely related to the restriction of the axillary bud growth (Agusti and Greb, 2013). The fruit also regulates the development of vascular bundles to sustain it is through by means of auxins (Mesejo *et al.*, 2003), and this inhibits, directly or indirectly, axillary bud sprouting.

This work considers the following hypothesis: the reduction of the availability of CHs of the growing fruit, through the interruption of the phloem transport between the fruit and the shoot, modifies the hormonal balance in the buds allowing sprouting. 'Nadorcott' mandarin leafy shoots bearing a single fruit in terminal position were selected at the phase II of fruit development. Fruit peduncle was girdled (RYD) in 50 shoots, whereas the others were used as control (ON). In addition, sprouting in fruit-bearing shoots was also compared with sprouting in vegetative shoots (OFF). Eleven days after the treatment and just before the beginning of sprouting buds were sampled to evaluate the content of indole-acetic acid (IAA), *trans*-Zeatin (*t*-Z), active gibberellins (GA₁ and GA₄), Abscisic acid (ABA) and jasmonic acid (JA).

The results reveal that the interruption of the phloem transport in the fruit peduncle allowed immediate sprouting of adjacent buds, regardless of environmental conditions. ON-shoot do not sprouted, while the OFF-shoots did it when the maximum temperature dropped below 25°C, coinciding with the beginning of autumn. In both types of shoots, the closest buds to the apical end sprouted larger than the buds

situated in the basal end of the shoot. Stem girdling changed the hormonal balance in buds, decreasing the concentration of AIA and *t-Z*, and increasing the concentration of GA₁. On the other hand, girdling did not modified ABA and JA concentrations.

The girdled fruits were smaller than control fruits at harvest date, and did not changed color. Girdling allowed flowering indirectly, through the autumn sprouting stimulation, whereas ON shoots did not flower.

Keywords: AIA Sprouting, Citrus, Apical Dominance, Phloem, Flowering, GAs

ALUMNO/A: M^a José Martínez Montagud

TUTOR/A: Carlos Mesejo Conejos

COTUTOR/A: Manuel Agustí Fonfría

VALENCIA, julio de 2015

A Carlos, por enseñarme otro punto de vista de la Citricultura y por inculcarme
un modo de disfrutar la investigación.

A Natalia, por ayudarme y por compartir las comidas entre risas.

A Amparo, Carmina, Manolo y el resto del IAM.

A Cuti, por compartir todos estos años de carrera y por nuestros chistes malos.

A los 'celiacos', compañeros y amigos de carrera.

A mi familia por hacer esto posible y confiar en mí.

A mi sobrina, por sacarme siempre una sonrisa.

A Felipe, por ayudarme en todo. Por cada momento vivido. Por todo lo que nos
queda.

ÍNDICES

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1.LA BROTAÇÃO EN LOS CÍTRICOS	1
1.1 Aspectos generales	1
1.2 Tipos de brotación	2
2.FACTORES QUE INFLUYEN EN LA BROTAÇÃO	3
2.1 Factores exógenos	3
2.1.1 Temperatura	3
2.1.2 Estrés hídrico.....	4
2.2 Factores endógenos.....	5
2.2.1 Factores nutricionales	5
2.2.2 Factores hormonales.....	6
3.HIPÓTESIS	8
4.Objetivos.....	8
II. MATERIAL Y MÉTODOS	9
1.MATERIAL VEGETAL Y DISEÑO DEL EXPERIMENTO	9
2.METODOLOGÍA.....	9
2.1 Toma y procesado de muestras.....	9
2.2 Análisis hormonal	10
2.3 Análisis estadístico de los resultados.....	11
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	12
1.EFECTO DEL AISLAMIENTO PARCIAL DEL FRUTO SOBRE LA BROTAÇÃO.....	12
2.EVOLUCIÓN DEL CONTENIDO HORMONAL DE LOS BROTES DURANTE LA BROTAÇÃO DE OTOÑO.....	19

IV. CONCLUSIONES	26
V. BIBLIOGRAFÍA	27

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características del fruto maduro de brotes control y rayado en el momento de la recolección (7 meses después del tratamiento). Cada valor es la media de 10 frutos. n.s: no significativo.	17
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Evolución del porcentaje de brotación de final del verano en brotes campaneros (ON) y brotes vegetativos (OFF) del mandarina Nadorcott. Influencia del micro-rayado del pedúnculo del fruto (RYD). Cada valor es la media de 50 brotes. Las barras verticales representan el error estándar. La barra azul mostrada a la izquierda del gráfico corresponde al intervalo LSD.....**13**

Figura 2. Evolución de la temperatura desde el 1 de agosto hasta el 15 de octubre; $t_{\text{máx}}$ (temperatura máxima), t_m (temperatura media) y t_{min} (temperatura mínima). El inicio de la brotación OFF comenzó el 5/9, hasta alcanzar el 8% de brotación, luego se mantuvo constante hasta que descendió significativamente la temperatura el 20/9 y aumentar la brotación hasta el 40%.**14**

Figura 3. Distribución de la brotación de final del verano a lo largo de los nudos en brotes campaneros (ON) y brotes vegetativos (OFF) del mandarina Nadorcott. Influencia del micro-rayado del pedúnculo del fruto (RYD). Cada valor es la media de 50 brotes. El nudo 1 corresponde al más cercano al fruto/ápice, mientras que el nudo 5 al más alejado. Las barras verticales representan el error estándar. La azul barra mostrada a la derecha del gráfico corresponde al intervalo LSD.....**15**

Figura 4. Longitud de la brotación de final del verano a lo largo de los nudos en brotes campaneros (ON) y brotes vegetativos (OFF) del mandarina Nadorcott. Influencia del micro-rayado del pedúnculo del fruto (RYD). Cada valor es la media de 5 brotes. El nudo 1 corresponde al más cercano al fruto/ápice, mientras que el nudo 5 al más alejado. Las barras verticales representan el error estándar. La azul barra mostrada a la derecha del gráfico corresponde al intervalo LSD.....**16**

Figura 5. Influencia del rayado del pedúnculo (verano 2014) en la brotación y floración de primavera (marzo 2015). Número de brotes de primavera (A y C) y flores (B y D) por nudo, en brotes OFF (A y B) y brotes ON (C y D) control y rayados; Con B. Otoño: indica que el brote seleccionado brotó en otoño y la brotación de primavera 2015 se ha evaluado sobre nudos de primavera 2014 y nudos de otoño 2014; Sin B. Otoño: indica que la brotación de primavera 2015 se ha evaluado sobre nudos de primavera 2014. Cada valor es la media de 10 brotes. Las barras verticales representan el error estándar.....**18**

Figura 6. . Evolución de la concentración de GA1, GA4, AIA, ABA, tZ, y JA a lo largo de los brotes ON y RYD a los 11ddt; evolución de las relaciones de GA1/tZ, giberelina activa 1 con zeatina (citoquinina), y la relación de IAA/tZ, ácido indolacético con zeatina, a lo largo de los brotes on a los 11ddt. F: flavedo; P: pulpa; n1-n5: nudos adyacentes al fruto, del 1-5. El micro-rayado se realizó en el pedúnculo, entre el fruto y el nudo 1. Cada valor es la media de 2 réplicas biológicas. Las barras verticales representan el error estándar. La barra negra mostrada a la izquierda del gráfico corresponde al intervalo LSD.....**20**

Figura 7. Evolución de la concentración de GA1, GA4, AIA, ABA, tZ y JA a lo largo del brote off en los 0 DDT y 11ddt. Evolución de las relaciones de GA1/tZ, giberelina activa 1 con zeatina (citoquinina), y la relación de IAA/tZ, ácido indolacético con zeatina, a los 0 DDT y 11 DDT en brotes off. A, ápice, n1-n5, nudos del 1-5. Las barras verticales representan el error estándar..**24**

I. INTRODUCCIÓN

1. LA BROTAÇÃO EN LOS CÍTRICOS

1.1. Aspectos generales

En los cítricos cultivados en clima Mediterráneo, el ritmo de las brotaciones y del desarrollo está controlado por los cambios de temperatura que se producen en las diferentes estaciones. Por ello, la brotación se da en tres etapas bien definidas: primavera, principio del verano y final del verano u otoño, en función de los años. En clima Tropical el crecimiento es prácticamente continuo (Agustí, 2003). En zonas de clima Mediterráneo las yemas entran en reposo durante el invierno. A partir de febrero, las yemas axilares comienzan su actividad, pero no brotan hasta el mes de marzo o abril. Esta brotación, la de primavera, desarrolla las flores que determinan la cosecha, mientras que las brotaciones de verano y otoño dan brotes vegetativos con nuevos nudos que brotarán en el siguiente ciclo. La brotación de primavera se desarrolla, fundamentalmente, sobre la de otoño, y esta sobre la de verano. Estas últimas se diferencian de la de primavera por el mayor tamaño de las hojas y mayor longitud de los brotes. El crecimiento vegetativo depende, por tanto, de la segunda y tercera brotación. (Agustí, 1980; Davies y Albrigo, 1994). La brotación de otoño y verano, por tanto, resultan esenciales en la floración de la primavera.

No se conoce con precisión los factores que determinan la brotación, esto es, el inicio del crecimiento del meristemo. Las yemas no requieren acumulación de horas frío y estas brotan cuando la temperatura del suelo supera los 12 °C, sin importar la del aire (Agustí, 2003). Una vez la yema ha empezado a brotar, un aumento de temperatura actúa sobre el balance hormonal y la movilización de reservas haciendo que aumente el desarrollo vegetativo. Por el contrario, una bajada de temperatura hace que cese este desarrollo. En un árbol, el porcentaje de yemas axilares que brotan es muy escaso. Entre éstas, las que están situadas en la madera joven y próximas al ápice presentan mayor porcentaje de brotación que las que se sitúan en la madera vieja. Dado que todas las yemas en un mismo árbol están expuestas a los mismos factores exógenos (ambientales), las diferencias de brotación entre ellas deben estar provocadas por factores endógenos. Entre los factores endógenos, la presencia del fruto ejerce un papel decisivo en la inhibición de la brotación y la floración. En los

cítricos, el fruto inhibe la brotación de las yemas axilares y el desarrollo vegetativo. Este efecto se relaciona, fundamentalmente, con factores nutricionales (Martínez-Alcántara *et al.*, 2015) y hormonales (Bangerth *et al.*, 2000).

