



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA Y DEL MEDIO NATURAL

Departamento de Producción Vegetal

VARIACIÓN ANUAL DE LA FOTOSÍNTESIS Y DEL
CONTENIDO EN CARBOHIDRATOS EN LA

VARIEDAD ALTERNANTE

'SALUSTIANA' DE NARANJO DULCE

[*CITRUS SINENSIS* (L.) OSBECK].

INFLUENCIA DE LA PRESENCIA DEL FRUTO Y

RELACIÓN CON LA FLORACIÓN

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

YOLANDA BORDÓN FERRÉ

Dirigida por:

DRA. ROSA VICTORIA MOLINA ROMERO

DR. SERGIO GONZÁLEZ NEBAUER

VALENCIA, JULIO DE 2015

AGRADECIMIENTOS

La tesis doctoral que aquí se presenta inició sus pasos en 1999 bajo la dirección de la Dra. Amparo García Luis y del Dr. José Luis Guardiola Bárcena. En esta primera etapa (1999-2004) se desarrolló una parte importante del trabajo experimental. A ellos mi agradecimiento y considerado recuerdo, porque lo que aprendí en este período constituye los cimientos, no sólo de esta tesis, sino también de mi trayectoria profesional.

En 2010, tras un largo paréntesis, la dirección de la tesis fue retomada por la Dra. Rosa Victoria Molina Romero y el Dr. Sergio González Nebauer, que aceptaron como suya una tarea ardua y complicada. En esta nueva etapa, una vez vueltos a analizar y a revisar los resultados, fueron descartadas algunas de las experiencias realizadas y se llevaron a cabo otras nuevas. Quiero dejar constancia de mi agradecimiento sin límites y mi profunda admiración por ambos.

Durante todos estos años han sido muchas las personas que han intervenido en la realización de este trabajo o de las que he recibido ayuda, y es imposible citarlas a todas. Gracias a todas ellas por su contribución. Sin embargo, quiero dar las gracias explícitamente al Dr. José Luis García Martínez por su ayuda con el capítulo de giberelinas, al Dr. Enrique Sanchís Duato por su ayuda con la recopilación de información sobre variedades cítricas, al Dr. Mariano Fos Causera y a la Dra. Livia Laskowsky Ochoa por sus valiosos consejos en el capítulo de observaciones histológicas, a la Dra. Begoña Renau Morata por su apoyo en el laboratorio y a Enric Fabra i Roca por su contribución en las traducciones de los resúmenes.

A la Sociedad Cooperativa ANECOOP, y en particular a José Miguel Martínez Martínez por haber facilitado este estudio en el campo experimental Masía del Doctor, en Museros (Valencia), así como a María Miranda Tarín, por la información aportada sobre la citricultura actual valenciana.

A la Dra. Anna García Ortolà, Dr. Fernando Fornés Sebastiá, Dra. Rosa M^a Belda Navarro, Ana M^a García Sánchez y al resto de personal docente y no docente del antiguo Departamento de Biología Vegetal de la UPV por su ayuda y apoyo moral, que han sido, en ocasiones, determinante.

A la Dra. Leonor Lapeña Barrachina, Dra. M^a Pilar García Agustín y Dra. M^a Ángeles Forner Giner por las sugerencias de cambios planteadas en el proceso de evaluación, que han contribuido a mejorar la calidad de este trabajo.

A todos mis queridos y necesarios amigos, quienes, a pesar del tiempo transcurrido, siguieron creyendo que esta tesis finalmente iba a presentarse (o lo disimularon muy bien) y me animaron a ello.

Especialmente, a aquellos compañeros, alumnos, amigos o familiares que durante estos años han ido superando con valor, esfuerzo, optimismo y determinación los obstáculos y problemas que la vida les ha ido presentando, y a aquellos que están llevando adelante sus proyectos vitales a pesar de lo imposibles o de lo aparentemente descabellados que sean. Gracias a todos ellos por su ejemplo.

A Geshe Lamsang por su amistad genuina y su apoyo sin condiciones.

Cualquier intento de expresar mi agradecimiento a Armando, a mi madre, y a mis hermanos y sobrinas va a resultar fallido, aunque tampoco es necesario, ya que ellos saben que son lo más importante.

Finalmente, agradecer a mi padre, entre infinitas cosas, que me arrancara la promesa que ahora puedo ver cumplida.

EN MEMORIA DE
FERNANDO BORDÓN JIMENO

RESUMEN

En este trabajo se ha estudiado la variación anual de la producción de fotoasimilados y la movilización de los mismos hacia sumideros en la variedad alternante de naranjo dulce ‘Salustiana’ (*Citrus sinensis* (L.) Osb.), y su relación con el comportamiento reproductivo.

Las observaciones aquí presentadas indican que el comportamiento alternante de esta variedad, que presenta árboles con elevado número de frutos (*on*) y árboles con escasa o nula carga de fruto (*off*) en un mismo año, es debido a la baja intensidad de floración que se obtiene tras un año de elevada cosecha, y no a una disminución del cuajado.

En esta variedad, la tasa fotosintética no manifiesta grandes variaciones estacionales, siendo las condiciones ambientales cambiantes entre los diferentes días de un mes la principal fuente de variación. No se observan diferencias significativas en la tasa fotosintética entre árboles *on* y *off*, si bien, en un mismo árbol *on*, las hojas de brotes con fruto presentan una tasa fotosintética ligeramente menor (10%) que las de brotes sin fruto. La capacidad fotosintética permanece estable a lo largo del primer año de vida de la hoja, y disminuye un 20% durante el segundo.

Los azúcares solubles en hojas de ‘Salustiana’ mantienen un nivel prácticamente constante durante todo el año, mientras que el exceso de carbono fijado se destina a la producción de almidón, que es el carbohidrato que presenta mayores variaciones. Destaca, no obstante, un incremento en azúcares solubles durante la época invernal, que se produce con independencia de la presencia de fruto. La variación en carbohidratos se ajusta a los cambios en la demanda de los diferentes sumideros. En los árboles *off*, el contenido de almidón en hojas es superior que en los árboles *on* entre marzo y agosto, siendo la diferencia máxima (más del doble) al final de la caída de fruto, en junio. Desde septiembre hasta marzo, no se observan diferencias en el contenido en carbohidratos entre árboles *on* y *off*. En el momento de plena floración (abril), la concentración de carbohidratos en las hojas de los árboles *on* disminuye considerablemente, con lo que la mayor parte de las reservas almacenadas durante el año *off* parecen destinadas a la formación de flores excedentes, cuyo coste es de unos 6 kg de materia seca. De estas observaciones, puede concluirse que las reservas de carbohidratos en hojas no tienen un papel regulador ni durante la inducción floral por bajas temperaturas, que tiene lugar entre noviembre y febrero, ni en el desarrollo de las flores, que se inicia entre febrero y marzo.

Con el fin de esclarecer las relaciones entre carbohidratos y floración, y, fundamentalmente, si las importantes diferencias en carbohidratos observadas en el mes de junio pueden ser responsables de las variaciones en floración entre árboles *on* y *off*, se realizaron tratamientos de rayado en árboles completos de 'Salustiana' desde el mes de junio hasta noviembre, cuando el rayado deja de tener efecto sobre la floración. El rayado en junio provoca un incremento en carbohidratos en árboles *off*, pero no en *on*, fundamentalmente en azúcares solubles, y un mayor porcentaje de brotes vegetativos, aunque no de brotes reproductivos. En los árboles *on* este tratamiento no tiene efecto. El rayado a primeros de septiembre aumenta los azúcares reductores e incrementa la floración de la primavera siguiente en unas 50 flores por 100 nudos, independientemente de la carga del árbol. Cuando el rayado se realiza en los meses de octubre y noviembre, únicamente se da un aumento en la acumulación de almidón y azúcares reductores en árboles *off*, pero no viene acompañado de un aumento significativo de la floración. Sin embargo, en mandarino satsuma 'Owari' (*Citrus unshiu* Marc.), se observa que el aumento en carbohidratos (almidón y azúcares no reductores) y el incremento de la brotación y la floración se obtiene cuando el rayado se lleva a cabo en noviembre. Estos resultados sugieren que existe un período de adquisición de competencia para florecer, anterior a la inducción floral, que es sensible al contenido en azúcares y que en naranjo dulce 'Salustiana' concluiría antes de octubre, mientras que en mandarino satsuma tendría una mayor duración.

Dado el papel de las giberelinas en la inhibición de la floración en cítricos y con objeto de comprobar si el contenido endógeno en yemas pudiera estar relacionado la transición floral, se cuantificaron estas hormonas desde el mes de julio hasta febrero. En el mes de julio, el contenido en GA₁ es diez veces mayor en yemas de brotes con fruto que en yemas de brotes sin fruto. Entre noviembre y febrero las giberelinas consideradas metabólicamente activas se hallan en concentraciones menores a 0,1 ng g⁻¹ (GA₁) o son indetectables (GA₄), sin apreciarse diferencias entre yemas de brotes con y sin fruto. Así, las diferencias en giberelinas endógenas durante el período de inducción floral no son las responsables del comportamiento alternante, si bien, las diferencias observadas en julio apoyan la hipótesis de la existencia de un proceso anterior a la inducción floral de adquisición de la competencia de yemas para ser inducidas posteriormente, que comprendería el período entre julio y agosto.

RESUM

En aquest treball s'ha estudiat la variació anual de la producció de fotoassimilats i la mobilització dels mateixos cap a embornals en la varietat alternant de taronger dolç 'Salustiana' (*Citrus sinensis* (L.) Osb.), i la seva relació amb el comportament reproductiu.

Les observacions presentades indiquen que el comportament alternant d'aquesta varietat, que presenta arbres amb elevat nombre de fruits (*on*) i arbres amb escassa o nul·la càrrega de fruit (*off*) en un mateix any, és a causa de la baixa intensitat de floració que s'obté després d'un any d'elevada collita, i no a una disminució del quallat.

En aquesta varietat, la taxa fotosintètica no mostra grans variacions estacionals, sent les condicions ambientals canviant entre els diferents dies d'un mes la principal font de variació. No s'observen diferències significatives en la taxa fotosintètica entre arbres *on* i *off*, si bé, en un mateix arbre *on*, les fulles de brots amb fruit presenten una taxa fotosintètica lleugerament menor (10%) que les de brots sense fruit. La capacitat fotosintètica roman estable al llarg del primer any de vida de la fulla, i disminueix un 20% durant el segon.

Els sucres solubles en fulles de 'Salustiana' mantenen un nivell pràcticament constant durant tot l'any, mentre que l'excés de carboni fixat es destina a la producció de midó, que és el carbohidrat que presenta majors variacions. Destaca no obstant això un increment en sucres solubles durant l'època hivernal, que es produeix amb independència de la presència de fruit. La variació en carbohidrats s'ajusta als canvis en la demanda dels diferents embornals. En els arbres *off*, el contingut de midó en fulles és superior que en arbres *on* entre març i agost, sent la diferència màxima (més del doble) al final de la caiguda de fruit, en juny. Des de setembre fins a març, no s'observen diferències en el contingut en carbohidrats entre arbres *on* i *off*. En el moment de plena floració (abril), la concentració de carbohidrats en les fulles dels arbres *on* disminueix considerablement, amb el que la major part de les reserves emmagatzemades durant l'any *off* semblen destinades a la formació de flors excedents, el cost de les quals és d'uns 6 kg de matèria seca. D'aquestes observacions, pot concloure's que les reserves de carbohidrats en fulles no tenen un paper regulador ni durant la inducció floral per baixes temperatures, que té lloc entre novembre i febrer, ni en el desenvolupament de les flors, que s'inicia entre febrer y març.

Amb la finalitat d'esclarir les relacions entre carbohidrats i floració, i fonamentalment si les importants diferències en carbohidrats observades en el mes de juny poden ser responsables de les variacions en floració entre arbres *on* i *off*, es van realitzar tractaments de ratllat en arbres complets de 'Salustiana' des del mes de juny fins a novembre, quan el ratllat deixa de tenir efecte sobre la floració. El ratllat al juny provoca un increment en carbohidrats en arbres *off*, però no en *on*, fonamentalment en sucres solubles, i un major percentatge de brots vegetatius, encara que no de brots reproductius. En els arbres *on* aquest tractament no té efecte. El ratllat a primers de setembre augmenta els sucres reductors i incrementa la floració de la primavera següent en unes 50 flors per 100 nusos, independentment de la càrrega de l'arbre. Quan el ratllat es fa en els mesos d'octubre i novembre, únicament es dona un augment en l'acumulació de midó i sucres reductors en arbres *off*, però no provoca un augment significatiu de la floració. No obstant això, en mandarí satsuma 'Owari' (*Citrus unshiu* Marc.), s'observa que l'augment en carbohidrats (midó i sucres no reductors) i l'increment de la brotació i la floració s'obté quan el ratllat es duu a terme al novembre. Aquests resultats suggereixen que existeix un període d'adquisició de competència per florir, anterior a la inducció floral, que és sensible al contingut en sucres i que en taronger 'Salustiana' conclouria abans d'octubre, mentre que en mandarí satsuma tindria una major durada.

Donat el paper de les giberelines en la inhibició de la floració en cítrics i a fi de comprovar si el contingut endogen en gemmes pogués estar relacionat amb la transició floral, es van quantificar aquestes hormones des del mes de juliol fins a febrer. En el mes de juliol, el contingut en GA₁ és deu vegades major en gemmes de brots amb fruit que en gemmes de brots sense fruit. Entre novembre i febrer les giberelines considerades metabòlicament actives es troben en concentracions menors a 0,1 ng g⁻¹ (GA₁) o són indetectables (GA₄), sense apreciar-se diferències entre gemmes de brots amb i sense fruit. Així, les diferències en giberelines endogenes durant el període de inducció floral no són les responsables del comportament alternant, si bé, les diferències observades al juliol recolzen la hipòtesi de l'existència d'un procés d'adquisició de la competència de gemmes per ser induïdes posteriorment, que comprendria el període entre juliol i agost.

ABSTRACT

In this work we have done a research study about the annual variation in production of photoassimilates and mobilizing them into sinks in the alternate bearing 'Salustiana' sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osb.), and its relation to the reproductive behavior.

Observations indicate that the alternate bearing of this variety, with trees with high fruit number (*on*) and trees with little or no load fruit (*off*) in the same year, is due to the low intensity of flowering obtained after a year of a high yield, and not to the decreased of fruit set.

In this variety, the photosynthetic rate does not show major seasonal variations, being the changing environmental conditions among the different days in a month the main source of variation. No significant differences were observed in the photosynthetic rate among trees *on* and *off*, although in the same *on* tree, the leaves of shoots that bear fruits have a slightly lower photosynthetic rate (10%) than shoots without fruit. The photosynthetic capacity remains stable throughout the first year of life of the leave, and decreases by 20% for the second-one.

Soluble sugars in leaves of 'Salustiana' maintain a fairly constant level throughout the year, whereas the excess of fixed carbon is used for the production of starch, which is the carbohydrate with greater variations. Nevertheless, an increase in soluble sugars during the winter season occurs regardless of the presence of fruit. The variation in carbohydrates meets the changing demand of the various sinks. In *off* trees, the starch content in leaves is higher than in *on* trees between March and August, and the maximum difference (more than double) occurs at the end of fruit drop, in June. From September until March, no differences in carbohydrate content among trees *on* and *off* are observed. At the time of full blossom (April), the concentration of carbohydrates in *on* tree leaves decreases dramatically. Most of the stocks during the *off* year seem destined to the formation of surplus flowers, with a cost of dry matter of about 6 kg. From these observations it can be concluded that the reserves of carbohydrates in leaves do not have a regulatory role in the floral induction which takes place between November and February, also in flower development, which starts between February and March.

In order to clarify the relationship between carbohydrates and flowering, and ultimately whether the dramatical differences in carbohydrate observed in June may be responsible

of the variations in flowering among trees *on* and *off*, ringing treatments were performed on complete 'Salustiana' trees from June to November, when the ringing ceases to have an effect on flowering. Ringing in June causes an increase of carbohydrates in *off* trees, but not in *on* trees, mainly in soluble sugars, and a higher percentage of vegetative shoots is observed, although not in the case of reproductive shoots. In the *on* trees this treatment has no effect. Ringing treatment in early September increases reducing sugars and increases flowering in the upcoming spring in about 50 flowers per 100 nodes, regardless of the fruit load. When ringed is done in October and November, there is only an increase in the accumulation of starch and reducing sugars in *off* trees, but does not cause a significant increase in flowering. However, 'Owari' satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) shows that the increase in carbohydrates (starch and non-reducing sugars) and the increase in sprouting and flowering is obtained when ringing treatment takes place in November. These results suggest that there is a period of acquisition of competence to flower, prior to the floral induction, which is sensitive to sugar content, and that in the case of the 'Salustiana' sweet orange would end before October, whereas in satsuma mandarin would have a higher duration.

Given the role of gibberellins in the inhibition of flowering in citrus and in order to prove if endogenous content in buds could be related to flowering transition, these hormones were measured from July to February. In July, the content of GA₁ is ten times higher in shoot tips with fruit nodes than in shoot tips unfruitful. Between November and February gibberellins considered as metabolically active are in concentrations less than 0,1 ng g⁻¹ (GA₁) or undetectables (GA₄), with no differences observed between shoot tips with and without fruit. Thus, differences in endogenous gibberellins in the floral induction period are not responsible for the alternate bearing. Although, the differences observed in July support the hypothesis of the existence of a period of acquisition competition in tips to be induced to flower afterwards, that would include the period between July and August.

ÍNDICE DE SIGLAS Y ABREVIATURAS

| | |
|------------------|--|
| 2,4-D | Ácido 2,4-diclorofenoxiacético |
| ABA | Ácido abscísico |
| AIA | Ácido indolacético |
| A _N | Fotosíntesis neta. Tasa de fijación neta de CO ₂ |
| ANA | Ácido naftalenacético |
| <i>API</i> | <i>APETALA1</i> |
| ARN _m | Ácido ribonucleico mensajero |
| ATP | Adenosín trifosfato |
| BA | Benciladenina |
| C _a | Concentración atmosférica de CO ₂ |
| C _i | Concentración subestomática o intercelular de CO ₂ |
| DDA | Días después de anthesis |
| DPV | Diferencia de presión de vapor de agua entre la hoja y la atmósfera |
| E | Tasa de transpiración |
| EUA | Eficiencia en el uso del agua |
| F _o | Fluorescencia mínima de clorofilas del PSII en hojas adaptadas a oscuridad |
| <i>FD</i> | <i>FLOWERING LOCUS D</i> |
| <i>FLC</i> | <i>FLOWERING LOCUS C</i> |
| F _m | Fluorescencia máxima de clorofilas del PSII en hojas adaptadas a oscuridad |
| <i>FT</i> | <i>FLOWERING LOCUS T</i> |
| F _v | Fluorescencia variable máxima |
| GA | Giberelina |
| GA ₃ | Ácido giberélico |
| g _s | Conductancia estomática |
| I | Índice de alternancia |
| <i>LFY</i> | <i>LEAFY</i> |
| LSD | Desviación estándar logarítmica |
| P | Probabilidad estadística |
| PAR | Radiación fotosintéticamente activa |
| PSII | Fotosistema II |
| r | Coefficiente de correlación de Pearson |
| R ² | Coefficiente de determinación |

| | |
|----------------|---|
| RuBisCO | Ribulosa 1-5-bifosfato carboxilasa-oxigenasa |
| RuBP | Ribulosa-1,5-bifosfato |
| <i>SOC1</i> | <i>SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1</i> |
| <i>SPL</i> | <i>SQUAMOSA PROMOTER BINDING-LIKE</i> |
| <i>TFL1</i> | <i>TERMINAL FLOWER 1</i> |
| T _h | Temperatura de la hoja |
| VP | Presión de vapor de agua en el aire |

ÍNDICE DE CONTENIDO

| | |
|---|----------|
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1. Aspectos generales sobre la producción, movilización y uso de fotoasimilados en cítricos | 1 |
| 2. Fotosíntesis en cítricos. Influencia de factores ambientales y endógenos | 2 |
| 2.1. Factores ambientales | 3 |
| 2.1.1. Disponibilidad de CO ₂ | 3 |
| 2.1.2. Iluminación y temperatura | 5 |
| 2.2. Factores internos | 7 |
| 2.2.1. Demanda de fotoasimilados | 7 |
| 2.2.2. Capacidad fotosintética de las hojas | 9 |
| 2.2.3. Nutrición mineral | 10 |
| 3. Variación anual en los requerimientos de fotoasimilados en cítricos | 10 |
| 3.1. Características y fases del desarrollo de los árboles | 10 |
| 3.2. Utilización de fotoasimilados durante la brotación, floración y fructificación | 14 |
| 3.3. Comportamiento alternante | 15 |
| 4. Regulación de la floración y el cuajado en cítricos | 17 |
| 4.1. Influencia de los factores externos | 17 |
| 4.1.1. Efecto de las bajas temperaturas | 17 |
| 4.1.2. Efecto del estrés hídrico | 20 |
| 4.2. Influencia de la presencia de fruto | 21 |
| 4.2.1. Efecto de la presencia del fruto | 21 |
| 4.2.2. Regulación hormonal | 23 |
| 4.2.3. Efecto de la disponibilidad de fotoasimilados | 26 |
| 4.3. Control génico de la floración | 26 |
| 4.3.1. Bases moleculares de la floración en especies modelo | 26 |
| 4.3.2. Bases moleculares de la floración en cítricos | 29 |

| | |
|--|-----------|
| 5. La práctica del anillado | 31 |
| 5.1. Descripción y usos de la práctica del anillado | 31 |
| 5.2. Aspectos anatómicos del anillado | 33 |
| 5.3. Efecto del anillado sobre la acumulación de carbohidratos | 34 |
| 5.4. Efecto del anillado sobre la floración | 36 |
| 6. Objetivos del trabajo | 39 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 41 |
| 1. Material vegetal | 41 |
| 1.1. Naranja dulce ‘Salustiana’ (<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osb.) | 41 |
| 1.2. Mandarino satsuma ‘Owari’ (<i>Citrus unshiu</i> Marc.) | 42 |
| 2. Medida de la actividad fotosintética | 42 |
| 2.1. Medidas de intercambio gaseoso y fluorescencia | 42 |
| 2.2. Medida del contenido de clorofila en hojas | 43 |
| 3. Tratamientos de rayado | 44 |
| 3.1. Rayado de árboles completos | 44 |
| 3.2. Rayado de ramas individuales | 44 |
| 4. Medida de la brotación y la floración | 45 |
| 5. Medida de la abscisión de órganos reproductivos, cuajado y fructificación | 47 |
| 5.1. Abscisión de órganos reproductivos | 47 |
| 5.2. Recolección de los frutos | 47 |
| 5.3. Cuajado | 47 |
| 5.4. Cálculo del índice de alternancia | 48 |
| 6. Determinación del contenido en carbohidratos metabolizables | 49 |
| 6.1. Toma de muestras para la determinación de carbohidratos | 49 |
| 6.2. Preparación de las muestras para su análisis | 49 |

| | |
|---|-----------|
| 6.3. Extracción de carbohidratos | 49 |
| 6.4. Análisis de azúcares reductores | 50 |
| 6.5. Análisis de azúcares solubles y almidón | 51 |
| 7. Determinación de giberelinas | 51 |
| 7.1. Toma de muestras para la determinación de giberelinas | 51 |
| 7.2. Determinación de giberelinas | 52 |
| 8. Tratamientos histológicos | 53 |
| 8.1. Fijación | 53 |
| 8.2. Infiltración e inclusión en parafina | 53 |
| 8.3. Realización de los cortes | 54 |
| 8.4. Desparafinado y tinción | 54 |
| 8.5. Observaciones microscópicas | 55 |
| 9. Análisis estadístico | 55 |
| RESULTADOS | 57 |
| 1. Caracterización del comportamiento alternante del naranjo dulce ‘Salustiana’ | 57 |
| 1.1. Comportamiento productivo del naranjo dulce ‘Salustiana’ | 57 |
| 1.2. Efecto del fruto sobre la brotación y la floración | 63 |
| 1.3. Efecto del fruto sobre la abscisión de flores y frutitos | 80 |
| 2. Variación estacional de la fotosíntesis e influencia de la carga del árbol | 94 |
| 2.1. Variación estacional de la fotosíntesis: influencia de las variables ambientales | 94 |
| 2.2. Influencia de las características de las hojas sobre la fotosíntesis | 103 |
| 2.3. Influencia de la presencia del fruto | 111 |
| 3. Variación anual del contenido en carbohidratos. Influencia de la carga del árbol | 113 |

| | |
|--|------------|
| 4. Empleo de técnicas de rayado para estudiar la influencia de la carga del árbol sobre la brotación, floración y cuajado en relación a los niveles de carbohidratos | 124 |
| 4.1. Rayado de árboles completos | 124 |
| 4.2. Rayado de ramas individuales | 158 |
| 4.3. Comparación con la variedad de mandarina temprano satsuma ‘Owari’ | 167 |
| 4.4. Estudio histológico de la regeneración de tejidos tras el rayado | 176 |
| 5. Influencia de la presencia del fruto sobre el nivel de giberelinas en yemas y su relación con la brotación y la floración | 184 |
| <u>DISCUSIÓN</u> | 189 |
| 1. Comportamiento alternante de la variedad de naranjo dulce ‘Salustiana’ | 189 |
| 2. Variación estacional de la fotosíntesis e influencia de la carga del árbol | 195 |
| 3. Variación estacional en el contenido en carbohidratos: efecto del fruto y su relación con la floración y el cuajado | 204 |
| 4. Efecto del incremento en el contenido en carbohidratos mediante técnicas de rayado durante el período de adquisición de competencia e inducción floral | 209 |
| 5. Influencia de la presencia de fruto sobre el nivel de giberelinas en yemas y su relación con la brotación y la floración | 218 |
| <u>CONCLUSIONES</u> | 221 |
| <u>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u> | 225 |

ANEXOS

I

Anexo 1. Datos climáticos

I

INTRODUCCIÓN

1. ASPECTOS GENERALES SOBRE LA PRODUCCIÓN, MOVILIZACIÓN Y USO DE FOTOASIMILADOS EN CÍTRICOS

Bajo condiciones de clima subtropical, los cítricos de hábito perennifolio acumulan carbohidratos de reserva durante el período de reposo invernal y los movilizan durante la brotación de primavera (Goldschmidt y Koch, 1996). Este comportamiento de los cítricos es similar al descrito en árboles frutales de hoja caduca, en los que se acumulan carbohidratos antes de la caída de la hoja, siendo utilizados durante el período de latencia y el crecimiento que tiene lugar en primavera (Schaffer *et al.*, 1999; Naschitz *et al.*, 2010). En la mayoría de árboles perennes estudiados, sin embargo, la brotación primaveral depende exclusivamente de los fotoasimilados producidos en las hojas ya existentes, mientras que las reservas son utilizadas para el crecimiento de tallos y raíces (Epron *et al.*, 2012).

En árboles caducifolios, la raíz es el principal órgano de almacenamiento de carbohidratos. La respiración invernal, el inicio de la brotación vegetativa primaveral y, en ocasiones, la floración, tiene lugar en ausencia de hojas fotosintéticamente activas, dependiendo totalmente de las reservas del árbol (Loescher *et al.*, 1990). En los cítricos las reservas son almacenadas principalmente en raíces, aunque también pueden encontrarse altas concentraciones de carbohidratos en hojas y en corteza (Goldschmidt y Golomb, 1982). La tasa fotosintética durante el invierno es suficiente para permitir el crecimiento (Syvertsen *et al.*, 1997; Goldschmidt, 1999). Por lo tanto, en el caso de los agrios, las reservas de carbohidratos pueden no ser tan críticas como en los árboles caducifolios para sobrevivir al invierno y poder llevar a cabo la brotación en primavera.

La partición de carbohidratos y el contenido en almidón en los cítricos depende de la carga de frutos en el árbol, ya que el fruto es el principal órgano sumidero y, durante su desarrollo, capta la mayoría de los fotoasimilados disponibles. Por ello, la acumulación de reservas está inversamente relacionada con la carga de fruto (Goldschmidt y Golomb, 1982). Una restricción en las mismas debida a una elevada fructificación puede desencadenar un comportamiento alternante en la producción (Monselise y Goldschmidt, 1982; Guardiola, 1992; Syvertsen y Lloyd, 1994) e incluso puede llevar al árbol al colapso (Smith, 1976).

INTRODUCCIÓN

El cuajado del fruto en los cítricos viene determinado por el suministro de carbohidratos (Duarte y Guardiola, 1996). La típica y fuerte abscisión post-antesis suele coincidir con la disminución de las reservas, y, a partir de este momento, el suministro de carbohidratos depende únicamente de la tasa fotosintética, la cual limita el cuajado del fruto (González-Ferrer *et al.*, 1995).

Un componente principal de la partición de carbohidratos es la translocación de azúcares desde los órganos fuentes, fotosintéticamente activos, hasta los órganos o tejidos sumideros, no fotosintéticos. En los cítricos, como en la mayoría de las plantas, la sacarosa es el principal azúcar de transporte, que tiene lugar a través del floema (Zimmerman y Ziegler, 1975). Diferentes proteínas de transporte están involucradas en este proceso, y actúan regulando la carga y la descarga del floema (Roitsch, 1999; Li *et al.*, 2012).

Otro componente de la partición de carbohidratos es la movilización de las reservas. El almidón es el principal carbohidrato de acumulación en plantas y las variaciones en su contenido están relacionadas con la regulación del crecimiento (Geigenberger, 2011).

2. FOTOSÍNTESIS EN CÍTRICOS. INFLUENCIA DE FACTORES AMBIENTALES Y ENDÓGENOS

Las hojas de los cítricos presentan tasas de asimilación de CO₂ menores a 12 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Estos valores son relativamente bajos comparados con los presentados por otras plantas C₃, que se sitúan generalmente entre 20 y 30 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Syvertsen y Lloyd, 1994), lo que puede ser un factor limitante de su crecimiento y productividad (Goldschmidt, 1999).

De entre los cultivos frutales, los cítricos son uno de los más importantes y extendidos en el mundo (Talón y Gmitter, 2008), situándose su producción mundial cerca de los 50 millones de toneladas anuales (USDA, 2015), de los cuales 6 se producen en España, 3 de ellos en la Comunitat Valenciana (IVACE, 2014). A pesar de ello, los mecanismos que limitan su eficiencia fotosintética y, por lo tanto, su producción, han sido poco estudiados. Una mejora en la eficiencia fotosintética requiere un mayor conocimiento de

la importancia relativa de los factores ambientales, como temperatura, luz, concentración atmosférica de CO₂, y de los internos, como los niveles de carbohidratos o la edad de las hojas (Jifon y Syvertsen, 2003).

2.1. Factores ambientales

Desde hace décadas se viene investigando la influencia de diferentes factores ambientales sobre la fotosíntesis en cítricos, tales como el déficit de agua, altas temperaturas y altas irradiancias (Vu y Yelenosky, 1988; Brakke y Allen, 1995; Jifon y Syvertsen, 2003; Guo *et al.*, 2006). Sin embargo, la mayoría de los resultados se han obtenido estudiando la respuesta fisiológica a un determinado factor en condiciones controladas y/o durante un corto período de tiempo (Ribeiro *et al.*, 2009a,b y 2012). Son escasos los experimentos realizados a lo largo de un año y utilizando plantas cultivadas en campo, en condiciones naturales, con la excepción de algunos desarrollados en Brasil sobre la variación estacional de la asimilación de CO₂ en hojas (Ribeiro y Machado, 2007; Ribeiro *et al.*, 2009a,b).

2.1.1. Disponibilidad de CO₂

La concentración actual de CO₂ presente en la atmósfera, situada aproximadamente sobre los 400 ppm (AEMET, 2015), limita la capacidad fotosintética de la mayoría de las plantas C₃, que muestran un gran potencial de respuesta al incremento del CO₂ disponible (Bowes, 1993; Drake *et al.*, 1997). Se ha demostrado que la exposición a concentraciones de CO₂ de 800 ppm durante un año favorece la fotosíntesis en árboles tropicales y subtropicales como mango, aguacate y macadamia (Schaffer *et al.*, 1999). Debido al aumento en cerca de 50 ppm del CO₂ atmosférico que ha tenido lugar en las últimas dos décadas, en una gran diversidad de especies vegetales en el medio natural se ha constatado un aumento en la tasa fotosintética y una disminución en la transpiración, con el correspondiente incremento en la eficiencia del uso de agua (Keenan *et al.*, 2013).

La tasa fotosintética está directamente relacionada con la actividad carboxilasa de la enzima ribulosa bifosfato carboxilasa-oxigenasa (RuBisCO), la cual a su vez está

INTRODUCCIÓN

marcadamente influida por la concentración de CO₂ y la temperatura. Actualmente, en las plantas C₃ la actividad carboxilasa de la RuBisCO está limitada por la concentración de CO₂ presente en la atmósfera.

Con respecto a los cítricos, Keutgen y Chen (2001) comprobaron que la concentración óptima de CO₂ para la fotosíntesis neta en *Citrus madurensis* Lour. se sitúa entre 450 y 600 ppm. A dichas concentraciones, la fotosíntesis llega a aumentar hasta un 300% en hojas jóvenes totalmente expandidas y un 90% en hojas más maduras. También observaron una disminución de la fotosíntesis a concentraciones de CO₂ superiores a 600 ppm, que podría ser debida a una menor actividad y/o concentración de las enzimas del ciclo de Calvin.

Estudiando el efecto a largo plazo de la exposición a altas concentraciones de CO₂ en plantas de naranjo amargo (*Citrus aurantium* L.) cultivadas durante 30 años a 300 ppm por encima del CO₂ ambiental, se vio que éstas mostraban una mayor producción de biomasa en general y una mayor fructificación en particular, que las plantas mantenidas en condiciones ambientales (Idso y Kimball, 2001).

Un incremento en la temperatura favorece la actividad oxigenasa de la RuBisCO por el descenso de la solubilidad de CO₂ en relación a la del O₂ y por la baja especificidad de la RuBisCO por el CO₂. Esto resulta en grandes pérdidas de carbono anteriormente fijado cuando la temperatura aumenta debido al fenómeno de la fotorrespiración. Una duplicación de la concentración de CO₂ en la atmósfera inhibe la reacción oxigenasa de la RuBisCO, lo que puede moderar los efectos adversos de las altas temperaturas en la fotosíntesis de las plantas C₃ y aumentar así la fijación de CO₂, como se ha comprobado en plantas del naranjo híbrido 'Ambersweet' (Vu *et al.*, 2002). Estas plantas, sometidas durante 29 meses a una elevada concentración de CO₂ (720 ppm) y elevadas temperaturas (1,5° y 6°C por encima de la temperatura ambiental) tuvieron mayores tasas fotosintéticas (40%), menor transpiración y menor conductividad estomática y mostraron una mayor eficiencia en el uso del agua que aquellas que habían crecido a una concentración de 360 ppm de CO₂. El contenido en azúcares solubles y almidón en las hojas fueron mayores bajo elevadas concentraciones de CO₂.

Algunas plantas muestran un descenso en la capacidad fotosintética (como por ejemplo, una reducción de la actividad y/o de la concentración de la RuBisCO) con el aumento de

la concentración de CO₂. La regulación negativa de la fotosíntesis, tanto en hojas jóvenes como maduras, debido a una elevada concentración de CO₂ a altas temperaturas parece ser una respuesta cultivar específica (Koch *et al.*, 1986; Vu *et al.*, 1997, 1999, 2001).

2.1.2. Iluminación y temperatura

En latitudes medias, donde se cultivan los agrios, los valores máximos de radiación fotosintéticamente activa (PAR) en un día soleado son de 2000 μmol de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La fotosíntesis en los cítricos se satura para valores de PAR entre 600 y 700 $\mu\text{mol} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Sinclair y Allen, 1982; Vu y Yelenosky, 1988; Jifon y Syvertsen, 2003).

Un exceso de luz afecta negativamente a las reacciones fotoquímicas, pero también ocasiona un incremento de temperatura de las hojas que provoca, frecuentemente, déficits hídricos y puede producir limitaciones de tipo estomático, llegando a reducir la fotosíntesis, el crecimiento y la cosecha y calidad de los frutos (Jifon y Syvertsen, 2003).

La cubierta de los árboles de cítricos puede absorber hasta un 90% de la radiación directa de longitud de onda baja (Green y Herber, 1967, citado por Syvertsen y Lloyd, 1994) y el exceso de radiación no canalizada hacia la fotosíntesis ha de ser disipada para evitar daños en el aparato fotosintético (Genty y Harbinson, 1996). En cítricos, se ha descrito la existencia de mecanismos fotoprotectores (Chen *et al.*, 2005), aunque la importancia de los procesos de atenuación, disipación térmica y fotoinhibición no ha sido esclarecida (Keutgen y Chen, 2001; Jifon y Syvertsen, 2003).

El fenómeno de la fotoinhibición, definido por primera vez por Kok en 1956, consiste en una reducción en la actividad de los fotosistemas que tiene lugar en la mayoría de las plantas como consecuencia de un exceso de iluminación, y que también se produce en los cítricos (Jifon y Syvertsen, 2003; Hu *et al.*, 2007; Ribeiro y Machado, 2007).

En los cítricos, la temperatura óptima para la fotosíntesis se sitúa entre 25 y 30°C, mientras que temperaturas por encima de 35°C inhiben el proceso (Vu y Yelenosky, 1988; Brakke y Allen, 1995; Guo *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2007). Para la mayoría de plantas C₃, el rango de temperatura óptimo de la fotosíntesis está situado entre los 15 y los 30°C. Muchas plantas de sombra lo tienen entre 10 y 20°C, mientras que, en general, las plantas

INTRODUCCIÓN

heliófilas lo presentan entre 25 y 35°C y la mayor parte de las plantas C4 sigue fotosintetizando bien a temperaturas aun superiores (Taiz y Zeiger, 2007).

La conductividad estomática en cítricos es muy sensible a la temperatura y a las diferencias de vapor de agua entre la hoja y la atmósfera. La conductividad estomática decrece cuando aumenta la temperatura de la hoja y se incrementa la diferencia de presión de vapor de agua (Habermann *et al.*, 2003; Jifon y Syvertsen, 2003). En estas condiciones, disminuye la tasa de fijación de CO₂. La relación entre la fotosíntesis y la conductividad estomática es lineal ascendente para valores de conductividad estomática entre 0,05 y 0,3 mol m² s⁻¹. A partir de este rango, la relación se vuelve asintótica.

En las plantas C3 la actividad de la RuBisCO depende de la difusión del CO₂. En una hoja iluminada, el CO₂ difunde predominantemente desde el aire hasta el cloroplasto, pero para ello debe pasar por distintas partes de la hoja: la capa límite de aire, el poro estomático, los espacios de aire del apoplasto, la pared y membrana celular y la fase líquida del simplasto. En cada uno de estos pasos se produce una disminución progresiva de la concentración de CO₂ (Farquhar y Sharkey, 1982). De esta manera, la concentración de CO₂ en los espacios aéreos del interior de la hoja o CO₂ intercelular (C_i), es inferior a la concentración de CO₂ atmosférico (C_a) durante el día, debido principalmente a la resistencia que ofrecen la capa límite y los estomas.

La presión parcial de CO₂ intercelular puede ser usada como un índice de la limitación de la fotosíntesis por los estomas. Si la disminución de la fotosíntesis estuviera causada en primer lugar por una reducción de la conductividad estomática, entonces sería de esperar que la concentración interna de CO₂ (C_i) disminuyese con el descenso de la fotosíntesis.

Se ha observado que los factores no estomáticos tienen un papel más importante que los estomáticos en regular la fijación de CO₂ de las hojas de cítricos con elevada radiación y alta temperatura. La limitación de los estomas a la fotosíntesis se sitúa por debajo del 25% (Jifon y Syvertsen, 2003). Las limitaciones no estomáticas a la fotosíntesis implican procesos de desajuste metabólico, afectando a actividades enzimáticas (como el ciclo de Calvin y el metabolismo de fotoasimilados), cadena de transporte de electrones, síntesis de ATP, o a la integridad del aparato fotosintético (Cheeseman y Lexa, 1996). La temperatura, la radiación y el déficit hídrico afectan directamente a la actividad de la

RuBisCO o a la tasa de transporte electrónico en cítricos (Vu y Yelenosky 1988; Syvertsen y Lloyd, 1994).

En los agrios, la influencia de las bajas temperaturas sobre la fotosíntesis ha sido poco estudiado, existiendo sólo algunos trabajos sobre su influencia (Syvertsen *et al.*, 1983; Vu y Yelenosky, 1988; Ribeiro *et al.*, 2009a,b). Además, la mayoría de ellos han sido realizados bajo condiciones de cultivo controlado o semicontrolado, y no en condiciones normales de cultivo en campo.

Es conocido que el sombreado de los cítricos incrementa la fotosíntesis y la conductividad estomática en días con temperaturas mayores de 25°C (Syvertsen *et al.*, 2003). En ambientes cálidos y con alta iluminación, el exceso de radiación puede aumentar la temperatura de la hoja hasta 9°C por encima de la temperatura del aire. Con un 50% de sombreado en ambientes con elevada radiación, se puede reducir la temperatura y la diferencia de presión de vapor, y así incrementar la conductividad estomática y la fotosíntesis, ya que aún hay luz adecuada para saturar el proceso de la fotosíntesis, como demostraron Syvertsen *et al.* (2003) en el naranjo dulce (*Citrus sinensis* L. (Osb.)) ‘Navel Spring’. Una PAR de 500 a 700 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bajo sombreado, es suficiente para alcanzar las tasas máximas de fijación de CO₂.

2.2. Factores internos

2.2.1. Demanda de fotoasimilados

Los azúcares presentes en los tejidos fotosintéticos podrían regular la fotosíntesis mediante sistemas de retroalimentación tanto positivos como negativos (Paul y Pellny, 2003; Rolland *et al.*, 2006). La acumulación de azúcares en hojas en respuesta a la disminución de la demanda se considera un mecanismo de control negativo de la actividad fotosintética en especies como tabaco (Paul y Driscoll, 1997), melocotonero (Quilot *et al.*, 2004), mango (Urban *et al.*, 2004) o café (Franck *et al.*, 2006). Asimismo, se ha sugerido la existencia de una retroalimentación negativa de la fotosíntesis en los

INTRODUCCIÓN

cítricos debida a una acumulación de carbohidratos en hojas, si bien no se ha establecido con claridad el papel de los azúcares solubles o del almidón (Nebauer *et al.*, 2011).

La regulación de la fotosíntesis por la demanda de sumideros ha sido demostrada en especies del género *Citrus* usando árboles en maceta (Syvertsen y Lloyd, 1994; Goldschmidt y Koch, 1996; Iglesias *et al.*, 2002) en diferentes sistemas experimentales: 1) alterando artificialmente el balance entre fuentes y sumideros en el árbol mediante el anillado de hojas (Goldschmidt y Huber, 1992; Iglesias *et al.*, 2002) y de ramas en ausencia de un sumidero (Schaffer *et al.*, 1986; Monselise, *et al.*, 1986; Bustan *et al.*, 1992; Li *et al.*, 2003a), 2) mediante la inyección de sacarosa (Iglesias *et al.*, 2002), 3) eliminando el fruto (Syvertsen *et al.*, 2003) o 4) mediante el cultivo en una atmósfera enriquecida en CO₂ (Downton *et al.*, 1987). Los resultados obtenidos en estos estudios apoyan una inhibición de la fotosíntesis provocada por el aumento de los productos fotosintéticos en las hojas. Así, la eliminación del fruto en una rama puede provocar una reducción considerable de la tasa fotosintética si, previamente, se ha anillado la rama (Schaffer *et al.*, 1986; Monselise *et al.*, 1986; Bustan *et al.*, 1992). Durante el invierno, Syvertsen *et al.* (2003) encontraron que árboles de naranja dulce ‘Navel Spring’ tenían un 40% menos de fotosíntesis en árboles en los que se había eliminado el fruto que en árboles con frutos. Utilizando discos escindidos de hojas expuestas a condiciones de oscuridad, se ha demostrado que la máxima capacidad fotosintética de la hoja se encuentra relacionada con la capacidad de consumo de carbohidratos, incluso en hojas con una elevada concentración de carbohidratos (Ribeiro *et al.*, 2012). También se han detectado efectos estacionales sobre la relación entre fotosíntesis y contenido en carbohidratos.

Sin embargo, la influencia de la carga del fruto y el papel de la demanda por sumideros sobre el control de la fotosíntesis en los cítricos permanece todavía sin ser explicado, especialmente en plantas intactas cultivadas bajo condiciones cultivo habitual en campo (Goldschmidt y Koch, 1996; Ribeiro *et al.*, 2012), ya que el anillado y el resto de los tratamientos artificiales que se han utilizado para manipular las relaciones fuente-sumidero han podido alterar el estado metabólico del árbol (De Schepper y Steppe, 2010). Como señalan Ribeiro *et al.* (2012), el estudio de las relaciones fuente-sumidero bajo condiciones normales de cultivo y en plantas intactas evitaría estas alteraciones sobre el metabolismo. Pero en árboles completamente desarrollados y bajo condiciones regulares de cultivo, tal inhibición podría no ser apreciable dada la existencia de sumideros alternativos. El

sistema radicular parece ser un sumidero particularmente fuerte y no saturable (Goldschmidt y Koch, 1996) si bien no está claro si la existencia de este sumidero tan potente ejerce un control efectivo sobre la fotosíntesis en condiciones normales. Sólo la eliminación del fruto en condiciones que restringen el crecimiento de las raíces, reduce la tasa fotosintética (Lenz, 1978). Este efecto se ha observado en cerezo (Roper *et al.*, 1988) y manzano (Lakso *et al.*, 1989).

Los trabajos llevados a cabo en la variedad ‘Murcott’ de *Citrus reticulata* Blanco por Li *et al.* (2003a,b,c) señalan que la expresión de diversos genes relacionados con el metabolismo de carbohidratos puede responder a cambios en azúcares específicos. Estos trabajos concuerdan con la hipótesis postulada por Iglesias *et al.* (2002), según la cual la regulación de la fotosíntesis en función del equilibrio fuente-sumidero podría estar mediada por el contenido de azúcares en hojas.

Por otra parte, una acumulación de gránulos de almidón, que tiene lugar a elevadas concentraciones de nitrógeno o de CO₂, pueden alterar la estructura y función del cloroplasto, o interferir con el ensamblaje de la membrana de los tilacoides (Bondada y Syvertsen, 2003). Además, la conductividad del CO₂ depende de la superficie del cloroplasto adyacente a la membrana plasmática, por lo que la modificación morfológica de los cloroplastos debida a la acumulación de almidón, puede ser un factor importante que disminuya la transferencia y la tasa de fijación de CO₂.

En ausencia de sumideros, se produce una rápida modulación de la expresión de genes implicados en los cambios adaptativos en la partición de fotoasimilados. La síntesis de sacarosa y la carga del floema son bloqueadas en las hojas, mientras que el carbono fijado se destina a la producción de almidón. Cambios relativos en la transformación almidón-azúcares solubles, aunque no el contenido *per se*, podría ser una señal de regulación de la fotosíntesis (Nebauer *et al.*, 2011).

2.2.2. Capacidad fotosintética de las hojas

Hay pocos estudios sobre la influencia de la edad de la hoja sobre la fotosíntesis. La variación en la asimilación de CO₂ en relación a su desarrollo ha sido estudiado en mandarino satsuma (*Citrus unshiu* Marc.) por Iglesias *et al.* (2002), mostrando que el

máximo en la actividad de la hoja se alcanza durante el primer año y que durante el segundo año de vida la tasa fotosintética desciende a valores del 60-70%. Teniendo en cuenta que las hojas de los cítricos duran más de 24 meses (Spiegel-Roy y Goldschmidt, 1996), y que el porcentaje de hojas de más de 12 meses por árbol es del 30 al 50%, el conocimiento sobre la variación fotosintética en función de la edad de la hoja en naranjo dulce puede ser de gran interés.

2.2.3. Nutrición mineral

La influencia de la nutrición mineral en la eficacia fotosintética de las hojas es un factor no analizado en profundidad. Elementos como fósforo y nitrógeno están directamente implicados en el metabolismo fotosintético (Paul y Driscoll, 1997). El efecto del contenido en nitrógeno en hojas sobre la fijación fotosintética de CO₂ ha sido estudiado en cítricos, observándose que las máximas tasas de fotosíntesis se alcanzan con concentraciones moderadas de nitrógeno (Bondada y Syvertsen, 2003), pero no se conoce si la reducción en los niveles de fósforo (elemento directamente implicado en el metabolismo fotosintético) que tiene lugar en la brotación de primavera, y que no resulta transitoria (Sanz *et al.*, 1987), puede afectar a la capacidad fotosintética de las hojas durante el cuajado del fruto.

3. VARIACIÓN ANUAL EN LOS REQUERIMIENTOS DE FOTOASIMILADOS EN CÍTRICOS

3.1. Características y fases del desarrollo de los árboles

El período juvenil en los cítricos varía entre los 6 o 20 primeros años de vida, dependiendo de especies y condiciones de crecimiento. Durante esta etapa las plantas muestran un crecimiento vegetativo muy vigoroso, hojas con forma característica y desarrollo de espinas en las axilas de las mismas (Spiegel-Roy y Goldschmidt, 1996).

Para que la floración tenga lugar, algunos de los meristemos apicales con crecimiento vegetativo deben cambiar su programa de desarrollo a un programa de crecimiento

generativo, en un proceso que se conoce como transición floral. La transición floral puede dividirse en dos etapas: la primera consiste en la adquisición de la competencia o habilidad para responder a los factores inductivos de la floración y la segunda etapa es la determinación del meristemo. Un meristemo que ha estado expuesto a los factores inductivos de la floración está determinado si conserva el mismo programa de desarrollo reproductivo, incluso después de haber sido apartado de su entorno (Bernier *et al.*, 1981).

La adquisición del estado competente del meristemo depende principalmente de la edad de la planta. A partir de una edad determinada, las plantas adquieren un estado de madurez reproductiva en el que son capaces de responder a los factores inductivos de la floración. Sin embargo, una vez que las plantas han alcanzado este estado, la competencia de sus yemas sigue dependiendo de otros factores, no del todo conocidos.

Por último, para que la floración tenga lugar es necesaria la diferenciación, que consiste en una serie de cambios anatómicos y morfológicos en el meristemo que inician la morfogénesis de los primordios florales. Posteriormente, se desarrollan los órganos florales y, finalmente, se produce la antesis de las flores.

Una vez que los árboles han alcanzado el período adulto, las yemas pueden formar diferentes tipos de brotes reproductivos (Guardiola *et al.*, 1977). Puede tratarse de brotes generativos uniflorales o multiflorales, ambos sin hojas, o bien de brotes mixtos uniflorales o multiflorales, ambos con hojas. No hay cambios morfológicos observables en las yemas axilares que van a producir brotes vegetativos o reproductivos hasta semanas antes de la brotación (Krajewsky y Rabe, 1995a).

Tradicionalmente, la larga fase juvenil de los cítricos se ha venido reduciendo mediante injerto de yemas adultas sobre diversos patrones para adelantar la entrada en producción de los árboles.

Los árboles cítricos realizan el crecimiento de su parte aérea en varios ciclos de brotación definidos, cuyo número y distribución a lo largo del año son característicos de la especie y dependen fundamentalmente de factores climáticos, los cuales a su vez influyen sobre la movilización de reservas (Goldschmidt, 1999).

En climas tropicales, y en algunos subtropicales, en los que la temperatura media anual supera los 18°C, los cítricos presentan un número muy elevado de brotaciones, sobretodo

INTRODUCCIÓN

en limero (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle y *C. latifolia* Tan.) y limonero (*C. limon* (L.) Burm.), lo que conduce a un crecimiento casi continuo de su parte aérea. En estos casos, la floración se produce varias veces al año (Cassin *et al.*, 1969; Mendel, 1969), si bien la floración más importante se concentra en la estación primaveral (Pereira, 2003). En estas regiones, la brotación está determinada principalmente por la disponibilidad de agua.

En climas subtropicales, el inicio del crecimiento de los brotes está regulado por la temperatura, que debe ser mayor de 12,5°C, y el desarrollo de nuevos brotes tiene lugar generalmente en tres ciclos de brotación anuales (Monselise, 1985). La brotación más importante es la brotación de primavera, que tiene lugar entre marzo y abril en el hemisferio norte, y entre septiembre y octubre en el hemisferio Sur. En este período las temperaturas oscilan entre los 12 y los 20°C. Una segunda brotación (brotación de verano), puede tener lugar a principios de verano (entre junio y julio en el hemisferio norte, y alrededor de enero y febrero en el sur), coincidiendo con el final de la caída fisiológica del fruto (conocida como caída de junio), cuando las temperaturas se encuentran entre los 25 y los 30°C. En septiembre, según especies y condiciones climáticas, puede tener lugar otra brotación (brotación de otoño).

Los brotes nuevos pueden ser brotes vegetativos, brotes generativos y brotes mixtos. La brotación tiene lugar, principalmente, en las yemas axilares de brotes vegetativos formados en brotaciones anteriores (Verreyne y Lovatt, 2009).

El crecimiento de las raíces alterna con los flujos de brotaciones de la parte aérea (Bevington y Castle, 1985). No obstante, durante el invierno, el crecimiento de los tallos cesa y la tasa de crecimiento de las raíces disminuye, incluso cuando las temperaturas no son inferiores a 12,5°C.

La intensidad de la brotación y la proporción en la que se presenta cada tipo de brote en plantas adultas está condicionada por varios factores, entre los que se encuentran:

- *La variedad:* en mandarino satsuma 'Owari' la proporción de brotes vegetativos formados en la brotación de primavera es mayor que en otras variedades (Guardiola, 1981; Guardiola *et al.*, 1982).

- *El momento de brotación:* los brotes generativos se producen principalmente en la brotación de primavera. En las brotaciones de verano y otoño, generalmente, no se forman flores o

muy escasamente, y los brotes formados tienen mayor número de entrenudos y son más largos y con hojas más grandes que las formadas en primavera (Schneider, 1968).

- *La edad de las yemas:* la tasa de brotación decrece con la edad de la yema (Guardiola *et al.*, 1977; Monselise, 1985; Davenport, 1990a). Así, en naranjo dulce ‘Washington Navel’ la brotación más elevada se encuentra en yemas formadas durante la brotación de otoño (con 5 meses de edad en el momento de la brotación), mientras que sobre las yemas con más de un año de edad se obtienen muy pocos brotes (Guardiola *et al.*, 1977). Esto es debido probablemente al control apical de yemas más jóvenes (Krajewski y Rabe, 1995a), ya que la eliminación de los brotes formados durante la última brotación en mandarino clementino ‘Nules’ (*Citrus reticulata*) tiene como consecuencia un aumento de la brotación de los nudos más viejos, con la formación de brotes vegetativos y algunas inflorescencias con hojas (Krajewski y Rabe, 1995b). En naranjo dulce ‘Washington Navel’ las yemas jóvenes forman más brotes generativos que las yemas más viejas. El 57% de los brotes formados en la madera de primavera son vegetativos, mientras que en las maderas de verano y otoño la proporción de brotes vegetativos es 10 veces menor (Guardiola *et al.*, 1977).

- *La posición en la rama:* existe un gradiente de brotación a lo largo del brote, siendo las yemas en posiciones apicales las que más brotan, con independencia de la edad de la yema (Guardiola *et al.*, 1977; 1982; García-Luis *et al.*, 1988, en mandarino satsuma). En las inflorescencias, la flor apical es la más grande, como en una inflorescencia cimosa (Monselise, 1985).

- *La intensidad de la brotación y la floración:* un aumento en el número de flores conlleva un aumento paralelo de brotes multiflorales sin hojas (Moss, (1969) en la variedad de naranjo dulce ‘Washington Navel’; Guardiola *et al.*, (1977) en ‘Navelate’; Becerra y Guardiola, (1984) en ‘Navelina’; Agustí *et al.*, (1985) en ‘Salustiana’ y Almela, (1990) en mandarino satsuma).

- *La temperatura durante la brotación:* las inflorescencias mixtas se desarrollan más tarde que las inflorescencias puramente vegetativas, coincidiendo con temperaturas más altas en el campo (Moss, 1969; Lovatt *et al.*, 1984, ambos en ‘Washington Navel’).

- *La orientación en el árbol:* en mandarino satsuma hay más brotes uniflorales sin hojas en la cara norte del árbol y en la parte baja de la copa (Ehara *et al.*, 1981).

El cuajado se define como la fase de desarrollo que marca la transición de una flor (ovario) a un frutito que se desarrollará hasta la madurez (Leopold y Kriedman, 1975). El cuajado es consecuencia de la combinación de un nivel de hormonas favorable y un suministro adecuado de metabolitos (Guardiola, 1997). En los cultivares con semillas el cuajado depende de la polinización y la fecundación. La mayor parte de los cultivares cítricos son sin embargo, partenocárpico, como los naranjos del grupo de las navel, los mandarinos de tipo satsuma y el naranjo dulce ‘Salustiana’ (González-Sicilia, 1968). La capacidad de cuajar fruto partenocárpico se ha relacionado con niveles altos de auxinas y giberelinas en los ovarios en antesis (Gustafson, 1939; García-Papí y García-Martínez, 1984; Talón *et al.*, 1992, 1997).

Casi todas las especies y variedades del género *Citrus* forman un número muy elevado de flores, y buena parte de los frutitos se desprenden del árbol durante la post-antesis y hasta diez o doce semanas tras la floración (Goldschmidt y Monselise, 1977; Guardiola, 1988), de manera que raramente el porcentaje de cuajado (entendido como frutos que llegan a la madurez) supera el 5% (Guardiola, 1992), y en ocasiones, es inferior al 0,2% (Agustí *et al.*, 1982).

En la mayoría de los cultivares, el cuajado suele ser mayor en inflorescencias con hojas (Primo-Millo *et al.*, 1977; Van Rensburg *et al.*, 1996; Ruiz *et al.*, 2001), como es el caso de naranjo ‘Salustiana’ (Fortunato-Almeida, 2003).

3.2. Utilización de fotoasimilados durante la brotación, floración y fructificación

A pesar de que la floración ha podido ser correlacionada con la acumulación de carbohidratos en algunos trabajos realizados en cítricos (Smith, 1976; Goldschmidt y Golomb, 1982), el nivel de carbohidratos parece no ser el único factor que regula la formación de flores (Goldschmidt, 1999; García-Luis y Guardiola, 2000). Durante la floración y el cuajado del fruto, parte de las reservas son transportadas a los órganos reproductivos (Akao *et al.*, 1981), pero la contribución de las reservas a estos procesos puede variar ampliamente, ya que la disminución de las mismas difiere entre cultivares (Borrás *et al.*, 1984; González-Ferrer *et al.*, 1984) e incluso entre experiencias con un mismo cultivar (García-Luis *et al.*, 1988; Ruiz y Guardiola, 1994; Ruiz *et al.*, 2001). Esta

reducción ha sido relacionada con el número de flores (García-Luis *et al.*, 1988) y hay algunos estudios que ponen de manifiesto el efecto de las reservas con el comportamiento alternante (Goldschmidt y Golomb, 1982) y que relacionan las diferencias entre contenidos de almidón entre cultivares con la carga de fruto (Borrás *et al.*, 1984). Sin embargo, no se tienen conclusiones definitivas que relacionen la floración con el contenido de carbohidratos en especies y cultivares cítricos (García-Luis *et al.*, 1988; Lovatt *et al.*, 1988; García-Luis *et al.*, 1995a,b; Martínez-Fuentes *et al.*, 2010). Por otra parte, una mínima cantidad de carbohidratos es requerida para la brotación de las yemas y la iniciación floral, mientras que los datos ofrecidos por diferentes estudios sugieren que la existencia de otros factores de control pueden oscurecer la existencia de esta correlación, indicando que la relación floración-almidón permanece todavía sin probar (Goldschmidt *et al.*, 1985; García-Luis *et al.*, 1988; Martínez-Fuentes *et al.*, 2010; Martínez-Alcántara *et al.*, 2015).

3.3. Comportamiento alternante

El comportamiento alternante o vecero consiste en que se alternan años de elevada floración y fructificación (años *on*) con años de baja o nula floración, y por tanto, poca o ninguna producción de frutos (años *off*). La alternancia en la producción es un fenómeno bastante extendido en especies leñosas tanto de hábito perennifolio como caducifolio, ya sean especies de carácter agrícola como son los árboles frutales (Davies, 1957; Singh, 1971) o de interés forestal, como coníferas y hayas (Daniel *et al.*, 1982). En éstas últimas, las especies que fructifican abundantemente todos los años se denominan “cadañeras”, (Pemán y Navarro, 1998). La alternancia entre años *on* y *off* es generalmente bianual, pero también un año *on* puede estar seguido por varios años *off*. La sincronización entre diferentes árboles en una misma plantación o en una misma región está desencadenada por condiciones ambientales que reducen la cosecha, como altas o bajas temperaturas, estrés hídrico, etc. Una vez iniciada, la vecería se consolida mediante el efecto de la carga de fruto sobre factores endógenos del árbol, que en última instancia modifican la intensidad de la floración (Samach y Smith, 2013).

INTRODUCCIÓN

En los cítricos, el comportamiento alternante es bastante habitual en los cultivares de naranjo ('Valencia' (Jones *et al.*, 1976), 'Shamouti' (Goren *et al.*, 1971; 'Washington Navel' (Goren y Monselise, 1971); 'Salustiana' (Agustí *et al.*, 1992)), de pomelo (*Citrus x paradisi* Macfad.) 'Marsh' (Betancourt *et al.*, 2008) y, especialmente, de mandarinos híbridos de maduración tardía, tanto los que forman semillas en el fruto ('Moncada' o 'Murcott') como en 'TDE-4', 'Garbí' o 'Safor', que no presentan semillas (IVIA, 2015).

Se considera que, en la práctica, todas las variedades cítricas son potencialmente veceras si un manejo inadecuado provoca campañas de producción excesivamente elevadas o, por el contrario, demasiado escasas. En un año de baja cosecha se producirá un número reducido de frutos de gran calibre y, en general, de mala calidad comercial. Si la cosecha es abundante, los frutos serán numerosos pero con un calibre reducido (Ferenczi *et al.*, 1999), produciéndose una reducción en la brotación y en la floración siguiente, perjudicando la cosecha posterior (Gambetta *et al.*, 2005).

Para evitar la entrada en el patrón de producción alternante, los citricultores utilizan habitualmente prácticas de cultivo que conducen a una estabilidad de la producción, que incluyen la aplicación de fitorreguladores. En campo, se realizan tratamientos para el control de la floración en años con tendencia excesiva a la producción, como son las aplicaciones de ácido giberélico en los meses de noviembre y diciembre (Monselise y Halevy, 1964; Guardiola *et al.*, 1977; Martínez-Fuentes *et al.*, 2004) o al inicio de la brotación, en febrero (Guardiola *et al.*, 1982), así como la poda de ramas.

Para aumentar la floración en años *off*, se ha demostrado la eficacia de las aplicaciones de urea durante los meses de invierno (Lovatt *et al.*, 1988; Ali y Lovatt, 1992) y de inhibidores de las giberelinas como el paclobutrazol (Agustí *et al.*, 2003), si bien éste último tratamiento no está autorizado en la actualidad. También se ha demostrado el efecto del adelanto de la cosecha (Martínez-Fuentes *et al.*, 2010) y del rayado en verano o en otoño, dependiendo de la especie y de la variedad (Agustí *et al.*, 1992).

Asimismo, es posible aumentar el calibre de los frutos mediante tratamientos de rayado al final de la caída fisiológica de frutos (Agustí *et al.*, 1992), el aclareo manual o eliminación de frutos durante el período de crecimiento de los mismos (Jones *et al.*, 1974; Monselise y Goldschmidt, 1981) y la aplicación de auxinas de síntesis como el ácido 3,5,6-tricloro-2-piridil oxiacético (3,5,6 TPA) para aumentar la fuerza sumidero de los frutos (Agustí *et al.*,

2001). El cultivo de los cítricos bajo malla de sombreo o con acolchado del suelo incrementa el desarrollo del árbol y su productividad, y puede favorecer la regularidad en la producción (Trénor y Requena, 2001; Talón *et al.*, 2003).

4. REGULACIÓN DE LA FLORACIÓN EN CÍTRICOS

Los cítricos, y las plantas en general, han desarrollado una complicada red de señalización molecular que les sirve para percibir condiciones ambientales y florecer en el momento del año más apropiado. La floración está controlada por señales ambientales (como la longitud de los días, la temperatura y la disponibilidad de agua) y por factores endógenos (como el estado nutricional y hormonal).

4.1. Influencia de los factores externos

Los cítricos se consideran especies autoinductivas porque no requieren un factor concreto indispensable para desencadenar la floración (Guardiola, 1981; Monselise, 1985; Davenport, 1990a, Krajewski y Rabe, 1995a). Sin embargo, hay factores ambientales que regulan el momento, la intensidad y la duración de la floración de los cítricos, así como también el tipo de flores producidas, su distribución en el árbol, el porcentaje de cuajado y, por último, la cosecha resultante. De entre estos factores, los más importantes son el frío en climas subtropicales y el déficit hídrico en regiones tropicales.

4.1.1. Efecto de las bajas temperaturas

Las bajas temperaturas tienen dos efectos sobre las yemas: inducir la floración y liberar la latencia de las mismas, permitiendo que broten cuando suben las temperaturas. La separación de ambos efectos es difícil de llevar a cabo, ya que el aumento en la floración de las yemas expuestas a bajas temperaturas podría deberse a que las yemas florales tienen una latencia más débil que las vegetativas (García-Luis y Guardiola, 2000; Smith y Samach, 2013). La latencia de los cítricos está impuesta por la influencia de otros órganos

INTRODUCCIÓN

(paralatenencia) y es eliminada por tratamiento de bajas temperaturas. Cultivando *in vitro* yemas aisladas, puede separarse el efecto de la inducción floral del de la brotación y, de esta forma, ha sido demostrado el efecto inductivo *per se* de las bajas temperaturas (García-Luis *et al.*, 1992b).

Una vez que los árboles han alcanzado el período reproductivo, la competencia de las yemas para responder a bajas temperaturas presenta una variación estacional. Las yemas de mandarina satsuma 'Owari' cultivadas *in vitro* se vuelven más sensibles a la inducción por bajas temperaturas a finales de otoño (García-Luis y Kanduser, 1995), mientras que plantas cultivadas en maceta de limonero, mandarina satsuma 'Owari' y *Citrus macrophylla* West. muestran una mayor inducción de la floración en los meses de enero y febrero en respuesta a bajas temperaturas (Ávila, 2004). Esta circunstancia, combinada con las bajas temperaturas propias de esta época del año, parece ser la causa de que la floración principal se concentre en la primavera, con el aumento de las temperaturas, en climas subtropicales (García-Luis y Guardiola, 2000).

La época en que se produce la inducción floral en cítricos no está bien determinada, ya que los primeros signos de morfogénesis floral no se detectan hasta inmediatamente antes de la brotación. Durante el reposo invernal, los ápices están histológicamente indiferenciados hasta la brotación de primavera (Iwahori y Oohata, 1981; Guardiola, 1981; Guardiola *et al.*, 1982; Lord y Eckardt, 1985). Tanto las aplicaciones de giberelinas a principios del mes de septiembre, como el rayado en otoño y la eliminación del fruto afectan a la floración de la primavera siguiente, lo que indica que algún proceso de la transición floral tiene lugar antes del reposo invernal (Guardiola, 1981; García-Luis *et al.*, 1986a; Iwahori *et al.*, 1990). Por otra parte, la capacidad de las giberelinas aplicadas exógenamente de revertir el desarrollo de las yemas florales a vegetativas demuestra que la determinación irreversible de las yemas tiene lugar muy tarde, al empezar la brotación (Iwahori y Oohata, 1981; Guardiola, 1981; Guardiola *et al.*, 1982; Lord y Eckardt, 1985). Davenport (1990b), afirma que en limero 'Tahiti' (*Citrus latifolia* Tan.) la inducción floral tiene lugar inmediatamente antes de la iniciación de la morfogénesis floral.

Las bajas temperaturas deben ser percibidas por la parte aérea de la planta, quedando demostrado que la exposición de raíces a las bajas temperaturas no tiene efecto sobre la

inducción (Davenport, 1990a), y que, en concreto, deben ser percibidas por las mismas yemas (García-Luis *et al.*, 1992b).

La época de frío tiene lugar cuando los días son cortos, y por ello se ha postulado que los fotoperiodos con pocas horas de luz predisponen la inducción de la floración por bajas temperaturas. De hecho, se ha demostrado que los días cortos con temperaturas altas (30°/25°C) no tienen efecto inductivo, pero sí son capaces de aumentar la respuesta inductiva con temperaturas medias (de 24°/19°C), mientras que en temperaturas bajas (18°/13°C) la inducción es la misma con días cortos que con días largos (Moss, 1973). Sin embargo, como indica Davenport (1990), en condiciones naturales es muy difícil separar el efecto del fotoperiodo y las bajas temperaturas.

Se ha comprobado que la competencia no está determinada por la edad de la yema, ya que la capacidad para responder a factores que inducen la floración se adquiere simultáneamente en las yemas formadas durante las brotaciones de primavera y verano (García-Luis *et al.*, 1992a,b). Según los mismos autores, si bien la presencia del fruto podría influir en la adquisición de competencia de las yemas, ya que reduce la formación de flores, no parece ser el único factor, pues no tiene influencia sobre los cambios estacionales en la respuesta a la vernalización.

El umbral de temperatura para la inducción floral no ha sido determinado con precisión, asumiéndose que está alrededor de 19°C (Davenport, 1990a). Inoue (1990) sitúa esta temperatura umbral en 25°C.

En plantas de naranjo dulce ‘Washington Navel’ la intensidad de la floración está relacionada con el descenso de la temperatura entre 22 y 10°C (Moss, 1969). Sin embargo, yemas de mandarino satsuma ‘Owari’ cultivadas *in vitro* florecen independientemente de la temperatura de incubación en un rango de los 10 a los 20°C (García-Luis *et al.*, 1992b). Las temperaturas entre 0 y 4°C, no sólo no inducen floración, sino que también inhiben la formación de flores en yemas inducidas.

La respuesta de la floración a las bajas temperaturas es cuantitativa ya que su intensidad incrementa con la duración del tratamiento en frío (Moss, 1969; Southwick y Davenport, 1986) y con la disminución de temperaturas (Moss, 1969, 1973).

4.1.2. Efecto del estrés hídrico

Un estrés hídrico moderado durante períodos prolongados de tiempo promueve la floración en los cítricos (Nir *et al.*, 1972). De hecho, el estrés hídrico se ha utilizado para inducir la floración en cultivos comerciales, y en algunos casos se ha conseguido producir cosecha fuera de temporada en diversas especies como limonero (Chaikiattiyos *et al.*, 1994), híbridos de mandarino (Tamim *et al.*, 1996), limero (Southwick y Davenport, 1987; Pire y Rojas, 1999) y naranjo dulce (Almaguer *et al.*, 1997). La “forzatura” ha sido una técnica habitual en Palermo (Italia) que permite una cosecha de limón ‘Verdelli’ al incrementar la floración de verano tras una etapa en el que se restringe el aporte de riego (Barbera *et al.*, 1985).

Las características de la respuesta al estrés hídrico, aunque difieren entre especies de cítricos, se ha descrito que dependen de la duración y de la intensidad del mismo. Goell *et al.* (1981) indican que un período corto de estrés es efectivo para iniciar y promover el crecimiento en diferentes épocas de brotación. Otros autores describen etapas de 40 a 60 días como suficientes para promover la inducción y diferenciación de flores en cítricos (Nir *et al.*, 1972). Southwick y Davenport (1986) comparan el efecto de la intensidad del estrés en limero ‘Tahiti’ e indican que dos semanas de estrés hídrico severo (-3.5 MPa) o 4 semanas de estrés moderado (-2.3 MPa) son suficientes para saturar la floración. Otros autores también han descrito que el grado de inducción fue proporcional a la severidad y la duración del estrés hídrico (Singh y Chadha, 1988; Gusolsatit *et al.*, 2003; Ávila, 2004). En otros casos la duración del estrés no afecta a la respuesta, aunque sí el nivel de estrés (Pire y Rojas, 1999).

Una cuestión importante y poco estudiada es la variación estacional de la sensibilidad al efecto del estrés hídrico. Al igual que ocurre en respuesta a las bajas temperaturas (Nebauer *et al.*, 2006), Ávila (2004) indica cambios en la competencia de las yemas a la inducción por estrés hídrico. Un período de sequía en diferentes momentos del año provoca siempre un incremento de la brotación, de forma que cuando se someten a árboles de limonero, mandarino satsuma o limero a estrés hídrico en primavera se forman tanto flores como brotes vegetativos, de acuerdo a lo descrito por otros autores anteriormente. Sin embargo, cuando el estrés se impone en junio, únicamente se forman brotes vegetativos. Estos resultados sugieren que las yemas no son competentes para ser

inducidas, o que las condiciones ambientales, fundamentalmente altas temperaturas, pueden eliminar la inducción de la floración.

Algunos autores han descrito la presencia de una iniciación floral perceptible durante el período de estrés hídrico. Nir *et al.* (1972) observaron primordios de inflorescencias en árboles de limonero 'Eureka' a las 5 semanas de someterlas a déficit hídrico. Las yemas axilares brotaron una vez que las partes florales estaban completamente formadas. Southwick y Davenport (1986, 1987) observaron que la inducción ocurrió durante las dos semanas de imposición del estrés hídrico, seguida por la iniciación de primordios de sépalos de la flor en posición terminal, antes de terminar el período de sequía. Al reanudar el riego se produjo un crecimiento rápido y desarrollo de flores (Davenport, 1990a).

4.2. Influencia de la presencia de fruto

4.2.1. Efecto de la presencia del fruto

Se considera que la principal causa del comportamiento alternante en los cítricos es el efecto inhibitor del fruto sobre la formación de flores en la brotación principal de primavera (Monselise y Goldschmidt, 1982; Becerra y Guardiola, 1984; Agustí *et al.*, 1985). En variedades de producción regular, la cantidad de flores formadas también está inversamente relacionada con la cantidad de fruto en el año anterior (Becerra y Guardiola, 1984), si bien en estos cultivares, el número de flores formadas no es un factor limitante del cuajado del fruto (Guardiola, 1992).

En el efecto de la inhibición del fruto sobre la floración hay que considerar, al menos, dos aspectos. Por una parte, el fruto reprime la formación de brotes vegetativos durante las brotaciones de verano y otoño. Las flores se forman en primavera en yemas axilares de brotes vegetativos (sin fruto). Por tanto, una reducción en su número disminuye los lugares posibles de floración (Monselise y Golschmidt, 1982; Guardiola, 1992). Este efecto puede ser más importante en variedades alternantes, las cuales forman la mayoría de brotes no vegetativos durante la brotación de primavera del año *m*, y es entonces cuando dejan de formar las yemas que darían lugar a los brotes florales el siguiente año, de baja producción (Verreyne y Lovatt, 2009). En segundo lugar, el efecto más

importante del fruto sobre la floración es una acción directa sobre el comportamiento de la yema, reduciendo el número de flores formadas por nudo disponible. Gran parte de este efecto viene de una limitación en la brotación de la yema (Becerra y Guardiola, 1984), aunque también ha sido demostrada una inhibición específica del desarrollo de primordios florales (García-Luis *et al.*, 1995b).

El efecto del fruto sobre la floración depende del número de frutos en desarrollo pero también del momento en que se cosechen. Es bien conocido que el fruto en los agrios ejerce un efecto inhibitorio sobre la floración que depende de la época del año (García-Luis *et al.*, 1986a; Southwick y Davenport, 1987; Iwahori *et al.*, 1990; Verreyne y Lovatt, 2009; Martínez-Fuentes *et al.*, 2010). Iwahori *et al.* (1990) indican que en mandarino satsuma, este efecto es máximo durante septiembre y octubre, mientras que Martínez-Fuentes *et al.* (2010), en naranjo dulce ‘Valencia’, proponen que este efecto es máximo en noviembre, cuando el fruto ya ha alcanzado el 90% de su tamaño final. Para los diferentes cultivares, el momento de máximo efecto inhibitorio del fruto, coincide con los períodos en los que los árboles son más sensibles a la manipulación exógena, tal como el anillado y la aplicación de giberelinas (García-Luis *et al.*, 1986; Martínez-Fuentes *et al.*, 2010).

En las variedades tempranas, como las de mandarino satsuma, el fruto se suele cosechar en septiembre u octubre, al menos un mes antes de que se produzca la inducción floral por bajas temperaturas, lo que indica que el fruto no tiene un efecto directo sobre la formación de flores en ese período (García-Luis y Kanduser, 1995). En estas variedades, la mayor parte del efecto inhibitorio del fruto sobre la floración se ejerce durante los meses de otoño (septiembre a noviembre) y probablemente más temprano, antes de la madurez comercial del fruto. Verreyne y Lovatt (2009) han constatado que en mandarino ‘Pixie’ (*Citrus reticulata*) el aclareo del fruto a principios de verano incrementa la floración siguiente, aumentando el número de yemas brotadas. Cuando se elimina el fruto antes de la inducción floral aumenta la formación de flores (García-Luis *et al.*, 1986b; Verreyne y Lovatt, 2009). Por el contrario, la presencia del fruto durante la exposición a temperaturas inductivas al principio del invierno no tiene efecto significativo sobre la floración (García-Luis *et al.*, 1986a, 1995b).

En cultivares de maduración tardía, la floración se induce mientras el fruto está todavía inmaduro. En naranjo dulce ‘Valencia’ el fruto inhibe la floración desde que completa su

crecimiento hasta la maduración, y no antes. La inhibición se produce en el número de yemas florales brotadas, no en la cantidad de flores por brote (Martínez-Fuentes *et al.*, 2010).

Se ha propuesto que el efecto inhibitor del fruto sobre la floración se realiza a través de la síntesis de giberelinas (Goldschmidt y Monselise, 1972). La presencia de giberelinas en los frutos de los agrios ha sido constatada en numerosos trabajos (García-Luis *et al.*, 1985; Goldschmidt *et al.*, 1997), comprobándose que disminuye conforme madura el fruto. Los contenidos en giberelinas endógenas en el xilema son más elevados en árboles con muchos frutos (Saidha *et al.*, 1983) y en las variedades con semilla, las cuales, en general, presentan más tendencia al comportamiento alternante (Monselise y Goldschmidt, 1982). Por otra parte, la fecundación de los primordios seminales aumenta la presencia de giberelinas en los ovarios, lo cual favorece el cuajado, posiblemente aumentando la capacidad de movilización de carbohidratos hacia los frutitos en desarrollo, lo que finalmente traduce en una mayor carga de fruto (Talón *et al.*, 1990). Las aplicaciones exógenas de giberelinas durante la floración tienen los mismos efectos descritos, mientras que la emasculación o la aplicación de inhibidores de la síntesis de giberelinas como el paclobutrazol, provoca la abscisión de los ovarios en desarrollo (Ben-Cheikh *et al.*, 1997; Agustí *et al.*, 2003; Goldschmidt y Samach, 2004).

4.2.2. Regulación hormonal

Las giberelinas son hormonas con efectos diferentes y específicos sobre la floración. Generalmente estimulan el proceso en la mayoría de las plantas herbáceas (Wilkie *et al.*, 2008), pero tienen un papel inhibitorio en algunas plantas perennes. Se han relacionado las bajas concentraciones de giberelinas endógenas con el aumento de la floración en especies leñosas (Moncur y Hasan, 1994). En la mayoría de los árboles frutales, incluidos los cítricos, las giberelinas tienen, generalmente, un efecto inhibitorio en la floración (González-Rossia *et al.*, 2006; Wilkie *et al.*, 2008).

