

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

**ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL**



**EL AISLAMIENTO DE LAS YEMAS AXILARES RESPECTO DE
LA INFLUENCIA DEL FRUTO Y DEL RESTO DE LA PLANTA
ACTIVA LA CAPACIDAD DE FLORECER EN VARIEDADES
ALTERNANTES DE CÍTRICOS.**

**TRABAJO FIN DE MÁSTER: MÁSTER UNIVERSITARIO EN
INGENIERÍA AGRONÓMICA**

Alumno: Andrés Marzal Blay
Tutor: Carlos Mesejo Conejos

Curso Académico: 2018-2019

VALENCIA, 17 de junio de 2019

Resumen:

La alternancia de cosechas es un problema de producción por el cual un árbol es incapaz de florecer, y, por tanto, producir frutos, después de una cosecha elevada. La intensidad de este fenómeno es distinta en función de la especie y la variedad. La presencia del fruto en los años de elevada producción inhibe la inducción floral y la floración del año siguiente. Este efecto se ha relacionado con factores hormonales, nutricionales y genéticos. Sin embargo, se desconoce el mecanismo de acción por el cual el fruto ejerce su acción sobre la floración, lo que impide establecer técnicas agronómicas con una respuesta satisfactoria para resolver la alternancia.

La hipótesis de trabajo de este Trabajo Final de Máster es la siguiente: el aislamiento de las yemas axilares respecto de la influencia del fruto y del resto de la planta promueve la inducción floral a través de un cambio del metabolismo primario.

El aislamiento de las yemas se realizó mediante la interrupción del transporte floemático entre el fruto y las yemas axilares (rayado apical), entre las yemas axilares y el resto de la planta (rayado basal) o ambos (rayado apical + basal), en brotes campaneros de árboles de mandarina cv. Nadorcott en septiembre de 2018. El efecto de los tratamientos sobre la floración y el metabolismo primario de las hojas y las yemas se comparó con brotes controles incapaces de florecer por efecto del fruto (control ON), y brotes controles que sí florecen por no tener fruto (control OFF).

Los tratamientos de rayado simple (apical o basal) aumentaron la brotación de las yemas axilares. Pero el rayado doble provocó que las yemas axilares florecieran, estimulando la expresión del gen *CiFT2* en las hojas 50 días antes que en los brotes OFF e independientemente de la señal exógena inductora (la baja temperatura).

Los resultados del estudio del metabolismo primario (aminoácidos y azúcares) sugieren que el efecto sobre el estímulo de la floración fue a través de un cambio en el metabolismo de los carbohidratos en las hojas y en el floema del brote. En las hojas se observó la señalización de un estrés nutricional (SNRK1) y un aumento de la expresión del gen *RbcS* (Rubisco, subunidad pequeña); en el brote se observó un aumento de la concentración de maltosa (hidrólisis de almidón).

Palabras clave: Alternancia, Fruto, Inducción floral, Rayado.

Resum:

L'alternança de collites és un problema de producció pel qual un arbre no és capaç de florir, i, per tant, produir fruits, després d'una collita elevada. La intensitat d'aquest fenomen és diferent en funció de l'espècie i la varietat. La presència del fruit en els anys d'elevada producció inhibeix la inducció floral i la floració de l'any següent. Este efecte s'ha relacionat amb factors hormonals, nutricionals i genètics. Tot i això, es desconeixen els mecanismes d'acció pel qual el fruit exerceix la seua acció sobre la floració, fet que impedeix establir tècniques agronòmiques amb una resposta satisfactòria per a resoldre l'alternança.

La hipòtesi de treball d'aquest Treball Final de Màster és la següent: l'aïllament de les gemmes axil·lars respecte de la influència del fruit i de la resta de la planta promou la inducció floral a través d'un canvi del metabolisme primari.

L'aïllament de les gemmes es va realitzar mitjançant la interrupció del transport floemàtic entre el fruit i les gemmes axil·lars (ratllat apical), entre les gemmes axil·lars i la resta de la planta (ratllat basal) o ambdós (ratllat apical + basal), en brots campaners d'arbres de mandarí cv. Nadorcott en setembre de 2018. L'efecte dels tractaments sobre la floració i el metabolisme primari de les fulles i les gemmes es va comparar amb brots control incapços de florir per efecte del fruit (control ON), i brots control que sí floreixen per no tenir fruit (control OFF).

Els tractaments de ratllat simple (apical o basal) van augmentar la brotació de les gemmes axil·lars. Però el ratllat doble provocar que les gemmes axil·lars florissin, estimulants l'expressió del gen CiFT2 en els fulls 50 dies abans que en els brots OFF i independentment del senyal exògena inductora (la baixa temperatura).

Els resultats de l'estudi del metabolisme primari (aminoàcids i sucres) suggereixen que l'efecte sobre l'estímul de la floració va ser a través d'un canvi en el metabolisme dels carbohidrats en les fulles i en el floema del brot. En els fulls es va observar la senyalització d'un estrès nutricional (SNRK1) i un augment de l'expressió del gen RbcS (Rubisco, subunitat xicoteta); en el brot es va observar un augment de la concentració de maltosa (hidròlisi de midó).

Paraules Clau: Alternança, Fruit, Inducció floral, Ratllat.

Abstract:

Alternate bearing is a problem whereby a tree is unable to bloom, and, therefore, produce fruits, after huge harvest. The intensity of this phenomenon differs depending on the species and the variety. The fruit inhibits the ability of blooming, the effect being related with hormonal, nutritional and genetic factors. However, the specific mechanism whereby the fruit inhibits flowering is not known, and therefore agronomical technics to solve the problem are not established.

The hypothesis of this Thesis is the following: the isolation of the axillary buds with respect to the fruit and tree influence activates the ability to bloom through changes in the primary metabolism.

The isolation of the buds was carried out by interrupting the phloem transport between the fruit and the axillary buds (apical girdling), between the axillary buds and the rest of the plant (basal girdling) or both (apical girdling + basal), in terminal shoots of tangerine trees cv. Nadorcott between September and November 2018. The effect of the treatments on flowering and the primary metabolism of the leaves and buds was compared with control buds unable to flower due to the fruit (ON control), and control buds that do flower because they do not have fruit (control OFF).

Simple-girdling treatments (apical or basal) increased the sprouting of the axillary buds. But double-girdling caused the axillary buds to flower, stimulating the expression of the CiFT2 gene in the leaves 50 days earlier than in the OFF shoots and independently of the exogenous inducing signal (the low temperature).

The results of the primary metabolism (amino acids and sugars) suggest that the effect on the stimulus of flowering was through a change in the metabolism of carbohydrates in the leaves and in the phloem of the shoot. In the leaves, the signaling of a nutritional stress (SNRK1) was observed, and also the expression of the RbcS gene (Rubisco, small subunit) upregulated; besides, an increase in maltose concentration (starch hydrolysis) was observed in the bark tissues of the shoot.

Keywords: Alternation, Fruit, Floral induction, Scratches.