El meristemo apical caulinar se sitúa en la zona distal del brote, formado por varias capas de células o túnica que reviste a una masa de células en división, rodeado y cubierto por los primordios foliares, formando todo el conjunto el ápice caulinar (Taiz y Zeiger, 2006). Los primordios foliares aparecen a medida que el meristemo avanza, con el tiempo diferenciaran el limbo y el peciolo formando las hojas más jóvenes (Agustí, 2003). Los meristemos apicales del brote, como en el caso de los cítricos, pueden presentar actividad estacional, como en el resto del brote. Estos pueden crecer rápidamente en la primavera, entrar en crecimiento lento en verano y en otoño entrar en latencia (Taiz y Zeiger, 2006). Las yemas axilares son meristemos secundarios que están recubiertas por profilos (escamas) y se localizan en las axilas de las hojas. Como en los meristemos apicales, tienen un meristemo rodeado por primordios foliares (Agustí, 2003).

1.2. Tipos de brotes

Cada nudo, cuando brota, puede desarrollar más de un brote, en correspondencia con su propia estructura en la que son visibles varias yemas. En los cítricos, los brotes que surgen de la brotación de primavera se clasifican en cinco tipos, dependiendo del número de hojas y flores que lo componen. Los brotes con varias flores sin hojas son los ramos de flor (RF), los que tienen flores y hojas son los ramos mixtos (RM), los que tienen solo una flor y sin hojas se conocen como flor solitaria (FS), y con hojas, brotes campaneros (BC), y los que sólo tienen hojas son los brotes vegetativos (BV) (Agustí 2003).

En la brotación de primavera, la distribución de la floración en tipos de brotes es idéntica para todas las especies, exceptuando a *Citrus unshiu* (mandarino Satsuma). El naranjo dulce (*Citrus sinensis*) presenta, en general, un 50% de brotes mixtos y un 25% de ramos de flor; las flores solitarias y los brotes vegetativos se presentan en una proporción del 10%, y el 5% restante son brotes campaneros (Guardiola *et al.*, 1977). En el mandarino Clementino (*Citrus clementina*) e híbridos (híbridos de mandarinas,

tangors y tangelos), la mayor cantidad de brotes son las flores solitarias, el 50%, un 20% de campaneros, y el resto de brotes (BM, RF y BV) se reparten a partes igual en el 30% restante. El mandarino Satsuma sólo tiene brotes uniflorales, con hojas el 35% o sin hojas el 25%, y vegetativos el 40% (Agustí, 2003).

2. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA BROTACIÓN

2.1. Factores exógenos

2.1.1. Temperatura

La temperatura es el factor climático que más influye en el desarrollo vegetativo. Los cítricos cultivados en clima Tropical brotan continuamente, al no haber grandes fluctuaciones de temperatura, que, en promedio, se sitúa en torno a los 25°C. En los climas subtropicales, al tener estaciones definidas, las brotaciones están controladas por los cambios de temperatura entre las estaciones. Cuando hay un descenso de la temperatura al principio del invierno, las yemas entran en estado de reposo que, a principios de primavera, se rompe cuando hay un ascenso de la temperatura, y éstas brotan. Una vez se alcanza en el suelo una temperatura superior a 12°C las yemas comienzan a brotar. Temperaturas por debajo de los 0°C afectan al desarrollo del vegetativo, produciendo, por ejemplo, manchas marrones en el envés de las hojas (Agustí, 2003). La temperatura óptima para que haya actividad fotosintética se encuentra entre 25°C y 30°C. Cuando la temperatura alcanza o supera los 35°C, la actividad fotosintética se reduce. Reuther (1973) comprobó que cuando las plantas crecen a altas temperaturas sólo producen brotes vegetativos, cuando el estado hídrico de la planta es óptimo, pero las que crecen a baja temperatura florecen independientemente de la longitud del día. Las bajas temperaturas activan la expresión del gen *FLOWERING LOCUS T* (FT) en las hojas y, por tanto, la inducción floral (Nishikawa *et al.*, 2007).

2.1.2. Estrés hídrico

El déficit hídrico afecta en gran medida el balance hormonal de especies vegetales alterando los procesos fisiológicos del crecimiento y desarrollo de la planta. El crecimiento primario es gracias a los meristemos a través de la división y elongación celular, y está relacionado con las hormonas promotoras de estos procesos (citoquininas, giberelinas y auxinas). La expansión celular se debe también al potencial de turgencia, suministro de sales minerales, agua y materia elaborada (Taiz y Zeiger, 2002); por ello, el desarrollo vegetativo se ve muy afectado por un déficit hídrico (Vélez *et al.*, 2012). En los cítricos, el estrés hídrico aumenta el contenido de ácido abscísico, ácido jasmónico y ácido salicílico, y disminuye las giberelinas en las hojas que están sometidas al estrés (Montoliu, 2010). El contenido de éstas se recupera una vez se vuelve a regar la planta (Mahouachi *et al.*, 2005). El ácido abscísico (ABA) es suministrado a las hojas para que éstas cierren sus estomas protegiendo a la planta del estrés hídrico al reducir la transpiración (Mahouachi *et al.*, 2005). No obstante, los estomas a veces se cierran antes de que se produzca un aumento del ABA en la hoja. El estrés hídrico reduce el gradiente del pH entre el citoplasma y el apoplasto y, como el ABA es mayor cuando el pH es más elevado, promueve el flujo del ABA desde la célula. Por eso los niveles de ABA son mayores en el apoplasto que en otra zona de la hoja. El producido en las raíces puede ser un indicador para la planta de regular su estado hídrico en suelos con poca humedad (Mahouachi *et al.*, 2005; Zhang y Outlaw, 2001).

Durante el período de déficit hídrico se reduce significativamente la brotación y el desarrollo vegetativo. La recuperación del estado hídrico supone el restablecimiento del crecimiento vegetativo y la aparición de nuevos brotes (González-Altozano y Castel, 2003).

2.2 Factores endógenos

El inicio de la brotación, el desarrollo de la yema, requiere de la activación de la división celular en el corpus. Los primordios foliares y la diferenciación de yemas axilares se produce a medida que el meristemo apical progresa. Inicialmente, las trazas de procambium son comunes para los órganos en desarrollo. La diferenciación de elementos vasculares, protoxilema y protofloema, progresa en sentido acrópeto y basípeto a partir del tercer primordio foliar (Agustí, 2003). La división celular requiere el aporte de carbohidratos para satisfacer los requerimientos energéticos, de ahí la dependencia nutricional de la brotación (Martínez-Alcántara *et al.*, 2015). Pero la brotación también depende de factores hormonales. El balance entre auxinas, citokininas y giberelinas determina que en el meristemo se promueva la diferenciación o la división (Moubayidin *et al.*, 2010). Las fitohormonas también regulan la inhibición de la brotación axilar mediante los procesos de dominancia apical (Bangerth *et al.*, 2000).

2.2.1. Factores nutricionales

En estos últimos, se ha señalado la necesidad de un nivel umbral mínimo de carbohidratos para que la brotación tenga lugar (García-Luis *et al.*, 1995; Goldschmidt, 1999). La presencia del fruto reduce significativamente la brotación y la floración de la primavera. El esfuerzo energético que un árbol realiza para completar su actividad productiva durante un ciclo de producción, supone un agotamiento de las reservas en carbohidratos (Goldschmidt y Golomb, 1982) y elementos minerales (Golomb y Goldschmidt, 1981), y la brotación de primavera es menor.

La eliminación de los frutos durante el verano modifica inmediatamente el contenido foliar en azúcares solubles (Martínez-Fuentes *et al.*, 2010). El fruto en desarrollo inhibe el desarrollo vegetativo por su competencia por los carbohidratos. Los árboles con fruto acumulan entre 60 y 300 veces más carbono en los frutos que en los brotes vegetativos en las brotaciones de primavera y verano, respectivamente (Martínez-Alcántara *et al.*, 2015). Por todo ello, la eliminación de los frutos durante la primavera o el verano incrementa significativamente la brotación (Verreyne y Lovatt, 2009).

2.2.2. Factores hormonales

Las giberelinas (GAs) constituyen un grupo de hormonas vegetales que controlan diversos aspectos del desarrollo como la germinación de las semillas, la expansión de las hojas, la elongación del tallo y de la raíz, el tiempo de la floración y el desarrollo de la flor y el fruto (Sponsel y Hedden, 2004; Swain y Singh, 2005). Su papel en la regulación de la elongación celular y la división celular se ha puesto de manifiesto (Nelissen *et al.*, 2012), por lo que regulan el crecimiento del brote. Así, la aplicación de giberelinas al inicio de la brotación estimula el crecimiento de los brotes iniciados y de sus hojas (Agustí, 2003), pero su aplicación justo antes de la brotación la inhibe (Guardiola *et al.*, 1982).

Durante el crecimiento de los brotes, se ha demostrado la relación entre las giberelinas y las auxinas. Cuando se decapita una planta de guisante, la elongación de tallo se detiene y, no sólo se reduce la cantidad de auxinas, sino que también disminuyen el nivel de GA₁, giberelinas activas, en la parte cercana al ápice del tallo. La yema apical promueve el crecimiento tanto por síntesis de auxinas como por síntesis de la giberelina GA₁ inducida por la auxina (Ross *et al.*, 2000; Ross y O'Neil, 2001).

Las auxinas regulan el mantenimiento de la dominancia apical (Mok y Mok, 2001). La dominancia apical consiste en un efecto inhibitorio de la yema apical sobre las yemas laterales. Las auxinas son producidas en el ápice y las hojas en expansión de los brotes que están creciendo y se transportan basípetamente con el concurso de proteínas transportadoras localizadas en la parte basal de las células (proteínas PIN1) (Taiz y Zeiger, 2006). Domagalska y Leyser (2011) indican que para que una yema brote es esencial que las auxinas que tiene las exporte, por lo que se produce una competición entre las yemas para exportarlas. La yema dominante establece una corriente de exportación impidiendo que otras se activen. Bangerth *et al.*, (2000) propusieron la hipótesis de la autoinhibición del transporte de auxinas (ATA, *auxin-transport-autoinhibition*) entre órganos en crecimiento dominantes y dominados: el transporte anterior y más intenso desde el órgano dominante (ápice, hoja o fruto) inhibe el transporte basípeto del órgano dominado (yema axilar) en la zona de confluencia del tallo, restringiendo su desarrollo. Como las auxinas no actúan directamente sobre la

yema se ha propuesto la acción de un mensajero secundario (Agustí y Greb, 2013). La auxina regula la producción de citoquininas negativamente y puede estimular la síntesis de estrigolactonas (Domagalska y Leyser, 2011).