Está ampliamente aceptado que las giberelinas promueven el crecimiento vegetativo en plantas perennes en detrimento del desarrollo reproductivo. La aplicación de ácido giberélico (GA₃) en ápices inhibe la respuesta en la floración de *Fuchsia hybrida* hort. ex

INTRODUCCIÓN

Siebert & Voss, al tiempo que reduce la concentración de sacarosa en los mismos, probablemente promoviendo el transporte de los azúcares hacia brotes vegetativos que, por el contrario, ven aumentada su tasa de crecimiento (King y Ben-Tal, 2001). En vid (*Vitis vinifera* L.) GA₃ inhibe la formación de flores y promueve la formación y crecimiento de zarcillos (Boss y Thomas, 2002).

Tanto la aplicación exógena de giberelinas durante otoño e invierno, como la presencia del fruto, conducen a una respuesta inhibitoria sobre la brotación y floración de los cítricos (Muñoz-Fambuena *et al.*, 2012a). Sin embargo, la aplicación de exógena de giberelinas no provoca el mismo efecto sobre la brotación y la floración que la existencia de fruto. Cuando se aplican en las fases de inducción y diferenciación temprana, las giberelinas impiden o disminuyen fuertemente la formación de flores (Monselise y Goren, 1969), incluso cuando la diferenciación ha progresado a nivel de la formación de los primordios de sépalos (Nir *et al.*, 1972). Un tratamiento con ácido giberélico entre finales de noviembre y mediados de diciembre reduce hasta un 50% la floración de la primavera siguiente, dependiendo de la concentración aplicada (Agustí y Almela, 1991).

En cítricos, la aplicación en otoño de GA₃ corrige la vecería de ciertas variedades ya que, al disminuir la floración, atenúa el efecto de una carga fisiológica excesiva de un año *on*. La eficacia de este efecto inhibitorio está bien documentada, siendo dependiente del tiempo exacto de su aplicación, de las condiciones climáticas locales, de la variedad tratada y de la concentración y características del tratamiento (García-Luís *et al.*, 1986b; Lord y Eckard, 1987; Goldschmidt *et al.*, 1997; Goldberg-Moeller *et al.*, 2013). Resultan efectivas las aplicaciones en otoño (desde noviembre hasta final de diciembre) que inhiben la inducción floral, así como las aplicaciones más tardías (desde mitad de enero hasta febrero), cuando la diferenciación floral ya puede ser observada en microscopio, con la iniciación de sépalos. No obstante, existen diferencias varietales en la época de sensibilidad a los tratamientos. Así por ejemplo, en mandarino satsuma se observa una mayor sensibilidad al tratamiento un mes posterior a cuando resultan sensibles el naranjo dulce ‘Washington Navel’ y el mandarino clementino (Guardiola *et al.*, 1982).

Se ha constatado que la sensibilidad de las yemas a la inhibición por giberelinas es mucho menor en brotes reproductivos con hojas que en brotes reproductivos sin hojas, que son los que mayormente disminuyen su número (García-Luis *et al.*, 1986b; Lord y Eckard,

1987; Goldberg-Moeller *et al.*, 2013). Los brotes vegetativos no se ven inhibidos por las aplicaciones de giberelinas, e incluso en algunos estudios, éstas tienen como resultado un mayor número de brotes vegetativos (García-Luis *et al.*, 1986b; Goldberg-Moeller *et al.*, 2013).

Por otra parte, el fruto induce la acumulación de ácido abscísico (ABA) en las yemas, lo cual podría ser también un factor regulador de la floración (Shalom *et al.*, 2014). No hay que olvidar el papel del ABA en el mantenimiento de la latencia de la yema, que puede influir en el comportamiento alternante. Cuando se aplica exógenamente, se ha comprobado que el ABA sólo es capaz de retrasar la brotación cuando el tratamiento se efectúa en una época tardía (finales de diciembre) en la que el efecto inhibitorio del fruto ya se ha completado (García-Luis *et al.*, 1986a). Sin embargo, también se ha sugerido la posibilidad de que el ABA promueva la floración, ya que se han detectado concentraciones más altas de ABA en hojas de árboles *off* (que van a florecer intensamente) y árboles *on* a los que se había eliminado el fruto, que en hojas de árboles *on* intactos (que van a florecer menos; Koshita *et al.*, 1999; Okuda, 2000)

Se ha descrito un aumento de los niveles endógenos de ácido indolacético (AIA) en hojas desde octubre a diciembre, detectándose a altos niveles en ramas anilladas (Koshita *et al.*, 1999). Recientes investigaciones con mandarina ‘Murcott’ (Shalom *et al.*, 2014) señalan una menor concentración de AIA en yemas de árboles *off* (que van a florecer) y árboles *on* a los que se había eliminado el fruto, que en yemas de árboles *on* control, y relacionan estos niveles con la transcripción de los genes implicados en el transporte polar de auxinas. El papel inhibitorio de las auxinas sobre la floración tras un año *on* en plantas perennes ha sido sugerido más recientemente (Smith y Samach, 2013). La aplicación de auxinas de síntesis, como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), durante el invierno reduce la floración en más de un 30% en naranjo dulce ‘Navelate’ (Guardiola *et al.*, 1977). Sin embargo, tratamientos exógenos con la auxina sintética ácido naftalenacético (ANA) estimulan la floración en mandarina satsuma (Sato *et al.*, 2007).

Las citoquininas promueven la brotación en diferentes especies cítricas (Hendry *et al.*, 1982), pero no regulan la inducción floral (Inoue e Ikoma, 1991). El tratamiento exógeno con la citoquinina sintética benciladenina (BA) incrementa el número de nudos que brotan. En los árboles tratados el número de flores por árbol aumenta como resultado de

un aumento en la frecuencia de yemas brotadas, pero el número de flores por nudo brotado no es afectado.

4.2.3. Efecto de la disponibilidad de fotoasimilados

La presencia de fruto en el árbol es causante de variaciones en la acumulación y movilización de carbohidratos en el árbol, lo cual puede estar relacionado con su efecto inhibitorio (Goldschmidt, 1999; García-Luis y Guardiola, 2000; Muñoz-Fambuena *et al.*, 2012b) como ya se ha comentado en el apartado 3.2.

4.3. Control génico de la floración

4.3.1. Bases moleculares de la floración en especies modelo

Los diferentes factores, tanto internos como externos, que participan en la regulación de la floración, activan rutas de señalización particulares que acaban convergiendo en ciertos genes claves que integran información de distinta naturaleza (genes integradores florales). En última instancia, éstos se encargan de poner en marcha los grupos de genes responsables del desarrollo de la flor (Blázquez *et al.*, 2011).

En las últimas tres décadas, ha sido muy importante el avance en el conocimiento de estos mecanismos moleculares y genéticos que controlan el proceso de la floración. Hay numerosas revisiones tanto en especies monocotiledóneas como en dicotiledóneas anuales (Alexandre y Hennig, 2008; Turck *et al.*, 2008; Amasino, 2010; Blázquez *et al.*, 2011; Andrés y Coupland, 2012) como en especies perennes (Hanke *et al.*, 2007; Wilkie *et al.*, 2008; Andrés y Coupland, 2012). Sin embargo, el conocimiento en éstas últimas es, hasta hoy, relativamente limitado (Pilliteri *et al.*, 2004a,b; Jaya *et al.*, 2011). En sistemas muy estudiados como arroz (*Oryza sativa* L.), especies de chopo (*Populus trichocarpa* (Torr. & Gray).y *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., la floración parece regulada por genes y redes de señalización similares, si bien hay que indicar que la mayor parte de la investigación se ha desarrollado con *Arabidopsis*. En esta planta anual, se ha podido comprobar la

implicación en el control del momento de la floración de aproximadamente 180 genes, gracias a la identificación de mutantes y al empleo de plantas transgénicas (Fornara *et al.*, 2010).

Se ha llegado a la aceptación general de que hay cuatro rutas principales que regulan la inducción floral: la ruta de control por fotoperiodo, la ruta de la temperatura, la ruta de la edad y la ruta de control por giberelinas y nutrientes (Jack, 2004; Amasino, 2010), que muestran un alto grado de interacción. Uno de los principales genes integradores en el que convergen diferentes rutas, como la ruta del fotoperiodo y la temperatura, es el *FLOWERING LOCUS T (FT)*. *FT* se expresa mayormente en hojas desarrolladas, y la proteína *FT* es transportada vía floema hasta los meristemos. La proteína *FT* interactúa con *FD*, codificada por *FLOWERING LOCUS D (FD)*, presente en los ápices antes de las condiciones de inducción: *FT* regula el momento de la transición floral, mientras *FD* regula espacialmente la floración (Abe *et al.*, 2005; Wigge *et al.*, 2005). Es el complejo *FT/FD* el que activa los genes de identidad de meristemo floral.

- En la *ruta dependiente del fotoperiodo*, la longitud de los días se percibe a través de mecanismos en los que participan los fotorreceptores y el reloj circadiano. La coincidencia de un ritmo interno de expresión del gen *CONSTANS (CO)* con una señal luminosa externa hace que, en día largo, se dé una mayor estabilidad y actividad de la proteína *CO*, que conduce a la activación del gen *FT*, y al también gen integrador *SOC1 (SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1)*. Las proteínas *FT* y *SOC1*, inducen los genes de identidad floral *APETALA1 (AP1)* y *LEAFY (LFY)*, que inician la expresión en cascada de genes del desarrollo floral (Blázquez *et al.*, 2001).

- En la *ruta dependiente de la temperatura*, se han podido identificar unos pocos genes que establecen el requerimiento de vernalización. El gen *FLC (FLOWERING LOCUS C)* de *Arabidopsis thaliana* codifica un factor de transcripción que actúa como un potente represor de la floración. La proteína *FLC* impide la activación de los genes integradores florales *FT* y *SOC1*, que inducen el inicio de la floración. Por otra parte, el aumento paulatino de la temperatura cuando se acerca la primavera, es percibido como una señal que conduce a la síntesis de las proteínas *FCA (FLOWERING LOCUS CA)* y *FVE*

(FLOWERING LOCUS VE). Estas proteínas también inhiben la expresión de *FLC* (Sheldon *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2002).

- *Ruta de las giberelinas y los nutrientes.* Las giberelinas, que regulan múltiples aspectos del crecimiento vegetativo, resultan esenciales para la floración de *Arabidopsis*, y otras plantas de día largo, bajo condiciones no inductivas de día corto (Wilson *et al.*, 1992). En estas condiciones, las giberelinas activan dianas moleculares tales como el gen de identidad floral del meristemo *LFY* a través de una ruta de señalización que es independiente de la ruta del fotoperiodo (Blázquez y Weigel, 2000). No obstante, se han puesto de manifiesto ciertas interacciones entre los componentes de la ruta de las giberelinas y algunos genes de la ruta de floración dependiente del día largo (Blázquez *et al.*, 2001). Giberelinas y nutrientes actúan promoviendo la floración a través de una ruta común de señalización. El análisis de la concentración de sacarosa y de GA₄ en plantas crecidas en día corto revela que ambos compuestos comienzan a acumularse en el ápice de la planta justo antes de la floración (Eriksson *et al.*, 2006). Las giberelinas y la sacarosa actúan de forma sinérgica activando el promotor de *LFY*. Ahora bien, las giberelinas no son las únicas hormonas implicadas en el control de la floración. Los brasinoesteroides y las giberelinas podrían compartir elementos de señalización en el control de la floración (Blázquez *et al.*, 2001).

- *Ruta dependiente de la edad.* Al aumentar la edad de la planta, la concentración del factor de transcripción SPL (SQUAMOSA PROMOTER BINDING-LIKE) incrementa.

Así pues, una serie de rutas convergen para regular un pequeño número de genes integradores que estimulan el desarrollo floral. La iniciación floral implica un cambio drástico en la arquitectura de la planta que está regida por la interacción de genes que determinan la identidad del brote, tales como *TFL1* (TERMINAL FLOWER 1) y *TFL2* (TERMINAL FLOWER 2), y aquellos que determinan la identidad de meristemo floral, tales como *LFY* y *AP1* (Blázquez *et al.*, 2001). El nivel de expresión de *LFY* es ya detectable en primordios florales y va incrementando hasta la transición floral (Blázquez *et al.*, 1997; Hempel *et al.*, 1997) y es determinante de la identidad floral del meristemo. En

contraste a *LFY*, la expresión de *AP1* aparece en el estado inicial del meristemo floral cuando ya se ha iniciado la transición. Los principales reguladores de la expresión de *AP1* son *LFY* y *FT*. Mientras *LFY* y *AP1* especificarían la identidad floral del meristemo, *TFL1* especificaría el tipo de inflorescencia (Shannon *et al.*, 1991; Blázquez *et al.*, 2006).

Los genes de identidad del meristemo floral codifican factores de transcripción cuyas dianas son otros genes, los llamados genes de identidad de órgano, que son responsables de la diferenciación floral, y determinan espacialmente la identidad de los distintos órganos florales mediante la interacción entre ellos según el modelo ABCDE basado a su vez en el modelo ABC postulado por Coen y Meyerowitz (1991) en *Arabidopsis* (Egea-Cortines y Davies, 2000).

4.3.2. Bases moleculares de la floración en cítricos

En los últimos años, han sido numerosos los genes relacionados con la floración en especies cítricas que han sido aislados y de los que se ha evaluado su expresión, tales como *LFY*, *AP1*, *TFL1*, *FT*, *SOC1*, *FLC* y *SPL5* (Kobayashi *et al.*, 1999; Peña *et al.*, 2001; Pillitteri *et al.*, 2004a,b; Endo *et al.*, 2005; Dornelas *et al.*, 2007; Tan y Swain, 2007; Zhang *et al.*, 2009; Nishikawa *et al.*, 2007 y 2010; Zhang *et al.*, 2011; Muñoz-Fambuena *et al.*, 2011, Shalom *et al.*, 2014). Estudios posteriores han descrito la existencia de tres genes homólogos de *FT*: *CiFT1*, *CiFT2* y *CiFT3* (Nishikawa *et al.*, 2007; Shalom *et al.*, 2012; Samach, 2013). Por el contrario, no se han encontrado homólogos de *FRI* (*FRIGIDA*) ni de otros genes integrantes de la ruta de la vernalización como *VRN1* (*VERNALIZATION 1* o *VRN2* (*VERNALIZATION 2*)) (Dornelas *et al.*, 2007).

La expresión constitutiva de los genes *LFY* o *AP1* de *Arabidopsis* (Peña *et al.*, 2001) en citrange ‘Carrizo’ (*Citrus sinensis* (L.) Osb. x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) y de ortólogos de *FT* (*CiFT*) en *P. trifoliata* (Endo *et al.*, 2005) y en mandarino satsuma ‘Okitsu’ (Nishikawa *et al.*, 2007), reduce drásticamente la fase juvenil, permitiendo florecer a plantas de un año de edad. Con *LFY* y *AP1*, las plantas transformadas siguen necesitando condiciones inductivas de bajas temperaturas para florecer. Por el contrario, la sobreexpresión de *CiFT* conduce a la floración de plantas jóvenes sin mediar inducción por bajas temperaturas. La sobreexpresión transgénica de *LFY* y *AP1* provoca efectos pleiotrópicos

INTRODUCCIÓN

negativos, dando como resultado un desarrollo anormal. Esto no sucede en el caso de *CiFT* (Peña *et al.*, 2001; Endo *et al.*, 2005; Nishikawa *et al.*, 2007).

No se conoce todavía cuáles son los factores que desencadenan la adquisición de la competencia de la yema en árboles adultos de cítricos. La expresión de *CiFT* en mandarino satsuma muestra un incremento estacional durante los meses de otoño e invierno, período durante el cual transcurre la inducción floral, y también aumenta con la exposición a temperaturas de 15°C, las cuales a su vez inducen la floración. En plantas sometidas a 25°C, las cuales no florecen, la expresión de este gen no se ve afectada (Nishikawa *et al.*, 2007 y 2010). No obstante hay que indicar que en los trabajos citados se habla de un único gen *FT*. El trabajo de Shalom *et al.* (2012) indica que el homólogo implicado en la inducción de la floración es *CiFT2*, mientras que *CiFT1* y *CiFT3* parecen estar relacionados con el control del crecimiento vegetativo.

En definitiva, se ha observado que los cambios en la expresión de *CiFT* están correlacionados con la periodicidad estacional de la floración (Muñoz-Fambuena *et al.*, 2011; Nishikawa, 2013).

En los últimos años el efecto inhibitorio de las giberelinas en la floración de los cítricos ha sido estudiado a nivel molecular (Muñoz-Fambuena *et al.*, 2012a; Goldberg-Moeller *et al.*, 2013). Los efectos de la aplicación de ácido giberélico sobre la expresión en hojas de los genes que regulan la floración han sido descritos por Muñoz-Fambuena *et al.* (2012a) en mandarino ‘Moncada’ y en yemas de mandarino ‘Orri’ por Goldberg-Moeller *et al.* (2013).

Asimismo, también se ha estudiado la expresión de este tipo de genes y su relación con el comportamiento alternante en hojas de mandarino ‘Moncada’ (Muñoz-Fambuena *et al.*, 2011, 2012b, 2013), en hojas de naranjo ‘Salustiana’ (Muñoz-Fambuena *et al.*, 2012a) y en yemas de mandarino ‘Orri’ (Shalom *et al.*, 2012).

En estos trabajos se indica que la aplicación de ácido giberélico durante la inducción floral en naranjo ‘Salustiana’ reduce la expresión de *CiFT* en las hojas, mientras que la aplicación de paclobutrazol revierte el efecto (Muñoz-Fambuena *et al.*, 2012b).

Por otra parte, Goldberg-Moeller *et al.* (2013) han demostrado en mandarino híbrido ‘Orri’ que, como resultado del tratamiento otoñal de ácido giberélico, disminuye la

transcripción de *FT* y *AP1* en yemas y que la expresión de estos genes es mayor en yemas de árboles en año *off* que en árboles en *on* (Shalom *et al.*, 2012).

Los estudios sobre la expresión del gen *LFY* muestran resultados contradictorios. Así, se observa que la presencia del fruto disminuye la expresión de este gen en hojas y yemas. Además, el tratamiento con paclobutrazol, aumenta la expresión de este gen (Muñoz-Fambuena *et al.*, 2012a,b; Shalom *et al.*, 2012). Sin embargo, el tratamiento con ácido giberélico durante el período de inducción floral, incrementa su expresión hasta el mes de enero, para disminuir con posterioridad en febrero (Goldberg-Moeller *et al.*, 2013).

5. LA PRÁCTICA DEL ANILLADO

5.1. Descripción y usos de la práctica del anillado

El anillado de ramas es una técnica que forma parte del manejo agronómico tradicional de distintas especies frutales, en las que se lleva a cabo con el objetivo principal de disminuir el crecimiento vegetativo y aumentar el desarrollo de flores o frutos, dependiendo de la época de realización (Noel, 1970). Consiste en la eliminación de un anillo de corteza del tronco o de las ramas principales del árbol y tiene como finalidad la interrupción temporal del transporte floemático, tratando de no perjudicar el xilema secundario. Para lograr esta interrupción, se emplean principalmente dos técnicas:

- *Anillado* (propriadamente dicho): consiste en la separación de un anillo completo de corteza del tronco o de las ramas principales, de varios mm de anchura (entre 2 mm y varios cm, según zona y cultivo).

- *Rayado*: consiste en la incisión anular o helicoidal, sin separación de la corteza, realizando un corte alrededor de toda la rama, de 1 mm de anchura aproximadamente.

En ambos casos los cortes se llevan a cabo con unas tijeras de filo curvo, especialmente diseñadas para estas operaciones.

Aun cuando se trata de evitar producir daños en la madera, el callo que se forma como reacción de herida puede colapsar los vasos más externos del xilema (Cohen, 1981)

INTRODUCCIÓN

interfiriendo con ello en la funcionalidad del transporte por este tejido. En cuanto al floema, la opinión de algunos autores es que la restauración de los tejidos nunca llega a ser completa de forma que la práctica continuada de esta técnica va reduciendo lentamente la capacidad de transporte del árbol (González-Sicilia, 1968). El anillado es, por tanto, una práctica polémica por los efectos indeseados que pueden derivarse, incluida la muerte de la planta, con lo cual sólo debe ser aplicada en árboles sanos (Cohen, 1981). El anillado completo de todas las ramas principales del árbol o del tronco, sólo se ha venido realizando en la fruticultura tradicional el año anterior al que el agricultor había decidido cambiar de variedad (Juan *et al.*, 1995) dados los peligros que pueden derivarse de un tratamiento indebido.

Son varias las revisiones publicadas sobre los efectos de esta práctica, tanto en frutales en general (Noel, 1970; Goren *et al.*, 2003), como en especies cítricas (Krajewsky y Rabe, 1995a). En ellas se cita que, ya en 1762, Fitzgerald estudió la transición de ramas anilladas de cerezo de un estado vegetativo a uno de floración y fructificación, y que Knight, en 1820, mostró que, tras el anillado, se obtenía una floración más intensa y una madurez más rápida, señalando que la estimulación de la floración se debía a la acumulación de nutrientes sobre el anillo.

En los agrios, el anillado se ha utilizado en campo tradicionalmente, con el objetivo principal de adelantar y aumentar la cosecha, y para corregir la alternancia de producción.

En el ámbito de la investigación, el anillado es una técnica que permite investigar el papel de los nutrientes, hormonas y otras sustancias en la fisiología de los cítricos. Entre otros aspectos, el anillado se ha utilizado para el estudio de:

- el momento de la inducción floral en combinación con la defoliación (Valiente y Albrigo, 2004)
- el papel de los carbohidratos sobre la floración (Agustí *et al.*, 1992; García-Luis *et al.*, 1995a; Martínez-Fuentes *et al.*, 2010)
- el efecto de las giberelinas en el cuajado del fruto (Mehouachi *et al.*, 2009; Rivas *et al.*, 2010)
- el efecto de los carbohidratos en el cuajado del fruto (Rivas *et al.*, 2006; Mehouachi *et al.*, 2009; Rivas *et al.*, 2010)

- el efecto de la acumulación de carbohidratos en la fotosíntesis (Mataa *et al.*, 1998; Iglesias *et al.*, 2002; Rivas *et al.*, 2007 Nebauer *et al.*, 2011)
- la respuesta de los cítricos a condiciones de estrés (Rivas *et al.*, 2008, 2011).

La respuesta del árbol frente al anillado depende de varios factores tales como el tiempo que tardan en restablecerse las conexiones vasculares, el momento en que se efectúa y el estado productivo del árbol. En general, el anillado temprano de otoño aumenta la formación de flores (Cohen, 1981; Goldschmidt *et al.*, 1985; Erner, 1988; García-Luis *et al.*, 1988). En primavera, en plena floración, aumenta el cuajado del fruto (Erner, 1988), mientras que realizado en verano aumenta el tamaño del fruto (Fishler *et al.*, 1983; Cohen, 1984a,b).

5.2. Aspectos anatómicos del anillado

El tiempo requerido para la formación de un callo que renueve las conexiones vasculares en el floema a ambos lados del anillado determina la duración e intensidad del efecto del mismo. Este período de tiempo es función de la anchura del anillo y del momento en que se realiza. A comienzo de la temporada de crecimiento, el restablecimiento se efectúa mucho más rápido que si se hace al final de ella (Schneider, 1954).

Según Noel (1970), el tejido que cicatriza la herida se desarrolla en dos etapas. La primera consiste en la formación de las células indiferenciadas del callo, mientras que en la segunda etapa se diferencia el tejido vascular a partir del nuevo cámbium formado dentro del callo. Swarbrick (1927; citado por Noel, 1970) demostró que la formación de callo en manzanos anillados se debe en un primer momento a la proliferación celular a partir del floema. Así como el tejido floemático que se desarrolla en el callo es normal, el xilema está irregularmente dispuesto en un patrón desorganizado.

En casi todas las especies estudiadas en la revisión de Noel (1970), la cicatriz formada en el margen inferior del corte es mucho más pequeña, y se desarrolla más lentamente que la del margen superior, lo que refleja las diferentes condiciones fisiológicas de los dos márgenes. Aún así, Esau *et al.* (1957) y Eschrich (1970), mostraron que tras el corte de los

vasos de floema se forma una inmediata conexión de los elementos de los tubos cribosos, restableciéndose el transporte.

En cítricos, en el proceso descrito por Schneider (1954), el anillado causa una proliferación en el floema siguiendo el patrón que se detalla a continuación: 1) Formación de células de callo sobre los tubos floemáticos rotos. 2) Colapso de los tubos. 3) Absorción del callo y del contenido del tubo floemático. 4) Hipertrofia del parénquima floemático. Posteriormente, en la superficie del callo se forman células epidérmicas.

Según Cohen (1981), realizando un anillado de 2 a 3 mm de anchura, no se restablece el transporte vía floema hasta 6 ó 12 semanas después de ser realizado. En el rayado, la herida que se produce es mucho menos intensa, lo que facilita su cicatrización y restauración del tejido floemático al poco tiempo, restableciéndose en el plazo de 1 a 2 semanas (Furr *et al.*, 1947).

5.3. Efecto del anillado sobre la acumulación de carbohidratos

El aumento del contenido en carbohidratos, particularmente de almidón, en los órganos situados por encima del anillado es uno de los efectos más estudiados en los cítricos (García-Luis *et al.*, 1995a; Mataa *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2003a; Rivas *et al.*, 2010; Nebauer *et al.*, 2011), siendo comúnmente aceptado que los efectos beneficiosos del anillado son consecuencia del aumento de la disponibilidad de carbohidratos en la parte aérea del árbol, si bien no ha podido ser demostrada esta relación causal.

En los experimentos de Iglesias *et al.* (2002), llevados a cabo con mandarino satsuma ‘Okitsu’, se muestra una correlación negativa entre la acumulación de almidón en hojas provocada por el anillado y la actividad fotosintética en hojas de diferentes edades. Yamanishi (1995) observó esta reducción de la fotosíntesis en pomelo. En especies no cítricas, como en manzano, también se ha comprobado que hay un descenso en la fotosíntesis tras el anillado (Zhou y Quebedeaux, 2003).

En general, se atribuye la reducción de la fotosíntesis a una acumulación de fotoasimilados en las hojas. De hecho, en ausencia de fruto (u otros sumideros activos) las hojas de árboles anillados pueden presentar algún grado de clorosis, atribuida por Cohen (1977) a una acumulación excesiva de productos de la fotosíntesis. Schaffer *et al.* (1986)

caracterizaron posteriormente este fenómeno, mostrando que en ausencia de un sumidero de salida, los cloroplastos de las hojas se cargan de almidón hasta el punto de que el sistema tilacoidal resulta dañado y la clorofila se degrada. Por otra parte, se ha demostrado que los azúcares ejercen una represión en la expresión de algunos genes fotosintéticos (Jang y Sheen, 1994), lo cual formaría parte de un mecanismo general de ajuste de fotosíntesis a la demanda de los sumideros. Sin embargo, el efecto de la demanda sobre la fotosíntesis no es tan obvia en muchas especies, incluidos los cítricos, ni demostrable en todas las condiciones (Syvertsen y Lloyd, 1994; Goldschmidt y Koch, 1996).

Los resultados de Iglesias *et al.* (2002), empleando inyección de sacarosa al tronco, apoyan la hipótesis de que los carbohidratos tienen, *per se*, un efecto inhibitorio sobre la fotosíntesis en plantas intactas con sumideros activos. Independientemente de la presencia o no de sumideros activos en el árbol, la sacarosa inyectada provoca un aumento de carbohidratos y un descenso de la actividad fotosintética. Según estos autores, la inhibición de la fotosíntesis no es debida al daño producido en el cloroplasto a través de un exceso de almidón acumulado. En todo caso, la demostración de la causalidad entre el contenido en carbohidratos y fotosíntesis no ha podido ser claramente demostrada. Experimentos recientes con naranjo dulce ‘Salustiana’ han observado que la reducción de la fotosíntesis y del intercambio de gases se produce antes de la acumulación tanto de almidón como de azúcares solubles (Nebauer *et al.*, 2011).

El anillado no evita completamente el movimiento de fotoasimilados desde las hojas hasta las raíces. Loomis (1935) observó que, retirando la corteza, los fotoasimilados presentaban un movimiento basípeto a través de la madera más periférica, llegando hasta las raíces. De este modo, el daño producido en las capas más superficiales de xilema no sólo afectaría al movimiento ascendente del agua sino que, además, impediría el movimiento descendente de sustancias orgánicas. Sin embargo, parece que las cantidades transportadas por esta vía son insignificantes.

En cítricos, Schneider (1954) comprobó que las raíces de árboles anillados disminuyen su concentración en carbohidratos, efecto que se produce más rápidamente si se anilla a mitad de la época de crecimiento, y más lentamente a final de ésta.

El contenido de carbohidratos por encima del anillado puede no verse aumentado si estos se utilizan en el crecimiento de órganos en desarrollo, como hojas y frutos, y no empiezan

a acumularse hasta que se completa su crecimiento (Swarbrick, 1927, citado por Noel, (1970), en hojas de manzano) o se cosechan los frutos (García-Luis *et al.*, 1995a; Goldschmidt *et al.*, 1985). Asimismo, la eliminación del fruto tiene como consecuencia una respuesta inmediata en el incremento de azúcares no reductores y una acumulación más rápida de almidón en hojas de árboles anillados. Las diferencias en carbohidratos persisten hasta la brotación de primavera. En árboles sin fruto, el anillado tiene como consecuencia una acumulación inmediata de almidón y azúcares no reductores en las hojas, muy por encima de los controles. Los árboles anillados en octubre alcanzan el contenido máximo de almidón en hojas al principio de diciembre, sin producirse cambios sobre los azúcares reductores (García-Luis *et al.*, 1995a).

5.4. Efecto del anillado sobre la floración

El efecto del anillado sobre la floración depende del momento y de la variedad sobre la que se realice el tratamiento. En cítricos, la efectividad del anillado de otoño para aumentar la floración está muy documentada (Iwahori *et al.*, 1990; Agustí *et al.*, 1992; García-Luis *et al.*, 1995a). El anillado efectuado en invierno, antes de la emergencia de los brotes, incrementa la brotación y el número de flores (Cohen, 1981), pero dado que el tratamiento se realiza en una fase tardía de la diferenciación, no puede considerarse que pueda haber un efecto inductivo.

En mandarino satsuma el anillado incrementa la floración en la primavera siguiente cuando se lleva a cabo desde julio hasta mediados de noviembre (Agustí *et al.*, 1992), aumentando la efectividad con la cercanía a este mes. En la misma variedad (Iwahori *et al.*, 1990) y en naranjo ‘Shamouti’ (Erner, 1988) hay respuesta en el rayado realizado en septiembre y octubre, coincidiendo con el período inductivo. En ambos casos, el anillado un mes antes o un mes después tiene muy poco efecto. Sin embargo, García-Luis *et al.*, (1995a) encuentran un efecto similar anillando tanto a inicios de octubre como de noviembre en mandarino satsuma ‘Owari’. En naranjo dulce ‘Salustiana’ el máximo efecto sobre la floración se obtiene anillando a final de julio y este efecto, aunque todavía observable, disminuye considerablemente en noviembre (Agustí *et al.*, 1992).

El anillado en otoño aumenta el porcentaje de nudos brotados en la primavera siguiente, incrementa el número de brotes reproductivos, especialmente brotes sin hojas y disminuye el de los vegetativos (Iwahori *et al.*, 1990; Agustí *et al.*, 1992; García-Luis *et al.*, 1995a).

Además de influir en el número de flores, el anillado tiene un efecto considerable sobre el momento del inicio de la floración. En satsuma, el anillado en otoño adelanta la floración (Iwahori *et al.*, 1990). En manzanos, un anillado temprano tiende a anticipar la floración, mientras que el anillado en verano tiende a retrasarla (Noel, 1970).

Los mecanismos que desencadenan el efecto provocado por el anillado sobre la floración todavía no han podido ser explicados. El anillado podría actuar durante el momento de la inducción por bajas temperaturas a través del efecto sobre la acumulación de carbohidratos y otros metabolitos en el árbol. En mandarino ‘Murcott’ el rayado aumenta el contenido en carbohidratos y la floración, y ambos sucesos quedan anulados por la presencia de fruto (Goldschmidt *et al.*, 1985). Sin embargo, según García-Luis y Guardiola (2000) esto parece poco probable, ya que según sus observaciones no hay evidencias de que los niveles de carbohidratos en las hojas limiten la formación de flores ni que actúen como el principal factor responsable del efecto del fruto y del anillado sobre la formación de flores. En mandarino satsuma ‘Owari’, el anillado al inicio del período inductivo (desde octubre a mitad de diciembre) incrementa la floración independientemente de los niveles de almidón que se acumulan (García-Luis *et al.*, 1988). El rayado, además, es igualmente efectivo en árboles cosechados temprana o tardíamente, aunque la acumulación de carbohidratos en ambos tratamientos es diferente (García-Luis *et al.*, 1995a).

La interrupción del transporte floemático provocado por el rayado afecta no sólo a los fotoasimilados, sino que también altera el equilibrio hormonal en la planta. Sin embargo, los estudios realizados en este aspecto son poco concluyentes (Goren *et al.*, 2003).

En cítricos, el anillado aumenta los niveles de giberelinas endógenas en hojas y corteza situadas por encima del lugar donde se practica (Goren *et al.*, 1971; Wallerstein *et al.*, 1973; Cutting y Lyne, 1993), mientras que provoca su disminución en las raíces, lo que puede ser debido tanto a una inhibición del transporte por el floema como a la síntesis de las

INTRODUCCIÓN

mismas debida a la interrupción del transporte de carbohidratos (Carr *et al.*, 1964). Según Paleg (1965) las giberelinas se transportan tanto por el xilema como por el floema.

Según Cohen (1981), la acumulación de giberelinas en la parte aérea debería de inhibir la floración, al contrario de lo que de hecho, ocurre. De la misma manera, el rayado de ramas con fruto debería traducirse en una mayor inhibición de la floración de la que por sí provoca la presencia del fruto, debido a una acumulación de giberelinas. Sin embargo, esto tampoco ocurre así (Goldschmidt *et al.*, 1985; García-Luis *et al.*, 1995a).

Al ser el movimiento de las auxinas basípeto (Huber, 1948) y producirse a través del floema y del cámbium, una consecuencia directa del anillado sería una acumulación de auxinas sobre el anillo y una disminución en la concentración de auxinas debajo de éste. Sin embargo, Stoltz (1965) comprobó que había una baja concentración de auxinas en ramas anilladas en especies del género *Hibiscus* L.

Las yemas de árboles anillados de mandarino satsuma responden más a la aplicación de citoquininas (benziladenina) en formación de flores cultivadas *in vitro* (Iwahori *et al.*, 1990). En muchas especies, la presencia de citoquininas en el medio de cultivo es un requisito para la formación de flores *in vitro* (Scorza, 1982).

Hasta el momento, no se ha establecido una relación clara entre la inducción floral en cítricos y los niveles endógenos de auxinas, ácido abscísico o giberelinas en hojas de ramas anilladas (Koshita *et al.*, 1999; Goren *et al.*, 2003).

Otros cambios causados por el anillado, tal como el cese temporal de la elongación de los brotes (Monselise, 1973, 1985) y la acumulación de proteína (Bernier *et al.*, 1981) son considerados como prerequisites para la transición floral. La acumulación de proteínas en las yemas está fuertemente ligada a la floración (Iwahori *et al.*, 1990) y precede a la formación floral *in vitro*, estando ausente en plantas jóvenes que no florecen. Si bien no se han encontrado las proteínas específicas que influyen en este proceso, las diferencias en contenido proteico y de comportamiento de yemas cultivadas *in vitro* demuestran un efecto inmediato del anillado en las propias yemas, lo cual podría determinar su mayor respuesta a las bajas temperaturas inductivas de la floración.

6. OBJETIVOS DEL TRABAJO

Los procesos de fotosíntesis y distribución de fotoasimilados son factores limitantes de la producción de árboles cítricos. Esta limitación tiene especial relevancia en variedades que presentan vejería, que alternan años de elevada producción y fruto de pequeño tamaño, con años de baja producción y fruto de gran tamaño. En el presente trabajo se estudia la variación anual de la fotosíntesis y del contenido en carbohidratos en la variedad 'Salustiana' de *Citrus sinensis*, en relación con la carga de fruto del árbol y su influencia en el comportamiento reproductivo. Para ello se proponen los siguientes objetivos parciales:

- Estudiar la brotación, floración y cuajado en árboles con diferencias extremas en carga de fruto.
- Realizar un estudio sistemático de la variación anual de la fotosíntesis. Determinar la contribución relativa sobre la actividad fotosintética de factores ambientales e internos, con especial atención al efecto de la carga de fruto.
- Estudiar los niveles de carbohidratos a lo largo del año y su relación con la carga de fruto y la floración subsiguiente.
- Relacionar la variación en el contenido en carbohidratos en brotes, provocada mediante técnicas de rayado, con el proceso de la floración.
- Comparar el comportamiento frente al rayado de la variedad de naranjo dulce 'Salustiana' con el de un cítrico con diferente época de inducción floral, como el mandarino satsuma 'Owari'.
- Relacionar los niveles endógenos de giberelinas en yemas con la inhibición de la floración debida a la presencia del fruto.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIAL VEGETAL

1.1. Naranja dulce ‘Salustiana’ (*Citrus sinensis* (L.) Osb.)

Los experimentos se realizaron con árboles de naranja dulce de la variedad ‘Salustiana’ (*Citrus sinensis* (L.) Osb.) injertados sobre citrange ‘Troyer’ (*Citrus sinensis* (L.) Osb.) x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.). Los árboles, se encontraban situados en una parcela comercial implantada en 1982, con un marco de plantación de 5x5 m, ocupando una superficie total de 4200 m², ubicada en la provincia de Valencia, en el término municipal de Museros, a 17 m sobre el nivel del mar.

La parcela estaba equipada con fertirrigación mediante un sistema de riego localizado. Se realizaron análisis foliares periódicos para ajustar la fertilización a las necesidades de los árboles, lo que se llevó a cabo siguiendo las indicaciones de aplicación del IVIA (Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias), aunque con modificaciones por la alcalinidad del suelo.

El suelo tenía una textura franco-arenosa, color 5YR5/3 (rojizo) y un valor de pH de 8,53 (alcalino). Mediante análisis de fertilidad del mismo, se apreció un bajo contenido en materia orgánica (0,69%) y en nitrógeno total (0,092%) y muy baja relación C/N (4,35). Los niveles de fósforo (18 ppm) y potasio (180 ppm) eran normales. En cuanto al complejo de cambio, el calcio (8,36 meq/100) g y el magnesio (1,4 meq/100 g) eran bajos, situándose el potasio dentro de los valores normales (0,46 meq/100 g).

El correcto manejo de la parcela aseguró las buenas condiciones fitosanitarias de los árboles.

Los árboles presentaron uniformidad de tamaño y buen vigor, si bien mostraron el comportamiento vecero característico de la variedad ‘Salustiana’. Por ello se encontraban árboles en la parcela con una intensidad de floración muy alta y simultáneamente otros con floración casi inexistente, característica que se aprovechó para estudiar la relación entre floración y desarrollo de fruto con la acumulación y movilización de reservas.

El clima de la localidad de Museros es típicamente mediterráneo, con temperatura media anual cercana a los 17°C, sin temperaturas extremas. Las temperaturas medias mensuales oscilan entre los 10°C del mes de enero a los 25°C del mes de julio. Los meses más

lluviosos son octubre y noviembre. La precipitación anual media es de 440 mm. Según la clasificación climática de Köppen-Geiger, se trata de un clima semiárido frío (BSk), caracterizado por una evapotranspiración acumulada mayor a la precipitación anual (Essenwanger, 2001). Como Anexo 1, se presentan las tablas con los registros de la estación meteorológica instalada en el Moncada (IVIA) a 6 km de distancia de la parcela, durante los años en los que se realizaron los experimentos. De estos datos se desprende que no hubo variaciones destacables en las condiciones meteorológicas que tuvieron lugar mientras se desarrollaron los mismos.

En esta localidad, la variedad ‘Salustiana’ inicia la brotación a final del mes de enero, y la antesis de las flores se produce a mediados de marzo, seguida por la abscisión de flores y frutos, que se extiende hasta principios del mes de junio. Posteriormente tiene lugar el desarrollo de los frutos cuajados, su maduración y, finalmente, la recolección, cuya época varía según razones de mercado y de climatología, y que en esta parcela suele realizarse entre la segunda quincena de enero y la primera de febrero.

1.2. Mandarino satsuma ‘Owari’ (*Citrus unshiu* Marc.)

Se utilizaron árboles de mandarino satsuma ‘Owari’ (*Citrus unshiu* Marc.) injertados sobre citrange ‘Carrizo’ (*Citrus sinensis* (L.) Osb.) x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.). Los árboles, plantados en 1994, se encontraban ubicados en la misma finca y en una parcela colindante a la de los árboles de naranja ‘Salustiana’. Por ello, las características climáticas y edafológicas, así como el sistema de riego y, en conjunto, el manejo hídrico, nutricional y sanitario fueron los mismos en ambas parcelas. El marco de plantación en este caso era de 4x4.

2. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD FOTOSINTÉTICA

2.1. Medidas de intercambio gaseoso y fluorescencia

Se midió la tasa de fijación de CO₂ (A_N), la conductancia estomática (g_s), la tasa de transpiración (E) y la concentración subestomática o intercelular de CO₂ (C_i) en estado

estacionario en condiciones de luz, temperatura, humedad relativa y concentración de CO₂ ambiental con un LCI *Portable Photosynthesis System* (ADC, Herts, Reino Unido), utilizando una cámara foliar de hoja ancha (6,25 cm² de área). La eficiencia instantánea en el uso del agua (EUA) se calculó mediante la relación A_N/E . Para compensar las oscilaciones del aparato, los datos utilizados fueron las medias de 4 valores tomados en intervalos de 20 s, empezados a tomar una vez estabilizado el aparato, unos 2 min después de introducir la hoja en la cámara. Se utilizaron 10 árboles en cada lote.

El rendimiento cuántico fotoquímico máximo de las clorofilas del fotosistema II se calculó como F_v/F_m siendo F_v la diferencia entre F_m y F_o (F_v =fluorescencia variable, F_m =fluorescencia máxima, F_o =fluorescencia mínima) y fue medido sobre hojas tras 30 min en oscuridad con un fluorímetro portátil de pulsos de amplitud modulada (MINI PAM, Walz, Effeltrich, Alemania). La señal de fluorescencia basal en hojas adaptadas a oscuridad (F_o) fue determinada a una luz de 0,5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a una frecuencia de 600 Hz. La aplicación de un pulso de luz de alta intensidad (10000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) permitió las medidas de la fluorescencia máxima (F_m).

Las medidas de intercambio gaseoso y de fluorescencia fueron realizadas desde las 9h hasta las 12h del día. Las medidas se llevaron a cabo en hojas maduras totalmente expandidas, tratándose de la tercera o cuarta hoja del brote, contando desde el ápice (excepto cuando se estudió el efecto de la posición de la hoja en el brote).

2.2. Medida del contenido de clorofila en hojas

Para estudiar el contenido en clorofila se utilizó el medidor de campo Minolta SPAD 502. El SPAD-502 determina la cantidad relativa de clorofila presente mediante la medición de la absorción de la hoja en las regiones de longitud de onda roja y cercanas a infrarroja. Utilizando estas dos transmisiones el medidor calcula el valor numérico SPAD, que es proporcional a la cantidad de clorofila presente en la hoja. El resultado se dio en unidades SPAD de Minolta.

Las medidas se efectuaron en las mismas condiciones detalladas en el apartado anterior, manteniendo la parte central del limbo de la hoja entre las pinzas del aparato.

3. TRATAMIENTOS DE RAYADO

Cada tratamiento de rayado consistió en la incisión de un corte completo abarcando todo el perímetro de la base de la rama seleccionada, realizada con una navaja específica que los agricultores locales utilizan para tal fin.

3.1. Rayado de árboles completos

Se realizaron los tratamientos de rayado en cada una de las ramas principales que conformaban la copa. Estas ramas, en número de 5 a 10 por árbol, tenían entre 5 y 15 cm de diámetro.

3.2. Rayado de ramas individuales

En este caso, fueron ramas individuales de 11 a 12 mm de diámetro y con origen en la misma rama principal las que se rayaron por la base, usando el mismo procedimiento descrito.



Fig. 1. Rama principal de naranjo dulce 'Salustiana' tres meses después de un tratamiento de rayado.

4. MEDIDA DE LA BROTAÇÃO Y LA FLORACIÓN

La brotación y la floración se midieron al final de la brotación de primavera, entre la segunda quincena de marzo y la primera quincena del mes de abril.

En cada árbol de naranjo ‘Salustiana’, se marcaron cuatro ramas en direcciones ortogonales y se anotaron las yemas formadas y los brotes formados en un mínimo de 500 nudos por árbol situados sobre la brotación de primavera del año anterior (cerca de 12 meses de edad al realizar las medidas) y de un año antes (aproximadamente 24 meses de edad). Se registraron las yemas brotadas y número y características de los brotes formados, tanto vegetativos como reproductivos.

En los experimentos con rayado de ramas individuales, se observaron y anotaron los brotes de todos los nudos situados en madera de 1 y 2 años de las ramas seleccionadas (unos 200 nudos por rama). En el caso de los árboles de mandarino satsuma ‘Owari’, los nudos se diferenciaron entre aquellos situados en madera de primavera y la de verano.

Los brotes se clasificaron en las siguientes categorías, tanto en naranjo ‘Salustiana’ (Fig. 2) como en mandarino satsuma (Fig. 3):

- brotes vegetativos*, con sólo hojas

- brotes reproductivos*, que podían ser, a su vez:

- *generativos* (sin hojas):

- generativos uniflorales*: brotes constituidos por una sola flor solitaria

- *generativos multiflorales*: brotes con más de una flor

- brotes mixtos* (con hojas):

- *mixtos uniflorales*: brotes con hojas y una flor en posición terminal o flor campanera

- *mixtos multiflorales*: brotes con hojas y más de una flor

Los resultados se expresaron como brotes y flores por cien nudos, para compensar las diferencias en el tamaño de los árboles o de las ramas seleccionadas.

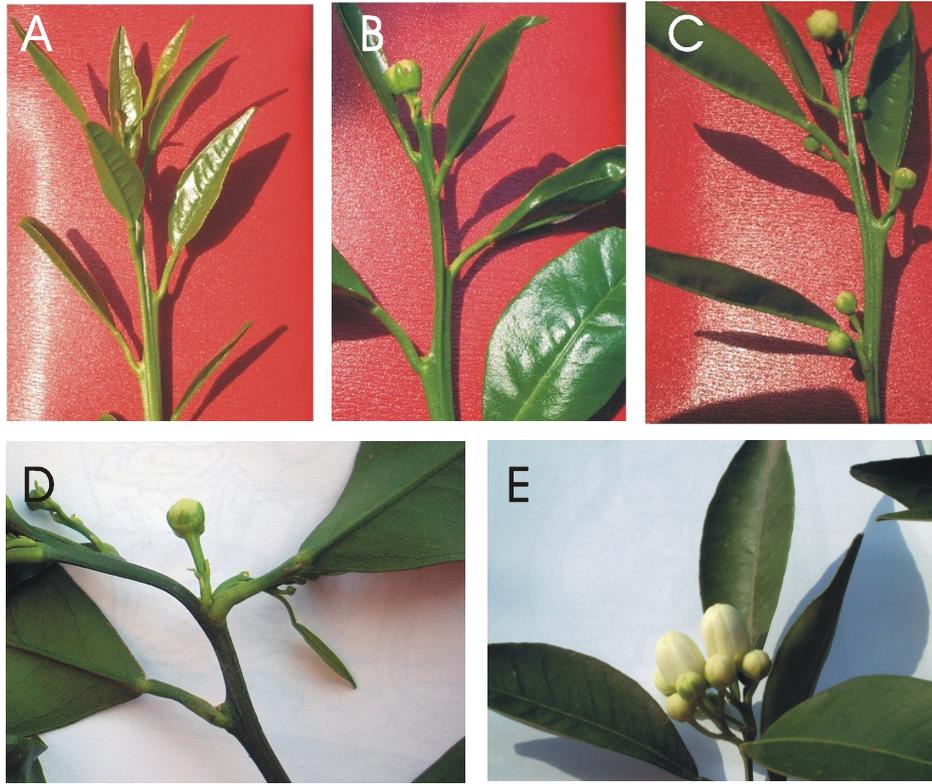


Fig. 2. Tipos de brotes desarrollados en la brotación de primavera en árboles de naranjo 'Salustiana'. A: brote vegetativo; B: Brote mixto unifloral; C: Brote mixto multifloral; D: Brote generativo unifloral; E: Brote generativo multifloral.



Fig. 3. Tipos de brotes desarrollados en la brotación de primavera en árboles de mandarino satsuma 'Owari'.

MH: Brote mixto multifloral; FS: Brote generativo unifloral; M: Brote generativo multifloral.

5. MEDIDA DE LA ABSCISIÓN DE ÓRGANOS REPRODUCTIVOS, CUAJADO Y FRUCTIFICACIÓN

5.1. Abscisión de órganos reproductivos

Al inicio de la floración y hasta el final de la caída de junio, se colocó por debajo de la copa de cada árbol de naranjo ‘Salustiana’ una red plástica de dimensiones 4x4 m (Fig. 4).

La recogida del material caído sobre cada red se realizó con una periodicidad semanal. Una vez el material estuvo en el laboratorio, se pesó la cantidad total recogida y se tomó una parte alícuota. En esta parte alícuota, se contaron el número de ovarios o frutitos y se separaron los mismos del resto de órganos florales (pétalos, sépalos, y pedúnculos), desecándolos en estufa a 70°C durante varios días hasta su peso constante. Se distinguieron las estructuras reproductivas caídas según la zona de abscisión se diera en el pedúnculo o bien en la base del ovario.

5.2. Recolección de los frutos

La recolección se realizó cuando los frutos habían adquirido el tamaño y las características comerciales adecuadas, cosechándose todo el fruto de una sola vez.

Para cada árbol se determinó individualmente el peso medio de los fruto y el número de frutos recolectados.

5.3. Cuajado

El número de flores totales formadas en un árbol se calculó sumando el número de ovarios caídos y el número de frutos recolectados. Con estos mismos datos se calculó el porcentaje de cuajado.

5.4. Cálculo del índice de alternancia

Se calculó el índice de alternancia I , indicado por Verreyne y Lovatt (2009), que evalúa cuantitativamente la vecería entre años consecutivos. Éste se calcula como:

$$I = \frac{\sum \frac{|a_{i+1} - a_i|}{a_{i+1} + a_i}}{n - 1}$$

donde n es el número de años para los que se calcula el índice de alternancia y a_i es el número de frutos en el año número i . Cuando I es 1, la alternancia, expresada como porcentaje, es del 100%, y cuando es 0, no hay alternancia.



Fig. 4. Recogida de órganos caídos tras la floración en árboles de naranjo dulce 'Salustiana'. Detalles del material vegetal recogido sobre lonas dispuestas bajo las copas de los árboles.

6. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN CARBOHIDRATOS METABOLIZABLES

6.1. Toma de muestras para la determinación de carbohidratos

Se seleccionaron brotes vegetativos obtenidos en la brotación de la primavera anterior dispuestos a una altura media de la copa, alrededor de todo el diámetro del árbol. Una vez en el laboratorio, se tomaron las hojas ubicadas en mitad de la longitud de los brotes, desechando el resto de las hojas.

6.2. Preparación de las muestras para su análisis

Las hojas seleccionadas y los tallos, sin hojas, se lavaron con detergente no iónico y se enjuagaron tres veces con agua destilada. En las muestras requeridas se procedió a separar la corteza de la madera del eje del brote.

Las muestras se desecaron durante 72 h en estufa a 70°C. Una vez comprobado el peso constante de la muestra desecada, se determinó su el peso seco. Posteriormente, las hojas se trituraron en molino de paletas con un tamiz incorporado de 0,2 mm (Fritsch Pulverisette). Las muestras pulverizadas se guardaron en recipientes herméticos hasta su análisis.

6.3. Extracción de carbohidratos

La preparación de los extractos de azúcares solubles y almidón se realizó siguiendo el método descrito por McCready *et al.* (1950).

En tubos de centrífuga se pesaron 50 mg de muestra pulverizada, se añadieron 15 ml de etanol al 80% en caliente (75°C aproximadamente). Los tubos se calentaron en baño de agua hasta 100°C, manteniéndose a esta temperatura durante 10 min, agitando ocasionalmente. Se centrifugaron durante 10 min a 7500 rpm a 20°C (Digicen 20R, Orto Alresa, España). El sobrenadante se decantó en un matraz Erlenmeyer. El precipitado se volvió a extraer dos veces más del mismo modo. Se combinaron los extractos y se eliminó

el alcohol en un evaporador rotatorio a 50°C. El extracto acuoso se diluyó con agua destilada aforando a 50 ml y se filtró con papel Whatman n° 2, eliminando los primeros 5 ml filtrados. Una parte alícuota de este extracto se utilizó para la determinación de azúcares solubles y azúcares reductores.

Para obtener el extracto del almidón contenido en la muestra se utilizó el precipitado de la última centrifugación. Se añadieron 15 ml de ácido perclórico al 35%, se agitó y se dejó en reposo durante 24 h. Se diluyó el extracto con agua destilada aforando a 50 ml y se filtró con papel Whatman n° 2. Una parte alícuota de este extracto se utilizó para la determinación de almidón.

6.4. Análisis de azúcares reductores

La determinación de azúcares reductores se realizó siguiendo el método de Park y Johnson (1949). Al no haberse realizado una separación previa, la determinación incluyó los monosacáridos libres y los oligosacáridos con grupos reductores libres.

En un tubo de ensayo con 1 ml de una dilución del extracto obtenido según el apartado anterior, se añadió 1 ml de solución carbonato (Na_2CO_3 , 5,3 g l⁻¹) y de cianuro potásico (KCN, 0,65 g l⁻¹) y 1 ml de solución de ferricianuro ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 0,5 g l⁻¹). Los tubos se mantuvieron en ebullición durante 15 min en baño de agua. Se dejaron enfriar en agua a temperatura ambiente y se añadió 5 ml de solución férrica ($\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 1,5 g l⁻¹), ácido sulfúrico 1N (H_2SO_4 , 50 ml l⁻¹) y dodecil sulfato sódico (SDS, 1 g l⁻¹).

Transcurridos 15 min se midió la absorbancia a 690 nm en espectrofotómetro (Jenway 6305).

Se utilizó para cada análisis una curva patrón de glucosa, con concentraciones entre 0 y 8 µg por tubo.

Los resultados se expresaron como porcentaje de azúcares reductores sobre materia seca.

6.5. Análisis de azúcares solubles y almidón

Las determinaciones de azúcares totales solubles y de almidón se realizaron siguiendo el método de la antrona-sulfúrico de McCready *et al.* (1950).

En un tubo de ensayo con tapón de rosca (Pyrex) se diluyó una alícuota del extracto con agua destilada hasta un volumen de 2,5 ml. Los tubos se colocaron en un baño de agua helada durante 10 min, y posteriormente, con una bureta, se añadieron lentamente, deslizando por la pared del tubo, 5 ml del reactivo antrona-sulfúrico (0,4 g de antrona en 200 ml de H₂SO₄ al 96% frío). Los tubos se cerraron con su tapa y se agitaron enérgicamente, se abrió el tapón de rosca ¼ de vuelta para permitir la salida de los gases y se volvió a cerrar. Los tubos así cerrados se calentaron en baño de agua, llevando a ebullición durante 7,5 min exactamente. Se enfriaron en agua a temperatura ambiente y pasados 15 min para que se estabilizara el color, se midió la absorbancia a 630 nm en espectrofotómetro (Jenway 6305).

Simultáneamente se preparó una curva patrón con concentraciones de glucosa entre 0 y 80 µg por tubo para interpolar los valores de las muestras en la recta obtenida.

Los resultados se expresaron como porcentaje sobre peso seco. En los análisis de almidón el valor obtenido se multiplicó por 0,9 para compensar la pérdida de agua en la formación de los enlaces.

7. DETERMINACIÓN DE GIBERELINAS

7.1. Toma de muestras para la determinación de giberelinas

Se realizaron determinaciones del contenido en giberelinas en yemas de la última brotación de primavera de árboles de naranjo dulce ‘Salustiana’, de brotes con un fruto (seleccionados de árboles *on*, con baja o nula carga de fruto) y de brotes vegetativos, sin fruto (seleccionados de árboles *off*, con elevada carga de fruto). Los brotes, de la última brotación de primavera, dispuestos a una altura media de la copa se situaron alrededor de

todo el diámetro del árbol. Una vez en el laboratorio, se tomaron las 5 yemas del brote más cercanas al ápice. Las muestras se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se mantuvieron congeladas a -80°C hasta su análisis.

7.2. Determinación de giberelinas

La determinación de giberelinas en yemas se realizó en el servicio de cuantificación de hormonas del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP, UPV-CSIC).

Se utilizaron alícuotas de 100 a 200 mg de peso fresco del material vegetal congelado, que se extrajeron con una solución de 80% de metanol y 1% de ácido acético. Para su purificación, los extractos se pasaron consecutivamente a través de columnas HLB (fase reversa), MCX (intercambio catiónico) y WAX (intercambio iónico) (Oasis 30 mg, Waters), tal como se describe en Seo *et al.* (2011). El residuo final se disolvió en una solución con un 5% de acetonitrilo y un 1% de ácido acético.

Las giberelinas se separaron por cromatografía de fase reversa (UPHL 2.6 μm Accucore RP-MS, 50 mm x 2.1 mm; ThermoFisher Scientific) con un gradiente de 5 a 50% de acetonitrilo y 0,05% de ácido acético, a $400\ \mu\text{l}\ \text{min}^{-1}$, durante 14 min.

La determinación se realizó por espectrometría de masas (espectrómetro Q-Exactive con detector Orbitrap, ThermoFisher Scientific) con ionización de tipo electrospray (ES) en modo negativo y analizador de tipo SIM. Se empleó una tensión de pulverización de 3,0 kV, con temperatura del vaporizador de 150°C , caudal de gas envolvente de $40\ \mu\text{l}\ \text{min}^{-1}$ y caudal de gas auxiliar de $10\ \mu\text{l}\ \text{min}^{-1}$ (temperatura del capilar de 300°C).

Para la cuantificación de giberelinas, se añadieron a los extractos los siguientes estándares internos marcados con $17,17\text{-}[^2\text{H}]$: GA₁, GA₈, GA₁₉, GA₂₀, GA₂₉, GA₄₄, GA₅₃ (para la ruta de la 13 hidroxilación temprana) y GA₄, GA₉, GA₁₂, GA₁₅, GA₂₄ y GA₅₁ (para la ruta de la no hidroxilación temprana), facilitados por el Prof. L. Mander (Canberra, Australia) y por OlChemim Ltd. (Olomouc, República Checa).

Las concentraciones de hormonas en los extractos fueron determinadas usando curvas de calibración integradas mediante los programas Xcalibur 2.2 y TraceFinder (ThermoFisher Scientific).

8. TRATAMIENTOS HISTOLÓGICOS

Con el objetivo de estudiar la regeneración de tejidos después del rayado, se realizaron observaciones microscópicas tras rayar ramas de 10 a 11 mm de diámetro, sin fruto, situadas a la altura media de la copa de árboles de naranjo ‘Salustiana’ y de mandarina satsuma ‘Owari’. Con un sacabocados metálico se extrajo una porción de tronco de alrededor de 3 mm de profundidad que incluyera la zona rayada. Las muestras se tomaron periódicamente desde el mismo día de efectuado el rayado hasta 6 semanas después.

8.1. Fijación

Las muestras tomadas se fijaron en una mezcla de formalina, ácido propiónico y etanol (FPA) en una proporción de 1:1:18 (Johansen, 1940).

Las muestras se fijaron durante al menos 2 semanas, cambiando la solución un mínimo de 2 veces.

8.2. Infiltración e inclusión en parafina

El tejido fijado se deshidrató sumergiéndolo durante 24 h en soluciones crecientes de alcohol butílico siguiendo el método de Johansen (1940), finalizando con tres lavados de alcohol butílico absoluto de 24 h cada uno.

El material deshidratado se infiltró progresivamente en parafina de 58-80°C de fusión (Paraffin wax, Fluka Chemika) en una estufa 5°C por encima del punto de fusión. Para ello, el material vegetal, junto con una pequeña porción de butílico, se depositó sobre algunas lentejas de parafina sólida y fría que ocupaban el cuarto inferior de un vial de vidrio. El material vegetal se mantuvo en esta mezcla durante 24 h, tras las cuales, la parafina y el butanol se sustituyeron por parafina pura, operación que se realizó una vez más al día siguiente. Tras la infiltración las muestras se incluyeron individualmente en parafina.

8.3. Realización de los cortes

Cada bloque de parafina con el material vegetal incluido se talló y se montó sobre una base de madera. Tras mantener los bloques en congelador (-15°C) durante alrededor de 2 h, se realizaron cortes de unos 20 µm de grosor con un microtomo de deslizamiento (R. Jung, Alemania), utilizando una cuchilla de acero de tipo I. Los cortes obtenidos se montaron sobre portaobjetos previamente untados con adhesivo de Haupt, mojándolos primero en agua con un 2% de formol.

El adhesivo de Haupt se preparó calentando a 30°C una solución de 100 ml de agua destilada con 1 g de gelatina, 2 g de cristales de fenol y 15 ml de glicerina (Johansen, 1940).

Los portaobjetos con los cortes montados se mantuvieron sobre una placa calefactora a 35-40°C hasta que se secó el pegamento (24 h aproximadamente).

8.4. Desparafinado y tinción

Los cortes, una vez adheridos a los portaobjetos, se sometieron a la doble tinción safranina verde luz (Johansen, 1940). Se trata de una tinción soluble en agua, con lo que se procedió a una desparafinización seguida de una hidratación, que consistieron en los siguientes pasos:

- Desparafinado en xileno: 2 inmersiones sucesivas por un período mínimo de 1 h cada uno
- Xileno: etanol absoluto (1:1); inmersión durante 15 min.
- Etanol absoluto; inmersión durante 3 min.
- Etanol 96%; inmersión durante 3 min.
- Etanol 85%; inmersión durante 3 min.
- Etanol 70%; inmersión durante 3 min.
- Etanol 50%; inmersión durante 3 min.
- Etanol 30%; inmersión durante 3 min.

- Agua destilada; inmersión durante 10 min.

La tinción safranina verde luz tiñe de color rojo las paredes con deposiciones de lignina y suberina y de color verde las paredes celulósicas. Consta de los siguientes pasos:

- Safranina al 1% en solución acuosa; inmersión durante 15 min.
- Agua destilada; inmersión durante 3 min.
- Verde luz al 1% en solución acuosa; inmersión durante 3 min.

Posteriormente se deshidrataron los cortes en soluciones crecientes de xilol hasta llegar a xilol absoluto para realizar el montaje definitivo en el medio de montaje (Entellan, Merck).

8.5. Observaciones microscópicas

Los cortes se realizaron con un microscopio Nikon Optiphot-2 con cámara digital adaptada para la toma de microfotografías.

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La significación estadística de las diferencias se apoyó en el análisis de varianza considerando los efectos principales y sus interacciones. En los datos expresados como porcentajes, se realizó la transformación $y = \arcsen \sqrt{x}$, siendo x el porcentaje, con objeto de uniformizar las varianzas. La χ^2 se aplicó cuando se trató de encontrar diferencias entre frecuencias poblacionales. La relación entre parámetros de interés se estudió mediante métodos de regresión lineal.

Para los análisis estadísticos se empleó el software SSPS de IBM (versión 22.0). La separación de medias se realizó con el test de Duncan con un nivel de significación del 5%.

RESULTADOS

1. CARACTERIZACIÓN DEL COMPORTAMIENTO ALTERNANTE DEL NARANJO ‘SALUSTIANA’

1.1. Comportamiento productivo del naranjo dulce ‘Salustiana’

Con el objetivo de caracterizar el comportamiento productivo de la variedad de naranjo dulce ‘Salustiana’, se estudiaron diferentes parámetros en árboles de una misma parcela en condiciones normales de cultivo a lo largo de 6 años consecutivos.

En la Figura 5 se muestra el rendimiento productivo del total de la parcela durante estos 6 años de experimentación. A partir del primer año, en el que se recolectaron 20 t ha⁻¹ (50 kg por árbol), se observó una tendencia creciente en la producción, alcanzándose un máximo de 40 t ha⁻¹ (100 kg por árbol) el cuarto año. El quinto y sexto año la producción volvió a disminuir hasta 27 t ha⁻¹ (68 kg por árbol).

La variación en la cosecha por árbol dependió del número de frutos ($r=0,95^*$)¹, y no del peso de los mismos, que disminuyó con el incremento de la producción ($r=-0,87^*$; Fig. 6).

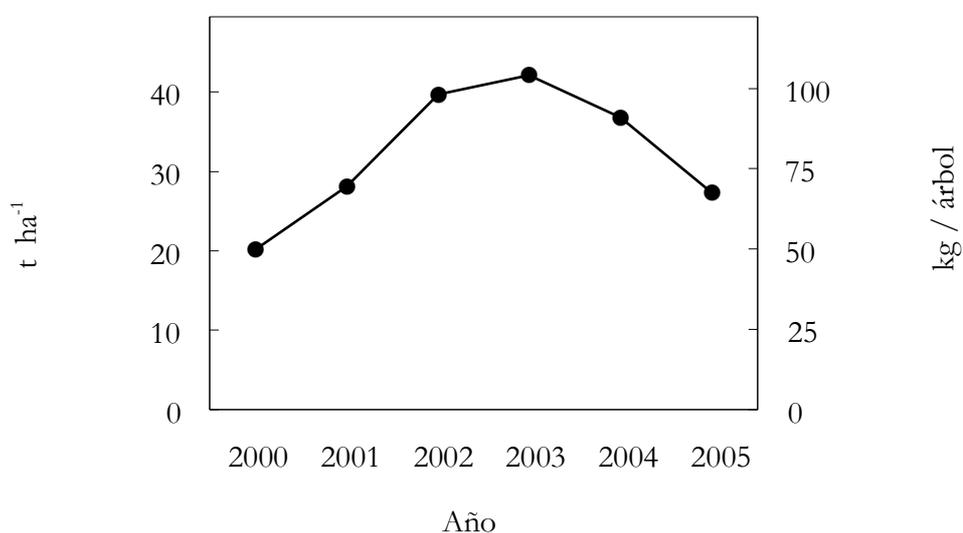


Fig. 5. Rendimiento de la cosecha expresado en toneladas por hectárea y kilos por árbol en la parcela de experimentación de naranjo dulce ‘Salustiana’ desde el año 2000 hasta el 2005.

¹ Aquí y en adelante, ** indica significación estadística para $P \leq 0,01$; *, para $P \leq 0,05$.

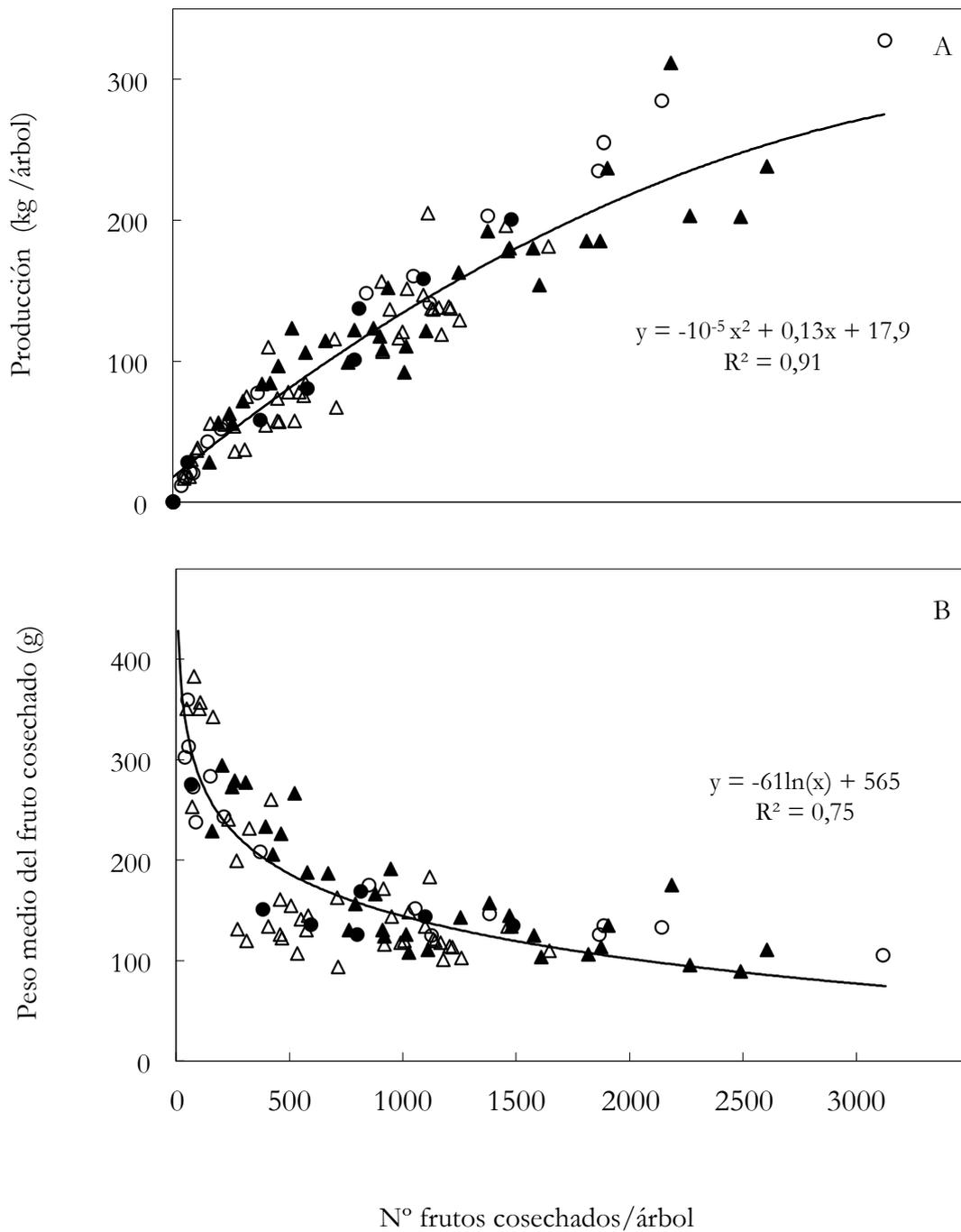


Fig. 6. Relación del número de frutos cosechados por árbol con el peso de la cosecha por árbol (A) y peso medio de fruto (B) en naranja 'Salustiana'. Cada punto representa el valor de un árbol. Símbolos diferentes representan datos de 4 años de producción diferentes (1999, 2000, 2001 y 2004). Se muestran líneas de regresión en el caso de ser significativas y sus coeficientes de determinación (R^2).

A nivel de árboles individuales, se observó un comportamiento fuertemente alternante o vecero de la cosecha entre períodos de producción consecutivos. Aquellos árboles que en un año determinado tuvieron una mayor producción con un mayor número de frutos y un menor peso medio (árboles *on*), al año siguiente tuvieron una producción mucho más reducida, con un menor número de frutos y un mayor peso medio de los mismos (árboles *off*; Figs. 7, 8 y 9).

La producción en cosecha para los árboles seleccionados como *on* osciló entre 100 y 220 kg por árbol, mientras que en los árboles *off* estuvo entre 0 y 70 kg por árbol. El número de frutos por árbol en los *on* varió de 900 a 2800, mientras que en los *off* este intervalo fue de 0 a 350 frutos. En cuanto al tamaño medio del fruto, los árboles *off* triplicaron el peso del fruto con respecto a los árboles *on*. El índice de alternancia I, que evalúa cuantitativamente la vecería entre años consecutivos (Verreyne y Lovatt, 2009), fue del $92 \pm 2\%$ en árboles individuales.

No obstante, y tal y como ya se ha hecho referencia, la cosecha del total de la parcela de los árboles en estos 6 años no varió siguiendo un patrón productivo alternante o vecero, debido a que los árboles manifestaron en un mismo año marcadas diferencias productivas entre ellos y a que la proporción entre árboles con alta y baja carga de fruto fue similar. El índice de alternancia I calculado con los valores del total de la parcela fue del $12 \pm 3\%$.

RESULTADOS

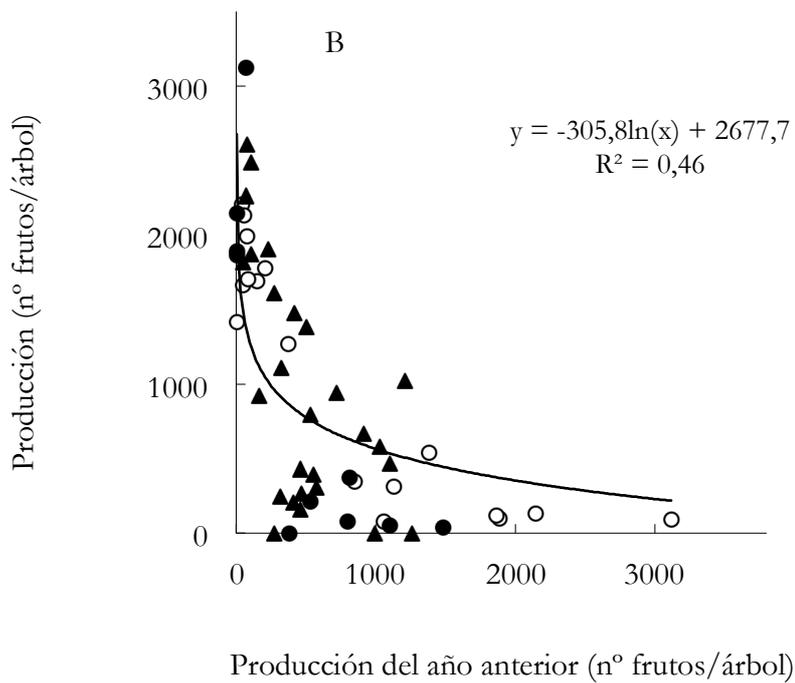
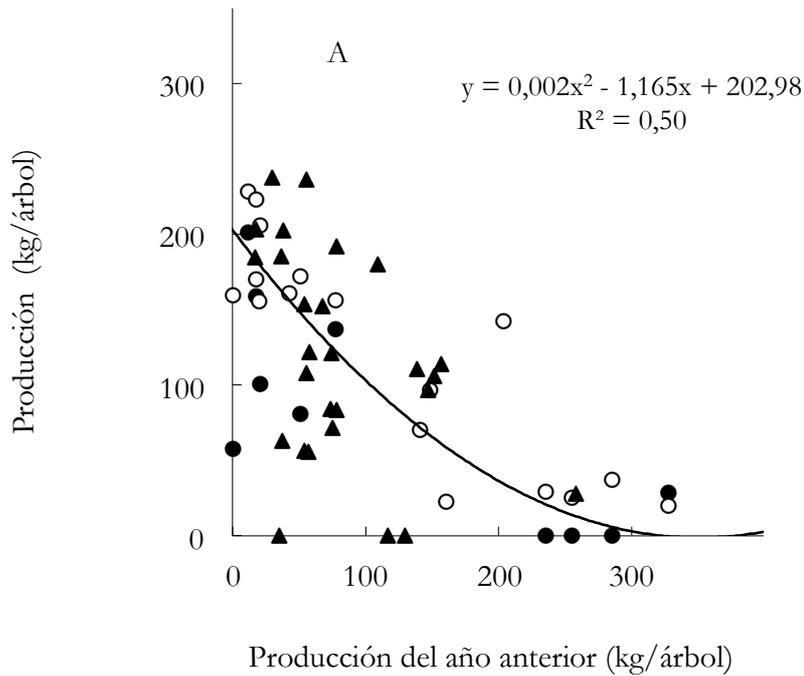


Fig. 7. Peso de la cosecha (A) y número de frutos cosechados (B) por árbol en relación con el mismo parámetro del año anterior en árboles de naranjo 'Salustiana'. Símbolos diferentes representan resultados de 3 pares de cosechas consecutivas (1999-2000, 2000-2001, 2004-2005). Se muestran líneas de regresión en el caso de ser significativas y sus coeficientes de determinación (R^2).

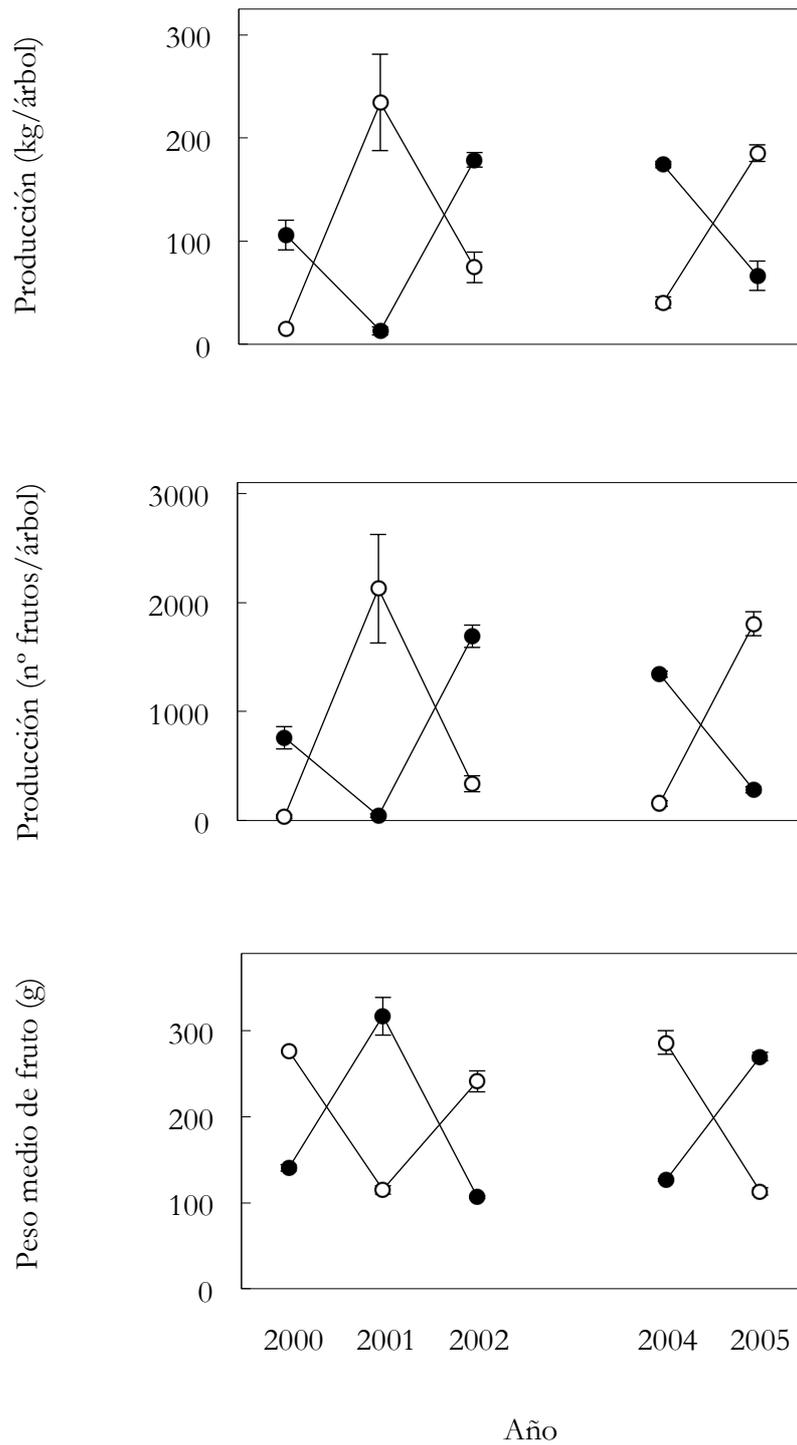


Fig. 8. Peso de la cosecha por árbol, número de frutos por árbol y peso fresco medio de fruto en cosechas consecutivas de árboles de naranjo 'Salustiana' seleccionados por su baja producción (off, ○) y por su alta producción (on, ●) en los años 2000 y 2004. Cada valor es la media de 3 a 6 árboles. Las barras indican el error estándar de cada media.

