

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE ECOSISTEMAS  
AGROFORESTALES



***INHIBICIÓN DE LA INDUCCIÓN FLORAL  
EN LOS CÍTRICOS.  
FACTORES HORMONALES RELACIONADOS CON  
LA PRESENCIA DEL FRUTO.***

TRABAJO FIN DE MÁSTER  
EN MÁSTER UNIVERSITARIO EN SANIDAD Y PRODUCCIÓN VEGETAL

ALUMNO/A: Sara Herrera Lagranja

TUTOR/A: Carlos Mesejo Conejos

*Curso Académico: 2014/2015*

VALENCIA, 7 de septiembre 2015



## RESUMEN

La producción alternante, años de gran producción seguidos de años de producción escasa o nula, es un serio problema en el cultivo de los Cítricos. Este fenómeno es debido a una disminución en la floración causada por la influencia del fruto tras una cosecha elevada. Martínez-Fuentes *et al.* (2010) demostraron que esta influencia tenía lugar si el fruto permanecía en el árbol a partir del mes de noviembre, que coincide con el momento en el que alcanza su máximo tamaño e inicia el cambio de color. El fruto ejerce su efecto inhibitorio mediante la inhibición de los genes promotores de la floración (*CiFT*, *CsAP1*, *CsLFY*) y promoviendo la expresión de los genes inhibidores (*CsTFL* y *FLC*) en las hojas y las yemas (Muñoz-Fambuena *et al.*, 2011; 2012). Sin embargo, se desconoce la(s) señal(es) que produce el fruto para desencadenar ese efecto.

Las hormonas que, mayoritariamente, se han relacionado con la floración son las giberelinas (GAs) y el ácido abscísico (ABA). En los cítricos, la aplicación exógena de GA<sub>3</sub> reduce la floración (Guardiola *et al.*, 1982) y reduce la expresión de *CiFT* (Muñoz-Fambuena *et al.* 2012). En *Arabidopsis*, el ABA se ha relacionado con la inhibición de la floración dado que promueve la expresión del gen *FLC*. Además, tanto el ABA como las GAs están implicadas en el proceso del cambio de color del fruto.

Por todo ello, en este trabajo se plantea la siguiente hipótesis: el fruto inhibe la floración en los cítricos, cuando inicia el cambio de color, mediante la exportación de hormonas que influyen en la expresión de los genes relacionados con la inducción floral.

Se llevaron a cabo dos experimentos utilizando árboles de mandarina 'Moncada' y de naranja dulce 'Navelate'. En el primero, se determinó la evolución del diámetro y de color del fruto, del contenido en clorofilas y carotenoides del fruto, de la expresión de los genes *CiFT* y *FLC* en las hojas y de las concentraciones de GAs y ABA en frutos, hojas y yemas, desde septiembre a febrero, en árboles con y sin frutos. En el segundo, se estudió el efecto de tratamientos exógenos con ABA y GA<sub>3</sub> durante el periodo de inducción floral (noviembre) en la expresión de los genes *CiFT* y *FLC* y se evaluó su efecto en la floración la primavera siguiente.

Los resultados confirman la influencia del fruto en la expresión de los genes relacionados con la inducción floral (*CiFT* y *FLC*) así como en la cuantía de la brotación y distribución de la floración. El incremento de la concentración de ABA en el fruto (en el cambio de color) coincidió con un incremento significativo de ABA en hojas y yemas, y de la expresión del gen *FLC* en hojas. Además, en los árboles 'off' ocurrió lo contrario, esto es, una reducción de la concentración de ABA a la vez que se redujo la expresión de *FLC* en las hojas. Pero la aplicación exógena de ABA a árboles 'off' no mostró una relación clara con la expresión de *FLC*, ni redujo significativamente la floración y la expresión del gen *CiFT*.

Las GAs de la ruta de la 13-hidroxilación disminuyeron en el fruto a la vez que aumentaron en las hojas, coincidiendo con la inhibición de la expresión de *CiFT*. La aplicación exógena de GA<sub>3</sub> redujo significativamente la expresión de *CiFT* y la floración.

Los resultados sugieren el fruto exporta ABA y GAs durante el cambio de color pero solamente las GAs se relacionan con la inhibición de la inducción floral en las hojas.

Palabras clave: FT, FLC, ABA, GA, Floración, Cítricos, Carotenoides.

## ABSTRACT

Fruit trees undergo cycles of heavy fruit load (ON) in one year, followed by low fruit load (OFF) the following year, a phenomenon known as alternate bearing. It results a serious problem in the Citrus Industry. Alternate bearing is due to a decrease in flowering caused by the influence of the fruit after a heavy harvest. Martinez-Fuentes *et al.* (2010) showed that fruit influence occurred if the fruit remained in the tree from November on, which coincides with the time when it reaches its maximum size and starts changing color. The fruit exerts its inhibitory effect by inhibiting flowering promoters' genes (*CiFT*, *CsAP1*, *CsLFY*) and promoting the expression of inhibitors genes (*CsTFL* and *FLC*) in the leaves and buds (Muñoz-Fambuena *et al.*, 2011; 2012). However, the mechanism by which fruit load affects flowering induction during the following year (return bloom) is still unclear. Gibberellins (GAs) and abscisic acid (ABA) have been associated with flowering inhibition. In citrus, the exogenous application of GA<sub>3</sub> reduces flowering (Guardiola *et al.*, 1982) and the expression of *CiFT* (Muñoz-Fambuena *et al.* 2012). In *Arabidopsis*, ABA has been related to flowering inhibition by promoting *FLC* expression. Additionally, both, ABA and GAs, are involved in the process of fruit color change.

Therefore, this work considers the following hypothesis: the fruit inhibits flowering by exporting hormones that influence the expression of genes related in floral induction during fruit color change.

Two experiments were carried out using 'Moncada' mandarin trees and 'Navelate' sweet orange. In the first experiment, the evolution of the diameter and color of the fruit, the chlorophylls and carotenoids content of the fruit, the expression of the *CiFT* and *FLC* genes in the leaves and GAs and ABA concentrations in fruit, leaves and buds was determined from September to February, in trees with and without fruits. In the second experiment, the effect of exogenous treatments of ABA and GA<sub>3</sub> was studied in the expression of *CiFT* and *FLC* genes during the floral induction (November) and its effect was evaluated in the following spring bloom.

The results confirm the influence of fruit on the expression of genes related to floral induction (*CiFT* and *FLC*) as well as on the bud sprouting and flowering distribution. ABA concentration's increase in the fruit (during color change) coincided with a significant increase of ABA in leaves and buds, and *FLC* gene expression in leaves. Furthermore, off-trees showed the opposite trend, that is, a reduction in ABA concentration while *FLC* expression was reduced in the leaves. But the exogenous application of ABA in 'off' trees did not show a clear relationship with the expression of *FLC*, besides flowering and *CiFT* expression were not reduced significantly.

The GAs of the 13-hydroxylation pathway decreased on the fruit at the same time that was increased on the leaves, coinciding with the inhibition of expression of *CiFT*. The exogenous application of GA<sub>3</sub> reduced significantly the expression of *CiFT* and flowering.

The results suggest the fruit ABA and GAs export during color change but only a GAs-relationship to the inhibition of flower induction in Citrus leaves.

Keywords: FT, FLC, ABA, GA, Flowering, Citrus, Carotenoids.

## RESUM

La producció alternant, anys de gran producció seguits d'anys de producció escassa o nul·la, és un seriós problema en el cultiu dels Cítrics. Aquest fenomen és degut a una disminució en la floració causada per la influència del fruit després d'una collita elevada. Martínez-Fuentes *et al.* (2010) van demostrar que aquesta influència tenia lloc si el fruit persistia a l'arbre a partir del mes de novembre, que coincideix amb el moment en què arriba al seu màxim tamany i inicia el canvi de color. El fruit exerceix el seu efecte inhibitori mitjançant la inhibició dels gens promotors de la floració (*CiFT*, *CsAP1*, *CsLFY*) i promovent l'expressió dels gens inhibidors (*CsTFL* i *FLC*) en les fulles i les gemmes (Muñoz-Fambuena *et al.*, 2011; 2012). No obstant això, es desconeix la (es) senyal (s) que produeix el fruit per desencadenar aquest efecte.

Les hormones que, majoritàriament, s'han relacionat amb la floració són les gibberel·lines (GAs) i l'àcid abscísic (ABA). En els cítrics, l'aplicació exògena de GA<sub>3</sub> redueix la floració (Guardiola *et al.*, 1982) i redueix l'expressió de *CiFT* (Muñoz-Fambuena *et al.*, 2012). En *Arabidopsis*, el ABA s'ha relacionat amb la inhibició de la floració atès que promou l'expressió del gen *FLC*. A més, tant el ABA com les GAs estan implicades en el procés del canvi de color del fruit.

Per tot això, en aquest treball es planteja la següent hipòtesi: el fruit inhibeix la floració en els cítrics, quan inicia el canvi de color, mitjançant l'exportació d'hormones que influeixen en l'expressió dels gens relacionats amb la inducció floral.

Es van dur a terme dos experiments utilitzant arbres de mandariner 'Moncada' i de taronger dolç 'Navelate'. En el primer, es va determinar l'evolució del diàmetre i de color del fruit, del contingut en clorofil·les i carotenoides del fruit, de l'expressió dels gens *CiFT* i *FLC* en les fulles i de les concentracions de GAs i ABA en fruits, fulles i gemmes, des de setembre a febrer, en arbres amb i sense fruits. En el segon, es va estudiar l'efecte de tractaments exògens amb ABA i GA<sub>3</sub> durant el període d'inducció floral (novembre) en l'expressió dels gens *CiFT* i *FLC* i es va avaluar el seu efecte en la floració la primavera següent.

Els resultats confirmen la influència del fruit en l'expressió dels gens relacionats amb la inducció floral (*CiFT* i *FLC*) així com en la quantia de la brotació i distribució de la floració. L'increment de la concentració d'ABA en el fruit (en el canvi de color) va coincidir amb un increment significatiu d'ABA en fulles i gemmes, i de l'expressió del gen *FLC* en les fulles. A més, en els arbres 'off' va passar el contrari, és a dir, una reducció de la concentració d'ABA alhora que es va reduir l'expressió de *FLC* a les fulles. Però l'aplicació exògena d'ABA a arbres 'off' no va mostrar una relació clara amb l'expressió de *FLC*, ni va reduir significativament la floració i l'expressió del gen *CiFT*.

Les GAs de la ruta de la 13-hidroxilació van disminuir en el fruit alhora que van augmentar en les fulles, coincidint amb la inhibició de l'expressió de *CiFT*. L'aplicació exògena de GA<sub>3</sub> va reduir significativament l'expressió de *CiFT* i la floració.

Els resultats suggereixen què el fruit exporta ABA i GAs durant el canvi de color però només les GAs es relacionen amb la inhibició de la inducció floral a les fulles.

Paraules clau: FT, FLC, ABA, GA, Floració, Citrics, Carotenoides.



A Carlos, por enseñarme este apasionante mundo de la Citricultura  
y ayudarme en todo.

A Manolo, por despertar en mí el interés por el mundo de la investigación.

A Natalia por su ayuda y su apoyo.

A Amparo, Carmina, Vicent y a mis compañeros del IAM, porque de una forma  
u otra han aportado su granito de arena a este trabajo.

A mis amigos, no solo compañeros, del master, sin vosotros este año no  
habría sido igual.

A mi familia, por apoyarme siempre y sobre todo por darme la oportunidad  
de haber estado aquí.

Y finalmente, gracias a ti que has llegado, y gracias a ti, por haber estado  
durante tantos años conmigo.



# ÍNDICES



# ÍNDICE GENERAL

<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1. La floración en los árboles frutales</b>	<b>1</b>
1.1. Inducción y diferenciación floral	2
1.2. El fruto inhibe la floración	4
<b>2. Inhibición de la floración. Factores hormonales</b>	<b>5</b>
2.1. Las giberelinas.	5
2.2. El ácido abscísico.	8
<b>3. Hipótesis de trabajo</b>	<b>10</b>
<b>4. Objetivos</b>	<b>11</b>
<b>II. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>13</b>
<b>1. Material vegetal</b>	<b>13</b>
<b>2. Diseño de los experimentos</b>	<b>13</b>
<b>3. Técnicas empleadas</b>	<b>14</b>
3.1. Estimación del índice de color	14
3.2. Diámetro del fruto	14
3.3. Extracción y cuantificación de pigmentos	14
3.4. Extracción y cuantificación de hormonas	16
3.4.1. <i>Protocolo de extracción de hormonas</i>	16
3.5. Diseño de oligonucleótidos	17
3.6. Análisis de la expresión génica	18
3.6.1. <i>Retrotranscripción</i>	18
3.6.2. <i>qPCR</i>	19
3.7. Evaluación de la floración	19
<b>4. Análisis estadístico</b>	<b>19</b>

<b>III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>21</b>
<b>1. El fruto inhibe la expresión del gen <i>FT</i> coincidiendo con el cambio de color</b>	<b>21</b>
<b>2. Evolución de la concentración de ABA en el fruto, hojas y yemas</b>	<b>26</b>
<b>3. Evolución de la concentración de GAs en el fruto, hojas y yemas</b>	<b>29</b>
<b>IV. CONCLUSIONES</b>	<b>35</b>
<b>V. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>37</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Lista de primers usados para la PCR

18





## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema de la ruta de síntesis de las giberelinas. 7
- Figura 2.** Esquema general de la biosíntesis de ABA en plantas. 9
- Figura 3.** Evolución del diámetro del fruto (A), la temperatura ambiental (B) el color del fruto (C,D), el contenido en clorofilas (E) y carotenoides (F) en el mandarino 'Moncada'. Cada valor es la media de 10 frutos. Las barras verticales indican el error estándar. 22
- Figura 4.** Evolución de la expresión relativa de los genes *FT* (A) y *FLC* (B) en árboles on y off de mandarino 'Moncada', y de la acumulación de horas frío (por debajo de 7,2°C). Cada valor es la media de 3 experimentos de RT-PCR independientes. 24
- Figura 5.** Cuantía de la brotación de otoño y primavera en árboles on y off de mandarino 'Moncada' (A) y distribución de los tipos de brotes desarrollados en árboles on y off en primavera (B). Cada valor es la media de 4 árboles. Las barras verticales indican el error estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas. 25
- Figura 6.** Evolución del contenido endógeno de ABA durante el periodo de inducción floral en hojas, yemas y frutos en árboles on (A) y en hojas y yemas en árboles off (B) de mandarino 'Moncada'. 27
- Figura 7.** Efecto del tratamiento exógeno de ABA (200 mg l<sup>-1</sup>) en la expresión relativa de los genes *CiFT2* (A) y *FLC* (B) de un árbol off de naranjo dulce 'Navelate'. Cada valor es la media de 3 RT-PCR independientes. La barra vertical muestra el valor LSD del experimento. 28
- Figura 8.** Efecto de ABA aplicado durante el periodo de inducción floral en la brotación y floración en árbol off de naranjo dulce 'Navelate'. Los asteriscos indican diferencias significativas. 29

**Figura 9.** Evolución del contenido de giberelinas en hojas, yemas y flavedo en árboles on de mandarino 'Moncada'. Ruta de la 13-no hidroxilación (A) y ruta de la 13-hidroxilación (B). 32

**Figura 10.** Evolución del contenido de giberelinas en hojas de brotación de otoño, en hojas de brotación de primavera y en yemas en árboles off de mandarino 'Moncada'. Ruta de la 13-no hidroxilación (A) y ruta de la 13-hidroxilación (B). 33

**Figura 11.** Efecto del tratamiento exógeno de GA en la expresión relativa del gen *CiFT2* en árbol off de naranjo dulce 'Navelate'. La barra vertical muestra el valor LSD del experimento. 34

**Figura 12.** Efecto de GA aplicado durante el periodo de inducción floral en la brotación y floración en árbol off de naranjo dulce 'Navelate'. Los asteriscos indican diferencias significativas. 34

# **I. INTRODUCCIÓN**



## 1. La floración en los árboles frutales

En los árboles frutales, la floración es generalmente muy abundante. Pero solamente una pequeña parte de ella llega a convertirse en fruto maduro. Por ejemplo, en especies de cítricos como el naranjo dulce (*Citrus sinensis*) se llegan a desarrollar hasta 250.000 flores por árbol durante el periodo de floración, pero el porcentaje de flores que cuajan y desarrollan un fruto maduro no supera el 1% (Agustí, 2003; Iglesias *et al.*, 2007). Este mecanismo se considera una estrategia de supervivencia. Sin embargo, en determinados casos, esta situación se ve interrumpida provocándose la inhibición total de la floración, como ocurre en el olivo (Dag *et al.*, 2010), en el aguacate (Monselise y Goldschmidt, 1982), en el mango (Nakagawa *et al.*, 2012) o en los cítricos (Muñoz-Fambuena *et al.*, 2013). La inhibición de la floración provoca la alternancia de cosechas.