*“El mundo está en manos de aquellos que tienen el coraje de
soñar y de correr el riesgo de vivir sus sueños”*

(Paulo Coelho)

A mis padres, mis abuelos y mis hermanos.

A Carlos, mil gracias por ser más que un profesor, por creer en mí y darme esta oportunidad sin apenas conocerme y sobre todo por enseñarme a disfrutar de cada momento...

A Amparo, por ayudarme en todo lo que he necesitado y su alegría constante en el trabajo.

Por haberme acogido en vuestro equipo como uno más, Manolo, Carmina y Vicent.

A mis amigos, por lo auténticos que son. ¿Qué habrían sido todos estos años sin vosotros?

A mis padres y hermanos por su apoyo constante y saber que siempre voy a poder contar con ellos.

Pero, especialmente, me gustaría agradecer a mis abuelos Miguel y Ricardo todo lo que me han enseñado a lo largo de los años y el gran ejemplo de vida que han sido para mí.

Índices

Índice:

I. Introducción	1
1. Introducción.....	1
1.1. Alternancia de cosechas.....	1
1.2. La floración. ¿Por qué florecen las plantas?	3
1.3. La floración en los cítricos.....	7
2. Factores que provocan la inducción de la floración en los cítricos.	8
2.1. Factores ambientales.....	8
2.2. Factores bióticos	9
2.3. La inhibición de la floración. El fruto. Factores endógenos:.....	9
3. Hipótesis de trabajo y objetivos:	12
II. Material y métodos	13
1. Material vegetal y diseño del experimento.....	13
2. Metodología.....	15
2.1. Toma, procesado de muestras y mediciones de campo	15
2.2. Expresión génica.....	15
2.2.1. Extracción de mRNA.....	15
2.2.2. Elección de genes de interés y sus cebadores	16
2.2.3. Rt-qPCR.....	17
2.3. Análisis metabolómico	18
2.4. Análisis estadísticos	18
III. Resultados y discusión	19
1. Influencia del rayado sobre la brotación y floración de las yemas axilares cercanas al fruto..19	
1.1. Comportamiento reproductivo de la variedad Nadorcott. Establecimiento del modelo experimental.....	19
1.2. Respuesta de las yemas al rayado.	21
1.2.1. Efecto sobre la brotación y la floración	21
2. Expresión del gen CiFT2 en hojas durante el periodo de inducción floral. Efecto del doble rayado (RABS).....	25
3. Efecto del doble rayado (RABS) sobre el estado nutricional y metabólico del brote.28	
3.1. Efecto sobre el desarrollo del fruto.....	28
3.2. Cambios en el metabolismo primario del brote debido al doble rayado (RAB).. 30	
3.2.1. Cambios en el contenido en aminoácidos, poliaminas y rutas metabólicas relacionadas	30
3.2.2. Cambios en el contenido en carbohidratos y rutas metabólicas relacionadas	33
IV. Conclusiones	38
V. Bibliografía	39

Índice de tablas y figuras:

Figuras:

Figura 1. Esquema de la alternancia de cosechas en cítricos. (Agustí et al., 2004). La falta de flores da lugar a una escasa producción (falta de frutos, año OFF). Esa situación permite la activación de la inducción floral por medio de señales exógenas, y una elevada floración en primavera. Las variedades alternantes no presentan problemas de cuajado por lo que la elevada floración permite la obtención de una elevada cosecha (muchos frutos, año ON). Ésta es la responsable del bloqueo de la inducción floral y, por tanto, de la falta de flores en la siguiente primavera, reiniciando, de este modo, el ciclo alternante..... 2

Figura 2. La inducción floral como respuesta al fotoperiodo. La respuesta de las plantas frente al estímulo del día largo consiste en la activación del gen CO e incremento de la expresión de FT (Blázquez et al., 2011). 4

Figura 3. Fases de la floración: 2.1. Proceso de inducción. 2.2. Proceso de diferenciación floral..... 6

Figura 4. Tipos de brotes cítricos. RF (ramo floral), FS (flor solitaria), BC (brote campanero), BM (brote mixto) y BV (brote vegetativo) (Agustí 2003). 8

Figura 5. Localización de los virus en una rama afectada de CTV. Sección de tallo de cítrico. (Dawson et al., 2015). 9

Figura 6. Calendario del ciclo vegetativo y reproductivo de la variedad "Nadorcott". Tratamientos realizados en cada momento..... 14

Figura 7. Rayado de la zona apical del brote campanero. 14

Figura 8. Número de flores en brotes sin fruto (OFF) y brotes con fruto (ON). Cada valor es la media de 15 brotes..... 19

Figura 9. Efecto del rayado junto al fruto (apical, RA), en la base del brote (RB) o ambos (RAB) sobre la brotación de primavera de brotes campaneros del año anterior. A: Brotación promedio por brote. B: Brotación promedio por nudo. Cada valor representa el promedio de 15 brotes campaneros por tratamiento. Las barras verticales indican el error estándar. Letras minúsculas diferentes muestran diferencias significativas entre tratamientos. Letras mayúsculas muestran diferencias significativas entre los nudos... 22

Figura 10. Efecto del rayado junto al fruto (apical, RA), en la base del brote (RB) o ambos (RAB) sobre la floración de brotes campaneros del año anterior. A: Floración promedio por brote. B: Floración promedio por nudo. Cada valor representa el promedio de 15 brotes campaneros por tratamiento. Las barras verticales indican el error estándar. Letras minúsculas diferentes muestran diferencias significativas entre tratamientos. Letras mayúsculas muestran diferencias significativas entre los nudos... 24

Figura 11. (A); Evolución de la temperatura mínima y máxima del día y las horas frío (<7,2°C) durante el experimento. (B); Expresión relativa del gen CiFT2 en hojas adultas. Cada valor es la media de la expresión de 4 hojas de cada muestra y fecha. (RAB) rayado doble, (C. ON) control con fruto y (C. OFF) control sin fruto. (C); Ampliación de la escala para los tratamientos (C. ON) control con fruto y (C. OFF) control sin fruto. Letras diferentes muestran diferencias significativas. 27

Figura 12. Efecto del rayado apical y basal (RAB) de brotes campaneros sobre el crecimiento y maduración del fruto. A: diámetro; B: peso; C: color del exocarpo; D: color de la pulpa. Cada valor es el promedio de 15 frutos por tratamiento, evaluados en el momento de la recolección. Letras distintas indican diferencias significativas. 29

Figura 13. Concentración relativa de aminoácidos y poliaminas en hojas de brotes campaneros con fruto (C.ON) y sin fruto (C.OFF), y con fruto y rayados en el ápice y la base (RAB). Cada valor es la media de tres repeticiones biológicas. Letras distintas indican diferencias significativas. (A) Metionina, (B) Glutamina, (C) Putrescina y (D) Triptófano. Análisis realizado a los 74 días del rayado apical y basal (RAB). 31