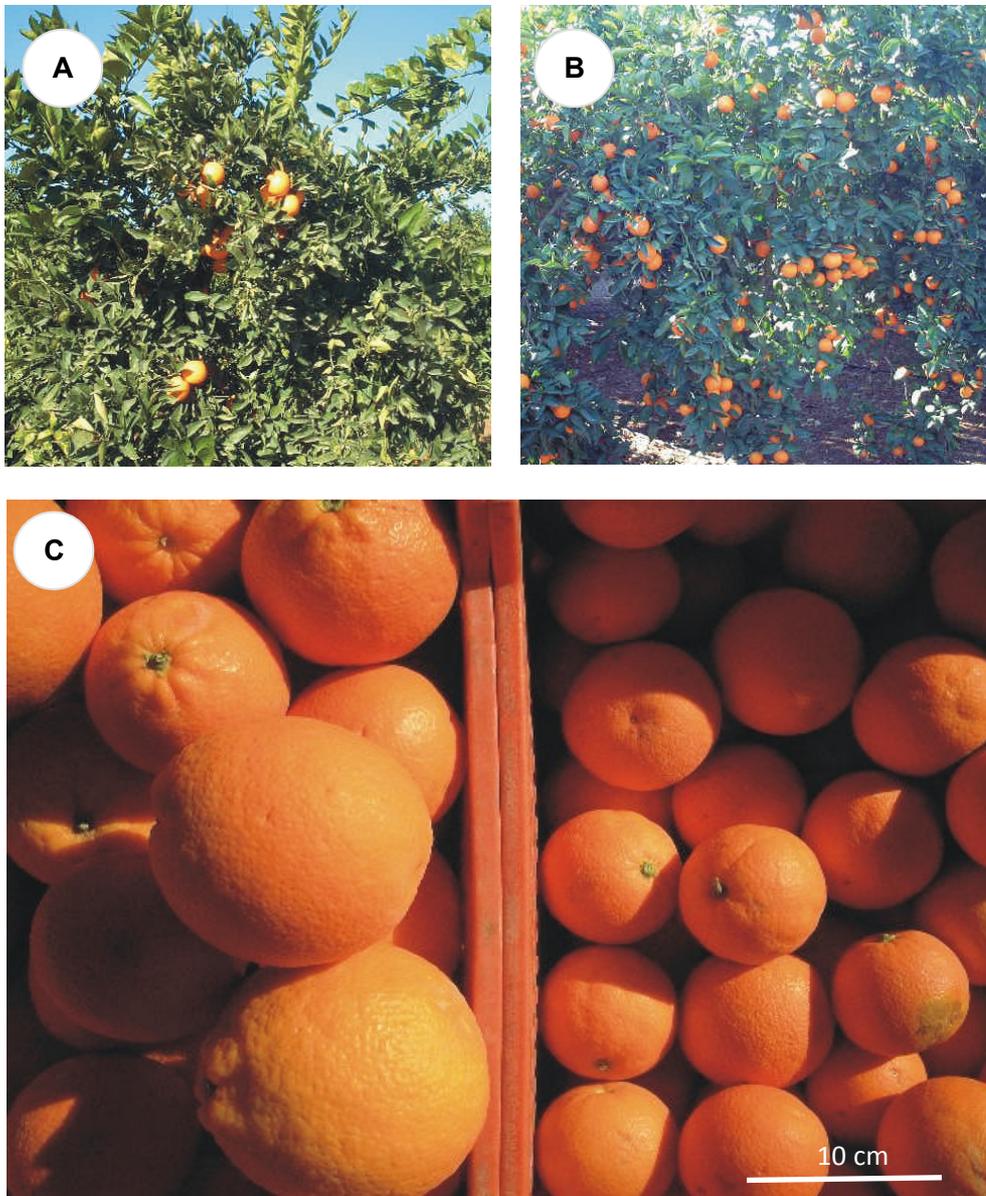


Fig. 9. Aspecto de árboles de naranjo 'Salustiana' antes de la recolección de un árbol off (A) y un árbol on (B) y frutos ya recolectados (C) de un árbol off (izquierda), y de un árbol on (derecha), mostrando las diferencias en el tamaño entre ambos.

1.2. Efecto del fruto sobre la brotación y la floración

Para estudiar el efecto de la producción de fruto sobre la brotación y la floración se seleccionaron árboles de la variedad de naranjo dulce ‘Salustiana’ que presentaban una alta carga de fruto (árboles *on*) y árboles con una carga de fruto baja o nula (árboles *off*) situados en la misma parcela. En éstos árboles, se determinaron las características de la brotación y la floración en la primavera siguiente, así como la abscisión de órganos reproductivos y la cosecha resultante.

Tal y como es característico en esta variedad de naranjo dulce, se observó un único período importante de brotación de las yemas a lo largo del año, que tuvo comienzo a principios de enero en los árboles con baja producción en la campaña anterior (árboles *off*) y de 2 a 3 semanas después en los árboles *on*.

Las características de la brotación y la floración se determinaron durante la primera quincena de marzo de los años 2000, 2001 y 2004, diferenciando entre las yemas situadas en la madera de la última brotación (1 año de edad) y las situadas en la madera de la penúltima brotación (2 años de edad). Para cada año se observaron 500 nudos por árbol, en 3 a 6 árboles, para cada nivel de carga de fruto.

- *Efecto del fruto sobre la brotación*

La brotación tuvo lugar principalmente en los nudos situados sobre la madera de 1 y 2 años de edad, si bien el número de nudos disponibles para brotar en este tipo de brotes difirió según la carga del fruto. En los árboles seleccionado por su elevada cosecha (*on*), el número de nudos fue aproximadamente la mitad que en árboles *off* (23000 *vs* 48900). Estos nudos brotaron en un porcentaje que estuvo determinado tanto por la carga del árbol en el año precedente como por la edad de las yemas.

En los árboles con alta carga de fruto en la cosecha anterior (árboles *on*) brotaron, en promedio de los 3 años de observación, un 22% de los nudos, frente al 56% de los nudos que brotaron en los árboles con poca carga de fruto (árboles *off*; Tabla 1; $P \leq 0,001$). El porcentaje de nudos que brotaron fue el doble en los nudos situados en la madera de 1

RESULTADOS

año que los situados en la madera de 2 años, independientemente del carácter *on/off* del árbol ($P \leq 0,001$).

Tabla 1. Porcentaje de nudos brotados en árboles de naranjo 'Salustiana' en la brotación de primavera de 3 años diferentes. Los datos son las medias de 3 a 6 árboles. En cada árbol se observó la brotación de unos 500 nudos. Letras diferentes en la misma columna y tipo de árbol indican diferencias estadísticas al 95% entre años de brotación para un mismo tipo de madera según el test de Duncan. NS: no hay diferencias significativas. Los análisis se realizaron utilizando la transformación $\arcsen\sqrt{x}$, siendo x el porcentaje de nudos brotados.

| Carga de fruto en la cosecha anterior | Año de brotación | Edad de la madera | | TOTAL (Media ponderada) |
|---|------------------|--------------------|--------------------|----------------------------|
| | | 1 año | 2 años | |
| Árboles <i>on</i> | | | | |
| | 2000 | 27,4 _{NS} | 11,2 _{NS} | 22,9 _{NS} |
| | 2001 | 30,6 | 15,2 | 26,7 |
| | 2004 | 24,7 | 6,0 | 18,1 |
| | Media | 26,4 | 10,8 | 22,4 |
| Árboles <i>off</i> | | | | |
| | 2000 | 64,4 _{NS} | 21,4 _{NS} | 50,6 _{NS} |
| | 2001 | 73,4 | 30,9 | 62,4 |
| | 2004 | 65,8 | 20,7 | 55,8 |
| | Media | 67,9 | 24,3 | 55,6 |

El número de brotes formados en 100 nudos (Tabla 2) presentó el mismo comportamiento que el porcentaje de nudos brotados, ya que se obtuvieron de 1 a 1,1 brotes por nudo brotado en cualquiera de los casos estudiados.

En consecuencia, se formaron en el total del árbol 5 veces menos brotes en los árboles *on* que en los *off* (5,4 vs 28,5 miles de brotes por árbol; Tabla 3; $P \leq 0,001$). Adicionalmente, el carácter vegetativo o reproductivo de estos brotes varió en dependencia de la carga de fruto.

En los árboles *on*, la práctica totalidad de las yemas brotadas presentaron brotes vegetativos, mientras que en árboles *off* la mayoría de los brotes obtenidos fueron del tipo reproductivo. Si bien el porcentaje de nudos brotados fue sensiblemente menor, los nudos de los árboles *on* desarrollaron 6 veces más brotes vegetativos que los árboles *off* (22 vs 4 brotes vegetativos en 100 nudos; Tabla 4; $P \leq 0,001$). Sin embargo, y debido a las diferencias en el número de nudos disponibles para brotar, la cantidad de brotes vegetativos por árbol fue sólo algo más del doble en árboles *on* que en *off* (5,0 vs 2,1 miles de brotes vegetativos por árbol).

En árboles *on* se estableció una fuerte correlación lineal entre el porcentaje de nudos brotados y el número de brotes vegetativos obtenidos por 100 nudos ($r=0,98^{**}$). Sin embargo, en árboles *off* no se observó una relación entre ambos parámetros (Fig. 10A).

Los brotes vegetativos tuvieron 6,5 hojas de media cada uno, sin apreciarse diferencias en este aspecto debidas a la presencia de fruto o a la edad de las yemas.

No hubo diferencias significativas en los parámetros descritos entre los 3 años de observación.

RESULTADOS

Tabla 2. Número de brotes en 100 nudos en árboles de naranjo 'Salustiana' en la brotación de primavera. Los datos son las medias de 3 a 6 árboles. En cada árbol se observó la brotación de unos 500 nudos. Letras diferentes en la misma columna y tipo de árbol indican diferencias estadísticas al 95% entre años de brotación para un mismo tipo de madera según el test de Duncan. NS: no hay diferencias significativas.

| Carga de fruto en la cosecha anterior | Año de brotación | Edad de la madera | | TOTAL (Media ponderada) |
|---|------------------|-------------------|---------|----------------------------|
| | | 1 año | 2 años | |
| Árboles on | | | | |
| | 2000 | 28,0 NS | 11,3 NS | 23,4 NS |
| | 2001 | 30,9 | 15,7 | 27,1 |
| | 2004 | 26,4 | 6,4 | 19,3 |
| | Media | 28,4 | 11,1 | 23,3 |
| Árboles off | | | | |
| | 2000 | 69,5 NS | 22,3 NS | 54,3 NS |
| | 2001 | 78,7 | 32,4 | 66,9 |
| | 2004 | 66,1 | 20,9 | 54,0 |
| | Media | 71,4 | 25,2 | 58,4 |

Tabla 3. Número de brotes por árbol según su tipo, y número de hojas nuevas, formados en naranjo 'Salustiana' en la brotación de primavera. Los datos son las medias de 3 años, con medidas de 3 a 6 árboles por año. Nudos totales del árbol sobre madera de 1 y 2 años de edad estimados a través de los datos de abscisión de flores y frutitos. Letras diferentes en la misma fila indican diferencias estadísticas con un nivel de significación del 95% para efecto de la carga del árbol.

| Tipo de brote | Carga de fruto en la cosecha anterior | |
|---------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|
| | Árboles <i>off</i> (Miles /árbol) | Árboles <i>on</i> (Miles /árbol) |
| Vegetativos | 2,1 b | 5,0 a |
| Generativos uniflorales | 6,3 a | 0,1 b |
| Generativos multiflorales | 12,0 a | 0,07 b |
| Mixtos uniflorales | 1,1 a | 0,07 b |
| Mixtos multiflorales | 7,1 a | 0,1 b |
| TOTAL BROTES | 28,5 a | 5,4 b |
| TOTAL HOJAS NUEVAS | 20,3 b | 26,7 a |

RESULTADOS

Tabla 4. Número de brotes vegetativos en 100 nudos en árboles de naranjo 'Salustiana' en la brotación de primavera de 3 años diferentes. Los datos son las medias de 3 a 6 árboles. En cada árbol se observó la brotación de unos 500 nudos. Letras diferentes en la misma columna y tipo de árbol indican diferencias estadísticas al 95% entre años de brotación para un mismo tipo de madera según el test de Duncan. NS: no hay diferencias significativas.

| Carga de fruto en la cosecha anterior | Año de brotación | Edad de la madera | | TOTAL (Media ponderada) |
|---|------------------|-------------------|---------|----------------------------|
| | | 1 año | 2 años | |
| Árboles on | | | | |
| | 2000 | 27,1 NS | 10,9 NS | 22,6 NS |
| | 2001 | 26,4 | 15,2 | 23,5 |
| | 2004 | 25,7 | 6,4 | 18,8 |
| | Media | 26,4 | 10,8 | 21,6 |
| Árboles off | | | | |
| | 2000 | 3,4 NS | 3,9 NS | 3,6 NS |
| | 2001 | 7,3 | 3,5 | 6,4 |
| | 2004 | 3,2 | 1,8 | 2,7 |
| | Media | 4,6 | 3,1 | 4,2 |

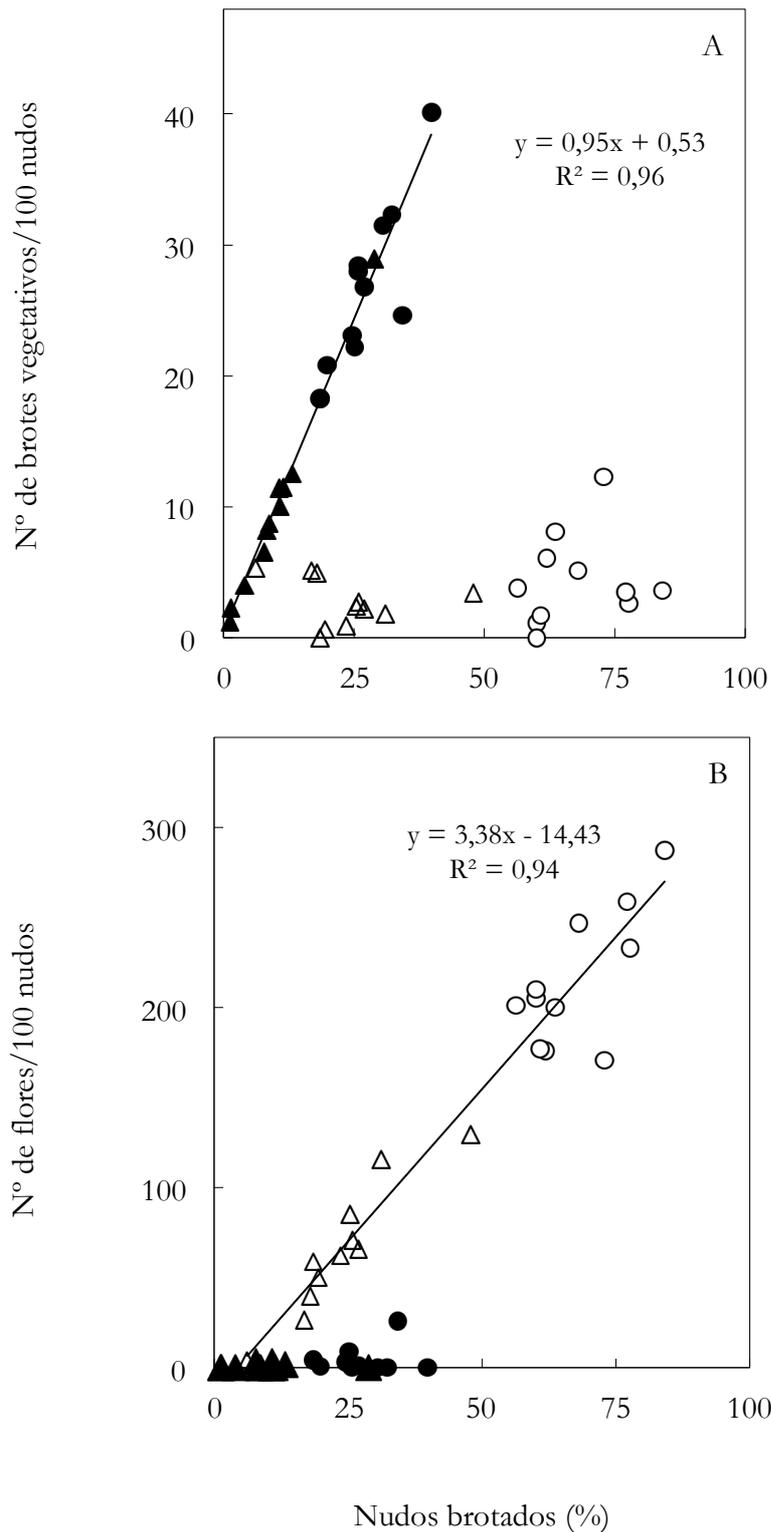


Fig. 10. Relación entre (A) número de brotes vegetativos y (B) número de flores en 100 nudos con el porcentaje de nudos brotados en yemas de 1 año de edad (○, ●) y de 2 años de edad (△, ▲). Datos individuales de árboles de naranjo 'Salustiana' seleccionados por su alta producción (on, símbolos llenos) y por su baja producción (off, símbolos vacíos) en el año anterior. Se muestran las líneas de regresión en el caso de ser significativas y sus coeficientes de determinación (R^2).

- *Efecto del fruto sobre la floración*

La intensidad de floración estuvo afectada tanto por la presencia de fruto como por la edad de la madera. Los árboles seleccionados como *off* presentaron siempre un mayor porcentaje de nudos con brotes florales que los árboles *on* en la primavera siguiente (51 *vs* 2%; $P \leq 0,001$; Tabla 5), un mayor número de brotes reproductivos (54 *vs* 2 brotes en 100 nudos; $P \leq 0,001$; Tabla 6;) y un mayor número de flores (171 *vs* 4 flores en 100 nudos; $P \leq 0,001$; Tabla 7). El mayor número de nudos disponibles en los árboles *off* acentuó todavía más el efecto de la carga del fruto sobre el número total de brotes reproductivos desarrollados (26 *vs* 0,4 miles de brotes reproductivos por árbol; $P \leq 0,001$; Tabla 3).

El efecto de la edad de la madera sobre la floración dependió de la carga del fruto, y sólo influyó en las características de la floración de los árboles *off*. En estos árboles la floración fue más elevada en la madera de 1 año que en la de 2 años, tanto en porcentaje de nudos con brotes reproductivos (62 *vs* 22%; $P \leq 0,001$), como en número de brotes florales (67 *vs* 22 brotes en 100 nudos $P \leq 0,001$) y número de flores (214 *vs* 63 flores en 100 nudos; $P \leq 0,001$).

Asimismo, en árboles *off* se apreció una relación cuantitativa y lineal entre el porcentaje de brotación y la intensidad de floración obtenida (número de flores en 100 nudos), tanto en madera de 1 año como de 2 años ($r=0,97^*$). Sin embargo, en árboles *on* el aumento en el porcentaje de brotación no se correspondió con un aumento en el número de flores (Fig. 10B).

Tabla 5. Porcentaje de nudos con brotes reproductivos en árboles de naranjo 'Salustiana' en la brotación de primavera de 3 años diferentes. Los datos son las medias de 3 a 6 árboles. En cada árbol se observó la brotación de unos 500 nudos. Letras diferentes en la misma columna y tipo de árbol indican diferencias estadísticas al 95% entre años de brotación para un mismo tipo de madera según el test de Duncan. NS: no hay diferencias significativas. Los análisis se realizaron utilizando la transformación $\arcsen\sqrt{x}$, siendo x el porcentaje de nudos brotados.

| Carga de fruto en la cosecha anterior | Año de brotación | Edad de la madera | | TOTAL (Media ponderada) |
|---|------------------|-------------------|---------|----------------------------|
| | | 1 año | 2 años | |
| Árboles on | | | | |
| | 2000 | 0,8 NS | 0,4 NS | 0,7 NS |
| | 2001 | 4,4 | 0,5 | 3,5 |
| | 2004 | 0,7 | 0,0 | 0,5 |
| | Media | 2,0 | 0,3 | 1,6 |
| Árboles off | | | | |
| | 2000 | 61,0 NS | 18,9 NS | 47,4 NS |
| | 2001 | 65,9 | 27,6 | 56,2 |
| | 2004 | 60,2 | 18,9 | 49,2 |
| | Media | 62,4 | 21,8 | 50,9 |

RESULTADOS

Tabla 6. Números de brotes reproductivos en 100 nudos en árboles de naranjo 'Salustiana' en la brotación de primavera de 3 años diferentes. Los datos son las medias de 3 a 6 árboles. En cada árbol se observó la brotación de unos 500 nudos. Letras diferentes en la misma columna y tipo de árbol indican diferencias estadísticas al 95% entre años de brotación para un mismo tipo de madera según el test de Duncan. NS: no hay diferencias significativas.

| Carga de fruto en la cosecha anterior | Año de brotación | Edad de la madera | | TOTAL (Media ponderada) |
|---|------------------|-------------------|---------|----------------------------|
| | | 1 año | 2 años | |
| Árboles on | | | | |
| | 2000 | 0,9 NS | 0,4 NS | 0,7 NS |
| | 2001 | 4,6 | 0,5 | 3,6 |
| | 2004 | 0,7 | 0,0 | 0,5 |
| | Media | 2,1 | 0,3 | 1,6 |
| Árboles off | | | | |
| | 2000 | 66,1 NS | 18,4 NS | 50,7 NS |
| | 2001 | 71,4 | 28,9 | 60,4 |
| | 2004 | 63,0 | 19,0 | 51,3 |
| | Media | 66,8 | 22,1 | 54,1 |

Tabla 7. Número de flores en 100 nudos en árboles de naranjo 'Salustiana' en la brotación de primavera de 3 años diferentes. Los datos son las medias de 3 a 6 árboles. En cada árbol se observó la brotación de unos 500 nudos. Letras diferentes en la misma columna y tipo de árbol indican diferencias estadísticas al 95% entre años de brotación para un mismo tipo de madera según el test de Duncan. NS: no hay diferencias significativas. Los análisis se realizaron utilizando la transformación $\arcsen\sqrt{x}$, siendo x el porcentaje de nudos brotados.

| Carga de fruto en la cosecha anterior | Año de brotación | Edad de la madera | | TOTAL (Media ponderada) |
|---|------------------|-------------------|---------|----------------------------|
| | | 1 año | 2 años | |
| Árboles on | | | | |
| | 2000 | 1,5 NS | 0,5 NS | 1,2 NS |
| | 2001 | 11,6 | 2,2 | 9,5 |
| | 2004 | 1,7 | 0,0 | 1,2 |
| | Media | 4,9 | 0,9 | 4,0 |
| Árboles off | | | | |
| | 2000 | 211,8 NS | 48,6 NS | 159,7 NS |
| | 2001 | 211,2 | 78,3 | 177,1 |
| | 2004 | 218,0 | 62,4 | 176,8 |
| | Media | 213,7 | 63,1 | 171,1 |

RESULTADOS

Los brotes florales formados en la variedad ‘Salustiana’ fueron de 4 tipos (Fig 2; Tabla 3): brotes mixtos multiflorales y uniflorales (ambos con hojas) y brotes generativos multiflorales y uniflorales (ambos sin hojas).

En árboles *on*, con un escaso nivel de floración, no se observaron diferencias significativas entre los tipos de brotes florales, con independencia del año de experimentación. En todos los casos el número de brotes formados fue muy bajo.

En árboles *off* hubo diferencias en la proporción en que se formó cada tipo de brote, con independencia del año de experimentación y de la edad de las yemas (Tablas 8 y 9; Fig. 11). En estos árboles la mayor parte de la floración se obtuvo en brotes generativos, de los cuales se observaron 45 frente a 22 brotes mixtos en las yemas de 1 año de edad y 17 generativos frente a 5 mixtos en las yemas de 2 años (número de brotes en 100 nudos). De entre los brotes generativos, los multiflorales fueron más abundantes que los uniflorales. Éstos se dieron en la misma proporción que los mixtos multiflorales. Los menos abundantes fueron los mixtos uniflorales.

Tabla 8. Número de brotes mixtos (con flores y con hojas) en 100 nudos en árboles de naranjo 'Salustiana' en la brotación de primavera de 3 años diferentes. Los datos son las medias de 3 a 6 árboles. En cada árbol se observó la brotación de unos 500 nudos. Letras diferentes en la misma columna y tipo de árbol indican diferencias estadísticas al 95% entre años de brotación para un mismo tipo de madera según el test de Duncan. NS: no hay diferencias significativas.

| Carga de fruto en la cosecha anterior | | Edad de la madera | | TOTAL (Media ponderada) |
|---|-------|-------------------|--------|----------------------------|
| | | Año de brotación | 1 año | |
| Árboles on | | | | |
| | 2000 | 0,5 NS | 0,3 NS | 0,4 NS |
| | 2001 | 2,3 | 0,5 | 1,9 |
| | 2004 | 0,4 | 0,0 | 0,3 |
| | Media | 1,1 | 0,3 | 0,9 |
| Árboles off | | | | |
| | 2000 | 39,8 a | 7,4 | 22,7 a |
| | 2001 | 21,4 b | 4,4 ab | 17,2 a |
| | 2004 | 13,4 c | 2,9 b | 10,5 b |
| | Media | 21,5 | 5,0 | 16,8 |

RESULTADOS

Tabla 9. Número de brotes generativos (sin hojas) en 100 nudos en árboles de naranjo 'Salustiana' en la brotación de primavera de 3 años diferentes. Los datos son las medias de 3 a 6 árboles. En cada árbol se observó la brotación de unos 500 nudos. Letras diferentes en la misma columna y tipo de árbol indican diferencias estadísticas al 95% entre años de brotación para un mismo tipo de madera según el test de Duncan. NS: no hay diferencias significativas.

| Carga de fruto en la cosecha anterior | | Edad de la madera | | TOTAL (Media ponderada) |
|---|-------|-------------------|---------|----------------------------|
| | | Año de brotación | 1 año | |
| Árboles on | | | | |
| | 2000 | 0,4 NS | 0,1 NS | 0,3 NS |
| | 2001 | 2,2 | 0,0 | 1,7 |
| | 2004 | 0,3 | 0,0 | 0,2 |
| | Media | 1,0 | 0,03 | 0,7 |
| Árboles off | | | | |
| | 2000 | 36,4 NS | 11,0 NS | 28,1 NS |
| | 2001 | 49,9 | 24,5 | 43,2 |
| | 2004 | 49,6 | 16,2 | 40,9 |
| | Media | 45,3 | 17,2 | 37,4 |

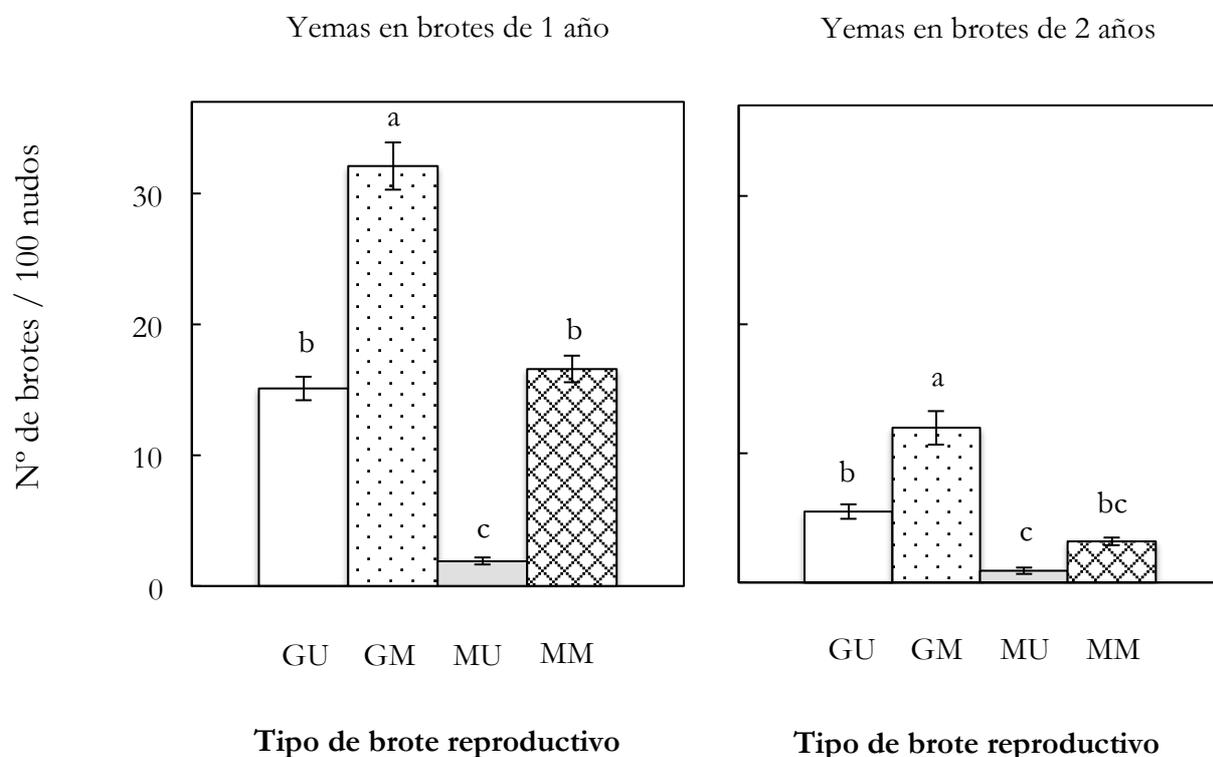


Fig. 11. Número de brotes florales en 100 nudos en árboles off en la cosecha anterior, de naranjo ‘Salustiana’, en función de la edad de las yemas y del tipo de brote. GU=Brotes generativos uniflorales; GM=Brotes generativos multiflorales; MU=Brotes mixtos uniflorales; MM=Brotes mixtos multiflorales. Los valores son la media de la brotación de primavera de 3 años. Para cada año, se observó la brotación de 3 a 6 árboles (unos 500 nudos por árbol). Las barras indican el error estándar de cada media. Letras diferentes entre tipos de brotes indican diferencias estadísticas con un nivel de significación del 95% según el test de Duncan.

RESULTADOS

La carga del fruto en la cosecha anterior también influyó en las características de los brotes reproductivos formados (número de flores y hojas por brote). En árboles *off*, los brotes obtenidos en las yemas de 1 año de edad tuvieron un mayor número de flores que en árboles *on*, tanto en brotes generativos multiflorales (3,8 *vs* 2,6 flores por brote; $P \leq 0,003$), como en mixtos multiflorales (4,6 *vs* 2 flores por brote; $P \leq 0,002$). En cuanto al número de hojas, los brotes mixtos multiflorales presentaron 2,3 hojas sin depender de la carga de fruto. Los brotes mixtos uniflorales tuvieron 6 hojas en los nudos de 1 año y 3 hojas en los de 2 años en árboles *off*, y 1 hoja independientemente de la edad de las yemas, en los árboles *on*.

En definitiva, el mayor número de flores en los árboles *off* se debió fundamentalmente (entre el 80 y el 90% de la diferencia con árboles *on*) a las flores obtenidas en los brotes mixtos multiflorales y brotes generativos multiflorales. Las flores solitarias (brotes generativos uniflorales) y las campaneras (en brotes mixtos uniflorales) representaron sólo de un 5 a un 10% de este incremento.

- *Efecto del fruto sobre el número y posición de las hojas*

El número de hojas en 100 nudos iniciadas en la primavera siguiente en los nudos de árboles *on* fue más del doble que en los nudos de los árboles *off* (116 *vs* 41,5 hojas en 100 nudos; $P \leq 0,001$; Fig. 12). Debido a que el número de nudos disponibles por árbol fue la mitad en éstos últimos, el número total de hojas formadas por árbol fue de aproximadamente 26700 en árboles *on* y 20300 en árboles *off* (Tabla 3).

En los árboles *on*, con un escaso nivel de floración, más del 98% de las hojas se formaron sobre brotes vegetativos, independientemente de la edad de las yemas. En árboles *off*, por el contrario, el 67% de las hojas nuevas se formaron sobre inflorescencias mixtas en las yemas de 1 año, mientras que las pocas hojas obtenidas en yemas de 2 años se obtuvieron por igual en brotes vegetativos y reproductivos (Fig. 12).

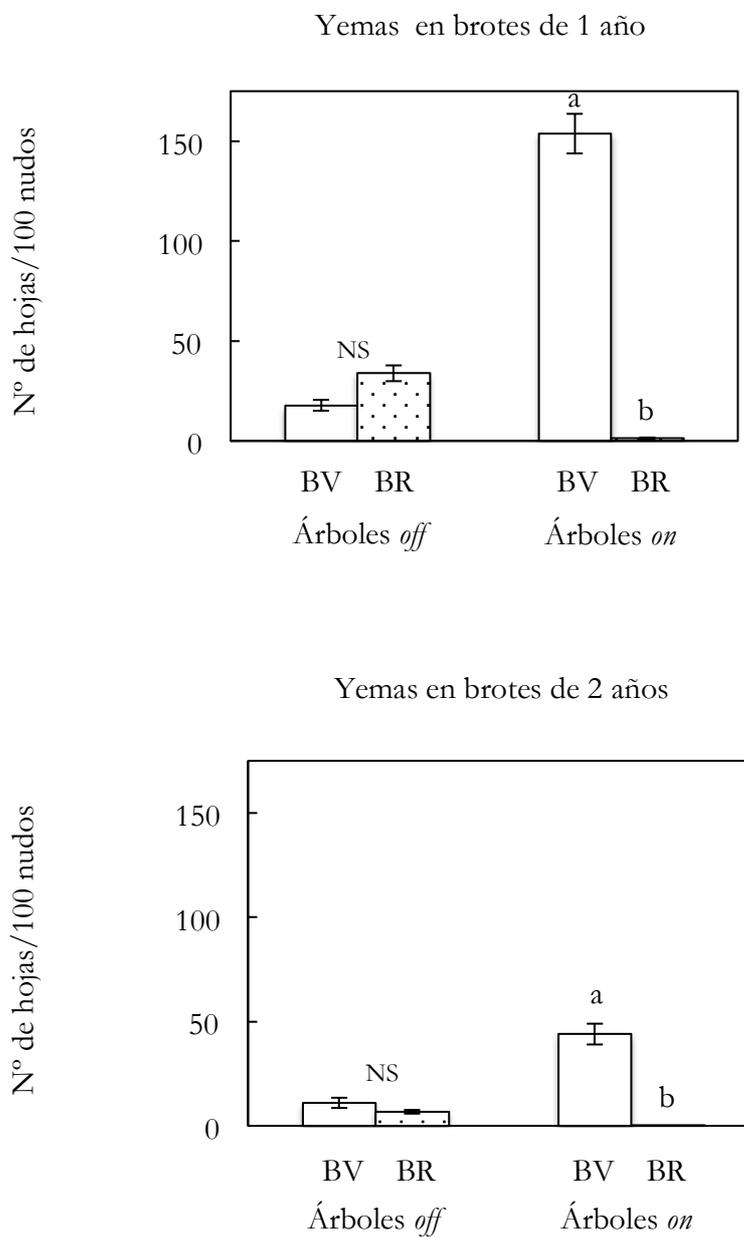


Fig. 12. Número de hojas en 100 nudos formadas en la brotación de primavera en árboles on y off de naranjo 'Salustiana' (en la cosecha anterior) en función de la edad de las yemas y del tipo de brote. BV=Brotos vegetativos; BR=Brotos reproductivos. Los valores son las medias de la brotación de primavera de 3 años. Para cada año, se observó la brotación de 3 a 6 árboles (unos 500 nudos por árbol). Las barras indican el error estándar de cada media. Letras diferentes entre tipos de brotes indican diferencias estadísticas con un nivel de significación del 95% según el test de Duncan. NS: no hay diferencias significativas.

1.3. Efecto del fruto sobre la abscisión de flores y frutitos

Para determinar la intensidad y características de la abscisión de órganos reproductivos se colocaron redes individuales bajo las copas de los árboles de ‘Salustiana’, tras iniciarse la brotación y floración de la primavera de 2000, 2001 y 2004 respectivamente. De esta manera, los órganos reproductivos caídos (flores y frutitos) se recogieron sobre las mismas. En los 3 años de medición se consideró el inicio de floración el 15 de marzo, cuando el 50% de las flores había alcanzado la antesis. A partir de ese momento y hasta final de junio, aproximadamente 100 días después de antesis (DDA), se controló la abscisión de estructuras reproductivas. Periódicamente, se recogió el material caído sobre las lonas y se llevó al laboratorio para el conteo y clasificación de órganos y la determinación de su peso seco.

El porcentaje de cuajado se calculó atendiendo al número total de flores del árbol, considerado como la suma de las flores y frutos caídos más el número de frutos recolectados.

La abscisión se inició a los pocos días de la antesis de las flores y tuvo lugar durante los 80 o 90 días posteriores, en los cuales fluctuó mostrando dos máximos característicos durante el período (Fig. 13). El proceso de abscisión de órganos generativos, aún siguiendo este patrón general, varió en los 3 años de observación. Adicionalmente, las diferencias en el nivel de floración observadas en árboles *on* y *off* se reflejaron drásticamente en las características e intensidad de la abscisión de órganos reproductivos.

La abscisión de los árboles con alta intensidad de floración (árboles *off* en la campaña anterior) aumentó gradualmente hasta alcanzar un máximo entre los 15 y los 30 DDA (abril) tras el cual descendió hasta casi anularse (Fig. 13). Inmediatamente se inició un segundo aumento en el número de órganos caídos cuyo máximo se alcanzó entre los 40 y los 65 DDA (mayo-junio). El primer pico tomó valores mayores en cuanto a número de ovarios caídos por día. El segundo año, en el que el primer pico fue muy elevado (hasta 5000 ovarios caídos por día y árbol), el segundo pico fue mucho más reducido (menos de 1000 ovarios caídos por día y árbol). A los 70 DDA ya se había completado más del 95% de la abscisión. En total, cayeron entre 70000 y 85000 ovarios por árbol (Fig. 14).

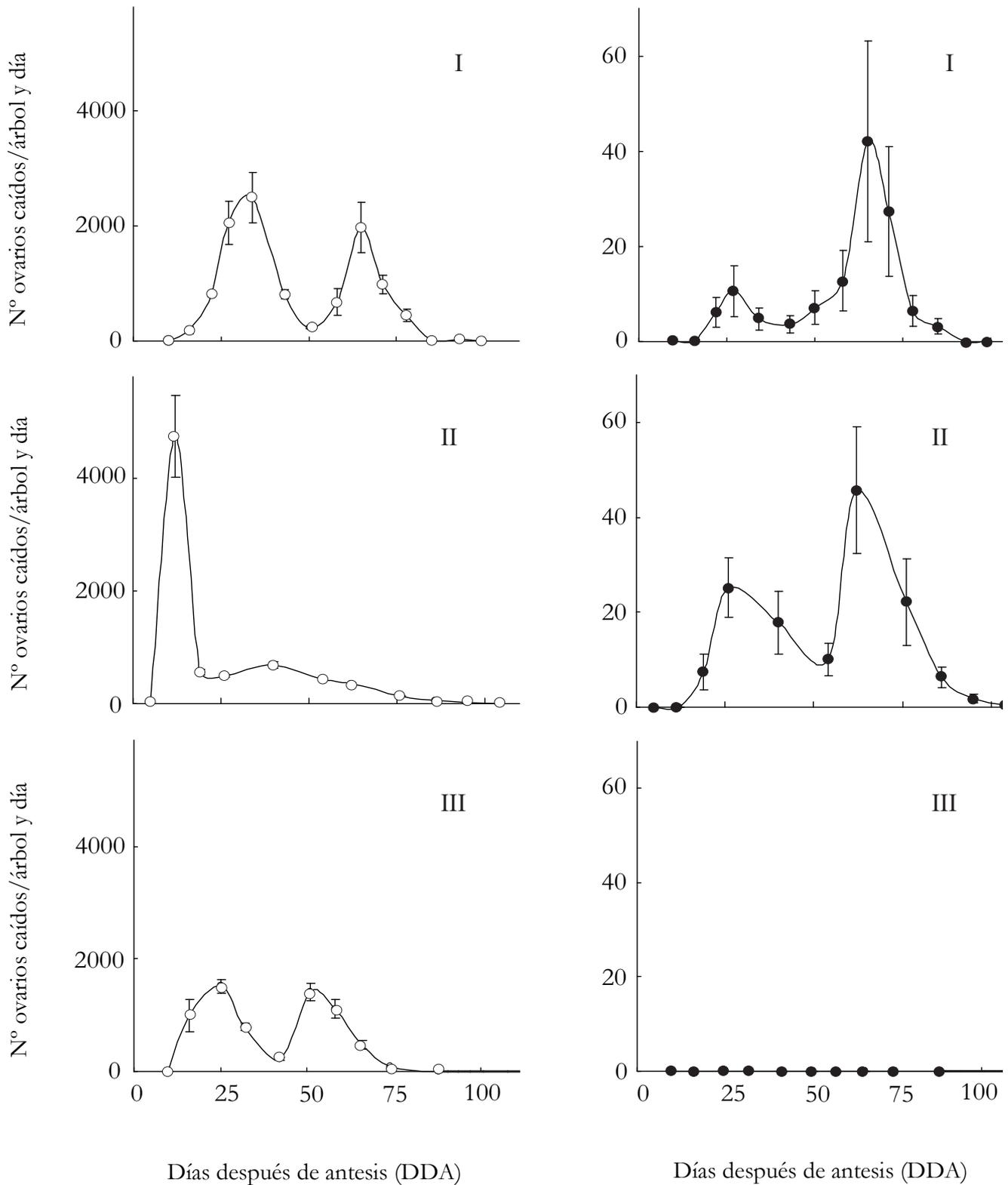


Fig. 13. Número de flores y frutos (ovarios) caídos por árbol y día en la primavera de 2000 (I), 2001 (II) y 2004 (III) en árboles de naranjo 'Salustiana' seleccionados como off (○) y on (●) en la campaña anterior. En los 3 años se consideró el 15 de marzo como día de inicio de antesis. Medias de 3 a 6 árboles. Las barras indican el error estándar de cada media.

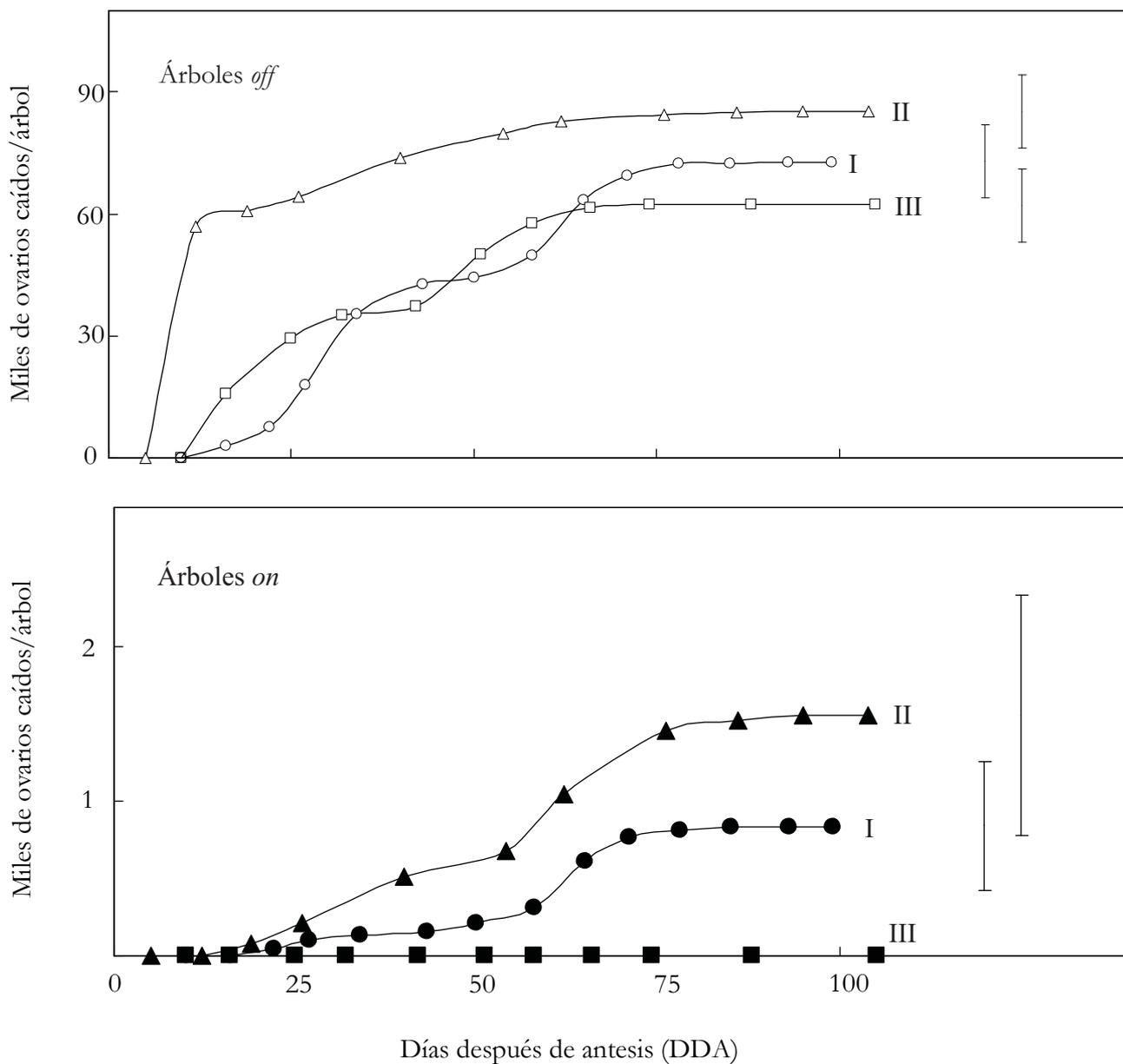


Fig. 14. *Abscisión acumulada de flores y frutos caídos por árbol en la primavera de 2000 (I), 2001 (II) y 2004 (III) en árboles de naranjo ‘Salustiana’ seleccionados como off (○) y on (●) en la campaña anterior. En los 3 años se consideró el 15 de marzo como día de inicio de anthesis. Medias de 3 a 6 árboles. Las barras muestran el valor LSD agrupado para cada período de experimentación.*

En los árboles cuyo nivel de floración era muy bajo (árboles *on* en la última cosecha), la abscisión se inició más tardíamente y los valores se mantuvieron sensiblemente menores que en los árboles *off*, tanto en valor absoluto como relativo (Fig. 15). Se alcanzó un máximo de 45 órganos generativos caídos por día a los 62-65 DDA. Los valores más altos de abscisión acumulada se dieron en la primavera de 2001, cuando cayeron 1600 ovarios por árbol.

La abscisión de capullos y de flores abiertas tuvo lugar en la base del pedúnculo, y predominó durante las primeras etapas, constituyendo la totalidad de los órganos caídos durante el primer pico de abscisión, y disminuyendo después gradualmente hasta volver a aumentar después, alcanzando un segundo máximo mucho más reducido que el primero. La abscisión de ovarios y frutitos se produjo en el cáliz, entre la pared del ovario y el disco nectarífero, y empezó a los 45-50 DDA (principios de mayo), contribuyendo mayoritariamente al segundo pico de abscisión (Fig. 16).

La abscisión relativa diaria, expresada como el porcentaje de órganos caídos en relación al número de órganos presentes en el árbol en cada momento difirió en los 3 años de experimentación, pero en general fueron visibles los dos picos característicos del proceso de abscisión en los árboles *off*. En los árboles *on*, cuando la abscisión fue detectable, el primer pico fue muy pequeño o nulo, mientras que el segundo pico fue más marcado (Fig. 15).

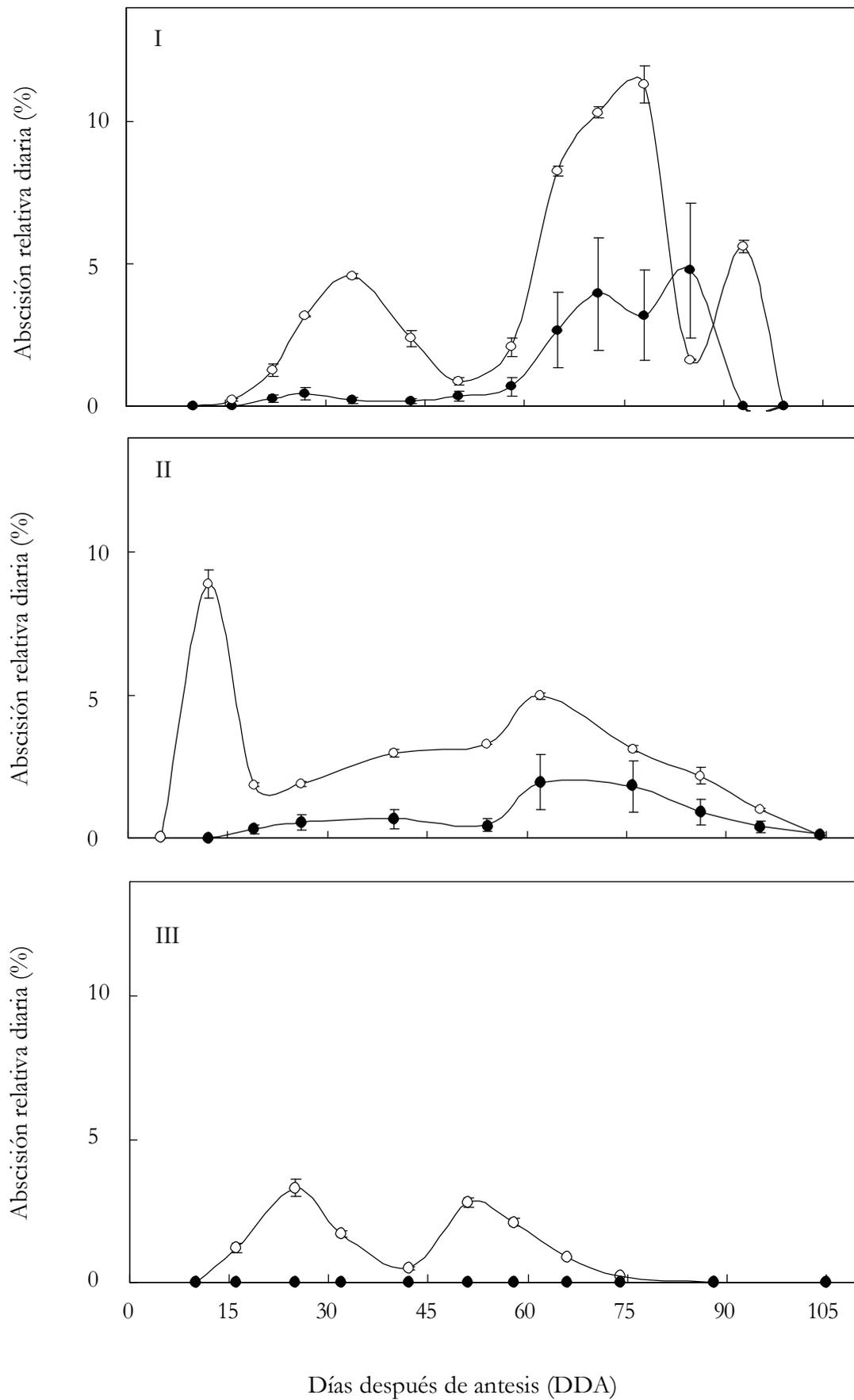
En la Figura 17 se representa la variación en el peso seco de los ovarios desprendidos. Al inicio de la abscisión, el peso medio de los ovarios fue de unos 20 mg, independientemente del nivel de floración del árbol. Este valor se mantuvo en ligero aumento hasta los 65 DDA, tras el segundo pico de abscisión, momento a partir del cual creció de forma más acentuada hasta alcanzar los 0,7 g y 1,9 g al final del período. No se observaron diferencias significativas en el peso de las estructuras caídas entre árboles con diferente nivel de floración.

Durante los períodos muestreados, la abscisión de órganos generativos provocó una pérdida de entre 1,8 y 3,5 kg de materia seca por árbol en los árboles que mostraron un alto nivel de floración (*off*) y de menos de 0,2 kg en los árboles con bajo nivel de floración (*on*; Fig. 18).

RESULTADOS

Al estudiar las pérdidas de materia seca, tanto por los valores acumulados (Fig. 18) como los diarios (Fig. 19), se observó que en los árboles con alta floración (árboles *off*) el primer pico de abscisión constituyó entre un 25 y un 40% de la materia seca total caída en todo el período. En éste, la evolución de la caída de materia seca acumulada siguió una curva doble sigmoide. En los árboles *on*, con bajo nivel de floración, el segundo pico fue mucho mayor que el primero, tanto considerando el número de órganos como el porcentaje de materia seca caída.

Fig. 15 (pág. siguiente). Abscisión relativa diaria (% de frutos supervivientes) en la primavera de 2000 (I), 2001 (II) y 2004 (III) en árboles de naranjo 'Salustiana' seleccionados como off (○) y on (●) en la campaña anterior. En los 3 años se consideró el 15 de marzo como día de inicio de antesis. Medias de 3 a 6 árboles. Las barras indican el error estándar de cada media.



RESULTADOS

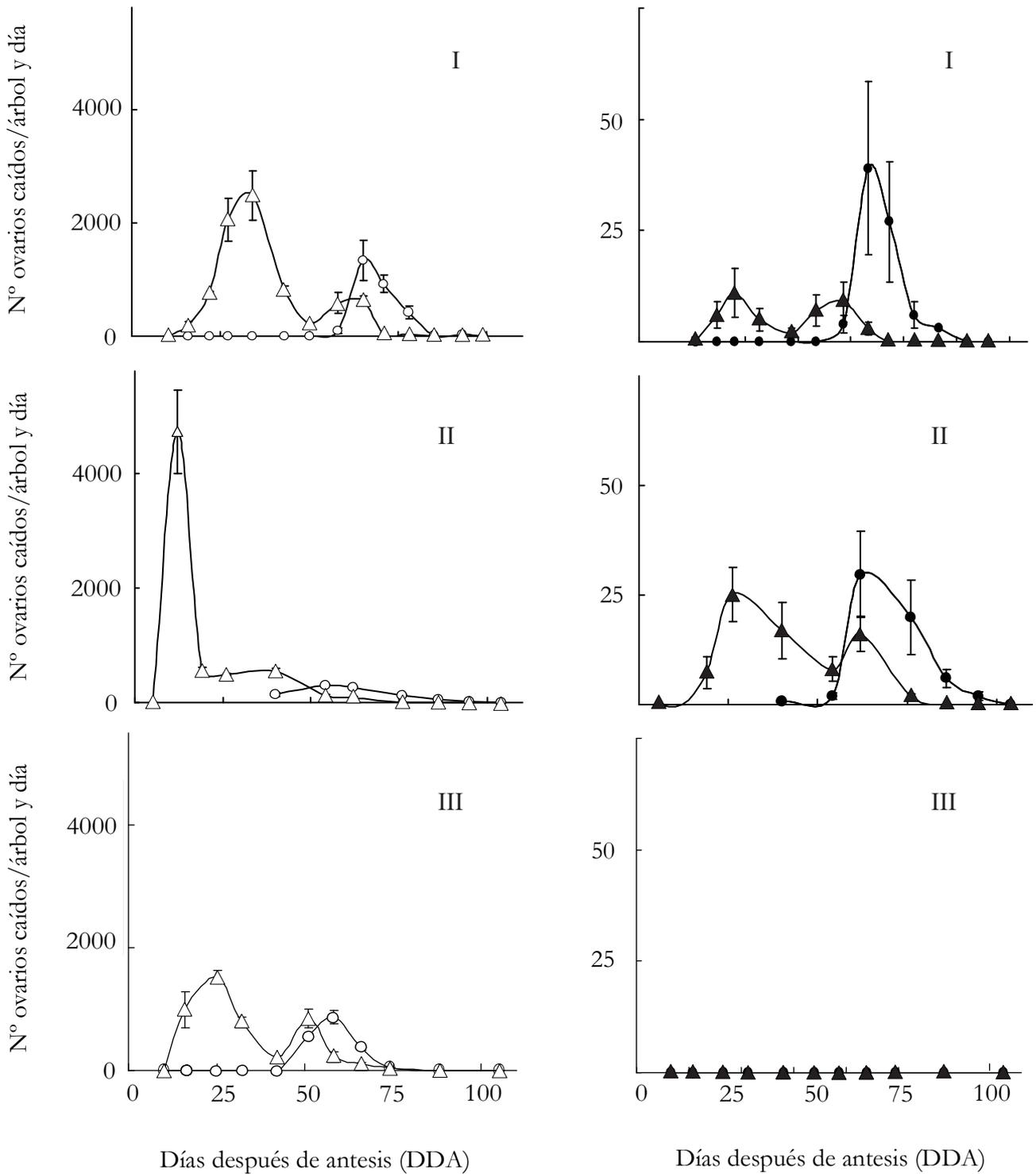


Fig. 16. *Abscisión diaria de órganos reproductivos por árbol según la zona de abscisión (círculos, abscisión en el pedúnculo; triángulos, abscisión en la base del ovario), en la primavera de 2000 (I), 2001 (II) y 2004 (III) en árboles de naranjo ‘Salustiana’ seleccionados como off (○, △) y on (●, ▲) en la campaña anterior. En los 3 años se consideró el 15 de marzo como día de inicio de anthesis. Medias de 3 a 6 árboles. Las barras indican el error estándar de cada media.*

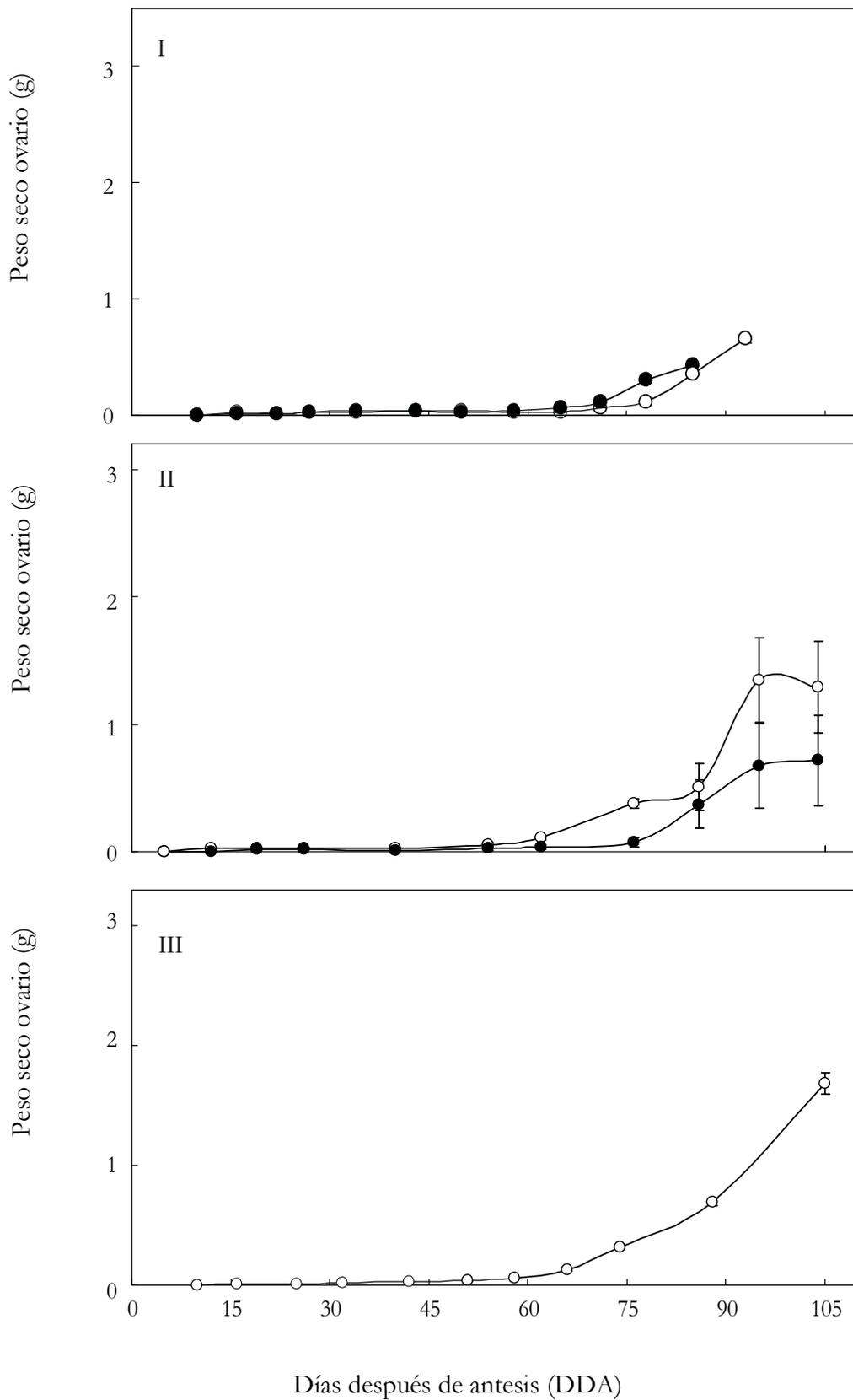


Fig. 17. Peso seco medio de ovarios y frutos caídos en la primavera de 2000 (I), 2001 (II) y 2004 (III) en árboles de naranjo 'Salustiana' seleccionados como off (○) y on (●) en la campaña anterior. En los 3 años se consideró el 15 de marzo como día de inicio de antesis. Medias de 3 a 6 árboles. Las barras indican el error estándar de cada media.

RESULTADOS

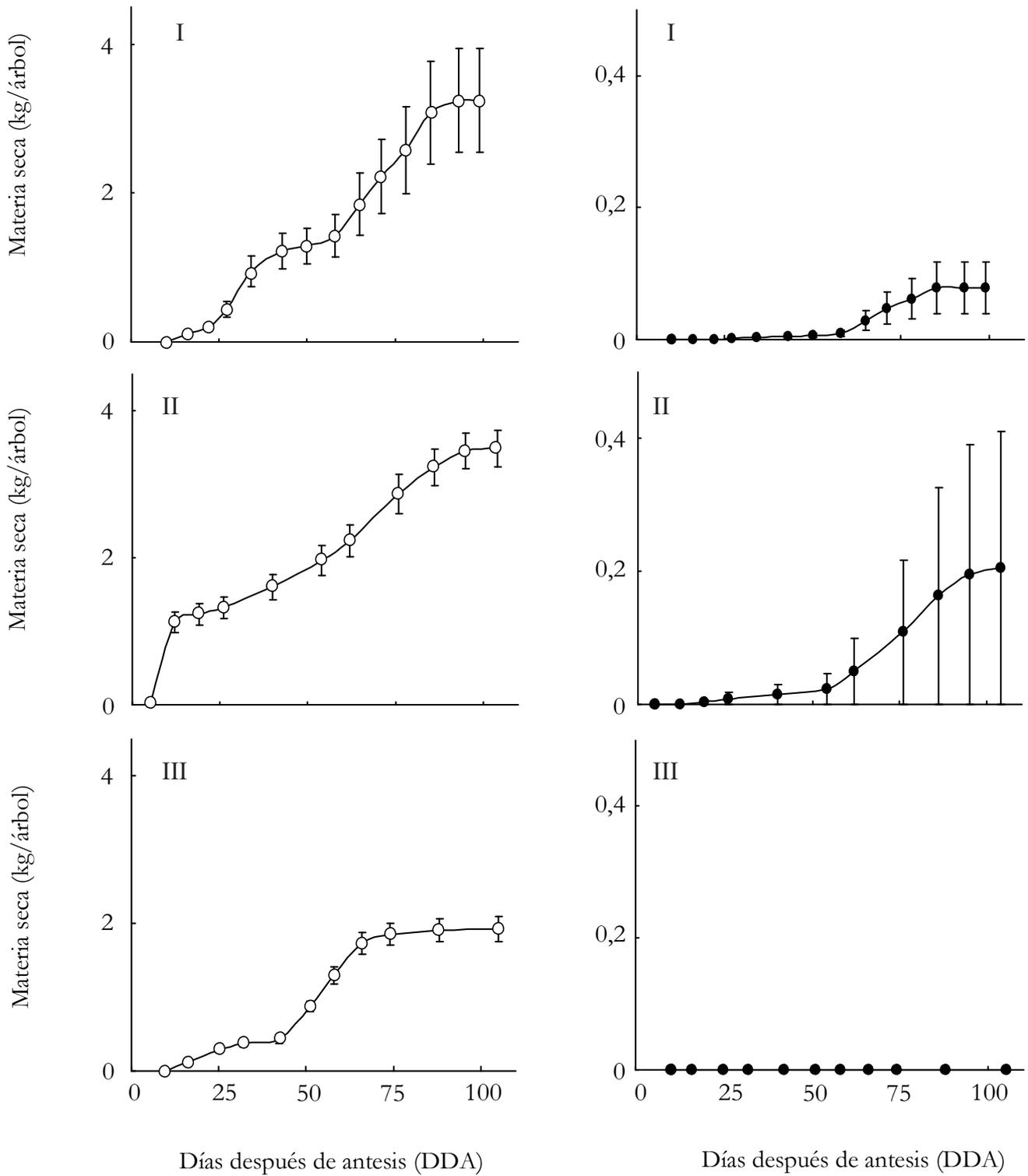


Fig. 18. Materia seca caída acumulada debida a ovarios en la primavera de 2000 (I), 2001 (II) y 2004 (III) en árboles de naranjo 'Salustiana' seleccionados como off (○) y on (●) en la campaña anterior. En los 3 años se consideró el 15 de marzo como día de inicio de antesis. Medias de 3 a 6 árboles. Las barras indican el error estándar de cada media.

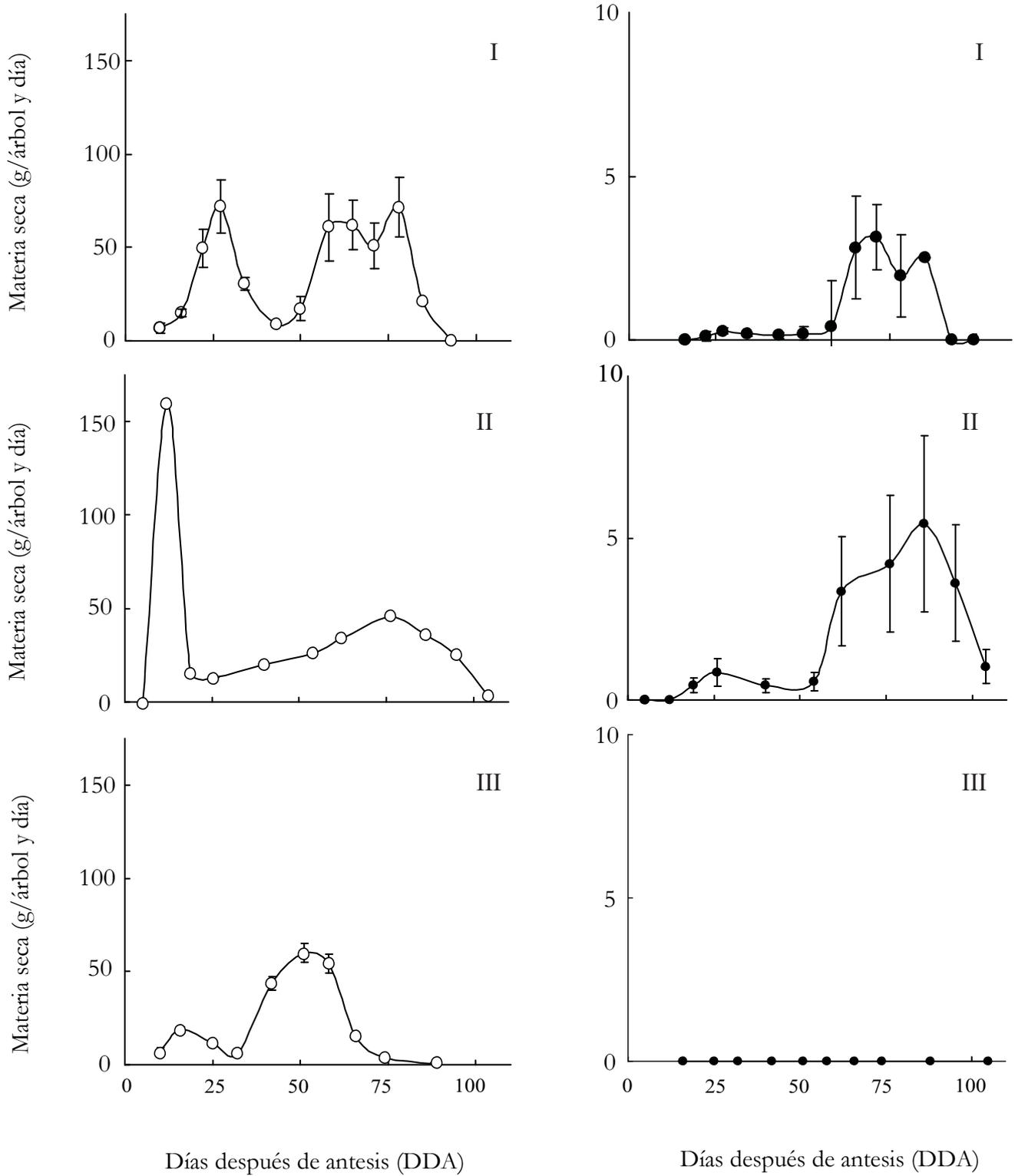


Fig. 19. Caída diaria de materia seca debida a ovarios en la primavera de 2000 (I), 2001 (II) y 2004 (III) en árboles de naranjo 'Salustiana' seleccionados como off (○) y on (●) en la campaña anterior. En los 3 años se consideró el 15 de marzo como día de inicio de antesis. Medias de 3 a 6 árboles. Las barras indican el error estándar de cada media.

RESULTADOS

Estudiando el cuajado a través de la relación entre el número de flores formadas y de frutos finalmente cosechados (Tabla 10; Figs. 20 y 21), se observó que a niveles bajos de floración (menos de 4000 flores por árbol) existió un incremento de la cosecha que aumentó con el número de flores (Fig. 20; $P \leq 0,001$). No obstante, en árboles *off* en la campaña anterior, en los cuales hubo entre 40000 y 120000 flores, el nivel de floración no estuvo relacionado con el número de frutos finalmente cosechados. Esto fue debido a que para cualquier intensidad de floración existió una disminución del porcentaje de cuajado con el aumento del número de flores, tal como se aprecia en la Figura 21, pero esta disminución fue más acusada en árboles con elevada floración.

Cuando los árboles formaron alrededor de 50000 flores, el porcentaje de cuajado tomó valores entre el 3 y el 5%. Para un número doble de flores, el cuajado se situó entre el 2 y el 3%. Para valores menores de 1000 flores por árbol, el cuajado se acercó al 100%, mientras que en el intervalo entre 1000 y 7000 flores por árbol, los valores se situaron entre el 12 y el 15% de flores finalmente cuajadas.

Tabla 10. Diferentes parámetros productivos y de floración en árboles de naranjo 'Salustiana' seleccionados por su carga extrema de fruto, en distintas campañas de producción. Los valores son medias de 3 a 6 árboles \pm error estándar.

| Carga de fruto en la cosecha anterior | Campana de producción | Nº de flores en 100 nudos | Nº total de flores formadas (miles) | Nº de frutos cosechados | Cuajado (%) |
|---------------------------------------|-----------------------|---------------------------|-------------------------------------|-------------------------|-----------------|
| Árboles on | | | | | |
| | 2000-2001 | 1,2 \pm 0,8 | 0,9 \pm 0,9 | 143 \pm 23 | 66,7 \pm 33,3 |
| | 2001-2002 | 9,5 \pm 6,2 | 1,7 \pm 1,1 | 336 \pm 150 | 47,4 \pm 26,4 |
| | 2004-2005 | 1,2 \pm 0,6 | 0,2 \pm 0,05 | 157 \pm 52 | 100,0 \pm 0 |
| Árboles off | | | | | |
| | 2000-2001 | 159,7 \pm 33,3 | 73,4 \pm 28,7 | 760 \pm 208 | 3,0 \pm 0,3 |
| | 2001-2002 | 177,1 \pm 10,8 | 87,3 \pm 21,7 | 2124 \pm 996 | 2,2 \pm 0,5 |
| | 2004-2005 | 176,8 \pm 9,4 | 62,7 \pm 14,4 | 444 \pm 43 | 3,5 \pm 0,9 |

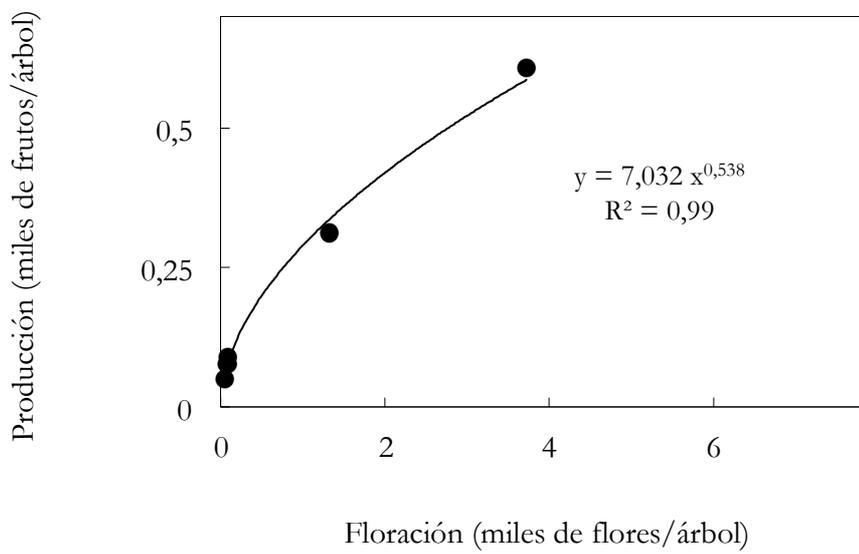
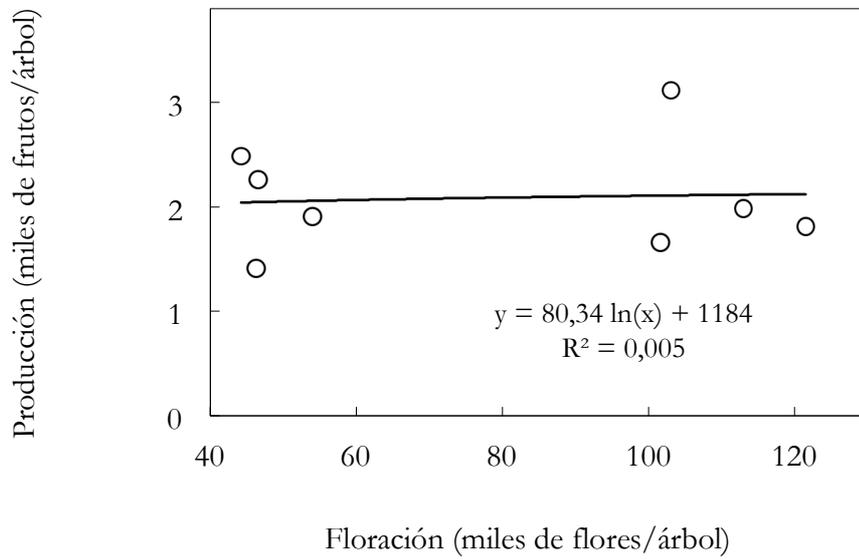


Fig. 20. Relación entre número de flores formadas y número de frutos cosechados en la misma campaña de producción en árboles de naranjo 'Salustiana'. Datos individuales de árboles seleccionados por su baja producción (off, ○) y por su alta producción (on, ●) en la cosecha anterior. Se muestran líneas de regresión en el caso de ser significativas y sus coeficientes de determinación (R^2).

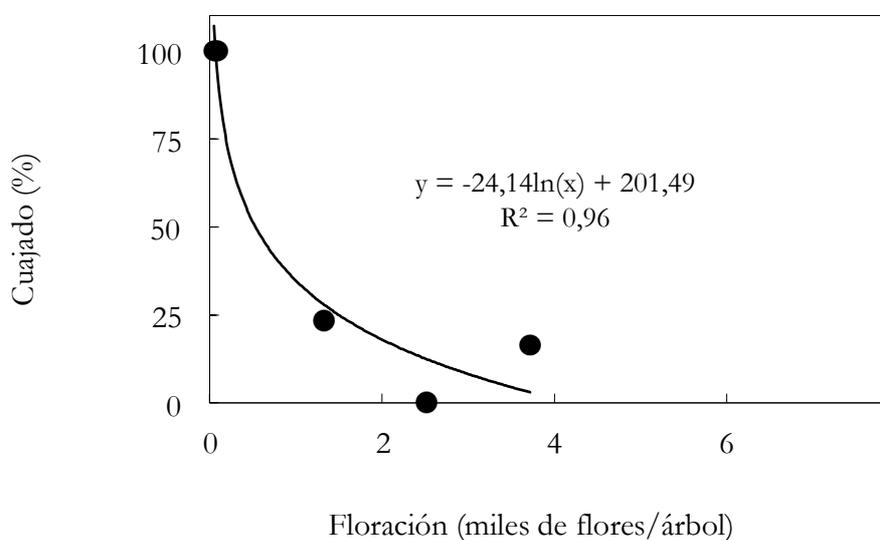
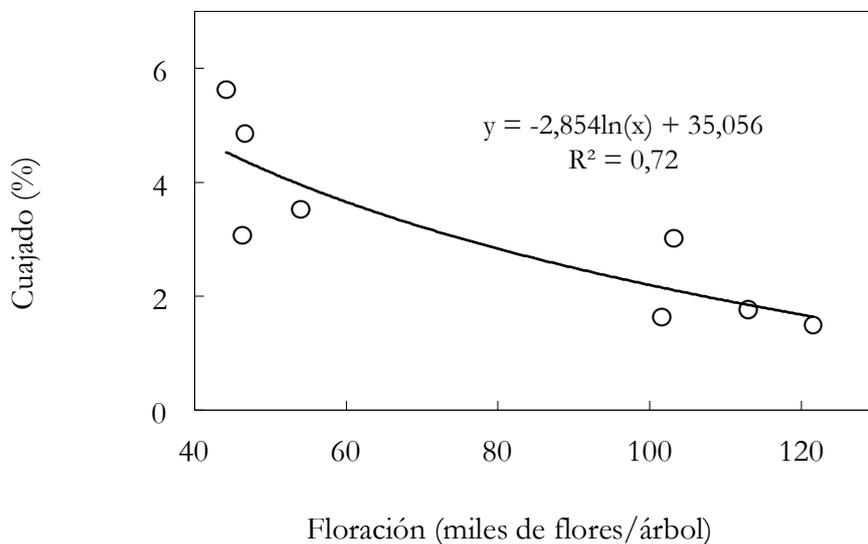


Fig. 21. Relación entre número de flores formadas y % de cuajado en la misma campaña de producción en árboles de naranjo ‘Salustiana’. Datos individuales de árboles seleccionados por su baja producción (off, ○) y por su alta producción (on, ●) en la cosecha anterior. Se muestran líneas de regresión en el caso de ser significativas y sus coeficientes de determinación (R^2).