Por otra parte, las citoquininas, que son producidas mayoritariamente en las raíces, también se sintetizan en los brotes, y transportadas acrópetamente en el xilema, promueven el crecimiento de las yemas laterales. La brotación está controlada por la relación de auxinas/citoquininas. Una aplicación directa de citoquininas a las yemas axilares, en algunas especies, estimula la actividad de división celular y el crecimiento (Taiz y Zeiger, 2006).

HIPÓTESIS

En resumen, el fruto en desarrollo supone un potente sumidero de carbohidratos restringiendo la brotación, el desarrollo vegetativo y la floración. La brotación vegetativa producida durante un ciclo productivo sustenta la floración del siguiente ciclo, y por tanto, la producción del árbol. La inhibición que ejerce el fruto en desarrollo sobre las yemas axilares es un mecanismo hormonal basado en su capacidad sumidero. Por ello, en este trabajo se plantea la siguiente hipótesis: la reducción de la disponibilidad de CHs del fruto en crecimiento, mediante la interrupción del transporte floemático entre el fruto y el brote, modifica el balance hormonal en las yemas permitiendo la brotación y aumentando, indirectamente, la floración.

De ella derivan los siguientes **objetivos**:

1. Determinar el efecto del rayado del pedúnculo del fruto en la brotación de otoño y la brotación y floración de primavera.
2. Determinar la distribución hormonal a lo largo del brote y su relación con la brotación.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL VEGETAL Y DISEÑO DEL EXPERIMENTO

Los experimentos se realizaron en 10 árboles adultos de tangor 'Nadorcott' (*Citrus reticulata* Blanco x *Citrus sinensis* (L.) Osb.) injertados sobre citrange Carrizo (*Citrus sinensis* (L.) Osb. x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.), situados en una plantación comercial localizada en Pedralba (Valencia), que disponía de condiciones normales de riego localizado, fertilización y cultivo.

Se seleccionaron 100 brotes campaneros (ON) de 5-6 nudos de longitud y 70 brotes vegetativos (OFF). Los brotes se seleccionaron al azar alrededor del árbol, en 10 árboles diferentes. En la mitad de los brotes campaneros se rayó el pedúnculo del fruto (RYD) al final del mes de agosto (25/8). Durante los días siguientes al tratamiento se evaluó la brotación de las yemas axilares, cada 4-5 días durante las 7 semanas posteriores al tratamiento, cuando la brotación finalizó. En ese momento, se determinó la longitud de los brotes emitidos. En la primavera siguiente, se evaluó la brotación y la floración en 30 brotes por tratamiento. En ese momento, se determinó la influencia del rayado en las características del fruto maduro, evaluando el peso del fruto (g), el diámetro (mm) mediante un pie de rey (Mitutoyo, Japón), el color de la piel y de la pulpa mediante un colorímetro (coordenadas Hunter) (Minolta, Japón), y los sólidos solubles totales mediante un refractómetro digital (Atago, Japón).

2. METODOLOGÍA

2.1 Toma y procesado de muestras.

Para el análisis endógeno hormonal, se muestrearon 20 brotes por tratamiento justo antes del inicio la brotación 11 días después del rayado (5/9). Además, en los brotes OFF se muestrearon 20 brotes el 25/8. Los brotes se almacenaron en frío hasta el laboratorio, donde se procesaron, separando, en los brotes OFF, el ápice y cada nudo manteniendo su posición relativa en el brote (1 más próximo al ápice, 5 más alejado al ápice). Del brote campanero, se separó el flavedo, la pulpa y cada nudo individualmente, manteniendo también su posición relativa en el brote. Una vez

procesados se congelaron y trituraron con nitrógeno líquido y se liofilizaron para su análisis hormonal.

2.2 Análisis hormonal

Para analizar el contenido endógeno de ácido indolacético (AIA), ácido abscísico (ABA), citoquininas (CKs), giberelinas (GAs) y ácido jasmónico (JA) se procedió del siguiente modo: para la extracción hormonal alícuotas (50 mg) duplicadas de cada muestra fueron extraídas con metanol 80%: ácido acético 1% (v/v) en presencia de diferentes estándares internos (hormonas marcadas con Deuterium para cuantificar las pérdidas de cada hormona inherentes al proceso de extracción [proporcionadas por Prof. L Mander- Camberra, OlChemim Ltd - Olomouc, o Cambridge Isotope Lab - Andover]: [17,17-2H]-GAn, [2H5]-IAA y [2H6]-ABA). Estos estándares fueron añadidos para la cuantificación de cada una de las diferentes giberelinas (GA₁ y GA₄), AIA, y ABA. Para la cuantificación del JA se usó el compuesto dhJA como estándar interno. En el caso de las citoquininas (CK), se utilizaron diferentes citoquininas deuteradas como estándares internos (D-tZ).

Para recuperar la fracción ácida donde se localizan las GA₁, GA₄, IAA, ABA y JA, los extractos pasaron consecutivamente a través de columnas HLB en fase reversa, MCX (intercambio catiónico) y WAX (intercambio iónico) (Oasis 30 mg. Waters) como se describe en Seo *et al.*, (2011). Para la recuperación de la fracción básica, donde se localizan las citoquininas, las muestras pasaron en primer lugar a través de un cartucho HLB (elución CH₃CN80: Ácido acético 1%) y a continuación a través de una columna MCX. Las muestras se llevaron a sequedad en rotovapor.

El residuo seco fue disuelto en acetonitrilo al 5% y ácido acético al 1% y las hormonas fueron separadas usando ultra-cromatografía en fase reversa (UPHL) mediante una columna RP-MS Accucore 2,6 µm (50 mm x 2,1 i.d.: Thermo Fisher Scientific) con un gradiente de acetonitrilo del 5 al 50%, tras lo cual fueron detectadas y analizadas en un espectrómetro masas/masas (Q-exactive Orbitrap detector, Thermo Fisher Scientific). Las concentraciones hormonales finales de los extractos fueron determinadas usando las curvas de calibración realizadas previamente. La

interpretación de los resultados se realizó mediante los programas Xcalibur 2.2 SP1 y TraceFinder.

2.3 Análisis estadístico de los resultados

Los resultados obtenidos se evaluaron estadísticamente mediante un análisis de la varianza (ANOVA), utilizando la mínima diferencia significativa (LSD) para la separación de las medias. Los datos experimentales se analizaron con el software Statgraphics Centurion XVI (Gráficos estadísticos, Englewood Cliffs, NJ, EE.UU.). A los datos porcentuales se les aplicó la transformación $\arcsen(p^{1/2})$.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. EFECTO DEL AISLAMIENTO PARCIAL DEL FRUTO SOBRE LA BROTACIÓN.

La presencia del fruto en el brote impide la brotación de las yemas axilares. Por ello, el aclareo de frutos en los meses de junio y julio permite un aumento de la brotación de verano y otoño (Verreyme y Lovatt, 2009); además, la eliminación de frutos también afecta al número de brotes por nudo y, consecuentemente, al número de flores producidas en la primavera siguiente (Martínez-Fuentes *et al.*, 2010).

El efecto inhibitorio del fruto sobre la brotación de final de verano se ratificó con el experimento del micro-rayado. La interrupción del transporte por el floema a través de un micro-rayado en el pedúnculo del fruto al final del verano (25/8) modificó significativamente la brotación de las yemas adyacentes (**Figura 1**). Así, 11 días después del tratamiento (DDT), las yemas adyacentes a los frutos micro-rayados (RYD) iniciaron la brotación en un 15% de los brotes, llegando al 45% de los brotes rayados 22 DDT. Por el contrario, las yemas de los brotes control con fruto (ON) no brotaron (**Figura 1**).

Por otra parte, los brotes vegetativos (OFF) también brotaron, como se esperaba, pero siguiendo una pauta diferente a la de los brotes RYD. Así, mientras la brotación de los brotes RYD creció exponencialmente entre 10 y 22 DDT, la brotación de los brotes OFF se detuvo, alcanzando el 8-10% de los brotes. Pero a partir de 25 DDT, la brotación aumentó significativamente en los brotes OFF alcanzando el 40% 49 DDT (**Figura 1**).

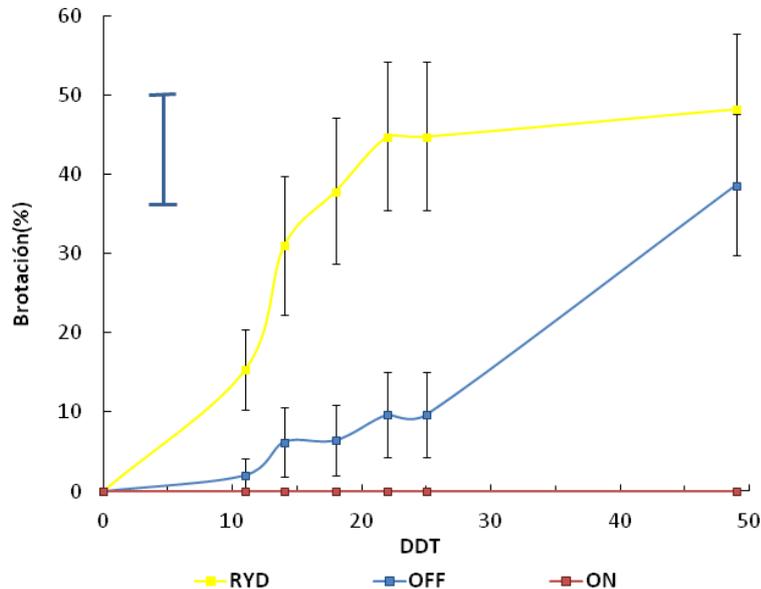


Figura 1. Evolución del porcentaje de brotación de final del verano en brotes campaneros (ON) y brotes vegetativos (OFF) del mandarino Nadorcott. Influencia del micro-rayado del pedúnculo del fruto (RYD). Cada valor es la media de 50 brotes. Las barras verticales representan el error estándar. La barra azul mostrada a la izquierda del gráfico corresponde al intervalo LSD.