La alternancia es un fenómeno que ocurre tanto en árboles caducifolios como en perennifolios. Consiste en que un año caracterizado por presentar una gran producción, 'año on', es seguido de un año en el que hay poca o nula producción, 'año off'. La alternancia de cosechas no implica estrictamente un modelo bianual regular, pues uno, dos o más años 'off' pueden seguir a uno o varios años 'on' (Singh, 1971).

En los cítricos, la alternancia causa problemas de producción y calidad. Los rendimientos son irregulares y la fruta producida es de bajo valor. En años 'off' se producen frutos muy grandes y de corteza gruesa, mientras que en años 'on' se producen muchos frutos pero demasiado pequeños. Además, una consecuencia colateral de este fenómeno es el declive del árbol llegando incluso a producirse el colapso en un año 'on' (Monselise *et al.*, 1981). En los cítricos se puede encontrar diferentes grados de alternancia en función de la especie y variedad. Por ejemplo, el mandarino 'Moncada' presenta un grado máximo de alternancia (0% - 100%) ya que su floración se anula por completo con niveles de cosecha intermedios (60-80 kg/árbol). Otras variedades, como el mandarino 'Nadorcott', requieren un nivel de cosecha elevado (150-200 kg/árbol) para que la floración se anule por completo (Muñoz-Fambuena *et al.*, 2013).

## 1.1. Inducción y diferenciación floral

La inducción floral es el proceso a través del cual las yemas vegetativas son promovidas a florecer (Davenport, 1990). Como consecuencia de un estímulo exógeno (luz, temperatura, estrés hídrico) se producen cambios endógenos en el interior del meristemo apical (contenido y distribución de nutrientes, hormonas y proteínas) que dan lugar a la floración.

La diferenciación floral es la transición morfológica y anatómica de los meristemos vegetativos a meristemos florales (Davenport, 1990). Se produce un aplanamiento del meristemo seguido de la aparición de los sépalos así como la diferenciación de los primordios de los pétalos, estambres y, por último, los carpelos (Benlloch *et al.*, 2007)

La floración está controlada exógenamente por señales ambientales, longitud del día, temperatura y estrés hídrico, y por factores endógenos como el estado nutricional y las hormonas. Cada uno de estos factores activa rutas de señalización particulares. Las diferentes rutas convergen en genes clave para el proceso de floración.

El gen *CONSTANS* (*CO*) está implicado en la regulación de la floración por el fotoperiodo. La proteína CO es estable solo a la luz por lo que sus niveles se mantienen bajos a lo largo de días cortos. El aumento de la duración del día y el reloj circadiano hacen que se exprese el gen *CO* y que la proteína CO se acumule hasta un cierto nivel durante el periodo de luz (Turck *et al.*, 2008). La acumulación de la proteína CO conduce a la activación del gen *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) que se expresa dando la proteína FT. Ésta se transporta por el floema hasta el meristemo donde forma un heterodímero uniéndose a la proteína *FLOWERING LOCUS D* (*FD*) (Giakountis y Coupland, 2008). El complejo FT/FD promueve la expresión de los genes de iniciación floral *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS* (*SOC1*) y *APETALA 1* (*AP1*). *SOC1*, a su vez, promueve la expresión de *LEAFY* (*LFY*). *LFY* y *AP1* son genes implicados en el establecimiento de la identidad del meristemo floral.

Los CYCLING DOF FACTORS (CDFs) son un conjunto de factores de transcripción represores de CO. La luz promueve la interacción entre GIGANTEA (GI) y una familia de proteínas (FKF1) que promuevan la degradación de CDFs, por lo que en día largo se da una mayor estabilidad y actividad de la proteína CO, que se acumula y conduce a la activación del gen *FT* (Turck *et al.*, 2008; Amasino, 2010).

Otro mecanismo de regulación de la floración es a través de la temperatura. El transcurso de un periodo de bajas temperaturas no induce directamente la floración pero si establece las bases para que se pueda inducir cuando las condiciones sean favorables (Blázquez *et al.*, 2011). Sin un periodo de exposición a bajas temperaturas, el gen *FLOWERING LOCUS C (FLC)* impide la activación de los genes integradores florales *FT* y *SOC1*. *FRIGIDA (FRI)* promueve la acción de *FLC*, haciendo retrasar el inicio de la floración. Con las bajas temperaturas las proteínas VERNALIZATION-INSENSITIVE 3 (VIN3) y VERNALIZATION 2 (VRN2) condensan la cromatina de *FLC* e impiden que se transcriba. *FLC* queda, por tanto, inactivo (Amasino, 2010). El aumento paulatino de las temperaturas conduce a la síntesis de FCA (gen *FLOWERING CONTROL LOCUS A*) y FVE (gen *FVE*) que son proteínas inhibitoras de *FLC*. Bajo estas condiciones CO se puede activar, traducirse en la proteína CO que induce la expresión de *FT* (Blázquez *et al.*, 2011).

En los cítricos la inducción floral está regulada exógenamente por la temperatura y por el estrés hídrico. El periodo de inducción floral de los cítricos, en condiciones subtropicales o de clima mediterráneo, se ha situado entre los meses de noviembre y diciembre para el hemisferio norte (Guardiola *et al.*, 1982). La baja temperatura del período otoño-invierno (<12°C) promueve la expresión del gen *FT* en las hojas (Nishikawa *et al.*, 2007); durante la salida del invierno y en primavera, la expresión de los genes *LFY* y *AP1* desencadena el inicio del crecimiento reproductivo coincidiendo con el progresivo aumento de las temperaturas (Cassin *et al.*, 1969; Nishikawa *et al.*, 2007). Por el contrario, en condiciones tropicales, la floración se da durante todo el año. Chica y Albrigo (2013) demuestran que en condiciones de elevada temperatura (23°C) el estrés hídrico es otro desencadenante de la floración ya que promueve la expresión del

gen *FT*. La interrupción del estrés promueve la expresión de *LFY* y *AP1* y la diferenciación floral.

Sin embargo, la presencia del fruto inhibe la floración con independencia de que se presenten las señales inductoras.

## 1.2. El fruto inhibe la floración

La presencia del fruto es la causa principal de la alternancia debido a que mediante un mecanismo inhibitorio, desconocido, reduce la floración. Cuantos más frutos tiene un árbol mayor es la inhibición de la floración. El fruto también reduce la floración si se alarga su periodo de permanencia en el árbol o se retrasa la época de recolección. Okuda *et al.*, (1996) ha demostrado que cuanto más tiempo permanece el fruto en el árbol más influye éste negativamente en la floración.

El fruto provoca su efecto inhibitorio en la floración desde el momento en el que está a punto de alcanzar su tamaño máximo, en torno al 90% de su tamaño final (Martínez-Fuentes *et al.*, 2010), coincidiendo con el inicio del cambio de color. Los estudios demuestran que hasta ese momento el fruto no influye en la floración de la primavera siguiente ya que si se elimina no produce su efecto inhibitorio. Sin embargo, a partir de los meses octubre y noviembre, que es cuando alcanza su máximo tamaño, el fruto ha provocado ya la inhibición y aunque sea eliminado ya ha influido en la floración de primavera reduciéndola. Este efecto es independiente de la especie y las condiciones ambientales. De hecho, se ha demostrado en el naranjo dulce 'Valencia' (Martínez-Fuentes *et al.*, 2010), y en el mandarino 'Moncada' (Muñoz-Fambuena *et al.*, 2011) en condiciones de clima Mediterráneo, y en el pomelo 'Marsh' en condiciones de clima Tropical (Betancourt *et al.*, 2014).

La presencia del fruto provoca una disminución de la brotación y una redistribución del número de tipos de brotes desarrollados, favoreciendo la brotación de yemas vegetativas sobre las reproductivas. Los brotes reproductivos sin hojas (ramos de flor y flores solitarias) se reducen en gran medida, así como los brotes reproductivos mixtos multiflorales y uniflorales (Agustí, 1980; Guardiola *et al.*, 1982; Albrigo y Saucó, 2004; Martínez-Fuentes *et al.*, 2010).



Muñoz-Fambuena *et al.* (2011; 2012) ha demostrado que la influencia del fruto en la inhibición de la inducción floral es debida a la inhibición de los genes promotores. El gen *CiFT* es sensible a la presencia del fruto, ya que su expresión se muestra invariable y muy baja durante el periodo de inducción floral en brotes con fruto, mientras que en brotes sin fruto su expresión aumenta hasta un nivel significativamente superior tanto en hojas como en yemas. Como consecuencia, la expresión de los genes *CsAP1* y *CsLFY* también se ve significativamente reducida en las yemas por efecto del fruto. El fruto estimula la expresión de los genes inhibidores *CsTFL* (en las yemas) y *FLC* (en las yemas y en las hojas). Sin embargo, Muñoz-Fambuena *et al.* (2011; 2012) no pudieron correlacionar la expresión temporal de estos inhibidores con la inhibición de la expresión del gen *FT*. Además, se desconoce la señal (es) que produce el fruto para estimular la expresión de los genes inhibidores y reprimir la expresión de los genes promotores de la floración.

## 2. Inhibición de la floración. Factores hormonales

### 2.1. Las giberelinas.

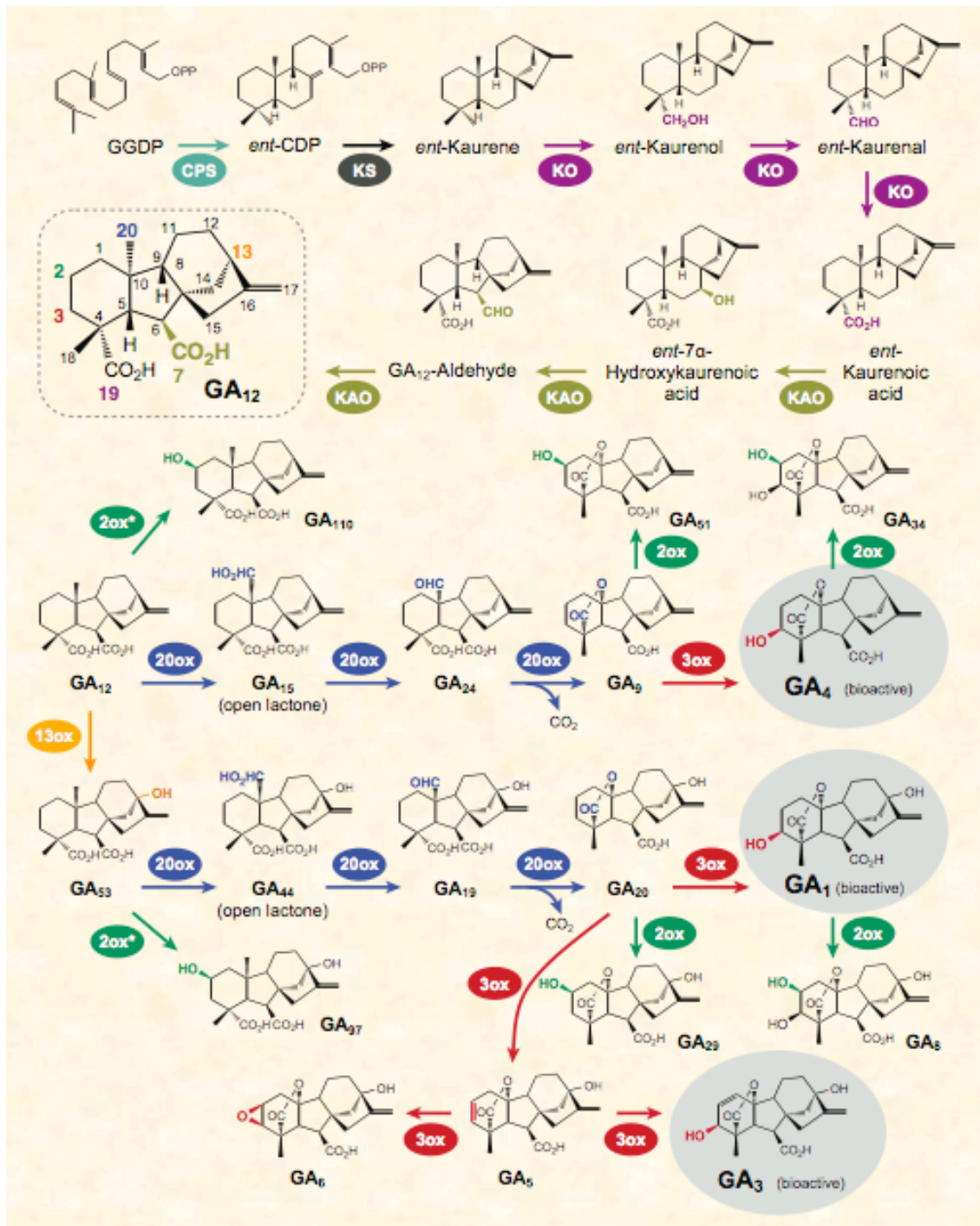
Las giberelinas (GAs) son un grupo de compuestos basados en la estructura *ent*-giberelano. Actualmente, han sido caracterizadas 136 GAs, designándose como GA<sub>1</sub> hasta GA<sub>136</sub>, identificadas en 128 especies de plantas vasculares, además de en hongos y bacterias (Taiz y Zeiger, 2006).