Figura 14. Concentración relativa de aminoácidos y poliaminas en el floema de brotes campaneros con fruto (C.ON) y sin fruto (C.OFF), y con fruto y rayados en el ápice y la base (RAB). Cada valor es la media de tres repeticiones biológicas. Letras distintas indican diferencias significativas. (A) Metionina, (B) Glutamina, (C) Putrescina y (D) Triptófano. Análisis realizado a los 74 días del rayado apical y basal (RAB). 31

Figura 15. Efecto del rayado apical y basal sobre índice SPAD de las hojas, evaluado al final del periodo inductivo (13/03/19). Se evaluaron unos 15 brotes por tratamiento. Letras diferentes muestran diferencias significativas. 32

Figura 16. Expresión relativa del gen ACO en hojas adultas. Cada valor es la media de la expresión de 4 hojas de cada muestra y fecha. (RAB) rayado doble, (ON) control con fruto y (OFF) control sin fruto. 33

Figura 17. Concentración relativa de carbohidratos en hojas de brotes campaneros con fruto (C.ON) y sin fruto (C.OFF), y con fruto y rayados en el ápice y la base (RAB). Cada valor es la media de tres repeticiones biológicas. Letras distintas indican diferencias significativas. (A) Fructosa, (B) Glucosa, (C) Sacarosa y (D) Trehalosa-6-fosfato y (E) Maltosa. Análisis realizado a los 74 días del rayado apical y basal (RAB). 34

Figura 18. Expresión relativa del gen SNRK1 en las hojas de brotes campaneros con fruto (C.ON) y sin fruto (C.OFF), y con fruto y rayados en el ápice y la base (RAB). Cada valor es la media de tres repeticiones biológicas. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). 35

Figura 19. Expresión relativa del gen RbcS en las hojas de de brotes campaneros con fruto (C.ON) y sin fruto (C.OFF), y con fruto y rayados en el ápice y la base (RAB). Cada valor es la media de tres repeticiones biológicas. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). 36

Figura 20. Azúcares esenciales. Cada valor es la media de tres repeticiones biológicas de una mezcla de 4 hojas adultas. Letras distintas indican diferencias significativas. (A) Fructosa, (B) Glucosa, (C) Sacarosa y (D) Trehalosa-6-fosfato y (E) Maltosa. El análisis se realizó 70 días después del tratamiento..... 37

Tablas:

Tabla 1. Señales que promueven la inducción floral en las plantas (Wada y Takeno, 2010)..... 5

Tabla 2. Cebadores elegidos para el análisis de expresión génica. 17

Tabla 3. Comparación de la distribución de la floración entre brotes OFF y el tratamiento de rayado apical y basal (RAB), evaluada en la primavera de 2019. Tipos de brotes florales; (S) flor solitaria, (C) brote campanero, (I) inflorescencia y (M) brote mixto. En cada tratamiento se evaluó un total de 15 brotes. 25

I. Introducción

1. Introducción.

Actualmente, en España, el cultivo de los cítricos ocupa una superficie total de 304.619 ha, lo que supone un aumento en la superficie del 2.56% respecto del año anterior (MAPAMA., 2018). Además, España se sitúa como quinto país productor de cítricos del mundo, siendo el mayor productor de cítricos de la Unión Europea. En 2018 la producción fue de 6,7 millones de toneladas (un 7 % menor que en 2017 que alcanzó los 7,2 millones de toneladas). La Comunidad Valenciana es la principal región productora a nivel nacional, con una superficie de cultivo de, aproximadamente, 158.167 ha, cerca del 60% del total, como ocurre con la producción, alrededor de 4 millones de toneladas (Conselleria de Agricultura, Medio Ambiente, Cambio Climático y Desarrollo Rural., 2018).

Pero la estimación realizada por el Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente para la campaña 2018-19 muestra un descenso en la producción de cítricos del 12 % aproximadamente, debido en gran medida a una pérdida generalizada de los rendimientos en todas las especies, tanto en limón, pomelo, naranja y mandarina. (MAPAMA., 2018). El documento de “Avance, Superficies y Producciones de Cultivos”, remarca como principales causas de este descenso, las fuertes lluvias acontecidas a final de año, el abandono del cultivo minifundista y, sobre todo, la *alternancia de cosechas*, la cual no permite una producción estable a lo largo del tiempo. La alternancia de cosechas es un problema destacado porque; 1) presenta un origen genético; 2) sucede todos los años; 3) se da con mayor intensidad en variedades de mandarinas y naranjas tardías, cuyo cultivo se ha planteado como estrategia para combatir la competencia de los cítricos exportados desde el hemisferio sur, y 4) no presenta, de momento, una solución agronómica eficaz.

1.1. Alternancia de cosechas.

La alternancia de cosechas es un proceso por el cual años de producción muy elevada (años ON) se suceden con años de producción escasa o incluso nula (año OFF), generalmente, con una frecuencia bianual. La ausencia de floración, tras la producción elevada, es el principal problema (Figura 1). Esta inhibición de la floración está asociada con la presencia del fruto en el árbol, y, particularmente, con el número de

frutos y tiempo de permanencia en el árbol (Martínez-Fuentes et al., 2010). Este fenómeno afecta al cultivo de numerosos árboles frutales además de los cítricos, como olivos, manzanos, aguacates y nogales entre otros. Al ser un fenómeno frecuente y no resuelto es objeto de numerosos estudios internacionales y revisiones bibliográficas, algunas de máxima actualidad (Davis, 1957; Jonkers, 1979; Monselise y Goldschmidt, 1982; Agustí, 1987; Muñoz-Fambuena et al., 2011; Durand et al., 2017; Muñoz-Fambuena et al., 2018; Sharma et al., 2019). El manzano es la especie caducifolia más estudiada a este respecto, mientras que el olivo, el aguacate y particularmente los cítricos lo son en cuanto a árboles perennifolios se refiere.

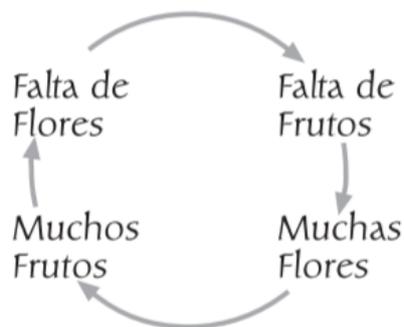


Figura 1. Esquema de la alternancia de cosechas en cítricos. (Agustí et al., 2004). La falta de flores da lugar a una escasa producción (falta de frutos, año OFF). Esa situación permite la activación de la inducción floral por medio de señales exógenas, y una elevada floración en primavera. Las variedades alternantes no presentan problemas de cuajado por lo que la elevada floración permite la obtención de una elevada cosecha (muchos frutos, año ON). Ésta es la responsable del bloqueo de la inducción floral y, por tanto, de la falta de flores en la siguiente primavera, reiniciando, de este modo, el ciclo alternante.