Este aumento de la brotación OFF se relacionó con una bajada significativa de la temperatura máxima (**Figura 2**). La brotación está controlada por los cambios de temperatura entre las estaciones. Entre el invierno y la primavera, cuando la temperatura es superior a los 12°C comienza la brotación de las yemas. Con el tiempo, las hojas se desarrollan completamente y se forman las yemas axilares, al mismo tiempo que el tallo se elonga. Pero cuando la temperatura estival alcanza un valor superior al umbral de crecimiento (35-40°C), el desarrollo del tallo cesa y el meristemo se protege (Agustí, 2004). La temperatura óptima para que haya actividad fotosintética se encuentra entre 25°C y 30°C. Cuando la temperatura alcanza o supera los 35°C, la actividad fotosintética se reduce (Agustí, 2003). Cuando la temperatura desciende al inicio del otoño se reinicia la actividad vegetativa, produciéndose la brotación de otoño (Agustí, 2004).

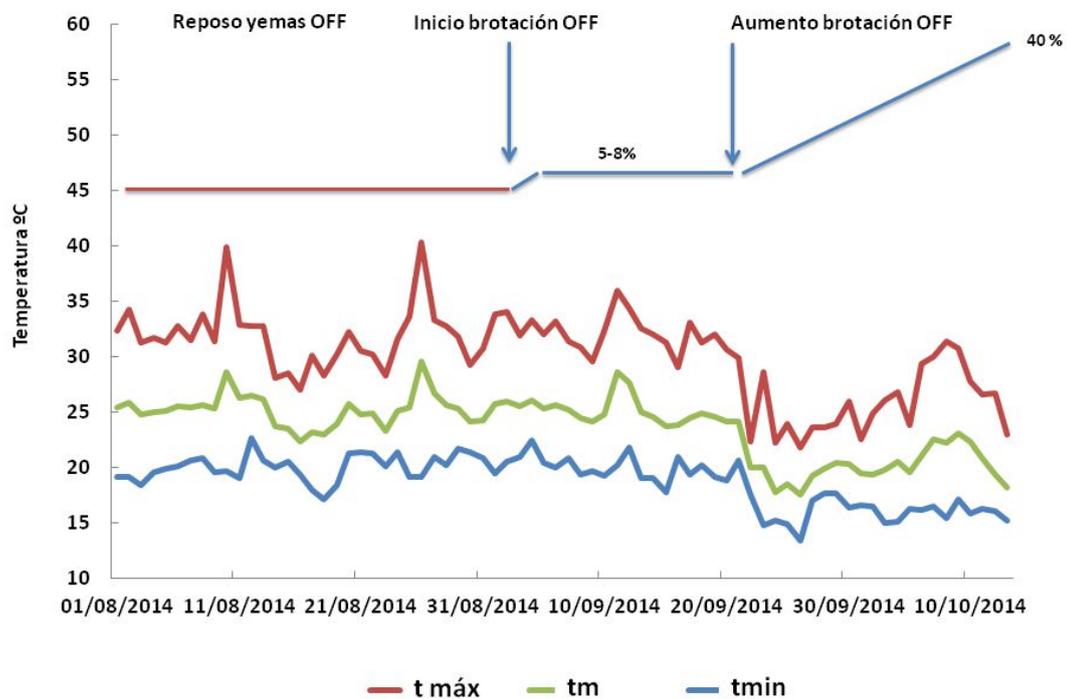


Figura 2 Evolución de la temperatura desde el 1 de agosto hasta el 15 de octubre; t máx (temperatura máxima), tm (temperatura media) y t min (temperatura mínima). El inicio de la brotación OFF comenzó el 5/9, hasta alcanzar el 8% de brotación, luego se mantuvo constante hasta que descendió significativamente la temperatura el 20/9 y aumentar la brotación hasta el 40%.

Sin embargo, el inicio de la brotación en los brotes OFF se produjo con anterioridad (5/9) a esta bajada de la temperatura (22/9). Además, el aumento de la brotación de los brotes RYD se produjo de un modo independiente a la evolución de la temperatura (**Figura 1**). Todo ello, sugiere la influencia de factores endógenos regulando la brotación.

Esta hipótesis se refuerza al estudiar la cuantía de la brotación en función de la posición de la yema en el brote, ya que las yemas más cercanas al ápice/fruto brotan antes y más intensamente que las que se encuentran en la base del brote, como se muestra en los resultados obtenidos en campo (**Figura 3**). La brotación en

los nudos 1, 2 y 3 de los brotes RYD, los más cercanos al fruto y, por tanto, al micro-rayado, fue significativamente mayor que la del nudo 4 a los 11 DDT. A partir del nudo 5 no hubo brotación hasta 25 DDT. Esta diferencia cuantitativa se mantuvo hasta el final del experimento. En el brote OFF, solamente brotaron los nudos 1 y 2, sin diferir significativamente entre ellos, 11 DDT. A los 25 DDT se observó brotación en los nudos 3 y 4. Al final del experimento, 49 DDT, no hubo diferencias entre los brotes RYD y OFF. Los brotes ON no brotaron en ningún momento (**Figura 3**).

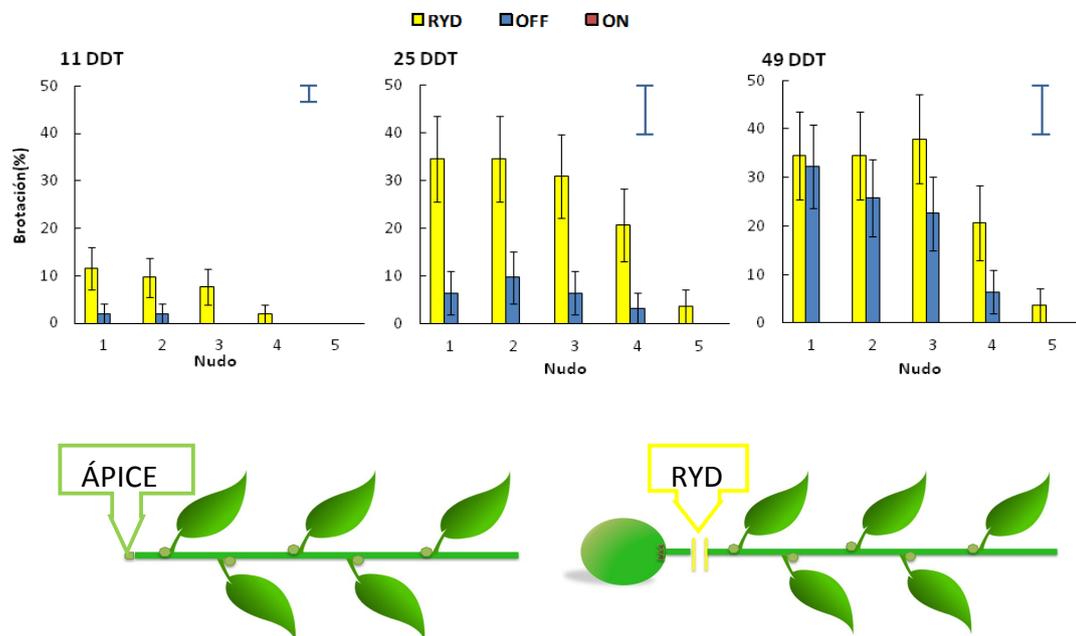


Figura 3. Distribución de la brotación de final del verano a lo largo de los nudos en brotes campaneros (ON) y brotes vegetativos (OFF) del mandarina Nadorcott. Influencia del micro-rayado del pedúnculo del fruto (RYD). Cada valor es la media de 50 brotes. El nudo 1 corresponde al más cercano al fruto/ápice, mientras que el nudo 5 al más alejado. Las barras verticales representan el error estándar. La azul barra mostrada a la derecha del gráfico corresponde al intervalo LSD.

La longitud de los nuevos brotes procedentes de las yemas axilares en los brotes RYD fue mayor que en los brotes OFF, alcanzado el máximo (59 mm) en el nudo 3. En los brotes OFF, la longitud de los nuevos brotes no superó los 12 mm (**Figura 4**). En estudios realizados en el guisante por Ferguson y Beveridge (2009), el anillado en el brote también originó un aumento de la brotación y longitud de las yemas próximas al rayado.

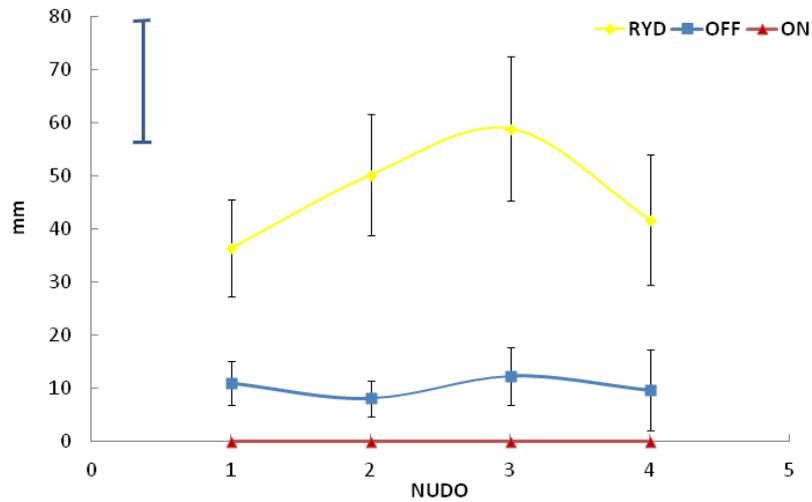


Figura 4. Longitud de la brotación de final del verano a lo largo de los nudos en brotes campaneros (ON) y brotes vegetativos (OFF) del mandarino Nadorcott. Influencia del micro-rayado del pedúnculo del fruto (RYD). Cada valor es la media de 5 brotes. El nudo 1 corresponde al más cercano al fruto/ápice, mientras que el nudo 5 al más alejado. Las barras verticales representan el error estándar. La azul barra mostrada a la derecha del gráfico corresponde al intervalo LSD.