Las GAs se clasifican en dos grupos atendiendo al número de átomos de carbono presentes en el esqueleto *ent*-giberelano: las GAs con 20 átomos de carbono (GAs C-20) y las GAs con 19 átomos de carbono (GAs C-19) que han perdido un grupo aldehído. Dentro del grupo de las GAs, solo un pequeño número de ellas, GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub> y GA<sub>4</sub>, tiene actividad biológica. La presencia o ausencia del grupo  $\beta$ -hidroxilo en el C-2, C-3 y C-13 del *ent*-giberelano de las GAs C-19 determina la existencia de actividad biológica. La  $\beta$ -hidroxilación en el C-3 parece ser la clave para atribuir la actividad biológica de las GAs (Talón, 2000).

La ruta biosintética de las GAs se puede dividir en tres etapas (Figura 1). La primera etapa consiste en las reacciones de ciclación que convierten el

geranilgeranil difosfato (GGPP) en *ent*-kaureno. Estos procesos tienen lugar en los cloroplastos. En la segunda etapa de la biosíntesis de las GAs, situada en el retículo endoplásmico, un grupo metilo del *ent*-kaureno se oxida a ácido carboxílico, se produce la contracción del anillo B pasando de 6 a 5 átomos de carbono para dar el aldehído de la GA<sub>12</sub>, que se oxida dando GA<sub>12</sub>. Los primeros pasos de la ruta son comunes para todas las especies, siendo la GA<sub>12</sub> la primera GA que se forma en la ruta de todas las plantas y la precursora del resto. Tras ello, mediante la hidroxilación del carbono 13 se forma GA<sub>53</sub> a partir de GA<sub>12</sub>.

En la tercera parte de la biosíntesis, que ocurre en el citosol, GA<sub>12</sub> y GA<sub>53</sub> son oxidadas a otras C20-GAs y C19-GAs dando lugar a dos rutas: ruta de la 13-hidroxilación y la ruta de la 13-no hidroxilación (Taiz y Zeiger, 2006). Ambas rutas están catalizadas por tres enzimas; GA 20-oxidasa (GA20ox), GA 3-oxidasa (GA3ox) y GA 2-oxidasa (GA2ox). Las giberelinas se transportan por el xilema y por el floema, siendo el transporte polar de GA<sub>1</sub> muy restringido (Davies, 2010). Sin embargo, recientemente, se ha demostrado que el transporte de GAs entre órganos se da, mayoritariamente, en forma de GA<sub>12</sub> (Regnault *et al.*, 2015), precursor de la GA<sub>15</sub> en la ruta de la no hidroxilación y de la GA<sub>53</sub> en la ruta de la 13 hidroxilación. (Figura 1).



**Figura 1.** Esquema de la ruta de síntesis de las giberelinas (extraído de Yamaguchi, 2008)

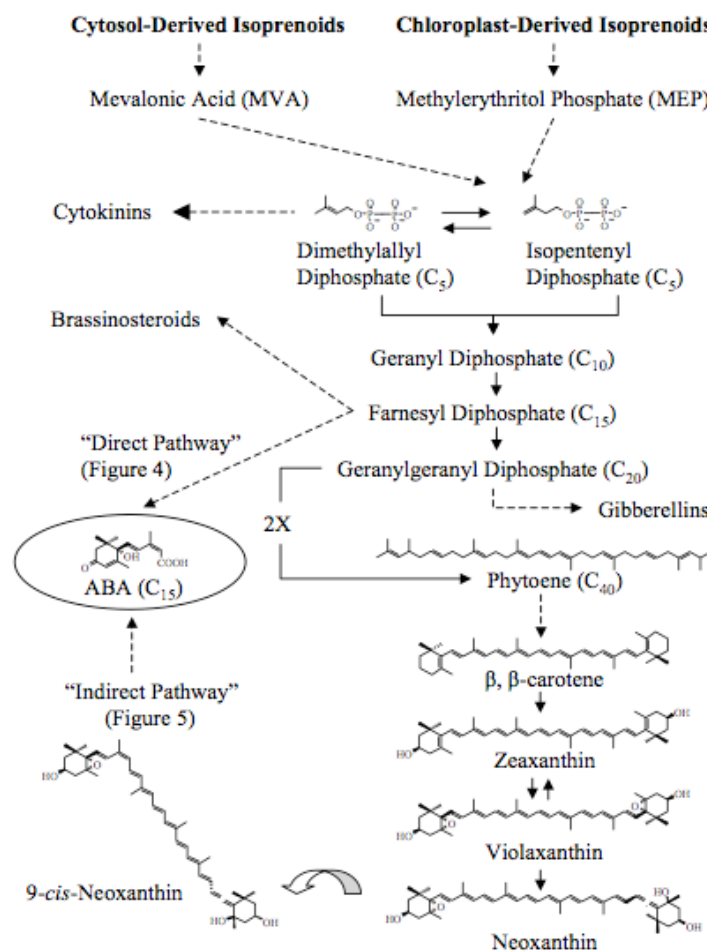
En *Arabidopsis* las giberelinas están implicadas en la transición del desarrollo vegetativo a reproductivo mediante un incremento en su concentración que promueve la terminación de la fase vegetativa y la expresión de genes relacionados con la diferenciación floral (*LFY* y *AP1*). Recientemente, se ha puesto de manifiesto que el aumento de expresión de *LFY* es necesario para reducir los

niveles de GAs en el meristemo y permitir la diferenciación floral a través de *AP1* (Yamaguchi *et al.*, 2014). Por otro lado, en especies perennes, principalmente en árboles frutales, las GAs actúan inhibiendo la floración (Mutasa-Göttgens y Hedden, 2009), como demuestran ensayos mediante la aplicación de GA<sub>3</sub> (Ayalon y Monselise, 1960). En los cítricos, hay dos momentos clave en los que la aplicación de GA tiene máxima eficacia en la inhibición: durante la translocación de la señal de floración de las hojas a las yemas, finales de noviembre a principios de diciembre, y al comienzo de la diferenciación morfológica de las flores (Monselise y Halevy, 1964; Guardiola *et al.*, 1982). Como la aplicación exógena de giberelinas produce un efecto inhibitorio similar al que produce el fruto, se ha sugerido que el mecanismo a través del cual el fruto inhibe la floración es a través de la síntesis de GAs (Goldschmidt y Monselise, 1972). Así, en la mandarina 'Satsuma', la concentración de GAs (GA1/3) es mayor en las hojas de brotes con fruto en el mes de octubre (Koshita *et al.*, 1999). Pero su concentración desciende a un nivel similar en ambos tipos de brote en diciembre, por lo que su relación con la inhibición de la inducción floral está por determinar, dado que la inducción floral en el mandarino 'Satsuma' ocurre entre diciembre y enero. Muñoz-Fambuena *et al.* (2012) demuestran que la aplicación exógena de GA<sub>3</sub> actúa reduciendo la floración mediante la reducción de la expresión del gen *CiFT* durante el periodo inductivo.

## 2.2. El ácido abscísico.

El ácido abscísico (ABA) es un apocarotenoide. La violaxantina es convertida a 9'-*cis*-violaxantina, un compuesto de 40 átomos de carbono, que se cataboliza para formar un compuesto de 15 carbonos, la xantoxina. Lo mismo ocurre en el caso de neoxantina mediante el compuesto intermedio 9'-*cis*-neoxantina. Estas rupturas están catalizadas por la enzima 9'-*cis*-epoxicarotenoide dioxigenasa (NCED), perteneciente a una familia de CCDs (*carotenoid cleavage dioxygenases*), localizada en los tilacoides. La xantoxina es convertida en ABA a través de etapas oxidativas que implican los intermediarios de ABA aldehído (Figura 2) (Taiz y Zeiger, 2006).

Por otro lado, la síntesis de ABA se puede producir a través de una ruta directa. El isopentenil difosfato (IPP) es sintetizado en el citosol por la vía del ácido mevalónico (MVA) y en los cloroplastos a partir de metil-eritritol fosfato (MEP). Mediante una reacción de condensación entre isopentenil difosfato (IPP) y su isómero, dimetilalil difosfato (DMAPP) se forma geranyl difosfato, al que se une otra molécula de isopreno dando lugar a farnesil difosfato, compuesto precursor de la síntesis de ABA (Figura 2) (Milborrow, 2001).



**Figura 2.** Esquema general de la biosíntesis de ABA en plantas (extraído de Davies, 2010)

El ABA se transporta tanto acrópetamente como basípetamente (Davies, 2010). En ensayos llevados a cabo en los cítricos Shalom *et al.* (2014) sugieren un transporte desde el fruto hacia las yemas. En las yemas de árboles 'on' se dan mayores niveles de ABA que en las yemas de árboles 'off'. Sin embargo, la síntesis

de ABA, determinada por la expresión de los genes *NCED3*, es mayor en las yemas de árboles 'off'. Shalom *et al.* (2014) sugieren que en las yemas de árboles 'on', el ABA no se produce en la yema sino que procede de una fuente externa que lo exporta, esto es, el fruto. En estudios anteriores se relaciona el ABA con la inhibición de la floración: Goldschmidt y Golomb (1982) encuentran una concentración significativamente mayor en hojas, tallo y yemas de árboles 'on' en diciembre, sugiriendo su relación, y de su isómero t-ABA, con un mayor reposo de la yema y la inhibición de la floración, debido al estrés provocado en el árbol por la sobrecarga de frutos. Por otro lado, la aplicación de ABA a yemas de *Citrus unshiu* redujo la brotación de las yemas y la floración (García-Luis *et al.*, 1986). Sin embargo, en condiciones de estrés hídrico, que promueven la floración (Koshita y Takahara, 2004), la concentración de ABA en las hojas aumenta (Gómez-Cadenas *et al.*, 2000; Koshita y Takahara, 2004) a la vez que aumenta la expresión del gen *CiFT* (Chica y Albrigo, 2013). El papel del ABA en la floración de los cítricos está todavía por resolver. En *Arabidopsis*, esta hormona se ha relacionado con la inhibición de la floración promoviendo la expresión del gen *FLOWERING LOCUS C* mediante la expresión de factores de transcripción bZIP como, por ejemplo, ABI5 (Wang *et al.*, 2013).

### 3. Hipótesis de trabajo

En los cítricos, el momento a partir del cual el fruto inhibe la inducción floral coincide temporalmente con la fase final del crecimiento y el inicio de la fase de maduración. Uno de los procesos más característicos de la maduración es el cambio de color, externo e interno, que se caracteriza por la síntesis de carotenoides (Rodrigo *et al.*, 2004). Tanto GAs como ABA se relacionan con ese proceso. Los niveles de ABA aumentan en el fruto durante el proceso de maduración, ya que el fruto produce ABA durante la acumulación de carotenoides (Gambetta *et al.*, 2014), es decir, a través de la ruta indirecta de síntesis de ABA (Davies, 2010). Por otra parte, Gambetta *et al.*, (2012) sugieren la necesidad de liberar al tejido del fruto de GAs para que se inicie el cambio de color. La concentración de GA<sub>4</sub> en el flavedo decrece a la vez que crece en los tejidos de la

corteza del tallo, próximo a las yemas, que sustenta al fruto (Gambetta *et al.*, 2012), de un modo similar a como ocurre con el ABA (Shalom *et al.*, 2014).

Por todo ello, se plantea la siguiente **hipótesis de trabajo**:

El fruto inhibe la floración en los cítricos, cuando alcanza su máximo tamaño e inicia el cambio de color, mediante la exportación de hormonas que influyen en la expresión de los genes relacionados con la inducción floral.

Los objetivos de esa Tesis de Máster son:

- Determinar la evolución de la concentración de GAs y ABA en brotes con fruto y sin fruto, analizando los tejidos del fruto, las yemas y las hojas, durante el periodo de inducción floral.
- Correlacionar la concentración de GAs y ABA en hojas y yemas con la expresión de los genes *FT* y *FLC* en árboles 'on' (con frutos) y 'off' (sin frutos) durante el periodo de inducción floral.
- Analizar el efecto de tratamientos hormonales exógenos en la expresión de los genes *FT* y *FLC* así como en la inhibición de la floración en árboles 'off' (sin frutos).





## **II. MATERIAL Y MÉTODOS**



## 1. Material vegetal

Para el experimento 1, se utilizaron hojas, yemas y frutos de árboles adultos de la variedad de mandarina 'Moncada' [Clementina cv. 'Oroval' (*Citrus clementina* Hort. ex. Tan.) x mandarina cv. 'Kara' (*C. unshiu* (Swingle) Marcow. x *C. nobilis* Lour.)], injertados sobre el patrón citrange Carrizo [*C. sinensis* Osbeck x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.], y situados con un marco de plantación de 5 m x 5 m de distancia. El campo utilizado para el experimento se encuentra ubicado en el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) de Moncada.

Para el experimento 2, se utilizaron ramas de naranja dulce 'Navelate' [*Citrus sinensis* L. (Osb)] injertado sobre citrange Carrizo, de un árbol ubicado en la parcela de la Universidad Politécnica de Valencia (Valencia).

## 2. Diseño de los experimentos

En el experimento 1 se tomaron muestras de hojas, yemas y frutos de 6 árboles 'on' (con muchos frutos) y 6 árboles 'off' (sin frutos) durante los meses correspondientes al periodo de inducción floral, desde septiembre a febrero, en las que se analizaron los niveles de hormonas (ABA y GA) y de la expresión génica en las hojas de los genes *FT* y *FLC*. Además, en los frutos recolectados se midió el diámetro, el color del flavedo y el contenido en clorofilas y carotenoides.

En el experimento 2 se llevaron a cabo tratamientos exógenos con ABA y GA<sub>3</sub> durante el periodo de inducción floral (noviembre). Para ello se seleccionaron 3 ramas al azar para cada tratamiento y se aplicó mediante spray de mano a las hojas y yemas una solución de 200 mg l<sup>-1</sup> de cada hormona. Tras el tratamiento, se realizaron muestreos de forma continuada, a las 8 horas, 24 horas, 48 horas, 5 días y 9 días después del tratamiento. En las muestras de hojas tratadas y control se analizó la expresión de los genes *FT* y *FLC*. En la primavera, se evaluó el efecto de los tratamientos sobre la floración.