En los cítricos, el control que el fruto ejerce sobre la floración puede llegar, en determinadas circunstancias, a reducirla completamente (Moss, 1971), constituyendo uno de los mayores problemas de producción. La intensidad de este fenómeno depende marcadamente de la especie y variedad, siendo en algunos cultivares de mandarino y sus híbridos una regla general que puede alcanzar niveles de gravedad. Particularmente importante se presenta en aquellos cultivares de mandarino y naranjo cuyos frutos contienen semillas debido a su mayor porcentaje de cuajado inicial que dificulta el mecanismo de autocontrol de abscisión de frutos en la planta (Monselise, 1979), así como en aquellos de maduración tardía porque la permanencia prolongada del fruto en el árbol acentúa el problema (Martínez-Fuentes et al., 2010). En el caso de la especie naranjo dulce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck], destaca el “Grupo Blancas”, compuesto por

las variedades *Salustiana* y *Valencia late*, siendo la primera la que muestra una alternancia más acentuada (Gravina et al., 2000). En el grupo navel, la variedad Navelina también presenta un alto grado de alternancia (Martínez-Fuentes, 2010). Por otro lado, entre los mandarinos clementinos (*Citrus clementina* Hort. Ex Tan.), la variedad Hernandina presentan un elevado grado de vecería. Dentro del grupo de los híbridos, destaca el caso de los cultivares Moncada, por su vecería estricta (0%-100%), y *Nadorcott*, que es capaz de producir 100 kg por árbol sin mostrar una alternancia elevada, pero superado ese umbral de producción alterna intensamente (Martínez-Fuentes et al., 2012). Finalmente, cabe destacar que las variedades triploides presentan también un alto grado de alternancia.

Por otra parte, la cosecha precedente ejerce un efecto inhibitorio sobre la brotación que afecta con mayor intensidad a los brotes multiflorales sin hojas. Pero es el descenso en el número de inflorescencias mixtas (flores y hojas) la causa de la reducción de la cosecha siguiente, ya que éstos aportan más del 75% de la cosecha (Agustí et al., 1985). Es más, la eliminación de los frutos al inicio del verano incrementa la brotación y floración de la primavera siguiente (Verreyne y Lovatt, 2009; Martínez-Fuentes et al., 2010) a través de la estimulación de las brotaciones de verano y otoño (Verreyne y Lovatt, 2009).

La inhibición de la floración está relacionada con factores genéticos, factores climáticos, factores nutricionales y hormonales, factores culturales, etc. Además, en algún caso, éstos se presentan interrelacionados (Lavee, 2007).

1.2. La floración. ¿Por qué florecen las plantas?

Debido al carácter sésil de las plantas, es crucial que la floración se dé en el momento óptimo para que las semillas tengan condiciones favorables para su desarrollo. Por tanto, no es extraño que las plantas hayan desarrollado mecanismos para poder percibir los estímulos ambientales de su entorno de manera precisa. La capacidad de ajustar el momento de la floración a las condiciones de crecimiento adecuadas ha supuesto una gran ventaja evolutiva, la cual ha llevado a desarrollar una serie de dispositivos moleculares que permiten identificar las condiciones ambientales a lo largo del año (Azcón-Bieto, 2008).

Las plantas son capaces de reconocer la longitud de los días y la calidad de la luz. Lo consiguen gracias a los fotorreceptores y a un “reloj celular” autónomo que les permite marcar periodos de 24 h. Por ello, la floración es un proceso regulado gracias a la interacción de factores tanto endógenos como exógenos (Blázquez et al., 2011) y puede dividirse en dos fases:

1/ Inducción floral:

El fotoperiodo regula la actividad de la proteína CONSTANS (CO). La luz promueve el aumento de los niveles de la proteína CO y la oscuridad permite su degradación. En los días largos los periodos de oscuridad son mínimos con lo que la degradación de la proteína CO es baja y permite que coincidan altos niveles de la misma con luz al final del día. Esta coincidencia activa la expresión del gen *FLOWERING LOCUS T (FT)* en las hojas (Figura 2). La proteína FT se transporta via floema hasta el meristemo apical, donde se une a la proteína *FLOWERING LOCUS D (FD)* formando un dímero que será clave para iniciar el proceso de diferenciación floral (Bürle y Dean., 2006).

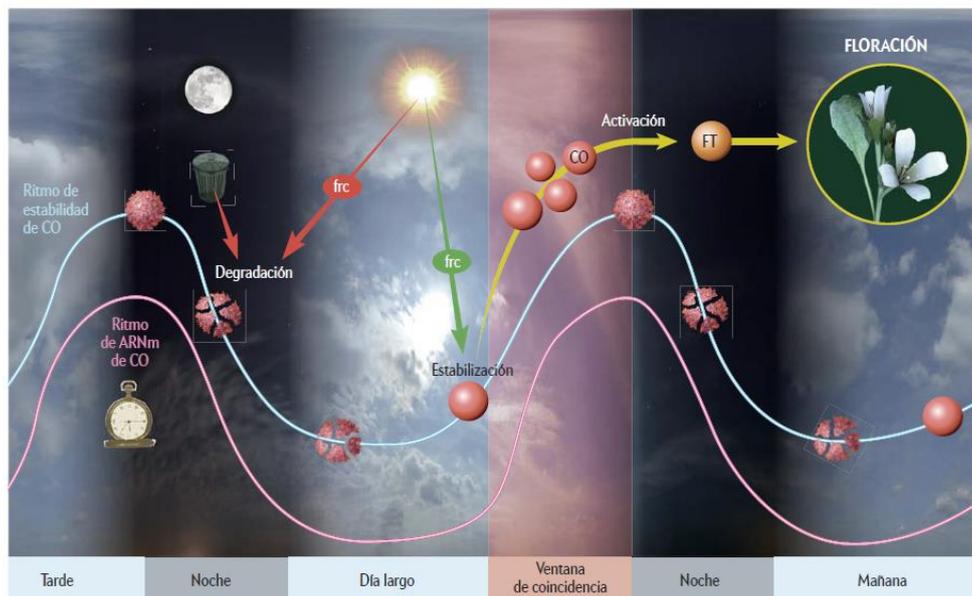


Figura 2. La inducción floral como respuesta al fotoperiodo. La respuesta de las plantas frente al estímulo del día largo consiste en la activación del gen CO e incremento de la expresión de FT (Blázquez et al., 2011).

Además del fotoperiodo, existen numerosas señales que promueven la inducción floral en las plantas, como la baja temperatura, la elevada/baja intensidad de floración, la luz ultravioleta, el estrés hídrico, una nutrición deficiente, la falta de nitrógeno, la falta de oxígeno, una elevada concentración de GA_{4/7}, el rayado de ramas, la poda de raíces, un estímulo mecánico o la supresión de la elongación de las raíces (Wada y Takeno, 2010).