El micro-rayado no provocó la abscisión de los frutos, que permanecieron en el brote hasta la recolección. Sin embargo, el micro-rayado modificó significativamente el desarrollo del fruto. Así, en el momento de la recolección 7 meses después del tratamiento (marzo), los frutos de los brotes RYD fueron más pequeños, su exocarpo se mantuvo verde, aunque no su pulpa, y acumularon menos SST (**Tabla 1**). Estos efectos se relacionan con la interrupción del transporte de carbohidratos (sacarosa) al fruto y la mayor acumulación de GA₄ en el exocarpo (Gambetta *et al.*, 2012).

Tabla 1. Características del fruto maduro de brotes control y rayado en el momento de la recolección (7 meses después del tratamiento). Cada valor es la media de 10 frutos. n.s: no significativo.

	Control	Rayado	Significación
Peso (g)	93±23	33±8	$\rho \leq 0.05$
Diámetro (mm)			
longitudinal	58±5	43±3	$\rho \leq 0.05$
transversal	47±6	34±2	n.s.
Color (HLab)			
piel			
a	29±1	-1±0,9	$\rho \leq 0.05$
b	34±0,5	20±1	$\rho \leq 0.05$
a/b	0,9±0	-0,07±0,10	$\rho \leq 0.05$
pulpa			
a	11±0,4	11±0,4	n.s.
b	20±0,3	21±0,3	n.s.
a/b	0,55±0,02	0,53±0,02	n.s.
SST (°Brix)	16±0.5	9±0.2	$\rho \leq 0.05$

El micro-rayado del pedúnculo también incrementó la floración de la primavera siguiente. Mientras los brotes ON no florecieron, en los brotes RYD se observó un promedio de 45 flores por brote siendo los nudos que más brotaron los que más florecieron (**Figura 5B**). Pero las flores solamente se formaron en aquellos brotes en los que el micro-rayado estimuló la brotación de otoño (**Figura 5A**). Esto es, que el efecto del rayado no es directo sobre la inducción floral sino indirecto sobre la brotación de otoño, que sustenta la brotación de primavera. Por ello, Agustí *et al.* (1992) observaron que la respuesta óptima para estimular la floración en plantaciones de cítricos mediante el rayado de ramas se obtiene cuando se efectúa en verano. Verreyne y Lovatt (2009) también indican la importancia de la

brotación de otoño mediante experimentos de aclareo al inicio del verano en el mandarino 'Pixie'. El efecto es, por tanto, general, como también se observa al evaluar la floración en los brotes vegetativos: los nudos que más brotaron en otoño más florecieron en primavera (Figura 5).

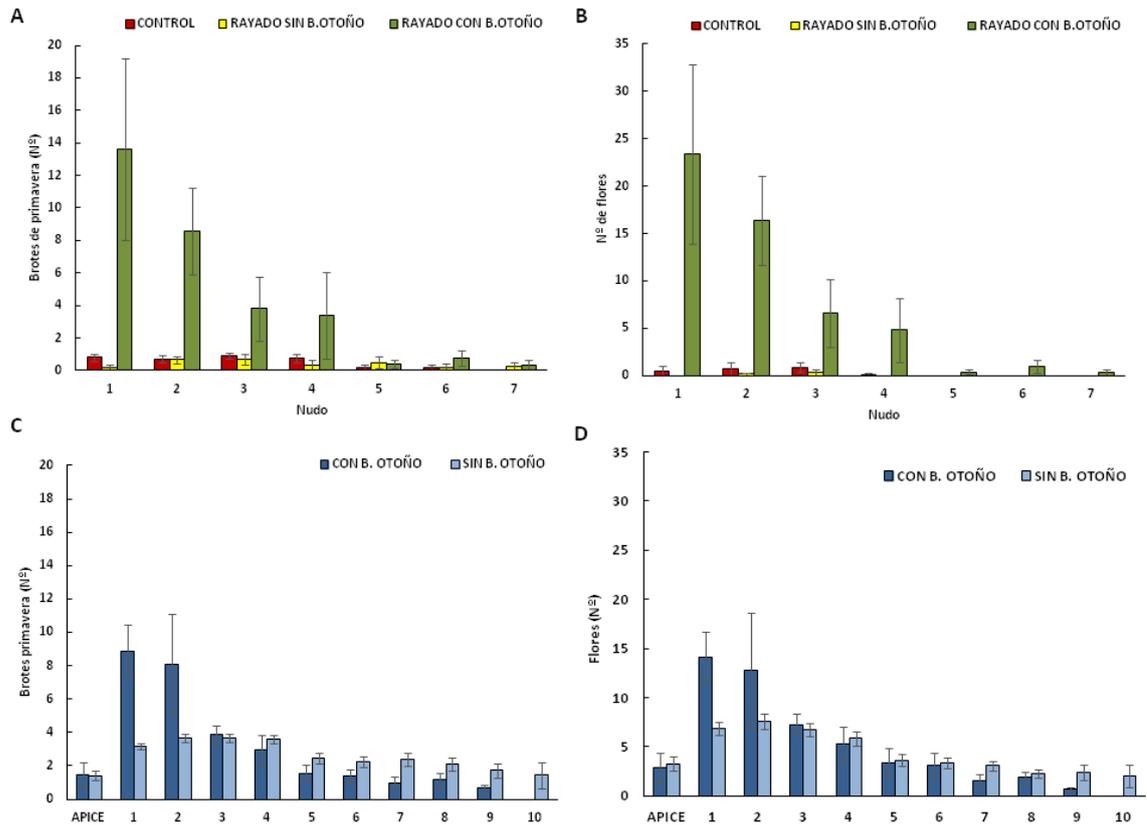


Figura 5. Influencia del rayado del pedúnculo (verano 2014) en la brotación y floración de primavera (marzo 2015). Número de brotes de primavera (A y C) y flores (B y D) por nudo, en brotes OFF (A y B) y brotes ON (C y D) control y rayados; Con B. Otoño: indica que el brote seleccionado brotó en otoño y la brotación de primavera 2015 se ha evaluado sobre nudos de primavera 2014 y nudos de otoño 2014; Sin B. Otoño: indica que la brotación de primavera 2015 se ha evaluado sobre nudos de primavera 2014. Cada valor es la media de 10 brotes. Las barras verticales representan el error estándar.

2. EVOLUCIÓN DEL CONTENIDO HORMONAL DE LOS BROTES DURANTE LA BROTAÇÃO DE OTOÑO

Bangerth *et al.*, (2000) propusieron la hipótesis de la autoinhibición del transporte de auxinas (*ATA, auxin-transport-autoinhibition*) entre órganos en crecimiento dominantes y dominados: el transporte anterior y más intenso desde el órgano dominante inhibe el transporte basípeto del órgano dominado en la zona de confluencia. Como se ha demostrado en el níspero japonés, la presencia del fruto en crecimiento restringe el crecimiento de las partes vegetativas hasta que el fruto culmina su desarrollo (Reig *et al.*, 2014). En esta especie, el contenido de AIA en el floema de brotes con fruto es significativamente mayor que el de brotes aclarados (Reig *et al.*, 2014). El micro-rayado del pedúnculo modificó el contenido de AIA a lo largo del brote. En los brotes ON, la concentración de AIA del fruto fue de 7 ng g^{-1} tanto en el flavedo (F) como en la pulpa (P) (**Figura 6**). La concentración de AIA fue significativamente mayor en los nudos del brote ON que en el fruto, alcanzando un valor máximo de 200 ng g^{-1} en el nudo 3 (**Figura 6**).

Por otra parte, en los brotes RYD, el contenido de AIA se redujo significativamente en la pulpa (2 ng g^{-1}) y en los nudos respecto del brote ON, alcanzando un valor máximo de 100 ng g^{-1} en el nudo 3 (**Figura 6**). La reducción del transporte de carbohidratos hacia el fruto provocado por el micro-rayado (Gambetta *et al.*, 2012), reduce su capacidad de crecimiento, hecho que explicaría la reducción de síntesis de AIA en la pulpa. Ello, junto con la interrupción física del transporte por el floema (Ferguson *et al.*, 2009), reducen el transporte basípeto y contenido de AIA en los nudos. El fruto, a través del AIA también regula la diferenciación de los vasos xilemáticos y el ensanchamiento de las tráqueas del xilema (Mesejo *et al.*, 2003; Agustí y Greb., 2013; Aloni, 2015).