### 3. Técnicas empleadas

#### 3.1. Estimación del índice de color

El color del flavedo se determinó usando un colorímetro Minolta CR-330, mediante tres lecturas alrededor de la zona ecuatorial de los frutos. Se midieron las coordenadas Hunter ' a ' y ' b '. La coordenada denominada ' a ' representa los cambios en el color desde verde (valores negativos) a rojo (valores positivos) y, la coordenada denominada ' b ' representa los cambios en el color desde azul (valores negativos) a amarillo (valores positivos). El color se expresó como la relación de las coordenadas Hunter ' a ' y ' b ', en la que valores negativos corresponden a coloración verde, próximos a cero a amarillo, y positivos a naranja (Stewart y Wheaton, 1972).

#### 3.2 Diámetro del fruto

El diámetro del fruto se midió mediante un pie de rey, expresando el resultado en milímetros.

#### 3.3. Extracción y cuantificación de pigmentos

La extracción y cuantificación de clorofilas y carotenoides se llevó a cabo, a partir de 0.5 g de flavedo siguiendo el método descrito por Rodrigo *et al.* (2003 y 2004). El material vegetal, previamente congelado y triturado, se introdujo en tubos de cristal Pyrex con tapón de rosca y se mantuvo en hielo hasta la adición de 2 ml de metanol (pureza HPLC, Carlo Erba), homogeneizándose la mezcla en vórtex durante 1 min y en agitación magnética a 4°C durante 5 min. Seguidamente se añadieron 1.5 ml de Tris-HCl (50 mM, pH 7.5) y NaCl 1M, volviendo a agitar a 4°C durante 5 min y añadiendo a continuación 3 ml de cloroformo. Tras homogeneizar en el vórtex se agitó a 4°C durante 5 min, dejando reposar después las muestras 5 min en hielo. Posteriormente, se centrifugó a 4000g durante 5 min a 4°C y se recuperó la fase inferior en un matraz de fondo redondo. Se añadieron de nuevo 3 ml de cloroformo y se repitió el proceso de extracción hasta que la fase inferior fue incolora. El combinado de las fases orgánicas recuperadas que

contiene las clorofilas y los carotenoides se evaporó a 40°C en evaporador rotatorio (Buchi) hasta la sequedad total. El residuo seco se resuspendió en 200 µl de acetona (pureza HPLC) y se añadieron 2.8 ml de Solución A (éter de petróleo: éter etílico, 9:1, v/v). La concentración de clorofila *a* y *b* se determinó midiendo la absorbancia de este extracto a 644 y 662 nm en un espectrofotómetro y aplicando las fórmulas de Smith y Benítez (1955):

$$\text{Clorofila a} = 10.050 \cdot A_{662} - 0.766 \cdot A_{644}$$

$$\text{Clorofila b} = 16.370 \cdot A_{644} - 3.140 \cdot A_{662}$$

Una vez determinadas las clorofilas, las muestras se secaron completamente a 40°C en evaporador rotatorio y se saponificaron mediante adición de 1.8 ml de metanol (pureza HPLC, Carlo Erba) y 200 µl de KOH al 60% (p/v), manteniendo la muestra durante la noche a temperatura ambiente y en atmósfera de nitrógeno. Los carotenoides se recuperaron mediante lavados sucesivos con 2 ml de agua bidestilada, 2 ml de solución A, 1 ml de cloroformo, y dos últimos lavados con 2 ml de solución A. Tras homogeneizar la muestra se dejó reposar durante 5 min a temperatura ambiente para que las fases se separaran, y se recuperó la fase etérea superior pasándola a un tubo de 15 ml con tapón de rosca. Se añadieron de nuevo 2 ml de solución A y se repitió el proceso hasta que la fase superior resultó incolora. El conjunto de las fases etéreas se llevaron a un volumen conocido en un matraz mediante la adición de solución A y se determinó la concentración de carotenoides midiendo la absorbancia entre 270 y 600 nm en un espectrofotómetro y registrando la absorbancia a 450 nm y a todos los máximos del espectro. La concentración de carotenoides se calculó aplicando la fórmula de Davies (1976) y expresando el resultado como µg de β-caroteno por gramo de peso fresco de tejido:

$$\text{g de carotenoides } (\beta\text{-caroteno}) = (E \cdot y) / (E^{1\%}_{1 \text{ cm}} \cdot 1000)$$

donde: E es la absorbancia a 450 nm; y, ml de disolución y  $E^{1\%}_{1 \text{ cm}}$ , 2500 (coeficiente de extinción del β-caroteno de una solución al 1%, medida en una cubeta de 1 cm de paso de luz)

Los extractos se llevaron a sequedad mediante corriente de N<sub>2</sub>. Con el fin de precipitar los ácidos grasos (esteroles) copurificados con los carotenoides. Los extractos secos se resuspendieron en 1 ml de acetona, se transfirieron a un tubo Eppendorf, y se incubaron durante la noche a -20°C. Tras centrifugar a 11400 g durante 15 min a 4°C el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf y se secó en corriente de N<sub>2</sub>. Las muestras se almacenaron a -20°C en oscuridad y atmósfera de N<sub>2</sub> hasta el momento de su análisis.

Durante todo el procedimiento se tuvo especial atención en evitar la exposición a la luz de las muestras trabajando en condiciones de baja luminosidad, con el fin de evitar la fotodegradación, la isomerización y los posibles cambios estructurales de los carotenoides. Todas las muestras se extrajeron al menos por duplicado.

### 3.4. Extracción y cuantificación de hormonas

La extracción de hormonas se realizó con el objetivo de cuantificar las concentraciones de ABA y GAs en hojas, yemas y frutos de la variedad Moncada durante los meses correspondientes al periodo de inducción floral. Las muestras de material se congelaron con nitrógeno líquido y se liofilizaron. Mantenido a -80°C, se molieron en frío hasta conseguir un polvo fino y se mandaron analizar al laboratorio de cuantificación de hormonas vegetales del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP).

#### 3.4.1. *Protocolo de extracción de hormonas*

Alícuotas (50 mg de peso seco) de material liofilizado duplicadas de cada muestra fueron extraídas con metanol 80%: ácido acético 1% (v/v) en presencia de diferentes estándares internos (hormonas marcadas con Deuterium para cuantificar las pérdidas de cada hormona inherentes al proceso de extracción [proporcionadas por Prof. L Mander - Camberra, OlChemim Ltd - Olomouc, o Cambridge Isotope Lab - Andover]: [17,17-2H]-GAn y [2H6]-ABA).

Para recuperar la fracción ácida donde se localizan las GAn y el ABA, los extractos pasaron consecutivamente a través de columnas HLB en fase reversa,

MCX (intercambio catiónico) y WAX (intercambio iónico) (Oasis 30 mg. Waters) como se describe en Seo *et al.* (2011).

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

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

### 3.5. Diseño de oligonucleótidos

Para el diseño de los primers del gen *FLOWERING LOCUS T (FT)*, se partió de la secuencia del gen *CiFT2* descrito por Nishikawa *et al.*, 2007, y se buscó su secuencia homóloga en la base de datos de Phytozome v9.1 seleccionando la especie *Citrus clementina*. Para el caso de *FLOWERING LOCUS C (FLC)*, se utilizó la secuencia de *Arabidopsis thaliana* y de otras especies de plantas anuales así como de árboles caducos y perennes que se obtuvieron de la base de datos NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Se alineó la secuencia de la proteína del gen *FLC* de *Arabidopsis* con el genoma de *C. clementina* usando la herramienta TBLASTN de la base de datos de Phytozome v9.1 ([www.phytozome.net](http://www.phytozome.net)). Basándose en la similitud de la secuencia, se identificó un solo candidato en el genoma de *C. clementina*.

Una vez seleccionadas las secuencias a estudiar, diseñamos los primers con la página web de Primer3web version 4.0.0 - Pick primers from a DNA sequence (<http://primer3.ut.ee>), los cuales se muestran en la siguiente tabla:

**Tabla 1.** Lista de primers usados para la PCR

GEN	SECUENCIA	EST
ACT F	TTAACCCCAAGGCCAACAGA	Ciclev10025866m.g
ACT R	TCCCTCATAGATTGGTACAGTATGAGAC	Ciclev10025866m.g
CiFT2 F	TCTAGCAGGGACAGAGATCCT	Ciclev10012905m.g
CiFT2	AGAACATCACCAACAACGCG	Ciclev10012905m.g
FLC F	GGCAACTTGAAGGTCCAAAC	Ciclev10033420m.g
FLC R	GCCCAATGAGCATAGGAATG	Ciclev10033420m.g

### 3.6. Análisis de la expresión génica

Para ello se realizó una extracción de RNA de cada una de las muestras. A continuación, para la evaluación de la expresión génica se realizó una reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa, una variante de la PCR en la que una hebra de ARN es retrotranscrita en ADN complementario (cDNA) usando una enzima llamada transcriptasa inversa. El resultado fue amplificado con una PCR en tiempo real, que permite amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta el producto de amplificación de ADN. Para ello se emplea un molde de ADN, un par de cebadores específicos, dNTPs, un tampón de reacción adecuado y una ADN polimerasa termoestable; a dicha mezcla se le adiciona una sustancia marcada con un fluoróforo que, en un termociclador que albergue sensores para medir fluorescencia tras excitar el fluoróforo a la longitud de onda apropiada, permita medir la tasa de generación de uno o más productos específicos.

#### 3.6.1. Retrotranscripción

Para la síntesis de cDNA se utilizaron 2 µg de ARN, empleándose el kit QuantiTect Reverse Transcription Kit (Quiagen) según las instrucciones del fabricante. Previamente se empleó el tampón gDNA Wipeout buffer, incluido en el kit para la eliminación de restos de ADN genómico. Se utilizó una mezcla de oligo dT y de random primers, también incluidos en el kit. El programa utilizado fue de 15 minutos a 42°C seguidos de 3 minutos a 95°C.



### 3.6.2. qPCR

Para la cuantificación relativa mediante PCR se utilizó el kit QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen), según las instrucciones del fabricante. Se utilizaron para cada muestra 2,5 µl provenientes de la reacción de retrotranscripción anterior. El programa utilizado fue de 15 minutos a 95°C para la activación de la Hotstar Taq polimerasa, seguidos de 40 ciclos de 15 segundos a 94°C (desnaturalización), 30 segundos a 60°C (anillamiento o alineamiento de los cebadores) y 30 segundos a 72°C (extensión). La fluorescencia se midió al final de la etapa de alineamiento. Los oligonucleótidos específicos para la amplificación de cada gen (Tabla 1) se emplearon a una concentración de 0,3 µM. Al final de cada qPCR se incluyó un paso final de análisis de la curva del punto de fusión, para detectar la presencia de dímeros o de amplificaciones inespecíficas

Se realizaron tres replicas técnicas de cada muestra de cDNA, incluyéndose por duplicado controles en los que el molde de cDNA se sustituyó por agua para detectar la posible presencia de contaminación o de formación de dímeros (conocido como control negativo o blanco).

### 3.7. Evaluación de la floración

Por otro lado, la primavera siguiente se evaluó la eficacia de los tratamientos mediante el conteo visual y la clasificación de los diferentes tipos de brote según Guardiola *et al.* (1977). Los nudos no brotados también fueron contabilizados.

## 4. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se evaluaron estadísticamente mediante un análisis de la varianza (ANOVA), utilizando la mínima diferencia significativa (LSD) para la separación de las medias. Los datos experimentales se analizaron con el software Statgraphics Plus 5.1 (Gráficos estadísticos, Englewood Cliffs, NJ, EE.UU.)

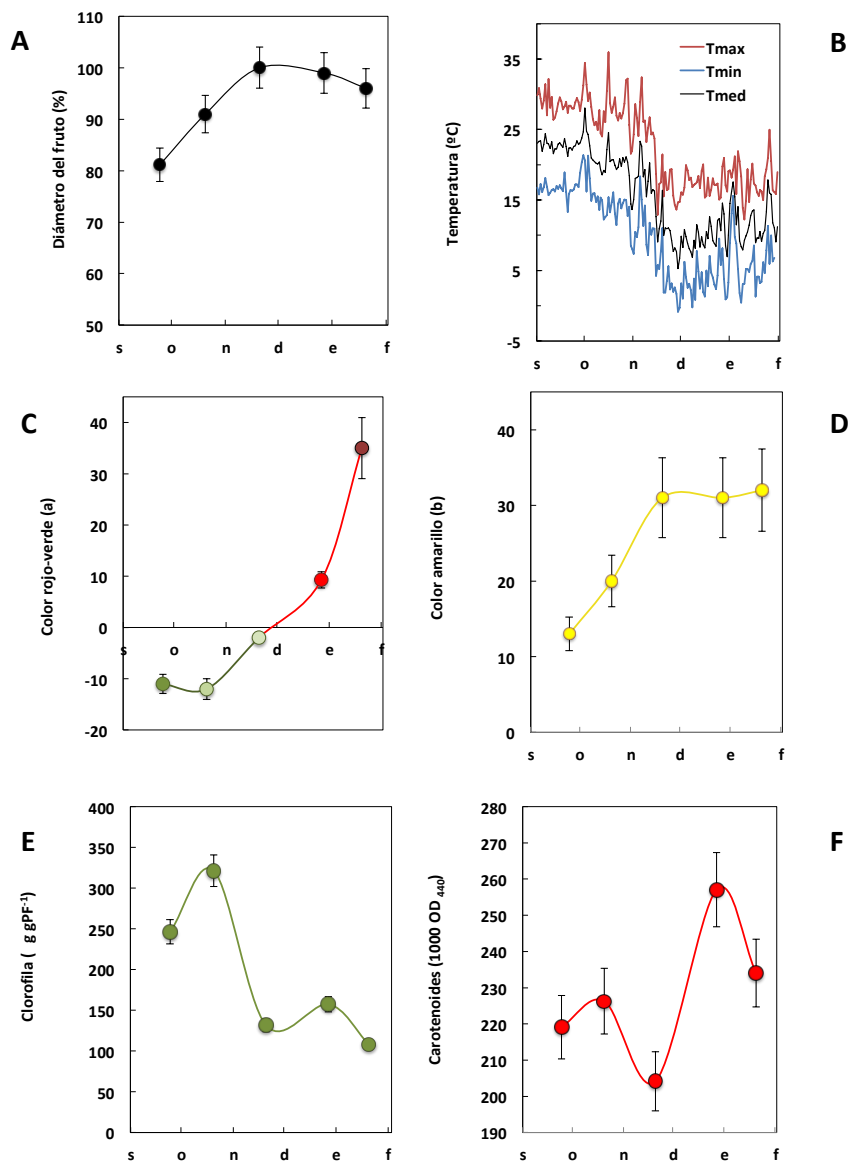


## **III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



## 1. El fruto inhibe la expresión del gen *FT* coincidiendo con el cambio de color

El diámetro de los frutos de mandarino 'Moncada' aumentó un 15% entre finales de septiembre y finales de noviembre. A partir de ese momento, los frutos dejaron de crecer y alcanzaron su máximo tamaño (Figura 3A). Por otra parte, durante el mes de octubre se inició la degradación de las clorofilas en el exocarpo (Figura 3E), siendo la temperatura media de 20°C (Figura 3B). El cambio de coloración es debido a una disminución del contenido de clorofilas junto con un incremento en el contenido de carotenoides, además de un cambio en su composición. Mientras el fruto es verde los carotenoides mayoritarios son característicos de tejido cloroplástico (luteína,  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno). Durante la maduración del fruto su concentración disminuye, incrementándose la acumulación de  $\beta,\beta$ -xantofilas ( $\beta$ -criptoxantina, zeaxantina, violaxantina) (Kato *et al.*, 2004). A finales del mes de noviembre, la concentración de clorofilas alcanzó su valor mínimo (Figura 3E) y, consecuentemente, el parámetro *a* de Hunter alcanzó el valor 0 (Figura 3C), esto es, el cambio de color, coincidiendo con una bajada significativa de la temperatura media, que se situó en torno a los 10°C (Figura 3B). La concentración de carotenoides totales alcanzó su valor mínimo en el momento del cambio de color. A partir de ese momento, la acumulación de carotenoides se incrementó significativamente, alcanzando su máximo nivel a finales de diciembre (Figura 3F). El inicio del cambio de coloración en cítricos está inducido por diversos factores, entre ellos la temperatura, ya que para que tenga lugar es necesario una temperatura inferior a 12°C (Casas y Mallent, 1988b). Por ejemplo, en el naranjo 'Valencia' el desarrollo del cambio de color requiere una temperatura por debajo de 10°C (Reuther *et al.*, 1973).