2. VARIACIÓN ESTACIONAL DE LA FOTOSÍNTESIS E INFLUENCIA DE LA CARGA DEL ÁRBOL

2.1. Variación estacional de la fotosíntesis: influencia de las variables ambientales

El objetivo de este experimento fue llevar a cabo una caracterización sistemática a lo largo del año de la variación de la eficiencia fotosintética en árboles de naranjo dulce ‘Salustiana’ cultivados en condiciones normales de producción, así como estudiar la influencia sobre la misma de las condiciones ambientales, como la intensidad de luz y la temperatura, y de las características internas del árbol, como el tipo de brote y la presencia de fruto. Se midieron parámetros relacionados con el intercambio gaseoso (fotosíntesis neta o tasa de fijación neta de CO_2 , A_N ; tasa de transpiración, E ; conductancia estomática, g_s y concentración subestomática de CO_2 , C_i) y la fluorescencia de las clorofilas (rendimiento fotoquímico máximo del PSII, F_v/F_m) a lo largo del año. Estas variables se relacionaron con diferentes parámetros ambientales como la radiación fotosintéticamente activa (PAR), la temperatura de la hoja (T_h), la diferencia de presión de vapor de agua (VP) entre la hoja y la atmósfera (DPV) y la concentración atmosférica de CO_2 (C_a).

Para estudiar la variación estacional de la fotosíntesis y el efecto de la carga del fruto fueron medidos el intercambio gaseoso y los parámetros de fluorescencia durante un año (desde mayo de 2011 hasta abril de 2012; 4 a 10 determinaciones por mes) en hojas de la última brotación de primavera, expuestas al sol y con una orientación sudeste, en ramas de árboles con alta carga de fruto (árboles *on*) y ramas de árboles con baja o nula carga de fruto (árboles *off*). También se determinó el efecto de la edad de la hoja midiendo estos parámetros en hojas de la brotación del año anterior.

- *Variación anual de la tasa fotosintética en hojas de brotes vegetativos con exposición directa al sol*

En naranjo dulce ‘Salustiana’ el desarrollo de la mayoría de las hojas se inició durante la brotación de primavera, a final de febrero, y en mayo habían completado gran parte de su crecimiento, sobre todo las situadas en árboles con poca carga del fruto (ver punto 3 del capítulo de Resultados). La variación de la tasa fotosintética y parámetros ambientales

desde mayo hasta la siguiente brotación de primavera se muestra en las Figuras 22 y 23, donde se representan las medias diarias para cada una de las fechas en las que se efectuaron las mediciones (Fig. 22) y las medias mensuales (Fig. 23A).

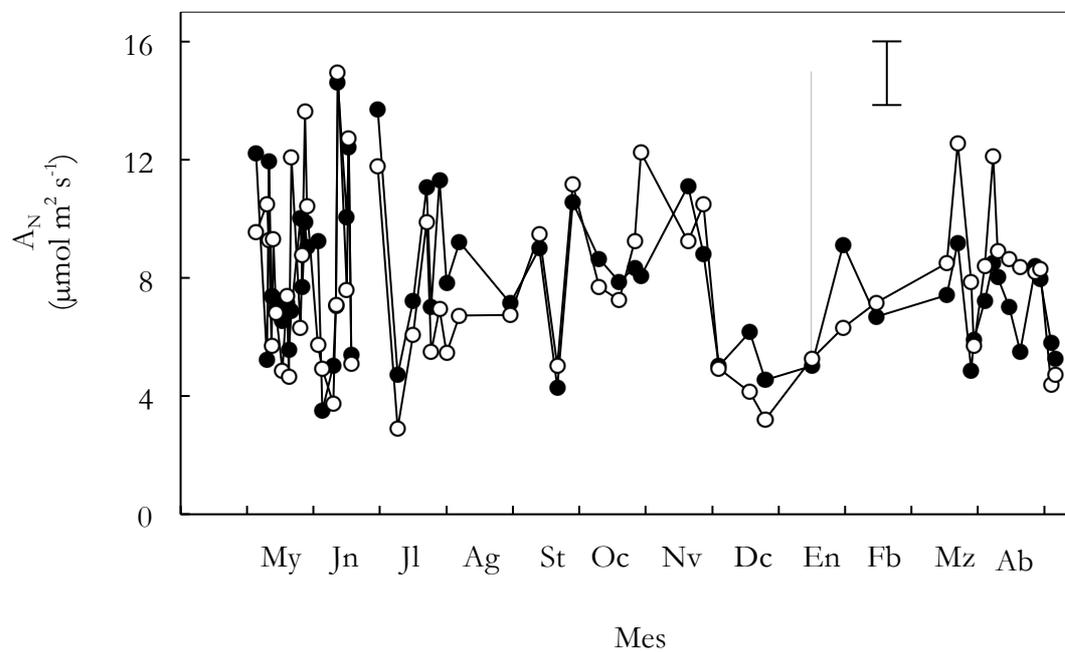


Fig. 22. Valores medios diarios de la tasa fotosintética neta (A_N) medidos durante un año en hojas expuestas al sol de brotes vegetativos de árboles off (○) y árboles on (●) de naranjo 'Salustiana' Cada valor es la media de 10 medidas de árboles diferentes. La barra muestra el valor LSD agrupado.

RESULTADOS

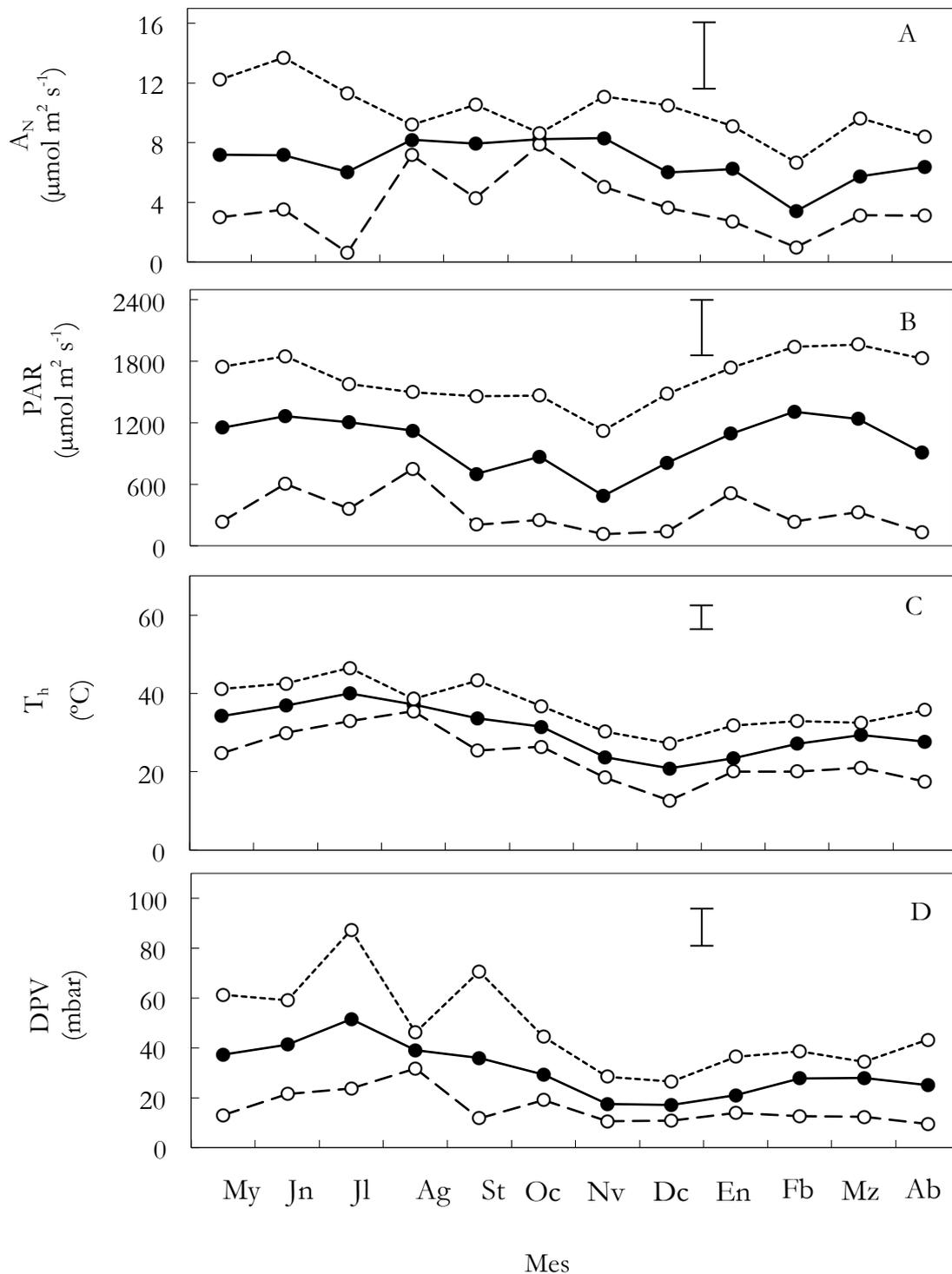


Fig. 23. Medias mensuales de los valores medios (—●—), máximos (---○---) y mínimos (---○---) durante un año en hojas expuestas al sol de brotes vegetativos de naranjo 'Salustiana' para la tasa fotosintética (A), radiación fotosintéticamente activa (B), temperatura de la hoja (C) y diferencia de presión de vapor entre la atmósfera y el interior de la hoja (D). Los valores mostrados son las medias de 4 a 10 datos por mes. Cada dato a su vez es la media de 10 medidas de árboles diferentes. Las barras muestran el valor LSD agrupado.

Es destacable que no se observaron cambios importantes en la tasa fotosintética de las hojas (A_N) durante su primer año de edad. Sin embargo, sí hubo una variación diaria muy acusada de este parámetro debido a los cambios en las condiciones ambientales. Los valores más bajos de A_N ($<1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) se alcanzaron en los meses de verano y durante las bajas temperaturas invernales, mientras que las tasas más elevadas ($>10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) se observaron en otoño y en primavera. La variabilidad de las tasas fotosintéticas medias mensuales fue muy inferior a la variabilidad debida a las diferencias entre los valores diarios en un mismo mes, y no resultó significativa (Tabla 11). La variación diaria en PAR fue, asimismo, superior a la variación mensual. La temperatura ambiental, así como la directamente relacionada temperatura de la hoja, presentaron una variación mensual significativa y superior a la variación entre los días de un mes, de forma que las medias mensuales más bajas se dieron en el mes de diciembre (21°C) y las más elevadas en el mes de julio (40°C). La variación en DPV siguió un patrón similar al de la temperatura, con los valores más altos en julio (52 mbar) y los más bajos en diciembre (17 mbar). Sin embargo, para esta variable, la variación entre meses, aunque significativa, resultó de menor cuantía que la variación diaria.

Tabla 11. Componentes de la varianza para parámetros ambientales y tasa fotosintética neta en hojas expuestas al sol de naranjo naranjo ‘Salustiana’. Hojas de brotes vegetativos de la última brotación de primavera. Se indican diferencias significativas para $P \leq 0,05$ (*) y $P \leq 0,01$ (**). NS: no hay diferencias significativas.

| | Componentes de la varianza (%) | | | |
|----------------|--------------------------------|---------|----------|----------|
| | A_N | PAR | T_h | DPV |
| MESES | 0,90 NS | 1,55 NS | 57,50 ** | 31,16 ** |
| DÍAS DE UN MES | 99,10 | 98,45 | 42,50 | 68,84 |

RESULTADOS

- *Correlación entre la variación diaria de la tasa fotosintética y los parámetros ambientales*

La relación entre la tasa fotosintética y la radiación fotosintéticamente activa (PAR) siguió una curva de optimización, como se observa en la Figura 24A. En las hojas externas del árbol, expuestas directamente a la radiación solar, la tasa fotosintética fue máxima en aquellos días en los cuales el valor medio de PAR, durante la mañana, estuvo alrededor de 550-600 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Fig. 23B). A partir de este límite, el incremento de la irradiancia media tuvo un efecto negativo sobre la fotosíntesis ($r_{\text{PAR-AN}}=-0,46^{**}$). Para valores inferiores a 550 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, existió una correlación positiva entre PAR y tasa fotosintética ($r_{\text{PAR-AN}}=0,49^*$). Esta correlación pudo explicarse parcialmente por el efecto de la temperatura. La correlación parcial entre la radiación y la tasa de fijación de CO_2 , eliminando el efecto de la temperatura, no resultó significativa en este rango de valores de PAR. Para valores de irradiancia elevados, la PAR tuvo un efecto directo importante sobre la fotosíntesis ($r_{\text{Th-PAR-AN}}=-0,41^*$). No obstante, hubo un ligero descenso en la correlación al eliminar el efecto de la temperatura, indicando una cierta relación entre el descenso de la fotosíntesis y la elevación de la temperatura de la hoja al incrementar PAR.

La relación entre la temperatura de la hoja y la fotosíntesis siguió asimismo una curva de optimización (Fig. 24B). La fotosíntesis fue máxima para temperaturas entre los 25 y los 30°C. Temperaturas superiores a 30°C disminuyeron la tasa de fijación de CO_2 y el efecto dependió de la presión de vapor de agua en el aire, VP (Fig. 24C). Cuando VP fue elevada (>20 mbar) hubo un efecto más acusado de disminución de la fotosíntesis con la temperatura ($r_{\text{Th-AN}}=-0,69^{**}$, Fig. 24C). Para valores bajos de VP (<20 mbar), el efecto fue menos acusado y la correlación entre ambos parámetros más débil ($r_{\text{Th-AN}}=-0,49^*$). Para temperaturas inferiores a los 25°C, un aumento en este parámetro incrementó la tasa fotosintética ($r_{\text{Th-AN}}=0,52^*$). En estas condiciones, VP fue siempre menor de 20 mbar.

Teniendo en cuenta la relación exponencial entre la temperatura de la hoja y la diferencia de presión de vapor (DPV), la relación entre ésta y la fotosíntesis siguió una curva similar a la de la temperatura (Fig. 24D).

Para valores de DPV mayores de 26 mbar, correspondientes a temperaturas de más de 30°C, hubo una correlación negativa entre DPV y fotosíntesis, aún más acusada para valores altos de VP ($r_{\text{DPV-AN}}=-0,54^{**}$) que para bajos valores de este parámetro ($r_{\text{DPV-AN}}=-0,48$). Para valores inferiores a 26 mbar, un incremento en esta variable supuso un aumento de la fijación de CO_2 ($r_{\text{DPV-AN}}=0,47^{**}$).

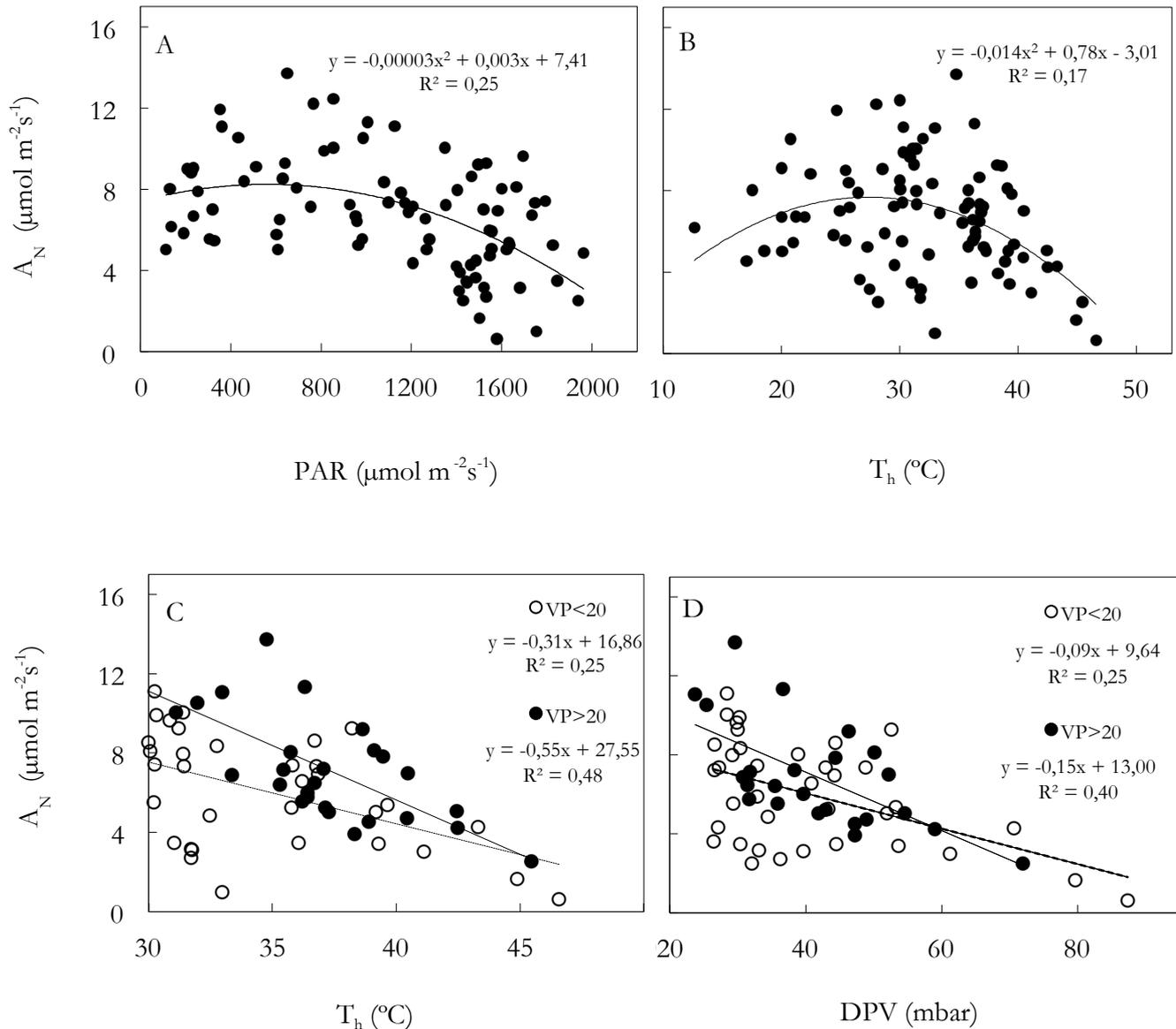


Fig. 24. Relación entre la tasa fotosintética (A_N) y diferentes parámetros ambientales en hojas expuestas al sol de naranjo 'Salustiana': (A) radiación fotosintéticamente activa, (B) temperatura de hoja, (C) temperatura de hoja para temperaturas mayores de 30°C en función de VP, y (D) diferencia de presión de vapor entre interior de la hoja y atmósfera en función de VP (en mbar). Cada dato es la media de 10 hojas de árboles diferentes. Se muestran las líneas de regresión en el caso de ser significativas y sus coeficientes de determinación (R^2).

RESULTADOS

- *Correlación entre la variación diaria de la fotosíntesis y parámetros relacionados (g_s , E , EUA)*

La conductividad estomática de la hoja (g_s) presentó una elevada correlación positiva con la fijación neta de CO_2 , dándose una relación de tipo logarítmico entre ambos parámetros (Fig. 25). Sin embargo, la tasa fotosintética estuvo correlacionada negativamente con la relación entre la concentración de CO_2 intercelular (C_i) y la del CO_2 ambiental (C_a) ($r_{AN-C_i/C_a} = -0,33^{**}$).

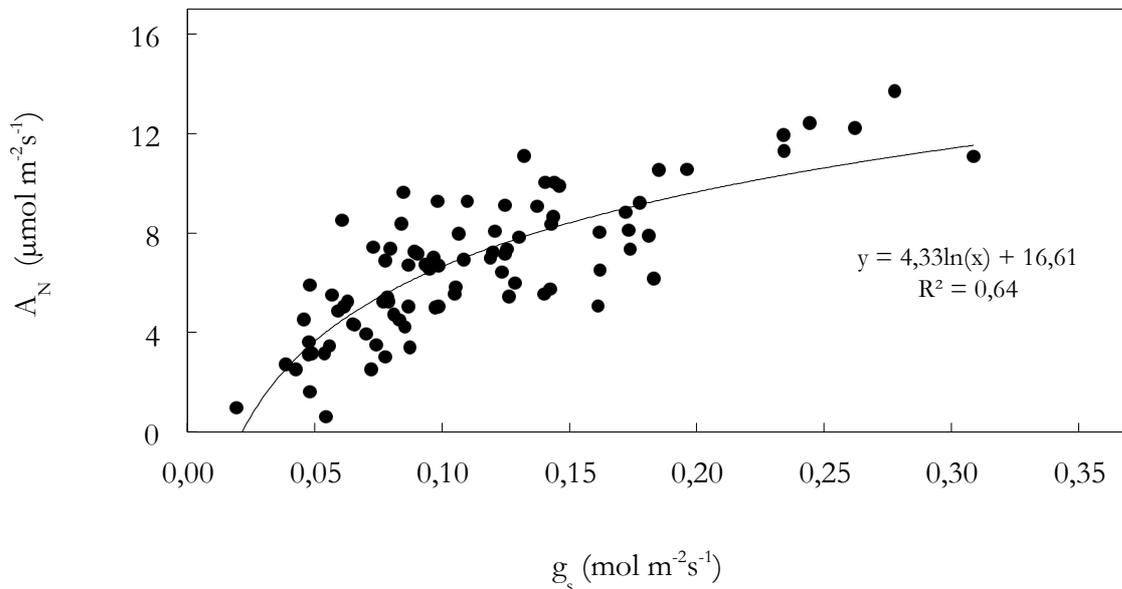


Fig. 25. Relación entre tasa fotosintética (A_N) y conductancia estomática (g_s) en hojas expuestas al sol de brotes vegetativos de primavera de naranjo 'Salustiana'. Se muestra la línea de tendencia de tipo logarítmico con su coeficiente de determinación (R^2).

La conductividad estomática presentó una correlación negativa con la irradiancia media diaria ($r_{g_s-PAR}=-0,45^{**}$), si bien hay que indicar que fue muy poco frecuente que, en las hojas exteriores, la radiación incidente presentara valores bajos y, por tanto, en este experimento, no hubo datos para estudiar el efecto de la baja irradiancia sobre la conductividad.

La temperatura de la hoja también influyó en la conductancia estomática. Para valores de T_h superiores a 25°C , hubo una disminución de la conductividad al aumentar la temperatura, y este efecto fue más pronunciado cuando VP fue elevada (Fig. 26A). Para valores de VP menores a 20 mbar, la temperatura sólo explicó el 4% de la variabilidad observada. Cuando los valores medios de temperatura de la hoja fueron inferiores a 25°C , el efecto fue el contrario, incrementando la conductividad con la temperatura (Fig. 26B).

Hubo una relación logarítmica ($y=1,32\ln(x)-2,47$) entre la diferencia de presión de vapor y la tasa de transpiración (E). DPV fue mayor cuanto mayor fue E, con un límite máximo de aproximadamente $4 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. La variación en DPV explicó el 60% de la variación observada en la tasa de transpiración.

La temperatura de la hoja explicó más del 70% de la variación mostrada por la eficiencia en el uso del agua (EUA). EUA incrementó con la disminución de la temperatura de la hoja, la cual a su vez fue debida a un incremento en A_N y a un descenso de E. Sin embargo, la última tuvo mayor influencia sobre la variabilidad de EUA ($r_{A_N-EUA}=0,46^*$; $r_{E-EUA}=-0,68^*$).

RESULTADOS

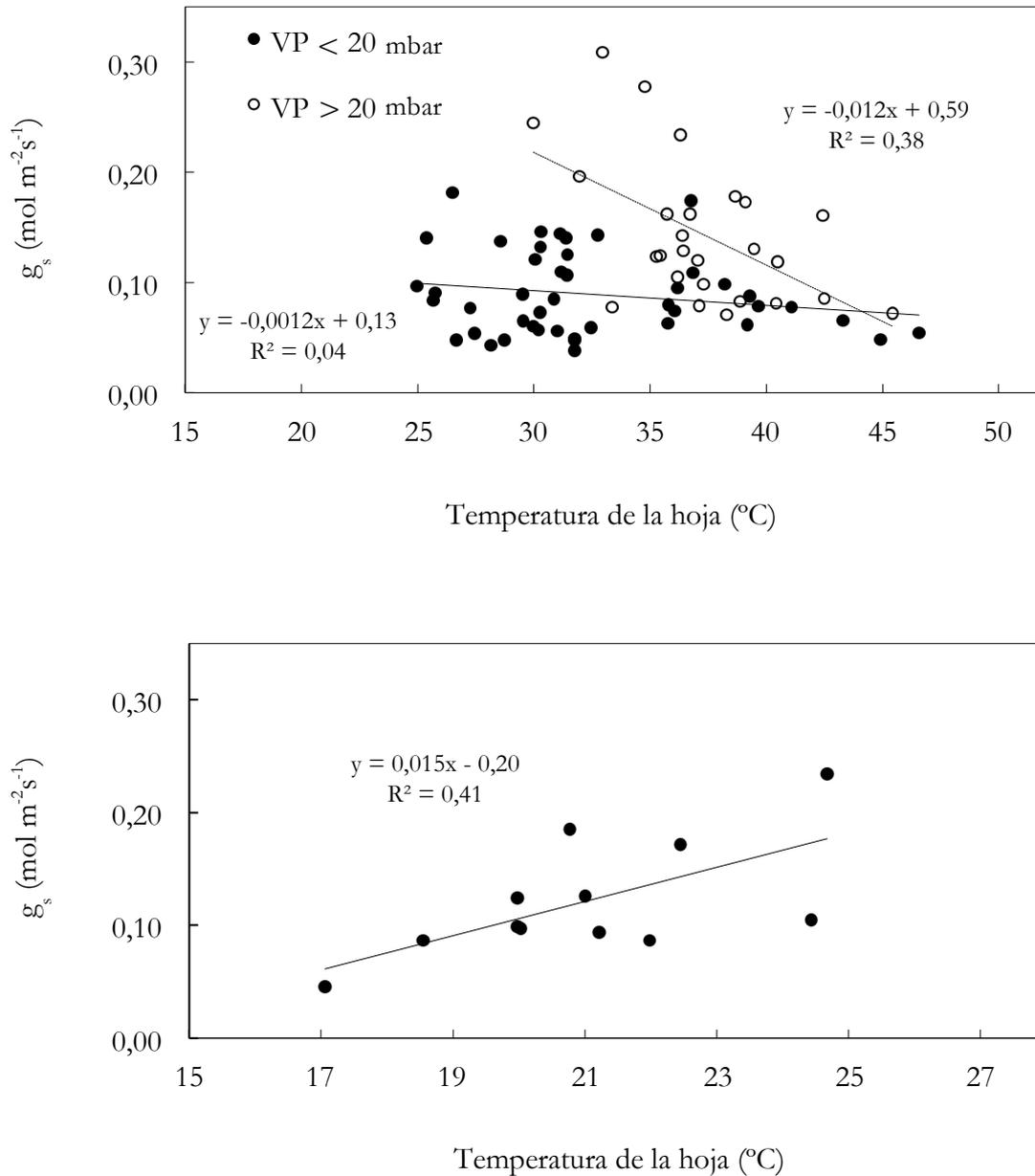


Fig. 26. Relación entre conductancia estomática (g_s) y temperatura en hojas expuestas al sol de brotes vegetativos de primavera de naranjo 'Salustiana'. (A) Relación a temperaturas por encima de 25°C en función de la presión de vapor del aire (VP). (B) Relación con temperaturas por debajo de 25°C. Se muestran las líneas de regresión en el caso de ser significativas y sus coeficientes de determinación (R^2).

2.2. Influencia de las características de las hojas sobre la fotosíntesis

Para estudiar el efecto de las características de las hojas sobre la fotosíntesis, se compararon los diferentes parámetros relacionados con dicha función en hojas jóvenes (3 a 6 meses) y viejas (13 a 15 meses) desarrolladas en las brotaciones de 2 años consecutivos, tanto en árboles *on* como en árboles *off*. Las medidas se realizaron en 24 días despejados, desde el 8 de mayo hasta el 25 de julio de 2011.

Por otra parte, se midieron los parámetros relacionados en hojas de brotes vegetativos de primavera de árboles sin fruto (*off*) diferenciando su exposición al sol (con o sin exposición directa) y su orientación (noroeste o sudeste). Las medidas se realizaron en días despejados, el 29 de junio en el primer caso y el 15 de julio de 2011 en el segundo.

El efecto de la posición de la hoja a lo largo del brote y de la cercanía al fruto se estudió midiendo los parámetros citados en hojas situadas en la 1^a, 3-4^a y 7^a posición en brotes con un fruto terminal, situados en árboles *on*. Las medidas se realizaron el 16 de mayo de 2011, en ausencia de nubes.

- *Efecto de la edad de la hoja*

La capacidad fotosintética de la hoja permaneció estable a lo largo de su primer año de vida. Sin embargo, durante el segundo año, esta capacidad disminuyó, de forma que las hojas de la nueva brotación de primavera tuvieron una tasa fotosintética mayor que aquella mostrada por las hojas más viejas (Tabla 12).

No hubo efecto de la edad de la hoja sobre el rendimiento fotoquímico máximo (F_v/F_m). Tampoco la edad varió las relaciones que se establecieron entre fotosíntesis y diferentes parámetros ambientales (PAR, T_h , DPV) u otros parámetros relacionados (g_s , E, EUA) descritos para las hojas jóvenes.

Tabla 12. Efecto de la edad de la hoja sobre la tasa fotosintética y parámetros relacionados en árboles on y off de naranjo ‘Salustiana’. Tasa fotosintética (A_N), conductancia estomática (g_s), tasa de transpiración (E), concentración subestomática de CO_2 (C_i), eficiencia en el uso del agua (EUA), rendimiento fotoquímico del fotosistema II (F_v/F_m), radiación fotosintéticamente activa (PAR), temperatura de la hoja (T_h) y diferencia de presión de vapor (DPV). Los valores para cada día son medias de 10 hojas de árboles diferentes para cada edad de la hoja y carga de fruto. Las medidas fueron realizadas en ausencia de nubes durante 24 días, desde el 8 de mayo al 25 de julio. Letras diferentes en una misma columna y tipo de árbol, indican diferencias estadísticamente significativas mayores del 95%. NS: no hay diferencias significativas.

| Carga de fruto y edad de la hoja | A_N ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) | g_s ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) | E ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) | C_i ($\mu\text{mol mol}^{-1}$) | EUA ($\mu\text{mol mmol}^{-1}$) | F_v/F_m - | PAR ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) | T_h ($^{\circ}\text{C}$) | DPV (mbar) |
|----------------------------------|---|--|---|---------------------------------------|--------------------------------------|----------------|---|---------------------------------|---------------|
| Árboles on | | | | | | | | | |
| 3-6 meses | 8,6 a | 0,17 a | 2,6 a | 268 NS | 3,6 NS | 0,794 NS | 1147 NS | 34 NS | 35,8 NS |
| 13-15 meses | 7,1 b | 0,11 b | 2,1 b | 273 | 3,3 | 0,795 | 1019 | 34 | 34,2 |
| Árboles off | | | | | | | | | |
| 3-6 meses | 8,7 a | 0,16 a | 2,4 a | 271 NS | 3,0 NS | 0,776 NS | 1051 NS | 33 NS | 34,9 NS |
| 13-15 meses | 7,0 b | 0,10 b | 1,9 b | 274 | 3,0 | 0,787 | 971 | 33 | 33,1 |

- *Efecto de la orientación del brote*

Las hojas de ramas situadas con orientación noroeste recibieron una PAR más de 20 veces menor y tuvieron una temperatura inferior a 2°C que aquellas situadas hacia el sudeste (Tabla 13). La irradiancia fue el parámetro ambiental con una mayor influencia sobre la variación de la fotosíntesis neta (68%). El contenido en clorofila fue similar en las hojas con distinta orientación (75 unidades SPAD). Las hojas orientadas hacia el noroeste tuvieron un mayor rendimiento fotosintético máximo del fotosistema II (F_v/F_m).

Las hojas situadas en ramas con orientación noroeste tuvieron una proporción en peso seco de almidón superior a las situadas con orientación sudeste (Tabla 14). Por el contrario, el contenido en azúcares solubles no fue diferente entre ambos tipos de hojas.

Tabla 13. Efecto de la orientación en la copa y de la localización de la hoja sobre la tasa fotosintética (A_N), conductancia estomática (g_s), tasa de transpiración (E), concentración subestomática de CO_2 (C_i), eficiencia en el uso del agua (EUA), rendimiento fotoquímico máximo del fotosistema II (F_v/F_m), radiación fotosintéticamente activa (PAR), temperatura de la hoja (T_h) y diferencia de presión de vapor (DPV) en brotes de naranjo 'Sahstiana'. Los valores son medias de 10 hojas de árboles diferentes. Las medidas fueron realizadas en ausencia de nubes el 29 de junio (medidas de localización de la hoja) y el 15 de julio (medidas de orientación de la hoja). Letras diferentes en una misma columna y para cada característica de hoja, indican diferencias estadísticamente significativas mayores del 95%. NS: no hay diferencias significativas.

| | A_N ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) | g_s ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) | E ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) | C_i ($\mu\text{mol mol}^{-1}$) | EUA ($\mu\text{mol mmol}^{-1}$) | F_v/F_m | PAR ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) | T_h ($^{\circ}\text{C}$) | DPV (mbar) |
|-----------------------------------|---|--|---|---------------------------------------|--------------------------------------|-----------|---|---------------------------------|--------------------|
| Características de la hoja | | | | | | | | | |
| Orientación | | | | | | | | | |
| Sudeste | 9,6 a | 0,18 a | 3,9 a | 300 _{NS} | 2,4 a | 0,795 b | 1722 a | 34 a | 35,9 _{NS} |
| Noroeste | 1,3 b | 0,10 b | 2,6 b | 354 | 0,5 b | 0,816 a | 68 b | 32 b | 32,9 |
| Localización | | | | | | | | | |
| Exterior | 6,6 a | 0,11 a | 2,7 a | 220 _{NS} | 2,4 a | 0,821 b | 1379 a | 38 a | 43,6 a |
| Interior | 3,0 b | 0,09 b | 2,0 b | 275 | 1,5 b | 0,836 a | 173 b | 36 b | 37,6 b |

Tabla 14. Contenido en carbohidratos metabolizables según la orientación del brote en hojas de brotes vegetativos de árboles sin fruto de naranjo 'Salustiana'. Los valores son la media de 3 réplicas, consistente cada una de ellas en 10 hojas de árboles diferentes. Muestras tomadas el 15 de julio. Letras diferentes indican diferencias significativas para $P \leq 0,01$. NS: no hay diferencias significativas.

| Orientación del brote | Contenido en carbohidratos metabolizables (% sobre m.s.) | | |
|-----------------------|--|-------------------|------------------------------|
| | Almidón | Azúcares solubles | Carbohidratos metabolizables |
| Sudeste | 7,5 b | 6,3 _{NS} | 13,8 b |
| Noroeste | 8,8 a | 6,5 | 15,3 a |

- *Efecto de la de la posición de la hoja en el brote*

La posición de la hoja a lo largo del brote y la distancia al fruto, influyó sobre la tasa fotosintética, de forma que las hojas situadas más cerca del fruto mostraron una mayor A_N (Tabla 15). Este gradiente decreciente desde el ápice del brote también fue observado en la conductancia estomática y en la tasa de transpiración. El resto de parámetros relacionados, como la concentración subestomática de CO_2 , la eficiencia en el uso del agua y la eficiencia máxima del fotosistema II, no se vieron afectados.

Tabla 15. Efecto de la posición de la hoja (distancia al ápice) a lo largo del brote con fruto en posición apical sobre la tasa fotosintética y parámetros relacionados en árboles on de naranjo 'Salustiana'. Tasa fotosintética (A_N), conductancia estomática (g_s), tasa de transpiración (E), concentración subestomática de CO_2 (C_i), eficiencia en el uso del agua (EUA), rendimiento fotoquímico máximo del fotosistema II (F_v/F_m), radiación fotosintéticamente activa (PAR), temperatura de la hoja (T_h) y diferencia de presión de vapor (DPV). Los valores son medias de 10 hojas para cada posición de la hoja. Las medidas fueron realizadas en ausencia de nubes el 16 de mayo. Letras diferentes en una misma columna y tipo de árbol, indican diferencias estadísticamente significativas mayores del 95% según el test de Duncan. NS: no hay diferencias significativas.

| Posición de la hoja | A_N ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) | g_s ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) | E ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) | C_i ($\mu\text{mol mol}^{-1}$) | EUA ($\mu\text{mol mmol}^{-1}$) | F_v/F_m - | PAR ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) | T_h ($^{\circ}\text{C}$) | DPV (mbar) |
|--------------------------------|---|--|---|---------------------------------------|--------------------------------------|----------------|---|---------------------------------|---------------|
| 1 ^a | 7,2 a | 0,09 a | 2,2 a | 187 NS | 3,3 NS | 0,81 NS | 1430 NS | 31 NS | 34,5 NS |
| 3 ^a -4 ^a | 6,3 ab | 0,08 a | 1,9 a | 171 | 3,3 | 0,81 | 1320 | 32 | 33,9 |
| 7 ^a | 4,7 b | 0,06 b | 1,4 b | 168 | 3,4 | 0,82 | 1410 | 31 | 35,3 |

- *Efecto de la exposición de la hoja a la radiación solar*

Las hojas internas de la planta, que recibieron una menor irradiancia (PAR media de 173 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), mostraron una tasa fotosintética menor que las hojas externas (Tabla 13). En estas hojas, y dentro del rango de PAR que reciben en condiciones de campo, un incremento en PAR supuso un aumento en la tasa de fijación de CO_2 , dándose una relación de tipo logarítmico entre ambos parámetros ($r_{\text{AN-PAR}}=0,44^{**}$). Este fue el parámetro ambiental que más influyó en la variabilidad observada. La tasa de fotosíntesis mostró, como se ha descrito anteriormente, una elevada correlación con las variaciones en conductividad ($r_{\text{AN-gs}}=0,74^{**}$), pero un incremento en este parámetro no implicó un aumento de la concentración de CO_2 subestomático ($r_{\text{AN-Ci}}=-0,63^{**}$).

El contenido en clorofilas, determinado con el SPAD, fue superior en las hojas exteriores y, asimismo, este tipo de hojas presentó una mayor proporción en peso seco de azúcares solubles que las hojas interiores. Sin embargo, la proporción de almidón fue similar en ambos tipos de hoja (Tabla 16).

Tabla 16. Contenido de carbohidratos (% sobre materia seca) en función de la exposición de la hoja a la radiación solar en hojas de brotes vegetativos de árboles sin fruto de naranjo 'Salustiana'. Los valores son la media de 3 réplicas, consistente cada una de ellas en 10 hojas de árboles diferentes. Las medidas fueron realizadas en ausencia de nubes el 29 de junio. Letras diferentes indican diferencias significativas mayores del 95%. NS: no hay diferencias significativas.

| Exposición de la hoja al sol | Almidón (% m.s.) | Azúcares solubles (% m.s.) | Carbohidratos metabolizables (% m.s.) | Clorofila (Unidades SPAD de Minolta) |
|------------------------------|-------------------|----------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|
| Exterior | 7,8 _{NS} | 21,5 a | 29,3 a | 77,4 a |
| Interior | 7,1 | 13,0 b | 20,1 b | 64,0 b |

RESULTADOS

Cuando las hojas interiores recibieron una PAR similar al de las hojas exteriores ($1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), desplazando la cubierta exterior que las sombreaba, respondieron rápidamente incrementando su tasa fotosintética, siendo el tiempo medio hasta la estabilización de la fijación de CO_2 de 50 a 60 s (Fig. 27). Sin embargo, en ningún caso llegaron a alcanzarse los valores de fijación de CO_2 que presentaron las hojas externas cuando las determinaciones se prolongaron durante 15 min con la mayor exposición a la luz directa.

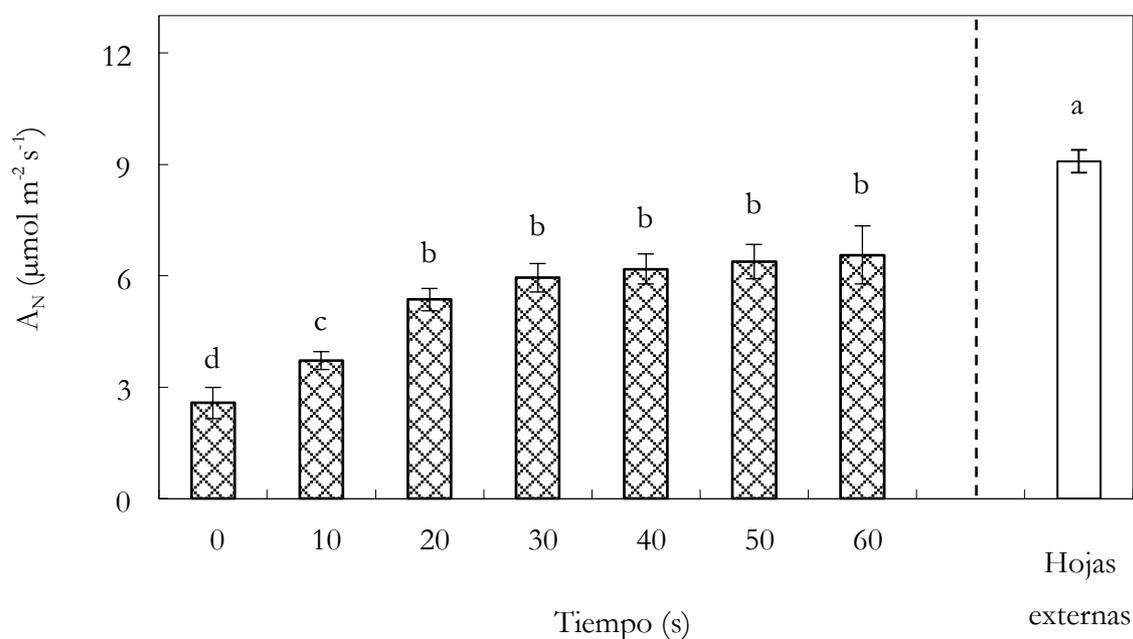


Fig. 27. Respuesta de la tasa fotosintética (A_N) a elevados valores de radiación fotosintéticamente activa en hojas internas a la sombra (barras sombreadas) en árboles de naranjo 'Salustiana'. Se aplicó una iluminación ($1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) tras el estado estacionario ($t=0$). Cada valor es la media de 10 hojas de árboles diferentes. Las barras indican el error estándar de cada media. La columna blanca muestra la tasa fotosintética de hojas externas expuestas al sol a $1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas al 95% según el test de Duncan.

2.3. Influencia de la presencia del fruto

Se realizaron medidas de intercambio gaseoso y de fluorescencia a lo largo de un año (desde mayo de 2011 hasta abril de 2012) para determinar el efecto de la presencia del fruto sobre la fotosíntesis en árboles adultos y en condiciones habituales de cultivo. Se realizó una medida por árbol en una hoja madura de la última brotación y totalmente expandida, tratándose de la tercera o cuarta hoja del brote, contando desde el ápice, situadas sobre brotes vegetativos. Se utilizaron brotes situados en 10 árboles con alta carga de fruto (*on*) y 10 árboles con baja carga de fruto (*off*).

No se observaron diferencias significativas en la tasa fotosintética entre árboles con alta y baja carga de fruto cuando se evaluó en la totalidad del año. Tampoco se encontraron diferencias entre los diferentes meses del año. Los parámetros ambientales fueron los factores principales en la variación de A_N (Tabla 17).

También se determinó el efecto de la proximidad del fruto en árboles *on*, comparando la A_N de hojas de brotes con fruto (brotes reproductivos uniflorales) con hojas de brotes sin fruto (brotes vegetativos). Se observaron valores de A_N , E y g_s ligeramente mayores en los brotes sin fruto (Tabla 18). No hubo efecto de la presencia de frutos cercanos sobre la relación C_i/C_a ni sobre la eficiencia en el uso de agua (EUA).

Tabla 17. Resumen del análisis de varianza para efecto de la carga de fruto y época del año sobre la tasa fotosintética (A_N) en hojas de naranjo 'Salustiana'. Las medidas fueron realizadas en días despejados a lo largo de un año. NS: no hay diferencias significativas al 95%.

| Fuente de variación | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Cuadrado medio | F |
|----------------------|-------------------|--------------------|----------------|---------|
| CARGA DE FRUTO | 0,79 | 1 | 0,79 | 0,10 NS |
| MES | 123,2 | 11 | 11,2 | 1,42 NS |
| CARGA DE FRUTO * MES | 36,7 | 11 | 3,34 | 0,42 NS |
| Error | 806,4 | 102 | 7,91 | |

3. VARIACIÓN ANUAL DEL CONTENIDO EN CARBOHIDRATOS. INFLUENCIA DE LA CARGA DEL ÁRBOL

Se determinó el contenido en carbohidratos en hojas durante un año completo (de junio de 1999 a mayo de 2000) en árboles *on* (con fruto) y *off* (sin fruto) de naranjo ‘Salustiana’, en intervalos de aproximadamente 30 días. Para ello, fueron seleccionados brotes vegetativos de la última brotación de primavera, dispuestos a una altura media de la copa y distribuidos uniformemente en todo su perímetro, situados en 3 árboles de cada nivel de carga de fruto, dando lugar a 2 muestras por árbol. Una vez en el laboratorio, se tomaron las hojas ubicadas en la mitad de la longitud de los brotes para su procesamiento y posterior análisis, desechándose el resto de las hojas del brote. Cada muestra estaba constituida por unas 20 hojas.

También se determinaron las distintas fracciones de carbohidratos en corteza y madera de los brotes seleccionados, desde octubre hasta febrero. En el laboratorio, en cada brote se separó la corteza de la madera, para ser convenientemente procesadas y analizadas.

- *Peso seco de las hojas*

En junio, al iniciar el período de muestreo, las hojas nuevas tenían entre 3 y 4 meses de edad. El peso seco de las hojas de árboles *off* fue sensiblemente mayor que las de los árboles *on* (310 vs 220 mg por hoja; Fig. 28). El desarrollo posterior en el tamaño de las hojas dependió de la presencia en el árbol de frutos en desarrollo, de forma que ésta retrasó la adquisición del peso seco máximo por las hojas, si bien el valor finalmente alcanzado no se vio afectado significativamente por la carga productiva del árbol.

En los árboles sin fruto, las hojas ya habían alcanzado su tamaño máximo al final de la caída de junio. El peso seco de las hojas en los árboles *off* se mantuvo a un nivel constante durante todo el período de muestreo en el primer año de experimentación (en torno a los 300 mg de peso seco por hoja).

En las hojas de árboles con fruto, que en junio tenían un menor tamaño que en los árboles *off*, las hojas siguieron incorporando un 30% más de materia seca durante los meses de verano hasta adquirir un máximo en octubre.

RESULTADOS

Entre noviembre y diciembre, coincidiendo con la última fase del crecimiento del fruto y la maduración del mismo, se observó la pérdida de materia seca en hojas de los árboles *on*. A partir de esta fecha, las hojas acumularon de nuevo materia seca, hasta adquirir los 300 mg de peso al inicio de la siguiente brotación, al entrar en un año *off*.

El porcentaje de materia seca en las hojas de brotes vegetativos de la brotación de primavera se mantuvo en torno al 45% durante todo el período de muestreo tanto en los árboles *on* como en los *off* (Fig. 29).

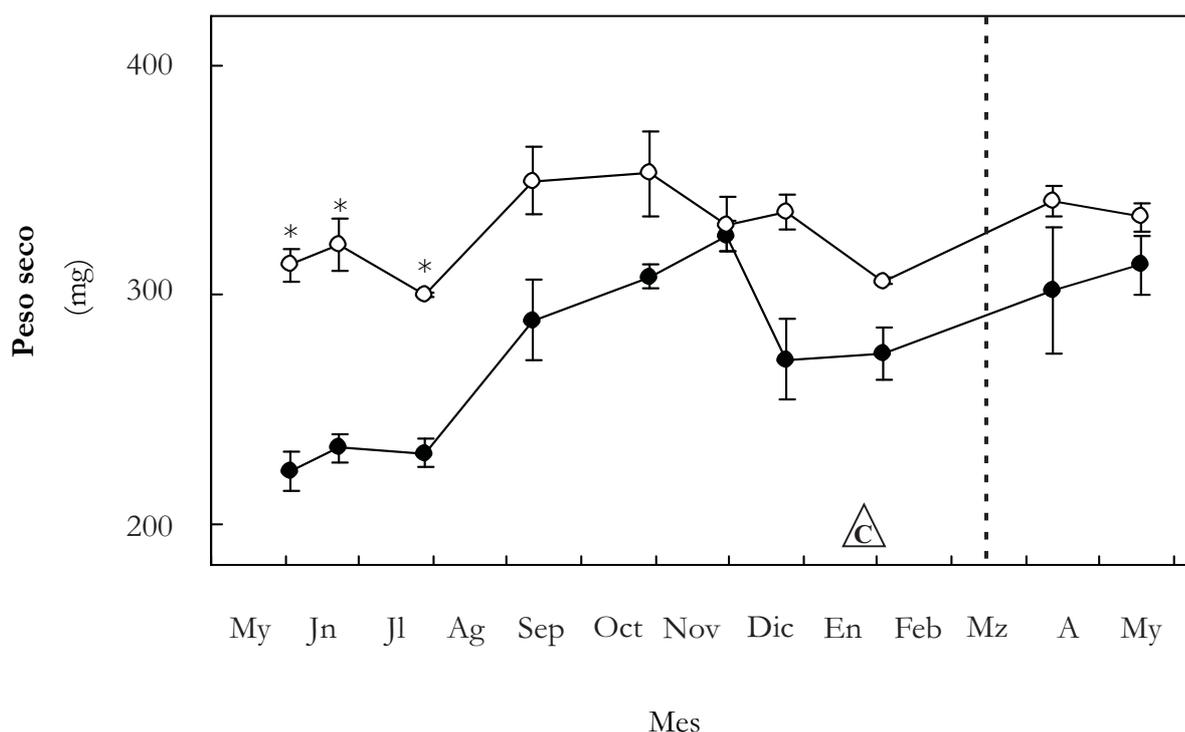


Fig. 28. Peso seco por hoja en brotes vegetativos de primavera de árboles *off* (○) y árboles *on* (●) de naranjo 'Salustiana'. Cada valor es la media de 3 árboles diferentes, con dos muestras por árbol. Las barras indican el error estándar de cada media. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre árboles con diferente carga de fruto para $P \leq 0,05$, en esa fecha. La línea discontinua vertical indica el momento de antesis de las flores; C: cosecha de los frutos.

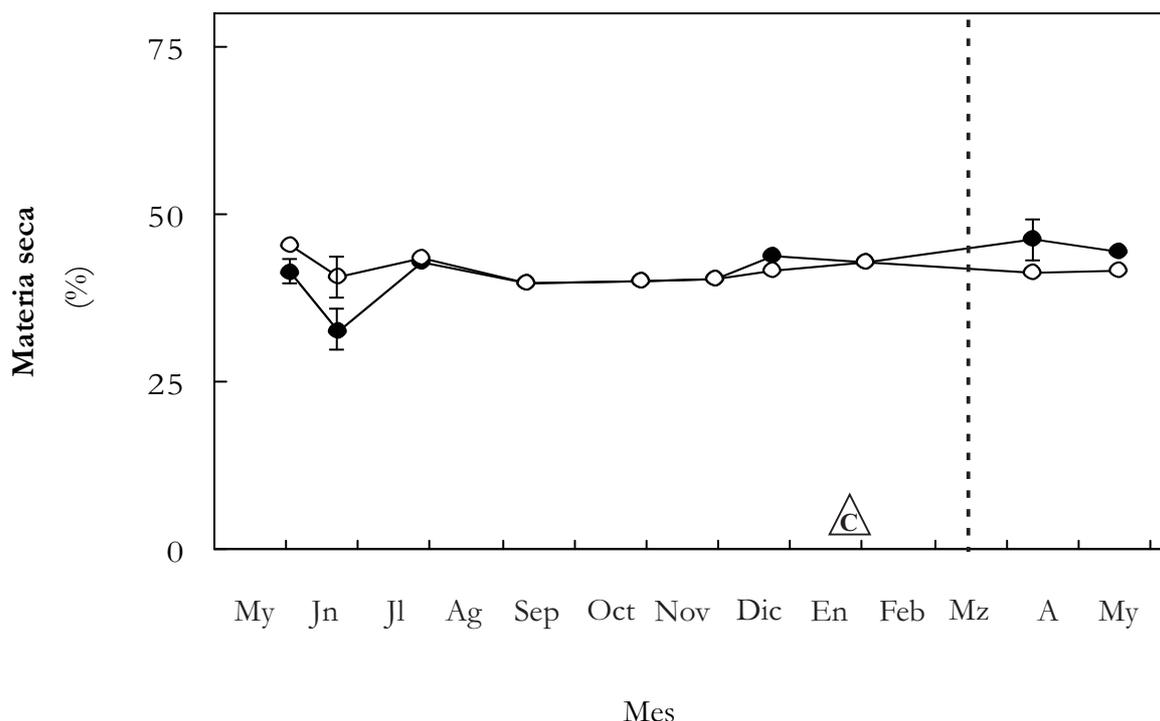


Fig. 29. Contenido en materia seca (%) en hojas de brotes vegetativos de primavera de árboles off (○) y árboles on (●) de naranjo 'Salustiana'. Cada valor es la media de 3 árboles diferentes, con 2 muestras por árbol. Las barras indican el error estándar de cada media. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre árboles con diferente carga de fruto para $P \leq 0,05$, en esa fecha. La línea discontinua vertical indica el momento de antesis de las flores; C: cosecha de los frutos.

- **Contenido en carbohidratos de las hojas**

a) Carbohidratos metabolizables totales

Hubo una fuerte variación estacional en la concentración total de carbohidratos en hojas de brotes vegetativos de primavera (Fig. 30). Esta pauta de variación estacional estuvo marcada por el estado productivo del árbol durante el período de muestreo. Los árboles no productivos (*off*) alcanzaron una mayor concentración de carbohidratos en sus hojas que los árboles que estaban desarrollando fruto (*on*). Las diferencias más acusadas se dieron al final de la caída de junio, momento en que los árboles *off* presentaron un 23% de carbohidratos sobre materia seca, y los árboles *on* un 11%.

RESULTADOS

Tras este momento, una disminución gradual de carbohidratos en los árboles *off* mantuvo los niveles a un valor cercano al 11% igualándose a los árboles *on* desde final de agosto. En enero, comenzó un rápido incremento en la concentración de carbohidratos en ambos tipos de árboles.

A partir de la antesis de las flores (mediados de marzo) descendió acusadamente el contenido en carbohidratos en hojas de árboles *off*. Éstos árboles, que habían sido seleccionados por su baja carga de fruto, florecieron intensamente, entrando en un año de alta producción. En los árboles previamente seleccionados como *on*, la nueva brotación fue menor y más tardía, consistiendo principalmente en brotes vegetativos, entrando en un año *off*.

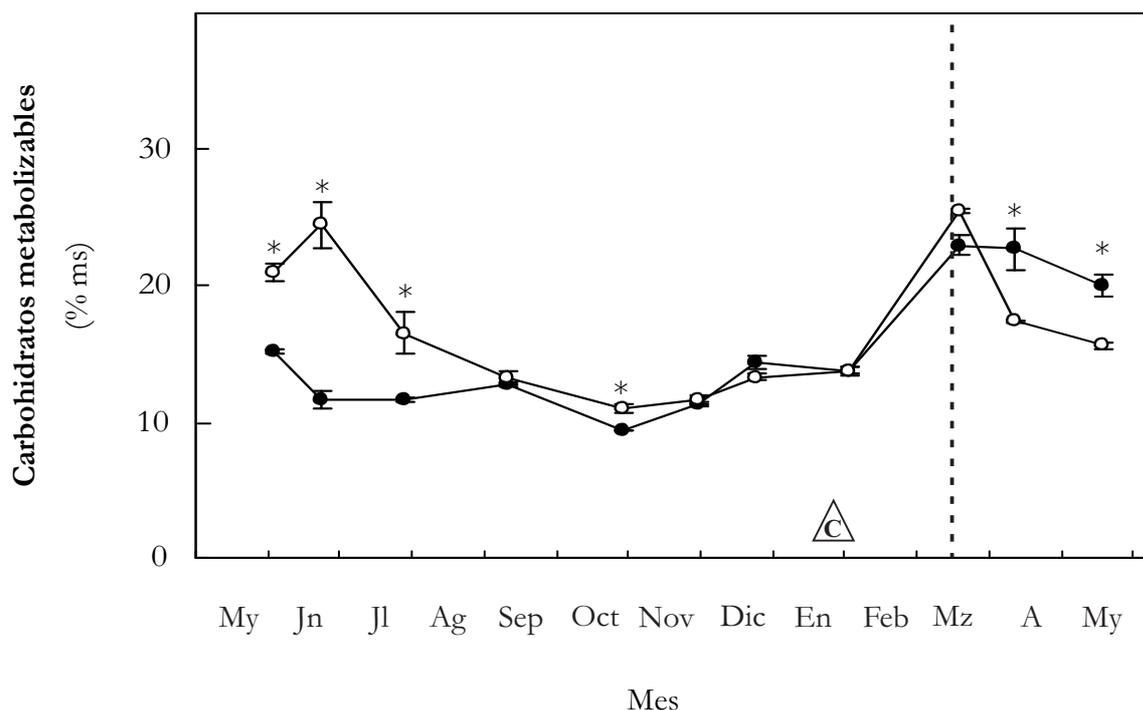


Fig. 30. Contenido en carbohidratos metabolizables en hojas de brotes vegetativos de primavera de árboles *on* (●) y *off* (○) de naranjo 'Salustiana', expresado como % sobre materia seca. Cada valor es la media de 3 árboles diferentes, con 2 muestras por árbol. Las barras indican el error estándar de cada media. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre árboles con diferente carga de fruto para $P \leq 0,05$, en esa fecha. Sin asterisco, no hay diferencias significativas. La línea discontinua vertical indica el momento de antesis de las flores; C: cosecha de los frutos.

b) Almidón

El patrón de variación en el contenido en almidón de las hojas fue muy similar al mostrado para el contenido total de carbohidratos metabolizables. Ambos parámetros estuvieron muy correlacionados ($r=0,97^{**}$). De entre todas las fracciones de carbohidratos consideradas, la de almidón fue la que más variación presentó en hojas a lo largo del año y la que se vio más influida por la presencia de fruto (Fig. 31).

Al inicio del período de muestreo se observó un mayor contenido en almidón en las hojas de árboles *off* (9 vs 6 % sobre peso seco). Posteriormente, durante la fase de abscisión, estas diferencias se incrementaron ya que hubo una marcada tendencia a acumular almidón en las hojas de los árboles *off*, mientras que en los árboles *on* tuvo lugar incluso un ligero descenso en el mismo período. La acumulación en árboles *off* llegó a su máximo (16% sobre peso seco) a final de junio, disminuyendo gradualmente hasta final de noviembre y permaneciendo constante en un 4% hasta diciembre en ambos tipos de árboles, sin mostrar diferencias por efecto del fruto en desarrollo. A partir de esta fecha, se observó un rápido aumento en los niveles de almidón en ambos tipos de árboles, que alcanzaron de nuevo el 16% a mediados de marzo, coincidiendo con la antesis de las flores. Desde este momento volvieron a aparecer diferencias entre árboles con fruto y sin fruto, ya que tuvo lugar una disminución en el contenido en almidón más acusada en los árboles que habían sido improproductivos durante el año anterior (árboles *off*) y que con la nueva brotación florecieron intensamente, entrando en un año *on*.

RESULTADOS

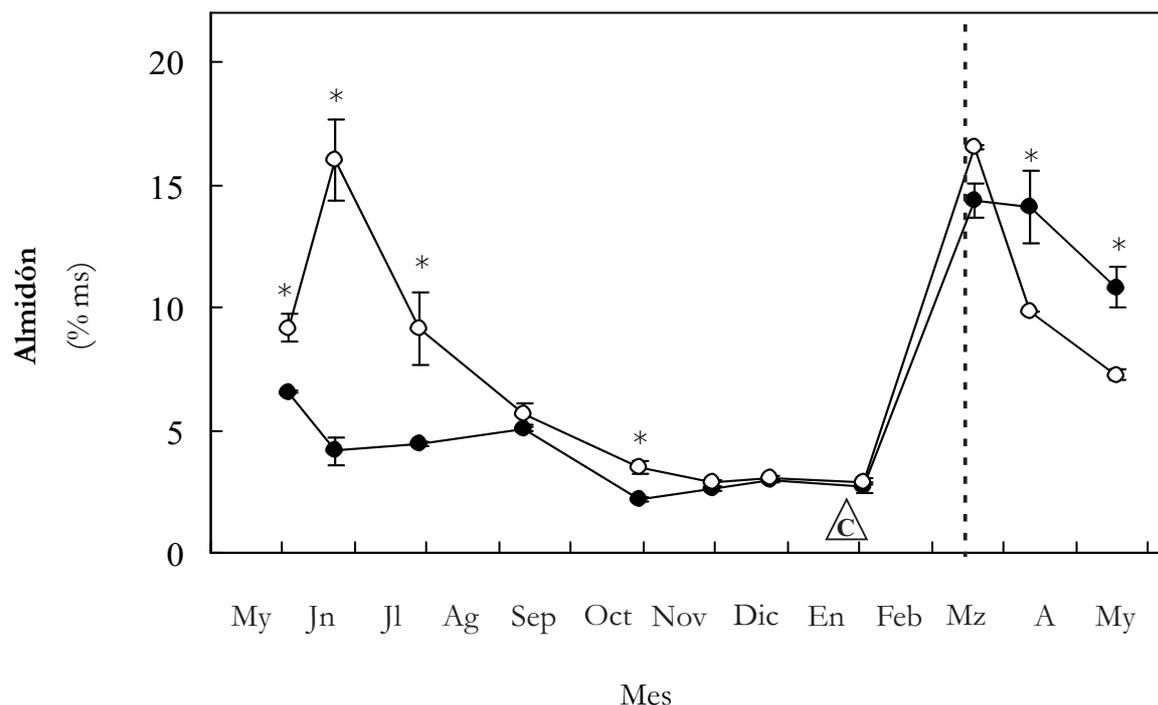


Fig. 31. Contenido en almidón en hojas de brotes vegetativos de primavera de árboles on (●) y off (○) de naranjo 'Salustiana', expresado como % sobre materia seca. Cada valor es la media de 3 árboles diferentes, con 2 muestras por árbol. Las barras indican el error estándar de cada media. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre árboles con diferente carga de fruto para $P \leq 0,05$, en esa fecha. Sin asterisco, no hay diferencias significativas. La línea discontinua vertical indica el momento de antesis de las flores; C: cosecha de los frutos.

c) Azúcares solubles

Los cambios anuales en azúcares solubles fueron mucho menores que en almidón. Solamente hubo diferencias importantes debido a la carga de fruto a principios de junio, cuando este contenido fue mayor en árboles *off* (12%) que en árboles *on* (8%), árboles estos últimos que se encontraban en pleno proceso de abscisión de frutitos (Fig. 32A). A partir de este momento, hubo una reducción en ambos hasta llegar a un mismo valor mínimo, próximo al 7% en el mes de julio. Este valor se mantuvo hasta inicios de noviembre. A continuación, aumentó gradualmente hasta alcanzar un máximo en diciembre-enero en todos los árboles. Posteriormente, la presencia de azúcares solubles mostró un descenso hasta el momento de la antesis. A partir de este momento, la relación

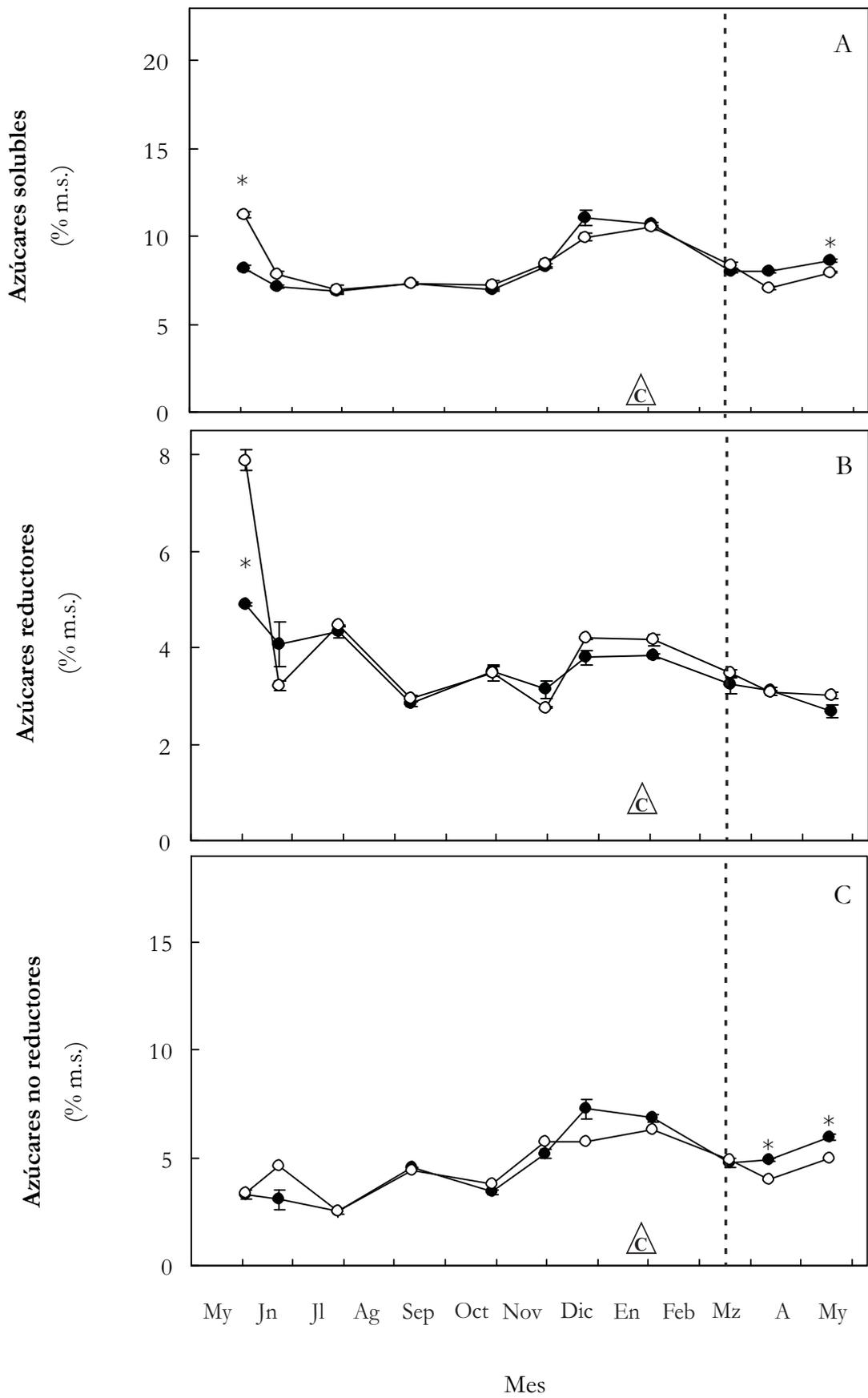
on/off se invirtió, de modo que los árboles que antes eran *on* (y que entraban en un año *off*) se situaron en niveles ligeramente superiores en el contenido en azúcares solubles.

El patrón de variación en el contenido porcentual en azúcares solubles fue debido principalmente a la variación en azúcares reductores (Fig. 32B). Éstos mostraron valores máximos al final de la caída de junio. En ese momento también fue cuando se observaron las mayores diferencias entre árboles *on* (5%) y árboles *off* (8%). Posteriormente, y en ambos casos, el nivel de azúcares reductores adquirió valores cercanos al 4% en los que se mantuvo el resto del período de muestreo, mostrando un ligero descenso a partir del inicio de la brotación.

La pauta de variación estacional en el contenido de azúcares no reductores en hojas se presenta en la Figura 32C. En ambos tipos de árboles el contenido se mantuvo en torno a un 4-5%, entre junio y octubre, y aumentando hasta un 6-7% hasta febrero, sin mostrar diferencias entre ellos. Sin embargo, tras la antesis de las flores e inicio del cuajado, en los árboles *off*, que entraban en un año *on*, los azúcares no reductores se situaron por debajo que en los árboles que entraban en un año de baja producción.

Fig. 32 (pág. siguiente). Contenido en azúcares solubles (A), azúcares reductores (B) y azúcares no reductores (C) en hojas de brotes vegetativos de primavera de árboles on (●) y off (○) de naranjo 'Salustiana', expresado como % sobre materia seca. Cada valor es la media de 3 árboles diferentes, con 2 muestras por árbol. Las barras indican el error estándar de cada media. El asterisco () indica diferencias significativas entre árboles con diferente carga de fruto para $P \leq 0,05$, en esa fecha. Sin asterisco, no hay diferencias significativas. La línea discontinua vertical indica el momento de antesis de las flores; C: cosecha de los frutos.*

RESULTADOS



- *Contenido en carbohidratos en corteza y madera*

Se observó un patrón similar de variación de carbohidratos totales tanto en la corteza como en la madera de los brotes vegetativos de la última brotación, con un descenso en el contenido en carbohidratos desde el inicio del muestreo (octubre) hasta noviembre en madera y diciembre en corteza, para luego incrementarse hasta el inicio de la brotación. Estas variaciones en el contenido porcentual de carbohidratos totales fueron semejantes en árboles *on* y *off*, si bien en éstos últimos el contenido de carbohidratos sobre materia seca mostró frecuentemente valores superiores (Fig. 33; Tabla 19).

En árboles *off* el patrón de variación de almidón fue similar al de carbohidratos totales, y el incremento en carbohidratos metabolizables anterior a la brotación fue debido, en gran medida, a la acumulación de este carbohidrato. La fracción de azúcares solubles, si bien sufrió un incremento inicial desde final de octubre (madera) o noviembre (corteza), no tuvo un incremento adicional antes de la brotación.

En árboles *on* el patrón de variación de almidón fue también parecido al de carbohidratos metabolizables totales. Sin embargo, en estos árboles el contenido en azúcares solubles fue siempre mayor que el de almidón, y explica en gran medida el incremento en carbohidratos totales.

Fig. 33 (pág. siguiente). Contenido en las distintas fracciones de carbohidratos metabolizables en corteza y madera (% sobre materia seca) de brotes vegetativos de primavera de naranjo 'Salustiana', en árboles off (dcha., símbolos vacíos) y on (izda., símbolos llenos). Carbohidratos metabolizables totales (○,●), almidón (△,▲), azúcares solubles (◇,◆), azúcares reductores (+,+) y azúcares no reductores (□,■). Cada valor es la media de 3 árboles diferentes, con dos muestras por árbol. Las barras indican el error estándar de cada media.

RESULTADOS

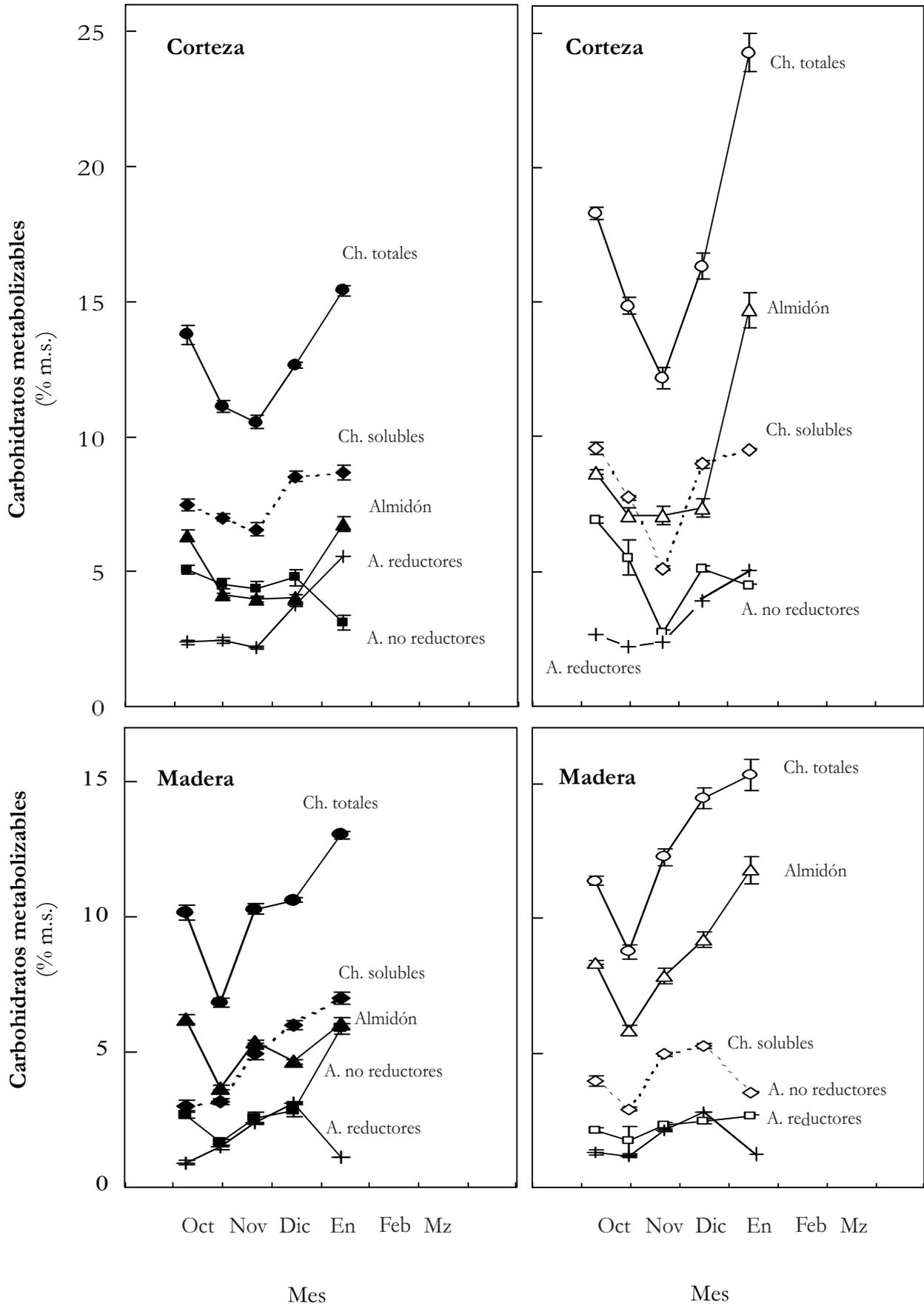


Tabla 19. Nivel de significación (P) de los análisis de varianza para el contenido de las distintas fracciones de carbohidratos (% sobre materia seca) en corteza y madera de brotes de la última brotación en árboles de naranjo 'Salustiana'. Influencia de la presencia del fruto y de la fecha de muestreo.

Corteza

| Fuente de variación | Carbohidratos totales | Almidón | Azúcares solubles | Azúcares reductores | Azúcares no reductores |
|---------------------|--------------------------|---------|----------------------|------------------------|------------------------------|
| FECHA | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| FRUTO | 0,000 | 0,000 | 0,059 | 0,838 | 0,035 |
| FECHA * FRUTO | 0,001 | 0,000 | 0,001 | 0,159 | 0,000 |

Madera

| Fuente de variación | Carbohidratos totales | Almidón | Azúcares solubles | Azúcares reductores | Azúcares no reductores |
|---------------------|--------------------------|---------|----------------------|------------------------|---------------------------|
| FECHA | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| FRUTO | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| FECHA * FRUTO | 0,001 | 0,000 | 0,000 | 0,981 | 0,000 |

4. EMPLEO DE TÉCNICAS DE RAYADO PARA ESTUDIAR LA INFLUENCIA DE LA CARGA DEL ÁRBOL SOBRE LA BROTAÇÃO, FLORACIÓN Y CUAJADO EN RELACIÓN A LOS NIVELES DE CARBOHIDRATOS

4.1. Rayado de árboles completos

Se llevaron a cabo diferentes tratamientos de rayado con el objetivo de comprobar si las variaciones observadas en los niveles de carbohidratos entre árboles con alta y baja carga de fruto podrían estar relacionadas con las diferencias en floración que presentan estos árboles y, asimismo, determinar si la modificación de estos niveles durante la transición floral podrían influir en las características de la brotación posterior.

Se realizaron tratamientos de rayado en todas las ramas principales de árboles adultos de naranjo 'Salustiana' seleccionados por su elevada presencia de fruto (árboles *on*) o por su escasa o nula carga de fruto (árboles *off*). Lotes de 3 árboles cada uno se rayaron el 2 de junio de 1999, el 6 de octubre de 2000 y el 17 de noviembre de 2000. Un lote de 6 árboles se rayó el 8 de septiembre de 2003. Cada año, se seleccionó un número igual de árboles a los tratados para ser utilizados como control, tanto *on* como *off*. En la primavera posterior a cada tratamiento, se caracterizó la brotación y la floración de cada árbol en un mínimo de 500 nudos de las dos últimas brotaciones, por árbol. Posteriormente, se controló la abscisión de flores y frutos en cada árbol y se recolectaron los frutos en el momento de la cosecha.

Desde la fecha de los diferentes tratamientos de rayado realizados sobre árboles completos, se tomaron muestras periódicas de brotes vegetativos de primavera para analizar el contenido en carbohidratos metabolizables en hojas. Para ello, se seleccionaron brotes vegetativos de primavera distribuidos uniformemente a una altura media de la copa. Una vez en laboratorio, se obtuvieron dos muestras por árbol, constituidas cada una de ellas por unas 20 hojas, una por brote, de posición intermedia. El contenido en carbohidratos de la corteza y la madera de estos brotes se analizaron tras los tratamientos de rayado del año 2000.

- *Efecto del rayado de árboles completos sobre la brotación y la floración de la primavera siguiente*

El efecto del rayado de árboles de ‘Salustiana’ sobre las características de la brotación y la floración en la primavera siguiente dependió de la fecha en que se efectuó, de la carga productiva del árbol y de la edad de las yemas (Tablas 20 a 27).

La intensidad de brotación (porcentaje de nudos brotados) no varió de forma importante tras los tratamientos de rayado (Tabla 20). En los árboles *on* sólo aumentó ligeramente el porcentaje de nudos brotados tras el rayado de junio (28 *vs* 23%; $P \leq 0,029$), mientras que no varió significativamente cuando los tratamientos se realizaron en fechas posteriores (septiembre, octubre y noviembre).

Por el contrario, el porcentaje de brotación en árboles *off* disminuyó tras el rayado de junio en las yemas de 2 años de edad (15 *vs* 21%; $P \leq 0,001$), mientras que los rayados posteriores no resultaron significativos. En estos árboles, la práctica del rayado no tuvo efectos destacables en la madera de 1 año de edad.