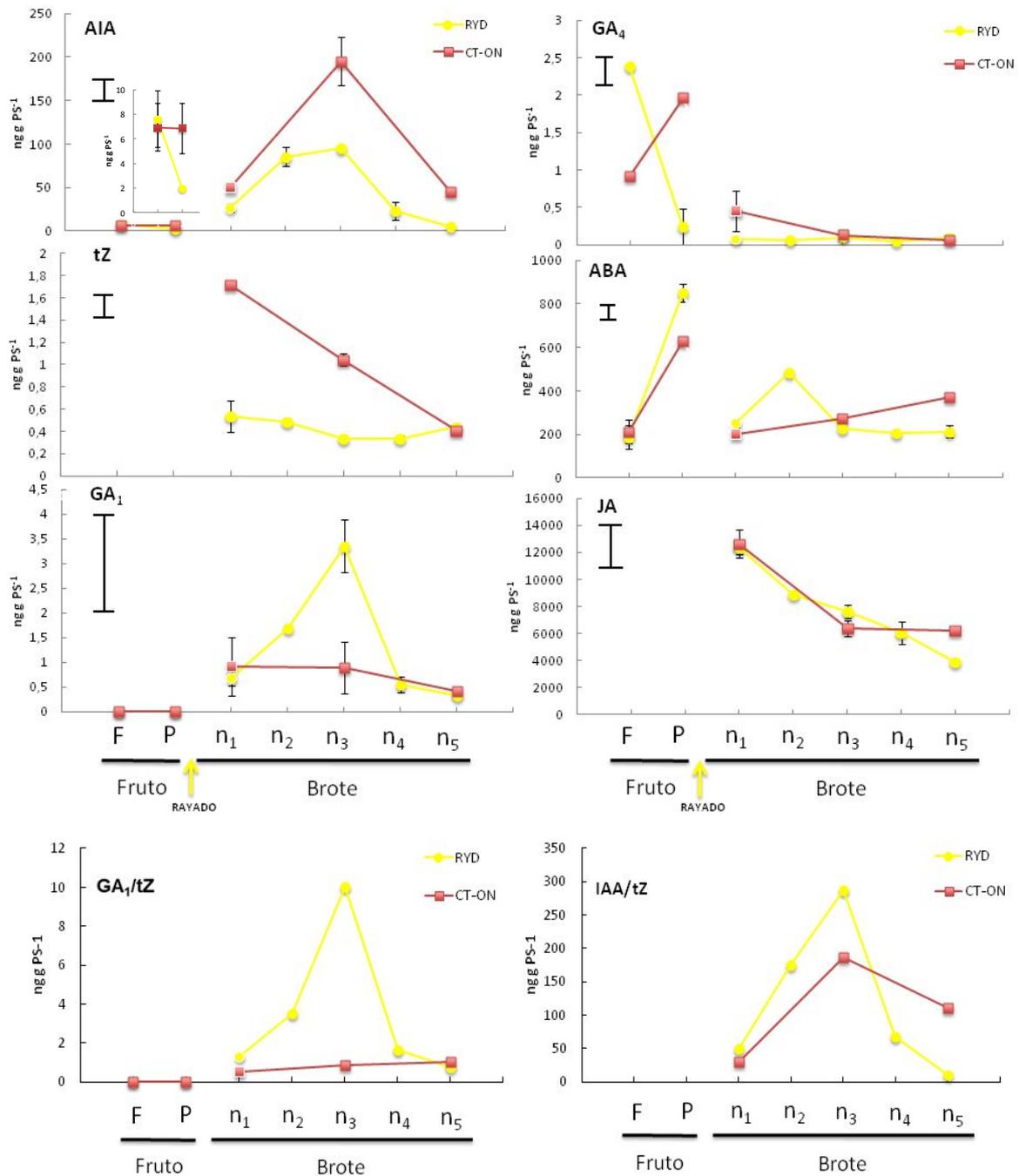


Figura 6. Evolución de la concentración de GA₁, GA₄, AIA, ABA, tZ, y JA a lo largo de los brotes ON y RYD a los 11ddt; evolución de las relaciones de GA₁/tZ, giberelina activa 1 con zeatina (citoquinina), y la relación de IAA/tZ, ácido indolacético con zeatina, a lo largo de los brotes on a los 11ddt. F: flavedo; P: pulpa; n₁-n₅: nudos adyacentes al fruto, del 1-5. El micro-rayado se realizó en el pedúnculo, entre el fruto y el nudo 1. Cada valor es la media de 2 réplicas biológicas. Las barras verticales representan el error estándar. La barra negra mostrada a la izquierda del gráfico corresponde al intervalo LSD.

Para que el crecimiento lateral de la yema se inicie es necesario que, además de la reducción del transporte de AIA, se produzca la síntesis de citocininas (CKs) (Bangerth *et al.*, 2000), ya que solamente la reducción del transporte de AIA no es suficiente para el crecimiento lateral de las yemas (Ferguson *et al.*, 2009). Pero la concentración de *trans*-zeatina (*t*-Z) fue significativamente mayor en los brotes ON que en los brotes RYD (**Figura 6**). Resultados similares se observaron en el níspero japonés, al comparar brotes con fruto y brotes aclarados (Reig *et al.*, 2014). En esta especie, la mayor brotación de los brotes aclarados se explicó a través de la menor relación AIA/*t*-Z (inhibidor/promotor del crecimiento lateral en los brotes) (Reig *et al.*, 2014). Pero la relación AIA/*t*-Z en los nudos del brote RYD no correlacionó con la brotación (**Figura 6**). Si la síntesis de CKs no se produce, la brotación de las yemas se inhibe (Ferguson *et al.*, 2009). El nivel basal de *t*-Z encontrado en todos los nudos del brote RYD podría ser suficiente para promover la diferenciación de la yema lateral, y, su crecimiento, dependería de otra hormona.

La concentración de GA₁ observada en los nudos de los brotes ON y RYD podría explicar las diferencias encontradas en la brotación. En el brote ON, la GA₁ apenas se modificó a lo largo del brote, y su concentración no superó 1 ng·g⁻¹ (**Figura 6**). Por el contrario, el brote RYD mostró a partir del nudo 1 un crecimiento significativo de la concentración de GA₁, alcanzando el máximo valor en el nudo 3, que fue más de tres veces superior al del control ON (3,4 ng·g⁻¹ y 0,9 ng·g⁻¹ respectivamente). Por otra parte la GA₄, no mostró diferencias significativas entre los nudos de brotes ON y RYD encontrándose valores entre 0,45 ng·g⁻¹ y 0,06 ng·g⁻¹ (**Figura 6**). El micro-rayado provocó un aumento de la GA₄ en el exocarpo (Gambetta *et al.*, 2012 también observaron este efecto) y una disminución en la pulpa. Hartman *et al.*, (2011) indicaron que la reactivación del meristemo y su crecimiento requiere de la acción conjunta de CKs y GAs. Las GAs por sí solas no son capaces de reactivar el crecimiento pero sí de estimularlo, mientras que las CKs son necesarias para romper la dominancia impuesta por el fruto a través del flujo

basípeto de auxinas (Hartman *et al.*, 2011). La longitud de los brotes formados en los brotes RYD y OFF correlaciona con la concentración de GA₁ (**Figura 4**). La mayor relación GA₁/*t*-Z se relaciona con la mayor brotación en los brotes RYD (**Figura 6**).

Como en los tejidos del fruto no se encontró GA₁ en ningún caso, el aumento observado en los nudos de los brotes RYD debe estar provocado por un aumento de su síntesis en los tejidos de la yema o la hoja. La acumulación de ambas giberelinas cerca del rayado podría ser un mecanismo para reparar la herida provocada por el micro-rayado (Martínez-Fuentes, 2010). En este sentido, Asahina *et al.*, (2002) demostraron que la síntesis de GAs es necesaria para la regeneración de córtex dañado mecánicamente. De este modo, los nudos próximos al microrayado se aprovecharían de este flujo de GAs para brotar.

A pesar de la cantidad de información que relaciona las auxinas y citokininas con el control de la brotación, nuestros resultados muestran algunas incongruencias. Por ejemplo, el contenido endógeno de AIA en los nudos RYD no correlaciona con la brotación. Así, el nudo 5, que no brota, es el que menor concentración de AIA presenta (**Figura 6**), y sin embargo presenta la misma concentración de *t*-Z y GA₁ que el nudo 1, el que más brota (**Figura 6**). Recientemente, Mason *et al.*, (2014) demuestran mediante experimentos en el guisante que la brotación correlaciona mejor con la demanda y disponibilidad de carbohidratos, como fuente de carbono para sustentar la división celular, que con las auxinas. En este sentido, el rayado provoca una acumulación de carbohidratos en el floema (Gambetta *et al.*, 2012), lo podría haber influido en la mayor brotación más próximas al rayado. Sin embargo, la disponibilidad de carbohidratos del nudo 5 no debe estar comprometida, por lo que otros factores a parte de los carbohidratos deben regular el proceso.

El AIA, a pesar de regular la dominancia apical, no lo hace directamente sobre la yema en reposo, sino que su acción se ejecuta en el tallo a través de un mensajero secundario, dependiente de la acción del AIA, que actúa sobre el meristemo (Bangerth *et al.*, 2000; Agustí y Greb, 2013). Bangerth *et al.* (2000)

propusieron que el ABA podría actuar conjuntamente con el AIA, y, recientemente, Shalom *et al.* (2014) demostraron la mayor concentración de ABA y sus catabolitos en las yemas adyacentes al fruto en comparación con las yemas de brotes vegetativos, sugiriendo un papel promotor del reposo de la yema. Sin embargo, la concentración de ABA en los brotes RYD y ON no se relacionó con las diferencias en la brotación (**Figura 6**). El mayor contenido de ABA en la pulpa podría ser debido al inicio de la síntesis de carotenoides que determinan el cambio de color (Rodrigo *et al.*, 2003).

Finalmente, el ácido jasmónico (JA) se ha relacionado con procesos de respuesta a estrés abiótico (Arbona y Gómez-Cadenas, 2008) o biótico (Wasternack *et al.*, 2013). Pero, recientemente, se ha puesto de manifiesto su relación con el desarrollo del cambium en brotes en desarrollo (Sehr *et al.*, 2010). En los brotes con fruto, RYD y ON, se encontró una concentración elevada de JA y decreciente a lo largo del brote, hecho que se relaciona con el mayor desarrollo vascular que presenta la base del brote. El micro-rayado no produjo ninguna modificación en la concentración de JA (**Figura 6**), por lo que no se relacionó con la brotación. El crecimiento secundario y el crecimiento lateral están inversamente coordinados (Agustí y Greb, 2013), de modo que la inhibición del transporte de AIA inhibe el crecimiento secundario y permite el crecimiento lateral. Pero la relación directa entre el AIA y el JA no está comprobada (Sehr *et al.*, 2010).

Los brotes vegetativos presentaron una concentración de AIA significativamente menor que los brotes con fruto. Así, en ningún caso la concentración de AIA superó 40 ng g^{-1} en los brotes vegetativos mientras que en los brotes con fruto alcanzó 200 ng g^{-1} . Por otra parte, las 2 fechas analizadas, antes de la brotación (25/8), y 11 días después (5/9, inicio de la brotación) no presentaron diferencias significativas en sus nudos (**Figura 7**). Como los brotes seleccionados eran de 4 meses de edad, pues procedían de la brotación de primavera, los resultados sugieren que la pérdida de dominancia apical se produjo con anterioridad al inicio del estudio. No obstante, la concentración de AIA fue

creciente a lo largo del brote (**Figura 7**) y se relacionó con la distribución de la brotación (**Figura 3**). La menor concentración de AIA junto con el mayor contenido de GA₁ en los nudos 1 y 2, y de *t*-Z en el nudo 1 explican su brotación (**Figura 7**).