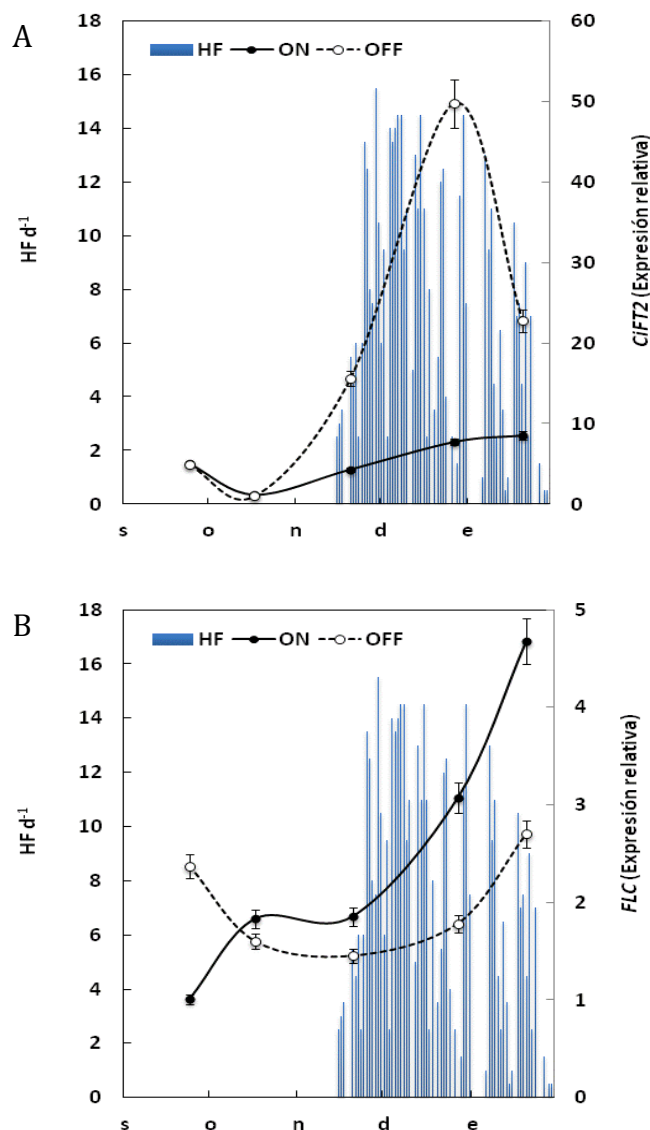


**Figura 3.** Evolución del diámetro del fruto (A), la temperatura ambiental (B) el color del fruto (C,D), el contenido en clorofilas (E) y carotenoides (F) en el mandarino 'Moncada'. Cada valor es la media de 10 frutos. Las barras verticales indican el error estándar.

El estudio de la expresión del gen *CiFT2* en las hojas no presentó diferencias significativas entre los árboles 'on' y 'off' durante los meses de septiembre y octubre. Pero a finales del mes de noviembre se observó un incremento de la

expresión del gen *CiFT2* en las hojas de los árboles 'off', pero no en las hojas de los árboles 'on', coincidiendo con la bajada de la temperatura (Figura 4A), y con el cambio de color del fruto. Posteriormente, su expresión se incrementó significativamente en los árboles 'off', alcanzando un valor máximo (x50), y casi 7 veces superior al árbol 'on', a final de diciembre (Figura 4A). Después, en el mes de enero, la expresión de *CiFT2* disminuyó en el árbol 'off' mientras que en el árbol 'on' continuó aumentando ligeramente, aunque siendo en todo momento significativamente inferior al árbol 'off' (Figura 4A). En *Arabidopsis* se ha demostrado que es necesario un periodo de bajas temperaturas (Vernalización) para que tenga lugar la expresión de *FT*, a través de la inhibición de la expresión del gen *FLC* (Blázquez, 2003). En el género *Citrus*, Nishikawa *et al.* (2007) demostraron que tras un periodo de bajas temperaturas (<15°C) durante los meses de noviembre y diciembre se incrementaba la expresión de *CiFT* y esto a su vez mejoraba el potencial de floración. Es decir, que la inducción floral ocurría como resultado a exposición prolongada a baja temperatura; cuanto mayor fuera la exposición, más se incrementaba la floración. Es relevante destacar que la expresión del gen *CiFT2* no se inició hasta que no se acumularon horas-frío por efecto de la bajada de la temperatura. Sin embargo, independientemente de la presencia de la señal inductora (acumulación de frío), la presencia del fruto bloqueó el incremento de la expresión del gen *CiFT2* (Figura 4A).

Por otra parte, la expresión del gen *FLC* en árboles 'on' muestra una tendencia creciente, aumentado hasta 4 veces (Figura 4B). En árboles 'off', la expresión del gen *FLC* disminuye entre noviembre y diciembre, y aumenta en enero.

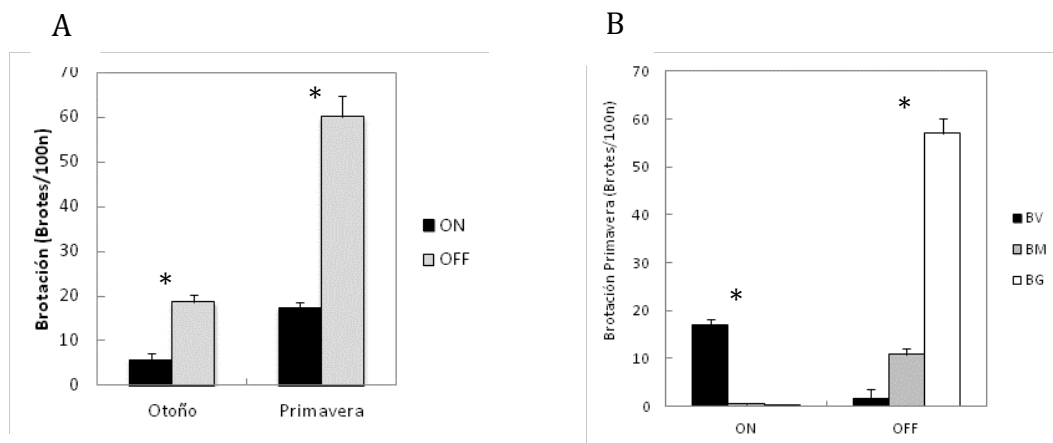


**Figura 4.** Evolución de la expresión relativa de los genes *FT* (A) y *FLC* (B) en árboles 'on' y 'off' de mandarina 'Moncada', y de la acumulación de horas frío (por debajo de 7,2°C). Cada valor es la media de 3 experimentos de RT-PCR independientes.

Este aumento de *FLC* no impidió la floración en los árboles 'off' que, sin embargo, fue completamente inhibida en los árboles 'on', como se esperaba a la vista de los resultados de expresión del gen *CiFT2*. El fruto redujo significativamente la brotación de otoño y de primavera, en comparación con la que se dio en árboles 'off', donde se redujeron un 70 % y un 71%, respectivamente



(Figura 5A). En los árboles 'on', prácticamente la totalidad de brotes que se desarrollaron fueron brotes vegetativos, a diferencia de lo que ocurrió en los árboles 'off' en los que los brotes generativos fueron los más producidos (81%), seguidos de los brotes mixtos (16%) y los brotes vegetativos (3%) (Figura 5B). Estos resultados coinciden con los observados por Verreynne y Lovatt (2009) que estudiaron la influencia del fruto en la brotación en mandarina 'Pixie', en el que los brotes florales sin hojas y con hojas se redujeron en árboles 'on' en comparación con árboles 'off' un 95% y 80%, respectivamente, a diferencia de lo ocurrido con los brotes vegetativos que aumentaron un 14%.



**Figura 5.** Cuantía de la brotación de otoño y primavera en árboles 'on' y 'off' de mandarina 'Moncada' (A) y distribución de los tipos de brotes desarrollados en árboles 'on' y 'off' en primavera (B). Cada valor es la media de 4 árboles. Las barras verticales indican el error estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas.

Por tanto, el fruto inhibió la expresión del gen *CiFT2*, a partir del momento en que alcanzó su máximo tamaño, y por ello, inhibió la floración, como ya observaron Martínez-Fuentes *et al.* (2010) y Muñoz-Fambuena *et al.* (2011; 2012) anteriormente. Sin embargo, se desconoce el mecanismo a través del cual el fruto ejerce su acción inhibidora sobre la expresión del gen *CiFT2*. Dada la coincidencia temporal del cambio de color del fruto con la inhibición de la expresión de este gen

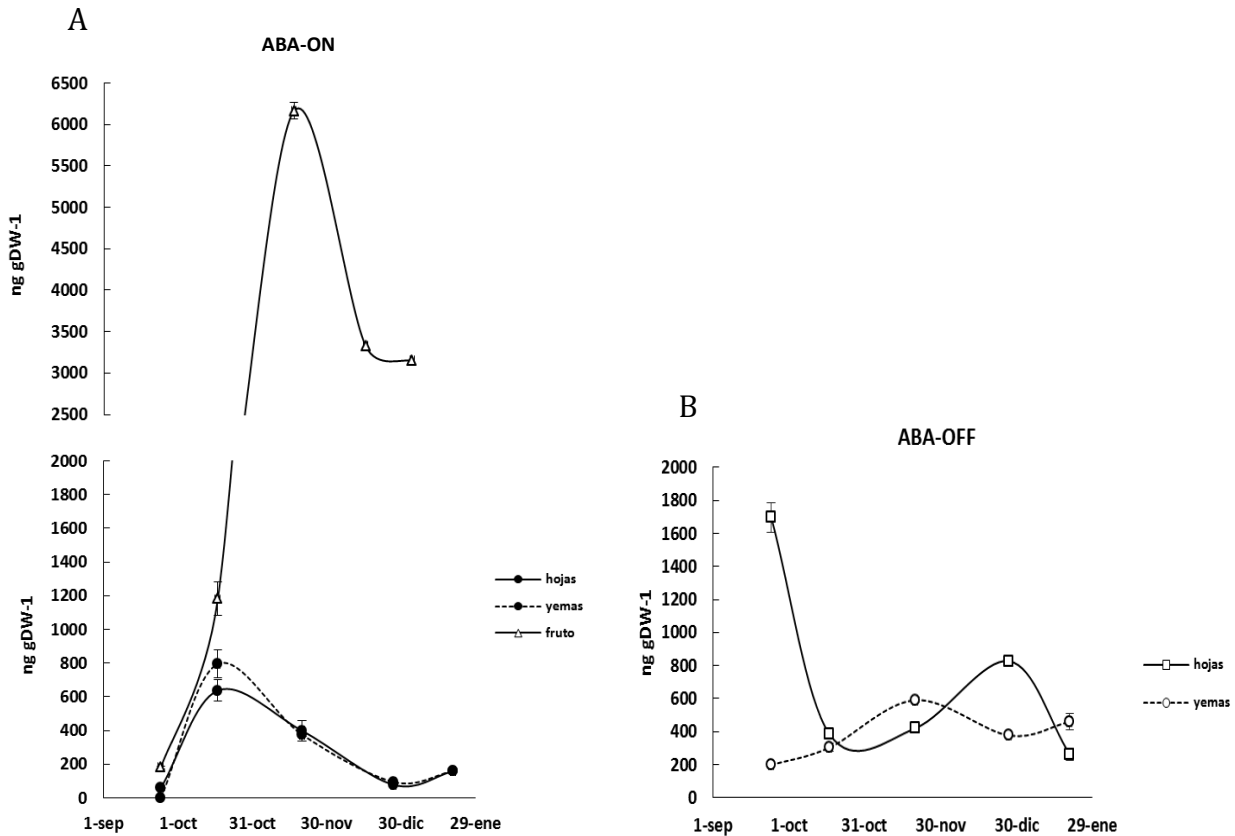
en los árboles 'on' se estudió la evolución del contenido en ABA y GAs en el fruto, las hojas y las yemas. Dichas hormonas regulan tanto el cambio de color de los frutos cítricos como la floración.

## 2. Evolución de la concentración de ABA en el fruto, hojas y yemas

El cambio de color en el fruto coincide con la máxima producción de ABA en el flavedo, que aumentó de 200 a 6000 ng g<sup>-1</sup> PS entre octubre y finales del mes de noviembre (Figura 6A). Este aumento se relacionó con el aumento del color amarillo del fruto (parámetro b de hunter, Figura 3D). En los cítricos, los pigmentos que confieren el color amarillo son, principalmente, la violaxantina y la neoxantina, que, a su vez, son precursoras de la síntesis de ABA (Alquezar *et al.*, 2008; Davies, 2010).

En las yemas y las hojas de los árboles 'on' la tendencia en la concentración de ABA es similar, aumentando su concentración durante el mes de octubre y descendiendo de noviembre en adelante (Figura 6A). El aumento de la concentración de ABA del mes de octubre, coincide con resultados previos (Shalom *et al.*, 2014). Pero dicho aumento no es debido a un incremento de la síntesis endógena en yemas, como indica Shalom *et al.* (2014), por lo que se sugiere el transporte de ABA desde el fruto coincidiendo con el inicio del cambio de color.