Tabla 1. Señales que promueven la inducción floral en las plantas (Wada y Takeno, 2010)

Stress factor	Species	Flowering response
high-intensity light	<i>Pharbitis nil</i>	induction
low-intensity light	<i>Lemna paucicostata</i>	induction
	<i>Perilla frutescens</i> var. <i>crispa</i>	induction
ultraviolet C	<i>Arabidopsis thaliana</i>	induction
drought	Douglas-fir	induction
	tropical pasture	induction
	Legumes	induction
	lemon	induction
poor nutrition	<i>Ipomoea batatas</i>	promotion
	<i>Pharbitis nil</i>	induction
	<i>Macroptilium atropurpureum</i>	promotion
	<i>Cyclamen persicum</i>	promotion
	<i>Ipomoea batatas</i>	promotion
poor nitrogen	<i>Arabidopsis thaliana</i>	induction
	<i>Lemna paucicostata</i>	induction
poor oxygen	<i>Pharbitis nil</i>	induction
low temperature	<i>Pharbitis nil</i>	induction
high conc. GA _{4/7}	Douglas-fir	promotion
girdling	Douglas-fir	induction
root pruning	Citrus sp.	induction
	<i>Pharbitis nil</i>	induction
mechanical stimulation	<i>Ananas comosus</i>	induction
suppression of root elongation	<i>Pharbitis nil</i>	induction

2/ Diferenciación floral:

Tras la inducción floral se produce la diferenciación del meristemo en la yema. Una vez recibida la señal inductora (FT), se activa la expresión en cascada de los genes encargados de conferir la identidad floral del meristemo: *LEAFY (LFY)*, *SUPPRESSION OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1 (SOC1)* y *APETALLA1 (AP1)*. La sobreexpresión de cualquiera de ellos en *Arabidopsis thaliana*, ha mostrado ser condición suficiente para que el meristemo acabe diferenciándose en una flor (M. Roldán y J. Martínez Zapater., 2008). En los cítricos, la sobreexpresión de *LFY* y *API* en plantas juveniles reduce el tiempo de floración de varios años a unos meses (Peña et al., 2001).

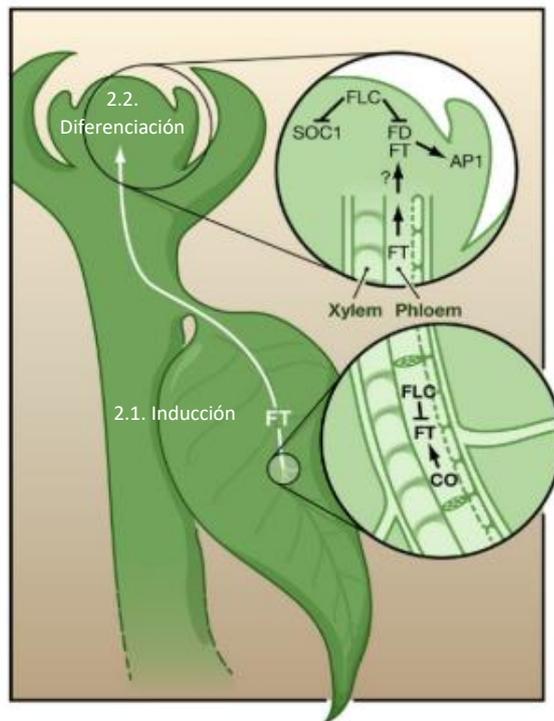


Figura 3. Fases de la floración: 2.1. Proceso de inducción. 2.2. Proceso de diferenciación floral.

Sin embargo, hay genes represores que pueden inhibir la floración incluso en presencia de las condiciones inductivas. Por ejemplo, la transcripción FT es reprimida por *TEMPRANILLO1 (TEM1)*, un gen que regula la juvenilidad en las plantas (Sgamma et al., 2014), o por *FLOWERING LOCUS C (FLC)*, un gen que juega un papel clave en la represión de la floración en el vía de vernalización (Seo et al., 2009). En el meristemo, *TERMINAL FLOWER1 (TFL1)* forma un heterodímero TFL1/FD que

reprime la transcripción de los genes diana de FD (Sohn et al., 2007), retrasa la floración y evita la regulación positiva de los genes de identidad floral dentro del meristemo apical del brote para mantener el crecimiento (Hanano y Goto, 2011).

1.3.1. La floración en los cítricos.

Tras la germinación de la semilla, los cítricos inician su desarrollo de un modo exclusivamente vegetativo, conformando el cuerpo de la planta. Este periodo se denomina fase juvenil o *juvenilidad*, y, en los cítricos, dura entre 8 y 10 años (Spiegel-Roy y Goldschmidt., 1996) durante los que la planta no es capaz de florecer. Esta incapacidad de activación del sistema reproductivo se explica por la inmadurez del meristemo en las primeras etapas del desarrollo, con lo que la planta, aunque recibe el estímulo de la hoja no es capaz de florecer, ya que no puede iniciar la diferenciación floral (Muñoz-Fambuena et al., 2019). En cambio, en la fase adulta, esta represión de la floración no ocurre en el meristemo, sino en la hoja, donde es reprimida la expresión del gen homólogo de *FT* en los cítricos, esto es, *CiFT2*.

Al superarse la fase juvenil, la planta adulta es capaz de florecer. Los cítricos son especies policárpicas que experimentan periodos continuos de floración, fructificación y desarrollo vegetativo. A lo largo de cada ciclo de cultivo mantienen un balance entre el desarrollo vegetativo y el desarrollo reproductivo, de forma que una parte de los meristemas se transformarán en flores, quedando el resto como la nueva brotación, con nuevas yemas, que aseguran tanto la renovación de la propia planta como el futuro de la especie (Spiegel-Roy y Goldschmidt., 1996). En los cítricos adultos de regiones subtropicales, donde las estaciones se encuentran bien definidas, la brotación se concentra en tres periodos, primavera, verano y otoño, siendo la primera la más importante, ya que en ella se asientan las flores sobre las que se generará la futura cosecha. Las otras dos brotaciones solamente producen desarrollo vegetativo.

Las yemas de los cítricos dan lugar a cinco tipos de brotes, los cuales se clasifican en función del número de hojas y/o flores (Figura 4). La distribución de la floración y la brotación en la planta ejerce un papel muy importante en la producción de los siguientes años.

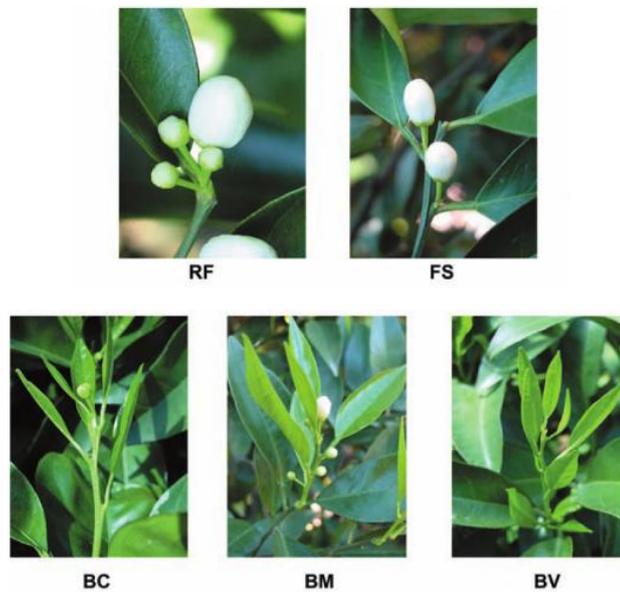


Figura 4. Tipos de brotes cítricos. RF (ramo floral), FS (flor solitaria), BC (brote campanero), BM (brote mixto) y BV (brote vegetativo) (Agustí 2003).