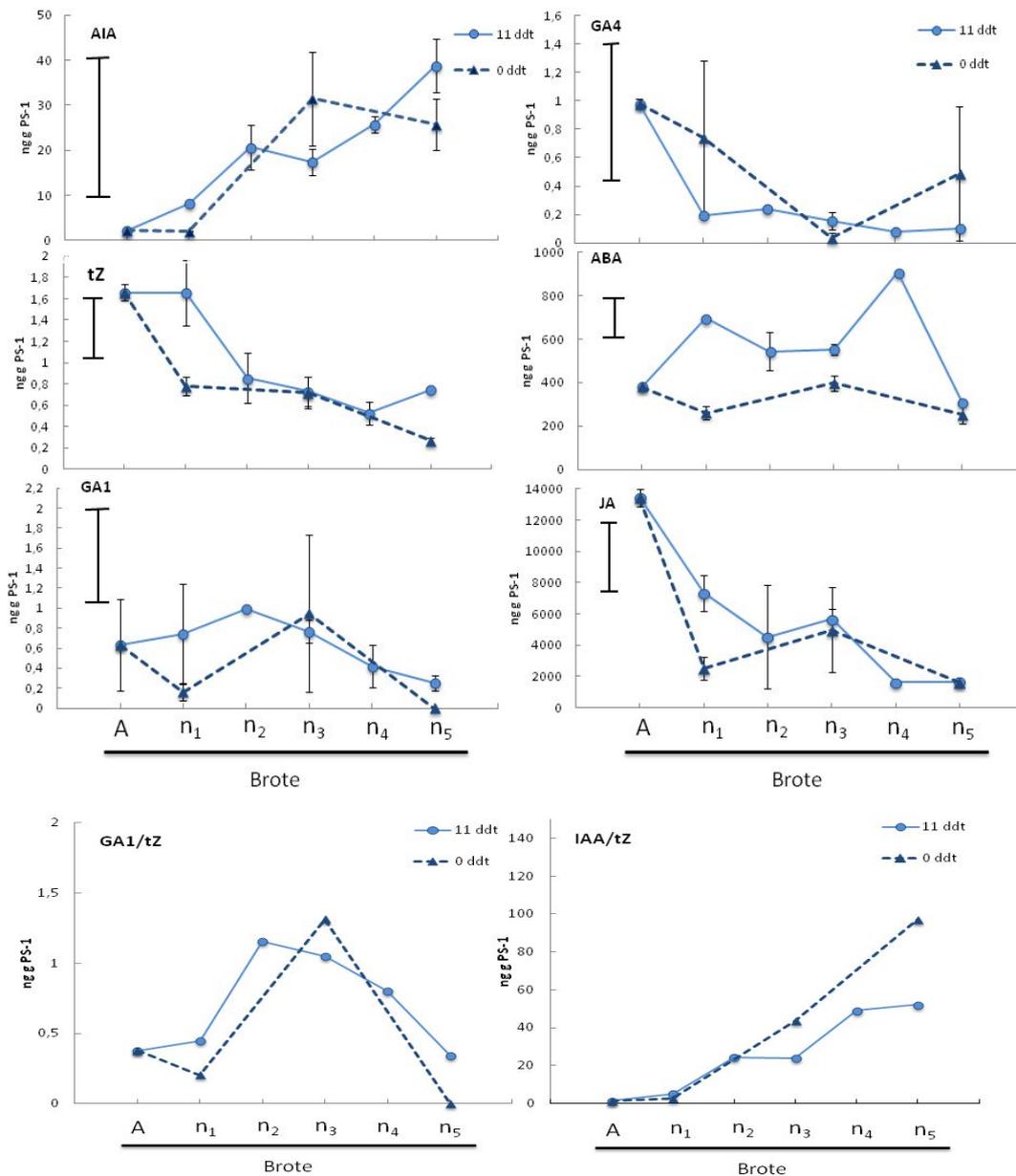


Figura 7. Evolución de la concentración de GA₁, GA₄, AIA, ABA, *t*Z y JA a lo largo del brote *off* en los 0 DDT y 11 ddt. Evolución de las relaciones de GA₁/*t*Z, giberelina activa 1 con zeatina (citoquinina), y la relación de IAA/*t*Z, ácido indolacético con zeatina, a los 0 DDT y 11 DDT en brotes *off*. A, ápice, n₁-n₅, nudos del 1-5. Las barras verticales representan el error estándar.

A diferencia del brote RYD, en el brote OFF la concentración de AIA es creciente desde el ápice a la base, y la de t -Z es decreciente, hecho que se relaciona con las diferencias de brotación entre los nudos. Además, la mayor concentración de GA₁ se observó en los nudos 1 y 2, lo se relaciona con su mayor porcentaje de brotación (**Figura 7**).

Ni el ABA ni el JA se relacionaron con la brotación de los brotes vegetativos. La concentración de ABA fue consistentemente mayor en todos los nudos en el momento de la brotación que 11 días antes (**Figura 7**), mientras que el JA no difirió entre fechas. Sin embargo, sí lo hizo entre nudos del mismo modo que en los brotes con fruto, reforzando su papel en la promoción del crecimiento en grosor de los tejidos más jóvenes.

IV. CONCLUSIONES

1. El rayado del pedúnculo del fruto provocó la brotación de las yemas axilares próximas al fruto, y estimuló el desarrollo de los nuevos brotes.
2. Los brotes con fruto rayado que brotaron en otoño florecieron en primavera.
3. El rayado del pedúnculo del fruto provocó una disminución de la concentración de AIA y un aumento de la concentración de GA₁ en los nudos próximos al tratamiento, lo que se relacionó con la brotación de las yemas axilares.

V. BIBLIOGRAFÍA

- [1] AGUSTÍ, M. (1980) Biología y control de la floración en el género *Citrus*. PhD Thesis. Universidad Politécnica de Valencia. España.
- [2] AGUSTÍ, M. (2003). *Citricultura*. Ediciones Mundi Prensa. 2da Edición. Madrid.
- [3] AGUSTÍ, M. (2004). *Fruticultura*. Ediciones Mundi Prensa, Madrid.
- [4] AGUSTÍ, M., ALMELA, V. Y PONS, J. (1992). Effect of girdling on alternate bearing in *Citrus*. *Journal of Horticultural Science*, 67:203-210.
- [5] AGUSTÍ, M. Y CREB, T. (2013). Going with the wind- Adaptive dynamics of plant secondary meristems. *Mechanisms of Development*, 130: 34-44.
- [6] ALONI, R. (2015). Ecophysiological implications of vascular differentiation and plan evolution. *Trees*, 29:1-16.
- [7] ARBONA, V. Y GOMEZ-CADENZAS, A. (2008). Hormonal Modulation of Citrus Responses to Flooding. *J. Plant Growth Regul*, 27: 241-250.
- [8] ASAHINA, M., IWAI, H., KIKUCHI, A., YAMAGUCHI, S., KAMIYA, Y., KAMADA, H. Y SATOH, S. (2002). Gibberellin Produced in the Cotyledon Is Required for Cell Division during Tissue Reunion in the Cortex of Cut Cucumber and Tomato Hypocotyls. *Plant Physiology*, 129:201-210.
- [9] BANGERTH, F., LI C. Y GRUBER, J. (2000). Mutual interaction of auxin and cytokinins in regulating correlative dominance. *Plant Growth Regulation*, 32:205–217.
- [10] CRANE, J.C., AL-SHALAN, I. Y CARLSON, R.M. (1973). Abscission of pistachio inflorescence buds as affected by leaf area and number of nuts. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 98: 591-592.
- [11] DAVIES, F.S. Y ALBRIGO, L.G. (1994). *Citrus*. CAB Intl., UK.
- [12] DOMAGALSKA, M.A. Y LEYSER, O. (2011). Signal integration in the control of shoot branching. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 12: 211–221.

- [13] FERGUSON, B.J. Y BEVERIDGE, C.A. (2009). Roles for Auxin, Cytokinin, and Strigolactone in Regulating Shoot Branching. *Plant Physiology*, 149: 1924-1944.
- [14] GAMBETTA, G., MARTÍNEZ-FUENTES, A., BENTANCUR, O., MESEJO, C., REIG, C., GRAVINA, A. Y AGUSTÍ, M. (2012). Hormonal and Nutritional Changes in the Flavedo Regulating Rind Color Development in Sweet Orange [*Citrus sinensis* (L.) Osb.] *J. Plant Growth Regul*, 31:273-282.
- [15] GARCÍA-LUÍS, A., FORNES, F., SANZ, A. Y GUARDIOLA, J.L. (1995). Leaf carbohydrates and flower formation in Citrus. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 120(2): 222-227.
- [16] GARCÍA-LUÍS, A. Y GUARDIOLA, J.L. (2000). Influence of citrus internal factors and climatic effects on flowering. *Proceedings of the International Society of Citriculture IX Congr.* 2000: 292-295.
- [17] GOLDSCHMIDT, E.E. (1999). Carbohydrate supply as a critical factor for citrus fruit development and productivity. *HortScience*, 34(6): 1020-1024.
- [18] GOLDSCHMIDT, E.E., ASCHKENAZI, N., HERZANO, Y., SCHAFFER, A.A. Y MONSELISE, S.P. (1985). A role for carbohydrate levels in the control of flowering in *citrus*. *Scientia Horticulturae*, 26: 159-166.
- [19] GOLDSCHMIDT, E.E. Y GOLOMB, A. (1982). The carbohydrate balance of alternate-bearing citrus trees and the significance of reserves for flowering and fruiting. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 107(2): 206-208.
- [20] GOLOMB, A. Y GOLDSCHMID, E.E. (1981). Mineral balance of alternate bearing 'Wilking' mandarins. *Alon Hanotea*, 35: 639-647.
- [21] GONZÁLEZ-ALTOZANO, P. Y CASTEL, J.R. (2003). Regulated deficit irrigation in "Clementina de Nules" citrus tree, 2. Effects on vegetative growth. *Spanish Journal of Agricultural Research* 1 (2), 93-101.
- [22] GRAVINA, A. (1999). Ciclo fenológico-reproductivo en *Citrus*. Bases fisiológicas y manejo. Universidad de la República. Facultad de Agronomía. 55p.