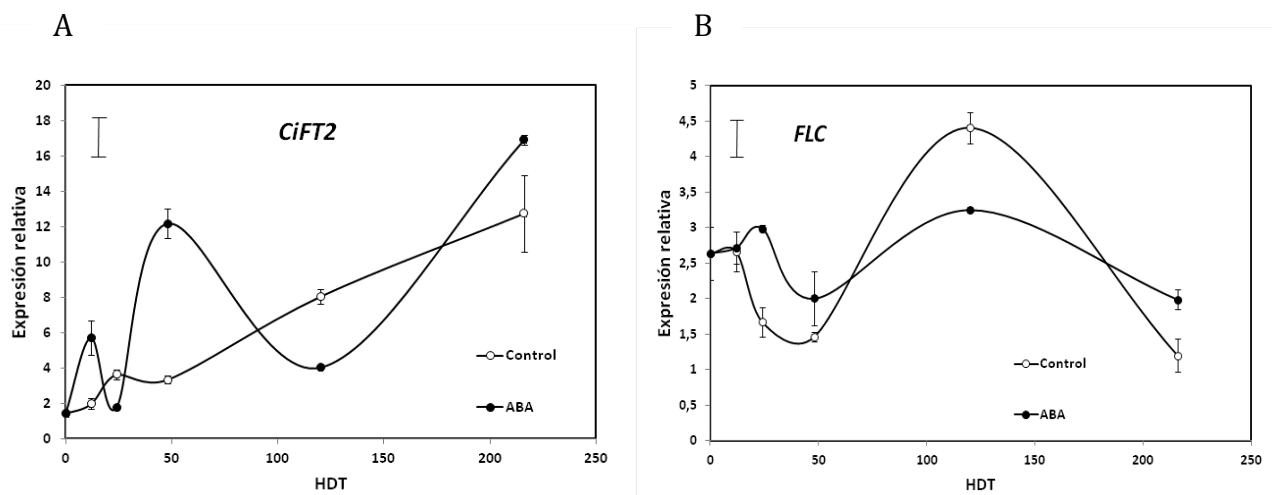
En las hojas de árboles sin fruto la concentración de ABA disminuyó significativamente (x4) durante el mes de octubre, aumentó levemente (x2) en diciembre y disminuyó en enero, justo antes de la brotación (Figura 6B). Por otra parte, en las yemas, la concentración de ABA aumentó levemente desde octubre hasta final de noviembre, alcanzando los 600 ng g<sup>-1</sup> PF, y se mantuvo próxima a ese nivel hasta la brotación (Figura 6B).



**Figura 6.** Evolución del contenido endógeno de ABA durante el periodo de inducción floral en hojas, yemas y frutos en árboles 'on' (A) y en hojas y yemas en árboles 'off' (B) de mandarino 'Moncada'.

El incremento de la concentración de ABA en hojas y yemas de los árboles 'on' coincidió con un incremento significativo ( $\times 2$ ) de la expresión del gen *FLC* en octubre. Además, en los árboles 'off' ocurrió lo contrario, esto es, una reducción de la concentración de ABA a la vez que se redujo la expresión de *FLC*. En *Arabidopsis*, el ABA inhibe la floración a través del estímulo de la expresión del gen *FLC* como indican Wang *et al.* (2013). Así, la mutación del factor de transcripción ABI5 (ABSCISIC ACID INSENSITIVE MUTANT 5) promueve la floración, mientras que la sobreexpresión de ABI5 estimula la expresión de *FLC*. Esto es, cuando la concentración de ABA es elevada se activa la expresión de ABI5 que, a su vez, estimula la expresión de *FLC* inhibiendo la floración. Sin embargo, el mayor aumento de la expresión del gen *FLC* tuvo lugar durante diciembre (Figura 4B), y no en octubre-noviembre cuando el ABA se acumuló en hojas y yemas (Figura 6A),

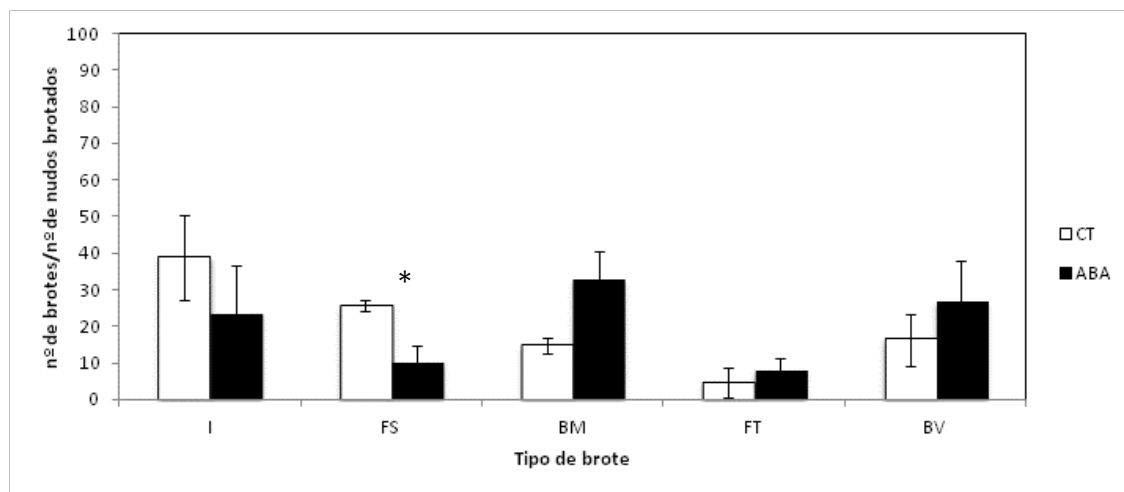
por lo que de estos resultados no se puede deducir una relación directa entre el ABA acumulado en yemas y hojas (*¿producido por el fruto?*) y la activación de *FLC*. Con el fin de estudiar la activación de *FLC* por un aumento de la concentración de ABA, se trataron hojas de árboles 'off' con ABA, y se estudió su efecto sobre la expresión de *FLC*, *CiFT2* y la floración. En dicho experimento, no se observó una clara relación entre la aplicación de ABA y la expresión de *FLC* (Figura 7B). El tratamiento con ABA incrementó significativamente la expresión de *FLC* 24h después del tratamiento. Pero este efecto no fue consistente en el tiempo durante el periodo de estudio. El efecto sobre la expresión de *CiFT2* tampoco fue claro. Mientras en los árboles 'off' control *CiFT2* aumentó progresivamente su expresión en el tiempo, en los árboles 'off' tratados con ABA la expresión de *CiFT2* osciló en el tiempo de un modo irregular (Figura 7A).



**Figura 7.** Efecto del tratamiento exógeno de ABA ( $200 \text{ mg l}^{-1}$ ) en la expresión relativa de los genes *CiFT2* (A) y *FLC* (B) de un árbol 'off' de naranjo dulce 'Navelate'. Cada valor es la media de 3 RT-PCR independientes. La barra vertical muestra el valor LSD del experimento.

El tratamiento con ABA no modificó significativamente ni la intensidad de floración (110 flores  $100 \text{ nudos}^{-1}$  en las ramas control, 115 flores  $100 \text{ nudos}^{-1}$  en las ramas tratadas) ni la distribución de los tipos de brotes (Figura 8). Estos resultados difieren de los obtenidos anteriormente por García-Luis *et al.* (1986),

que mediante tratamiento con ABA a yemas de mandarina 'Satsuma' redujeron significativamente la intensidad de floración (de 164 a 123 flores por 100 nudos<sup>-1</sup>) y el porcentaje de brotes florales sin hojas.



**Figura 8.** Efecto de ABA aplicado durante el periodo de inducción floral en la brotación y floración en árbol 'off' de naranjo dulce 'Navelate'. Los asteriscos indican diferencias significativas.

### 3. Evolución de la concentración de GAs en el fruto, hojas y yemas

En la mandarina 'Moncada', el inicio de la degradación de clorofilas del flavedo (octubre, Figura 3E) coincidió con una disminución de la concentración de GA<sub>12</sub> y de las GAs de la ruta de la 13-hidroxiación, GA<sub>19</sub>, GA<sub>20</sub> y su catabolito GA<sub>29</sub>. La concentración de GA<sub>12</sub>, GA<sub>20</sub>, y GA<sub>29</sub> se redujo rápidamente de 0,82 ng g<sup>-1</sup>, 0,88 ng g<sup>-1</sup> y 0,81 ng g<sup>-1</sup> a 0, respectivamente, mientras que la concentración de GA<sub>19</sub> se redujo progresivamente de 2,47 ng g<sup>-1</sup> en septiembre a 0 ng g<sup>-1</sup> en enero (Figura 9B). No se encontró ni GA<sub>1</sub> ni su catabolito GA<sub>8</sub> (Figura 9B). La relación entre GAs y clorofila se demostró mediante la aplicación exógena de GA<sub>3</sub>, que retrasa su degradación (García-Luis *et al.*, 1986; Alós *et al.*, 2006; Gambetta *et al.*, 2014). Además, Gambetta *et al.* (2012) demostraron que la concentración de GA<sub>4</sub> y GA<sub>1</sub> disminuye en el flavedo antes del cambio de color, a la vez que aumenta en el brote que sustenta al fruto. Ello sugiere la hipótesis de que para que tenga lugar el cambio de color, el fruto debe *exportar* las GAs del flavedo. Si bien el transporte de

GAs activas es reducido (Davies, 2010) el transporte del precursor GA<sub>12</sub> se produce a larga distancia (Regnault *et al.*, 2015). La ausencia de GA<sub>1</sub> y de los catabolitos GA<sub>8</sub> y GA<sub>29</sub> en el flavedo se podría relacionar con la hipótesis de transporte. Además, paralelamente a la disminución de GAs en el fruto, la concentración de GA<sub>20</sub> y GA<sub>1</sub> en las hojas del brote aumenta significativamente (x4), así como el catabolito GA<sub>29</sub> (Figura 9B). Regnault *et al.* (2015) no descartan el transporte de otros precursores distintos a la GA<sub>12</sub>. Aunque en menor cuantía, el precursor GA<sub>44</sub> también incrementó su concentración en las hojas a la vez que disminuyó en el flavedo (Figura 9B). Por otra parte, no se observaron cambios significativos de los precursores GA<sub>12</sub>, GA<sub>53</sub>, y GA<sub>19</sub> en las hojas. Aunque este experimento no demuestra, directamente, el transporte específico de GAs desde el fruto a las hojas, lo sugiere a través de los cambios de concentración tanto en los precursores como en la GA<sub>1</sub>. El estudio de expresión génica de las enzimas relacionadas con la síntesis de GAs en las hojas ayudaría a determinar si este aumento de concentración en las hojas es debido a síntesis propia o transporte de GAs desde otros órganos.

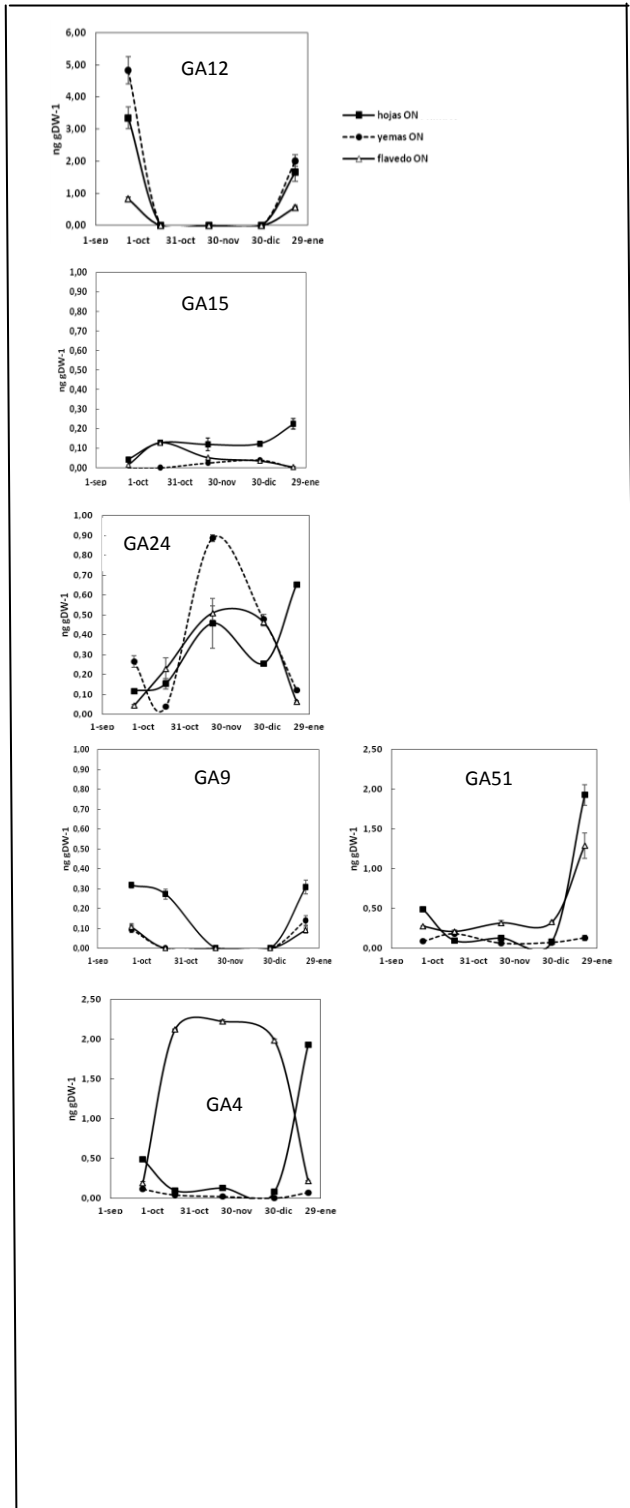
Este resultado indica un cambio cualitativo en el metabolismo de las GAs en las hojas en noviembre, en el periodo de inducción floral. ¿Se podría relacionar este cambio endógeno con la inhibición de la expresión del gen *CiFT2*? Cuatro razones sugieren que esta relación es posible: 1) la concentración de GA<sub>1</sub> en hojas de árboles 'off' en este periodo (noviembre) es nula, encontrándose solamente en septiembre en hojas jóvenes en crecimiento procedentes de la brotación de otoño (Figura 10B); 2) el aumento de la expresión de *CiFT2* en las hojas de árboles 'on' está reprimido justo en esa fecha, coincidiendo con el aumento de GA<sub>1</sub>, y el inicio de la expresión de este gen en hojas de árboles 'off' (sin GA<sub>1</sub>) (Figura 4); 3) el tratamiento con GA<sub>3</sub> a ramas de árboles 'off' redujo significativamente la expresión del gen *CiFT2* con respecto al control (Figura 11), la floración (de 110 flores 100 nudos<sup>-1</sup> en las ramas control, 15 flores 100 nudos<sup>-1</sup> en las ramas tratadas), y la distribución de los tipos de brotes en detrimento de los brotes florales (Figura 12); 4) finalmente, en el caso de las yemas, a pesar de que su tendencia es similar, la concentración de GA<sub>1</sub> en árboles 'on' es superior a la de los árboles 'off' siendo el

momento de máxima acumulación en noviembre de 1,71 frente a 1,01 (Figuras 9B y 10B).