RESULTADOS

Tabla 20. Porcentaje de nudos brotados en árboles de naranjo ‘Salustiana’ on y off rayados en diferentes fechas, en la brotación de la primavera siguiente. Los datos son las medias de 3 a 6 árboles. En cada árbol se observó la brotación de unos 500 nudos. Letras diferentes en la misma columna y experimento indican diferencias estadísticas al 95% para un mismo tipo de árbol y madera según el test de Duncan. NS: no hay diferencias significativas. Los análisis se realizaron utilizando la transformación $\arcsen\sqrt{x}$, siendo x el porcentaje de nudos brotados.

| Carga de fruto en la cosecha anterior | TRATAMIENTO DE RAYADO | Edad de la madera | | TOTAL (Media ponderada) |
|---|--------------------------|-------------------|---------|----------------------------|
| | | 1 año | 2 años | |
| Árboles on | Control | 27,4 NS | 11,2 NS | 22,9 b |
| | Rayado 2 jun | 32,2 | 13,0 | 27,6 a |
| | Control | 24,7 NS | 14,5 NS | 21,7 NS |
| | Rayado 8 sept | 30,2 | 9,9 | 23,4 |
| | Control | 30,6 NS | 15,2 NS | 26,7 NS |
| | Rayado 6 oct | 21,7 | 6,1 | 18,5 |
| | Rayado 17 nov | 21,6 | 6,1 | 19,8 |
| Árboles off | Control | 64,4 NS | 21,4 a | 50,6 NS |
| | Rayado 2 jun | 71,6 | 15,3 b | 55,6 |
| | Control | 65,8 NS | 26,8 NS | 55,8 NS |
| | Rayado 8 sept | 71,5 | 31,5 | 58,6 |
| | Control | 73,0 NS | 30,9 NS | 62,4 NS |
| | Rayado 6 oct | 65,6 | 43,5 | 59,7 |
| | Rayado 17 nov | 72,5 | 44,3 | 65,7 |

En cuanto al número de brotes obtenidos en 100 nudos, la tendencia fue similar a la observada para el porcentaje de brotación (Tabla 21), ya que los tratamientos de rayado no tuvieron efecto sobre el número de brotes por nudo brotado, valor que se mantuvo cercano a 1,1 en cualquier caso. Sólo difirió de este comportamiento el incremento en el número de brotes en árboles *off* tras rayar en junio (77 *vs* 70 brotes en 100 nudos; $P \leq 0,050$) en la madera de 1 año, y tras rayar en septiembre, en la madera de 2 años (33 *vs* 21 brotes en 100 nudos; $P \leq 0,045$). No obstante, considerando en conjunto el número de brotes en 100 nudos, no se observó efecto del rayado sobre este parámetro.

a) Brotación vegetativa

En árboles *on*, la brotación vegetativa aumentó ligeramente tras el rayado de junio (27 *vs* 23 brotes en 100 nudos $P \leq 0,040$) y disminuyó en un 50% tras el rayado de septiembre en la madera de 1 año (12 *vs* 26 brotes en 100 nudos; $P \leq 0,029$; Tabla 22; Fig. 34). El número de hojas formadas en cada brote fue ligeramente mayor en los árboles rayados en esta fecha (7 *vs* 6 hojas por brote; $P \leq 0,039$). En la madera de 2 años, cuya brotación vegetativa fue mucho menor, la disminución que se observó tras rayar en septiembre no fue significativa.

Hay que destacar que en ambos tipos de madera de los árboles *on* existió una correlación lineal entre el porcentaje de brotación y el número de brotes vegetativos en árboles no rayados ($r = 0,99^{**}$; Fig. 34). Sin embargo, tras el rayado de septiembre se observó una correlación negativa entre estos dos parámetros, tanto para madera de 1 año ($r = 0,85^*$) como para madera de 2 años ($r = 0,76^*$).

En árboles *off*, con un número de brotes vegetativos por 100 nudos muy bajo, aumentó este parámetro tras el rayado de junio en la madera de 1 año (13 *vs* 3 brotes vegetativos en 100 nudos; $P \leq 0,001$), aunque no en la de 2 años. Los rayados posteriores a junio no tuvieron efecto. En ningún caso los rayados variaron el número de hojas formadas por brote vegetativo (6 hojas por brote).

En árboles *off* no se observaron correlaciones significativas entre la intensidad de brotación y el número de brotes vegetativos tras el rayado de septiembre.

RESULTADOS

Tabla 21. Número de brotes en 100 nudos en árboles de naranjo 'Salustiana' on y off rayados en diferentes fechas, en la brotación de la primavera siguiente. Los datos son las medias de 3 a 6 árboles. En cada árbol se observó la brotación de unos 500 nudos. Letras diferentes en la misma columna y experimento indican diferencias estadísticas al 95% para un mismo tipo de árbol y madera según el test de Duncan. NS: no hay diferencias significativas.

| Carga de fruto en la cosecha anterior | TRATAMIENTO DE RAYADO | Edad de la madera | | TOTAL (Media ponderada) |
|---|--------------------------|-------------------|---------|----------------------------|
| | | 1 año | 2 años | |
| Árboles on | Control | 28,0 NS | 11,3 NS | 23,4 b |
| | Rayado 2 jun | 32,7 | 13,0 | 28,0 a |
| | Control | 26,4 NS | 6,4 NS | 19,3 |
| | Rayado 8 sept | 28,5 | 10,4 | 22,6 |
| | Control | 30,9 NS | 15,7 NS | 27,1 NS |
| | Rayado 6 oct | 22,0 | 6,0 | 18,7 |
| | Rayado 17 nov | 21,6 | 6,1 | 19,8 |
| Árboles off | Control | 69,5 b | 22,3 a | 54,3 NS |
| | Rayado 2 jun | 77,4 a | 16,2 b | 60,0 |
| | Control | 66,2 NS | 21,0 b | 54,0 NS |
| | Rayado 8 sept | 72,8 | 32,7 a | 59,9 |
| | Control | 78,7 NS | 32,4 NS | 66,9 NS |
| | Rayado 6 oct | 69,4 | 43,5 | 62,5 |
| | Rayado 17 nov | 82,4 | 45,0 | 73,2 |

Tabla 22. Número de brotes vegetativos en 100 nudos en árboles de naranjo 'Salustiana' on y off rayados en diferentes fechas, en la brotación de la primavera siguiente. Los datos son las medias de 3 a 6 árboles. En cada árbol se observó la brotación de unos 500 nudos. Letras diferentes en la misma columna y experimento indican diferencias estadísticas al 95% para un mismo tipo de árbol y madera según el test de Duncan. NS: no hay diferencias significativas.

| Carga de fruto en la cosecha anterior | | Edad de la madera | | |
|---|---------------|-------------------|---------|----------------------------|
| | | 1 año | 2 años | TOTAL (Media ponderada) |
| Árboles on | Control | 27,1 NS | 10,9 NS | 22,6 b |
| | Rayado 2 jun | 31,4 | 12,8 | 27,0 a |
| | Control | 25,7 a | 7,1 NS | 19,1 a |
| | Rayado 8 sept | 11,9 b | 4,2 | 10,6 b |
| | Control | 26,4 NS | 15,2 NS | 23,5 NS |
| | Rayado 6 oct | 21,3 | 6,1 | 18,1 |
| | Rayado 17 nov | 19,5 | 4,4 | 17,7 |
| Árboles off | Control | 3,4 b | 3,9 NS | 3,6 b |
| | Rayado 2 jun | 13,4 a | 4,8 | 11,0 a |
| | Control | 3,2 NS | 1,8 NS | 2,7 NS |
| | Rayado 8 sept | 3,6 | 1,2 | 3,0 |
| | Control | 7,3 NS | 3,5 NS | 6,4 NS |
| | Rayado 6 oct | 5,7 | 1,2 | 4,6 |
| | Rayado 17 nov | 5,3 | 3,2 | 4,7 |

RESULTADOS

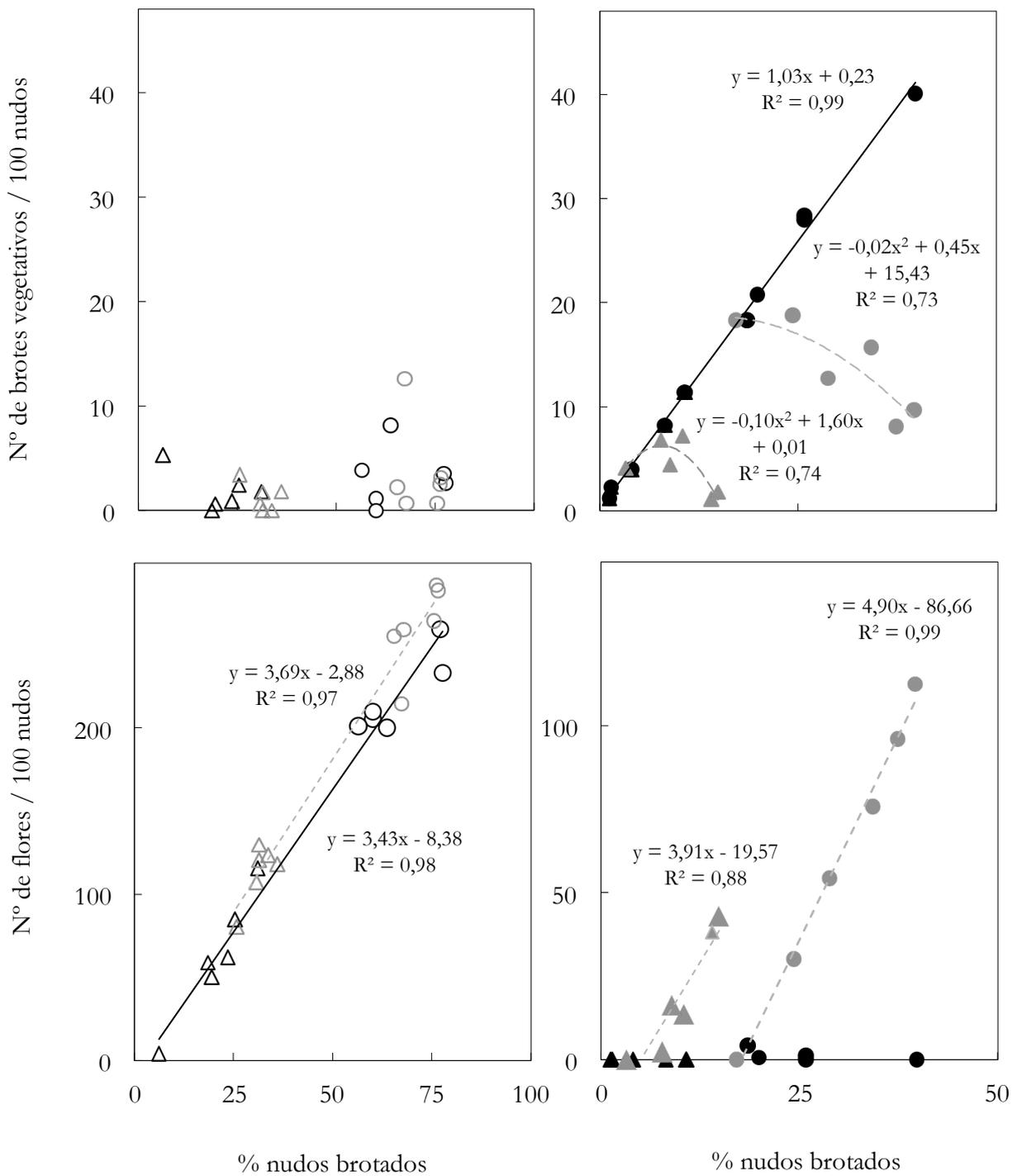


Fig. 34. Relación de la brotación vegetativa (arriba) y de la floración (abajo) con el porcentaje de nudos brotados en yemas de 1 año de edad (círculos) y de 2 años de edad (triángulos) en árboles de naranjo 'Salustiana' rayados el 8 de septiembre (gris) y control (negro). Datos individuales de árboles seleccionados por su alta producción (on, símbolos llenos, dcha.) y por su baja producción (off, símbolos vacíos, izda.) en el año anterior. Se indica la línea de regresión y su coeficiente de determinación (R²) para cada tratamiento en el caso de ser significativa.

b) Floración

Los efectos de los tratamientos de rayado sobre la floración fueron marcadamente diferentes (prácticamente inversos) a aquellos observados sobre la brotación vegetativa. El rayado en septiembre incrementó el porcentaje de nudos con brotes reproductivos, y de forma más acusada en los árboles *on* (12,8 *vs* 0,5%; $P \leq 0,010$), en los dos tipos de madera (Tabla 23). Efectuando el rayado en otras fechas, este porcentaje se mantuvo a niveles muy bajos, entre el 0 y el 2%, en ambos tipos de madera.

En árboles *off* hubo un efecto positivo del rayado de septiembre (56 *vs* 49% de nudos con brotes reproductivos; $P \leq 0,020$), sobretodo en la madera de 2 años, que incrementó en más del 60% el porcentaje de nudos con flores (31 *vs* 9%; $P \leq 0,001$). Los rayados efectuados en octubre y noviembre no tuvieron efecto significativo.

El número de flores en 100 nudos se vio afectado exclusivamente por el rayado en el mes de septiembre (Tabla 24; Fig. 34), que incrementó significativamente este parámetro tanto en árboles *on* (48 *vs* 1 flores en 100 nudos; $P \leq 0,001$) como en *off* (213 *vs* 177 flores en 100 nudos; $P \leq 0,010$). El efecto, en términos relativos, fue mucho más acusado en árboles *on*.

En árboles *on*, tras el rayado de septiembre, hubo una correlación positiva entre el número de flores y el porcentaje de brotación que no existió en el control (Fig. 34), más acusada en la madera de 1 año de edad ($r=0,99^{**}$) que en la de 2 años ($r=0,94^{**}$). En los árboles *off* rayados en septiembre, la correlación entre número de flores y porcentaje de brotación fue algo superior a la mostrada por los árboles control.

En cuanto el tipo de brotes reproductivos formados, en los árboles *on* rayados en septiembre, con muy poca floración, no se pudieron constatar diferencias con los controles por la baja floración de los últimos (Fig. 35). Los brotes generativos multiflorales fueron los más abundantes en las yemas de 1 año, mientras que en la madera de 2 años no hubo diferencias entre los distintos tipos de brotes formados. El número de flores en los brotes generativos multiflorales formados se mantuvo en 4 flores por brote independientemente de la edad de las yemas.

RESULTADOS

Tabla 23. Porcentaje de nudos con brotes reproductivos en árboles de naranjo 'Salustiana' on y off rayados en diferentes fechas, en la brotación de la primavera siguiente. Los datos son las medias de 3 a 6 árboles. En cada árbol se observó la brotación de unos 500 nudos. Letras diferentes en la misma columna y experimento indican diferencias estadísticas al 95% para un mismo tipo de árbol y madera según el test de Duncan. NS: no hay diferencias significativas. Los análisis se realizaron utilizando la transformación $\arcsen\sqrt{x}$, siendo x el porcentaje de nudos brotados.

| Carga de fruto en la cosecha anterior | | Edad de la madera | | |
|---|--------------------------|-------------------|---------|----------------------------|
| | | 1 año | 2 años | TOTAL (Media ponderada) |
| | TRATAMIENTO DE RAYADO | | | |
| Árboles on | Control | 0,8 NS | 0,4 NS | 0,7 NS |
| | Rayado 2 jun | 1,3 NS | 0,2 | 1,0 |
| | Control | 0,7 b | 0,0 b | 0,5 b |
| | Rayado 8 sept | 16,6 a | 5,2 a | 12,8 a |
| | Control | 4,4 NS | 0,5 NS | 3,5 NS |
| | Rayado 6 oct | 0,7 | 0,0 | 0,6 |
| | Rayado 17 nov | 2,0 | 1,7 | 2,1 |
| Árboles off | Control | 61,0 NS | 18,9 NS | 47,4 NS |
| | Rayado 2 jun | 59,8 | 10,6 | 45,8 |
| | Control | 60,2 NS | 8,9 b | 49,2 b |
| | Rayado 8 sept | 67,7 | 31,0 a | 55,8 a |
| | Control | 65,9 NS | 27,6 NS | 56,2 NS |
| | Rayado 6 oct | 60,7 | 42,5 | 55,7 |
| | Rayado 17 nov | 70,6 | 41,1 | 63,6 |

Tabla 24. Número de flores en 100 nudos en árboles de naranjo ‘Salustiana’ on y off rayados en diferentes fechas, en la brotación de la primavera siguiente. Los datos son las medias de 3 a 6 árboles. En cada árbol se observó la brotación de unos 500 nudos. Letras diferentes en la misma columna y experimento indican diferencias estadísticas al 95% para un mismo tipo de árbol y madera según el test de Duncan. NS: no hay diferencias significativas.

| Carga de fruto en la cosecha anterior | | Edad de la madera | | |
|---|--------------------------|-------------------|---------|----------------------------|
| | | 1 año | 2 años | TOTAL (Media ponderada) |
| Árboles on | TRATAMIENTO DE RAYADO | | | |
| | Control | 1,5 NS | 0,5 NS | 1,2 NS |
| | Rayado 2 jun | 2,5 | 0,7 | 2,0 |
| | Control | 1,7 b | 0,0 b | 1,2 b |
| | Rayado 8 sept | 61,5 a | 18,9 a | 47,7 a |
| | Control | 11,6 NS | 2,2 NS | 9,5 NS |
| | Rayado 6 oct | 1,0 | 0,0 | 0,8 |
| Rayado 17 nov | 5,9 | 3,9 | 5,7 | |
| Árboles off | Control | 211,8 NS | 48,6 NS | 159,7 NS |
| | Rayado 2 jun | 189,7 | 37,9 | 146,6 |
| | Control | 218,0 b | 62,4 b | 177,1 b |
| | Rayado 8 sept | 260,2 a | 113,2 a | 212,8 a |
| | Control | 211,2 NS | 78,3 NS | 176,8 NS |
| | Rayado 6 oct | 209,3 | 144,0 | 191,8 |
| | Rayado 17 nov | 273,1 | 142,4 | 240,5 |

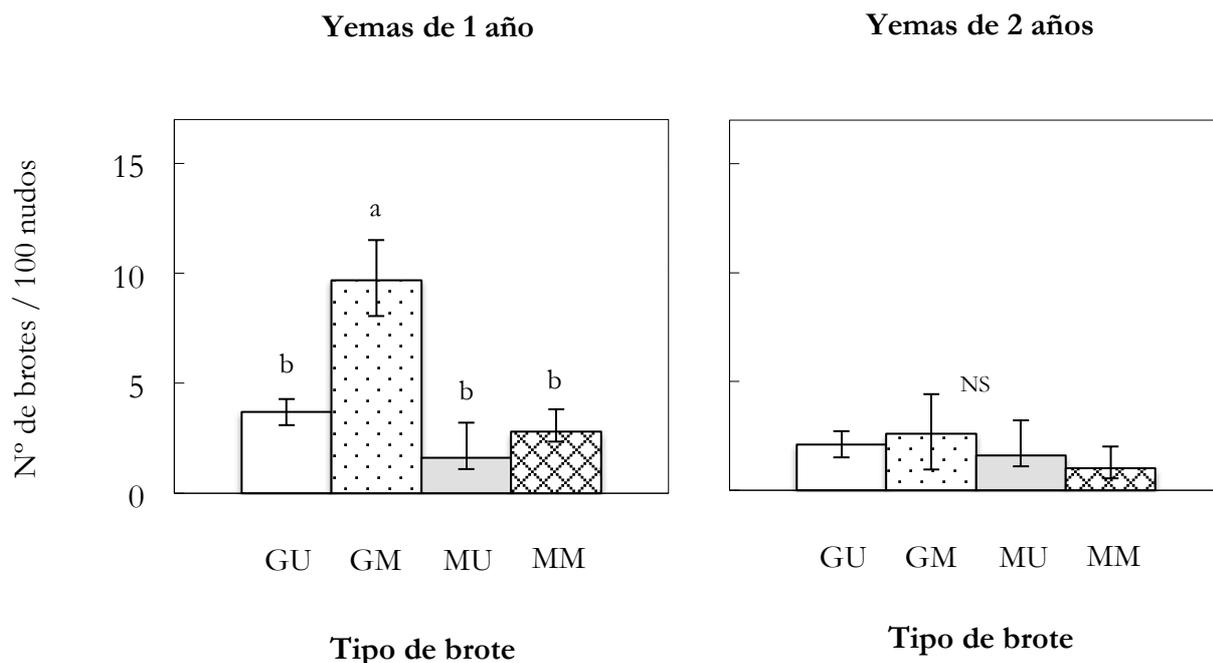


Fig. 35. Distribución de los tipos de brotes reproductivos formados en la brotación de primavera tras el rayado de septiembre de árboles on (en la cosecha anterior) de naranjo ‘Salustiana’, en función de la edad de las yemas. GU=Brotes generativos uniflorales; GM=Brotes generativos multiflorales; MU=Brotes mixtos uniflorales; MM=Brotes mixtos multiflorales. Los valores son la media de la brotación de primavera de 6 árboles. Para cada año, se observó la brotación de unos 500 nudos por árbol. Las barras indican el error estándar de cada media. Letras diferentes entre tipos de brotes indican diferencias estadísticas con un nivel de significación del 95% según el test de Duncan. NS: no hay diferencias significativas.

En los árboles *off*, el aumento de la floración tras el rayado de septiembre se debió únicamente al incremento en un tipo de brotes reproductivos, los brotes generativos (sin hojas; Tablas 26 y 27) y concretamente los brotes generativos multiflorales (Fig. 36) en ambos tipos de madera. El incremento en el número de brotes generativos multiflorales vino acompañado por un ligero aumento, aunque significativo, en el número de flores por brote en las yemas de 1 año de edad (4,4 vs 3,7 flores por brote multifloral; $P \leq 0,032$), aunque no en las yemas de 2 años (4 flores por brote generativo multifloral).

Tabla 25. Número de brotes reproductivos en 100 nudos en árboles de naranjo 'Salustiana' on y off rayados en diferentes fechas, en la brotación de la primavera siguiente. Los datos son las medias de 3 a 6 árboles. En cada árbol se observó la brotación de unos 500 nudos. Letras diferentes en la misma columna y experimento indican diferencias estadísticas al 95% para un mismo tipo de árbol y madera según el test de Duncan. NS: no hay diferencias significativas.

| Carga de fruto en la cosecha anterior | | Edad de la madera | | |
|---|--------------------------|-------------------|---------|----------------------------|
| | | 1 año | 2 años | TOTAL (Media ponderada) |
| | TRATAMIENTO DE RAYADO | | | |
| Árboles on | Control | 0,9 NS | 0,4 NS | 0,7 NS |
| | Rayado 2 jun | 1,3 | 0,2 | 1,0 |
| | Control | 0,7 b | 0,0 b | 0,5 b |
| | Rayado 8 sept | 17,8 a | 7,3 a | 14,2 a |
| | Control | 4,5 NS | 0,5 NS | 3,6 NS |
| | Rayado 6 oct | 0,8 | 0,0 | 0,6 |
| | Rayado 17 nov | 2,0 | 1,7 | 2,1 |
| Árboles off | Control | 66,1 NS | 18,4 NS | 50,7 NS |
| | Rayado 2 jun | 64,0 | 11,4 | 49,1 |
| | Control | 63,0 NS | 19,0 b | 51,3 b |
| | Rayado 8 sept | 69,1 | 31,5 a | 56,9 a |
| | Control | 71,4 NS | 28,9 NS | 60,4 NS |
| | Rayado 6 oct | 56,8 | 35,9 | 51,2 |
| | Rayado 17 nov | 77,1 | 41,8 | 68,5 |

RESULTADOS

Tabla 26. Número de brotes mixtos (con flores y hojas) en 100 nudos en árboles de naranjo 'Salustiana' on y off rayados en diferentes fechas, en la brotación de la primavera siguiente. Los datos son las medias de 3 a 6 árboles. En cada árbol se observó la brotación de unos 500 nudos. Letras diferentes en la misma columna y experimento indican diferencias estadísticas al 95% para un mismo tipo de árbol y madera según el test de Duncan. NS: no hay diferencias significativas.

| Carga de fruto en la cosecha anterior | | Edad de la madera | | |
|---|---------------|-------------------|--------|----------------------------|
| | | 1 año | 2 años | TOTAL (Media ponderada) |
| TRATAMIENTO DE RAYADO | | | | |
| Árboles on | Control | 0,5 NS | 0,3 NS | 0,4 NS |
| | Rayado 2 jun | 1,0 | 0,2 | 0,8 |
| | Control | 0,4 b | 0,0 b | 0,3 b |
| | Rayado 8 sept | 4,4 a | 2,6 a | 3,7 a |
| | Control | 2,3 NS | 0,5 NS | 1,9 NS |
| | Rayado 6 oct | 0,2 | 0,0 | 0,2 |
| | Rayado 17 nov | 0,5 | 0,0 | 0,4 |
| Árboles off | Control | 29,8 NS | 7,4 NS | 22,7 NS |
| | Rayado 2 jun | 29,9 | 5,3 | 23,0 |
| | Control | 13,4 NS | 2,9 NS | 10,5 NS |
| | Rayado 8 sept | 13,9 | 3,5 | 10,8 |
| | Control | 21,4 a | 4,4 NS | 17,2 a |
| | Rayado 6 oct | 11,2 b | 5,8 | 9,7 b |
| | Rayado 17 nov | 19,2 ab | 5,0 | 15,6 ab |

Tabla 27. Número de brotes generativos (sin hojas) en 100 nudos en árboles de naranjo 'Salustiana' on y off rayados en diferentes fechas, en la brotación de la primavera siguiente. Los datos son las medias de 3 a 6 árboles. En cada árbol se observó la brotación de unos 500 nudos. Letras diferentes en la misma columna y experimento indican diferencias estadísticas al 95% para un mismo tipo de árbol y madera según el test de Duncan. NS: no hay diferencias significativas.

| Carga de fruto en la cosecha anterior | | Edad de la madera | | |
|---|--------------------------|-------------------|---------|----------------------------|
| | | 1 año | 2 años | TOTAL (Media ponderada) |
| | TRATAMIENTO DE RAYADO | | | |
| Árboles on | Control | 0,4 NS | 0,1 NS | 0,3 NS |
| | Rayado 2 jun | 0,3 | 0,0 | 0,2 |
| | Control | 0,3 b | 0,0 b | 0,2 b |
| | Rayado 8 sept | 13,4 a | 4,7 a | 10,5 a |
| | Control | 2,2 NS | 0,0 NS | 1,7 NS |
| | Rayado 6 oct | 0,5 | 0,0 | 0,4 |
| | Rayado 17 nov | 1,5 | 1,7 | 1,6 |
| Árboles off | Control | 36,4 NS | 11,0 NS | 28,1 NS |
| | Rayado 2 jun | 34,1 | 6,0 | 26,1 |
| | Control | 49,6 NS | 16,2 b | 40,9 NS |
| | Rayado 8 sept | 55,2 | 28,0 a | 46,2 |
| | Control | 49,9 NS | 24,5 NS | 43,2 NS |
| | Rayado 6 oct | 45,6 | 30,0 | 41,5 |
| | Rayado 17 nov | 57,9 | 36,8 | 52,9 |

RESULTADOS

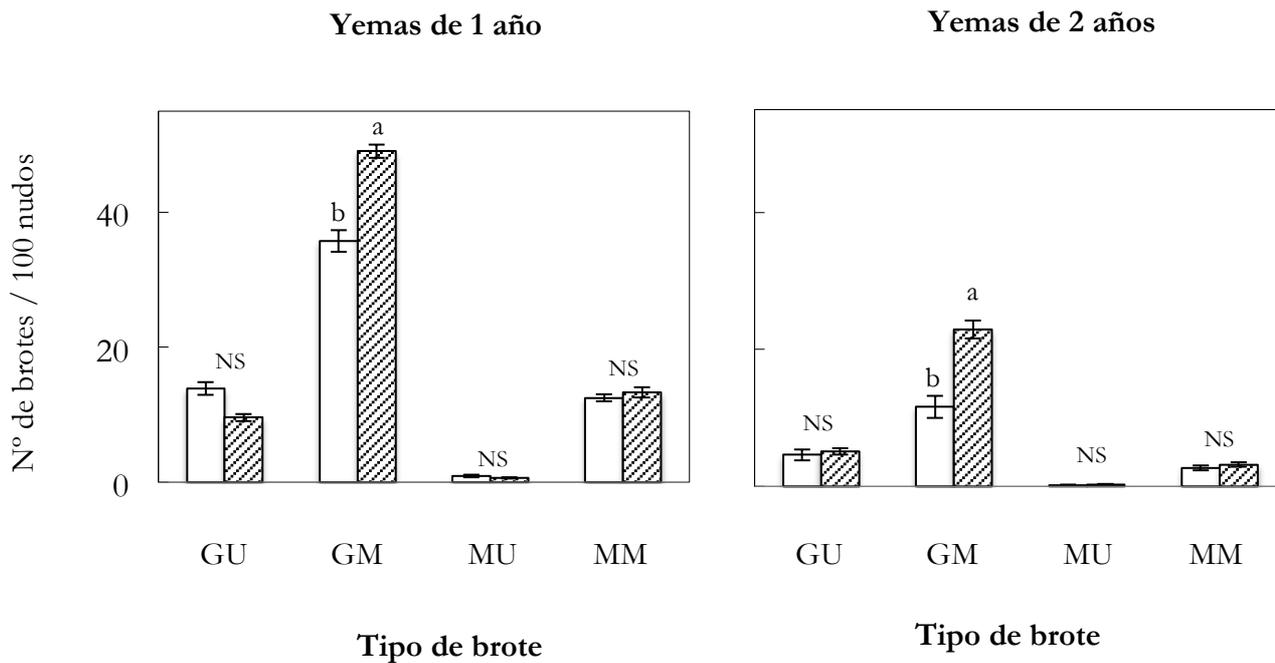


Fig. 36. Distribución de los tipos de brotes reproductivos formados en la brotación de primavera tras el rayado de septiembre de árboles off (en la cosecha anterior) de naranjo 'Salustiana', en función de la edad de las yemas. Columnas blancas, árboles control y columnas con trama, árboles rayados. GU=Brotes generativos uniflorales; GM=Brotes generativos multiflorales; MU=Brotes mixtos uniflorales; MM=Brotes mixtos multiflorales. Medias de 6 árboles. Los valores son la media de la brotación de primavera de 6 árboles. Para cada año, se observó la brotación de unos 500 nudos por árbol. Las barras indican el error estándar de cada media. Letras diferentes entre tipos de brotes indican diferencias estadísticas con un nivel de significación del 95% según el test de Duncan. NS: no hay diferencias significativas.

- *Efecto del rayado de árboles completos sobre el desarrollo del fruto en la misma campaña de producción*

El rayado no influyó positivamente ni en el número de frutos cosechados (Tabla 28) ni en el peso total recolectado por árbol (Tabla 29) en la misma campaña de producción en que se efectuó el tratamiento (Fig. 37).

El rayado realizado en junio, tras la caída fisiológica de flores y frutitos, tampoco afectó al tamaño del fruto (Tabla 30), el cual estuvo principalmente relacionado con el número de frutos cosechados por árbol independientemente de la fecha en que se efectuó el rayado ($r=0,87^*$; Fig. 37).

Tabla 28. Número de frutos por árbol cosechados en la misma campaña de producción de los tratamientos de rayado de árboles completos de naranjo ‘Salustiana’ on y off. Los valores son las medias de 3 a 6 árboles. Letras diferentes en la misma columna y experimento indican diferencias estadísticas al 95% para un mismo tipo de árbol y madera según el test de Duncan. NS: no hay diferencias significativas.

| TRATAMIENTO DE RAYADO | Árboles <i>on</i> (n° frutos /árbol) | Árboles <i>off</i> (n° frutos /árbol) |
|-----------------------|---|--|
| Control | 760 NS | 43 a |
| Rayado 2 jun | 943 | 0 b |
| Control | 444 NS | 157 NS |
| Rayado 8 sept | 781 | 218 |
| Control | 2124 NS | 336 NS |
| Rayado 6 oct | 1966 | 207 |
| Rayado 17 nov | 1679 | 97 |

RESULTADOS

Tabla 29. Peso de los frutos cosechados por árbol en de la misma campaña de producción de los tratamientos de rayado de árboles completos de naranjo 'Salustiana' on y off. Los valores son las medias de 3 a 6 árboles. Letras diferentes en la misma columna y experimento indican diferencias estadísticas al 95% para un mismo tipo de árbol y madera según el test de Duncan. NS: no hay diferencias significativas.

| TRATAMIENTO DE RAYADO | Árboles <i>on</i> (kg /árbol) | Árboles <i>off</i> (kg /árbol) |
|-----------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| Control | 105,7 NS | 12,8 a |
| Rayado 2 jun | 139,7 | 0 b |
| Control | 96,4 NS | 43,2 NS |
| Rayado 8 sept | 93,8 | 57,5 |
| Control | 199,3 NS | 43,0 NS |
| Rayado 6 oct | 258,3 | 46,8 |
| Rayado 17 nov | 170,8 | 26,8 |

Tabla 30. Resumen de los análisis de varianza para el efecto del rayado de árboles completos de naranjo 'Salustiana' on y off sobre el peso medio de fruto cosechado en la misma campaña de producción. Tratamiento de rayado en diferentes fechas (junio, septiembre, octubre y noviembre).

| Fuente de variación | | Suma de cuadrados | Grados de libertad | F | P |
|---------------------|--------|-------------------|--------------------|-------|-------|
| Árboles <i>on</i> | RAYADO | 10752 | 1 | 0,902 | 0,358 |
| | Error | 166874 | 14 | | |
| Árboles <i>off</i> | RAYADO | 53 | 1 | 0,011 | 0,920 |
| | Error | 44978 | 9 | | |

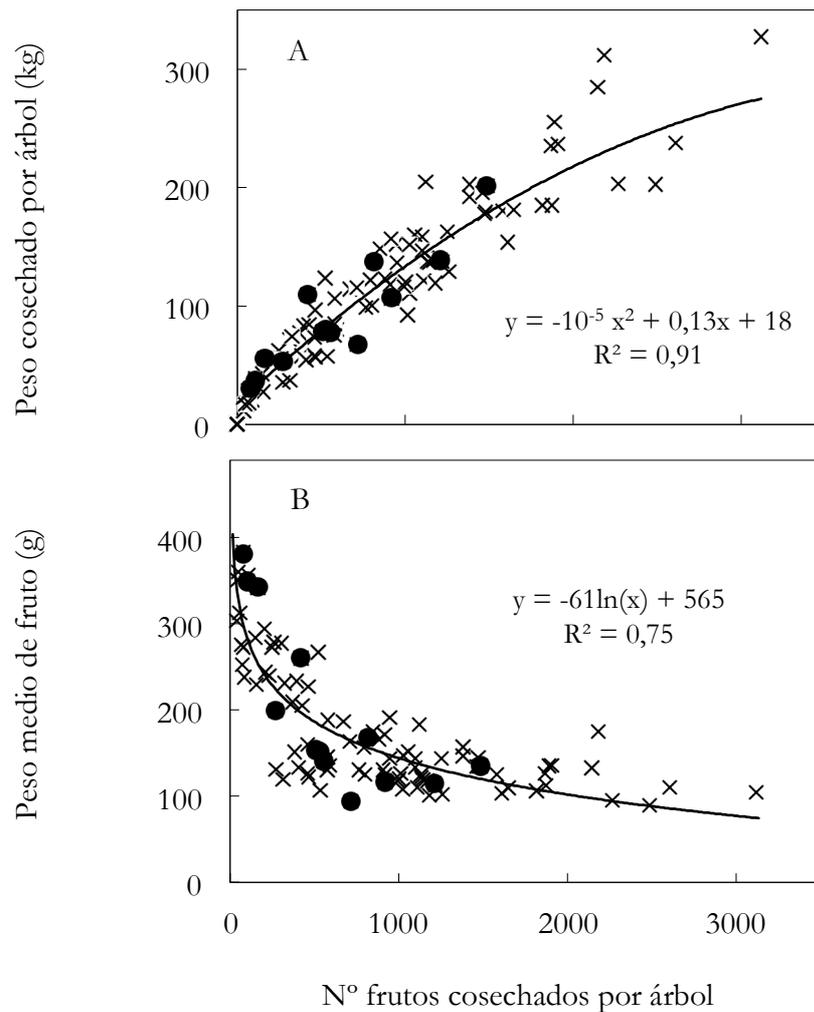


Fig. 37. Relación entre número de frutos por árbol con el peso de la cosecha por árbol (A) y con el peso fresco medio del fruto (B) de 4 años de producción diferentes en árboles control (●) y rayados (×) en todas las ramas principales del árbol, en diferentes fechas (junio, septiembre, octubre y noviembre). Se muestran las líneas de regresión en el caso de ser significativas, y sus coeficiente de determinación (R^2).

RESULTADOS

- *Efecto del rayado de árboles completos sobre la abscisión de estructuras reproductivas y el cuajado de fruto en la primavera siguiente*

El tratamiento de rayado, cuando se realizó en los meses de junio, octubre y noviembre, que no provocó el aumento de la floración, tampoco influyó sobre la abscisión de las flores formadas ni sobre el porcentaje de frutos cuajados (Tablas 31 y 32) en naranjo ‘Salustiana’. Tampoco tuvo efecto en el patrón de abscisión de las estructuras reproductivas a lo largo del período de caída de junio (Fig. 38) ni en el peso medio de los ovarios caídos (Fig. 39).

Sin embargo, cuando el rayado se realizó en septiembre, el incremento de la floración observado vino acompañado de cambios en la abscisión y cuajado de estas flores. Estos cambios dependieron de la carga del fruto.

Cuando se rayaron en septiembre árboles *on*, la caída acumulada al final de junio siguiente fue de unos 13000 ovarios por árbol, mientras que en los árboles control esta caída fue indetectable. En los árboles rayados se recolectaron alrededor de 980 frutos por árbol, lo que supuso un cuajado medio del 7% (Tabla 32). En los árboles control se recolectaron alrededor de 230 frutos por árbol y el cuajado observado se acercó al 100%. La pauta de abscisión en los árboles rayados mostró los dos máximos característicos de la caída de junio. Los dos máximos alcanzaron el mismo valor, cayendo 400 ovarios y frutitos por árbol en un día (Fig. 38).

Cuando los rayados en septiembre fueron los árboles *off*, no se observó un aumento en el número de órganos caídos en la primavera siguiente con respecto a los árboles control, dando valores similares en el porcentaje de cuajado.

Tabla 31. Efecto de los tratamientos de rayado sobre la abscisión acumulada por árbol (n° de ovarios y frutitos) al final de la caída del junio siguiente a los tratamientos de rayado de árboles completos de naranjo 'Salustiana' on y off. Los valores son las medias de 3 a 6 árboles según experimentos. Letras diferentes en la misma columna y experimento indican diferencias estadísticas al 95% para un mismo tipo de árbol y madera según el test de Duncan. NS: no hay diferencias significativas.

| TRATAMIENTO DE RAYADO | Árboles <i>on</i> (miles de frutos caídos) | Árboles <i>off</i> (miles de frutos caídos) |
|-----------------------|---|--|
| Control | 0,8 NS | 72,8 NS |
| Rayado 2 jun | 3,0 | 54,4 |
| Control | 0,0 b | 62,3 NS |
| Rayado 8 sept | 16,7 a | 66,2 |
| Control | 1,4 NS | 85,2 NS |
| Rayado 6 oct | 0,0 | 61,9 |
| Rayado 17 nov | 4,3 | 89,6 |

RESULTADOS

Tabla 32. Efecto de los tratamientos de rayado sobre el porcentaje de flores cuajadas en la siguiente campaña a los tratamientos de rayado de árboles completos de naranjo ‘Salustiana’ on y off. Los valores son las medias de 3 a 6 árboles según experimentos. Letras diferentes en la misma columna y experimento indican diferencias estadísticas al 95% para un mismo tipo de árbol y madera según el test de Duncan. NS: no hay diferencias significativas. Los análisis se realizaron utilizando la transformación $\arcsen\sqrt{x}$, siendo x el porcentaje de flores cuajadas.

| TRATAMIENTO DE RAYADO | Árboles <i>on</i> (% flores cuajadas) | Árboles <i>off</i> (% flores cuajadas) |
|-----------------------|--|---|
| Control | 66,7 NS | 3,0 NS |
| Rayado 2 jun | 67,4 | 3,7 |
| Control | 100,0 a | 3,5 NS |
| Rayado 8 sept | 7,0 b | 2,6 |
| Control | 47,4 NS | 2,2 NS |
| Rayado 6 oct | 100,0 | 2,8 |
| Rayado 17 nov | 37,6 | 1,5 |

Fig. 38 (pág. siguiente). Número de ovarios caídos por día y árbol en árboles off (○) y on (●) de naranjo ‘Salustiana’, rayados en diferentes fechas en todas sus ramas principales. Árboles control con línea continua y árboles rayados con línea discontinua. Rayado realizado en la fecha indicada. Se consideró el 1 de marzo como día de inicio de antesis. Los datos son medias de 3 a 6 árboles. Las barras indican el error estándar de cada media.

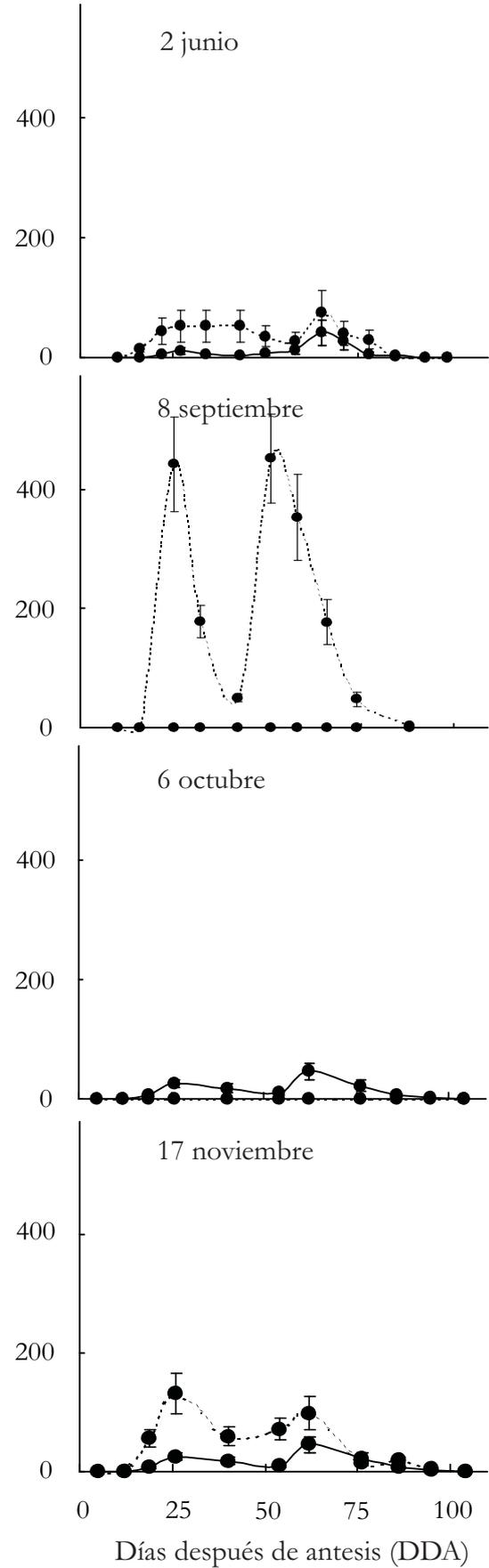
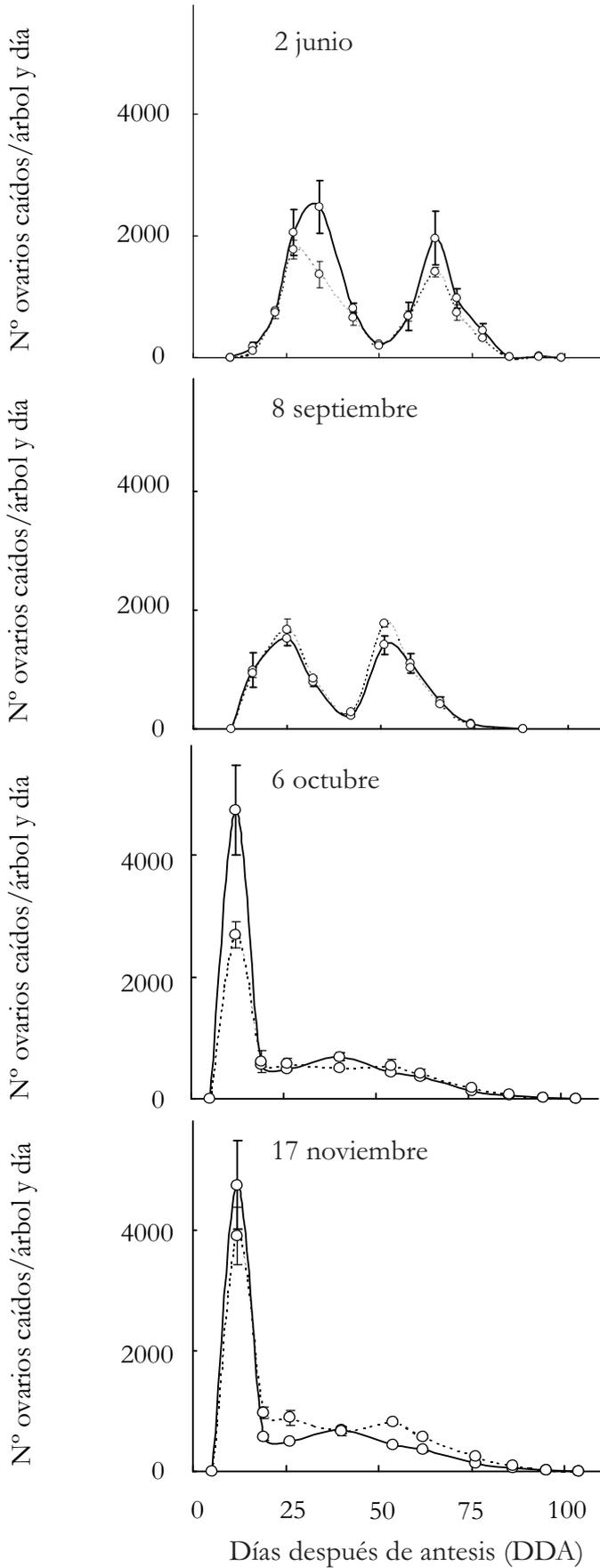
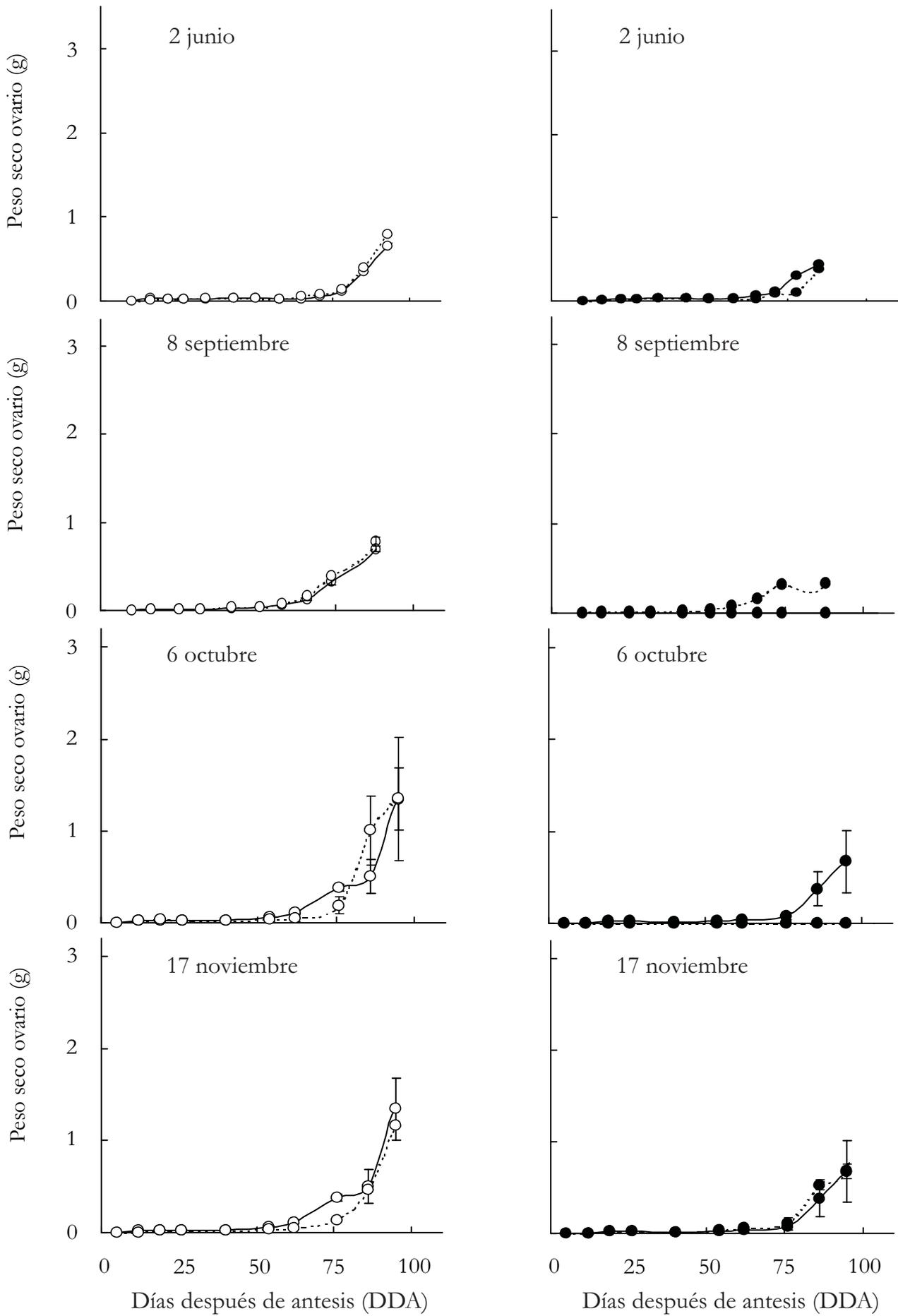


Fig. 39 (pág. siguiente). Peso seco medio de ovarios y frutos caídos en árboles off (○) y on (●) de naranjo 'Salustiana', rayados en diferentes fechas en todas sus ramas principales. Árboles control con línea continua y árboles rayados con línea discontinua. Rayado realizado en la fecha indicada. Se consideró el 1 de marzo como día de inicio de antesis. Los datos son medias de 3 a 6 árboles. Las barras indican el error estándar de cada media.



- *Efecto del rayado de árboles completos sobre el contenido en carbohidratos*

La influencia del rayado sobre el contenido de carbohidratos en hojas de naranjo ‘Salustiana’ dependió de la fecha en que se efectuó el tratamiento y de la carga de fruto en el árbol. La acumulación de carbohidratos fue mayor en árboles *off* que en árboles *on* (Fig. 40).

Cuando tuvo lugar, la acumulación ya fue observable tras 15 días de realizar el rayado. La fracción de carbohidratos afectada, la cantidad acumulada y la transitoriedad del efecto variaron en función de la fecha en que se efectuó el tratamiento y de la carga del árbol (Figs. 41 a 44). La acumulación de carbohidratos en hojas fue máxima de 6 a 9 semanas después de realizar el rayado, con la excepción de un gran incremento puntual en azúcares no reductores en febrero en árboles *on* que se rayaron en octubre y en noviembre. Las diferencias con el control se mantuvieron generalmente hasta inmediatamente antes del inicio de la brotación.

El rayado en junio (Fig. 41) sólo tuvo efecto en el aumento de carbohidratos de árboles *off*, que incrementó los azúcares solubles, sobretodo los no reductores.

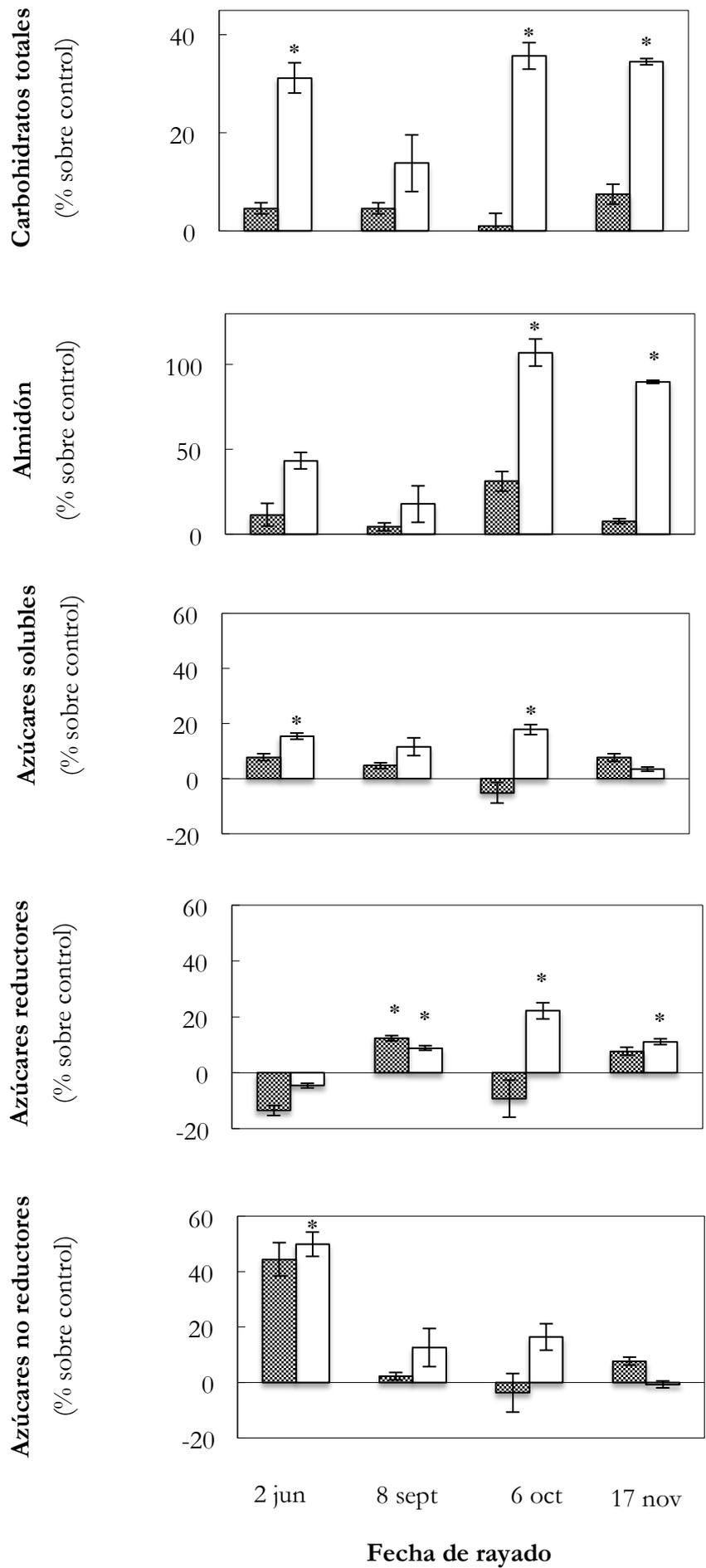
El rayado en septiembre en árboles *off* (Fig. 42) no varió significativamente el nivel de carbohidratos en los dos meses siguientes, con la excepción del efecto observado en los azúcares reductores, que incrementaron un 17% sobre el control. En árboles *on*, hubo un ligero, aunque significativo, aumento en todas las fracciones de carbohidratos, si bien el efecto más marcado se produjo de nuevo en los azúcares reductores.

El rayado en octubre (Fig. 43) aumentó todos los tipos de carbohidratos metabolizables en árboles *off*, sobretodo el almidón, que llegó a duplicarse. En árboles *on* el único aumento apreciable se produjo en el almidón, y de forma mucho más discreta.

El rayado en noviembre (Fig. 44) aumentó los carbohidratos sólo en los árboles *off*, principalmente el almidón y, en menor medida, los azúcares reductores.

Fig. 40 (pág siguiente). Acumulación en las distintas fracciones de carbohidratos metabolizables en hojas de brotes vegetativos en árboles on (columnas en gris) y árboles off (columnas en blanco) de naranjo 'Salustiana' rayados en diferentes fechas. Los resultados se expresan como incrementos porcentuales sobre el contenido en carbohidratos de los árboles control, a las 6 a 9 semanas tras el rayado. Los valores son las medias de 3 a 6 árboles, con 2 muestras por árbol. Las barras indican el error estándar de cada media. El asterisco (*) indica diferencias estadísticamente significativas con los árboles control para $P \leq 0,05$. Sin asterisco, no hay significación estadística.

RESULTADOS



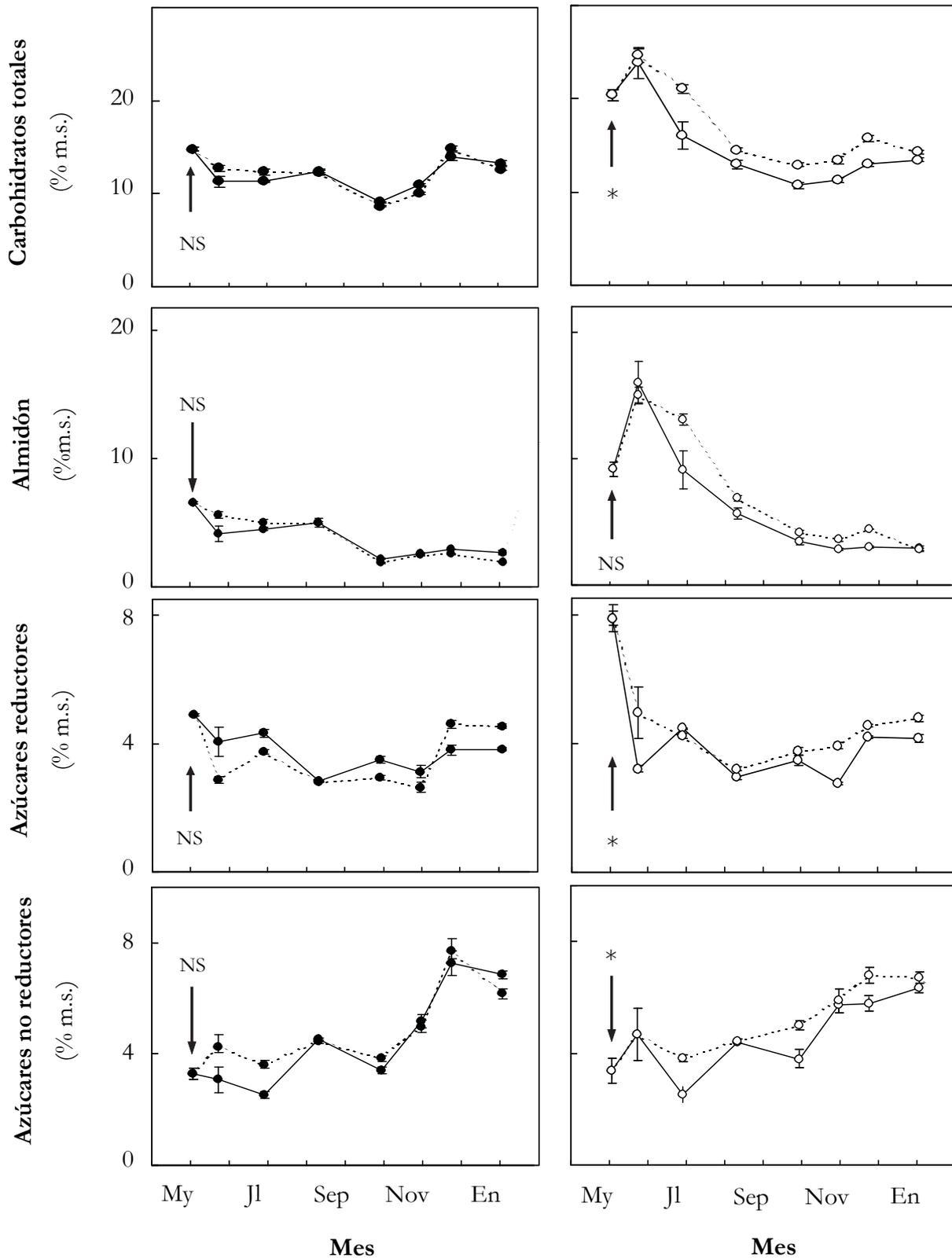


Fig. 41. Contenido en las distintas fracciones de carbohidratos metabolizables en hojas de brotes vegetativos de primavera de árboles on (●) y off (○) de naranjo 'Salustiana', expresado como % sobre materia seca. Línea continua, árboles control; línea discontinua, árboles rayados el 2 de junio. Los datos son medias de 3 árboles, con 2 muestras por árbol. Las barras indican el error estándar de cada media. Se indica el momento de rayado (flecha) y la significación del efecto del rayado durante el período de muestreo para $P \leq 0,05$ (*); NS: no hay diferencias significativas.

RESULTADOS

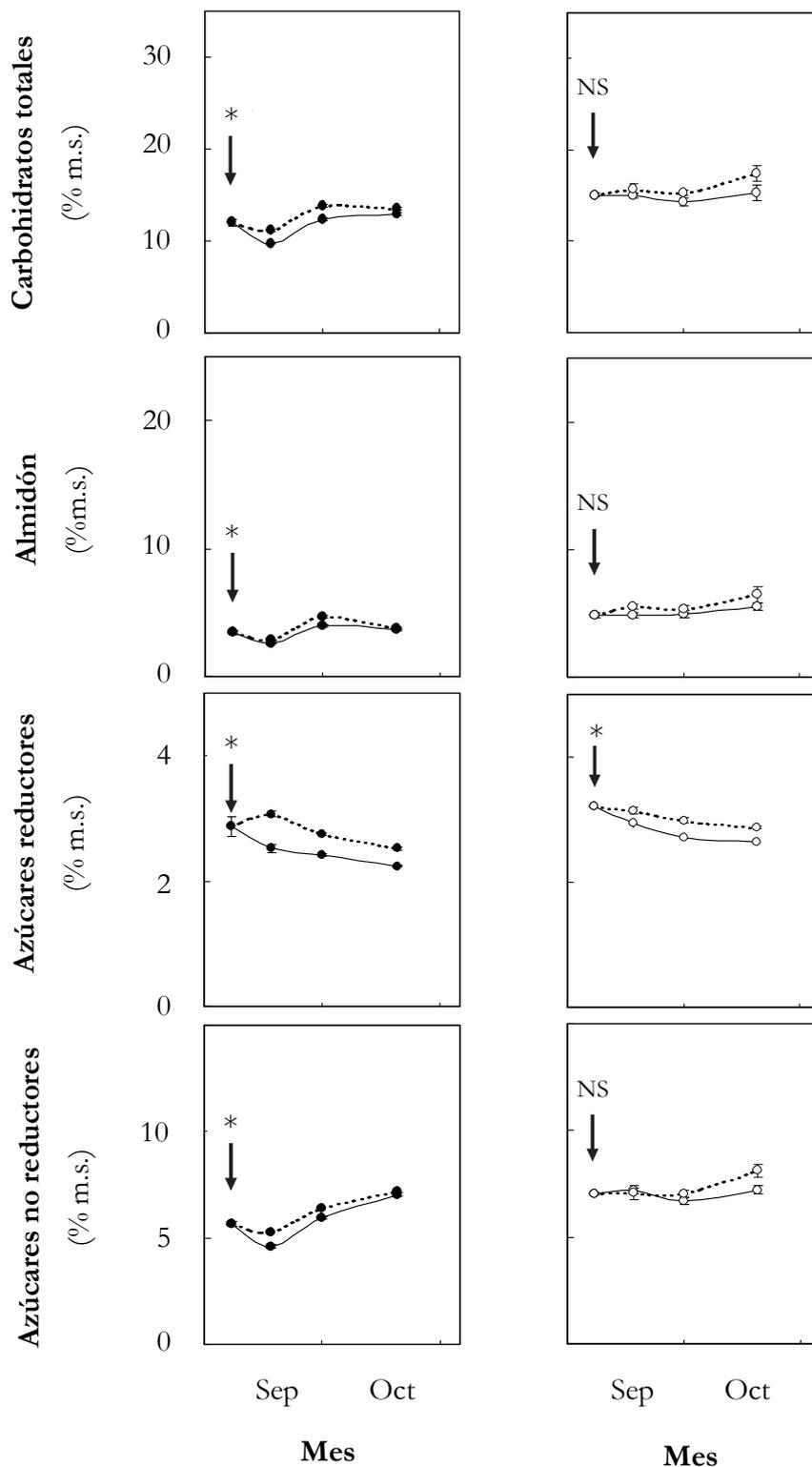


Fig. 42. Contenido en las distintas fracciones de carbohidratos metabolizables en hojas de brotes vegetativos de primavera de árboles on (●) y off (○) de naranjo 'Salustiana', expresado como % sobre materia seca. Línea continua, árboles control; línea discontinua, árboles rayados el 8 de septiembre. Los datos son medias de 6 árboles, con 2 muestras por árbol. Las barras indican el error estándar de cada media. Se indica el momento de rayado (flecha) y la significación del efecto del rayado durante el período de muestreo para $P \leq 0,05$ (*); NS: no hay diferencias significativas.

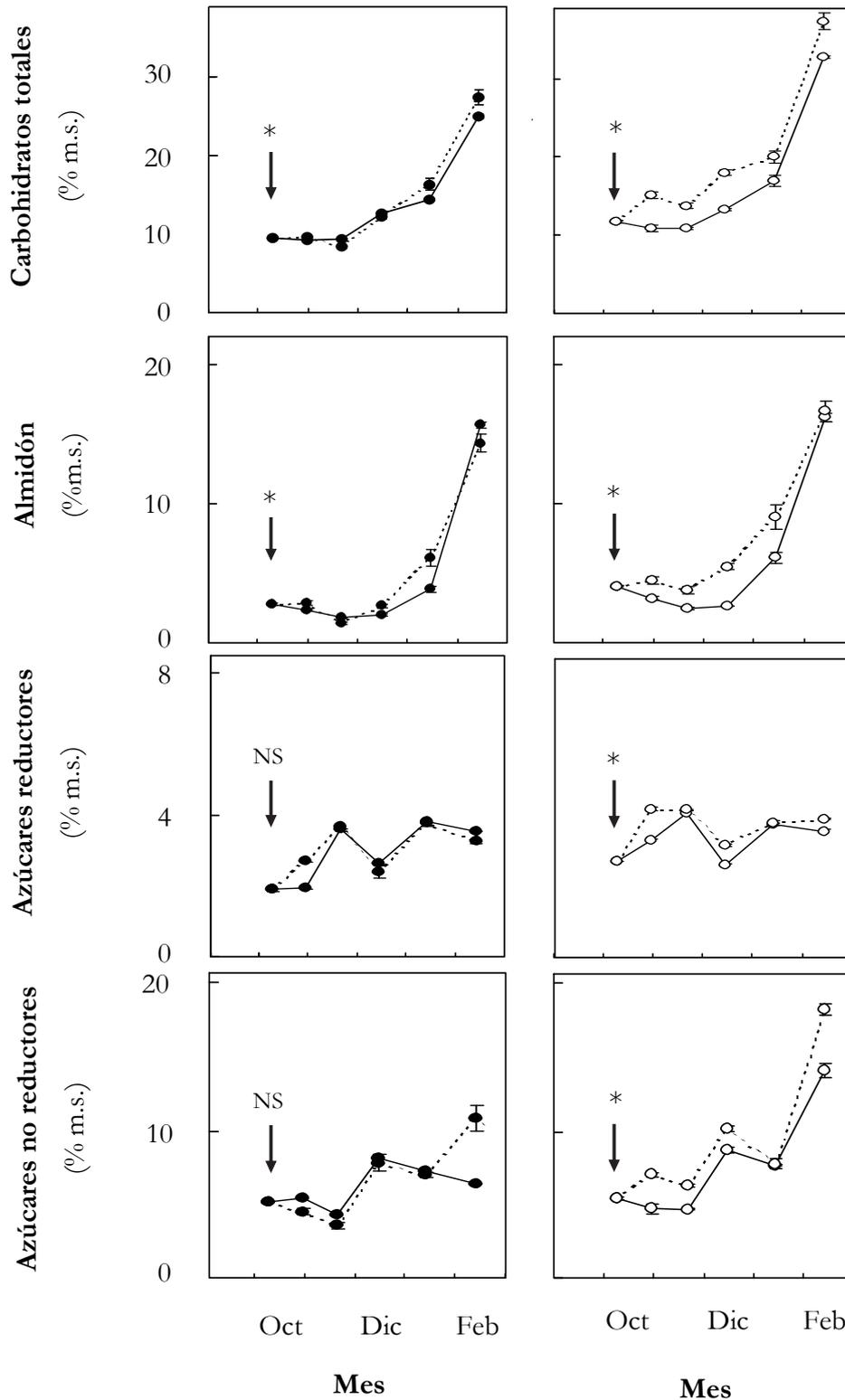


Fig. 43. Contenido en las distintas fracciones de carbohidratos metabolizables en hojas de brotes vegetativos de primavera de árboles on (●) y off (○) de naranjo 'Salustiana', expresado como % sobre materia seca. Línea continua, árboles control; línea discontinua, árboles rayados el 6 de octubre. Los datos son medias de 3 árboles, con 2 muestras por árbol. Las barras indican el error estándar de cada media. Se indica el momento de rayado (flecha) y la significación del efecto del rayado durante el período de muestreo para $P \leq 0,05$ (*); NS: no hay diferencias significativas.

RESULTADOS

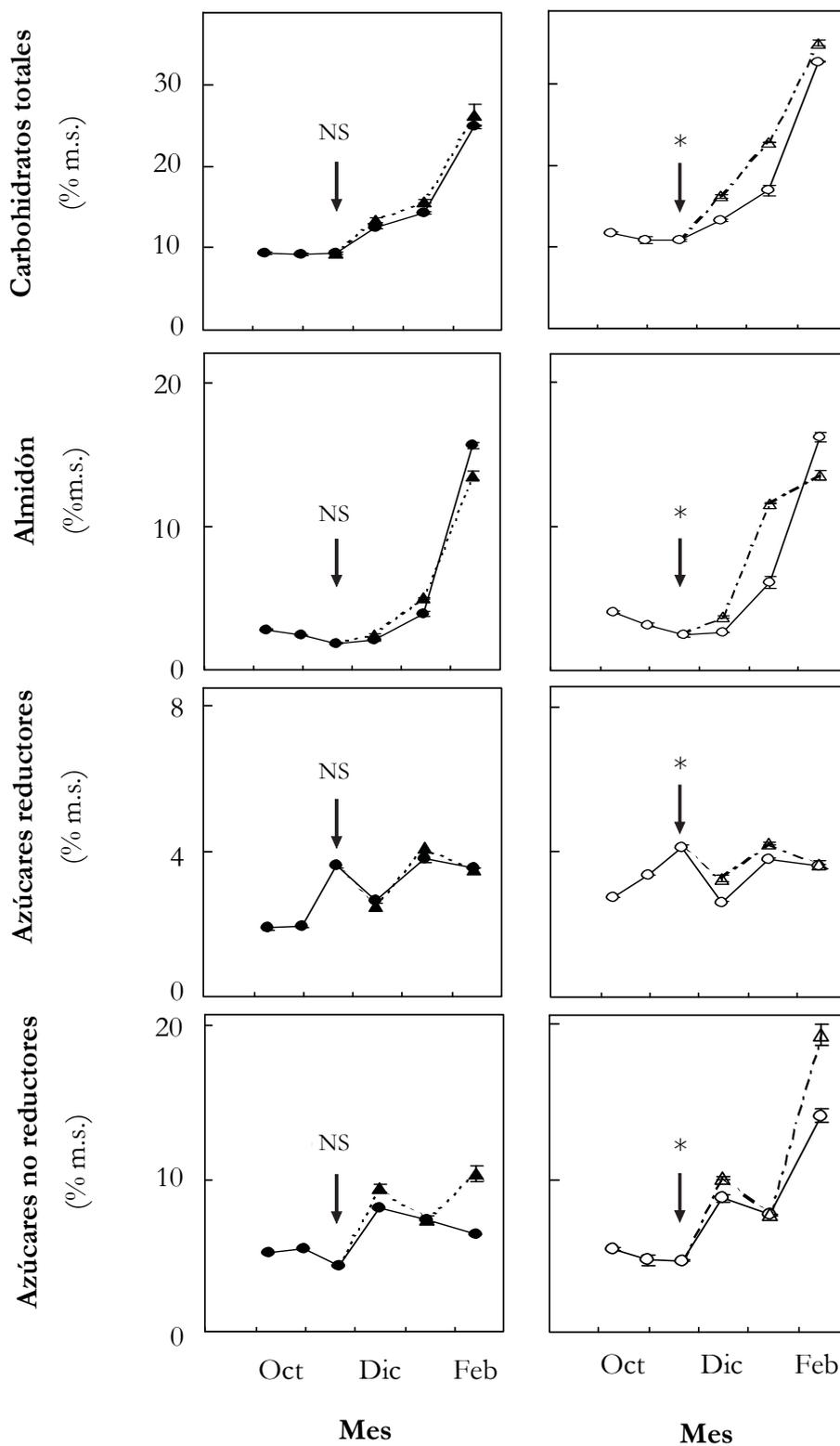


Fig. 44. Contenido en las distintas fracciones de carbohidratos metabolizables en hojas de brotes vegetativos de primavera de árboles on (●) y off (○) de naranjo 'Salustiana', expresado como % sobre materia seca. Línea continua, árboles control; línea discontinua, árboles rayados el 17 de noviembre. Los datos son medias de 3 árboles, con 2 muestras por árbol. Las barras indican el error estándar de cada media. Se indica el momento de rayado (flecha) y la significación del efecto del rayado durante el período de muestreo para $P \leq 0,05$ (*); NS: no hay diferencias significativas.

Sólo hubo efecto del rayado sobre la evolución en el peso seco de las hojas de brotes vegetativos de primavera cuando el tratamiento se realizó en octubre o en noviembre, y dependió de la carga productiva del árbol (Fig. 45).

En árboles *off* el rayado de los árboles completos incrementó el peso de la hoja cuando se realizó en octubre o en noviembre, aumentando hasta el 30% del peso seco de la hoja. Las diferencias desaparecieron en febrero, justo antes del inicio de la brotación.

En árboles *on* el rayado sólo produjo un aumento importante del peso de la hoja cuando se realizó en noviembre, y supuso un incremento máximo de un 20% sobre el control, que se mantuvo durante los 3 meses siguientes al rayado.

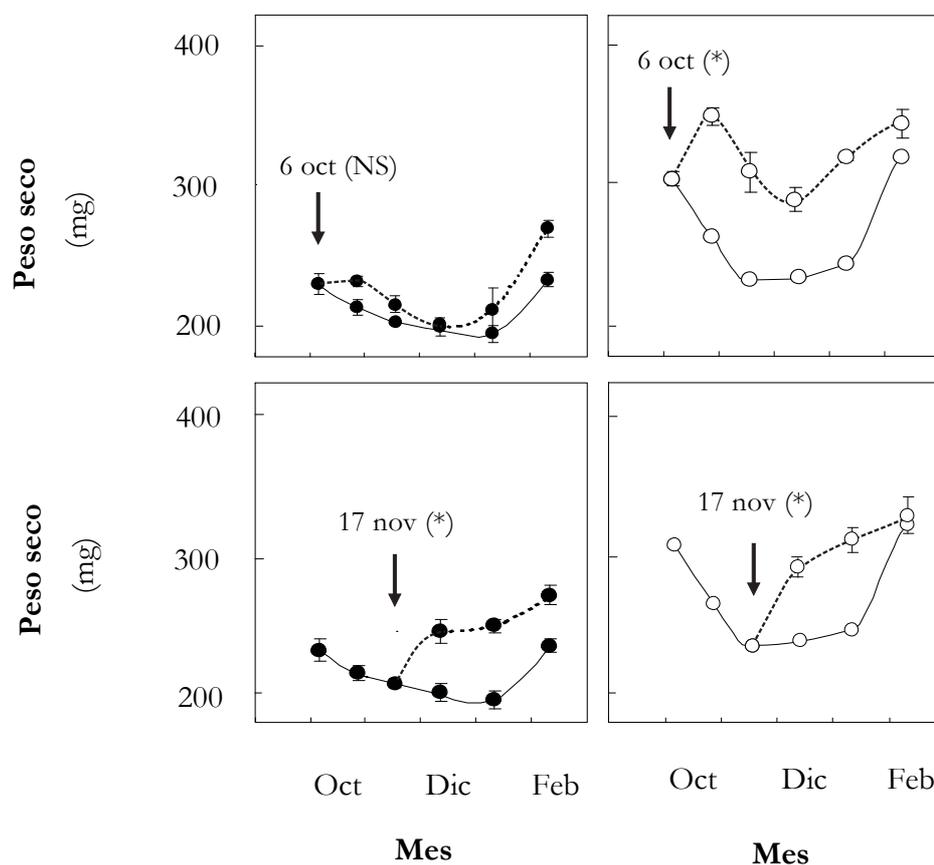


Fig. 45. Peso seco por hoja en brotes vegetativos de primavera de árboles *on* (●) y *off* (○) de naranjo 'Salustiana'. Línea continua, árboles control; línea discontinua, árboles rayados el 6 de octubre o el 17 de noviembre, según se indica. Los datos son medias de 3 árboles, con 2 muestras por árbol. Las barras indican el error estándar de cada media. Se indica el momento de rayado (flecha) y la significación del efecto del rayado durante el período de muestreo para $P \leq 0,05$ (*); NS: no hay diferencias significativas.

RESULTADOS

El contenido en carbohidratos en la corteza de brotes vegetativos sólo se vio afectado por los rayados de octubre y noviembre (Tabla 33). En árboles *off* el rayado en estas fechas aumentó el contenido de almidón en esta parte del brote. En árboles *on* sólo se modificó el contenido en carbohidratos en la corteza tras el rayado de noviembre, incrementando los azúcares no reductores. Hay que señalar el descenso en azúcares reductores tanto en árboles *on* como en *off* que tuvo lugar antes de la brotación en árboles rayados en noviembre.

Tabla 33. Contenido en carbohidratos metabolizables, expresado como % sobre materia seca, en corteza de brotes vegetativos de primavera de árboles de naranjo 'Salustiana' *on* y *off* a las 6 a 9 semanas del rayado en árboles completos efectuado el 6 de octubre o el 17 de noviembre. Los valores son las medias de 3 árboles, con 2 muestras por árbol. Letras diferentes en la misma columna y experimento indican diferencias estadísticas al 95 según el test de Duncan. NS: no hay diferencias significativas.

| TRATAMIENTO DE RAYADO | | Total carbohidratos (% m.s.) | Almidón (% m.s.) | Azúcares no reductores (% m.s.) | Azúcares reductores (% m.s.) |
|---------------------------|---------------|---------------------------------|---------------------|------------------------------------|---------------------------------|
| Árboles <i>on</i> | Control | 12,5 _{NS} | 4,0 _{NS} | 4,8 _{NS} | 3,8 _{NS} |
| | Rayado 6 oct | 11,6 | 4,3 | 3,4 | 4,0 |
| | Control | 15,4 _b | 6,8 _{NS} | 3,1 _b | 5,6 _a |
| | Rayado 17 nov | 16,5 _a | 6,8 | 5,2 _a | 4,6 _b |
| Árboles <i>off</i> | Control | 16,3 _b | 7,4 _b | 5,1 _{NS} | 3,9 _{NS} |
| | Rayado 6 oct | 21,9 _a | 13,0 _a | 5,0 | 3,8 |
| | Control | 24,3 _b | 14,7 _b | 4,5 _{NS} | 5,0 _a |
| | Rayado 17 nov | 30,0 _a | 20,6 _a | 5,5 | 3,9 _b |

El contenido de carbohidratos en la madera de brotes vegetativos de primavera sólo se vio afectado por el rayado realizado en noviembre (Tabla 34), que disminuyó el contenido en azúcares no reductores en árboles *on* e incrementó el contenido en almidón en árboles *off*.