2. Factores que provocan la inducción de la floración en los cítricos.

2.1. Factores ambientales

Los factores ambientales que pueden inducir la floración en el naranjo dulce (*Citrus sinensis L.*) han sido relacionados con situaciones de estrés por parte de la planta. El déficit de agua y las bajas temperaturas son los agentes más conocidos.

Los resultados obtenidos por Chica y Albrigo (2013) muestran como al someter los cítricos a periodos de estrés hídrico de 45-60 días se induce la floración a través de la regulación positiva que experimenta *CiFT*. La escasez de agua provoca un aumento de la transcripción de *CiFT*, mientras que la transcripción de *API* y *LFY* se redujo. En cambio, una vez el déficit hídrico fue interrumpido con el riego, *CiFT* volvió a los parámetros iniciales previos al tratamiento. Todo lo contrario, ocurrió con *API* y *LFY*, los cuales aumentaron su expresión y los árboles florecieron.

Por otro lado, exponer a las plantas a periodos de bajas temperaturas (Guardiola et al., 1992; Nishikawa et al., 2007; Cho et al., 2017), pueden provocar la inducción de la floración. Árboles adultos de mandarina Satsuma (*Citrus unshiu Marc.*), sometidos a bajas temperaturas (15°C durante 45 días) correlacionan con un incremento de *CiFT* en el meristemo, induciendo la floración (Nishikawa et al., 2007)

2.2. Factores bióticos

Por otro lado, las situaciones de estrés que inducen la floración también pueden ser originadas por agentes bióticos. En el caso de los cítricos, uno de los principales síntomas de los ataques del virus de la *Tristeza* (CTV), es la elevada floración que experimenta el árbol, y, de hecho, la capacidad de florecer de plantas infectadas se ha utilizado experimentalmente para determinar la tolerancia a diferentes cepas del virus (Bowman et al., 2001). Esta virosis ataca directamente al tejido floemático, con lo que se interrumpe el transporte de fotoasimilados a lo largo de la planta. Esta restricción de carbohidratos y otros nutrientes podría estar relacionada con dicha floración espontánea, debido al estrés nutricional que se genera (Wada y Takeno, 2010).

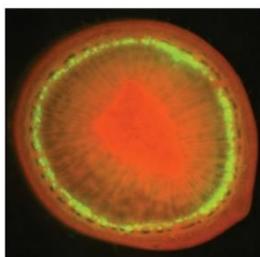


Figura 5. Localización de los virus en una rama afectada de CTV. Sección de tallo de cítrico. (Dawson et al., 2015).

2.3. La inhibición de la floración. El fruto. Factores endógenos:

En los cítricos, el efecto inhibitorio que ejerce el fruto en la formación de las flores es la principal causa de la alternancia de cosechas. El fruto ejerce este efecto inhibitorio, tanto en la brotación, como en la floración, desde el momento en que éste se encuentra cerca de su peso final, el 90% (Martinez-Fuentes et al., 2010).

Esta inhibición de la floración, por parte del fruto, se encuentra regulada endógenamente por distintos factores:

- Las hormonas podrían ejercer un papel importante. En el caso de las auxinas (*AUX*), la eliminación de la fruta provoca un descenso de la homeostasis del ácido indolacético (*AIA*) en las yemas de los cítricos (Shalom et al., 2014). Por otro lado, las giberelinas (*GAs*) se han relacionado con la inhibición de la floración a través de aplicaciones exógenas de ácido giberélico (*AG*) en el momento de reposo vegetativo (Guardiola et al., 1982), a través de su interferencia en la expresión del gen *CiFT* en las hojas (Muñoz-Fambuena et al., 2012) Sin embargo, la relación entre las giberelinas endógenas y la inhibición de la floración por efecto del fruto no está demostrada. Se desconoce el mecanismo de acción de las giberelinas en este proceso inductivo.
- Por otro lado, el gen *FLC* también ejerce un papel directo sobre la floración. En los años con rendimientos bajos (*OFF*), en el momento de la inducción, el gen *CiFT* se expresa en las hojas, transportando esa señal al ápice para que empiece la diferenciación. En cambio, en los años con rendimientos altos (*ON*), la expresión en hojas del gen *CiFT* se reduce mientras que aumenta la expresión del gen *FLC*, el cual reprime al gen inductor de la floración (Finnegan et al., 2005). Este incremento o descenso de la expresión de *FLC* está directamente relacionado con la carga de fruta en el árbol (Muñoz-Fambuena et al., 2011). Se desconoce qué señal producida por la presencia del fruto activa la expresión de *FLC* en las hojas.
- Los carbohidratos ejercen un papel directo sobre la brotación (Mason et al., 2014). La eliminación del meristemo apical, principal fuente de reclamo de carbohidratos permite que las yemas axilares incrementen su capacidad sumidero y puedan brotar. Sin embargo, la relación entre los carbohidratos y la floración no se comprende completamente, ya que no está claro si actúan para promover o inhibir el proceso, o simplemente como fuente de energía necesaria para sustentar la división celular y el desarrollo. Algunos estudios relacionan la movilización de las reservas de almidón y un aumento del transporte de carbohidratos al meristemo apical con la diferenciación floral. El aumento de sacarosa en el floema es transitorio y previo a la actividad mitótica del meristemo (Corbesier et al., 1998). También, las plantas con niveles anormales de trehalosa 6 fosfato (*T6P*), han visto alterado su tiempo de floración (Wahl et

al. 2013). La expresión de *FT* se reduce en plantas con una cantidades bajas de T6P, por lo que podría ser posible que T6P promueva la floración a través de la activación del florígeno, ya que la T6P inhibe la expresión de miRNA156 y con ello SPL es capaz de promover la inducción floral (Matsoukas et al. 2012). Este carbohidrato ha sido propuesto como una molécula de señalización del metabolismo del carbono. Otros sistemas importantes que regulan la señalización del azúcar en las plantas son las proteínas Snf1-related kinase 1 (SnRK1) y target of rapamycin (TOR). Ambas son reguladoras centrales que detectan los niveles de nutrientes y promueven o inhiben el crecimiento de forma antagónica: los niveles bajos de azúcar promueven la expresión de SnRK1 y los niveles altos de azúcar aumentan la actividad TOR. (Smeekens et al. 2010).