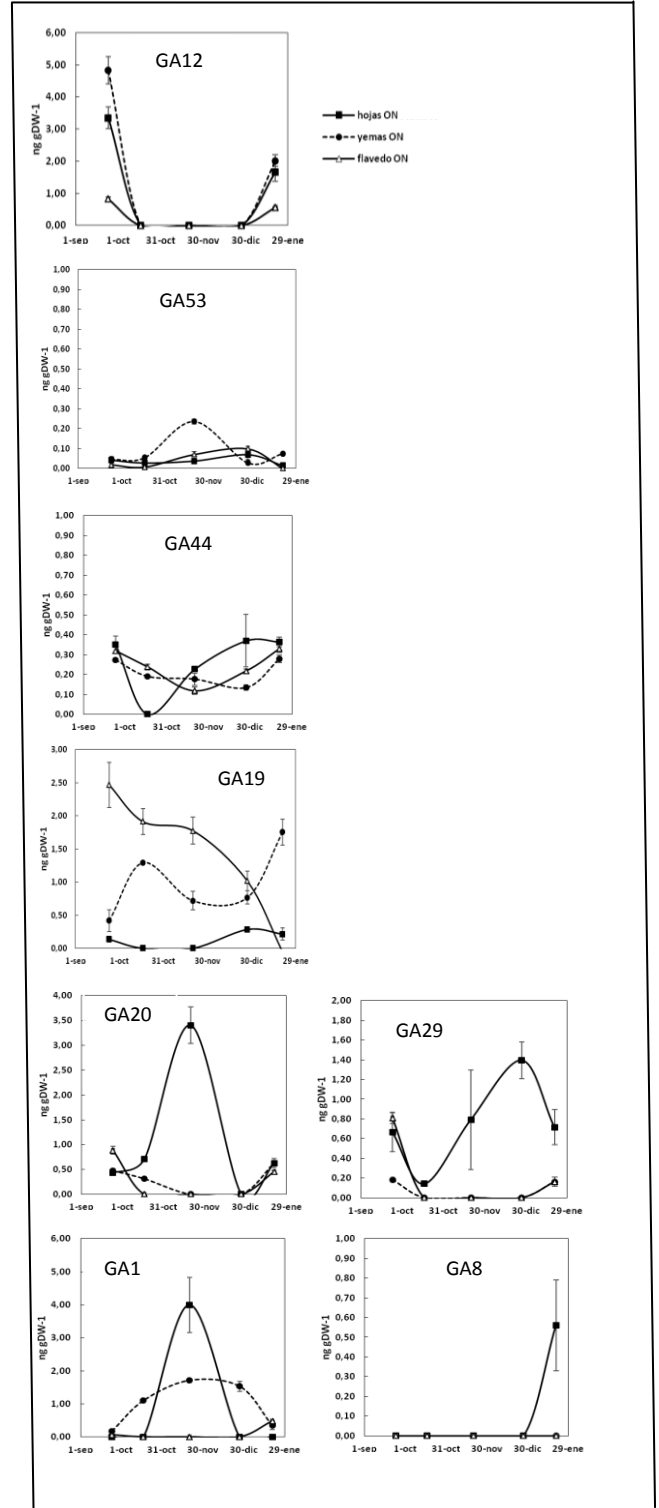
Muñoz-Fambuena *et al.* (2012) y Goldberg-Moller *et al.* (2013) relacionaron la aplicación exógena de GA<sub>3</sub> con la inhibición de la expresión del gen *CiFT*, y Guardiola *et al.* (1982) explicaron el efecto del GA<sub>3</sub> inhibiendo la floración. Los resultados que aquí se presentan son similares a los de estos autores. Guardiola *et al.* (1982), mediante la aplicación exógena de GA<sub>3</sub> durante el mes de noviembre, redujeron los brotes mixtos un 17,2% y los generativos un 55,4%, y aumentaron los brotes vegetativos un 45,7%. Muñoz-Fambuena *et al.* (2012) y Goldberg-Moller *et al.* (2013) redujeron la expresión de *CiFT* en árboles del naranjo dulce 'Salustiana' con cosecha intermedia o mandarino 'Orri', respectivamente, mediante 1 o varias aplicaciones de GA<sub>3</sub> a partir de noviembre. Sin embargo, este es el primer estudio que relaciona la concentración endógena de GAs con la inhibición de la expresión de *CiFT* en los cítricos.

En el caso de GA<sub>4</sub>, los niveles en árboles 'on' son superiores a los que encontramos en árboles 'off'. La mayor concentración se da en el flavedo durante el periodo correspondiente a la inducción floral. Se observa un aumento significativo entre septiembre y octubre, de 0,19 ng g<sup>-1</sup> a 2,12 ng g<sup>-1</sup>, manteniéndose los niveles constantes hasta final de diciembre. Posteriormente, su concentración en el flavedo disminuye, sufriendo un descenso brusco pasando de 2,23 a 0,22 (Figura 9A), coincidiendo con la acumulación de carotenoides (Figura 3F). La ausencia de GA<sub>4</sub> y sus precursores en las hojas durante el periodo de inducción floral no permite relacionar la ruta de la 13-hidroxilación con el proceso, como ocurre también, en el cuajado del fruto (Talón *et al.*, 1992; Mesejo *et al.*, 2013). Sin embargo, al final del estudio (finales de enero) la concentración de GA<sub>4</sub> en hojas y de todos sus precursores aumenta (Figura 9A), como también ocurre con la GA<sub>1</sub> y sus precursores (Figura 9B) lo que sugiere el inicio de la brotación que tiene lugar en primavera.

A



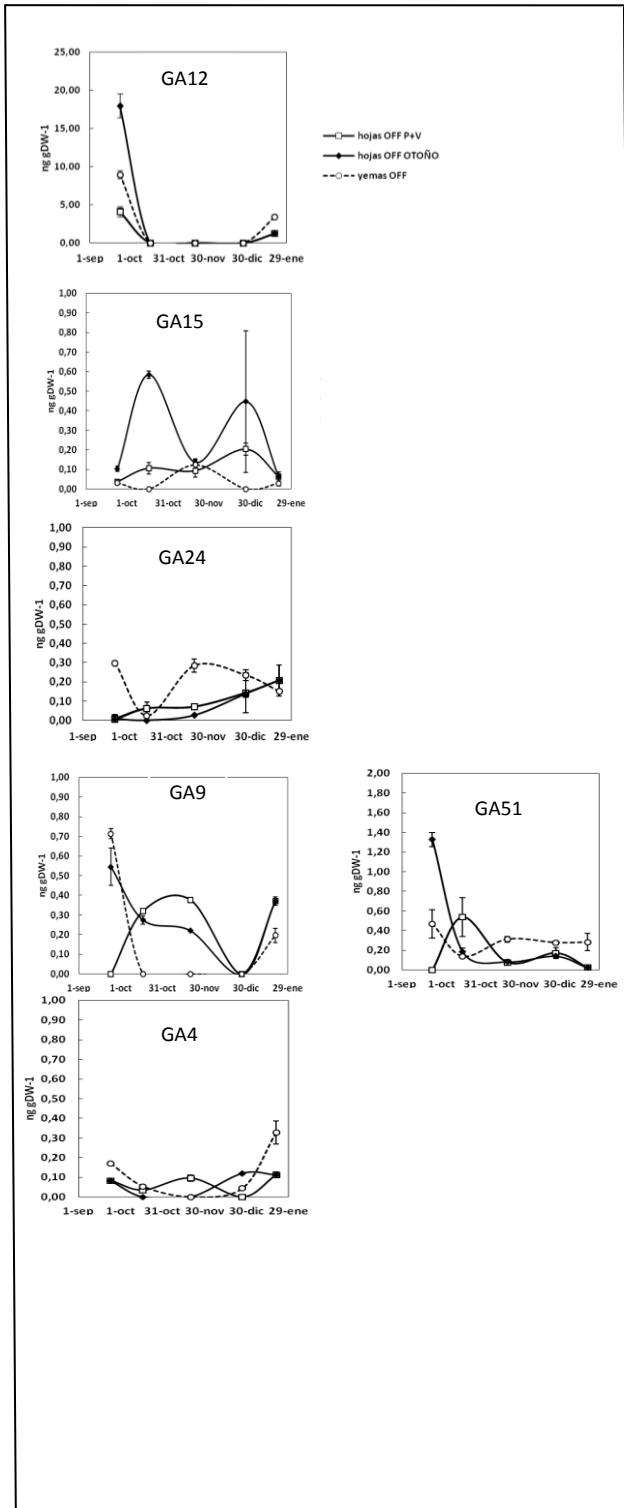
B



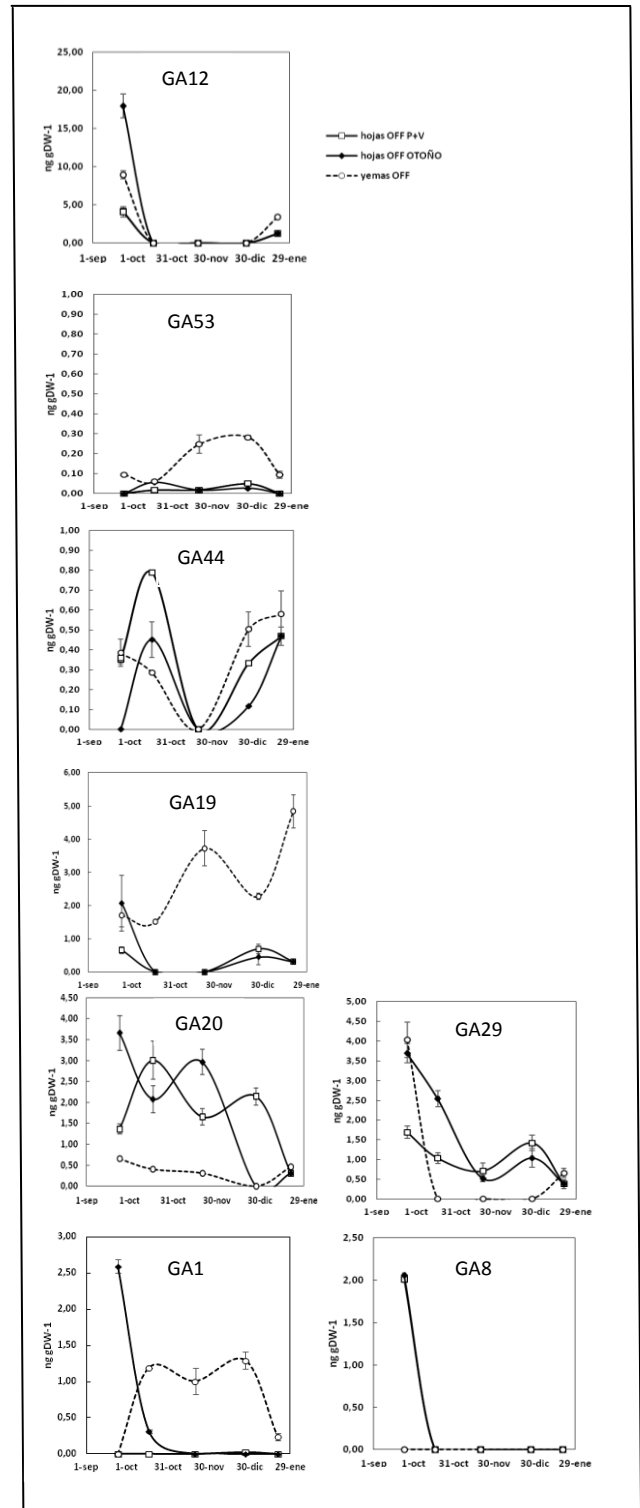
**Figura 9.** Evolución del contenido de giberelinas en hojas, yemas y flavedo en árboles ‘on’ de mandarino ‘Moncada’. Ruta de la 13-no hidroxilación (A) y ruta de la 13-hidroxilación (B).



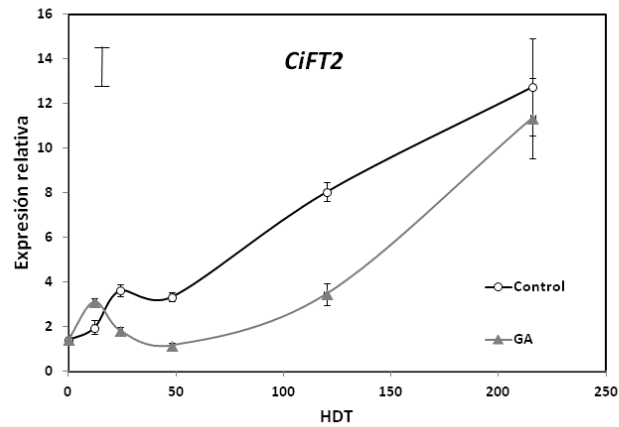
A



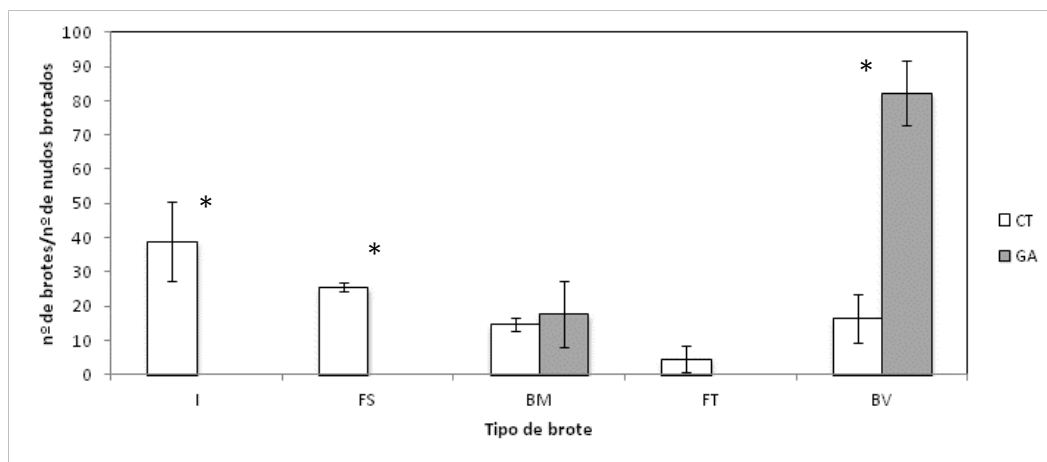
B



**Figura 10.** Evolución del contenido de giberelinas en hojas de brotación de otoño, en hojas de brotación de primavera y en yemas en árboles ‘off’ de mandarino ‘Moncada’. Ruta de la 13-no hidroxilación (A) y ruta de la 13-hidroxilación (B).