- [23] GUARDIOLA, J.L., AGUSTÍ, M. Y GARCÍA-MARÍ, F. (1977). Gibberellic acid and flower bud development in sweet orange. *Proceedings of the International Society of Citriculture*, 2: 696-699.
- [24] GUARDIOLA, J.L., MONERR, I. C. Y AGUSTÍ, M. (1982). The inhibitory effect of gibberellic acid on flowering in citrus. *Physiologie Plantarum*, 55: 136-142.
- [25] HARTMANN, A., SENNING, M., HEDDEN, P., SONNEWALD, U. Y SONNEWALD, S. (2011). Reaction of Meristem Activity and Sprout Growth in Potato tubers Require Both Cytokinin and Gibberellin. *Plant Physiology*, 155: 776-796.
- [26] HEDDEN, P. Y PHILLIPS, A.L. (2000a). Manipulation of hormone biosynthetic genes in transgenic plants. *Curr Opin Biotechnol*, 11:130-137.
- [27] HENRY, M.J. (1985). Plant growth regulating activity of sterol and gibberellin biosynthesis inhibitors. *Bull Plant Growth Regul Soc Am*, 13:9-11.
- [28] HUANG, X., HUANG, H. Y GAO F. (2000) The growth potential generated in citrus fruit under water stress and its relevant mechanisms. *Scientia Horticulturae*, 83: 227-24.
- [29] KONDO, S. Y FUKUDA, K. (2001). Changes of jasmonates in grape berries and their possible roles in fruit development. *Scientia Horticulturae*, 91: 275-288.
- [30] LENZ, F. (1986). Fruit effects on transpiration and dry matter production in apples. En: A. N. Lakso and F. Lenz (eds.). *The regulation of photosynthesis in fruit trees*. Symp. Proc. Publ., N.Y. State Agr. Expt. Sta., Geneva.
- [31] MAHOUACHI, J., GÓMEZ-CADENAS, PRIMO-MILLO, E. Y TALON, M. (2005). Antagonistic Changes between Absciscic Acid and Gibberellins in Citrus Fruits Subjected to a Series of Different Water Conditions. *Journal of Plant Growth Regulation*, 24:179-187.
- [32] MARTÍNEZ-ALCÁNTARA, B., IGLESIAS, D.J., REIG, C., MESEJO, C., AGUSTÍ, M. Y PRIMO-MILLO, E. (2015). Carbon utilization by fruit limits shoot growth in alternate-bearing citrus trees. *Journal of Plant Physiology*, 176:108-117.

- [33] MARTÍNEZ-FUENTES, A. (2010). El tiempo de permanencia el fruto en el árbol y su relación en los cítricos. Tesis. Universidad Politécnica de Valencia. España.
- [34] MARTÍNEZ-FUENTES, A., MESEJO, C., REIG, C. Y AGUSTÍ, M. (2010). Timing of the inhibitory effect of fruit on return bloom of 'Valencia' sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). *J. Sci Food Agric.* 90: 1936-1943.
- [35] MASON, M.G., ROSS, J.J., BABST, B.A., WIENCLAW B.N. Y BEVERIDGE, C.A. (2013). Sugar demand, not auxin, is the initial regulator of apical dominance. *PNAS*, 16: 6092-6097.
- [36] MESEJO, C., MARTÍNEZ-FUENTES, A., JUAN, M., ALMELA, V. Y AGUSTÍ, M. (2003). Vascular tissues development of citrus fruit peduncle is promoted by synthetic auxins. *Plant Growth Regulation*, 39:131-135.
- [37] MOK, D.W. Y MOK, M.C. (2001). Cytokinin metabolism and action. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 52: 89–118.
- [38] MONSELISE, S.P., GOLDSCHMIDT, E.E. Y GOLOMB, A. (1981). Alternate bearing in citrus and ways of control. *Proc. Int. Soc. Citriculture*, 1: 232-242.
- [39] MONTOLIU, V.A. (2010). Respuestas fisiológicas de los cítricos sometidas a condiciones de estrés biótico y abiótico aspectos comunes y específicos. Tesis Doctoral. Universitat Jaume I. España.
- [40] MOUBAYIDIN, L., PERILLI, S., DELLO IOIO, R., DI MAMBRO, R., COSTANTINO, P. Y SABATIN, S. (2010). The Rate of Cell Differentiation Controls the Arabidopsis Root Meristem Growth Phase. *Current Biology*, 20:1138-1143.
- [41] NELISSEN, H., RYMEN, B., JIKUMARU, Y., DEMUYNCK, K., VAN LIJSEBETTENS, M., KAMIYA, Y., INZÉ, D. Y BEEMSTER, G.T.S. (2012). A local maximum in gibberellin levels regulates maize leaf growth by spatial control of cell division. *Curr Biol*, 22: 1183-1187.
- [42] NISHIKAWA, F., ENDO, T., SHIMADA, T., FUJII, H., SHIMIZU, T. Y OMURA M. (2009). Differences in seasonal expression of flowering genes between deciduous trifoliolate orange and evergreen Satsuma mandarin. *Tree Physiol*, 29:921-926.

- [43] NISHIKAWA, F., ENDO, T., SHIMADA, T., FUJII, H., SHIMIZU, T., OMURA, M. Y 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*, 246: 1-13.
- [44] OCKERSE, R. Y GALSTON, A.W. (1967). Gibberellin-Auxin Interaction in Pea Stem Elongation. *Plant Physiology*, 42 (1): 47-54.
- [45] REIG, C., FARINA, V., MESEJO, C., MARTÍNEZ-FUENTES, A., BARONE, F. Y AGUSTÍ, M. (2014). Fruit regulates Bud Sprouting and Vegetative Growth in Field-Grown Loquat Trees (*Eriobotrya japonica* Lindl.): Nutritional and Hormonal Changes. *J. Plant Growth Regul*, 33:222-232.
- [46] REIG, C., GONZÁLEZ-ROSSIA, D., JUAN, M. Y AGUSTÍ, M. (2006). Effects of fruit load on flower bud initiation and development in peach. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 81: 1079-1085.
- [47] REIG, C., MESEJO, C., MARTÍNEZ-FUENTES, A. Y AGUSTÍ, M. (2013). En el níspero japonés (*Eriobotrya japonica* Lindl.) la brotación, el desarrollo vegetativo y la floración y la floración están regulados por el fruto. VII Congreso Ibérico de Agroingeniería y Ciencias Hortícolas. Ref. Nº CO174.
- [48] REUTHER, W. (1973). Climate and citrus behavior. En: *The citrus industry*, Vol. III, W. Reuther (Ed.), Univ. California, Div. Agricultural Science, Berkeley, USA, pp 280-337.
- [49] RODRIGO, M.J., MARCOS, J.F., ALFÉREZ, F.M., MALLENT, M.D. Y ZACARÍAS, L. (2003). Characterization of Pinalate, a novel *Citrus sinensis* mutant with a fruit-specific alteration that results in yellow pigmentation and decreased ABA content. *Journal of Experimental Botany*, 383:727-738.
- [50] ROSS, J.J. Y O'NEILL, D.P. (2001). New interactions between classical plant hormones. *Trends Plant Science*, 21:547-552.

- [51] ROSS, J.J., O'NEILL, D.P. Y RATHBONE, D.A. (2003). Auxin-Gibberellin Interactions in Pea: Integrating the Old with the New. *J. Plant Growth Regul.*, 22: 99-108.
- [52] ROSS, J.J., O'NEILL, D.P., SMITH, J.J., KERCKHOFFS, L.H.J. Y ELLIOTT, R.C. (2000). Evidence that auxin promotes gibberellin A₁ biosynthesis in pea. *Plant Science*, 21:547-552.
- [53] SAVÉ, R., BIEL, C., DOMINGO, R., RUIZ-SÁNCHEZ, M.C. Y TORRECILLAS, A. (1995). Some physiological and morphological characteristics of Citrus plants for drought resistance. *Plant Science*, 110:167-172.
- [54] SEHR, E.M., AGUSTÍ, J., LEHNER, R., FARMER, E.E., SCHWARZ, M. Y GREB, T. (2010). Analysis of secondary growth in the Arabidopsis shoot reveals a positive role of jasmonate signalling in cambium formation. *The Plant Journal*, 63:811-822.
- [55] SEO, M., JIKUMARU, Y. Y KAMIYA, Y. (2011). Profiling of Hormones and Related Metabolites in Seed Dormancy and Germination Studies. *Methods Mol. Biol.*, 773:99-111.
- [56] SHALOM, L., SAMUELS, S., ZUR, N., SHLIZERMAN, L., DORON-FAIGENBOIM, A., BLUMWALD, E. Y SADKA, A. (2014). Fruit load induces changes in global gene expression and in abscisic acid (ABA) and indole acetic acid (IAA) homeostasis in citrus buds. *Journal of Experimental Botany*, 12:3029–3044
- [57] SMITH, H.M. Y SAMACH, A. (2013). Constrains to obtaining consistent annual yields in perennial tree crops. I: Heavy fruit load dominates over vegetative growth. *Plant Science*, 207:158-167.
- [58] SPONSEL, V.M. Y HEDDEN, P. (2004). Gibberellin biosynthesis and inactivation. En: *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action*, ed. PJ Davies, pp. 63–94.
- [59] SWAIN, S.M. Y SINGH, D.P. (2005). Tall tales from sly swarves. Novel functions of gibberellins in plant development. *Plant Science*, 10: 123-129
- [60] TAIZ, L. Y ZEIGER, E. (2002). *Plant Physiology*. 3rd ed. Sinauer Associates Inc. Publishers, Sunderland, MA. 690p.

- [61] TAIZ, L. Y ZEIGER, E. (2006). El papel fisiológico de las auxinas, en: *Fisiología vegetal* Vol.II. Editorial Publicacions de la Universitat Jaume I, Castelló de la Plana. 961-976.
- [62] TAYLOR, B.K. (1967). Storage and mobilization of nitrogen in fruit trees. *Journal of the American Society for Horticultural Science*,. 33: 23-29.
- [63] VALIENTE, J.L. Y ALBRIGO, L.G. (2004). Flower bud induction of sweet oranges trees (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck): Effect of low temperatures, crop load, and bud age. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 134: 299-307.
- [64] VÉLEZ, J.E., ÁLVAREZ-HERRERA, J.G. Y ALVARADO-SANABRIA, O.H. (2012). El Estrés Hídrico en Cítricos (*Citrus* spp.): Una revision. Orinoquia. Universidad de los Llanos. Villavicencio, Meta. Colombia Vol. 16 - No 2.
- [65] VERREYNE, J.S. Y LOVATT, C.J. (2009). The Effect of Crop Load on Bud Break Influences Return Bloom in Alternate Bearing 'Pixie' Mandarin. *Journal American Society Horticultural Science*, 134: 229-307
- [66] WASTERNAK, C. Y HAUSE, B. (2013). Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals of Botany*, 111:1021-1058.
- [67] ZHANG, S.Q. Y OUTLAW, W.H. (2001) Abscisic acid introduced into the transpiration stream accumulates in the guard cell apoplast and causes stomatal closure. *Plant, Cell & Environment*, 24: 1045-1054.