Tabla 34. Contenido en carbohidratos metabolizables, expresado como % sobre materia seca, en madera de brotes vegetativos de primavera de árboles de naranjo 'Salustiana' *on* y *off* a las 6 a 9 semanas del rayado en árboles completos efectuado el 17 de noviembre. Los valores son las medias de 3 árboles, con 2 muestras por árbol. Letras diferentes en la misma columna y tipo de árbol indican diferencias estadísticas al 95 según el test de Duncan. NS: no hay diferencias significativas.

| TRATAMIENTO DE RAYADO | | Total carbohidratos (% m.s.) | Almidón (% m.s.) | Azúcares no reductores (% m.s.) | Azúcares reductores (% m.s.) |
|---------------------------|---------------|---------------------------------|---------------------|------------------------------------|---------------------------------|
| Árboles <i>on</i> | Control | 16,3 a | 7,6 NS | 7,3 a | 1,4 NS |
| | Rayado 17 nov | 12,2 b | 7,7 | 3,2 b | 1,3 |
| Árboles <i>off</i> | Control | 19,0 b | 14,7 b | 3,3 NS | 1,4 NS |
| | Rayado 17 nov | 26,7 a | 18,9 a | 7,1 | 1,1 |

4.2. Rayado de ramas individuales

Se realizaron tratamientos de rayado en ramas individuales de naranjo ‘Salustiana’ en diferentes fechas de 2003. Para ello, se seleccionaron 4 ramas de 11 a 12 mm de diámetro, con origen en la misma rama principal en 6 árboles distintos con carga de fruto escasa o nula (árboles *off*). Las ramas escogidas, sin presencia de fruto, tenían de 150 a 200 hojas.

Los tratamientos efectuados fueron los siguientes:

-1 rama de cada árbol se rayó el 8 de septiembre.

-1 rama de cada árbol se rayó el 24 de noviembre.

-1 rama de cada árbol se rayó en 4 fechas consecutivas (8 de septiembre, 18 de septiembre, 20 de octubre y 24 de noviembre), rayando exactamente sobre la herida anterior.

-1 rama de cada árbol se mantuvo intacta para ser utilizada como control.

Se caracterizó la brotación y la floración de cada rama en la primavera siguiente.

Desde la fecha de los diferentes tratamientos de rayado hasta mediados del mes de enero siguiente, se tomaron muestras periódicas de hojas de brotes vegetativos de primavera para analizar el contenido en carbohidratos (2 muestras por rama, de unas 5 hojas de brotes diferentes cada una). El contenido en carbohidratos de la corteza y la madera de estos brotes se analizó tras el tratamiento de rayado realizado el 24 de noviembre. Para ello, se obtuvieron 2 muestras por rama, cada una de ellas con la madera y la corteza de 5 brotes de la misma rama.

- *Efecto del rayado de ramas individuales sobre la brotación y la floración de la primavera siguiente*

El porcentaje de brotación en ramas naranjo ‘Salustiana’ y el número de brotes en 100 nudos aumentó significativamente tras el rayado de septiembre (Tablas 35 y 36). Si bien el número de brotes vegetativos permaneció invariable (Tabla 37), aumentó tanto el porcentaje de nudos con brotes reproductivos (Tabla 38) como el número de brotes reproductivos formados (Tabla 39), y, concretamente, de brotes generativos (sin hojas),

que fueron un 33% superior al control (Tabla 40). El número de brotes mixtos (con flores y hojas) no se vio afectado (Tabla 41). El número total de flores formadas aumentó de forma muy destacable tras el rayado de septiembre (284 *vs* 161 flores en 100 nudos; Tabla 42), sobretodo en la madera de 1 año, que llegó a incrementar un 78% el número de flores obtenidas en 100 nudos.

Tras el rayado de noviembre, aunque se observaron mayores valores de las variables relacionadas con la brotación y la floración, las diferencias con el control no fueron significativas. El rayado repetido de ramas anuló parcialmente el efecto promotor del rayado.

Tabla 35. Porcentaje de nudos brotados en ramas de árboles sin fruto de naranjo ‘Salustiana’ en la brotación de primavera con diferentes tratamientos de rayado. Los valores son las medias de 6 ramas de árboles diferentes. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas al 95% entre tratamientos (test de Duncan). Los análisis se realizaron utilizando la transformación $\arcsen\sqrt{x}$, siendo x el porcentaje de nudos brotados. NS: no hay diferencias significativas.

| TRATAMIENTO DE RAYADO | Edad de la madera | | TOTAL (Media ponderada) |
|-----------------------|-------------------|---------|----------------------------|
| | 1 año | 2 años | |
| Control | 55,5 b | 54,1 NS | 53,3 b |
| Rayado 8 sept | 85,0 a | 45,4 | 74,2 a |
| Rayado 24 nov | 70,1 ab | 38,2 | 60,6 ab |
| Rayados repetidos | 65,7 b | 50,3 | 61,0 ab |

RESULTADOS

Tabla 36. Número de brotes en 100 nudos en ramas de árboles sin fruto de naranjo 'Salustiana' en la brotación de primavera con diferentes tratamientos de rayado. Los valores son las medias de 6 ramas de árboles diferentes. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas al 95% entre tratamientos (test de Duncan). NS: no hay diferencias significativas.

| TRATAMIENTO DE RAYADO | Edad de la madera | | TOTAL (Media ponderada) |
|-----------------------|-------------------|---------|----------------------------|
| | 1 año | 2 años | |
| Control | 65,8 b | 48,5 NS | 58,6 b |
| Rayado 8 sept | 89,7 a | 47,3 | 78,0 a |
| Rayado 24 nov | 70,6 b | 39,3 | 60,8 ab |
| Rayados repetidos | 68,1 b | 47,6 | 61,5 ab |

Tabla 37. Número de brotes vegetativos en 100 nudos en ramas de árboles sin fruto de naranjo 'Salustiana' en la brotación de primavera con diferentes tratamientos de rayado. Los valores son las medias de 6 ramas de árboles diferentes. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas al 95% entre tratamientos (test de Duncan). NS: no hay diferencias significativas.

| TRATAMIENTO DE RAYADO | Edad de la madera | | TOTAL (Media ponderada) |
|-----------------------|-------------------|--------|----------------------------|
| | 1 año | 2 años | |
| Control | 4,4 NS | 3,9 NS | 4,1 NS |
| Rayado 8 sept | 2,8 | 1,2 | 2,4 |
| Rayado 24 nov | 1,1 | 0,2 | 0,8 |
| Rayados repetidos | 0,7 | 0,0 | 0,5 |

Tabla 38. Porcentaje de nudos con brotes reproductivos en ramas de árboles sin fruto de naranjo 'Salustiana' en la brotación de primavera con diferentes tratamientos de rayado. Los valores son las medias de 6 ramas de árboles diferentes. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas al 95% entre tratamientos (test de Duncan). NS: no hay diferencias significativas. Los análisis se realizaron utilizando la transformación $\arcsen\sqrt{x}$, siendo x el porcentaje de nudos brotados.

| TRATAMIENTO DE RAYADO | Edad de la madera | | TOTAL (Media ponderada) |
|-----------------------|-------------------|---------|----------------------------|
| | 1 año | 2 años | |
| Control | 45,3 b | 37,8 NS | 42,9 b |
| Rayado 8 sept | 82,2 a | 45,3 | 72,1 a |
| Rayado 24 nov | 65,9 ab | 38,0 | 57,1 ab |
| Rayados repetidos | 77,2 a | 40,2 | 66,6 ab |

Tabla 39. Número de brotes reproductivos en 100 nudos en ramas de árboles sin fruto de naranjo 'Salustiana' en la brotación de primavera con diferentes tratamientos de rayado. Los valores son las medias de 6 ramas de árboles diferentes. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas al 95% entre tratamientos (test de Duncan). NS: no hay diferencias significativas.

| TRATAMIENTO DE RAYADO | Edad de la madera | | TOTAL (Media ponderada) |
|-----------------------|-------------------|---------|----------------------------|
| | 1 año | 2 años | |
| Control | 61,4 b | 44,6 NS | 54,5 b |
| Rayado 8 sept | 86,9 a | 46,2 | 75,6 a |
| Rayado 24 nov | 69,5 b | 39,1 | 60,0 ab |
| Rayados repetidos | 67,4 b | 47,6 | 61,1 ab |

RESULTADOS

Tabla 40. Número de brotes generativos (sin hojas) en 100 nudos en ramas de árboles sin fruto de naranjo 'Salustiana' en la brotación de primavera con diferentes tratamientos de rayado. Los valores son las medias de 6 ramas de árboles diferentes. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas al 95% entre tratamientos (test de Duncan). NS: no hay diferencias significativas.

| TRATAMIENTO DE RAYADO | Edad de la madera | | TOTAL (Media ponderada) |
|-----------------------|--------------------|--------------------|----------------------------|
| | 1 año | 2 años | |
| Control | 48,8 _{NS} | 28,8 _{NS} | 41,9 _b |
| Rayado 8 sept | 65,3 | 39,4 | 58,1 _a |
| Rayado 24 nov | 48,2 | 33,4 | 42,7 _{ab} |
| Rayados repetidos | 48,7 | 37,0 | 44,3 _{ab} |

Tabla 41. Número de brotes mixtos (con flores y con hojas) en 100 nudos en ramas de árboles sin fruto de naranjo 'Salustiana' en la brotación de primavera con diferentes tratamientos de rayado. Los valores son las medias de 6 ramas de árboles diferentes. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas al 95% entre tratamientos (test de Duncan). NS: no hay diferencias significativas.

| TRATAMIENTO DE RAYADO | Edad de la madera | | TOTAL (Media ponderada) |
|-----------------------|--------------------|--------------------|----------------------------|
| | 1 año | 2 años | |
| Control | 12,6 _{NS} | 15,9 _{NS} | 12,5 _{NS} |
| Rayado 8 sept | 21,6 | 6,7 | 17,5 |
| Rayado 24 nov | 21,3 | 5,7 | 17,3 |
| Rayados repetidos | 18,7 | 10,7 | 16,8 |

Tabla 42. Número de flores en 100 nudos en ramas de árboles sin fruto de naranjo 'Salustiana' en la brotación de primavera con diferentes tratamientos de rayado. Los valores son las medias de 6 ramas de árboles diferentes. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas al 95% entre tratamientos (test de Duncan). NS: no hay diferencias significativas.

| TRATAMIENTO DE RAYADO | Edad de la madera | | TOTAL (Media ponderada) |
|-----------------------|-------------------|----------|----------------------------|
| | 1 año | 2 años | |
| Control | 182,2 b | 124,2 NS | 160,6 b |
| Rayado 8 sept | 324,6 a | 181,7 | 284,0 a |
| Rayado 24 nov | 259,6 ab | 123,3 | 220,6 ab |
| Rayados repetidos | 213,4 b | 163,6 | 197,7 ab |

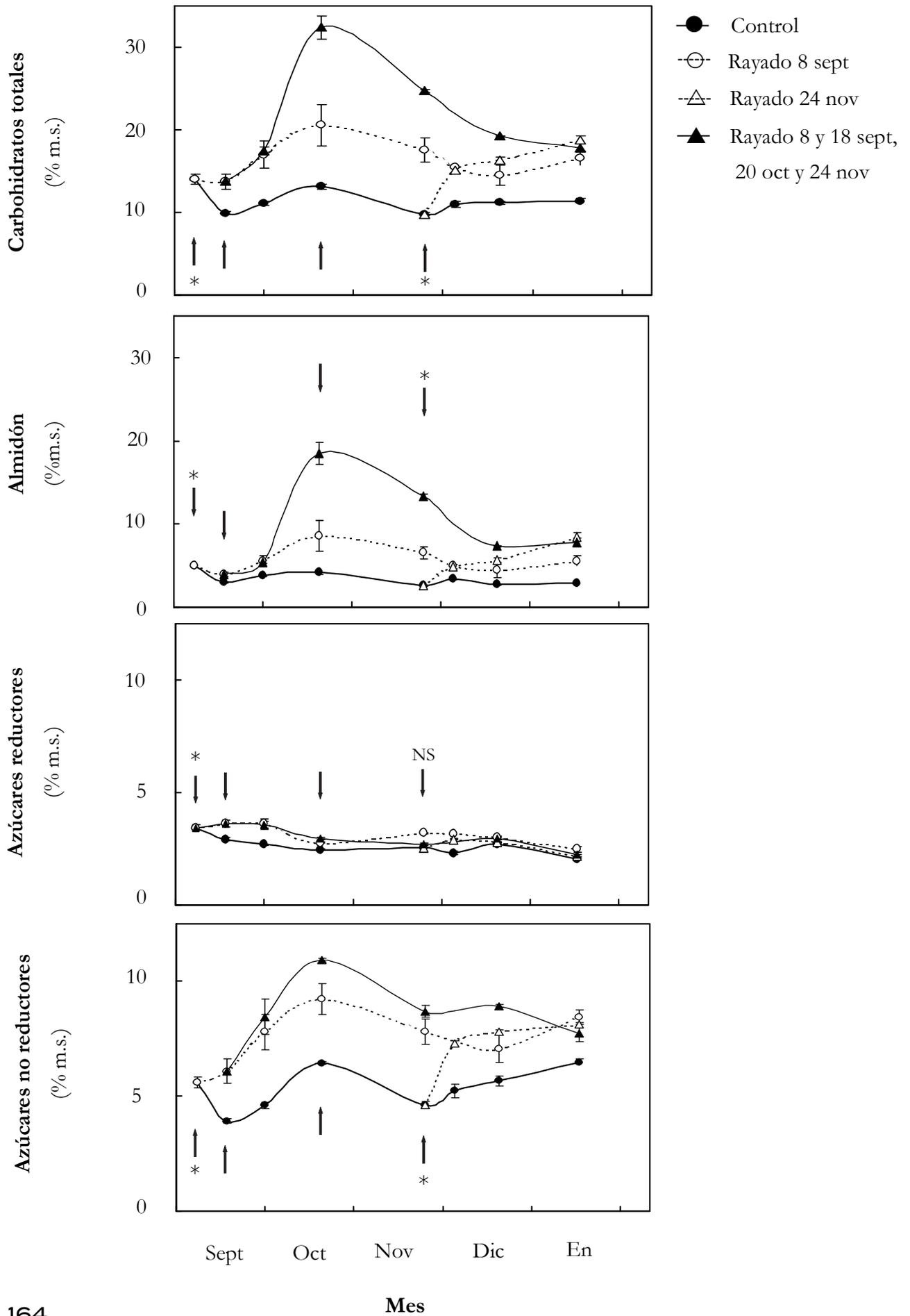
- Efecto del rayado de ramas individuales sobre el contenido en carbohidratos

a) Carbohidratos en hojas

El rayado de ramas individuales de 'Salustiana' tuvo un efecto más marcado sobre el contenido en carbohidratos que cuando el rayado se efectuó sobre el total de las ramas principales del árbol. Cuando se rayó en septiembre o en noviembre, la concentración de carbohidratos en las hojas aumentó de forma importante (Fig. 46). Este aumento fue más acusado en la concentración de almidón y en la de azúcares no reductores. Se mantuvieron valores mayores que los controles hasta el inicio de la brotación. La fracción de azúcares reductores no se vio afectada por los tratamientos de rayado.

Fig. 46 (pág. siguiente). Contenido en las distintas fracciones de carbohidratos metabolizables, expresado como % sobre materia seca, en hojas de brotes vegetativos de primavera de ramas árboles sin fruto de naranjo 'Salustiana' con diferentes tratamientos de rayado. Los datos son medias de 6 ramas de árboles diferentes, con 2 muestras por rama. Las barras indican el error estándar de cada media. Se indica el momento de los tratamientos de rayado (flechas). El asterisco (*) indica diferencias significativas entre árboles rayados el 8 de septiembre o el 24 de noviembre para $P \leq 0,05$ durante el período de muestreo. NS: sin diferencias significativas.

RESULTADOS



Cuando el rayado se realizó sobre la misma herida de forma repetida, se observó un aumento de carbohidratos que triplicó el valor inicial tras el segundo rayado. Cuando se volvió a rayar el 20 de octubre ya no tuvo efecto positivo, y en el cuarto rayado el efecto fue nulo. La respuesta descrita fue debida, principalmente, a la acumulación en almidón y en azúcares no reductores. Visualmente, se observaron síntomas típicos de la acumulación de almidón en hojas, que acompañó a los rayados, observándose clorosis y posterior senescencia en gran parte de las hojas de las ramas rayadas (Fig. 47).



Fig. 47. Hojas de naranjo 'Salustiana' de ramas con rayado repetido sobre la misma herida en 4 fechas diferentes (8 y 18 de septiembre, 20 de octubre y 24 de noviembre), mostrando síntomas de clorosis.

b) Carbohidratos en corteza y madera

Se estudió el efecto del rayado de ramas individuales de naranjo 'Salustiana' efectuado el 24 de noviembre sobre la variación en el contenido en carbohidratos en la corteza y la madera de brotes vegetativos de primavera (Tabla 43). En la corteza se acumularon más carbohidratos a las 6 semanas del rayado, debido fundamentalmente a la mayor presencia de almidón. En la madera, el rayado del 24 de noviembre tuvo un ligero efecto sobre la concentración de carbohidratos.

RESULTADOS

Tabla 43. Contenido en carbohidratos metabolizables, expresado como % sobre materia seca, en corteza y madera de brotes vegetativos de primavera de ramas de árboles sin fruto de naranjo 'Salustiana' a las 6 semanas del tratamiento de rayado en ramas individuales realizado el 24 de noviembre. Los valores son las medias de 3 árboles, con 2 muestras por árbol. Letras diferentes en la misma columna y parte del brote indican diferencias estadísticas al 95 según el test de Duncan. NS: no hay diferencias significativas.

| TRATAMIENTO DE RAYADO | | Total carbohidratos (% m.s.) | Almidón (% m.s.) | Azúcares no reductores (% m.s.) | Azúcares reductores (% m.s.) |
|--------------------------|---------------|------------------------------------|---------------------|---------------------------------------|------------------------------------|
| Corteza | Control | 18,8 b | 11,3 b | 5,3 _{NS} | 2,2 _{NS} |
| | Rayado 24 nov | 28,6 a | 19,0 a | 6,9 | 2,8 |
| Madera | Control | 13,5 _{NS} | 10,8 _{NS} | 1,6 _{NS} | 1,1 b |
| | Rayado 24 nov | 15,8 | 12,4 | 1,5 | 1,4 a |

4.3. Comparación con la variedad de mandarino temprano satsuma ‘Owari’

El propósito de este experimento fue el de comparar el comportamiento de la variedad de naranjo dulce ‘Salustiana’ con una variedad como mandarino satsuma ‘Owari’, con diferente época de inducción floral y diferente respuesta estacional a la fecha en que se efectúa el rayado, según estudios previos, y relacionar estas diferencias con el contenido en carbohidratos. Para ello, se realizaron los mismos tratamientos de rayado descritos para ‘Salustiana’ sobre ramas individuales en diferentes fechas de 2003, en ramas de características equivalentes de mandarino satsuma ‘Owari’. Es decir, en este caso, también se seleccionaron 4 ramas de 11 a 12 mm de diámetro, con origen en la misma rama principal, en 6 árboles distintos de satsuma con carga de fruto escasa o nula. Las ramas escogidas, sin presencia de fruto, tenían de 100 a 150 hojas.

Los tratamientos efectuados fueron los siguientes:

- 1 rama de cada árbol se rayó el 8 de septiembre.
- 1 rama de cada árbol se rayó el 24 de noviembre.
- 1 rama de cada árbol se rayó en 4 fechas consecutivas (8 de septiembre, 18 de septiembre, 20 de octubre y 24 de noviembre) rayando exactamente sobre la herida anterior.
- 1 rama de cada árbol se mantuvo intacta para ser utilizada como control.

Se caracterizó la brotación y la floración de cada rama en la primavera siguiente. Además de la brotación de primavera, en la que se concentra la floración, el mandarino satsuma ‘Owari’ presenta una apreciable brotación en verano, constituida principalmente por brotes vegetativos con hojas de mayor tamaño. En la primavera siguiente a los tratamientos, se caracterizó la brotación y la floración de cada rama, distinguiendo entre:

- yemas situadas en la madera de la brotación de primavera anterior
- yemas situadas en la madera de la brotación de verano anterior
- yemas situadas en la madera de la brotación del año anterior (madera de 2 años).

Tras cada tratamiento de rayado se tomaron muestras periódicas de hojas de brotes de primavera para analizar el contenido en carbohidratos (2 muestras por rama, de unas 5

RESULTADOS

hojas cada una de brotes diferentes cada una). Asimismo, tras el rayado del 24 de noviembre se tomaron muestras de la corteza y la madera de estos brotes para el posterior análisis del contenido en carbohidratos, consistiendo cada una de las muestras en la madera y la corteza de 5 brotes de la misma rama.

- *Efecto del rayado de ramas individuales sobre la brotación y la floración de la primavera siguiente*

En los árboles de mandarina satsuma ‘Owari’ la brotación de primavera tuvo lugar principalmente en las yemas del último año (62 vs 11% de nudos brotados en madera de 1 año y de 2 años, respectivamente; Tabla 44). Como el número de brotes por nudo brotado formados fue también mayor en la madera de 1 año que en la de 2 años (1,3 vs 1 brote por nudo; $P \leq 0,031$), hubo una gran diferencia entre la cantidad de brotes totales en 100 nudos entre la madera de 1 y la de 2 años (82 vs 12 brotes en 100 nudos; Tabla 45) siendo en cualquiera de los casos casi todos los brotes de tipo reproductivo (Tablas 46 y 47). Los brotes vegetativos fueron pues, prácticamente inexistentes (Tabla 48). De entre los brotes reproductivos, los de tipo generativo (sin hojas) fueron mucho más abundantes: 7 de cada 10 brotes reproductivos formados en la madera de 1 año, y 9 de cada 10 en la madera de 2 años fueron brotes generativos (Tablas 48 a 51) y prácticamente la totalidad de ellos fueron del tipo generativo unifloral (flor solitaria). Se observaron 82 flores por 100 nudos en madera de 1 año y 11 en la madera de 2 años (Tabla 51). No se apreciaron diferencias en las características de la brotación ni de la floración entre las yemas situadas sobre brotes de primavera o en aquellas situadas sobre brotes de verano.

En esta variedad de mandarina satsuma, el rayado de noviembre fue el único que provocó efectos significativos sobre la brotación y la floración. El porcentaje de brotación no varió con los tratamientos de rayado en los nudos situados en las brotaciones de verano y primavera del último año, pero sí en los nudos del año anterior. En estos nudos, el rayado en noviembre aumentó drásticamente el nivel de brotación (45 vs 11% de nudos brotados). Este efecto no desapareció cuando el rayado se realizó repetidamente. El número de brotes obtenidos en 100 nudos sólo se vio afectado por el rayado en

noviembre, incrementando tanto en la brotación de 1 año como en la de 2 años (Tabla 45).

El número de brotes vegetativos formados, que fue muy bajo en la brotación de primavera en las ramas utilizadas como control, fue prácticamente nulo y la totalidad de los brotes formados fueron reproductivos. Así, el incremento en la brotación tras el rayado de noviembre se tradujo en un aumento significativo de la floración. El número de flores en 100 nudos fue muy superior tras el rayado en esta fecha tanto en la madera de 1 año (135 vs 82 flores en 100 nudos) como en la de 2 años (66 vs 11 flores en 100 nudos; Tabla 51). Las flores se formaron en brotes generativos sin hojas (Tabla 50), ya que el rayado, en cualquiera de las fechas que se realizara, tuvo un efecto inhibitorio de la formación de brotes generativos con hojas (Tabla 49).

Tabla 44. Porcentaje de nudos brotados en ramas sin fruto de mandarino satsuma ‘Owari’ en la brotación de primavera con diferentes tratamientos de rayado. Los valores son las medias de 6 ramas. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas al 95% entre tratamientos (test de Duncan). NS: no hay diferencias significativas. Los análisis se realizaron utilizando la transformación $\arcsen\sqrt{x}$, siendo x el porcentaje de nudos brotados.

| TRATAMIENTO DE RAYADO | Edad de la madera | | | | TOTAL Media ponderada |
|-----------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------------|
| | 1 año | | | 2 años | |
| | Primavera | Verano | Media ponderada | | |
| Control | 62,9 _{NS} | 61,9 _{NS} | 62,2 _{NS} | 11,2 _b | 55,9 _{NS} |
| Rayado 8 sept | 67,2 | 61,8 | 66,5 | 23,6 _{ab} | 61,2 |
| Rayado 24 nov | 72,5 | 60,0 | 72,2 | 44,8 _a | 66,5 |
| Rayados repetidos | 65,3 | 53,3 | 59,4 | 40,7 _a | 56,9 |

RESULTADOS

Tabla 45. Número de brotes en 100 nudos en ramas sin fruto de mandarina satsuma 'Owari' en la brotación de primavera con diferentes tratamientos de rayado. Los valores son las medias de 6 ramas de árboles diferentes. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas al 95% entre tratamientos (test de Duncan). NS: no hay diferencias significativas.

| TRATAMIENTO DE RAYADO | Edad de la madera | | | | TOTAL Media ponderada |
|-----------------------|-------------------|---------|-----------------|---------|--------------------------|
| | 1 año | | | 2 años | |
| | Primavera | Verano | Media ponderada | | |
| Control | 82,2 b | 81,8 NS | 82,0 b | 11,9 b | 73,3 b |
| Rayado 8 sept | 104,6 ab | 101,4 | 106,0 ab | 27,1 b | 95,7 ab |
| Rayado 24 nov | 132,8 a | 113,0 | 134,1 a | 65,9 a | 119,0 a |
| Rayados repetidos | 111,0 ab | 69,2 | 96,9 ab | 45,7 ab | 90,1 ab |

Tabla 46. Porcentaje de nudos con brotes reproductivos en ramas sin fruto de mandarina satsuma 'Owari' en la brotación de primavera con diferentes tratamientos de rayado. Los valores son las medias de 6 ramas de árboles diferentes. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas al 95% entre tratamientos (test de Duncan). NS: no hay diferencias significativas. Los análisis se realizaron utilizando la transformación $\arcsen\sqrt{x}$, siendo x el porcentaje de nudos brotados.

| TRATAMIENTO DE RAYADO | Edad de la madera | | | | TOTAL Media ponderada |
|-----------------------|-------------------|---------|-----------------|---------|--------------------------|
| | 1 año | | | 2 años | |
| | Primavera | Verano | Media ponderada | | |
| Control | 62,3 NS | 61,6 NS | 61,7 NS | 10,5 b | 55,4 NS |
| Rayado 8 sept | 67,2 | 61,8 | 66,5 | 23,6 ab | 61,2 |
| Rayado 24 nov | 72,5 | 60,0 | 72,2 | 44,8 a | 66,5 |
| Rayados repetidos | 65,3 | 53,3 | 59,4 | 40,7 a | 56,9 |

Tabla 47. Número de brotes reproductivos en 100 nudos en ramas sin fruto de mandarina satsuma 'Owari' en la brotación de primavera con diferentes tratamientos de rayado. Los valores son las medias de 6 ramas de árboles diferentes. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas al 95% entre tratamientos (test de Duncan). NS: no hay diferencias significativas.

| TRATAMIENTO DE RAYADO | Edad de la madera | | | | TOTAL Media ponderada |
|-----------------------|-------------------|--------------------|-----------------|---------|--------------------------|
| | 1 año | | | 2 años | |
| | Primavera | Verano | Media ponderada | | |
| Control | 81,6 b | 81,5 _{NS} | 81,5 b | 11,2 b | 72,8 b |
| Rayado 8 sept | 104,6 ab | 101,4 | 106,8 ab | 27,1 b | 95,7 ab |
| Rayado 24 nov | 132,8 a | 113,0 | 134,1 a | 65,9 a | 119,0 a |
| Rayados repetidos | 111,0 ab | 69,2 | 96,9 ab | 45,7 ab | 90,1 ab |

Tabla 48. Número de brotes vegetativos en 100 nudos en ramas sin fruto de mandarina satsuma 'Owari' en la brotación de primavera con diferentes tratamientos de rayado. Los valores son las medias de 6 ramas de árboles diferentes. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas al 95% entre tratamientos (test de Duncan). NS: no hay diferencias significativas.

| TRATAMIENTO DE RAYADO | Edad de la madera | | | | TOTAL Media ponderada |
|-----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------------|
| | 1 año | | | 2 años | |
| | Primavera | Verano | Media ponderada | | |
| Control | 0,6 _{NS} | 0,3 _{NS} | 0,5 _{NS} | 0,7 _{NS} | 0,5 _{NS} |
| Rayado 8 sept | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Rayado 24 nov | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Rayados repetidos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

RESULTADOS

Tabla 49. Número de brotes mixtos (reproductivos con hojas) en 100 nudos en ramas sin fruto de mandarina satsuma 'Owari' en la brotación de primavera con diferentes tratamientos de rayado de árboles. Los valores son las medias de 6 ramas de árboles diferentes. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas al 95% entre tratamientos (test de Duncan). NS: no hay diferencias significativas.

| TRATAMIENTO DE RAYADO | Edad de la madera | | | | TOTAL Media ponderada |
|-----------------------|-------------------|--------|-----------------|--------|--------------------------|
| | 1 año | | | 2 años | |
| | Primavera | Verano | Media ponderada | | |
| Control | 26,2 a | 26,8 a | 26,2 a | 1,4 b | 22,8 a |
| Rayado 8 sept | 5,9 b | 8,2 b | 6,2 b | 3,5 b | 5,9 b |
| Rayado 24 nov | 2,6 b | 4,5 b | 3,5 b | 9,5 a | 5,0 b |
| Rayados repetidos | 2,7 b | 0,2 b | 1,1 b | 2,5 ab | 1,3 b |

Tabla 50. Número de brotes generativos (reproductivos sin hojas) en 100 nudos en ramas sin fruto de mandarina satsuma 'Owari' en la brotación de primavera con diferentes tratamientos de rayado. Los valores son las medias de 6 ramas. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas al 95% entre tratamientos (test de Duncan). NS: no hay diferencias significativas.

| TRATAMIENTO DE RAYADO | Edad de la madera | | | | TOTAL Media ponderada |
|-----------------------|-------------------|---------|-----------------|---------|--------------------------|
| | 1 año | | | 2 años | |
| | Primavera | Verano | Media ponderada | | |
| Control | 55,4 b | 54,7 NS | 55,4 b | 9,8 b | 50,0 b |
| Rayado 8 sept | 98,6 a | 93,3 | 99,8 ab | 23,6 ab | 89,8 ab |
| Rayado 24 nov | 130,2 a | 108,4 | 130,5 a | 56,3 a | 113,9 a |
| Rayados repetidos | 108,2 a | 69,0 | 95,8 ab | 43,2 ab | 88,8 ab |

Tabla 51. Número de flores en 100 nudos en ramas sin fruto de mandarina satsuma 'Owari' en la brotación de primavera con diferentes tratamientos de rayado. Los valores son las medias de 6 ramas. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas al 95% entre tratamientos (test de Duncan). NS: no hay diferencias significativas.

| TRATAMIENTO DE RAYADO | Edad de la madera | | | | TOTAL Media ponderada |
|-----------------------|-------------------|--------------------|-----------------|---------|--------------------------|
| | 1 año | | | 2 años | |
| | Primavera | Verano | Media ponderada | | |
| Control | 82,7 b | 82,1 _{NS} | 82,4 b | 11,2 b | 73,6 b |
| Rayado 8 sept | 105,6 ab | 102,0 | 106,8 ab | 27,1 b | 96,4 ab |
| Rayado 24 nov | 134,1 a | 114,1 | 135,4 a | 65,9 a | 120,0 a |
| Rayados repetidos | 112,6 ab | 88,5 | 98,7 ab | 45,7 ab | 91,7 ab |

- *Efecto del rayado de ramas sobre el contenido en carbohidratos metabolizables*

El rayado de ramas individuales realizado el 8 de septiembre no tuvo efecto significativo sobre la concentración en carbohidratos metabolizables presentes en hojas de brotes vegetativos de primavera de árboles de mandarina satsuma 'Owari' (Fig. 48). Sin embargo, el rayado efectuado el 24 de noviembre sí provocó un importante aumento de los mismos, debido al incremento en el almidón y en los azúcares no reductores. El contenido en azúcares reductores no varió con respecto a los controles.

Cuando el rayado del 8 de septiembre se repitió a los 10 días sobre la misma rama (18 de septiembre) sí hubo un aumento muy marcado de carbohidratos, que no prosiguió con los rayados posteriores.

Se estudió el efecto del rayado del 24 de noviembre sobre el contenido en carbohidratos en la corteza y la madera de brotes vegetativos de primavera (Tabla 52). El rayado en esta fecha incrementó el contenido en carbohidratos metabolizables en la corteza 6 semanas

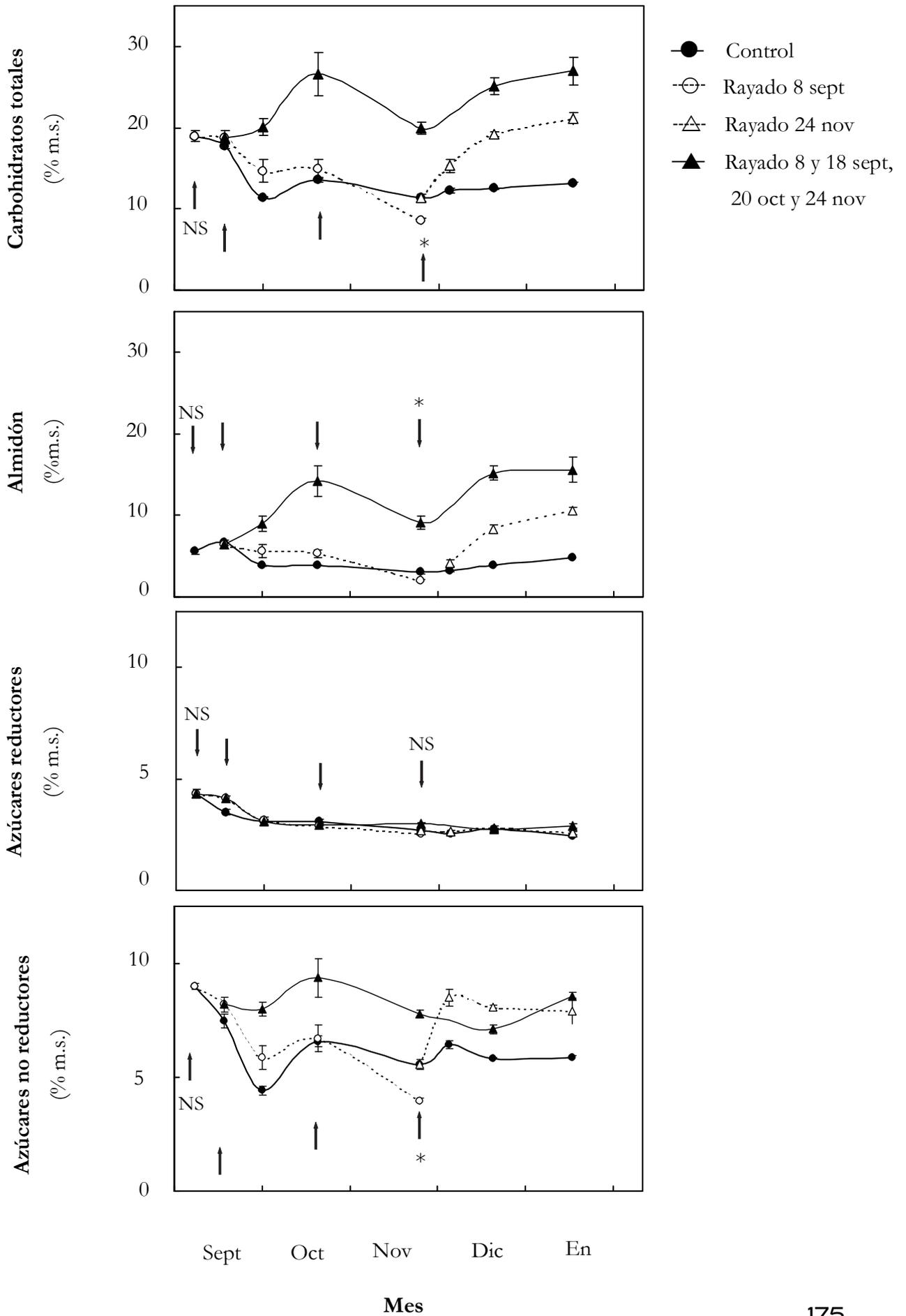
RESULTADOS

después, efecto debido exclusivamente a la acumulación de almidón, ya que el resto de las fracciones de carbohidratos no se vieron afectadas. En la madera de estos brotes los azúcares solubles disminuyeron en árboles rayados a las 6 semanas del tratamiento de anillado.

Tabla 52. Contenido en carbohidratos metabolizables, expresado como % sobre materia seca, en corteza y madera de brotes vegetativos de primavera de ramas sin fruto de mandarina satsuma 'Owari' a las 6 semanas del tratamiento de rayado en ramas individuales realizado el 24 de noviembre. Los valores son las medias de 6 ramas de árboles diferentes, con 2 muestras por rama. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas al 95% entre tratamientos (test de Duncan). NS: no hay diferencias significativas.

| | TRATAMIENTO DE RAYADO | Total carbohidratos (% m.s.) | Almidón (% m.s.) | Azúcares no reductores (% m.s.) | Azúcares reductores (% m.s.) |
|----------------|--------------------------|------------------------------------|---------------------|---------------------------------------|------------------------------------|
| Corteza | Control | 17,3 b | 11,1 b | 4,1 NS | 2,1 NS |
| | Rayado 24 nov | 29,2 a | 23,3 a | 3,7 | 2,2 |
| Madera | Control | 14,0 NS | 8,6 NS | 4,0 a | 1,4 a |
| | Rayado 24 nov | 12,7 | 10,1 | 1,5 b | 1,1 b |

Fig. 48 (pág. siguiente). Contenido en las distintas fracciones de carbohidratos metabolizables, expresado como % sobre materia seca, en hojas de brotes vegetativos de primavera de ramas sin fruto de mandarina satsuma 'Owari' con diferentes tratamientos de rayado. Los datos son medias de 6 ramas de árboles diferentes, con 2 muestras por rama. Las barras indican el error estándar de cada media. Se indica el momento de los tratamientos de rayado (flechas). El asterisco (*) indica diferencias significativas entre árboles rayados el 8 de septiembre y el 24 de noviembre para $P \leq 0,05$ durante el período de muestreo. NS: sin diferencias significativas.



4.4. Estudio histológico de la regeneración de tejidos tras el rayado

Con el objetivo de estudiar la regeneración de tejidos tras los tratamientos de rayado, se realizaron observaciones microscópicas tras rayar ramas sin fruto, de 10 a 11 mm de diámetro, de árboles de naranjo ‘Salustiana’ y de mandarino satsuma ‘Owari’. Los tratamientos de rayado se efectuaron el 8 de septiembre y el 23 de noviembre de 2003. Las muestras se tomaron periódicamente desde el mismo día de efectuado el rayado hasta 77 días después de la primera fecha (mitad de diciembre) y 55 días de la segunda (mitad de enero).

- *Rayado realizado el 8 de septiembre*

El rayado de ramas seccionó los tejidos externos al xilema, es decir, el tejido protector, el córtex, el floema primario y secundario y el cámbium vascular.

A los 10 días de efectuado el rayado (Fig. 49) las células del córtex y del floema más externo (más próximas al córtex) se observó regeneración de tejidos tanto en naranjo ‘Salustiana’ como en mandarino satsuma ‘Owari’, alcanzándose un estado de desarrollo similar en ambas variedades, que consistió en una respuesta cicatricial, con hipertrofia y necrosamiento en las células más cercanas al corte y engrosamiento de pared y suberificación en las células situadas a continuación (Fig. 49A,B). Por el contrario, en el floema más interno (más próximo al cámbium vascular), se observó una masa de células con un tamaño menor, y un núcleo y un citoplasma más denso que el resto de las células parenquimáticas del floema, mostrando características propias de células meristemáticas. La respuesta de los tejidos a ambos lados del corte fue, en apariencia, la misma (Fig. 49C, D,E).

A los 42 días tras el rayado (Figs. 50 y 51) la zona cicatricial (situada en la parte más cercana al córtex) se había extendido, de forma que la hipertrofia y suberificación había afectado a un mayor número de células (Figs. 50A,B y 51A,B). De esta forma las porciones vivas de córtex y floema más externo a ambos lados del corte estaban más distantes entre sí. En la región de floema más interno se observó un tejido parenquimático de células de pequeño tamaño y paredes delgadas que conectaban ambos

lados del rayado (Fig. 50C,D). En el caso de mandarino satsuma, en el seno de este tejido parenquimático se observaron células alargadas con aspecto de elementos conductores (Fig. 51B,C,D). En ambas variedades, el tejido de conexión pareció haber tenido lugar por la proliferación de células del floema situado a ambos lados del corte. En el interior del tejido de conexión se apreciaron pequeños grupos aislados de células lignificadas, típicas del floema.

A los 77 días del rayado (Fig. 52), no se observaron cambios en la zona cicatricial del córtex. En el tejido de conexión, hubo una mayor presencia de células lignificadas en ambas variedades.

Al finalizar las observaciones, paralelamente a la cicatrización de los tejidos expuestos hacia el exterior, se observó la proliferación del parénquima floemático, dando como resultado la conexión del floema a ambos lados del rayado. Este tejido de conexión pareció contener elementos conductores en satsuma que no se observaron en 'Salustiana'.

Este patrón de regeneración no se produjo siempre en todo el perímetro de rayado (Fig. 53). En ocasiones pudo apreciarse la formación de una capa de células suberificadas que impidió una conexión funcional entre ambos lados del rayado. En estos casos, ya a los 42 días del rayado pudo observarse una peridermis en la superficie de los callos formados a cada lado del corte, con formación de células suberificadas hacia el exterior. Como resultado, hubo un distanciamiento cada vez mayor de las zonas separadas por el corte.

RESULTADOS

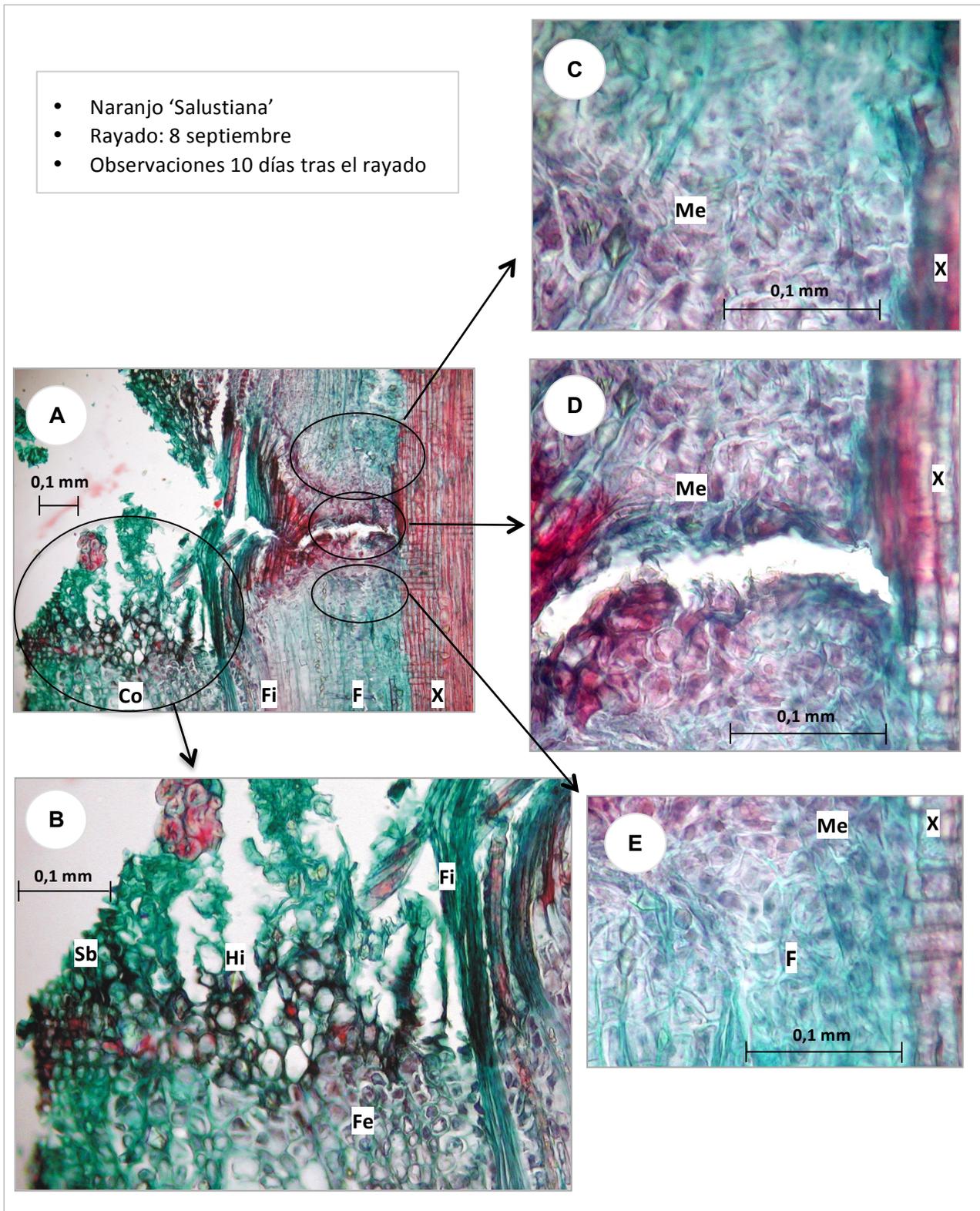


Fig. 49. Secciones longitudinales de ramas de naranjo 'Salustiana' rayadas el 8 de septiembre. Muestras de tejidos tomadas 10 días después del tratamiento de rayado. A: Aspecto general de los tejidos afectados por el rayado. B: Detalle de las células hipertrofiadas y suberificadas de la región del córtex. C, D y E: Detalles de la proliferación de células en la región del floema.

Co: córtex; F: floema; Fe: felógeno; Fi: fibras de floema; Hi: células hipertrofiadas; Me: células meristemáticas; Sb: súber; X: xilema.

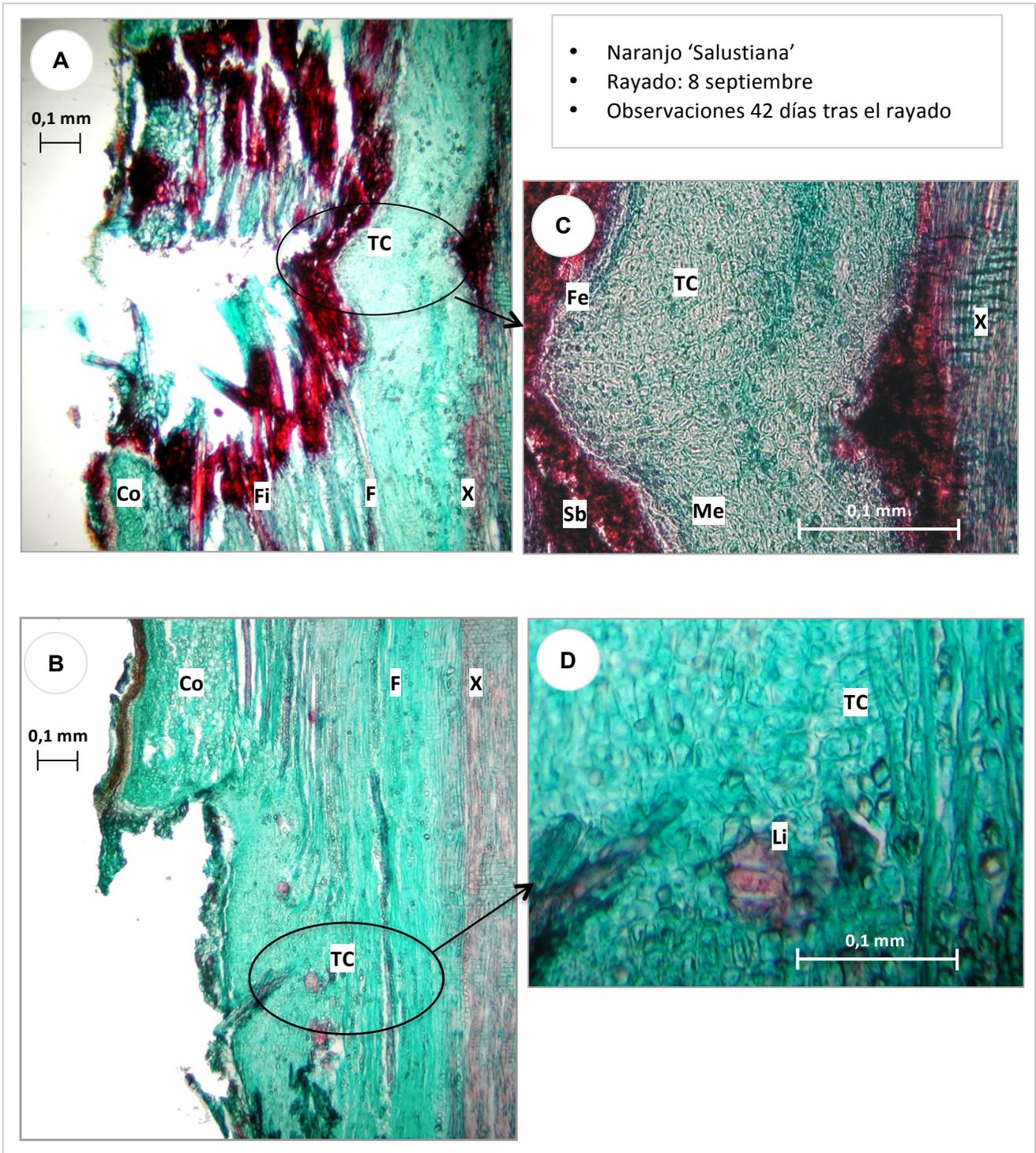


Fig. 50. Secciones longitudinales de ramas de naranjo 'Salustiana' rayadas el 8 de septiembre. Muestras de tejidos tomadas 42 días después del tratamiento de rayado. A y B: Aspecto general de los tejidos afectados por el rayado de dos muestras diferentes. C y D: Detalles del tejido de conexión formado en cada una de las anteriores.

Co: córtex; F: floema; Fe: felógeno; Fi: fibras de floema; Li: células lignificadas; Me: células meristemáticas; Sb: súber; TC: tejido de conexión; X: xilema.

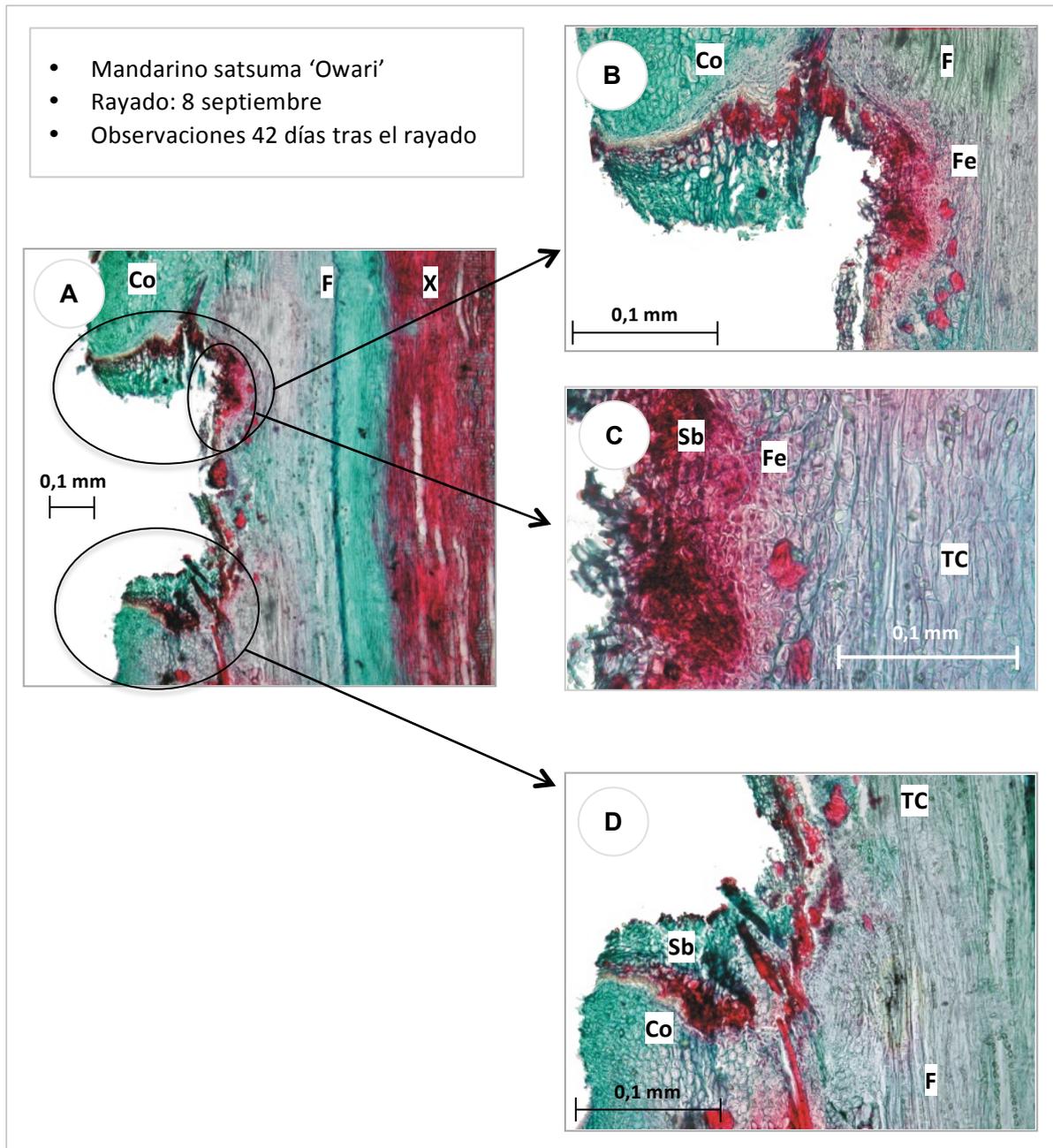


Fig. 51. Secciones longitudinales de ramas de mandarino satsuma 'Owari' rayadas el 8 de septiembre. Muestras de tejidos tomadas 42 días después del tratamiento de rayado. A: Aspecto general de los tejidos afectados por el rayado. B, C y D: Detalles del tejido de conexión, con células alargadas, y la zona cicatricial.

Co: córtex; F: floema; Fe: felógeno; Sb: súber; TC: tejido de conexión; X: xilema.

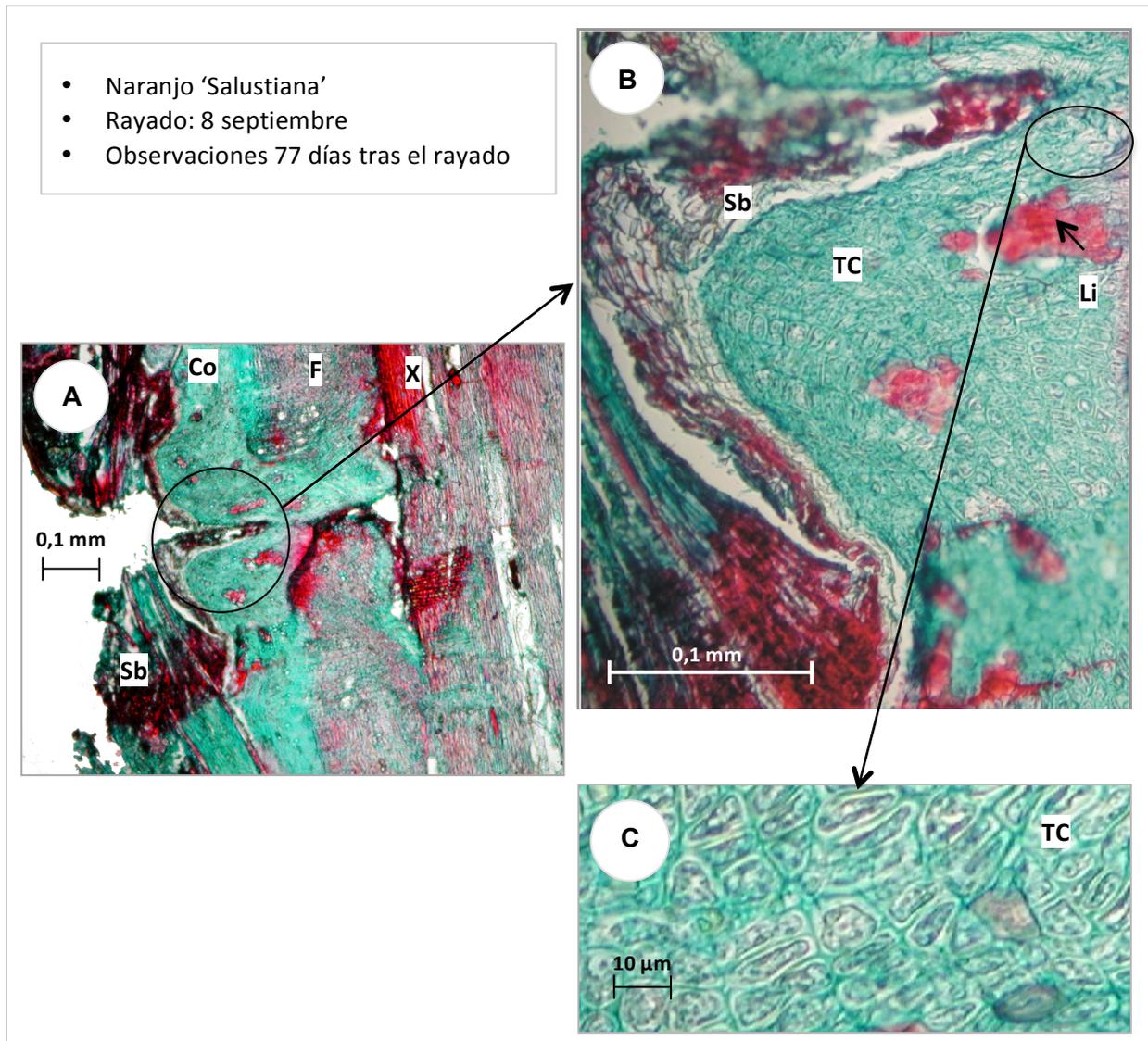


Fig. 52. Secciones longitudinales de ramas de naranja 'Salustiana' rayadas el 8 de septiembre. Muestras de tejidos tomadas tras 77 días después del tratamiento de rayado. A: Aspecto general de los tejidos afectados por el rayado. B y C: Detalles del tejido de conexión.

Co: córtex; F: floema; Li: células lignificadas; Sb: súber; TC: tejido de conexión; X: xilema.

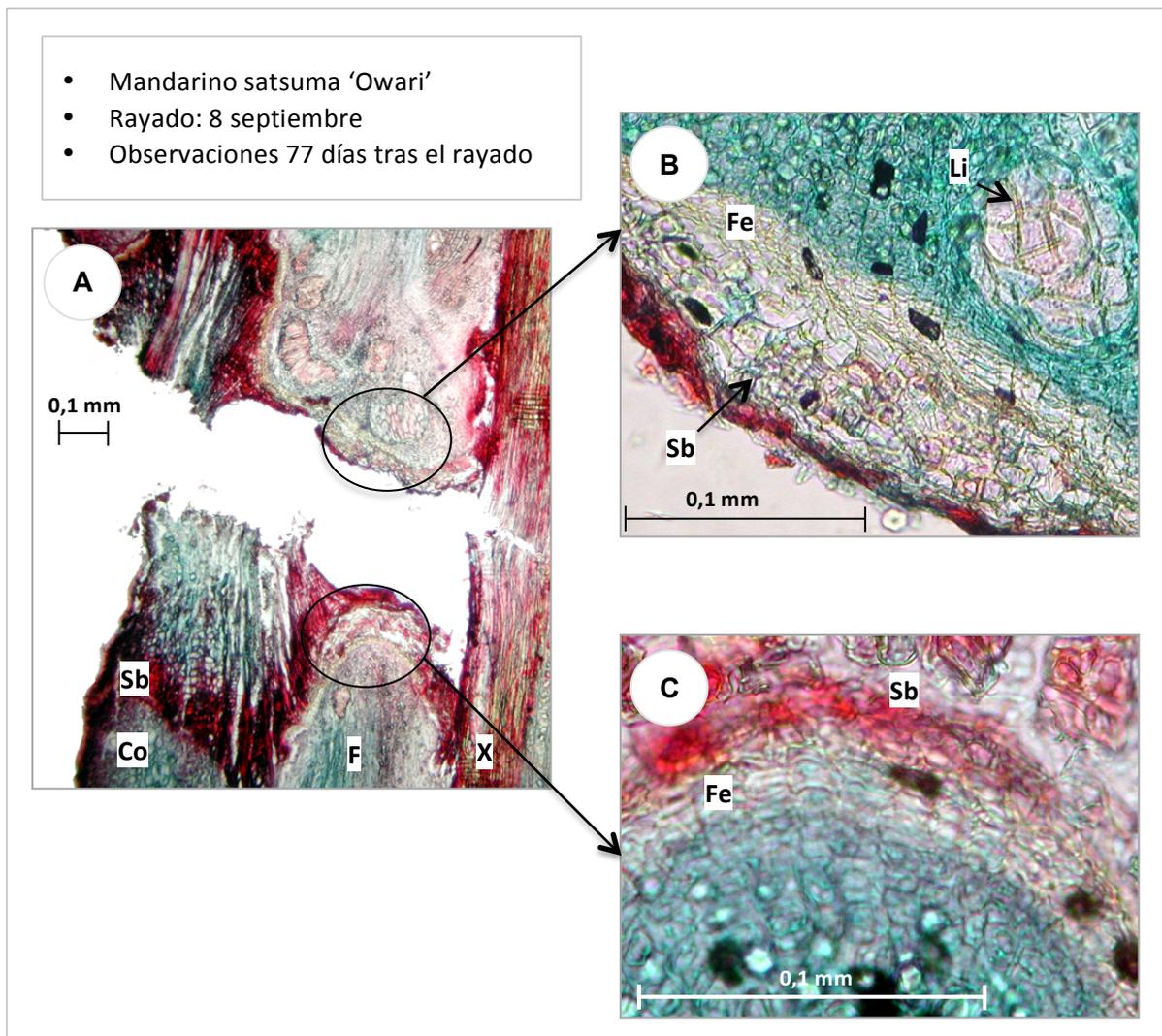


Fig. 53. Secciones longitudinales de ramas de mandarino satsuma 'Owari' rayadas el 8 de septiembre. Muestras de tejidos tomadas 77 días después del tratamiento de rayado. A: Aspecto general de los tejidos afectados por el rayado, observándose ausencia de conexión entre los tejidos escindidos. B y C: Detalles de la respuesta cicatricial observada a ambos lados del rayado.

Co: córtex; F: floema; Fe: felógeno; Li: células lignificadas; Sb: súber; X: xilema.

- Rayado realizado el 24 de noviembre

Tras el rayado realizado en noviembre, el único cambio observado en los tejidos de los dos cultivares estudiados fue una ligera hipertrofia, necrosamiento, y, en ocasiones, suberificación de las células expuestas por el corte, sobretodo en la región del córtex y floema más externo. No se observaron divisiones celulares en todo el período de muestreo, que se extendió hasta 55 días después del rayado, es decir, hasta mitad del mes de enero (Fig. 54).

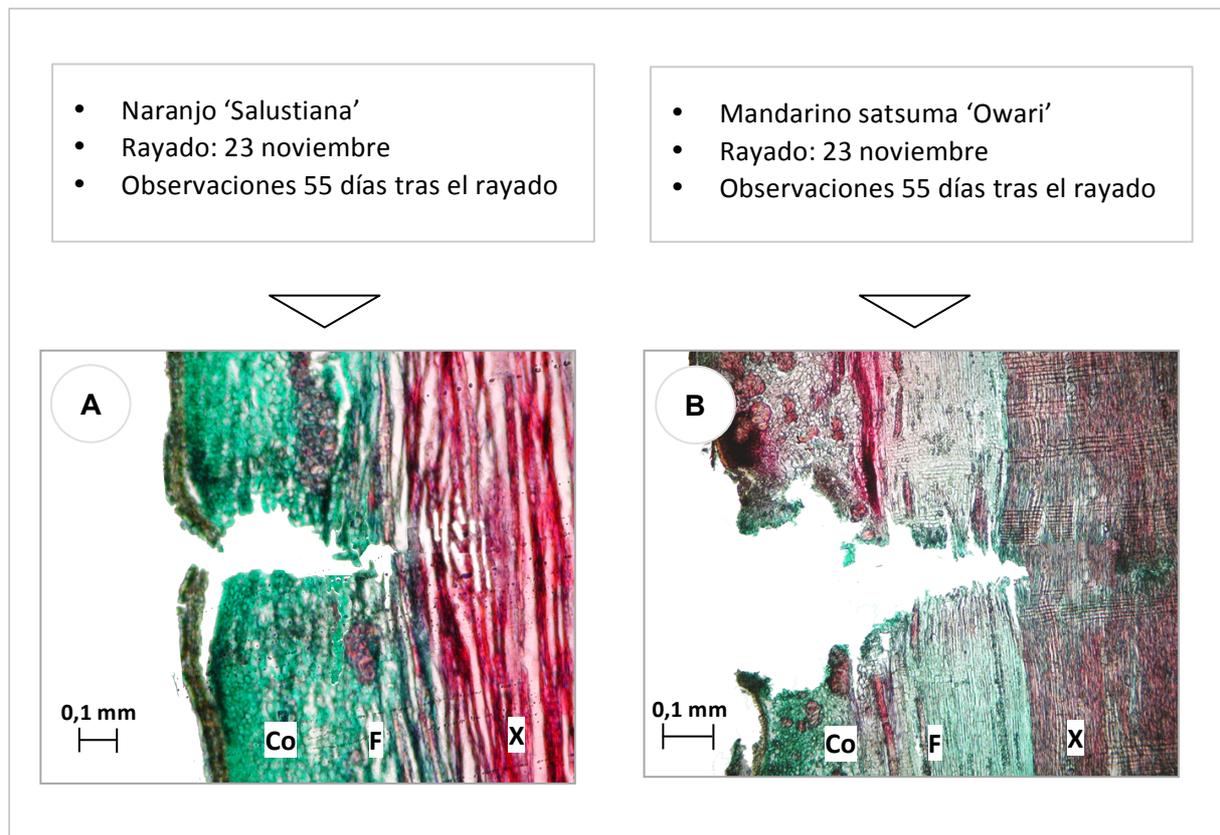


Fig. 54. Secciones longitudinales de ramas de naranjo 'Salustiana' (A) y mandarino satsuma 'Owari' (B) rayadas el 23 de noviembre. Muestras tomadas 55 días después del tratamiento de rayado. rayado efectuado el 23 de noviembre en ramas de 10-12 mm de diámetro. No se observa regeneración de tejidos.

Co: córtex; F: floema; X: xilema.

5. INFLUENCIA DE LA PRESENCIA DE FRUTO SOBRE EL NIVEL DE GIBERELINAS EN YEMAS Y SU RELACIÓN CON LA BROTACIÓN Y LA FLORACIÓN

El contenido en giberelinas presentes en meristemas apicales de yemas de brotes de naranjo dulce ‘Salustiana’ se midió entre los meses de julio de 2011 y febrero de 2012 con el fin de disponer de los contenidos endógenos de este grupo de hormonas vegetales durante la época de adquisición de la competencia e inducción floral.

Para ello, se seleccionaron 15 árboles de naranjo ‘Salustiana’ con alta carga de fruto (*on*) y 15 árboles con baja carga de fruto (*off*). Cada 5 árboles constituyó una réplica independiente de la cual se tomaron alrededor de 250 yemas (750 mg de peso fresco, aproximadamente) distribuidas en 50 brotes, y 5 hojas. En los árboles *on* los brotes seleccionados fueron los generativos uniflorales. En los árboles *off* se tomaron las muestras de brotes vegetativos. En ambos casos se seleccionaron las 5 yemas del brote más cercanas al ápice y una hoja en posición intermedia. Las muestras se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se mantuvieron a -80°C hasta su análisis.

Las muestras se tomaron en 5 fechas diferentes, desde el 26 de julio al 16 de febrero.

En relación a la ruta de biosíntesis sin hidroxilación temprana en el carbono 13 del aldehído de GA₁₂, (secuencia GA₁₂ → GA₁₅ → GA₂₄ → GA₉ → GA₄) sólo se encontraron GA₁₅ y GA₉, mientras que GA₁₂, GA₂₄ y GA₄ fueron indetectables (Fig. 59A). Tampoco se detectó GA₅₁, producto final fisiológicamente inactivo obtenido por hidroxilación en 2β de GA₉.

Por el contrario, se detectó la totalidad de los componentes de la ruta de biosíntesis de las giberelinas de hidroxilación temprana (GA₅₃ → GA₄₄ → GA₁₉ → GA₂₀ → GA₁) que dan lugar a la GA₁, con actividad fisiológica (Fig. 59B). Asimismo, se detectaron GA₂₉ y GA₈, productos finales fisiológicamente inactivos, obtenidos respectivamente a partir de GA₂₀ y GA₁ por hidroxilación en 2β.

El contenido en giberelinas de la ruta de la no hidroxilación temprana (GA₁₅ y GA₉) fue superior en árboles *on* desde julio hasta finales de octubre, si bien existió mucha variabilidad entre árboles y las diferencias sólo resultaron significativas a final de octubre.

A partir de esta fecha, se observó un contenido mayor de GA₁₅ en los árboles *off* (4,1 *vs* 1,5 ng g⁻¹ de tejido; P≤0,029).

El contenido en giberelinas de la ruta de la hidroxilación temprana dependió tanto de la fecha de muestreo como de la presencia de fruto.

GA₅₃ fue detectada a partir de octubre en brotes sin fruto, y a partir de diciembre en brotes con fruto. En cualquier caso, el contenido de GA₅₃ siempre se mantuvo muy bajo, nunca superior a 0,2 ng g⁻¹ de tejido.

GA₄₄ se mantuvo en concentraciones cercanas a 0,4 ng g⁻¹ de tejido durante todo el período de muestreo, sin verse afectada de forma destacable por la presencia de fruto, salvo en octubre, donde se apreció una ligera mayor concentración en árboles *on* que en árboles *off*.

GA₁₉, al inicio del muestreo, fue ligeramente menor en yemas de brotes sin fruto (0,1 *vs* 0,3 ng g⁻¹; P≤0,041). Desde julio hasta febrero este contenido aumentó gradualmente en ambos tipos de árboles, y, a partir de diciembre se produjo un notable ascenso en yemas de brotes sin fruto, que llegaron a triplicar su contenido en esta giberelina con respecto a los brotes con fruto (2,7 *vs* 0,9 ng g⁻¹; P≤0,005).

GA₂₀ también fue mayor en yemas de brotes con fruto en julio. Desde este momento el contenido en GA₂₀ decreció ligeramente y las diferencias por efecto del fruto desaparecieron.

La concentración de GA₂₉ fue relativamente alta al inicio del muestreo, alrededor de 2,2 ng g⁻¹, en ambos tipos de brotes. Este contenido fue disminuyendo progresivamente hasta llegar en diciembre a niveles muy bajos o indetectables en yemas de brotes con y sin fruto respectivamente. En febrero, mientras en brotes con fruto no se detectó su presencia, en brotes sin fruto aumentó bruscamente hasta 2,9 ng g⁻¹.

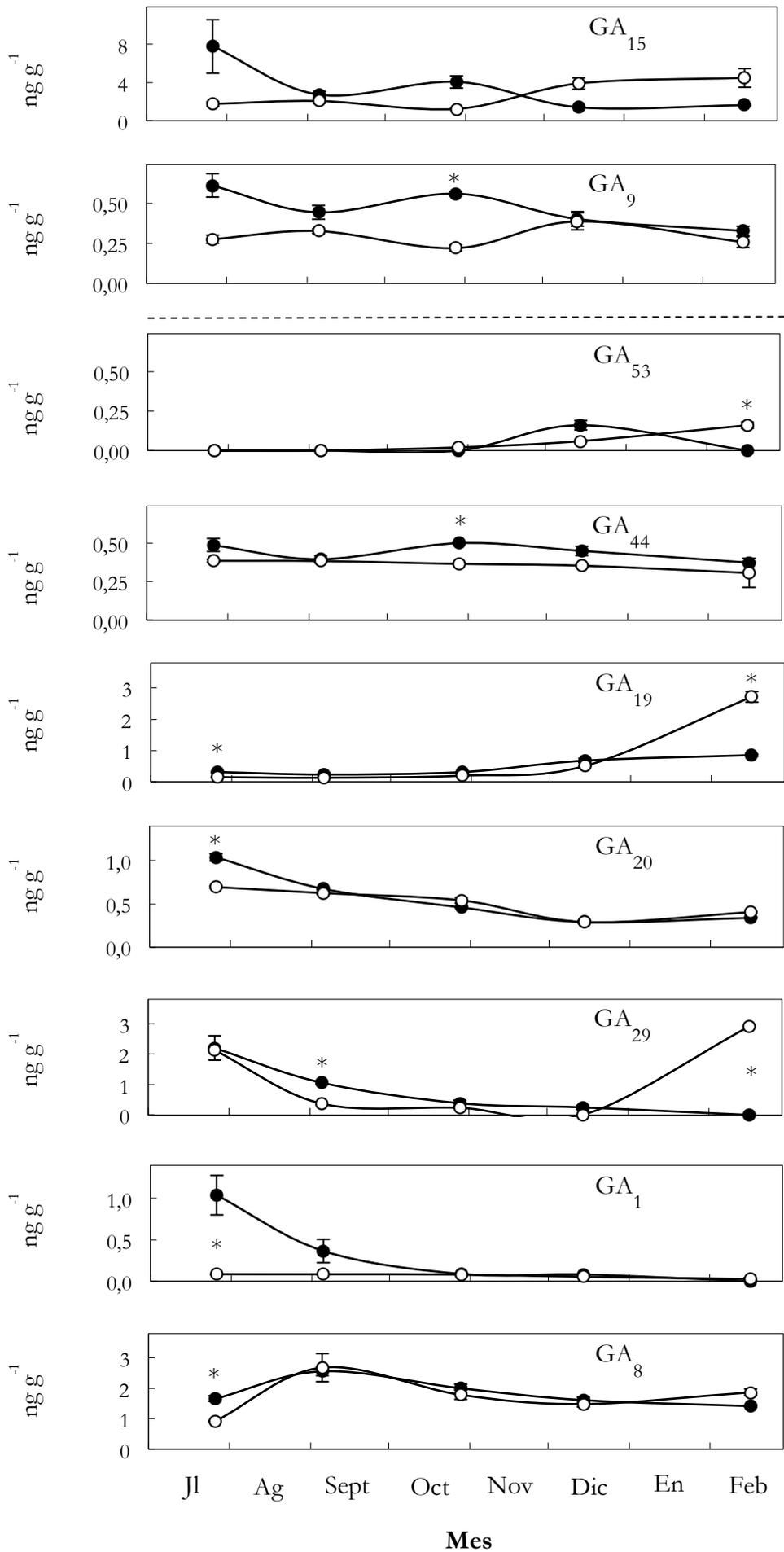
GA₁ no varió su contenido entre los meses de julio y febrero en los árboles *off* manteniéndose por debajo de 0,1 ng g⁻¹. Sin embargo, en los árboles *on* se observó un mayor contenido de esta hormona en el mes de julio, que fue 13 veces superior a aquél de los árboles *off*.

RESULTADOS

Por último, GA₈ tuvo un comportamiento similar a GA₁. En este caso, al inicio del muestreo, las yemas de árboles con fruto tuvieron un contenido mayor que los sin fruto (1,7 *vs* 0,9 ng g⁻¹, respectivamente; P≤0,007). Posteriormente, las diferencias no fueron significativas y el contenido fue prácticamente constante (alrededor de 1,8 ng g⁻¹) hasta el inicio de la brotación.

Fig. 55 (pág. siguiente). Contenido en giberelinas en yemas de brotes de primavera de naranjo 'Salustiana'. Árboles sin fruto (off, ○) y árboles con fruto (on, ●). Los valores, expresados como ng por g de peso fresco, son medias de 3 muestras. Las barras indican el error estándar de cada media. Se indican las diferencias estadísticamente significativas para P≤0,05 () para cada fecha de muestreo. Sin asterisco, no hay diferencias significativas.*

RESULTADOS



A
GAs de la ruta de la no hidroxilación temprana

B
GAs de la ruta de la hidroxilación temprana

DISCUSIÓN

1. COMPORTAMIENTO ALTERNANTE DE LA VARIEDAD DE NARANJO DULCE ‘SALUSTIANA’

La alternancia de cosechas se ha estudiado ampliamente en numerosas especies frutales tanto de hoja caduca como perenne (Baktir *et al.*, 2004; Reig *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2007; Krishnamurty *et al.*, 2013; Smith y Samach, 2013; Samach y Smith, 2013). En cítricos, también se han observado variedades que alternan años de elevada floración y fructificación (*on*) con años con predominio de crecimiento vegetativo y escasa o nula cosecha (*off*) (Monselise y Goldschmidt, 1982; Becerra y Guardiola, 1984; Verreyne y Lovatt, 2009; Martínez-Fuentes *et al.*, 2010).

En el naranjo dulce ‘Salustiana’, objeto de este estudio, la recolección comercial de los frutos se realiza una vez que la maduración se ha completado, a final de enero o principios de febrero, cuando ya ha tenido lugar la inducción floral y está a punto de tener lugar la brotación de las yemas. En esta variedad, se ha descrito un comportamiento alternante a nivel de árbol individual, de parte de un árbol o incluso se ha descrito la alternancia en ramas individuales (Gravina *et al.*, 2000; Martínez-Fuentes, 2010). En el trabajo de Gravina *et al.* (2000), se observa un comportamiento típicamente alternante de esta variedad cuando se cultiva en el este de España, pero no en Uruguay, donde la intensidad de floración no desciende a valores que comprometen la producción. En el trabajo de Martínez-Fuentes (2010), llevado a cabo en España, se trabaja con 10 árboles de intensidad creciente de floración y un árbol por clase, y se encuentra alternancia en aquellos árboles con más de 30 flores por 100 nudos o con menos de 5 flores por 100 nudos.

En el presente trabajo, con objeto de estudiar la regulación del metabolismo de carbohidratos por la presencia del fruto y su relación con el comportamiento reproductivo, se utilizaron dos tipos de árboles de variedad ‘Salustiana’ con diferencia de carga extrema (0-340 frente a 1700-3100 frutos por árbol) y se consideró la posible variación entre árboles con el mismo tipo de carga para evaluar los efectos de la misma. La caracterización previa del comportamiento reproductivo alternante permitió relacionar las variaciones en carbohidratos con el suministro y la demanda de fotoasimilados a lo largo del año, así como la relación entre las reservas de carbohidratos y la formación de flores y frutos.

DISCUSIÓN

La alternancia fue un comportamiento individual de los árboles estudiados ($I^1=92\%$) y no una respuesta simultánea de los árboles de la parcela ($I=12\%$). El comportamiento vecero se observó tanto en el peso total recolectado en cada árbol, como en el número de frutos cosechados. Los árboles con baja carga triplicaron el peso individual del fruto en relación a los árboles con fructificación elevada, mientras que el peso de los frutos disminuyó al aumentar su número. Otros trabajos desarrollados con esta variedad (Gravina *et al.*, 2000) muestran también una correlación negativa del peso del fruto con el número de los mismos hasta el valor de 450 frutos por árbol, encontrando que por encima de este valor el peso se estabiliza.