**Figura 11.** Efecto del tratamiento exógeno de GA en la expresión relativa del gen *CiFT2* en árbol 'off' de naranjo dulce 'Navelate'. La barra vertical muestra el valor LSD del experimento.



**Figura 12.** Efecto de GA aplicado durante el periodo de inducción floral en la brotación y floración en árbol 'off' de naranjo dulce 'Navelate'. Los asteriscos indican diferencias significativas.

## **IV. CONCLUSIONES**



1. El incremento de la concentración de ABA en el fruto durante el cambio de color coincidió con un incremento significativo de ABA en hojas y yemas, y de la expresión del gen *FLC* en hojas; por el contrario, en los árboles 'off' se redujo la concentración de ABA a la vez que la expresión de *FLC*.
2. La aplicación exógena de ABA a árboles 'off' no mostró una relación clara con la expresión de *FLC*, ni redujo significativamente la floración y la expresión del gen *CiFT*.
3. Las GAs de la ruta de la 13-hidroxiación disminuyeron en el fruto a la vez que aumentaron en las hojas durante la inducción floral coincidiendo con la inhibición de la expresión de *CiFT*; por el contrario, en los árboles 'off', la concentración de GAs en las hojas disminuyó a la vez que aumentó la expresión de *CiFT*.



## **V. BIBLIOGRAFÍA**





- Agustí M.** 1980. Biología y control de la floración en el género *Citrus* [Tesis doctoral]. Universitat Politècnica de València. España.
- Agustí M.** 2003. *Citricultura*. Ediciones Mundiprensa. 2da. Edición. España.
- Albrigo LG, Saúco VG.** 2004. Flower bud induction, flowering and fruit-set of some tropical and subtropical fruit tree crops with special reference to citrus. *Acta Horticulturae* 632, ISHS: 81-90.
- Alós E, Cercós M, Rodrigo MJ, Zacarias L, Talón M.** 2006. Regulation of color break in Citrus fruits. Changes in pigment profiling and gene expression induced by gibberellins and nitrate, two ripening retardants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 4888–4895.
- Alquezar B, Rodrigo MJ, Zacarias L.** 2008. Carotenoid biosynthesis and their regulation in citrus fruit. *Tree and Forestry Science and Biotechnology* 2 (Special Issue 1): 23-35.
- Amasino R.** 2010. Seasonal and developmental timing of flowering. *The Plant Journal* 61: 1001-1013.
- Ayalon S, Monselise SP.** 1960. Flower bud induction and differentiation in the Shamouti orange. *Proceedings of the American Society of Horticultural Science* 75: 216-221.
- Benlloch R, Berbel A, Serrano-Mislata A, Madueño F.** 2007. Floral initiation and inflorescence architecture: A comparative view. *Annals of Botany* 100: 659-676.
- Betancourt M, Sistachs V, Martínez-Fuentes A, Mesejo C, Reig C, Agustí M.** 2014. Influence of harvest date on fruit yield and return bloom in 'Marsh' grapefruit trees (*Citrus paradisi* Macf.) grown under a tropical climate. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 89 (4): 435-440.
- Blázquez MA.** 2003. Regulación del tiempo de floración por luz y temperatura. *BioPress* número 8.

- Blazquez MA, Piñeiro M, Valverde F.** 2011. Bases moleculares de la floración. *Investigación y Ciencia*, mayo: 28-36.
- Casas A, Mallent MD.** 1988b. El color de los frutos cítricos. I. Generalidades. II. Factores que influyen en el color. Influencia de la especie, la variedad y la temperatura. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*. 28(2): 183-202.
- Cassin J, Bourdeaut J, Fougue A, Furon V, Gaillard JP, LeBourdelle J, Montagut G, Moreuil C.** 1969. The influence of climate upon the blooming of citrus in tropical areas. *Proceedings First International Citrus Symposium* 1: 315-323.
- Chica EJ, Albrigo LG.** 2013. Expression of flower promoting genes in sweet orange during floral inductive water deficits. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 138 (2): 88-94.
- Dag A, Bustan A, Avni A, Tzipori I, Lavee S, Riov J.** 2010. Timing of fruit removal affects concurrent vegetative growth and subsequent return bloom and yield in olive (*Olea europaea* L.). *Scientia Horticulturae* 123: 469-472.
- Davenport TL.** 1990. Citrus flowering. *Horticultural Review*, 12: 349-408.
- Davies BH.** 1976. Carotenoids. New York: Academic Press.
- Davies PJ** Ed. 2010. *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!*. 3rd ed. Springer Science+Business Media B.V. Dordrecht, The Netherlands.
- Gambetta G, Martínez-Fuentes A, Betancur O, Mesejo C, Reig C, Graviana A, Agustí M.** 2012. Hormonal and nutritional changes in the flavedo regulating rind color development in sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). *Journal of Plant Growth Regulation* 31: 273-282.
- Gambetta G, Mesejo C, Martínez-Fuentes A, Reig C, Graviana A, Agustí A.** 2014. Gibberellic acid and norflurazon affecting the time-course of flavedo pigment and abscisic acid content in 'Valencia' sweet orange. *Scientia Horticulturae* 180: 94-101.

- García-Luis A, Almela V, Monerri C, Agustí M, Guardiola JL.** 1986. Inhibition of flowering in vivo by existing fruits and applied growth- regulators in *Citrus unshiu*. *Physiologia Plantarum* 66: 515–520.
- García-Luis A, Fornes F, Guardiola JL.** 1986. Effects of gibberellin A3 and cytokinins on natural post-harvest, ethylene-induced pigmentation of Satsuma mandarin peel. *Physiologia Plantarum* 68: 271-274.
- Giakountis A, Coupland G.** 2008. Phloem transport of flowering signals. *Current Opinion in Plant Biology* 11: 687-694.
- Goldberg-Moeller R, Shalom L, Shlizerman L, Samuels S, Zur N, Ophir R, Blumwald E, 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 Science* 198: 46–57.
- Goldschmidt EE, Golomb A.** 1982. The carbohydrate balance of alternate-bearing citrus trees and the significance of reserves for flowering and fruiting. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 107: 206–208.
- Goldschmidt EE, Monselise SP.** 1972. Hormonal control of flowering in citrus and some other woody perennials. En: Carr DJ Ed. *Plant growth Substances* 1970. Springer-Verdag. New York, pp. 758-766.
- Gómez-Cadenas A, Mehouchi J, Tadeo FR, Primo-Millo E, Talon M.** 2000. Hormonal regulation of fruitlet abscission induced by carbohydrate shortage in citrus. *Planta* 210: 636-643.
- Guardiola JL, Agustí M, García-Marí F.** 1977. Gibberellic acid and flower bud development in sweet orange. *Proceedings International Society of Citriculture* 2: 696–699
- Guardiola JL, Monerri C, Agustí M.** 1982. The inhibitory effect of gibberellic acid on flowering in Citrus. *Physiologia Plantarum* 55: 136–142.
- Iglesias DJ, Cercós M, Colmenero-Flores JM, Naranjo MA, Ríos G, Carrera E, Ruiz-Rivero O, Lliso I, Morillon R, Tadeo FR, Talon M.** 2007. Physiology of citrus fruiting. *Braz. Journal of Plant Physiology* 19 (4): 333-362.

- Kato M, Ikoma Y, Matsumoto H, Sugiura M, Hyodo H, Masamichi Y.** 2004. Accumulation of carotenoids and expression of carotenoid biosynthetic genes during maturation in citrus fruit. *Plant Physiology* 134: 824-837.
- Koshita Y, Takahara T, Ogata T, Goto A.** 1999. Involvement of endogenous plant hormones (IAA, ABA, GAs) in leaves and flower bud formation of Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.). *Scientia Horticulturae* 79: 185-194.
- Koshita Y, Takahara T.** 2004. Effect of water stress on flower-bud formation and plant hormone content of satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.). *Scientia Horticulturae* 99: 301-307.
- Martínez-Fuentes A, Mesejo C, Reig C, Agustí M.** 2010. Timing of the inhibitory effect of fruit on return bloom of 'Valencia' sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90: 1936-1943.
- Mesejo C, Yuste R, Martínez-Fuentes A, Reig C, Iglesias DJ, Primo-Murillo E, Agustí M.** 2013. Self-pollination and parthenocarpic ability in developing ovaries of self-incompatible Clementine mandarins (*Citrus clementina*). *Physiologia Plantarum* 148 (1): 87-96.
- Milborrow BV.** 2001. The pathway of biosynthesis of abscisic acid in vascular plants: a review of the present state of knowledge of ABA biosynthesis. *Journal of Experimental Botany* 52 (359): 1145-1164.
- Monselise SP, Goldschmidt EE, Golomb A.** 1981. Alternate bearing in citrus and ways of control. *Proceedings International Society of Citriculture* 1: 232-242.
- Monselise SP, Goldschmidt EE.** 1982. Alternate bearing in fruit trees. *Horticultural reviews* 4: 128-173.
- Monselise SP, Halevy AH.** 1964. Chemical inhibition and promotion of citrus flower bud induction. *Journal of American Society for Horticultural Science* 84: 141-146.
- Muñoz-Fambuena N, Mesejo C, González-Mas MC, Primo-Millo E, Agustí M, Iglesias DJ.** 2011. Fruit regulates seasonal expression of flowering genes in alternate-bearing 'Moncada' mandarin. *Annals of Botany* 108: 511-519.

- Muñoz-Fambuena N, Mesejo C, González-Mas MC, Primo-Millo E, Agustí M, Iglesias DJ.** 2012. Gibberellic acid reduces flowering intensity in sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) by repressing *CiFT* gene expression. *Journal of Plant Growth Regulation* 31: 529-536.
- Muñoz-Fambuena N, Mesejo C, Iglesias DJ, Reig C, Martínez-Fuentes A, Gonzalez-Mas MC, Primo-Millo E, Agustí M.** 2013. La alternancia de cosechas en los cítricos. Control genético y técnicas para reducirla. *Levante agrícola* 4º Trimestre: 322-328.
- Mutasa-Göttgens E, Hedden P.** 2009. Gibberellin as a factor in floral regulatory networks. *Journal of Experimental Botany* 60: 1979-1989.
- Nakagawa M, Honsho C, Kanzaki S, Shimizu K, Utsunomiya N.** 2012. Isolation and expression analysis of *FLOWERING LOCUS T*-like and gibberellin metabolism genes in biennial-bearing mango trees. *Scientia Horticulturae* 139: 108-117.
- Nishikawa F, Endo T, Shimada T, Fujii H, Shimizu T, Omura M, Ikoma Y.** 2007. Increased *CiFT* abundance in the stem correlates with floral induction by low temperature in Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.). *Journal of Experimental Botany* 58 (14): 3915-3927.
- Okuda H, Kihara T, Iwagaki I.** 1996. Effects of fruit removal on photosynthesis, stomatal conductance and ABA level in the leaves of vegetative shoots in relation to flowering of Satsuma mandarin. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 65(1): 15-20.
- Regnault T, Davière JM, Wild M, Sakvarelidze-Achard L, Heintz D, Carrera-Bergua E, Lopez-Diaz I, Gong F, Hedden P, Achard P.** 2015. The gibberellin precursor GA<sub>12</sub> acts as a long-distance growth signal in *Arabidopsis*. *Nature Plants* 1 (6).
- Reuther W, Nauer EM, Summers L.** 1973. Effects of seasonal temperature of regimes on development and maturation of citrus fruits. *Proceedings of the International Society of Citriculture* 3: 63-71.

- Rodrigo MJ, Marcos JF, Alferez F, Mallent MD, Zacarias L.** 2003. Characterization of Pinalate, a novel *Citrus sinensis* mutant with a fruit-specific alteration that results in yellow pigmentation and decreased ABA content. *Journal of Experimental Botany* 54: 727–738.
- Rodrigo MJ, Marcos JF, Zacarias L.** 2004. Biochemical and molecular analysis of carotenoid biosynthesis in flavedo of orange (*Citrus sinensis* L.) during fruit development and maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 6724–6731.
- Seo M, Jikumaru Y, Kamiya Y.** 2011. Profiling of hormones and related metabolites in seed dormancy and germination studies. *Methods in Molecular Biology*, 773: 99-111.
- Shalom L, Samuels S, Zur N, Shlizerman L, Doron-Faigenboim A, Blumwald E, Sadka A.** 2014. Fruit load induces changes in global gene expression and in abscisic acid (ABA) and indole acetic acid (IAA) homeostasis in citrus buds. *Journal of Experimental Botany* 65(12): 3029-3044.
- Singh RN.** 1971. Biennial bearing in fruit trees - accent on apple and mango. *Ind. Counc. Agr. Res. Bul.* 30.
- Smith JHC, Benítez A.** 1955. Chlorophylls. En: Paech K y Tracey MM Eds. *Modern Methods of Plant Analysis*: 142-196. Berlin: Springer.
- Stewart I, Wheaton TA.** 1972. Carotenoids in Citrus - Their accumulation induced by ethylene. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 20 (2): 448-449.
- Taiz L, Zeiger E** Eds. 2006. *Fisiología Vegetal*. Volumen 2: Crecimiento y desarrollo. Publicacions de la Universitat Jaume I. Castelló de la Plana, España.
- Talón M, Zacarias L, Primo-Millo E.** 1992. Gibberellins and parthenocarpic ability in developing ovaries of seedless mandarins. *Plant Physiology* 99(4): 1575-1581.
- Talón M.** 2000. Giberelinas. En: Azcón-Bieto J, Talón M Eds. *Fundamentos de la Fisiología Vegetal*. McGraw-Hill Interamericana. Madrid, España, pp. 325-341.

- Turck F, Fornara F, Coupland G.** 2008. Regulation and identity of Florigen: *FLOWERING LOCUS T* moves center stage. *Annual Review of Plant Biology*. 59: 573-594.
- Verreynne JS, Lovatt CJ.** 2009. The effect of crop load on budbreak influences return bloom in alternate bearing 'Pixie' mandarin. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 134 (3): 299-307.
- Wang Y, Li L, Ye T, Lu Y, Chen X, Wu Y.** 2013. The inhibitory effect of ABA on floral transition is mediated by ABI5 in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* 64 (2): 675-684.
- Yamaguchi S.** 2008. Gibberellin Metabolism and its Regulation. *Annual Review of Plant Biology* 59: 225-251.
- Yamaguchi N, Winter CM, Wu MF, Kanno Y, Yamaguchi A, Seo M, Wagner D.** 2014. Gibberellin acts positively then negatively to control onset of flower formation in Arabidopsis. *Science* 344: 638-641.