En los cítricos, las inflorescencias que principalmente determinan la cosecha son de tipo determinado (fruto en posición apical). Durante su crecimiento y maduración, el fruto es el principal sumidero del brote, disminuyendo el contenido en almidón de las hojas próximas respecto de brotes sin fruto e impidiendo la inducción floral (Muñoz-Fambuena et al., 2013). Del mismo modo, pero utilizando el árbol completo como sistema, en un año ON, los frutos reducen el contenido en carbohidratos de las hojas ramas y raíces, respecto de un año OFF, e impiden la floración (Golschmidt et al, 1985; Li et al., 2003). Mediante el bloqueo temporal del transporte por el floema con el rayado se incrementa la floración de esa rama, probablemente debido a un aumento del contenido en carbohidratos, pero no en presencia de frutos (Goldschmidt et al., 1985).

3. Hipótesis de trabajo y objetivos:

Como se ha expuesto anteriormente, el fruto ejerce un papel inhibitor sobre el gen *CiFT2*, encargado de transmitir la señal inductora a las yemas desde las hojas. Por ello, el fruto inhibe la floración en los años con una elevada carga de fruta, años ON, limitando la cosecha del año siguiente. Pero, tras un año de desarrollo vegetativo, sin flores, las hojas son capaces de transmitir la señal inductora *CiFT2* a las yemas, iniciando un nuevo año ON. Por otra parte, el rayado de ramas impide el transporte basípeto de carbohidratos, aumenta el contenido en carbohidratos y promueve la floración, pero no en presencia del fruto.

Por todo ello, **la hipótesis** que se plantea en este trabajo consiste en que el aislamiento de las yemas axilares respecto de la influencia del fruto y del resto de la planta promueve su inducción floral a través de un cambio del metabolismo primario.

Los **objetivos** de este Trabajo Final de Máster son:

1. Estudiar el efecto del rayado del pedúnculo (rayado apical) y de la base del brote (rayado basal) sobre el estímulo de la floración
2. Estudiar el efecto del rayado apical y basal sobre la señal inductora, determinada por la expresión del gen *CiFT2* en las hojas a lo largo del tiempo.
3. Estudiar el efecto del rayado apical y basal sobre el metabolismo primario, a partir de un análisis genético y metabólico.

II. Material y métodos

1. Material vegetal y diseño del experimento

El experimento se realizó en una explotación privada situada en la localidad de Godella, provincia de Valencia. Dicha finca está formada por dos cultivares, el naranjo dulce cv. ‘M7’ (*Citrus sinensis* L.), de recolección precoz, y el mandarino híbrido cv. “Nadorcott”, de recolección tardía. Ente ellas, se escogió la variedad que presenta un marcado problema de alternancia de cosechas, como es “Nadorcott”, injertada sobre citrange Carrizo [*Citrus sinensis* (L.) Osb. x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.]. Todos los árboles seleccionados se encontraban en óptimas condiciones sanitarias y nutricionales, con riego localizado, abonado y cultivo según la normativa de la producción integrada.

Para el experimento se seleccionaron 20 árboles adultos, separados en dos filas. De forma aleatoria, en el mes de septiembre (20/09/18), se seleccionaron brotes vegetativos del año, considerados como controles sin fruto (OFF) y brotes campaneros con fruto, considerados como controles con fruto (ON). En otros brotes campaneros se realizaron los tratamientos: rayado en la zona apical del brote, junto al fruto, (RA), en la zona basal del brote (RB), contigua a la rama, y un rayado doble, apical y basal, (RAB), con la intención de estudiar el efecto del aislamiento de las yemas sobre la influencia del fruto, sobre la influencia de la planta, y ambas. Se seleccionaron 40 brotes por tratamiento, repartidos aleatoriamente entre los 20 árboles.

Para evaluar el efecto del rayado sobre el desarrollo del fruto, se tomaron muestras de peso, diámetro, color de la pulpa y de la corteza, al inicio (17/10/18) y al final (10/01/19) del experimento. Por otro lado, se tomaron muestras de hojas cada dos semanas aproximadamente (7 muestreos), para el posterior estudio metabólico y de expresión génica (Figura 1). También se realizaron dos muestreos de brotes completos y se separaron las yemas, el floema, la corteza, pulpa y haces vasculares del fruto y las hojas, en el momento de la inducción floral (03/12/18) y de la diferenciación (12/02/19). Finalmente, se evaluó la floración y brotación en primavera (13/03/19) y se realizaron mediciones SPAD (*Konica Minolta SPAD-502Plus*) en las hojas de los tratamientos rayado doble (RAB) y control con fruto (ON).

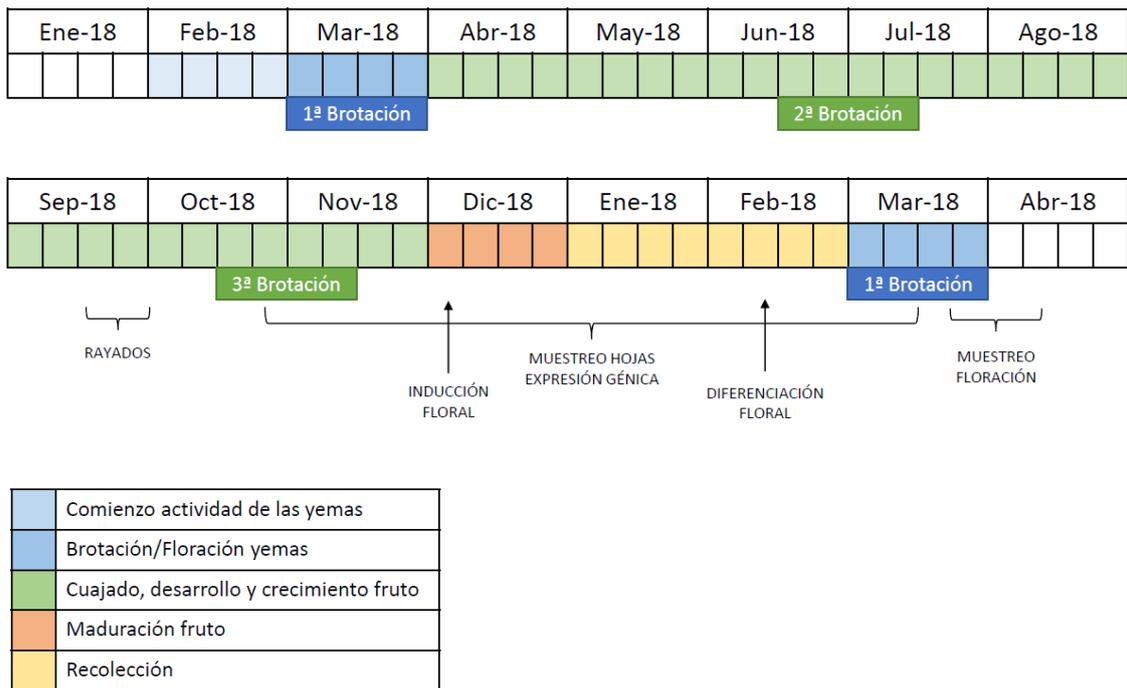


Figura 6. Calendario del ciclo vegetativo y reproductivo de la variedad "Nadorcott". Tratamientos realizados en cada momento.