- *Efecto del fruto sobre la brotación y la floración*

En condiciones subtropicales, algunos cítricos, como el mandarino satsuma, presentan una importante brotación de primavera que coincide también con la floración, y una brotación de verano en la que principalmente se forman brotes vegetativos (Goldsmichdt y Golomb, 1982; García-Luis *et al.*, 1986a). El naranjo ‘Salustiana’ tuvo un único período importante de brotación de yemas, coincidente con la floración, que comenzó a principio de la primavera, al igual que el comportamiento observado en Pakistán o Uruguay (Gravina *et al.*, 2000; Ibrahim *et al.*, 2011).

La brotación se produjo, casi exclusivamente, en los nudos situados en la madera de los 2 últimos años, y de ellos, los del primer año de edad brotaron entre 2 y 3 veces más que los de 2 años, similarmente a lo descrito en otros cítricos (Monselise, 1985; Davenport, 1990a; Krajewski y Rabe, 1995b; Valiente y Albrigo 2004).

En algunos genotipos de cítricos, se ha comprobado la acción directa del fruto en la reducción de la brotación, así como también una inhibición específica de la floración (Monselise y Goldschmidt, 1982; Becerra y Guardiola, 1984; Verreyne y Lovatt, 2009) de manera que la intensidad de la brotación y la floración es inversamente proporcional al número de frutos producidos en el año precedente. En el cultivar ‘Salustiana’ la brotación

¹ I = índice de alternancia (Verreyne y Lovatt, 2009) expresado en porcentaje.

se vio afectada por la carga de fruto, que influyó tanto en la intensidad que se produjo como en las características que mostró, en diferentes aspectos: la presencia del fruto disminuyó la disponibilidad de nudos en la primavera siguiente, el porcentaje de brotación y el porcentaje de brotes florales. La floración en ‘Salustiana’ tuvo lugar, principalmente, en las yemas axilares de los brotes vegetativos, que en variedades alternantes se forman mayoritariamente en los años *off*.

Se ha propuesto que la presencia de fruto puede afectar a diferentes procesos. En determinados cultivares, con varias brotaciones al año, el fruto puede afectar disminuyendo el número de brotes vegetativos obtenidos en la brotación de verano o de otoño y, disminuir, de este modo, el número de nudos que pueden llevar inflorescencias (Verreyne y Lovatt, 2000). La carga de fruto también puede influir en la brotación de las yemas (Becerra y Guardiola, 1984; García-Luis *et al.*, 1995a). Por último, también se ha señalado un efecto directo sobre el proceso de inducción floral o en una etapa previa de adquisición de la competencia de las yemas (Shalom *et al.*, 2012).

Los resultados obtenidos indican que el hecho de que los árboles con elevada carga de fruto disminuyan su capacidad de florecer en la siguiente primavera se debe parcialmente a que reducen a la mitad sus nudos disponibles para brotar. Esta disminución se produce por una parte porque durante un año *on* se forman pocos brotes vegetativos, lo que supone una merma de los nudos de 1 año de edad en la primavera siguiente. Por otra parte, en un año *on*, los nudos formados el año anterior brotan intensamente y, en consecuencia, hay una menor disponibilidad de nudos de 2 años de edad en la primavera siguiente. Además de encontrarse en un número situado por debajo de la mitad, los nudos de 1 y 2 años en un árbol *off* brotan menos que en un árbol *on* (22 *vs* 56% de nudos brotados). Aún así, estos factores no explican por sí solos la disminución en 25 o 30 veces del número de brotes florales y en más de 40 veces del número de flores por 100 nudos en los árboles con baja floración y que tiene como consecuencia que un árbol *on* forme más de 80000 flores, mientras que uno *off* produzca, de media, alrededor del millar. Hay por tanto una inhibición muy concreta del fruto en la formación de flores. El efecto de la disminución de flores tras un año *on* no es proporcional a la disminución de la brotación, sino que los brotes reproductivos disminuyen su número hasta casi anularse, mientras que la brotación vegetativa sí se encuentra determinada positivamente por la cantidad de nudos brotados.

DISCUSIÓN

En otros genotipos de cítricos en los que se ha estudiado la reducción de la floración por la presencia del fruto, también se ha observado que es en parte debida a un menor número de ramas portadoras de inflorescencias (El-Otmani *et al.*, 2004; Verreyne y Lovatt, 2009; Martínez-Fuentes *et al.*, 2010), a un menor número de nudos en estos brotes (Verreyne y Lovatt, 2009; Martínez-Fuentes *et al.*, 2010) y a una disminución del número de nudos brotados (Becerra y Guardiola, 1984; García-Luis *et al.*, 1986; Martínez-Fuentes *et al.*, 2010). Asimismo, trabajos con mandarino satsuma y con naranjo dulce ‘Valencia’ indican que las yemas que producen brotes generativos son las más sensibles al efecto inhibitorio del fruto, mientras que aquellas con brotes vegetativos incrementan su número (García-Luis *et al.*, 1986a, 1995b; Okuda *et al.*, 2002; Martínez-Fuentes *et al.*, 2010). Sin embargo, no hay evidencias claras de las diferencias en la tasa de ruptura de latencia de yemas en función de su naturaleza vegetativa o reproductiva (Smith y Samach, 2013).

En relación al tipo de brotes formados, hay que señalar que en árboles *off* que entraban en año *on*, los brotes reproductivos en ‘Salustiana’ fueron mayoritariamente generativos (sin hojas) y, dentro de éstos, los más abundantes fueron los multiflorales. Otros autores también encuentran más abundantes los brotes generativos que los mixtos (Agustí *et al.*, 1992; Gravina *et al.*, 2000; Martínez-Fuentes, 2010) en otras variedades cítricas con elevada intensidad de floración. Gravina *et al.* (2000) no aprecian diferencias entre la presencia de brotes generativos uniflorales o multiflorales en España, tendiendo a ser más abundantes las flores solitarias en Uruguay.

En árboles *on*, la elevada presencia del fruto disminuyó drásticamente la aparición de brotes florales en la primavera siguiente, y no se encontraron diferencias significativas entre los tipos de brotes reproductivos, dada su baja cuantía. Puede afirmarse que la mayor disminución frente a árboles con alta floración, se dio en el número de brotes generativos. Trabajos realizados con naranjo ‘Salustiana’ (Martínez-Fuentes, 2010), y con mandarino ‘Pixie’ (Verreyne y Lovatt, 2009) señalan que éstos son los brotes más afectados por el fruto, ya que son los que, en proporción, más aumentan con la eliminación temprana del mismo. Así, trabajos anteriores también muestran que, en general, las condiciones que incrementan el número de flores implican sobretudo un aumento de brotes multiflorales sin hojas (Moss, 1969 en naranjo ‘Washington Navel’; Guardiola *et al.*, 1977 en ‘Navelate’; Becerra y Guardiola, 1984 en ‘Navelina’; Agustí *et al.*, 1985 en ‘Salustiana’; Almela, 1990 en mandarino satsuma). Los resultados aquí

presentados en relación al tipo de brotes formados coinciden, pues, con los de otros autores. Sin embargo, se encontraron diferencias en la influencia del fruto en el número de flores y hojas de las inflorescencias, mientras Martínez-Fuentes (2010) indica que el número de flores por inflorescencia o el número de hojas por brote, no se ve afectado por la presencia del fruto en el árbol. El hecho de que el trabajo aquí presentado se haya llevado a cabo con árboles con diferencias muy marcadas en producción, permitió detectar un mayor número de flores y hojas en las inflorescencias de árboles con elevada floración.

- *Efecto del nivel de floración sobre la abscisión y el cuajado*

Los cítricos producen una elevada cantidad de flores que, en su mayoría, se desprenden tras la antesis en diferentes estados de desarrollo (yemas, flores, frutitos y frutos). Se ha descrito un patrón de abscisión para árboles con alta carga de floración, con dos máximos de abscisión, en diferentes cultivares de naranjo, como en ‘Navelina’ (Guardiola, 1977), ‘Navelate’ (Primo-Millo *et al.*, 1977), ‘Washington Navel’ (Ruiz *et al.*, 2001) y ‘Salustiana’ (Rebolledo, 2006), y en los mandarinos ‘Fina’ (Van-Rensburg *et al.*, 1996), ‘Fortune’ (Duarte y Guardiola, 1996) y ‘Marisol’ (García-Luis *et al.*, 2002). El hecho de que la importancia de la abscisión temprana, tanto relativa como absoluta, dependa de la intensidad de floración ha sido descrito previamente en otros cítricos (Agustí *et al.*, 1982; García-Luis *et al.*, 1988). No obstante, hay que indicar que en la variedad ‘Salustiana’ no había sido estudiada, hasta la fecha, la influencia del nivel de floración sobre el patrón de abscisión.

En árboles con elevada floración de ‘Salustiana’, coincidiendo con otros autores como Rebolledo (2006), se observó un primer máximo de abscisión (entre los 15 y los 30 DDA) debido a flores u ovarios desprendidos por la base del pedicelo. El segundo máximo, menos importante que el primero, se alcanzó entre los 40 y los 65 DDA, y principalmente consistió en el inicio de la caída de ovarios y frutitos por la base del ovario, cuyo propio máximo se alcanzó pocos días después. Estos dos picos de abscisión se corresponden con la fase I de crecimiento del fruto (división celular) y su transición a la fase II (elongación celular), considerando 3 fases de desarrollo en el fruto de los cítricos. La abscisión

DISCUSIÓN

posterior que tiene lugar en otros cítricos, cuando los frutos están maduros (Iglesias *et al.*, 2007), no se detectó en naranjo ‘Salustiana’.

Sin embargo, en los árboles con baja intensidad de floración, se observó un patrón de caída distinto. En estos árboles, al contrario que en aquellos con elevada intensidad de floración, el segundo pico fue más importante que el primero, y predominó la abscisión por la base del ovario, mientras que la abscisión en la zona del pedúnculo fue menor.

Por una parte, el cambio característico de zona de abscisión de la base del pedúnculo a la base del ovario, puede estar relacionado con el inicio del crecimiento secundario de los tejidos vasculares del pedúnculo, asociado con un incremento de los tejidos de sostén, que dificultaría la caída del fruto por esta zona. Este crecimiento está determinado por factores nutricionales u hormonales debidos tanto a la presencia de fruto como al tipo de inflorescencia (Laskowski, 2005). La mayor disponibilidad de fotoasimilados observados en los presentes resultados durante este período en árboles *off* podría dar lugar a un mayor desarrollo de tejidos vasculares, dificultando la abscisión en la base del pedúnculo.

Por otra parte, en la primera fase de abscisión, caen los órganos que supuestamente tienen una tasa de crecimiento menor (Zucconi *et al.*, 1978), lo que no llega a suceder necesariamente si la disponibilidad de metabolitos es la adecuada (Ruiz y Guardiola, 1994), como es el caso de los árboles con baja floración. En el presente estudio, la materia seca caída debida a ovarios se situó entre los 2 y los 4 kg en árboles de alta floración, y fue menor de 0,4 kg en árboles de baja floración.

También hay que señalar que en estudios previos se ha observado una variación en el patrón de abscisión en función del tipo de brote. Laskowski (2005) indica que la abscisión de frutos en brotes mixtos uniflorales de ‘Salustiana’ presenta sólo un máximo que tiene lugar de 45 a 75 DDA.

Coincidiendo con lo observado por algunos autores en otras variedades cítricas, los resultados aquí expuestos indican que la baja producción en un año *off* es debida al efecto inhibitor del fruto sobre la formación de flores en la brotación principal de primavera, pero no a un efecto negativo sobre el cuajado (Monselise y Goldschmidt, 1982; Becerra y Guardiola, 1984; Agustí *et al.*, 1985). Aunque se observó una baja intensidad de floración en la primavera siguiente tras un año de elevada cosecha, no hubo una disminución del porcentaje de cuajado ni un incremento de la abscisión de los frutos. En árboles con alta

intensidad de floración, el cuajado se situó entre el 2 y el 3%, coincidiendo con Rebolledo (2006) y Martínez-Fuentes (2010). En los árboles con bajos niveles de floración el cuajado tomó valores muy superiores (47-67%). En los primeros, el número de frutos que cuajaron y finalmente llegaron a ser cosechados, no dependió de la intensidad de floración, mientras que en árboles poco productivos se estableció una relación exponencial entre ambos parámetros. Estos resultados están de acuerdo con lo señalado por Martínez-Fuentes (2010) en la misma variedad y para muy diversos niveles de floración y con trabajos en otras variedades (Becerra y Guardiola, 1984; Agustí *et al.*, 1985). No obstante, los presentes resultados muestran un porcentaje de cuajado para árboles con baja floración algo superior a los señalados por Martínez-Fuentes (2010), lo que podría estar relacionado con una variación en el tipo de inflorescencias formadas. Hay que señalar que en ‘Salustiana’ el tipo de brotes reproductivos formados determina el nivel de cosecha, ya que el cuajado de fruto por inflorescencia es mayor en brotes multiflorales que en uniflorales (Rebolledo, 2006). Esto también se ha descrito en otras variedades de naranjo (Primo-Millo *et al.*, 1977; Erner y Shomer, 1996), si bien sigue sin conocerse cuál es el factor que determina un mayor cuajado en brotes multiflorales.

Teniendo en cuenta las diferencias en requerimientos de fotoasimilados entre árboles con diferentes niveles de fructificación y en las diferentes etapas de crecimiento, a continuación se analizan las variaciones en la tasa fotosintética y la importancia de la carga del árbol en esta variación, en relación con los factores ambientales.

2. VARIACIÓN ESTACIONAL DE LA FOTOSÍNTESIS E INFLUENCIA DE LA CARGA DEL ÁRBOL

El cuajado del fruto en cítricos, y en las plantas en general, depende críticamente de la acumulación de carbono y nutrientes en los frutos en desarrollo. Esta acumulación está determinada por un equilibrio hormonal favorable, resultado bien de la polinización efectiva, o bien de la capacidad partenocárpica de los frutos para desencadenar la síntesis de hormonas sin que medie la fecundación.

Los cítricos producen normalmente un número elevado de flores por árbol, hasta más de 100 millares, de los que solamente un pequeño porcentaje formará fruto (Monselise, 1986;

DISCUSIÓN

Agustí *et al.*, 1992). En su mayor parte, se desprenden del árbol en el plazo de unas 12 semanas después de la antesis, en muchos casos cuando el ovario ha iniciado el crecimiento y ha aumentado de peso hasta 50 veces. Este proceso de abscisión se ha interpretado como un mecanismo de autorregulación, que ajusta continuamente el número de frutos supervivientes a la capacidad de suministro de metabolitos por el árbol (Guardiola, 1988). Este hecho implica que el cuajado del fruto es resultado de una combinación favorable de niveles de hormonas y de un suministro suficiente de carbohidratos (Ortolá *et al.*, 1997; Talón *et al.*, 1997; Gómez-Cadenas *et al.*, 2000). La función reguladora de los carbohidratos en el cuajado, y el carácter limitante del suministro de éstos en dicho proceso, se confirma por el aumento del cuajado que producen las técnicas que incrementan su disponibilidad para los frutos en desarrollo, como el anillado (Guardiola, 1988; Duarte y Guardiola, 1996) y el enriquecimiento de la atmósfera con CO₂ (Downton *et al.*, 1987). El análisis detallado del proceso ha permitido establecer que la abscisión que tiene lugar en las primeras semanas tras la antesis no está determinada únicamente por los niveles de carbohidratos de la planta (Ruiz y Guardiola, 1994; Iglesias *et al.*, 2007). La existencia de una señal hormonal (Bangerth, 1989, 2009) o la actuación de un proceso estocástico (Ganeshia y Uma-Shaanker, 1994), se han señalado como causantes de la abscisión en esta fase del desarrollo. En etapas más tardías, la abscisión parece estar determinada por la disponibilidad en carbohidratos (Ruiz *et al.*, 2001). Durante este período la tasa de acumulación de materia seca en el frutito excede la capacidad fotosintética de las hojas de la inflorescencia, y los frutos en desarrollo captan carbohidratos de otras partes de árbol, estableciéndose una competencia por los fotoasimilados disponibles. Esta abscisión tardía determina el cuajado del fruto.

La disponibilidad en carbohidratos durante el cuajado depende de las reservas acumuladas con anterioridad, y de la fijación fotosintética en ese momento. Se acumulan carbohidratos en diversos órganos de la planta (raíz, tallo y hojas) durante el reposo invernal y al principio de la brotación de primavera (Sanz *et al.*, 1987; García-Luis *et al.*, 1995a; Monerri *et al.*, 2011). Estas reservas se utilizan durante la fructificación, si bien a un ritmo variable. En ocasiones las reservas se agotan pocas semanas después de la floración, de tal modo que durante las últimas fases de la abscisión, la nutrición depende de la fotosíntesis, mientras que en otros casos las reservas se utilizan gradualmente y contribuyen a la nutrición de los frutitos en desarrollo en ese momento (González-Ferrer

et al., 1984). Estudios ulteriores han demostrado que las diferencias en la movilización de las reservas más que una característica varietal, están causadas por diferencias en el nivel de floración. Una floración abundante, por otro lado frecuente, provoca un agotamiento precoz de las reservas y tiene como resultado la dependencia del cuajado frente a la fotosíntesis (Fortunato-Almeida, 2003).

Esta dependencia justifica el estudio en profundidad de los factores que limitan al proceso fotosintético durante el año. En este sentido se ha analizado la influencia de factores internos de la planta, como capacidad fotosintética de las hojas o la fuerza de los sumideros, y la importancia relativa de las principales limitaciones medioambientales.

Los principales aspectos de la regulación de la fotosíntesis de los cítricos se han revisado de manera crítica por Syvertsen y Lloyd (1994) y Goldschmidt y Koch (1996). La tasa de fijación de CO₂ en estas especies es del orden de 2 a 10 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, en el límite inferior del rango que se encuentra en las plantas leñosas, factor que se ha relacionado con la estructura anatómica de sus hojas (Syvertsen y Lloyd, 1994). Además de las limitaciones impuestas por las características de las hojas (edad, posición, orientación, etc.), otros procesos, tanto internos (como las relaciones fuente-sumidero), como externos (luz, temperatura, etc.) limitan la tasa fotosintética en cítricos.

- *Influencia de las condiciones ambientales en la tasa fotosintética*

Los cítricos son árboles perennifolios sujetos a las variaciones estacionales de las condiciones ambientales propias del ciclo anual. Se han realizado importantes esfuerzos con el objetivo de conocer la influencia de diferentes factores ambientales tales como el déficit de agua, altas temperaturas y altas irradiancias, sobre la fotosíntesis de las hojas de cítricos (Vu y Yelenosky, 1988; Brakke y Allen, 1995; Jifon y Syvertsen, 2003; Guo *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2011; Ribeiro *et al.*, 2012). Sin embargo, la mayoría de los resultados se han obtenido estudiando la respuesta fisiológica a un determinado factor con árboles cultivados bajo condiciones controladas y durante un corto período de tiempo. Son escasos los experimentos a lo largo de un año y con plantas adultas cultivadas en campo, en condiciones naturales, como los presentados aquí. El trabajo de Ribeiro y Machado

DISCUSIÓN

(2007) desarrollado en Brasil sobre la variación estacional de la asimilación de CO₂ en hojas, es una excepción.

El clima típicamente mediterráneo de la Comunitat Valenciana se caracteriza por veranos secos y calurosos. Las precipitaciones se acumulan en primavera y, mayormente, en otoño, y éstas son frecuentemente en forma de tormentas. Las temperaturas invernales son moderadas. Estas condiciones climáticas son muy diferentes a las de las zonas donde se han realizado los estudios previos, y por lo tanto, son de gran interés las contribuciones que puedan realizarse sobre el conocimiento en las variaciones de la fotosíntesis en cítricos cultivados en condiciones de campo en una zona tan importante para la producción citrícola.

Los resultados expuestos indican que las hojas de naranjo ‘Salustiana’ expuestas al sol, bajo las condiciones climáticas de Valencia, muestran ligeras variaciones entre los diferentes meses del año en la tasa fotosintética (A_N), con valores medios mensuales máximos de 8,3 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en noviembre, y mínimos de 3,4 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en febrero. Los valores medios diarios pueden alcanzar valores máximos de 13,7 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en un día nublado de junio y valores cercanos a 1 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en un día caluroso o en invierno. Estos valores coinciden con los descritos por Spiegel-Roy y Goldschmidt (1996), Syvertsen y Lloyd (1994) y Ribeiro y Machado (2007). Sin embargo, del presente trabajo se deriva una observación interesante: la variación entre meses es mucho menos importante que la existente entre los días de un mismo mes. Más del 90% de la variación puede ser explicada por los cambios en las condiciones ambientales que se dan entre los diferentes días de un mes. Por lo tanto, los cambios estacionales de las condiciones ambientales son menos importantes que los cambios diarios en relación a la fotosíntesis.

Los principales factores ambientales que influyen sobre la tasa fotosintética son la radiación fotosintéticamente activa (PAR), la temperatura y la diferencia de presión de vapor entre la hoja y la atmósfera (DPV; Vu y Yelenosky, 1988; Brakke y Allen, 1995; Jifon y Syvertsen, 2003; Guo *et al.*, 2006), que están, además, correlacionados entre ellos. La respuesta de A_N en las hojas expuestas al sol a estas variables siguió un patrón de una curva de optimización. Las condiciones óptimas de PAR (550-600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), T_h (25-30 °C) y DPV (20-25 mbar) son similares a las indicadas por otros trabajos con cítricos (Brakke y Allen, 1995; Jifon y Syvertsen, 2003).

La disminución de A_N a elevados valores de PAR pueden ser debidos a un exceso en la energía de excitación, lo que puede provocar la fotoinhibición del fotosistema II (Ort, 2001; Jifon y Syvertsen, 2003). En este trabajo, se observó la existencia de fotoinhibición dinámica en hojas expuestas al sol directo. A altos niveles de PAR se produjo un descenso de la eficiencia máxima del PSII (F_v/F_m) a lo largo del día, si bien, estos cambios diarios fueron reversibles, y ésta se recuperó durante el período nocturno. Otros autores (Syvertsen, 1984; Jifon y Syvertsen, 2003) han indicado que las hojas de cítricos pueden aclimatarse a las condiciones de radiación elevadas y sufren un daño permanente menor. Aunque otros mecanismos pueden estar funcionando, se ha sugerido que en cítricos el ciclo de las xantofilas tenga un papel relevante en la protección frente la fotoinhibición (Gilmore y Ball, 2000). Valores de PAR por debajo de $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ también disminuyeron la tasa fotosintética. Este efecto pudo ser parcialmente mediado por la temperatura.

Pocos trabajos han estudiado la influencia de las bajas temperaturas en la fisiología de los cítricos (Syvertsen *et al.*, 1983; Vu y Yelenosky, 1987; Ribeiro y Machado, 2007; Santos *et al.*, 2011; Ribeiro *et al.*, 2012). Vu (1999) y Ribeiro y Machado (2007) han descrito una reducción de la tasa máxima de carboxilación de RuBisCO (V_{cmax}) y de la capacidad de transporte electrónico que conduce a la regeneración de RuBP (J_{max}) en invierno. En el presente estudio, se pudo observar una correlación positiva entre la temperatura de la hoja y la fotosíntesis para temperaturas por debajo de 25°C . La conductividad estomática (g_s) también tuvo una correlación positiva con la temperatura para este rango de valores. Estas observaciones concuerdan con las de Ribeiro y Machado (2007), que sugieren una baja sensibilidad de los estomas a la temperatura en un rango entre 25 y 40°C . Fuera de este intervalo (tal y como ocurre en Brasil en durante el invierno), la apertura estomática sí resultó afectada por la temperatura. Sin embargo, hay que matizar que esto es lo que sucedió con valores de presión de vapor de agua menores de 20 mbar.

Temperaturas superiores a 30°C , frecuentes desde mayo a septiembre en la Comunitat Valenciana, afectaron negativamente a la tasa fotosintética. La media mensual máxima de la temperatura de la hoja se registró en julio (40°C) y la media diaria máxima se observó a mitad de este mismo mes ($46,6^\circ\text{C}$), con valores de A_N cercanos a cero ($0,68 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). La disminución de A_N observada con altas temperaturas pudo ser debida tanto a factores

DISCUSIÓN

directamente relacionados con los estomas como a factores no estomáticos. Se observó una fuerte correlación entre T_h y DPV, siendo DPV un factor ambiental importante que regula la apertura estomática. Una elevada DPV disminuyó directamente la conductividad estomática, pudiendo limitar de esta manera la difusión de CO_2 al interior de la hoja. Si la disminución de A_N hubiera estado causada principalmente por la reducción de g_s , hubiera cabido esperar una disminución de la presión parcial de CO_2 en los espacios intercelulares de la hoja (C_i) al bajar A_N . Sin embargo, en el presente trabajo, se observó una correlación negativa entre A_N y C_i cuando la temperatura de la hoja fue mayor de 30°C . Estos datos sugieren que, a altas temperaturas, la reducción de A_N parece estar más relacionada con factores no estomáticos que con la conductancia estomática (g_s). Se han obtenido resultados similares en los trabajos de Jifon y Syvertsen (2003) y Hu *et al.* (2007) al estudiar la disminución de A_N en el estrés por radiación solar y altas temperaturas. Estos autores indican que la estimulación de la fotorrespiración y la respiración diurna a altas temperaturas pueden incrementar C_i , y por lo tanto provocar el cierre estomático y la disminución de la carboxilación en el ciclo de Calvin.

Una cuestión importante es que la variación estacional de la tasa fotosintética se midió en hojas expuestas al sol, al igual que la mayoría de los estudios. Sin embargo, las hojas expuestas directamente al sol representan alrededor del 20% del total de la superficie foliar en una sección transversal de una copa de un árbol de naranjo (Cohen y Fuchs, 1987). Los resultados del presente trabajo muestran que la media en PAR en la copa interna durante la estación con mayor irradiancia fue de alrededor de $170 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, lo que representa el 13% de la irradiancia externa. La PAR en capas profundas es mayor que el punto de compensación de la luz y promueve por lo tanto la fijación neta de CO_2 . Sin embargo, la tasa fotosintética fue menor del 50% de la que tiene lugar en la copa externa. Nuestros resultados pueden explicar que en algunos experimentos con sombreado (Syvertsen *et al.*, 2003) la cosecha no se incremente. Ribeiro y Machado (2007) indican que hojas sombreadas de cítricos tienen potencial para aclimatarse a una baja PAR, mostrando un aumento en el contenido en clorofila y, consecuentemente, incrementando la eficiencia en absorción de luz. Sin embargo, los resultados aquí presentados difieren de lo anterior, porque el contenido en clorofila fue menor en la parte interna de la copa, y cuando las hojas internas fueron expuestas a una elevada PAR, similar a la que estuvieron expuestas

las hojas externas ($1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), respondieron incrementando rápidamente la tasa fotosintética, pero no alcanzaron el nivel de las hojas externas.

Adicionalmente, otra importante cuestión relacionada con la variación de la tasa fotosintética en cítricos es la orientación de la copa. En el presente estudio, la copa orientada hacia el sudeste recibió radiación solar directa durante la mañana. Inversamente, la orientación noroeste recibió radiación solar directa al atardecer. Al igual que ocurrió en las hojas internas, en las hojas orientadas al noroeste, una menor PAR (sólo un 4% de la radiación recibida en las hojas orientadas hacia el sudeste) dio lugar a un descenso en la tasa fotosintética (sólo un 13% de la que presentaron las hojas de la copa orientada al sudeste). Sin embargo, no hubo diferencias en el contenido de clorofila debido al hecho de que todas las hojas recibieron radiación solar directa.

- *Efecto de la carga del árbol sobre la fotosíntesis*

La regulación de la fotosíntesis (A_N) por la fuerza sumidero ha sido demostrada en cítricos, tanto en árboles cultivados en maceta (Syvertsen y Lloyd, 1994; Goldschmidt y Koch, 1996; Iglesias *et al.*, 2002) como alterando el balance fuente-sumidero en el árbol, bien a través de experimentos de anillado (Li *et al.*, 2003a), eliminando el fruto (Syvertsen *et al.*, 2003) o en discos de hojas en oscuridad (Ribeiro *et al.*, 2012). Sin embargo, hasta qué punto la demanda de fotoasimilados regula la tasa fotosintética en cítricos en condiciones normales de campo, o el mecanismo de regulación implicado, ha recibido menor atención (Goldschmidt y Koch, 1996).

En el presente trabajo, se midió A_N en árboles de más de 30 años de edad, bajo condiciones de cultivo en campo y a través de diversos estados de desarrollo a lo largo del ciclo anual. Los datos aquí presentados apoyan la hipótesis de que la fotosíntesis en árboles de cítricos no manipulados está limitada por las fuentes más que por los sumideros a lo largo del año. No se observaron diferencias significativas en la tasa fotosintética entre árboles con y sin carga de frutos, independientemente de su estado de desarrollo. Tal y como se ha demostrado en especies leñosas de hoja caduca, como en manzano (Lakso *et al.*, 1989) y en cerezo (Flore y Layne, 1999), la carga de fruto no tiene efecto sobre la fotosíntesis ya que los carbohidratos pueden ser transportados a

sumideros alternativos. Las presentes observaciones están de acuerdo con Goldschmidt y Koch (1996) y con Monerri *et al.* (2011), quienes indican que el sistema radicular puede ser un sumidero no saturable en condiciones de cultivo de campo y en árboles adultos, y que la tasa de asimilación de CO₂ de árboles sin fruto es similar a la de árboles con alta carga de fruto. Además, considerando los cambios estacionales en el contenido en carbohidratos en las hojas de cítricos, la fotosíntesis no estuvo regulada por los niveles absolutos de carbohidratos solubles.

Sin embargo, Syvertsen *et al.* (2003) describen que durante el invierno (final de junio en el hemisferio sur, equivalente a final de diciembre en el hemisferio norte), árboles de naranjo ‘Navel Spring’ en los que se elimina el fruto presentan una tasa fotosintética un 40% menor que los árboles con fruto (incluso árboles con el fruto ya cosechado). La eliminación del fruto puede provocar un cambio temporal en A_N (Gucci *et al.*, 1991) y además, los árboles utilizados por Syvertsen *et al.*, (2003) fueron de menor tamaño (5 años de edad) que los utilizados en el presente estudio, por lo que la fuerza sumidero de la raíz en estos árboles jóvenes puede ser mucho menor. La manipulación artificial de la relación fuente-sumidero puede alterar el estado del carbono del árbol y, a su vez, alterar la relación entre carbohidratos y fotosíntesis, de forma que los resultados pueden no ser comparables a las condiciones de cultivo habituales.

Aunque no se observaron diferencias en la tasa fotosintética de las hojas de ramas vegetativas entre árboles *on* y *off*, es de interés remarcar que en el mismo árbol con carga elevada de fruto, las hojas de brotes con un fruto presentaron una tasa fotosintética ligeramente menor (10%) que aquellas de brotes sin fruto. Esto se observó durante todos los estados de desarrollo del fruto. Resultados similares han sido descritos por Syvertsen *et al.* (2003), quienes proponen que un menor contenido en nitrógeno en hojas de brotes con fruto podría justificar estos resultados (Sanz *et al.*, 1987). El trabajo de Fortunato-Almeida (2003), apoya esta afirmación y, además, también observa la disminución en el contenido de otros elementos que influyen en la tasa fotosintética, como en potasio y en fósforo. El fósforo juega un papel fundamental en el almacenamiento y uso de la energía de la fotosíntesis, mientras que el potasio es crucial en la regulación osmótica de la apertura estomática (Epstein y Bloom, 2005). Una deficiencia en cualquiera de estos dos elementos puede causar la baja tasa fotosintética. Monerri *et al.* (2011) indican que, tras el período de abscisión del fruto en junio, el 13% de los brotes con hojas en árboles *on* de

‘Salustiana’ presenta un fruto, mientras que sólo un 1% tienen fruto en los árboles *off*. Teniendo en cuenta estos datos, la disminución de la tasa fotosintética en las hojas de brotes con fruto se ha de tener en cuenta cuando se estima la fijación de CO₂ diaria en árboles con diferente carga.

En ramas con fruto, la tasa fotosintética, la conductividad estomática y la tasa de transpiración también dependieron de la posición de la hoja a lo largo del brote. La redistribución de los elementos minerales de hojas al fruto, estimuladas en condiciones de limitación en el aporte, puede iniciarse en las hojas más viejas de la rama (Nebauer *et al.*, 2013), explicando la disminución de los parámetros fotosintéticos en las hojas a medida que aumenta la distancia al fruto en el brote.

- *Efecto de la edad de la hoja sobre la fotosíntesis*

La variación de las tasas de asimilación de CO₂ en relación con la edad de la hoja sólo ha sido estudiada hasta ahora en árboles de mandarino satsuma (Iglesias *et al.*, 2002). Según estos autores, la exportación de fotoasimilados y la actividad de las fuentes es máxima a lo largo del primer año, mientras que durante el segundo año, la tasa fotosintética de las hojas se recupera, tras el invierno, a valores del 60-70% de los observados en el año anterior. Los presentes datos confirman que en naranjo dulce ‘Salustiana’ la capacidad fotosintética de la hoja permanece estable durante el primer año de su vida, y decrece durante el segundo año un 20%, tanto en árboles *on* como en árboles *off*. Teniendo en cuenta la diferencia en el número de hojas jóvenes y viejas entre árboles *on* y *off*, y las diferencias en la tasa de fijación neta de las mismas, puede estimarse que la fijación neta de CO₂ por unidad de tiempo y árbol es similar entre árboles con diferente carga. Las diferencias en el contenido en carbohidratos metabolizables en las hojas analizadas sugieren por lo tanto diferencias en la partición de fotoasimilados en el árbol.

3. VARIACIÓN ESTACIONAL EN EL CONTENIDO EN CARBOHIDRATOS: EFECTO DEL FRUTO Y SU RELACIÓN CON LA FLORACIÓN Y EL CUAJADO

El fruto es el principal sumidero en los cítricos, de forma que en árboles con elevada carga, su presencia inhibe el transporte de carbohidratos a la raíz (García-Luis *et al.*, 1995a) y la acumulación de reservas (Goldschmidt y Koch, 1996). Se ha estimado en unos 24 kg la cantidad de reservas invernales durante un año *off* en árboles adultos de mandarino ‘Wilking’ (Goldschmidt y Golomb, 1982). Estas reservas son movilizadas durante el siguiente año (*on*), y se ha especulado que podrían cubrir buena parte de los requerimientos de materia seca de la siguiente cosecha. Sin embargo, la contribución de las reservas al cuajado del fruto varía entre cultivares, y los niveles de carbohidratos no son el único factor que regula la formación de flores. En este trabajo se ha estudiado la variación anual en el contenido en carbohidratos en función de la carga de fruto del árbol y su posible papel en la regulación de la transición e iniciación floral en el naranjo dulce ‘Salustiana’.

- *Cambios estacionales en las reservas de carbohidratos*

Los estudios sobre la variación anual de las reservas de carbohidratos en cítricos han sido escasos hasta ahora, ya que la mayoría de los experimentos publicados en esta materia se limitan a sólo unos meses. Muchos de ellos, además, se han centrado fundamentalmente en las hojas (Borrás *et al.*, 1984; García-Luis *et al.*, 1995a; Ruiz *et al.*, 2001). No obstante, también se han publicado estudios sobre variaciones estacionales en carbohidratos no estructurales en raíces y tejidos del brote (Goldschmidt y Golomb, 1982; García-Luis *et al.*, 1995a; Laskowski, 2014; DAVIS *et al.*, 2014). Sólo recientemente se han llevado a cabo estudios más completos en mandarino ‘Dancy’ (*Citrus reticulata*) y naranjo ‘Valencia’ (Laskowski, 2014), en mandarino ‘Moncada’ (Martínez-Alcántara, 2015) y en naranjo ‘Salustiana’ (Monerri *et al.*, 2011) donde se han incorporado parte de los resultados de este trabajo.

En el presente estudio, que se extendió durante un año completo, se comprobó que la presencia de fruto determinó la partición de fotoasimilados en los árboles de ‘Salustiana’. En las hojas, los azúcares solubles tendieron a mantener un nivel constante, mientras que

el exceso de carbono fijado se canalizó a la producción de almidón, que fue el carbohidrato que presentó mayores variaciones. Destacó, no obstante, un incremento en azúcares solubles durante la época invernal, que se produjo con independencia de la presencia de fruto. Este comportamiento se ha descrito similarmente en otros cultivares (García-Luis *et al.*, 1995a) y se ha relacionado el papel de estos azúcares solubles con la protección frente a bajas temperaturas invernales (Goldschmidt y Koch, 1996).

Los cambios en las reservas de carbohidratos durante el año reflejaron las variaciones entre la oferta y la demanda de los mismos. El requerimiento de carbohidratos durante las primeras etapas de crecimiento vegetativo y reproductivo en los árboles que entraron en un año *on* produjo una caída de reservas en la hoja, que alcanzaron su mínimo en junio, tras la abscisión de fruto. En los árboles que entraron en un año *off*, la baja demanda en carbohidratos provocó que la acumulación de los mismos se mantuviera alta durante la primavera, llegando a su concentración máxima en junio, siendo en este momento más del doble que en los árboles *on*.

Tras el período de abscisión del fruto, los niveles de carbohidratos en las hojas se mantuvieron bajos hasta el invierno en los árboles *on*. En árboles *off*, éstos descendieron en junio hasta alcanzar en septiembre un nivel similar al de los árboles con alta carga de fruto. Durante los meses de invierno y hasta la brotación se produjo un incremento en ambos tipos de árboles. Así, la concentración de carbohidratos en las hojas de los árboles *on* fue menor que en los *off* desde marzo hasta agosto, pero se igualó desde septiembre hasta febrero. En el mandarino alternante ‘Moncada’ (Martínez-Alcántara *et al.*, 2015), se ha descrito recientemente un patrón diferente en la variación anual de carbohidratos, en el que se acumulan carbohidratos en otoño en árboles *on* y *off*, y sólo se acumulan en invierno en árboles *off*. Estas diferencias en la variación de reservas podrían ser debidas a las características varietales en cuanto a hábitos de brotación y desarrollo del fruto.

Como no se encontraron efectos del fruto sobre la fotosíntesis ni sobre los carbohidratos acumulados en las hojas durante los meses de septiembre a febrero, la mayor parte del carbono fijado por los árboles *off* se debió transportar al sistema radical. Esta conclusión está apoyada por los experimentos de rayado aquí presentados (Fig. 40), en los cuales se observó una acumulación de carbohidratos en hojas por encima del rayado en los árboles sin fruto. Se ha publicado que el mayor transporte a las raíces de los hidratos de carbono

detectado en naranjo ‘Salustiana’ en árboles *off*, no aumentan las reservas en las mismas hasta final de otoño ni afectan a su crecimiento (Monerri *et al.*, 2011), lo cual sugiere que podrían ser utilizadas en el engrosamiento de las raíces principales. A este respecto, Goldschmidt y Golomb (1982) indican el doble de peso de las principales raíces después de un año *off* en mandarina ‘Wilking’. A partir de noviembre-diciembre sí que existe la acumulación de carbohidratos en raíces de árboles *off*, mientras que en árboles *on*, a pesar de la baja fuerza sumidero del fruto a partir de diciembre, éste impide la acumulación de reservas de carbohidratos en las raíces (Monerri *et al.*, 2011). Éstas aumentan sólo después de la cosecha, un efecto también observado en árboles de mandarina satsuma ‘Owari’ cultivados en maceta (García-Luis *et al.*, 1995b). Este efecto del fruto, cuya regulación se desconoce, no afecta a la acumulación de carbohidratos en hojas desde septiembre hasta febrero. Como señalan Goldschmidt y Golomb (1982), las hojas no son siempre los órganos indicadores más sensibles.

- *Papel de las reservas de hidratos de carbono en la floración*

En el presente trabajo y, como se ha señalado anteriormente, se ha constatado un efecto inhibitor del fruto sobre la floración en el cultivar ‘Salustiana’, que no puede explicarse exclusivamente por una disminución del número de nudos disponibles, o por la disminución de la brotación de los mismos, sino que afecta directamente a la obtención de un porcentaje de brotes florales mucho menor. Esta inhibición de la formación de la flor, tras un período de una carga elevada de fruto, se ha intentado relacionar, por diversos autores, con los niveles de carbohidratos (Goldschmidt *et al.*, 1985; García-Luis *et al.*, 1988). Sin embargo, en muchas publicaciones se concluye que el efecto inhibitorio del fruto sobre la floración no puede ser explicado únicamente por la merma en la disponibilidad de carbohidratos que se deriva de su presencia (García-Luis *et al.*, 1995a; Guardiola y García-Luis, 2000; Yahata *et al.*, 2004; Dosis *et al.*, 2014).

En algunos cultivares de cítricos alternantes de maduración tardía, el fruto en desarrollo impide la acumulación de hidratos de carbono en todos los órganos de árboles durante un ciclo *on* (Syvertsen y Lloyd, 1994). El naranjo ‘Salustiana’ utilizado en este estudio es de maduración relativamente temprana, y la baja fuerza sumidero de frutos después de noviembre permitió la acumulación de reservas durante el invierno en hojas y brotes.

Durante el período de inducción de la floración y hasta la iniciación de la brotación (desde principios de noviembre hasta febrero), los niveles de carbohidratos en estos órganos fueron similares en árboles *on* y *off*. Por lo tanto, puede concluirse que las reservas de carbohidratos en hojas no tuvieron un papel regulador durante la inducción y el desarrollo de las flores, si bien este papel ha sido propuesto por Goldschmidt (1999), García-Luis y Guardiola (2000) o Martínez-Fuentes *et al.* (2010). Nuestros resultados acerca de la variación anual en el contenido en carbohidratos en hojas, difieren de aquellos observados en otras variedades alternantes. Así, en el trabajo reciente de Martínez-Alcántara *et al.* (2015) en mandarino ‘Moncada’, que presenta tres períodos anuales de brotación, aparecen importantes diferencias en el contenido en carbohidratos entre los árboles *on* y *off* durante el otoño y principios del invierno, cuando tiene lugar la inducción floral y el desarrollo de las flores, lo que no se observa en este trabajo. En el cultivar ‘Salustiana’ aparecen diferencias muy acusadas de almidón entre los árboles *on* y *off*, desde mayo hasta agosto, período anterior a aquél considerado de inducción floral, de forma que no se puede descartar el hecho de que en las yemas tenga lugar un proceso de adquisición de competencia, previo a la inducción, que estuviera influido por la disponibilidad de carbohidratos en hojas, y que pudiera explicar parcialmente las diferencias observadas en floración.

En los árboles *off* también se observa una menor capacidad de brotación, que afecta, aunque en menor medida que la inhibición de la formación de flores, a la disminución de la floración. Las diferencias en las reservas de carbohidratos en hojas entre árboles con diferente carga de fruto, en el período inmediatamente anterior al de la brotación, no pueden ser causa de las diferencias observadas en la misma, aunque el mayor contenido en almidón en corteza, observado en este trabajo, y en raíces (Monerri *et al.*, 2011) en los árboles *off*, sí podría influir en el proceso. Monerri *et al.* (2011) indican una utilización de éstas reservas acumuladas en la corteza de los brotes y en las raíces en el proceso de brotación. No obstante, dado que las yemas brotadas de árboles tras un año *on* son mayormente vegetativas, el factor más importante en la disminución de la floración no es el número de yemas brotadas, sino la determinación de las mismas, que podría estar mediada por el contenido en carbohidratos en una época previa a la inducción floral en que tendría lugar un proceso de adquisición de competencia, pero no puede descartarse un efecto del fruto mediado por hormonas.

Hay autores que mantienen la hipótesis de que la mayoría de yemas de árboles adultos sufren inducción floral pero su desarrollo posterior está bajo el control de un inhibidor que, cuando actúa, o bien la yema no brota o revierte su capacidad de florecer y brota como vegetativa (Martínez-Fuentes *et al.*, 2004; Goldschmidt y Samach, 2004).

- *Utilización de las reservas durante el cuajado del fruto*

Las reservas de carbohidratos en hojas al inicio de la brotación, que fue similar en árboles *on* y *off*, y de parecido orden de magnitud que las señaladas en otros agrios (Goldschmidt y Koch, 1996), fueron utilizadas durante la brotación y la floración. Durante el período de abscisión del fruto (mayo y junio), en el que la competencia por los hidratos de carbono se considera que es un factor limitante para la retención de la fruta en el árbol (Goldschmidt, 1999), el nivel de carbohidratos cayó a un nivel mínimo y el suministro al fruto fue mantenido por la fotosíntesis. El contenido de carbohidratos relativamente alto en las hojas (Goldschmidt y Koch, 1996; Ruiz *et al.*, 2001; Martínez-Alcántara *et al.*, 2015) y en la corteza (Monerri *et al.*, 2011; Martínez-Alcántara *et al.*, 2015) durante la abscisión (en torno al 10% de materia seca) podría constituir una fracción no aprovechable metabólicamente.

En los trabajos llevados a cabo en distintas especies leñosas (Loescher *et al.*, 1990) el sistema radical es el principal órgano de reserva de carbohidratos. En ‘Salustiana’ también se ha observado un empleo de las reservas en raíces al inicio de la brotación, en particular en las raíces fibrosas, coincidiendo con el reinicio del crecimiento de las mismas (Monerri *et al.*, 2011). Este hecho no sugiere un papel relevante de las reservas en las raíces en el cuajado del fruto. Los experimentos de anillado aquí expuestos muestran que en estas fechas el sistema radical compete con el fruto por los carbohidratos disponibles.

Loescher *et al.* (1990) proponen una conclusión similar en su revisión acerca de las reservas en raíces en árboles de hoja caduca. Una parte importante de las reservas almacenadas durante el año *off* habrían sido destinadas a la formación de flores excedentes, cuyo coste, en nuestro estudio, fue de unos 6 kg de materia seca. Esta formación de flor excedente tiene poco o ningún efecto sobre el cuajado de los frutos

(Becerra y Guardiola, 1984), aunque en algunas condiciones, puede limitarlo (Becerra y Guardiola, 1984; Guardiola *et al.*, 1984).

4. EFECTO DEL INCREMENTO EN EL CONTENIDO EN CARBOHIDRATOS MEDIANTE TÉCNICAS DE RAYADO DURANTE EL PERÍODO DE ADQUISICIÓN DE COMPETENCIA E INDUCCIÓN FLORAL

Estudios previos han detectado efectos del rayado de ramas sobre la floración de naranjo ‘Salustiana’ entre agosto y noviembre (Agustí *et al.*, 1992). En este contexto, se realizaron tratamientos de rayado desde junio, cuando las diferencias en carbohidratos entre árboles *on* y *off* fueron máximas y podrían explicar las diferencias en floración, suponiendo que fuera ésta la época en que las yemas adquieren competencia, hasta noviembre.

Es bien conocido que las técnicas de rayado permiten modificar el nivel de azúcares en los cítricos, si bien otros cambios bioquímicos que se desencadenan tras el rayado han sido poco estudiados, y todavía no se dispone de una interpretación detallada de los efectos fisiológicos de esta práctica. Se ha comprobado que, además de aumentar el contenido de carbohidratos en la parte aérea (Li *et al.*, 2003a), el rayado ejerce un efecto hormonal (Goren *et al.*, 1971; Wallerstein *et al.*, 1973; Talón *et al.*, 2000; Mehouchi *et al.*, 2009) sobretodo en relación al cuajado y desarrollo del fruto. También se ha descrito un aumento de la actividad fotosintética tras el anillado en las hojas próximas al fruto (Rivas *et al.*, 2007), aunque estos resultados no son consistentes con los de otros autores (Nebauer *et al.*, 2011). Asimismo, existen evidencias de que el anillado produce un cambio oxidativo durante la acumulación de carbohidratos activando mecanismos de defensa tanto enzimáticos como no enzimáticos (Rivas *et al.*, 2008). Se ha apuntado hacia un posible papel señalizador de las especies reactivas de oxígeno y de los metabolitos antioxidantes que, al igual que a consecuencia del estrés hídrico o del frío, podrían modificar procesos fisiológicos como la latencia o la floración en *Citrus*.

Los azúcares tienen una función reguladora que va más allá de la función nutricional y energética, y se ha comprobado su relación con la regulación de la expresión de genes (Koch, 1986; Jang y Sheen, 1997; Smeekens, 2000; Koch y Zeng, 2002). Uno de los objetivos del presente trabajo ha sido comprobar si la modificación de los niveles de

DISCUSIÓN

carbohidratos en la parte aérea provocados por el rayado en árboles con diferente carga de fruto, podrían estar relacionados con las características de la brotación y de la floración de la siguiente primavera.

Los resultados de los tratamientos de rayado aquí expuestos no permiten descartar que el menor contenido en carbohidratos que se observó entre mayo y agosto en los árboles *on* debido a la presencia de fruto, estuviera mediando la menor floración de éstos árboles.

El tratamiento de rayado de todas las ramas principales del árbol realizado en junio, que provocó un incremento en carbohidratos en árboles *off*, fundamentalmente en azúcares solubles, y cercano al 20%, no se tradujo en un mayor porcentaje de brotes reproductivos. Teniendo en cuenta que los árboles *off* sin rayar ya disponían de un nivel de carbohidratos muy elevado, la falta de efecto sobre la floración podría ser debida a que a estos niveles la respuesta ya estuviera saturada. En los árboles *on*, con un bajo nivel de carbohidratos en este período, no se consiguió un aumento en la acumulación de carbohidratos como consecuencia del rayado, debido a la presencia de fruto. Este efecto de la presencia de sumideros sobre la acumulación de carbohidratos tras un tratamiento de rayado ha sido observado también en otras variedades cítricas (García-Luis *et al.*, 1995a; Li *et al.*, 2003a). Así pues, a partir de los experimentos del rayado en junio, no se puede concluir la ausencia total de relación entre las diferencias de carbohidratos observadas entre árboles *on* y *off* y la adquisición de la competencia de las yemas, dada la falta de efecto el rayado sobre el contenido de carbohidratos en las hojas de los árboles con fruto.

Sin embargo, cuando el tratamiento se realizó en septiembre, sí se observaron efectos del rayado sobre la floración, que podrían estar relacionados con el contenido en carbohidratos. En esta fecha, no había diferencias significativas en la concentración de carbohidratos entre los árboles *on* y *off*, ya que en los árboles *off* ésta había sufrido un importante descenso, llegando a igualarse con los árboles *on*. El rayado a primeros de septiembre incrementó la floración en unas 40 flores por 100 nudos, tanto en árboles sin fruto como con fruto. Este incremento podría estar relacionado con un aumento en azúcares reductores del 7% en árboles *off* y del 22% en árboles *on* observado a los 10 días del tratamiento. En árboles *on*, este aumento en la floración no está relacionado con un incremento en la brotación, dado que no se observaron diferencias en el total de brotes entre árboles tratados y no tratados. En árboles *off*, si bien aumentó el número de brotes,

lo hicieron en mayor medida los reproductivos. Así pues, el rayado en este período provocó una alteración en la calidad de las yemas, que pasaron de vegetativas a reproductivas. Otros autores (Agustí *et al.*, 1992) han encontrado resultados similares en cuanto al incremento de la floración en naranjo ‘Salustiana’, anillando árboles *on* a últimos de agosto. Según Agustí *et al.* (1992), el aumento es debido al mayor número de brotes uniflorales, con o sin hojas, mientras en el presente estudio, fue causado principalmente por el aumento en brotes multiflorales sin hojas.

La respuesta al anillado en septiembre es un efecto general independiente de la presencia de fruto, y que indica que en este período las yemas son capaces de responder a un incremento de azúcares, aumentando así el número de yemas competentes para florecer. Ahora bien, en condiciones de cultivo habitual en esta variedad, las diferencias de carbohidratos en septiembre entre árboles *on* y *off* no pueden ser responsables de las diferencias en floración, dado que en este época, el nivel de azúcares reductores es similar en árboles *on* y *off*.

Cuando el rayado se realizó en los meses de octubre y noviembre, únicamente se dio un incremento significativo en la acumulación de almidón y un ligero ascenso de azúcares reductores en árboles *off*, que no se tradujo en un aumento significativo de la floración en estos árboles. En el trabajo de Agustí *et al.* (1992) también se observa un menor efecto del rayado practicado en esta época en relación al que se hace a finales de verano. El rayado en ‘Salustiana’ realizado en otoño provocó una acumulación de almidón en corteza y madera que no se observó en los rayados realizados en verano. Tal y como se discute posteriormente, este efecto puede estar relacionado con los procesos de regeneración de los tejidos conductores tras el tratamiento.

El rayado en otoño no tuvo ningún efecto sobre los árboles con fruto. En condiciones normales de cultivo y en árboles sin anillar, los niveles de carbohidratos en este período son similares en árboles con y sin fruto, con lo que éstos tampoco pueden ocasionar las diferencias en el porcentaje de yemas competentes para la floración.

En conclusión, en los cítricos, los presentes resultados y los de otros autores muestran una estacionalidad en la efectividad del incremento en carbohidratos mediante técnicas de rayado sobre la floración, que sólo se produce en algunas épocas del año, lo que podría estar relacionado con la estacionalidad en la adquisición del estado de competencia en las

DISCUSIÓN

yemas para responder a los factores inductivos de la floración. En verano y otoño, tanto las aplicaciones de giberelinas (El-Otmani *et al.*, 2000) como el rayado (Guardiola, 1981; García-Luis *et al.*, 1986a; Iwahori *et al.*, 1990) y la eliminación del fruto (Martínez-Fuentes *et al.*, 2010) afectan a la floración de la primavera siguiente, lo que indica que algún proceso de adquisición de la competencia para florecer tiene lugar antes del reposo invernal.

El trabajo de Shalom *et al.* (2012), en el que se estudia la alternancia de mandarino ‘Murcott’ a nivel molecular, pone de manifiesto que existe un período anterior al de inducción floral en el que las yemas adquieren competencia para florecer, ya que se observa una expresión diferencial de genes relacionados con la floración entre árboles *on* y *off* antes del otoño. Así, un gen homólogo a *SPL* que controla la transición de la fase juvenil a la adulta en *Arabidopsis*, alcanza mayor expresión desde mayo hasta septiembre en árboles *off*. Por otra parte, los genes *CiFT1* y *CiFT3* que los autores relacionan con la determinación vegetativa de las yemas, tienen una expresión superior en árboles *on* en junio y septiembre.

La época en la que se produce la inducción floral en los cítricos no está bien determinada, ya que los primeros signos de la morfogénesis floral no se detectan hasta inmediatamente antes de la brotación (Iwahori y Oohata, 1981; Davenport, 1990a) si bien, la mayoría de los autores admiten que se produce desde mitad de noviembre hasta mitad de diciembre o enero en el hemisferio norte (Davenport, 1990a; El-Otmani *et al.*, 2000). Para naranjo dulce y algunos mandarinos, la inducción tendría lugar a principios de este período (Guardiola *et al.*, 1982) mientras que para mandarino satsuma tendría lugar más hacia el final (Iwahori y Oohata, 1981; Guardiola *et al.*, 1982).

Se ha demostrado que durante la época de inducción floral (entre noviembre y enero), los niveles de ARNm del gen *FT2* (relacionado en cítricos con la inducción floral) son mayores en yemas que en hojas, y que estos niveles son mayores en hojas y/o yemas de árboles *off*. La expresión de *CiFT2*, *AP1* y *LFY* es mayor en árboles *off* que en árboles *on* en mandarino ‘Murcott’ (Shalom *et al.*, 2012) y en mandarino ‘Moncada’ (Muñoz-Fambuena *et al.*, 2011). En otras especies alternantes, como en mango, se ha comprobado lo mismo durante la época de inducción floral para *FT* y *AP1* (Nakawaga *et al.*, 2012).

Así, una señal negativa reduce la floración en árboles con elevada carga de fruto, que afecta tanto a genes relacionados con la adquisición de la competencia como a genes relacionados con el proceso de inducción de la floración. Los resultados aquí presentados señalan que esta señal endógena, que afecta a genes relacionados con la adquisición de competencia para florecer de las yemas, podría estar relacionada con el nivel de carbohidratos en hojas.

- *Rayado de ramas individuales. Comparación con mandarino satsuma ‘Owari’*

Con objeto de confirmar la existencia de un período de adquisición de competencia en las yemas, previo a la inducción floral, en el cual éstas fueran sensibles al contenido de carbohidratos en hojas, se realizaron experimentos de rayado en naranjo ‘Salustiana’ y en mandarino satsuma ‘Owari’, variedades que difieren tanto en el ciclo de crecimiento y maduración del fruto como en la época en que sus yemas son sensibles a la inducción floral. Según algunos autores, el período en que se produce la inducción floral de mandarino satsuma es posterior al de naranjo ‘Salustiana’ (El-Otmani *et al.*, 2000), mientras que la maduración y recolección del fruto es anterior. Otra diferencia entre ambas variedades es que el mandarino presenta una importante brotación durante los meses de verano.

Para conseguir un mayor incremento en el contenido en carbohidratos mediante el rayado, éste se llevó a cabo en ambas variedades sobre ramas sin fruto.

En naranjo ‘Salustiana’ el rayado tuvo efecto sobre el incremento de la floración sólo cuando se realizó en septiembre, confirmando lo observado en el experimento anterior, en el que se rayaron todas las ramas principales del árbol. Ahora bien, en este caso el rayado individual de ramas menores incrementó no sólo los azúcares reductores, como ocurrió en el rayado de ramas principales, sino también el almidón y los azúcares no reductores. Paralelamente a este incremento de carbohidratos, se observó un mayor incremento de la brotación, y también un mayor incremento en el porcentaje de nudos con brotes reproductivos. De nuevo, se observó que el aumento en el contenido en carbohidratos anterior al período de inducción floral no afectó sólo al proceso de brotación, sino a la calidad de las yemas formadas, que pasaron de vegetativas a

DISCUSIÓN

reproductivas. El rayado en noviembre de ramas individuales provocó un aumento muy elevado en el contenido en almidón, pero no tuvo efecto sobre la brotación ni tampoco sobre la floración.

En mandarino satsuma 'Owari' el rayado fue más efectivo cuando se realizó en noviembre que en septiembre, aumentando drásticamente el número de brotes florales por nudo brotado. No obstante, el porcentaje de brotes florales no se vio modificado frente al control, cuyos brotes fueron también, casi en su totalidad, florales.

Hay que señalar que existen discrepancias entre diferentes autores en relación con el momento en que el rayado tiene una respuesta máxima sobre la floración en mandarino satsuma, ya que se han encontrado máximos de respuesta a estos tratamientos realizados en agosto (Agustí *et al.*, 1992), en septiembre-octubre (Cohen, 1981; García Luis *et al.*, 1985, 1989, 1995a; Iwahori *et al.*, 1990), y en noviembre (García-Luis *et al.*, 1995a). Estos trabajos difieren en la edad de los nudos considerados, la intensidad de la brotación, la presencia de fruto, la edad del árbol y las condiciones ambientales, lo que podría justificar las diferencias observadas. No obstante, en la mayoría de los estudios no se determina el contenido en carbohidratos, por lo que no permiten relacionar el efecto del anillado con este factor.

Los resultados aquí expuestos señalan que el incremento en el número de brotes desarrollados tras el rayado de noviembre en satsuma 'Owari' podría estar relacionado con el incremento en carbohidratos provocado por el tratamiento. El rayado de septiembre, tras el cual no se acumularon carbohidratos, no tuvo efectos significativos sobre la floración.

En trabajos que estudian el efecto inhibitor del ácido giberélico en la floración de los cítricos, se señala que existe un período de competencia, previo a la inducción floral, durante el cual la yema es sensible a esta hormona y que concluye un mes antes en naranjo dulce que en mandarino satsuma (Guardiola *et al.*, 1982). De igual forma, los resultados aquí expuestos indican que la competencia para responder a un incremento de carbohidratos, dando lugar a una mayor floración, concluye antes en 'Salustiana' que en satsuma 'Owari'. Pero cabe señalar las diferencias observadas en dicha respuesta entre ambos cultivares. Mientras en 'Salustiana' el incremento de azúcares tras el rayado de septiembre vino acompañado por un aumento tanto de nudos brotados como de número

de brotes por cien nudos y hubo un cambio de yemas vegetativas a reproductivas (los brotes reproductivos pasaron de ser el 93% al 97% de los brotes totales), en satsuma el incremento de carbohidratos observado tras el rayado de noviembre aumentó el número de brotes florales, a través, no de un cambio en la determinación de las yemas, sino en la brotación, ya que prácticamente todas los brotes que se obtuvieron tras el rayado siguieron siendo reproductivos, como en los árboles control. Esto difiere de lo observado en otros trabajos, en los que se indica una mayor presencia de brotes vegetativos en la brotación de primavera en esta variedad de mandarino, y en los que se constata que disminuyen su número (García-Luis *et al.*, 1995a) o no resultan afectados (Agustí *et al.*, 1992) tras rayar en noviembre.

Es necesario destacar que los resultados de los experimentos de histología y de rayado múltiple muestran que la falta de respuesta al rayado en septiembre de satsuma puede no ser debido a la falta de competencia de las yemas para responder a un incremento en carbohidratos durante este período.

El análisis histológico indica que, en satsuma, el hecho de que no se acumulen azúcares tras el rayado de septiembre podría deberse al restablecimiento de las conexiones vasculares interrumpidas por el tratamiento, de forma más rápida y efectiva que en 'Salustiana'. Comparando la respuesta de ambas variedades al rayado múltiple de ramas, se deduce que, a partir de los 10 días, hubo un restablecimiento de los tejidos vasculares en satsuma que impidió la acumulación de carbohidratos y de otras sustancias. Esta regeneración no se dio cuando el rayado se efectuó en noviembre. De esta forma, la diferente respuesta en la floración al rayado entre los meses de septiembre y noviembre en satsuma, podría deberse a la imposibilidad de acumulación de azúcares por la rápida regeneración de los tejidos en septiembre, pero no a un estado fisiológico relacionado con la partición de fotoasimilados en esa variedad, ni a una falta de competencia de las yemas para responder al nivel de carbohidratos.

Los resultados presentados en este trabajo sólo apoyan parcialmente conclusiones de otros estudios anteriores (Guardiola *et al.*, 1982; Agustí *et al.*, 1992) y sugieren la existencia de un período de adquisición de competencia para la floración, durante el cual las yemas son sensibles a la concentración de carbohidratos, y que es anterior en naranjo 'Salustiana' que en mandarino satsuma, con independencia de la fecha concreta en que éste fenómeno

DISCUSIÓN

tiene lugar. Si bien se confirma que dicho período concluye antes en ‘Salustiana’, no está claro que se inicie antes en esta variedad.

El rayado repetido de ramas dio lugar a unos niveles muy elevados de carbohidratos, muy por encima del control en almidón y en azúcares reductores, durante todo el período de inducción floral, pero la acumulación de almidón vino acompañada por síntomas de clorosis y posterior senescencia de gran parte de las hojas de las ramas rayadas, anulándose el efecto promotor de la floración tanto del rayado de septiembre en naranjo ‘Salustiana’ como el de noviembre en mandarino satsuma ‘Owari’.

- *Efecto del rayado sobre la abscisión, cuajado y desarrollo del fruto*

En general, el rayado incrementa el cuajado y el tamaño del fruto en cítricos cuando el tratamiento se lleva a cabo a los pocos días de la antesis de las flores o al final de la caída de junio (García-Luis *et al.*, 1988; Mataa *et al.*, 1998; Goldschmidt, 1999; Goren *et al.*, 2003; Rivas *et al.*, 2004, 2006). Cuando se efectúa inmediatamente después de la antesis, mejora el cuajado en cultivares poco productivos, mientras que si se realiza hacia el final del período de caída de junio, el anillado tiene un efecto positivo sobre el cuajado tanto en cultivares de alta como de baja producción (Rivas *et al.*, 2006).

En el presente trabajo, ni el rayado que se realizó tras la caída de junio ni en ninguna de las otras fechas, tuvieron efecto sobre el número o tamaño de frutos cosechados en esa misma campaña de producción. Las características de los frutos cosechados estuvieron fundamentalmente determinadas por la intensidad de la floración.

En la campaña del año siguiente, sí se observó efecto del rayado sobre la abscisión de los ovarios cuando éste se llevó a cabo en septiembre. Hubo una mayor abscisión en los árboles *off* anillados debido al incremento de su tasa de floración. El rayado de árboles *on* condujo a la presencia de flores en árboles que no hubieran florecido sin anillar y, por tanto, incrementó el número de frutos cuajados, mientras que, dada la baja carga de flor, la abscisión fue prácticamente nula. Así, el efecto del anillado sobre las características de los frutos cosechados estuvo mediado por su efecto sobre la intensidad de la floración.

- *Regeneración de tejido vascular tras el rayado y su relación con la acumulación de carbohidratos*

Tras el rayado realizado a principios de septiembre, hubo una regeneración de tejidos que se produjo entre 2 y 6 semanas después y que volvió a conectar las dos partes de floema separadas por el tratamiento. En naranjo ‘Salustiana’, la restauración vascular observada en el seno del tejido de conexión formado *de novo* pareció posterior y más incompleta que en mandarino satsuma ‘Owari’. Sin embargo, cuando el rayado se realizó a final de noviembre, en ninguno de los dos cultivares tuvo lugar ningún tipo de regeneración. Schneider (1954) indica que en cítricos anillados a comienzo de la temporada de crecimiento, el restablecimiento se efectúa mucho más rápido (de 1 a 2 semanas según Furr *et al.* (1947)) que si se hace al final de ella. En las presentes observaciones, al final del período vegetativo (noviembre) el restablecimiento no llegó a producirse.

El proceso observado tras el rayado en verano pudo dividirse en dos etapas: en primer lugar se formaron células indiferenciadas del callo, presumiblemente a partir de la división de células del floema, como indica Noel (1970) y, a continuación, se diferenció el tejido vascular a partir del nuevo cámbium formado dentro del callo. Esta segunda etapa se produjo con mayor claridad en mandarino satsuma que en ‘Salustiana’ durante el período observado, hasta 77 días tras el rayado.

La regeneración, tanto en naranjo ‘Salustiana’ como en mandarino satsuma, cuando se produjo, tuvo lugar de forma simétrica a ambos lados del rayado. Sin embargo, en casi todas las especies estudiadas en la revisión de Noel (1970), la cicatriz formada en el margen inferior del corte es mucho más pequeña, y se desarrolla más lentamente que la del margen superior, reflejando las diferentes condiciones fisiológicas de los dos márgenes.

En naranjo ‘Salustiana’ la rápida proliferación de un tejido de conexión tras el rayado de septiembre no fue óbice para que se acumularan carbohidratos en las hojas de ramas rayadas sin fruto. Las diferencias con respecto a las ramas sin rayar se mantuvieron hasta 5 meses después, a pesar de que el tejido de conexión ya estaba restituido. Sin embargo, en mandarino satsuma, tras el rayado de septiembre, no se produjo acumulación destacable de carbohidratos de reserva. Al volver a realizar el rayado encima de la misma herida a los 10 días, la acumulación sí tuvo lugar en ambos cultivares, indicando que el

DISCUSIÓN

transporte entre ambas partes del rayado en satsuma ya estaba restaurado en ese momento, frente a la ausencia del mismo en ‘Salustiana’.

Por lo tanto, las diferencias de acumulación de carbohidratos observadas entre ambos cultivares podrían ser debidas a que los tejidos formados *de novo* en naranjo ‘Salustiana’ tuvieran una mayor limitación en el transporte. De hecho, en el callo formado en esta variedad no se observaron células longitudinales con aspecto de elementos conductores que sí se observaron en el tejido de conexión formado en satsuma ‘Owari’. También es posible que los fallos en la restauración de tejidos vasculares que tuvieron lugar en algunas zonas del perímetro de rayado, fueran más frecuentes en naranjo ‘Salustiana’. No obstante, no se pueden descartar otras causas relacionadas con la influencia del rayado sobre el efecto oxidativo o el metabolismo del carbono o del nitrógeno, indicados por Rivas *et al.* (2008) y otros autores.

5. INFLUENCIA DE LA PRESENCIA DE FRUTO SOBRE EL NIVEL DE GIBERELINAS EN YEMAS Y SU RELACIÓN CON LA BROTACIÓN Y LA FLORACIÓN

Los trabajos llevados a cabo en cítricos sobre la relación entre giberelinas y floración han puesto de manifiesto la inhibición del proceso mediante la aplicación exógena de estas hormonas durante el período de inducción floral (García-Luis *et al.*, 1986a; Goldschmidt *et al.*, 1997; Goldberg-Moeller *et al.*, 2013), y su efecto inhibitorio sobre los genes que regulan la inducción y diferenciación floral en hojas y yemas (Muñoz-Fambuena *et al.*, 2012a,b; Goldberg-Moeller *et al.*, 2013). Tratamientos que inhiben la acción de las giberelinas, revierten estos efectos (Muñoz-Fambuena *et al.*, 2012a). Asimismo, los niveles endógenos de giberelinas se ven incrementados en las hojas de árboles con elevada carga de fruto que presentan una menor floración en la primavera siguiente (Koshita *et al.*, 1999), y las hojas y yemas de estos árboles muestran también menor expresión de los genes relacionados con la inducción floral.

Estas observaciones previas apuntan a que las giberelinas endógenas, procedentes del fruto, podrían ser responsables de la inhibición de la floración en árboles que presentan vejería. Sin embargo, el hecho de que el ácido giberélico actúe endógenamente para inhibir la floración permanece sin ser demostrado (Goldberg-Moeller *et al.*, 2013; Shalom

et al., 2014). Asimismo, el transporte de estas hormonas desde el fruto hasta las yemas tampoco ha podido ser comprobado hasta el momento, ya que cuando se intenta interrumpir el transporte basípeto del fluido floemático desde el fruto mediante el anillado del pedicelo, se acumulan giberelinas tanto por encima como por debajo del anillado (Martínez-Fuentes, 2010).

El presente trabajo aporta los contenidos de giberelinas endógenas en yemas de brotes con fruto y sin fruto de la variedad de naranjo dulce ‘Salustiana’ entre los meses de julio y febrero, giberelinas pertenecientes tanto a la ruta de biosíntesis de la hidroxilación temprana como de la ruta de la no hidroxilación temprana. Algunas de las primeras (GA₁, GA₂₀ y GA₂₉) se han detectado previamente en yemas reproductivas de naranjo ‘Salustiana’ (y su antecesor, el naranjo blanca ‘Comuna’) 21 días antes de la antesis, por Talón *et al.* (1990). Los mismos autores, detectaron GA₁, GA₁₉, GA₂₀ y GA₂₉ y trazas de GA₈ y GA₁₇ en brotes vegetativos de ‘Salustiana’. La ruta de la hidroxilación temprana está considerada como la más importante ruta de biosíntesis en tejidos vegetativos (Talón *et al.*, 1990).

Los datos aquí presentados muestran que la concentración de giberelinas durante el período de inducción floral (considerando que éste tiene lugar entre noviembre y diciembre) no explicó los efectos observados de la inhibición por parte del fruto sobre la floración, ya que las giberelinas consideradas metabólicamente activas permanecieron a niveles menores de 0,1 ng g⁻¹ (GA₁) o fueron indetectables (GA₄), sin apreciarse diferencias entre árboles con o sin carga de fruto, durante este período.

Las giberelinas de la ruta de no hidroxilación temprana (GA₁₅ y GA₉) fueron superiores en árboles *on* de julio a final de octubre, es decir, antes del período de inducción floral. Por el contrario, después, durante los meses de inducción floral por frío y hasta la brotación, el contenido en GA₁₅ fue casi tres veces superior en yemas de árboles que iban a dar fundamentalmente brotes reproductivos, mientras que en GA₉ no difirió entre árboles con o sin fruto, lo que podría deberse a la inactivación de la misma a través de la síntesis de GA₂₉ (Hedden y Kamiya, 1997) en árboles con fruto. En cualquier caso, GA₄, metabólicamente activa, permaneció indetectable durante todo el período de muestreo.

En el mes de julio fueron observados valores elevados de GA₁ en árboles con fruto (del orden de 1 ng g⁻¹), superiores en más de 10 veces a los árboles sin fruto. En este momento

DISCUSIÓN

también se detectaron mayores concentraciones en yemas de brotes con fruto que en las de brotes sin fruto en GA₁₉, GA₂₀ y GA₈, pertenecientes todas ellas a la ruta de la hidroxilación temprana.

Estos resultados señalan hacia la presencia de un proceso anterior a la inducción floral en el cual las giberelinas endógenas tendrían un papel inhibitor sobre las yemas de árboles con elevada carga de fruto (*on*). Podría así sugerirse la existencia de un período de adquisición de la competencia de yemas en cítricos para ser inducidas posteriormente, que tendría lugar entre julio y septiembre, lo que vendría apoyado por los estudios sobre la expresión de los genes *CiFT1* y *CiFT3*, relacionados con la determinación vegetativa de las yemas, y cuya expresión durante este período es superior en árboles con fruto de mandarino 'Murcott' (Shalom *et al.*, 2012).

Por otra parte, los períodos de sensibilidad a los tratamientos con giberelinas (entre septiembre y enero), difieren de la época de acción de las giberelinas endógenas sobre la inhibición de la floración. Esto podría indicar que las giberelinas aplicadas exógenamente actúan sobre diferentes dianas que las giberelinas endógenas, activando diferentes respuestas. De hecho, el efecto de la presencia de fruto sobre las características de la brotación y la floración, que es máximo cuando el fruto alcanza su tamaño definitivo (Martínez-Fuentes *et al.*, 2010), es diferente del efecto de la aplicación de ácido giberélico, ya que éste adelanta la brotación, mientras que la presencia de fruto la retrasa (García-Luis *et al.*, 1986a).

En febrero, al aproximarse la época de brotación, hubo un fuerte aumento de GA₁₉ en las yemas de brotes sin fruto, yemas que en este momento estaban diferenciándose en un alto porcentaje para dar brotes reproductivos. Sin embargo, no hubo un reflejo de este aumento en la concentración de GA₂₀ ni de GA₁, aunque sí de GA₂₉, metabólicamente inactiva. El aumento de GA₁₉ podría ser la etapa anterior para el incremento de GA₁, la cual parece tener un papel fundamental en la fase de cuajado y desarrollo del fruto (Talón *et al.*, 1990).

CONCLUSIONES

De los resultados observados en esta tesis, pueden obtenerse las siguientes conclusiones:

1. Comportamiento alternante del naranjo dulce ‘Salustiana’

- En la variedad de naranjo dulce ‘Salustiana’ la presencia de una carga elevada de fruto reduce su capacidad de florecer en la primavera siguiente, debido al menor número de nudos disponibles de 1 y 2 años de edad, a la menor brotación de los mismos y a la inhibición de la formación de flores, siendo este último factor el más determinante.
- La disminución de la producción en años *off* no está relacionada con un efecto de reducción del cuajado, sino con la reducción de la floración, mientras que la formación de flor excedente en árboles *on* tiene poco o ningún efecto sobre la producción.

2. Variación de la tasa fotosintética e influencia del fruto

- En las hojas expuestas al sol de naranjo dulce ‘Salustiana’ la mayor parte de la variabilidad de la tasa fotosintética es debida a cambios diarios en las condiciones ambientales, mostrando una baja variabilidad estacional.
- La capacidad fotosintética permanece estable a lo largo del primer año de vida de la hoja, y disminuye un 20% durante el segundo.
- La carga del fruto no tiene un efecto significativo en la fijación de CO₂, siendo que los carbohidratos pueden ser transportados a sumideros alternativos, como el sistema radical.
- La PAR en capas profundas de la copa es mayor que el punto de compensación de la luz y promueve por lo tanto la fijación neta de CO₂. Sin embargo, la tasa fotosintética es menor del 50% de la que tiene lugar en la copa externa, lo que podría justificar que en algunos experimentos con sombreado la cosecha no se incremente. Asimismo, la orientación de la hoja es un factor muy importante en la variación de la tasa fotosintética, pudiendo llegar a descender en la orientación noroeste hasta un 13% de aquella observada en la orientación sudeste.

3. Influencia del fruto sobre la partición de fotoasimilados

- Las variaciones observadas en el contenido en carbohidratos en brotes reflejan los cambios que se producen a lo largo del año en el suministro y la demanda. En naranjo ‘Salustiana’ la formación de flores excedentes en un año *on* tiene un coste para el árbol de unos 6 kg de materia seca, lo que provoca la movilización de los carbohidratos de reserva acumulados en hojas maduras durante el invierno e impide la acumulación de los mismos en hojas nuevas durante la primavera. En los árboles que entran en un año *off*, la reserva de carbohidratos en hojas nuevas es máxima en junio, llegando en este momento a ser más del doble que en los árboles *on*, principalmente por la acumulación de almidón.

4. Carbohidratos y floración

- En naranjo ‘Salustiana’, las reservas de carbohidratos en hojas durante el período de inducción floral (que tiene lugar entre noviembre y febrero), no explican las diferencias de floración observadas entre árboles *on* y *off*, ya que durante estos meses los niveles de carbohidratos en las hojas son casi idénticos en árboles *on* y *off*. Asimismo, dado que el incremento en los niveles de azúcares durante esta etapa, obtenido mediante técnicas de rayado, no favorecen significativamente la floración, las reservas de carbohidratos no parecen tener un papel regulador durante la inducción floral.
- Los resultados sugieren que en naranjo ‘Salustiana’ existe un período de adquisición de competencia para florecer, anterior a la inducción floral, durante el cual las yemas son sensibles al contenido en azúcares, y que concluiría en octubre. Así, el rayado en septiembre, cuando existe un bajo nivel de carbohidratos en árboles *on* y *off*, incrementa el nivel de los mismos y estimula, asimismo, la formación de yemas reproductivas frente a las vegetativas, siendo el estímulo mayor cuando el incremento de azúcares también es mayor.
- No puede descartarse un papel de los carbohidratos en un proceso de adquisición de competencia de las yemas, durante los meses comprendidos entre junio y

agosto, y que explicaría las diferencias de floración observadas entre los árboles *on* y *off*.

- En mandarino satsuma ‘Owari’, con un período de inducción floral posterior al de naranjo ‘Salustiana’, el efecto sobre la floración del incremento en el nivel de carbohidratos obtenido mediante el rayado, concluye con posterioridad que en ‘Salustiana’. No puede descartarse un efecto del nivel de carbohidratos sobre la floración en meses anteriores, ya que el rápido restablecimiento de conexiones vasculares tras el rayado en verano, impide aumentar el nivel de carbohidratos y observar su efecto.

5. Carbohidratos y fructificación

- Las reservas del vástago son empleadas durante la brotación y la floración, siendo que en el momento de máxima floración las reservas de carbohidratos disminuyen drásticamente. No se han encontrado evidencias de la contribución de estas reservas al cuajado del fruto. Por lo tanto, desde el momento de la abscisión, la fotosíntesis es el proveedor de carbohidratos al mismo. El incremento de carbohidratos debido a los rayados realizados entre junio y noviembre en naranjo ‘Salustiana’ no tiene efecto sobre el número o tamaño de frutos cosechados en la misma campaña de producción. Sin embargo, en la campaña del año siguiente, sí que existe un efecto cuando el rayado se lleva a cabo en septiembre sobre árboles *on*, debido al incremento de la tasa de floración que conduce a una mayor producción, pero también a un aumento en la abscisión de ovarios y a una disminución del porcentaje de flores finalmente cuajadas.

6. Contenido en giberelinas en relación con la presencia de fruto y la floración

- Entre noviembre y febrero, las giberelinas consideradas metabólicamente activas permanecen a niveles muy bajos (GA_1) o indetectables (GA_4), sin apreciarse diferencias entre árboles con o sin carga de fruto. Sin embargo en el mes de julio se observan valores elevados de GA_1 en árboles con fruto, superiores en más de 10 veces a los árboles sin fruto, junto a GA_{19} , GA_{20} y GA_8 . Esto también sugiere la

CONCLUSIONES

existencia de un proceso anterior a la inducción floral, en el cual las yemas adquieren capacidad o competencia para ser inducidas posteriormente, y que comprendería julio y agosto, en el cual las giberelinas endógenas tendrían un papel inhibitor sobre las yemas de árboles con elevada carga de fruto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE,M., KOBAYASHI,Y., YAMAMOTO,S., DAIMON,Y., YAMAGUCHI,A., IKEDA,Y., ICHINOKI,H., NOTAGUCHI,M., GOTO,K. y ARAKI,T. 2005. *FD*, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator *FT* at the shoot apex. *Science* 309: 1052-1056.
- AEMET (AGENCIA ESPAÑOLA DE METEOROLOGÍA). 2015. *¡El CO2 supera la barrera de las 400 ppm! (s.f)*. Recuperado el 12 mayo 2015 de http://izana.aemet.es/index.php?option=com_content&view=article&id=320.
- AGUSTÍ,M. y ALMELA,V. 1991. Desarrollo y tamaño final del fruto. En: *Aplicación de fitorreguladores en citricultura*. Eds: Agustí,M. y Almela,V. Aedos. Barcelona: 145-174.
- AGUSTÍ,M., GARCÍA-MARÍ,F. y GUARDIOLA,J.L. 1982. The influence of flowering intensity on the shedding of reproductive structures in sweet orange *Citrus sinensis*. *Sci. Hortic.* 17: 343-352.
- AGUSTÍ,M., ALMELA,V. y GUARDIOLA,J.L. 1985. Interrelaciones floración-fructificación en el naranjo dulce cv. Salustiana (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *VI Reunión Nacional de la SEFV*. Valencia. Resumen n° 195.
- AGUSTÍ,M., ALMELA,V. y PONS,J. 1992. Effects of girdling on alternate bearing in citrus. *J. Hort. Sci.* 67: 203-210.
- 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 Reg.* 36 (2):141-147.
- AGUSTÍ,M., MARTÍNEZ-FUENTES,A., MESEJO,C., JUAN,M. y ALMELA,V. 2003. Cuajado y desarrollo de los frutos cítricos. Generalitat Valenciana. Valencia.
- AKAO,S., TSUKAHARA,S., HISADA,H. y ONO,S. 1981. Contribution of photosynthetic assimilates to development of flower and spring flush in *Citrus unshiu* Marc. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 50: 1-9.
- ALEXANDRE,C.M. y HENNIG,L. 2008. FLC or not FLC: the other side of vernalization. *J. Exp. Bot.* 59: 1127-1135.
- ALI,A.G. y LOVATT,C.J. 1992. Winter applications of foliar urea. *Citrograph.* 78: 7-9.
- ALMELA,V. 1990. Control de la maduración y el tamaño del fruto en el mandarino Satsuma (*Citrus unshiu* Marc.) mediante la aplicación de reguladores del desarrollo. Tesis. U.P.V.
- ALMAGUER,V.G., RODRÍGUEZ,J. BECERRIL,E.A. y LARQUÉ,A. 1997. Promoción de la floración fuera de estación mediante estrés físico o químico aplicados a naranjo en invernadero. *Agrociencia* 31: 51-58.
- AMASINO,R. 2010. *Arabidopsis*: Seasonal and developmental timing of flowering. *Plant J.* 61: 1001-1013.
- ANDRÉS,F. y COUPLAND,G. 2012. The genetic basis of flowering responses to seasonal cues. *Nat. Rev. Gen.* 13: 627-639.
- ÁVILA,C. 2004. La floración en los agrios. Variación estacional en la competencia de las yemas y caracterización del efecto inductivo de las bajas temperaturas y del estrés hídrico. Tesis. U.P.V.
- BAKTIR,I., ULGER,S., KAYNAK,L. y HIMELRICK,D.G. 2004. Relationship of seasonal changes in endogenous plant hormones and alternate bearing of olive trees. *HortSci* 39 (5): 987-990.
- BANGERTH,F. 1989. Dominance among fruits/sinks and the search for a correlative signal. *Physiol. Plant.* 76: 608-614.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BANGERTH K.F. 2009. Floral induction in mature, perennial angiosperm fruit trees: similarities and discrepancies with annual/biennial plants and the involvement of plant hormones. *Sci. Hort.* 122: 153-163
- BARBERA,G., FATTA DEL BOSCO,G. y LO CASCIO,B. 1985. Effects of water stress on lemon summer bloom: the "Forzatura" technique in the Sicilian citrus industry. *Acta Hort.* 191:371-397.
- BECERRA,S. y GUARDIOLA,J.L. 1984. Inter-relationship between flowering and fruiting in sweet orange, cultivar Navelina. *Proc. Int. Soc. Citricult.* 1: 190-194.
- BEN-CHEIKH,W., PÉREZ-BOTELLA,J., TADEO,F.R., TALÓN,M. y PRIMO-MILLO,E. 1997. Pollination increases gibberellin levels in developing ovaries of seeded varieties of citrus. *Plant Physiol.* 114(2): 557-564.
- BERNIER,G., KINET,J.M. y SACHS,R.M. 1981. *The physiology of flowering*. CRC Press, Boca Ratón, Florida.
- BETANCOURT,M., MARTÍNEZ-FUENTES,A., GARCÍA,M.E., MESEJO,C., SÁNCHEZ,C.D., NÚÑEZ,M., REIG,C. y AGUSTÍ,M. 2008. The influence of fruit load on flowering intensity of grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.) under tropical climatic conditions. *ISC Congress*, Abstract P249.
- BEVINGTON,K.B. y CASTLE,W.S. 1985. Annual root growth pattern of young citrus trees in relation to shoot growth, soil temperature, and soil water content. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 110(6): 840-845.
- BLÁZQUEZ,M.A. y WEIGEL,D. 2000. Integration of floral inductive signals in *Arabidopsis*. *Nature* 404: 889-892.
- BLÁZQUEZ,M.A., SOOWAL,L.N., LEE,I. y WEIGEL,D. 1997. LEAFY expression and flower initiation in *Arabidopsis*. *Development* 124: 3835-3844.
- BLÁZQUEZ,M.A., KOORNNEEF,M. y PUTTERILL,J. 2001. Flowering on time: genes that regulate the floral transition. *EMBO reports* 2 12: 1078-1082.
- BLÁZQUEZ,M.A., FERRÁNDIZ,C., MADUEÑO,F. y PARCY,F. 2006. How floral meristems are built. *Plant Mol. Biol.* 60: 855-870.
- BLÁZQUEZ,M.A., PIÑEIRO,M. y VALVERDE,F. 2011. Bases moleculares de la floración. *Investigación y ciencia*. 416: 28-36.
- BONDADA,B.R. y SYVERTSEN,J.P. 2003. Leaf chlorophyll, net gas exchange and chloroplast ultrastructure in citrus leaves of different nitrogen status. *Tree Physiol.* 23(8): 553-559.
- BORRÁS,R., TADEO,F.L. y PRIMO-MILLO,E. 1984. Seasonal carbohydrate changes in two sweet orange varieties of the navel group. *Sci. Hort.* 24: 143-149.
- BOSS,P.K. y THOMAS,M.R. 2002. Association of dwarfism and floral induction with a grape 'green revolution' mutation. *Nature* 416: 847-850.
- BOWES, G. 1993. Facing the inevitable: plants and increasing atmospheric CO₂. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44: 309-332
- BRAKKE,M. y ALLEN,L.H. 1995. Gas-exchange of citrus seedlings at different temperatures, vapor-pressure deficits, and soil-water contents. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 120: 497-504.
- BUSTAN,A., MARGALIT,E., GOLDSCHMIDT,E.E., ERNER,Y., GOREN,R. y SELIGMAN,N. 1992. Effect of source-sink ratio on carbohydrate level and photosynthesis in *Citrus* source leaves (Abstract). *Plant Physiol.* S857.

- BUSTAN,A., ERNER,Y. y GOLDSCHMIDT,E.E. 1995. Interactions between developing Citrus fruits and their supportive vascular system. *Ann. Bot.* 76: 657-666.
- CARR,D.J., REID,D.M. y SKENE,K.G.M. 1964. The supply of gibberellin from the root to the shoot. *Planta* 63: 382-392.
- CASSIN,J., BOURDEAUT,B., FOUGUE,F., FURRIN,V., GAILLARD,J.P., LE BOURDELLERS,J., MONTIGUNT,C. y MONEVIL,C. 1969. The influence of climate upon the blooming of citrus in tropical areas. *Proc. Int. Soc. Citricult.* 1: 315-323.
- CHAIKIATTIYOS,S., MENZEL,C.M. y RASMUSSEN,T.S. 1994. Floral induction in tropical fruit trees: Effects of temperature and water supply. *J. Hort. Sci.* 69: 397-415.
- CHAPMAN,J.C. 1984. Etephon as a fruit thinning agent for 'Murcott' mandarins. *Scient. Hortíc.* 24: 135-141.
- CHANDLER,W.H. 1950. Evergreen orchards. Henry Kimpton. Londres.
- CHEN,L.S., QI,Y.P y LIU, .H. 2005. Effects of aluminum on light energy utilization and photoprotective systems in citrus leaves. *Ann. Bot.* 96(1): 35-41.
- CHEESEMAN,J.M. y LEXA,M. 1996. Gas exchange: models and measurements. En: *Photosynthesis and the environment*. Ed: Baker,N.R. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht: 223-240.
- COEN,E.S. y MEYEROWITZ,E.M. 1991. The war of the whorls: Genetic interactions controlling flower development. *Nature* 353: 31-37.
- COHEN,A. 1977. Girdling effects on tree performance. *Proc. Int. Soc. Citricult.* 1: 178-181.
- COHEN,A. 1981. Recent developments in girdlings of citrus trees. *Proc. Int. Soc. Citricult.* 1: 196-199.
- COHEN,A. 1984a. Citrus fruit enlargement by means of summer girdling. *J. Hort. Sci.* 59: 119-125.
- COHEN,A. 1984b. Effect of girdling date on fruit size of Marsh Seedless grapefruit. *J. Hort. Sci.* 59: 567-573.
- COHEN,S. y FUCHS,M. 1987. The distribution of leaf área, radiation, photosynthesis and transpiration in a Shamouti orange hedgerow orchard, I. Leaf and radiation. *Agn. For. Meteorol.* 40: 123-144.
- DANIEL,T.W. HELMS,J.A. y BAKER,F.S. 1982. Principios de silvicultura. McGraw-Hill. México
- DAVENPORT,T.L. 1990a. Citrus flowering. *Hort. Rev.* 12: 349-408.
- DAVENPORT,T.L. 1990b. Leaves not necessary for floral induction of *Citrus latifolia*. *Proc. Plant Growth Reg. Soc. Am.* 1: 18-19.
- DAVIES,F.S. y ALBRIGO,G. 1994. Citrus. CAB International, Wallingford, Reino Unido.
- DAVIES,L.D. 1957. Flowering and alternate bearing. *Proc. Am. Soc. Hortíc. Sci.* 70: 545-556.
- DE SCHEPPER,V. y STEPPE,K. 2010. Development and verification of a water and sugar transport model using measured stem diameter variations. *J. Exp. Bot.* 61: 2083-2099.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DORNELAS,M.C., CAMARGO,R.L.B., FIGUEIREDO,L.H.M. y TAKITA,M.A. 2007. A genetic framework for flowering-time pathways in *Citrus* spp. *Gen. Mol. Biol.* 30: 769-779.
- DOVIS,V.L., MACHADO,E.C., RIBEIRO,R.V., FILHO,J.R.M., MARCHIORI,P.E.R. y SALES,C.R.G. 2014. Roots are important sources of carbohydrates during flowering and fruiting in 'Valencia' sweet orange trees with varying fruit load. *Sci. Hortic.* 174: 87-95
- DOWNTON,W.J.S., GRANT,W.J.R. y LOVEYS,B.R. 1987. Carbon dioxide enrichment increases yield of Valencia orange. *Aust. J. Plant Physiol.* 14:493-501.
- DRAKE,B.G., GONZÁLEZ-MELER,M.A., LONG,S.P. 1997. More efficient plants: a consequence of rising atmospheric CO₂? *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 609-639.
- DUARTE,A.M. y GUARDIOLA,J.L. 1996. Flowering and fruit set on Fortune hybrid mandarin: Effect of girdling and growth regulators. *Proc. Int. Soc. Citricult.* 1: 1069-1071.
- EGEA-CORTINES,M., y DAVIES, B. 2000. Beyond the ABCs: Ternary complex formation in the control of floral organ identity. *Trends Plant Sci.* 5: 471-476.
- EHARA,T., NOGATA,T. y NAKAMUTA,T. 1981. Studies on fruit-bearing branches of Satsuma mandarin. *Proc. Int. Soc. Citricult.* 1: 209-213.
- EL-OTMANI,M., COGGINS,C.W., AGUSTÍ,M., y LOVATT,C.J. 2000. Plant growth regulators in citriculture: World current uses. *Crit. Rev. Plant. Sci.* 19: 395-447.
- EL-OTMANI,M., GOUMARI,M., SRAIRI,I., LBREK,A., CHARIF,L. y LOVATT,C.J. 2004. Heavy fruit load and late harvest inhibit flowering of the 'Nour' Clementine mandarin. *Proc. Int. Soc. Citricult.* 2: 525-527.
- ENDO,T., SHIMADA,T. FUJII,H., KOBAYASHI,Y., ARAKI,T. y OMURA,M. 2005. Ectopic expression of an *FT* homolog from *Citrus* confers an early flowering phenotype on trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.). *Transgenic Res.* 14: 703-712.
- EPRON,D., NOUVELLON,Y. y RYAN,M. 2012. Introduction to the invited issue on carbon allocation of trees and forests. *Tree Physiol.* 32(6): 639-643.
- EPSTEIN,E. y BLOOM,A.J. 2005. Mineral Nutrition of Plants: Principles and Perspectives. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- ERIKSSON,S., BÖHLENIUS,H., MORITZ,T., y NILSSON,O. 2006. GA₄ is the active gibberellin in the regulation of leafy transcription and *Arabidopsis* floral initiation. *Plant Cell* 18: 2172-2181.
- ERNERY,Y. 1988. Effects of girdling date on the differentiation of inflorescence types and fruit set in Shamouti orange trees. *Israel J. Bot.* 37: 173-180.
- ERNERY,Y. y SHOMER,I. 1996. Morphology and anatomy of stems and pedicels of spring flush shoots associated with citrus fruit set. *Ann. Bot.* 77: 537-545.
- ESAU,C., CURRIER,H.B. y CHEADLE,V.I. 1957. Physiology of phloem. *A. Rev. Plant Physiol.* 8: 349-374.
- ESCHRICH,V. 1970. Biochemistry and fine structure of phloem in relation to transport. *A. Rev. Plant Physiol.* 21: 198-214.

- ESSENWANGER,O.M. 2001: Classification of climates. En: *World Survey of Climatology 1C, General Climatology*. Elsevier. Amsterdam.
- FARQUHAR,G.D. y SHARKEY,T.D. 1982. Stomatal conductance and photosynthesis. *A. Rev. Plant Physiol.* 33: 317-345.
- FERENCZI,A., GAMBETTA,M., FRANCO,J., ARBIZA,H. y GRAVINA,A. 1999. Crecimiento del fruto, tamaño final y productividad en naranja “Valencia” (*Citrus sinensis* L. Osb.) con la aplicación del ácido 2,4-diclorofenoxipropionico. *Agrociencia* 3(1): 51-57.
- FERRER,P.J., VILLALBA,D., GARCÍA-TARÍN,A. 2003. Efectos en el cultivo de los cítricos del acolchado del suelo con plástico negro. *Comunitat Valenciana Agraria* 23: 4-8.
- FISHLER,M., GOLDSCHMIDT,E.E. y MONSELISE,S.P. 1983. Leaf area and fruit size in girdled grapefruit branches. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 108: 218-221.
- FLORE, J.A. y LAYNE, D.R. 1999. Photoassimilate production and distribution in cherry. *HortSci.* 34: 1015-1019.
- FORNARA,F., DE MONTAIGU,A. y COUPLAND,G. 2010. SnapShot: Control of flowering in *Arabidopsis*. *Cell* 141: 550-550e2.
- FORTUNATO-ALMEIDA,A. 2003. Acumulación y movilización de carbohidratos durante el cuajado del fruto en el naranjo dulce Salustiana (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). Tesis. UPV.
- FRANCK,N., VAAST,P., GÉNARD,M. y DAUZAT,J. 2006. Soluble sugars mediate sink feedback down-regulation of leaf photosynthesis in field-grown *Coffea arabica*. *Tree Physiol.* 26(4): 517-25.
- FURR,J.R., COOPER,W.C. y REECE,P.E. 1947. An investigation of flower formation in adult and juvenile citrus trees. *Am. J. Bot.* 34: 1-8.
- GALLASH,P.T. 1988. Chemical thinning of heavy crops of mandarins to increase fruit size. *Proc. Int. Citrus Cong.* 6: 395-405.
- GAMBETTA,G., ESPINO,M., PARDO,E., ALBERTI,V. y GRAVINA,A. 2005. Comportamiento fenológico y mejora del tamaño en mandarina Montenegro. *Mem. II. Simp. Investigación y desarrollo en Citrus*. Resumen.
- GANESHAIA,K.N. y UMA-SHAANKER,R. 1994. Seed and fruit abortion as a process of self-organisation among developing sinks. *Phys. Plantarum* 91: 81-89.
- GARCÍA-LUIS,A. y GUARDIOLA,J.L. 2000. The influence of internal factors on the climatic effects of flowering. *Proc. Int. Soc. Citricult.* 1: 289-291.
- GARCÍA-LUIS,A. y KANDUSER,M. 1995. Changes in dormancy and sensitivity to vernalization in axillary buds of Satsuma mandarin examined in vitro during the annual cycle. *Ann. Bot.* 76: 451-455.
- GARCÍA-LUIS,A., AGUSTÍ,M., ALMELA,V., ROMERO,E. y GUARDIOLA,J.L. 1985. Effect of gibberellic acid on ripening and peel puffing in Satsuma mandarin. *Sci. Hortíc.* 27: 75-86.
- GARCÍA-LUIS,A., ALMELA,V., MONERRI,C., AGUSTÍ,M. y GUARDIOLA,J.L. 1986a. Inhibition of flowering in vivo by existing fruits and applied growth regulators in *Citrus unshiu*. *Physiol. Plant.* 66: 515-520.
- GARCÍA-LUIS,A., FORNÉS,F. y GUARDIOLA,J.L. 1986b. Effects of gibberellin GA₃ and cytokinins on natural and post-harvest, ethylene-induced pigmentation of Satsuma mandarin peel. *Physiol. Plant* 68: 271-274.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- GARCÍA-LUIS,A., FORNÉS,F., SANZ,A. y GUARDIOLA,J.L. 1988. The regulation of flowering and fruit set in *Citrus*: relationship with carbohydrate levels. *Isr. J. Bot.* 37: 189-201.
- GARCÍA-LUIS,A., SANTAMARINA,P. y GUARDIOLA,J.L. 1989. Flower formation from *Citrus unshiu* buds cultured *in vitro*. *Ann. Bot.* 64(5): 515-519.
- GARCÍA-LUIS,A., KANDUSER,M., SÁNCHEZ-PERALES,M., SANTAMARINA,P. y GUARDIOLA,J.L. 1992a. The characterization of the inductive effect of low temperature on flowering in *Citrus*. *Proc. Int. Soc. Citricult.* 1: 364-367.
- GARCÍA-LUIS,A., KANDUSER,M., SANTAMARINA,P. y GUARDIOLA,J.L. 1992b. Low temperature influence on flowering in *Citrus*. The separation of inductive and bud dormancy releasing effects. *Physiol. Plant.* 86: 648-652.
- GARCÍA-LUIS,A., FORNÉS,F. y GUARDIOLA,J.L. 1995a. Leaf carbohydrates and flower formation in *Citrus*. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 120: 222-227.
- GARCÍA-LUIS,A., KANDUSER,M. y GUARDIOLA,J.L. 1995b. The influence of fruiting on the bud sprouting and flower induction responses to chilling in *Citrus*. *J. Hort. Sci.* 70: 817-825.
- GARCÍA-LUIS,A., OLIVEIRA,M.E., BORDÓN,Y., SIQUEIRA,D.L., TOMINAGA,S., y GUARDIOLA,J.L. 2002. Dry matter accumulation in citrus fruit is not limited by transport capacity of the pedicel. *Ann. Bot.* 90: 755-64.
- GARCÍA-PAPÍ,M.A. y 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. Hort.* 22(3): 265-274.
- GEIGENBERGER,P. 2011. Regulation of starch biosynthesis in response to a fluctuating environment. *Plant Physiol.* 155(4): 1566-1577.
- GENTY,B.G., y HARBINSON,J. 1996. The regulation of light utilisation for photosynthetic electron transport. En: *Environmental stress and photosynthesis*. Ed: Baker, N.R. Dordrecht. Kluwer: 67-99.
- GILMORE,A.M. y BALL,M.C. 2000. Protection and storage of chlorophyll in overwintering evergreens. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 11098-11101.
- GOELL,A., GOLOMB,A, KALMAR,D., MANTELL,A y SHARON,S. 1981. Moisture stress -a potent factor for affecting vegetative growth and tree size in *Citrus*. *Proc. Int. Soc. Citricult.* 2: 503-506.
- GOLDBERG-MOELLER,R., SHALOM,I., SHLIZERMAN,L., SAMUELS,S., ZUR,N., OPHIR,R., BLUMWALD,E. y SADKA,A. 2013. Effects of gibberellin treatment during flowering induction period on global gene expression and the transcription of flowering-control genes in *Citrus* buds. *Plant Sci.* 198: 46-57.
- GOLDSCHMIDT,E.E. 1999. Carbohydrate supply as a critical factor for citrus fruit development and productivity. *HortSci.* 34: 1020-1024.
- GOLDSCHMIDT,E.E. y GOLOMB,A. 1982. The carbohydrate balance of alternate bearing *Citrus* trees and significance of reserves for flowering and fruiting. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 107: 206-208.
- GOLDSCHMIDT,E.E. y HUBER,S.C. 1992. Regulation of photosynthesis by end-product accumulation in leaves of plants storing starch, sucrose, and hexose sugars. *Plant Physiol.* 99(4): 1443-1448.
- GOLDSCHMIDT,E.E. y KOCH,K.E. 1996. Citrus. En: *Photoassimilate distribution in plants and crops*. Eds: Zamski,E.E. y Schaffer,A.A. Marcel Dekker Inc. Nueva York: 797-823.

- GOLDSCHMIDT,E.E. y MONSELISE,S.P. 1972. Hormonal control of flowering in Citrus and other woody perennials. En: *Plant Growth Substances*. Ed: Carr,D.J Springer-Verlag, Berlín: 758-766.
- GOLDSCHMIDT,E.E. y SAMACH,A. 2004. Aspects of flowering in fruit trees. *Acta Hort.* 653: 23-27.
- 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*. *Sci. Hort.* 26: 159-166.
- GOLDSCHMIDT,E.E., TAMIM,M. y GOREN,R. 1997. Gibberellins and flowering in Citrus and other fruit trees: A critical analysis. *Acta Hort.* 463: 201-208.
- GÓMEZ-CADENAS,A., MEHOUACHI, J., TADEO,F.R., PRIMO-MILLO,E., y TALÓN,M. 2000. Hormonal regulation of fruitlet abscission induced by carbohydrate shortage in citrus. *Planta* 210: 636-643.
- GONZÁLEZ-FERRER,J., AGUSTÍ,M. y GUARDIOLA,J.L. 1984. Fruiting pattern and the retranslocation of reserves in the Navelate and the Washington navel oranges. *Proc. Int. Soc. Citricult.* 1: 194-200.
- GONZÁLEZ-ROSSIA,D., JUAN,M., REIG,C. y AGUSTÍ,M. 2006. The inhibition of flowering by means of gibberellic acid application reduces the cost of hand thinning in Japanese plums (*Prunus salicina* Lindl.) *Sci. Hort.* 110(4): 319-323.
- GONZÁLEZ-SICILIA,E. 1968. El cultivo de los agrios. INIA, Madrid.
- GOREN,R. y MONSELISE,S.P. 1971. Effects of ringing on yields of low bearing orange trees (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). *J. Hort. Sci.* 46: 435-441.
- GOREN,R., GOLDSCHMIDT,E.E. y MONSELISE,S.P. 1971. Hormonal balance in bark and leaves of "Shamouti" orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) trees in relation to ringing. *J. Hort. Sci.* 46: 443-451.
- GOREN,R., HUBERMAN,M. y GOLDSCHMIDT,E.E. 2003. Girdling: physiological and horticultural aspects. *Hort. Rev.* 30: 1-36.
- GRAVINA,A., ARBIZA,H., FERENCZI,A., ORLANDO,L., SEVERINO,V., GAMBETTA,G., ALMELA,V. y AGUSTÍ,M. 2000. Estudio del comportamiento alternante de la naranja "Salustiana" [*Citrus sinensis* (L.) Osb.] en diferentes condiciones productivas. *Agrociencia* 4(1): 17-22.
- GUARDIOLA,J.L. 1977. Varietal response to nutrition. *Proc. Int. Soc. Citricult.* 1: 242-246
- GUARDIOLA,J.L. 1981. Flower initiation and development in citrus. *Proc. Int. Soc. Citricult.* 1: 26-30.
- GUARDIOLA,J.L. 1988. Factors limiting productivity in Citrus. A physiological approach. *Proc. Int. Soc. Citricult.* 2: 381-394.
- GUARDIOLA,J.L. 1992. Fruit set and growth. En: *Second Intl. Sem. Citrus Physiol. Univ. Bebedouro*. Ed: Donadio,L.C. S.P.Brasil: 1-30.
- GUARDIOLA,J.L. 1997. Overview of flower bud induction, flowering and fruit set. En: *Citrus Flowering and Fruiting Short Course. April 9-10*. Citrus Research and Education Center Lake Alfred, Florida: 5-21.
- GUARDIOLA,J.L. y GARCÍA-LUIS,A. 2000. Increasing fruit size in citrus. Thinning and stimulation of fruit growth. *Plant Growth Regul.* 31: 121-132.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- GUARDIOLA,J.L., AGUSTÍ,M. y GARCÍA-MARÍ,F. 1977. Gibberellic acid and flower bud development in sweet orange. *Proc. Int. Soc. Citricult.* 2: 696-699.
- GUARDIOLA,J.L., MONERRI,C. y AGUSTÍ,M. 1982. The inhibitory effect of gibberellic acid on flowering in *Citrus*. *Physiol Plant* 55: 136-142.
- GUARDIOLA,J.L., GARCÍA-MARÍ,F. y AGUSTÍ,M. 1984. Competition and fruit set in the Washington navel orange. *Physiol. Plant.* 62: 297-302.
- GUCCI,R., XILOYANNIS,C., y FLORE,J.A. 1991. Gas Exchange parameters, water relations and carbohydrate partitioning in leaves of field-grown *Prunus domestica* L. following fruit removal. *Physiol. Plant.* 83: 497-505.
- GUO,Y.P., ZHOU,H.F. y ZHANG,L.C. 2006. Photosynthetic characteristics and protective mechanisms against photooxidation during high temperature stress in two citrus species. *Sci. Hort.* 108: 260-267.
- GUSOLSATIT,T., SURIYAPANANONT,V., VEERASARN,V. y SURIYAPANANONT,S. 2003. Effect of water stress on physiological process and flowering of mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) cv. Shogun. *Proc. of 41st Kasetsart Univ. Ann. Conf.*. Bangkok: 77-84
- GUSTAFSON,F.G. 1939. The cause of natural parthenocarpy. *Am. J. Bot.* 26: 135-138.
- HABERMANN,G., MACHADO,E.C.; RODRIGUES,J.D. y MEDINA,C.L. 2003. CO₂ assimilation, photosynthetic light response curves, and water relations of 'Pêra' sweet orange plants infected with *Xylella fastidiosa*. *Braz. J. Plant Physiol.* 15(2): 79-87.
- HANKE,M.V., FLACHOWSKY,H., PEIL,A. y HÄTTASCH,C. 2007. No flower no fruit – genetic potentials to trigger flowering in fruit trees. *G3* 1: 1-20.
- HEDDEN,P. y KAMIYA,Y. 1997. Gibberellin biosynthesis: enzymes, genes and their regulation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 431-460.
- HEMPEL,F.D., WEIGEL,D., MANDEL,M.A., DITTA,G., ZAMBRYSKI,P.C., FELDMAN,L.J. y YANOFSKY,M.F. 1997. Floral determination and expression of floral regulatory genes in *Arabidopsis*. *Development* 124: 3845-3853.
- HENDRY,N.S., VAN STADEN,J. y ALLAN,P. 1982. Cytokinins in citrus. II. Fluctuations during growth in juvenile and adult plants. *Sci. Hort.* 17:247-256.
- HU,L.M., XIA,R.X., XIAO,Z.Y., HUANG,R.H., TAN,M.L., WANG,M.Y. y WU,Q.S. 2007. Reduced leaf photosynthesis at midday in citrus leaves growing under field or greenhouse conditions. *J. Hort. Sci. Biotech.* 82: 387-392.
- HUBER,B. 1948. Physiologie der Rindenschälung bei Fichte und Eichen. *Forst Wiss. Centbl.* 67: 129-164.
- IBRAHIM,M., ABBASI,N.A., HAFEEZ-UR-RAHMAN, HUSSAIN,A. y HAFIZ,I.A. 2011. Phenological behaviour and effect of different chemicals on pre-harvest fruit drop on sweet orange cv. Salustiana. *Pak. J. Bot.* 43: 453-457.
- IDSO,S.B. y KIMBALL,B.A. 2001. CO₂ enrichment of sour orange trees: 13 years and counting. *Environ. Exp. Bot.* 46: 147-153.
- IGLESIAS,D.J., LLISO,I., TADEO,F.R. y TALÓN,M. 2002. Regulation of photosynthesis through source:sink imbalance in citrus is mediated by carbohydrate contents in leaves. *Physiol. Plant.* 116: 563-572.

- IGLESIAS,D.J., CERCÓS,M., COLMENERO-FLORES,J.M., NARANJO, M.A., RÍOS,G., CARRERA,E., RUIZ-RIVERO,O., LLISO,I., MORILLON,R., TADEO,F.R. y TALÓN,M. 2007. Physiology of citrus fruiting. *Braz. J. Plant Physiol.* 19(4):333-362.
- IVACE (INSTITUTO VALENCIANO DE COMPETITIVIDAD EMPRESARIAL). 2014. *Cítricos de la Comunitat Valenciana*. Generalitat Valenciana. Valencia.
- INOUE,H. 1990. Effects of temperature on bud dormancy and flower bud differentiation of Satsuma mandarin. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 58: 919-926.
- INOUE,H. e IKOMA,Y. 1991. Effects of autumn ringing and ba sprays on flower bud differentiation and development of satsuma mandarin. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 60(2): 285-90.
- IVIA (INSTITUTO VALENCIANO DE INVESTIGACIONES AGRARIAS) 2015. *Variedades comerciales de cítricos*. Pardo,J., Soler,G. y Buj,A. Recuperado el 9 mayo 2015 de <http://www.ivia.es/variedades/>.
- IWAHORI,S. y OOHATA,J.T. 1981. Control of flowering of Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) with gibberellin. *Proc. Int. Soc. Citricult.* 1: 247-249.
- IWAHORI,S., GARCÍA-LUIS,A., SANTAMARINA,P., MONERRI,C. y GUARDIOLA,J.L. 1990. The influence of ringing on bud development and flowering in Satsuma mandarin. *J. Exp. Bot.* 41: 1341-1346.
- JACK,T. 2004. Molecular and genetic mechanisms of floral control. *Plant Cell* 16: S1-S17.
- JANG,J.C. y SHEEN,J. 1997. Sugar sensing in higher plants. *Plant Cell* 6: 1665-1679.
- JAYA,E., SONG,J.C., CLEMENS,J. y JAMESON,P.E. 2011. Effect of environment and shoot architecture on floral transition and gene expression in *Eucalyptus occidentalis* and *Metrosideros excelsa*. *Plant Growth Reg.* 64(1): 53-61.
- JIFON,J.L. y SYVERTSEN,J.P. 2003. Moderate shade can increase net gas exchange and reduce photoinhibition in citrus leaves. *Tree Physiol.* 23: 119-127.
- JOHANSEN,D.A. 1940. *Plant microtechnique*. McGraw-Hill. Nueva York, Londres.
- JONES,W.W., EMBLETON,T.W., BARNHART,E.L. y CREE,C.B. 1974. Effect of time and amount of fruit thinning on leaf carbohydrate and fruit set in 'Valencia' oranges. *Hilgardia* 42: 441-449.
- JONES,W.W., COGGINS,C.W. y EMBLETON,T.W. 1976. Endogenous abscisic acid in relation to bud growth in alternate bearing "Valencia" orange. *Plant Physiol.* 58: 681-682.
- JONKERS,H. 1979. Biennial bearing in apple and pear: a literature survey. *Scientia Hort.* 11: 303-317.
- JUAN,M., MEDINA,F., ALMELA,V. y AGUSTÍ,M. 1995. El rayado de ramas como técnica para mejorar la calidad de los frutos de hueso. Generalitat Valenciana. Conselleria de Agricultura y Medio Ambiente.
- KEENAN,T.F., HOLLINGER,D.Y., BOHRER,G., DRAGONI,D., MUNGER,J.W., SCHMID,H.P. y RICHARDSON,A.D. 2013. Increase in forest water-use efficiency as atmospheric carbon dioxide concentrations rise. *Nature* 499(7458): 324-327.
- KEUTGEN,N. y CHEN,K. 2001. Responses of citrus leaf photosynthesis, chlorophyll fluorescence, macronutrient and carbohydrate contents to elevated CO₂. *J. Plant Physiol.* 158: 1307-1316.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- KIM,H.J., KIM,Y.K., PARK,J.Y. y KIM,J. 2002. Light signalling mediated by phytochrome plays an important role in coldinduced gene expression through the C-repeat/dehydration responsive element (C/DRE) in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 29: 693-704.
- KING,R.W. y BEN-TAL,Y. 2001. A florigenic effect of sucrose in *Fuchsia hybrida* is blocked by gibberellin-induced assimilate competition. *Plant Phys.* 125: 488-496.
- KOBAYASHI,Y., KAYA,H., GOTO,K., IWABUCHI,M. y ARAKI,T. 1999. A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. *Science* 286: 1960.
- KOCH,K.E., JONES,P.H., AVIGNE,W.T. y ALLEN,L.H. 1986. Growth, dry matter partitioning, and diurnal activities of RuBP carboxylase in citrus seedlings maintained at two levels of CO₂. *Physiol. Plant.* 67(3): 477-484.
- KOCH,K.E. y ZENG,Y. 2002. Molecular approaches to altered C-partitioning: Genes for sucrose metabolism. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 127: 474-483.
- KOK,B. 1956. On the inhibition of photosynthesis by intense light. *Biochim. Biophys. Acta* 21: 234-244.
- KOSHITA,Y., TAKAHARA,T., OGATA,T. y GOTO,A. 1999. Involvement of endogenous plant hormones (IAA, ABA, GAs) in leaves and flower bud formation of "Satsuma" mandarin (*Citrus unshiu* Marc.). *Sci. Hort.* 79: 185-194.
- KRAJEWSKI,A.J. y RABE,E. 1995a. Citrus flowering: a critical evaluation. *J. Hort. Sci.* 70: 357-374.
- KRAJEWSKI,A.J. y RABE,E. 1995b. Effect of heading and its timing on flowering and vegetative shoot development in clementine mandarin (*Citrus reticulata* Blanco). *J. Hort. Sci.* 70: 445-451.
- KRISHNAMURTHY,K.S., ANKEGOWDA,S.J., SRINIVASAN,V. y HAMZA,S. 2013. Influence of carbohydrates, mineral nutrients and plant hormones in alternate bearing of black pepper (*Piper nigrum* L.). *Am. J. Plant Sci.* 4: 1960-1967.
- LAKSO,A.N., ROBINSON,T.L. AND R.M. POOL. 1989. Canopy microclimate effects on patterns of fruiting and fruit development in apples and grapes. En: *Manipulation of Fruiting*. Ed: Wright,C.J. Butterworths, Londres: 263-274.
- LASKOWSKI,L.E. 2014. Contenido de carbohidratos en hojas y raíces de plantas de naranja 'Valencia' y mandarina 'Dancy' durante un ciclo anual de crecimiento. *Rev. Fac. Agron.* 31: 1-22
- LENZ,F. 1978. Photosynthesis and respiration of citrus as dependent upon fruit load. *Proc. Int. Soc. Citricult.* 78: 70-71.
- LEOPOLD,A.C. y KRIEDMAN,P.E. 1975. *Plant growth and development*. Mc-Graw Hill. Nueva York.
- LI,C.Y., WEISS,D. y GOLDSCHMIDT,E.E. 2003a. Girdling affects carbohydrate-related gene expression in leaves, bark and roots of alternate-bearing citrus trees. *Ann. Bot.* 92: 137-143.
- LI,C.Y., WEISS,D. y GOLDSCHMIDT,E.E. 2003b. Effects of carbohydrate starvation on gene expression in citrus root. *Planta* 217: 11-20.
- LI,C.Y., SHI,J.X., WEISS,D. y GOLDSCHMIDT,E.E. 2003c. Sugars regulate sucrose transporter gene expression in citrus. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 306: 402-407.
- LI,C.Y., FENG,F. y CHENG,L. 2012. Expression patterns of genes involved in sugar metabolism and accumulation during apple fruit development. *PLoS ONE* 7: 1-14.

- LOESCHER,W.H., THADDEUS,M.C., JOHN,D.K. 1990. Carbohydrate reserves, translocation, and storage in woody plant roots. *Hort. Sci.* 25: 274-281.
- LOOMIS,W.E. 1935. Translocation and growth balance in woody plants. *Ann. Bot.* 49: 247-272.
- LORD,E.M. y ECKARDT,K.J. 1985. Shoot development in *Citrus sinensis* L. (Washington navel orange). I. Floral and inflorescence ontogeny. *Bot. Gaz.* 146(3): 320-326.
- LORD,E.M. y ECKARDT,K.J. 1987. Shoot development in *Citrus sinensis* L. (Washington navel orange). II. Alteration of developmental fate of flowering shoots after GA treatment. *Bot. Gaz.* 148(1): 217-222.
- LOVATT,C.J., STREETER,S.M., MINTER,T.C., O'CONNEL,N.V., FLAHERTY,D.L., FREEMAN,M.W. y GOODELL,P.B. 1984. Phenology of flowering in *Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Washington navel orange. *Proc. Int. Soc. Citricult.* 1: 186-190.
- LOVATT,C.J., ZHENG,Y. y HAKE,K.D. 1988. A new look at the Kraus-Kraybill hypothesis and flowering in Citrus. *Proc. Int. Soc. Citricult.* 1: 475-483.
- 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. *J. Plant Physiol.* 176: 108-17.
- MARTÍNEZ-FUENTES,A. 2010. El tiempo de permanencia del fruto en el árbol y su relación con la floración en los cítricos. Tesis UPV.
- MARTÍNEZ-FUENTES,A., MESEJO,C., JUAN,M., ALMELA,V. y AGUSTÍ,M. 2004. Restrictions on the exogenous control of flowering in citrus. *Acta Hort.* 632: 91-98.
- 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: 1936-43.
- MATAA,M., TOMINAGA,S. y KOZAKI,I. 1998. The effect of time of girdling on carbohydrate contents and fruiting in Ponkan mandarin (*Citrus reticulata* Blanco). *Sci.Hort.* 73: 203-211.
- McCREADY,R.M., GUGGOLZ,J., SILVIERA,V. y OWENS,H.S. 1950. Determination of starch and amylase in vegetables. *Ann. Chem.* 22(9): 1156-1158.
- MEHOUACHI,J., IGLESIAS,D.J., TADEO,F.R., AGUSTÍ,M., PRIMO-MILLO,E. y TALÓN,M. 2009. Delay of early fruitlet abscisión by Branco girdling in citrus coincides with previous increases in carbohydrate and gibberellin concentration. *Plant Growth Regul.* 58: 15-23.
- MENDEL,K. 1969. The influence of temperature and light on the vegetative development of citrus trees. *Proc. Int. Soc. Citricult.* 1: 259-265.
- MONCUR,M.W. y HASAN,O. 1994. Floral induction in *Eucalyptus nitens*. *Tree Physiol.* 14: 1303-1312.
- MONERRI,C., FORTUNATO-ALMEIDA,A., MOLINA,RV, NEBAUERS,G., GARCÍA-LUIS,A. y GUARDIOLA,J.L. 2011. Relation of carbohydrate reserves with the forthcoming crop, flower formation and photosintetic rate, in the alternate bearing "Salustiana" sweet Orange (*Citrus sinensis* L.). *Sci. Hort.* 129: 71-78.
- MONSELISE,S.P. 1973. Recent advances in the understanding of flower formation in fruits trees and its hormonal control. *Acta Hort.* 34: 457-476.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- MONSELISE,S.P. 1978. Crop regulation. Understanding of plant processes as a basis for successful growth regulation in citrus. *Proc. Int. Soc. Citricult.* 1:250-255.
- MONSELISE,S.P. 1985. Citrus and related genera. En: *Handbook of flowering. Volume 2.* Ed: Halevy,A.H. CRC Press. Boca Raton. Florida: 275-294.
- MONSELISE,S.P. 1986. Citrus. En: *Handbook of fruit set and development.* Ed: Monselise,S.P. CRC Press. Boca Raton. Florida: 87-108.
- MONSELISE,S.P. y GOLDSCHMIDT,E.E. 1981. Alternate bearing in citrus and ways of control. *Proc. Int. Soc. Citricult.* 1: 239-242.
- MONSELISE,S.P. y GOLDSCHMIDT,E.E. 1982. Alternate bearing in fruit trees. *Hort. Rev.* 4: 128-173.
- MONSELISE,S.P. y GOREN,R. 1969. Flowering and fruiting-interactions of exogenous and internal factors. *1st. Int. Citrus Symp., Riverside, 1968:* 1105-1112.
- MONSELISE,S.P. y HALEVY,A.H. 1964. Chemical inhibition and promotion of citrus flower bud induction. *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.* 84: 141-146.
- MONSELISE,S.P., FISHLER,M., BRAVDO,B. y GOLDSCHMIDT,E.E. 1986. Source-sink relationship in citrus: whole trees vs. girdled branches. En: *The regulation of photosynthesis in fruit trees.* Eds: Lakso,A.N. y Lenz,F. N.Y. State Agric. Exp. Sta. Geneva, Nueva York: 98-100.
- MOON,J., SUH,S.S., LEE,H., CHOI,K.R., HONG,C.B., PAEK,N.C., KIM,S.G. y LEE,I. 2003. The SOC1 MADS-box gene integrates vernalization and gibberellin signals for flowering in Arabidopsis. *Plant J.* 35: 613-623.
- MOORE,B.D., CHENG, S.H., RICE, J. y SEEMANN, J.R. 1998. Sucrose cycling, rubisco expression, and prediction of photosynthetic acclimation to elevated atmospheric CO₂. *Plant Cell Environ.* 22: 567-582.
- MOSS,G.I. 1969. Influence of temperature and photoperiod on flower induction and inflorescence development in sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *J. Hort. Sci.* 44: 311-320.
- MOSS,G.I. 1973. Major factors influencing flower formation and subsequent fruit-set of sweet orange. *Proc. Int. Soc. Citricult.* 2: 215-222.
- MOSS,G.I. 1976. Temperature effects on flower initiation in sweet orange (*Citrus sinensis*). *Aust. J. Agr. Res.* 27: 399-407.
- MUÑOZ-FAMBUENA,N., MESEJO,C., GONZÁLEZ-MAS,M.C., PRIMO-MILLO,E., AGUSTÍ,M., e IGLESIAS,D.J. 2011. Fruit regulates seasonal expression of flowering genes in alternate-bearing 'Moncada' mandarin. *Ann. Bot.* 108(3): 511-519.
- MUÑOZ-FAMBUENA,N., MESEJO,C., GONZÁLEZ-MAS,M.C., IGLESIAS,D.J. PRIMO-MILLO,E. y AGUSTÍ,M. 2012a. Gibberellic acid reduces flowering intensity in sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] by repressing *CiFT* gene expression. *J. Plant Growth Regul.* 31: 529-536.
- MUÑOZ-FAMBUENA,N., MESEJO,C., GONZÁLEZ-MAS,M.C., PRIMO-MILLO,E., AGUSTÍ,M., e IGLESIAS,D.J. 2012b. Fruit load modulates flowering-related gene expression in buds of alternate-bearing 'Moncada' mandarin. *Ann. Bot.* 110(6): 1109-1118.

- MUÑOZ-FAMBUENA,N., MESEJO,C., AGUSTÍ,M., TÁRRAGA,S., IGLESIAS,D.J., PRIMO-MILLO, E. y GONZÁLEZ-MAS,M.C. 2013. Proteomic analysis of "Moncada" mandarin leaves with contrasting fruit load. *Plant Physiol. Biochem.* 62: 95-106.
- NAKAGAWA,M., HONSHO,C., KANZAKI,S., SHIMIZU,K. y UTSUNOMIYA,N. 2012. Isolation and expression analysis of *FLOWERING LOCUS T*-like and gibberellin metabolism genes in biennial-bearing mango trees. *Sci. Horticult.* 139: 108-117.
- NASCHITZ,S., NAORA,A., GENISH,S., WOLF,S. y GOLDSCHMIDT,EE. 2010. Internal management of non-structural carbohydrate resources in apple leaves and branch wood under a broad range of sink and source manipulations. *Tree Physiol.* 30(6): 715-27.
- NEBAUER,S.G., ÁVILA,C., GARCÍA-LUIS,A. y GUARDIOLA,J.L. 2006. Seasonal variation in the competence of the buds of three cultivars from different *Citrus* species to flower. *Trees* 20: 507-514.
- NEBAUER,S.G., RENAU-MORATA,B., GUARDIOLA,J.L. y MOLINA,R.V. 2011. Photosynthesis down-regulation precedes carbohydrate accumulation under sink limitation in *Citrus*. *Tree Physiol.* 31: 169-177.
- NEBAUER,S.G., ARENAS,C., RODRÍGUEZ-GAMIR,J., BORDÓN,Y., FORTUNATO-ALMEIDA,A., MONERRI,C., GUARDIOLA,J.L. y MOLINA,R.V. 2013. Crop load not increase the photosynthetic rate in *Citrus* leaves under regular cropping conditions. A study throughout the year. *Sci. Horticult.* 160: 358-365.
- NIR,I., GOREN,R. y LESHEN,B. 1972. Effects of water stress, gibberellic acid and 2-dichloroethylmethylammonium chloride (CCC) on flower differentiation in Eureka lemon trees. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 97: 774-778.
- 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.). *J. Exp. Bot.* 58: 3915-3927.
- NISHIKAWA,F., ENDO,T., SHIMADA,T., FUJII,H., SHIMIZU,T. y OMURA,M. 2010. Transcriptional changes in *CiFT*-introduced transgenic trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.). *Tree Physiol.* 30(3) : 431-439.
- NISHIKAWA,F., 2013. Regulation of floral induction in citrus. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 82(4): 283-292.
- NOEL,A.R.A. 1970. The girdled tree. *Bot. Rev.* 36: 162-195.
- OKUDA,H. 2000. A comparison of IAA and ABA levels in leaves and roots of two citrus cultivars with different degrees of alternate bearing. *J. Hort. Sci. Biotech.* 75: 355-359.
- OKUDA,H., NODA,K., KIHARA,T. y HIRABAYASHI,T. 2002. Fine root volume, flowering, sprouting and carbohydrate content in the leaves and roots of bearing and non-bearing Satsuma mandarin trees in a systemized alternate-bearing orchard. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 71: 588-590.
- ORT,D.R. 2001. When there is too much light. *Plant Physiol.* 125: 29-32.
- ORTOLÁ,A.G., MONERRI,C., GUARDIOLA,J.L. 1997. Fruitlet age and inflorescence characteristics affect the thinning and the increase in fruitlet growth rate induced by auxin applications in *Citrus*. *Acta Hort.* 463: 501-508.
- PALEG,L.G. 1965. Physiological effects of gibberellins. *A. Rev. Plant Physiol.* 16: 291-322.
- PARK, J.T. y JOHNSON,MJ. 1949. A submicrodetermination of glucose. *J. Biol. Chem.* 181: 149-151.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- PAUL,M.J. y DRISCOLL,S.P. 1997. Sugar repression of photosynthesis: the role of carbohydrates in signalling nitrogen deficiency through source: sink imbalance. *Plant Cell Environ.* 20: 110-116.
- PAUL,M.J. y PELLNY,T.K. 2003. Carbon metabolite feedback regulation of leaf photosynthesis and development. *J. Exp. Bot.* 54(382): 539-47.
- PEMÁN,J. y NAVARRO,R. 1988. Repoblaciones forestales. Universitat de Lleida. Lleida.
- PEÑA,L., MARTÍN-TRILLO,M., JUÁREZ,J., PINA,J.A., NAVARRO,L. y MARTÍNEZ-ZAPATER,J.M. 2001. Consecutive expression of *Arabidopsis* *LEAFY* or *APETALA1* genes in citrus reduces their generation time. *Nature* 19: 263-267.
- PEREIRA,I.A.M. 2003. Época da indução e evocação floral em *Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Pêra Rio. *Ciência Rural* 33: 857-862.
- PILLITTERI,L.J., LOVATT,C.J. y WALLING,L. 2004a. Isolation and Characterization of a *TERMINAL FLOWER* homolog and its correlation with juvenility in *Citrus*. *Plant Physiol.* 135: 1540-1551.
- PILLITTERI,L.J., LOVATT,C.J. y WALLING,L. 2004b. Isolation and characterization of *LEAFY* and *APETALA1* homologues from *Citrus sinensis* L. Osbeck "Washington". *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 129: 846-856.
- PIRE,R. y ROJAS,E. 1999. Effects of drought stress and urea sprays on production of flower and vegetative buds of Tahiti lime. *Fruits* 54: 177-182.
- PRIMO-MILLO,E., IBÁÑEZ,R., MARTÍN,B. y LEGAZ,F. 1977. Productividad de la variedad de naranjo Navelate I. Factores que afectan a la fructificación. *An. INIA* 7: 163-182.
- QUEDADO,R.M. y FRIEND,D.J. 1978. Participation of photosynthesis in floral induction of the long day plant *Anagallis arvensis* L. *Plant Physiol.* 62: 802-806.
- QUILLOT,B., GENARD,M. y KERVELLA,J. 2004. Leaf light-saturated photosynthesis for wild and cultivated peach genotypes and their hybrids: a simple mathematical modelling analysis. *J. Hort. Sci. Biotech.* 79(4): 546-553.
- RATCLIFFE,O., BRADLEY,D. y COEN,E.S. 1999. Separation of shoot and floral identity in *Arabidopsis*. *Development* 125: 1609-1615.
- REBOLLEDO,A., 2006. Factores hormonales y nutricionales en el desarrollo del fruto del naranjo dulce *Citrus sinensis* (L.) Osbeck de la variedad Salustiana. Tesis UPV.
- REIG,C., GONZÁLEZ-ROSSIA,D., JUAN. y AGUSTÍ,M. 2006. Effects of fruit load on flower bud initiation and development in peach. *J. Hort. Sci. Biotech.* 81:1079-1085.
- RIBEIRO,R.V. y MACHADO,E.C. 2007. Some aspects of citrus ecophysiology in subtropical climates: revisiting photosynthesis under natural conditions. *Braz. J. Plant Physiol.* 19: 393-411.
- RIBEIRO,R.V., MACHADO,E.C., SANTOS,M.G. y OLIVEIRA, R.F. 2009a. Seasonal and diurnal changes in photosynthetic limitation of young sweet orange trees. *Environ. Exp. Bot.* 66: 203-211.
- RIBEIRO,R.V., MACHADO,E.C., SANTOS,M.G. y OLIVEIRA,R.F. 2009b. Photosynthesis and water relations of well-watered orange plants as affected by winter and summer conditions. *Photosynthetica* 47: 215-222.
- RIBEIRO,R.V., MACHADO,E.C., HABERMANN,G., SANTOS,M.G. y OLIVEIRA,R.F. 2012. Seasonal effects on the relationship between photosynthesis and leaf carbohydrates in orange trees. *Func. Plant Biol.* 39: 471-480.

- RIVAS,F., FRASCHINI,C., LANFRANCO,M. BORGES,A., ESPINO,M. y GRAVINA,A. 2004. Characterization and improvement of potential productivity of 'Nova' mandarin in Uruguay. *Proc. Int. Soc. Citricult.*: 385-391.
- RIVAS,F., ERNER,Y., ALOS,E., JUAN,M., ALMELA,V. y AGUSTÍ,M. 2006. Girdling increases carbohydrate availability and fruit-set in citrus cultivars irrespective of parthenocarpic ability. *J. Hort. Sci. Biotech.* 81: 289-295.
- RIVAS,F., GRAVINA,A. y AGUSTÍ,M. 2007. Girdling effects on fruit set and quantum yield efficiency of PSII in two citrus cultivars. *Tree Physiol.* 27: 527-535.
- RIVAS,F., FORNÉS,F., y AGUSTÍ,M. 2008. Girdling induces oxidative damage and triggers enzymatic and non-enzymatic antioxidative defences in *Citrus* leaves. *Env. Exp. Bot.* 64: 256-263.
- RIVAS,F., MARTÍNEZ-FUENTES,A., MESEJO,C., REIG,C. y AGUSTÍ,M. 2010. Efecto hormonal y nutricional del anillado en frutos de diferentes tipos de brotes cítricos. *Agrociencia* 14: 8-14.
- RIVAS,F., FORNÉS,F., RODRIGO,M.J., ZACARÍAS,L. y AGUSTÍ,M. 2011. Changes in carotenoids and ABA content in *Citrus* leaves in response to girdling. *Sci. Hortic.* 127: 482-48.
- ROITSCH,T. 1999. Source-sink regulation by sugar and stress. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 198-206.
- ROLLAND,F., BAENA-GONZÁLEZ,E. y SHEEN,J. 2006. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57: 675-709.
- ROPER,T.R., KELLER,J.D., LOESCHER,W.H. y ROM,C.R. 1988. Photosynthesis and carbohydrate partitioning in sweet cherry: Fruiting effects. *Physiol. Plant.* 72: 42-47.
- RUIZ,R. y GUARDIOLA,J.L. 1994. Carbohydrate and mineral nutrition of orange fruitlets in relation to growth and abscission. *Physiol. Plant.* 90: 27-36.
- RUIZ,R., GARCÍA-LUIS,A., MONERRI,C. y GUARDIOLA,J.L. 2001. Carbohydrate availability in relation to fruitlet abscission in *Citrus*. *Ann. Bot.* 87: 805-812.
- RUÍZ-GARCÍA,L., MADUENO,F., WILKINSON,M., HAUGN,G., SALINAS,J. y MARTÍNEZ-ZAPATER, J.M. 1997. Different roles of flowering-time genes in the activation of floral initiation genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 9: 1921-1934.
- SACHS,R.M. y HACKETT,W.P. 1983. Source-sink relationships and flowering. En: *Strategies of plant reproduction*. Allanheld, Osmund, Ottawa: 263-272.
- SAIDHA,T., GOLDSCHMIDT,E.E. y MONSELISE,S.P. 1983. Endogenous growth-regulators in tracheal sap of *Citrus*. *HortSci.* 18(2): 231-232.
- SANTOS,C., RIBEIRO,R., MAGALHES,J.R., MACHADO,D. y MACHADO,E. 2011. Low substrate temperature imposes higher limitation to photosynthesis of orange plants as compared to atmospheric chilling. *Photosynthetica* 49: 546-554.
- SANZ,A., MONERRI,C., GONZÁLEZ-FERRER,J. y GUARDIOLA,J.L. 1987. Changes in carbohydrates and mineral elements in citrus leaves during flowering and fruit set. *Physiol. Plant.* 69: 93-98.
- SAMACH,A. 2013. Congratulations, you have been carefully chosen to represent an important developmental regulator! *Ann. Bot.* 111(3): 329-333.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- SAMACH,A. y SMITH,H.M. 2013. Constraints to obtaining consistent annual yields in perennials. II: Environment and fruit load affect induction of flowering. *Plant Sci.* 207: 168-76.
- SATO,K., SUGIHARA,K., IWASAKI,M. y OKUDA,H. 2007. Effect of NAA on the flowering ability and concentration of nutritional elements in the leaves and shoots of satsuma mandarin grown in a early heating plastic house. *Hort. Res.* 6: 553-557.
- SCHAFFER,A.A., GOLDSCHMIDT,E.E., GOREN,R. y GALILI,D. 1985. Fruit set and carbohydrate status in alternate and nonalternate bearing Citrus cultivars. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 110: 574-578.
- SCHAFFER,A.A., LIN,K.C., GOLDSCHMIDT,E.E., BOYER,C.D. y GOREN,R. 1986. Citrus leaf chlorosis induced by sink removal: starch, nitrogen and chloroplast ultrastructure. *J. Plant Physiol.* 124: 111-121.
- SCHAFFER,B., WHILEY,A.W. y SEARLE,C. 1999. Atmospheric CO₂ enrichment, root restriction, photosynthesis, and dry-matter partitioning in subtropical and tropical fruit crops. *HortSci.* 34: 1033-1037.
- SCHNEIDER,H. 1954. Effect of trunk girdling on phloem of trunk of sweet orange trees on sour orange rootstock. *Hilgardia* 22: 593-691.
- SCHNEIDER,H. 1968. The anatomy of citrus. En: *The Citrus Industry*. Eds: Reuther,W., Bachelor,L.D., y Webber,H.J. Univ. Calif. Div. Agric. Sci. Berkeley: 1-85.
- SCORZA,R. 1982. In vitro flowering. *Hort. Rev.* 4: 106-127.
- SEO,M., JIKUMARU,Y. y KAMIYA,Y. 2011. Profiling of hormones and related metabolites in seed dormancy and germination studies. Ed: Clifton,N.J. *Metb. Mol. Biol.* 773: 99-111.
- SHALOM,L., SAMUELS,S., ZUR,N., SHLIZERMAN,L., ZEMACH,H., WEISSBERG,M., OPHIR,R., BLUMWALD,E. y SADKA,A. 2012. Alternate bearing in citrus: changes in the expression of flowering control genes and in global gene expression in ON- versus OFF- crop trees. *PLoS ONE* 7(10): e46930.
- SHALOM,L., SAMUELS,S., ZUR,N., SHLIZERMAN,L., 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. *J. Exp. Bot.* doi: 10.1093/jxb/eru148.
- SHAMEL,A.D. y POMEROY,C.S. 1935. Progress report on girdling Washington navel orange trees. *Calif. Citrog.* 16: 94-101.
- SHANNON,S. y MEEKS-WAGNER,D.R. 1991. A mutation in the Arabidopsis *TFL1* gene affects inflorescence meristem development. *Plant Cell* 3: 877-892.
- SHELDON,C.C.; CONN,A.B., DENNIS,E.S. y PEACOCK,W.J. 2002. Different regulatory regions are required for the vernalization-induced repression of FLOWERING LOCUS C and for the epigenetic maintenance of repression. *Plant Cell* 14(10): 2527-2537.
- SINCLAIR,T.R. y ALLEN,L.H., 1982. Carbon dioxide and water vapour exchange of leaves on field-grown Citrus trees. *J. Exp. Bot.* 33: 1166-1175.
- SINGH,H.P. y CHADHA,K.L. 1988. Regulation of flushing and flowering in acid lime (*Citrus aurantifolia* Swing.) through stress management. *Prog. Hort.* 20: 1-6.
- SINGH,R.N. 1971. Biennial bearing in fruit trees-accent on apple and mango. *Ind. Counc. Agr. Res. Bul.* 30.

- SKENE,K.G.M. 1967. Gibberellin-like substances in root exudate of *Vitis vinifera*. *Planta* 74: 250-262.
- SMEEKENS,S. 2000. Sugar-induced signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51: 49-81.
- SMITH,M.W., ROHLA,C.T. y MANESS,N.O. 2007. Correlations of crop load and return bloom with root and shoot concentrations of potassium, nitrogen, and nonstructural carbohydrates in pecan. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 132 (1): 44 -51.
- SMITH,H.M. y SAMACH,A. 2013. Constraints to obtaining consistent annual yields in perennial tree crops. I: heavy fruit load dominates over vegetative growth. *Plant Sci.* 207: 158-167.
- SMITH,P. 1976. Collapse of 'Murcott' tangerine trees. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 101:23-25.
- SOUTHWICK,S.M. y DAVENPORT,T.L. 1986. Characterization of water stress and low temperature effects on flower induction in citrus. *Plant Physiol.* 81: 26-29.
- SOUTHWICK,S.M. y DAVENPORT,T.L. 1987. Modification of the water stress-induced floral response in Tahiti lime. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 112: 231-236.
- SPIEGEL-ROY,P. y GOLDSCHMIDT,E.E. 1996. *Biology of Citrus*. Cambridge University Press, Cambridge.
- STOLTZ,L.P. 1965. Physiological study of the effect of girdling on rooting. *Diss. Abstr.* 26: 1739-1740.
- SWARBRICK,T. 1927. The healing of wounds in woody stems. II. Contribution to the physiological anatomy of ringed apple shoots. *J. Pom. Hort. Sci.* 6: 29-46.
- SYVERTSEN,J.P. 1984. Light acclimation in citrus leaves. II. CO₂ assimilation and light, water, and nitrogen use efficiency. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 109: 812-817.
- SYVERTSEN,J.P. y LLOYD,J. 1994. Citrus. En: *Handbook of environmental physiology of fruit crops, Vol.2. Subtropical and tropical crops*. Eds: Schaffer,A.A. y Anderson,P.C. CRC Press. Boca Ratón, Florida: 65-99.
- SYVERTSEN,J.P., ZABLOTOWICZ,R.M. y SMITH Jr,M.L. 1983. Soil temperature and flooding effects on two species of citrus. 1. Plant growth and hydraulic conductivity. *Plant Soil* 72: 3-12.
- SYVERTSEN,J.P., SMITH Jr,M.L, LLOYD,J. y FARQUHAR,G.D., 1997. Net carbon dioxide assimilation, carbón isotope discrimination, growth, and water use efficiency of *Citrus* trees in response to nitrogen status. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 122: 226-232.
- SYVERTSEN,J.P., GOÑI,C. y OTERO,A. 2003. Fruit load and canopy shading affect leaf characteristics and net gas exchange of 'Spring' navel orange trees. *Tree Physiol.* 23: 899-906.
- TAIZ,L. y ZEIGER,E. 2007. *Fisiología vegetal*. Universitat Jaume I. Castellón de la Plana.
- TALÓN,M. y GMITTER,F.G. 2008. Citrus genomics. *Int. J. Plant Genomics*. ID: 528361.
- TALÓN,M., HEDDEN,P. y PRIMO-MILLO,E. 1990. Gibberellins in *Citrus sinensis*: a comparison between seeded and seedless varieties. *J. Plant Growth Regul.* 9: 201-206.
- TALÓN,M., ZACARÍAS,L. y PRIMO-MILLO,E. 1992. Gibberellins and parthenocarpic ability in developing ovaries of seedless mandarins. *Plant Physiol.* 99: 1575-1581.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- TALÓN,M., TADEO,F.R., BEN-CHEIKH,W., GÓMEZ-CADENAS,A., MEHOUACHI,J., PÉREZ-BOTELLA,J. y PRIMO-MILLO,E. 1997. Hormonal regulation of fruit set and abscission in citrus: classical concepts and new evidence. *Acta Hort.* 463: 209-217.
- TALÓN,M., MEHOUACHI,J., IGLESIAS,D.J., TADEO,F.R., LLISO,I., MOYA,J.L., GÓMEZ-CADENAS,A. y PRIMO-MILLO,E. 2000. Citrus fruitlet abscission: physiological bases supporting the “competition hypothesis”. *Proc. Int. Soc. Citricult.* 1: 602-604.
- TAMIM,M., ALTMAN,A., GOREN,R. y GOLDSCHMIDT,E.E. 1996. Modification of the time and intensity of flowering in *Citrus* cultivars by water stress, light, low temperatures and growth regulators. *Proc. Int. Soc. Citricult.* 2: 945-948.
- TAN,F.C. y SWAIN,S.M. 2007. Functional characterization of *AP3*: *SOC1* and *WUS* homologues from citrus (*Citrus sinensis*). *Physiol. Plant.* 131: 481-49.
- TRÉNOR,I. y REQUENA,S. 2001. Cultivar cítricos bajo malla de plástico aumenta la producción. *Vida Rural* 15: 40-44.
- TURCK,F., FORNARA,F. y COUPLAND,G. 2008. Regulation and identity of florigen: *FLOWERING LOCUS T* moves center stage. *Ann. Rev. Plant Biol.* 59: 573-594.
- URBAN,L., LÉCHAUDEL,M. y LU.,P. 2004. Effect of fruit load and girdling on leaf photosynthesis in *Mangifera indica* L. *J. Exp. Bot.* 55(405): 2075-2085.
- USDA (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE). 2015. *Citrus: World Markets and Trade.* (s.f). Recuperado el 15 mayo 2015 de <http://www.fas.usda.gov/data/citrus-world-markets-and-trade>.
- VALIENTE,J.I. y ALBRIGO,G. 2004. Flower bud induction of sweet orange trees (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck): effect of low temperatures, crop load and bud age. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 129: 158-164.
- VAN HUYLENBROECK,J.M. y DEBERGH,P.C. 1993. Year round production of flowering *Calathea crocata*: influence of light and carbon dioxide. *HortSci.* 28: 897-898.
- VAN RENSBURG,P.J.J., PENG,S., GARCÍA-LUIS,A., FORNÉS,F. y GUARDIOLA,J.L. 1996. Increasing crop value in fino clementine mandarin with plant growth regulators. *Proc. Int. Soc. Citricult.* 2: 970-974.
- VERREYNNE,J.S. y LOVATT,C.J. 2009. The effect of crop load on budbreak influences return bloom in alternate bearing 'Pixie' mandarin. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 134 : 299-307.
- VU,J.C.V. 1999. Photosynthetic responses of citrus to environmental changes. En: *Handbook of Plant and Crop Stress*. Ed: Pessarakli. Marcel Dekker. New York: 947-961.
- VU,J.C.V. y YELENOSKY,G. 1987. Photosynthetic characteristics in leaves 'Valencia' orange (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck) grown under high and low temperature regimes. *Environ. Exp.Bot.* 27: 279-287.
- VU,J.C.V. y YELENOSKY,G. 1988. Water deficit and associated changes in some photosynthetic parameters in leaves of 'Valencia' orange (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck). *Plant Physiol.* 88: 375-378.
- VU,J.C.V, ALLEN,L.H, BOOTE,K.J. y BOWES,G. 1997. Effects of elevated CO₂ and temperature on photosynthesis and rubisco in rice and soybean. *Plant Cell Environ.* 20: 68-76.
- VU, J.C.V., GESCH,R.W., ALLEN,L.H., BOOTE,K.J. y BOWES,G. 1999. CO₂ enrichment delays a rapid, drought-induced decrease in rubisco small subunit transcript abundance. *J. Plant Physiol.* 155: 139-142.

- VUJ.C.V., GESCH,R.W. PENNANEN,A.H., ALLEN,L.H., BOOTE,K.J. y BOWES,G. 2001. Soybean photosynthesis, Rubisco, and carbohydrate enzymes function at supraoptimal temperatures in elevated CO₂. *J. Plant Physiol.* 158: 295-307.
- VUJ.C.V., NEWMAN,Y., ALLEN,L.H., GALLO-MEAGHER,M. y ZHANG,M.Q. 2002. Photosynthetic acclimation of young sweet orange trees to elevated growth CO₂ and temperature. *J. Plant Physiol.* 159: 147-157.
- WALLERSTEIN,I., GOREN,R. y MONSELISE,S.P. 1973. Seasonal changes in gibberellin-like substances of Shamouti orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) trees in relation to ringing. *J. Hort. Sci.* 48: 75-82.
- WIGGE,P.A., KIM,M.C., JAEGER,K.E., BUSCH,W., SCHMID,M., LOHMANN,J.U. y WEIGEL,D. 2005. Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*. *Science* 309: 1056-1059.
- WILKIE,J.D., SEDGLEY,M. y OLESEN,T. 2008. Regulation of floral initiation in horticultural trees. *J. Exp. Bot.* 59: 3215-3228.
- WILSON,R.N., HECKMAN,J.W. y SOMERVILLE,C.R. 1992. Gibberellin is required for flowering in *Arabidopsis thaliana* under short days. *Plant Physiol.* 100: 4003-408.
- YAHATA,D., MATSUMOTO,K. y USHIJIMA,K., 2004. Relationship between flower-bud differentiation and carbohydrate contents in spring shoots of very-early, early and late maturing cultivars of 'Satsuma' mandarin. *J. Jap. Soc. Hortic. Sci.* 73: 405-410.
- YAMANISHI,O.K. 1995. Trunk strangulation and winter heating effects on carbohydrate level and its relation with flowering, fruiting and yield of "Tosa Buntan" pummelo grown in a plastic house. *J. Hort. Sci.* 70: 85-95.
- ZHANG,J.Z., LI,Z.M., YAO,J.L., HU,C.G. 2009. Identification of flowering-related genes between early flowering trifoliolate orange mutant and wild-type trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.) by suppression subtraction hybridization (SSH) and microarray. *Gene* 430: 95-104.
- ZHANG,J.Z., AI,X.Y., SUN,L.M., ZHANG,D.L., GUO,W.W., DENG,X.X. y HU,C.G. 2011. Molecular cloning and functional characterization of genes associated with flowering in citrus using an early-flowering trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf) mutant. *Plant Mol. Biol.* 76(1-2): 187-204.
- ZHOU,R. y QUEBEDEAUX,B. 2003. Changes in photosynthesis and carbohydrate metabolism in mature apple leaves in response to whole plant source-sink manipulation. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 128:113-119.
- ZIMMERMANN,M.H. y ZIEGLER,H. 1975. List of sugars and sugar alcohols in sieve-tube exudates. En: *Transport in plants: Phloem transport*. Eds: Zimmerman,M.H. y Milburn,J.A. Springer, NuevaYork: 480-503.
- ZUCCONI,G., MONSELISE,S.P. y GOREN,R. 1978. Growth-abscission relationships in developing orange fruit. *Sci. Hortic.* 9: 137-146.

ANEXOS

ANEXO I

DATOS CLIMÁTICOS

Tabla I. Temperaturas medias mensuales y anuales de las medias diarias (°C) para cada año de experimentación. Datos de la estación meteorológica del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (Moncada, Valencia), situada a 6 km de la parcela de experimentación.

| | Año | | | | | | | | |
|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 1999 | 2000 | 2001 | 2002 | 2003 | 2004 | 2005 | 2011 | 2012 |
| Mes | | | | | | | | | |
| E | 11,11 | 7,13 | 11,75 | 9,45 | 9,68 | 11,47 | 7,23 | 9,24 | 8,26 |
| F | 10,67 | 12,23 | 10,57 | 11,31 | 9,24 | 9,22 | 7,58 | 10,54 | 7,44 |
| Mz | 12,47 | 12,84 | 16,73 | 12,91 | 11,77 | 11,05 | 11,24 | 11,61 | 11,89 |
| Ab | 15,94 | 15,53 | 15,51 | 14,55 | 14,7 | 13,7 | 14,62 | 16,15 | 15,22 |
| My | 19,93 | 19,38 | 18,36 | 16,96 | 18,23 | 16,56 | 18,41 | 18,94 | 19,66 |
| Jn | 22,12 | 22,47 | 22,64 | 22,43 | 24,73 | 22,75 | 23,39 | 21,33 | 23,64 |
| Jl | 25,18 | 24,63 | 24,44 | 24,11 | 26,19 | 24,29 | 24,9 | 23,96 | 25,03 |
| Ag | 26,27 | 24,8 | 25,63 | 23,17 | 26,34 | 26,04 | 24,02 | 23,97 | 26,27 |
| S | 22,75 | 21,98 | 21,76 | 21,83 | 21,71 | 22,64 | 21,58 | 22,13 | 22,27 |
| O | 17,84 | 17,4 | 19,17 | 17,92 | 17,3 | 18,7 | 19,05 | 18,38 | 17,98 |
| N | 11,26 | 13,22 | 11,13 | 14,07 | 13,52 | 12,09 | 12,4 | 14,04 | 13,79 |
| D | 10,51 | 11,23 | 7,91 | 12,04 | 10,08 | 9,72 | 9,52 | 10,04 | 10,82 |
| Media anual | 17,17 | 16,90 | 17,13 | 16,73 | 16,96 | 16,52 | 16,16 | 16,69 | 16,86 |

ANEXOS

Tabla II. Temperaturas medias mensuales y anuales de las máximas diarias (°C) para cada año de experimentación. Datos de la estación meteorológica del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (Moncada, Valencia), situada a 6 km de la parcela de experimentación.

| | Año | | | | | | | | |
|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 1999 | 2000 | 2001 | 2002 | 2003 | 2004 | 2005 | 2011 | 2012 |
| Mes | | | | | | | | | |
| E | 16,83 | 14,49 | 17,27 | 16,5 | 16,15 | 19,11 | 16,02 | 16,79 | 17,34 |
| F | 18,03 | 20,4 | 17,58 | 19,48 | 15,14 | 15,66 | 14,4 | 18,97 | 15,92 |
| Mz | 19,15 | 19,86 | 23,82 | 19,47 | 18,59 | 17,16 | 18,2 | 17,46 | 19,92 |
| Ab | 23,3 | 21,44 | 22,43 | 20,71 | 21,23 | 20,48 | 21,6 | 22,55 | 22,11 |
| My | 25,92 | 25,12 | 24,8 | 22,85 | 24,18 | 22,86 | 24,81 | 24,93 | 26,02 |
| Jn | 27,53 | 27,7 | 28,64 | 28,92 | 30,87 | 28,79 | 29,41 | 26,56 | 29,78 |
| Jl | 30,02 | 30,19 | 30,05 | 29,69 | 31,86 | 29,52 | 30,15 | 28,97 | 30,33 |
| Ag | 31,38 | 30,37 | 31,38 | 29,01 | 32,85 | 32,06 | 29,61 | 30,33 | 32,64 |
| S | 29,42 | 28,11 | 26,67 | 27,84 | 27,56 | 28,51 | 29,79 | 28,5 | 28,6 |
| O | 22,92 | 23,67 | 25,45 | 25,02 | 22,99 | 25,86 | 25,39 | 25,67 | 25,26 |
| N | 17,8 | 18,91 | 17,77 | 20,89 | 19,63 | 19,59 | 19,32 | 20,27 | 19,81 |
| D | 16,34 | 17,74 | 14,81 | 18,13 | 17,26 | 15,97 | 16,7 | 18,44 | 19,22 |
| Media anual | 23,22 | 23,17 | 23,39 | 23,21 | 23,19 | 22,96 | 22,95 | 23,29 | 23,91 |

Tabla III. Temperaturas medias mensuales y anuales de las mínimas diarias (°C) para cada año de experimentación. Datos de la estación meteorológica del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (Moncada, Valencia), situada a 6 km de la parcela de experimentación.

| | Año | | | | | | | | |
|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 1999 | 2000 | 2001 | 2002 | 2003 | 2004 | 2005 | 2011 | 2012 |
| Mes | | | | | | | | | |
| E | 5,74 | 2,01 | 6,62 | 4,29 | 4 | 4,99 | 1,19 | 3,17 | 1,95 |
| F | 4,35 | 5,73 | 4,59 | 4,64 | 4,07 | 3,92 | 2,02 | 3,54 | -0,02 |
| Mz | 6,3 | 6,61 | 9,85 | 7,25 | 5,94 | 5,66 | 5,47 | 6,08 | 4,26 |
| Ab | 8,98 | 9,62 | 8,66 | 8,85 | 8,63 | 7,4 | 8,15 | 9,96 | 8,08 |
| My | 14,09 | 13,76 | 12,48 | 10,95 | 12,31 | 10,81 | 12,14 | 12,2 | 12,26 |
| Jn | 16,25 | 16,66 | 15,73 | 15,28 | 18,34 | 16,56 | 17,16 | 15,12 | 16,45 |
| Jl | 19,65 | 18,84 | 18,34 | 18,28 | 20,18 | 18,66 | 19,43 | 18,49 | 18,98 |
| Ag | 21,25 | 18,96 | 20 | 18,28 | 19,76 | 19,95 | 18,51 | 17,51 | 19,35 |
| S | 16,31 | 16,16 | 17,36 | 16,74 | 16,73 | 17,6 | 15,44 | 16,18 | 16,17 |
| O | 13,44 | 12,25 | 14,48 | 12,3 | 12,83 | 13,05 | 13,32 | 12,51 | 12,06 |
| N | 6,05 | 7,44 | 6,4 | 8,27 | 8,54 | 6,3 | 7,04 | 9,45 | 8,88 |
| D | 5,14 | 6,25 | 2,98 | 6,91 | 4,69 | 4,83 | 3,52 | 3,82 | 4,22 |
| Media anual | 11,46 | 11,19 | 11,46 | 11,00 | 11,34 | 10,81 | 10,28 | 10,67 | 10,22 |

ANEXOS

Tabla IV. Precipitaciones acumuladas mensuales y anuales (mm) para cada año de experimentación. Datos de la estación meteorológica del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (Moncada, Valencia), situada a 6 km de la parcela de experimentación.

| | Año | | | | | | | | |
|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 1999 | 2000 | 2001 | 2002 | 2003 | 2004 | 2005 | 2011 | 2012 |
| Mes | | | | | | | | | |
| E | 2,0 | 48,2 | 17,0 | 23,5 | 4,6 | 0,6 | 0,0 | 27,1 | 21,6 |
| F | 1,7 | 0,0 | 22,5 | 0,3 | 45,8 | 37,8 | 84,9 | 2,4 | 0,8 |
| Mz | 28,5 | 60,1 | 1,5 | 30,7 | 18,7 | 19,5 | 4,9 | 78,1 | 33,8 |
| Ab | 7,0 | 22,9 | 11,9 | 68,5 | 51,6 | 47,6 | 26,8 | 43,7 | 35,8 |
| My | 4,0 | 17,1 | 32,7 | 96,6 | 79,8 | 89,2 | 19,1 | 45,7 | 1,7 |
| Jn | 2,0 | 11,6 | 2,7 | 35,7 | 8,7 | 23,2 | 14,1 | 20,9 | 6,1 |
| Jl | 54,1 | 0,8 | 0,1 | 78,1 | 13,8 | 5,1 | 18,3 | 9,2 | 0,0 |
| Ag | 1,5 | 6,4 | 1,8 | 53,2 | 30,4 | 1,2 | 14,4 | 1,7 | 0,0 |
| S | 59,1 | 8,7 | 168,3 | 34,7 | 46,8 | 121,8 | 20,0 | 52,9 | 37,6 |
| O | 46 | 265 | 36,2 | 24,1 | 47,2 | 12,3 | 18,7 | 31,7 | 49,2 |
| N | 6,8 | 3,7 | 57,9 | 12,8 | 14,0 | 0,1 | 73,7 | 63 | 50,8 |
| D | 10,1 | 25,4 | 44,4 | 29,1 | 16,0 | 38,5 | 14,2 | 11,9 | 8,0 |
| Total anual | 222,8 | 469,9 | 397,0 | 487,3 | 377,4 | 396,9 | 309,1 | 388,3 | 245,4 |