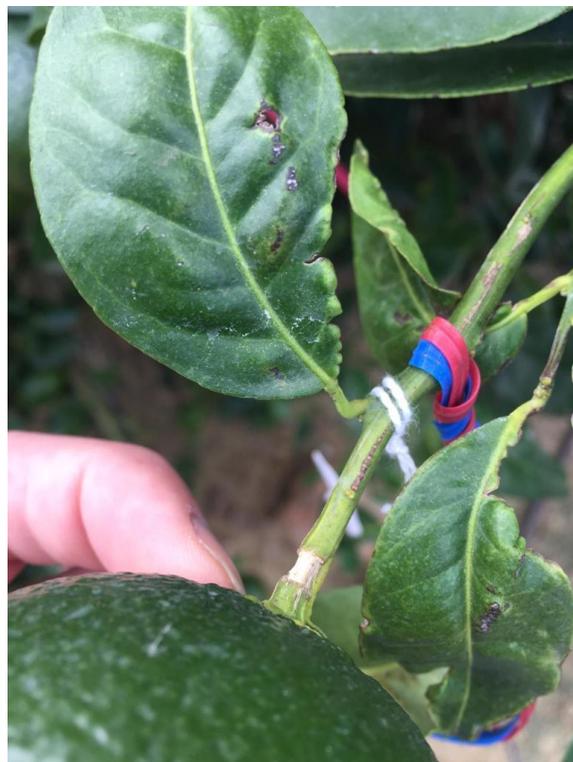


Figura 7. Rayado de la zona apical del brote campanero.

2. Metodología

2.1. Toma, procesado de muestras y mediciones de campo

Los muestreos realizados para evaluar la expresión génica de genes de interés se realizaron siempre a la misma hora, dada la cinética circadiana que presentan algunos de ellos. En cada muestreo de hojas se tomaron 4 de ellas por tratamiento, de brotes diferentes, manteniéndolas debidamente refrigeradas hasta su procesado en el laboratorio, donde se conservaron a -80°C . Finalmente, las muestras se molieron a polvo fino, utilizando nitrógeno líquido, para la posterior extracción de mRNA. En los muestreos de brote completo, se tomaron 8 brotes por tratamiento, que se procesaron de la misma forma que en el caso anterior durante conservación, triturado y extracción del mRNA.

Para evaluar el desarrollo del fruto se recolectaron 15 frutos por tratamiento que se procesaron en el laboratorio. Se determinó el peso individual (g) de cada fruto con una balanza de precisión ($\pm 0,001\text{g}$), su diámetro (mm) con un pie de rey (Mitutoyo, Japón) y color interno y externo con el colorímetro (Medidor de Colorimetría CR-400), expresando los resultados según la relación a/b.

Finalmente, para evaluar la floración y la brotación en primavera, se muestrearon alrededor de 15 brotes por tratamiento. En el laboratorio se evaluó el tipo de brotación y floración en las primeras cinco yemas apicales de cada uno de los tratamientos, clasificándolos en función del número de hojas y/o flores (Agustí, 2010).

2.2. Expresión génica

2.2.1. Extracción de mRNA

La extracción de mRNA, consiste en la eliminación de todos aquellos compuestos como polifenoles, polisacáridos, metabolitos secundarios, proteínas y otros contaminantes como el fenol y sales inorgánicas, que actúan como barreras físicas y químicas sobre el mRNA. Todo ello, es necesario para poder realizar la RT-qPCR (Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa).

El protocolo de extracción se divide en dos partes, con una duración de dos días. La primera parte consiste en pesar 0.5 g de cada muestra de hojas que se transfiere a un tubo de 15 ml. Posteriormente, se introduce en el tubo 2ml de TCES (0.2 Tris ph=8 + 0.2 M NaCl + 50mM EDTA + 2% SDS), además de 2ml de fenol ácido y 40 μ l β -mercaptoetanol. Posteriormente, se homogeniza la muestra en el vórtex durante 1 minuto y se dejan los tubos 5 minutos en el baño a 50°C, agitando manualmente una vez por minuto. Después, se centrifuga a 4000 r.p.m. durante 30 minutos (centrifuga grande Ependorf). Una vez terminado el tiempo, se pasa el sobrenadante a otro tubo.

El siguiente paso consiste añadir 1 volumen de cloroformo alcohol isoamílico (24:1). Se vuelve a pasar por el vórtex y se centrifuga otros 30 minutos a 4000 r.p.m. Una vez separadas las fases, se separa la fase superior a uno o varios microtubos de 1,5 ml y se vuelve a centrifugar, en este caso a 10000 r.p.m. durante 15 minutos en microcentrífuga. Con este paso se acaban de eliminar las impurezas. Una vez finalizada la centrifugación, se pasa el sobrenadante a otro microtubo de 1,5 ml y se le añade ½ de volumen de LiCl 6M (DEPC), dejándose precipitar a -20°C toda la noche.

Al inicio del segundo día, se centrifuga a 10000 r.p.m. unos 30 minutos, en la microcentrífuga, para obtener el precipitado. Este se lava con 200 μ l EtOH 70% (debe estar a -20°C). El tubo se centrifuga 5 minutos y se elimina el sobrenadante. Se repite el proceso hasta que el pellet quede limpio. Posteriormente, se deja secar al aire unos 20 minutos y se vuelve a suspender con 100 μ l de agua.

Finalmente, se pasa a la fase de purificación por columnas, empleando para ello el kit RNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. También, se cuantifico la calidad y cantidad del mRNA libre obtenido. Para ello, se utilizó un equipo NanoDrop ND-100 (NanoDrop Technologies).

2.2.2. Elección de genes de interés y sus cebadores

Uno de los objetivos del estudio es cuantificar cómo afectan los tratamientos a la inducción floral, determinada por la expresión del gen *CiFT2*, así como al metabolismo primario de la planta. En particular, se consideró importante determinar si el rayado induce un estado de estrés nutricional. Para ello, se seleccionó el gen *SnRK1* relacionado con la señalización de déficit de carbohidratos. Por otra parte, se decidió determinar si el rayado activaba la fotosíntesis en las hojas próximas (Rivas et al.,

2007), con el fin de paliar la deficiencia nutricional. Para ello se seleccionó el gen *RbcS* (subunidad pequeña del enzima RuBisCO). Este gen se localiza en el núcleo, a diferencia del *RbcL* (subunidad grande del enzima RuBisCO) que se encuentra en el cloroplasto. La expresión de gen *RbcS* se activa cuando hay una demanda para incrementar la fotosíntesis (Berry et al., 2013). Finalmente, con el fin de relacionar el estrés con la inducción floral se determinó la expresión del enzima ACC-oxidasa como medida indirecta de la síntesis de etileno. Los cebadores se eligieron a partir de los estudios realizados por Distefano et al., 2009; Mesejo et al., 2019 y Muñoz-Fambuena 2019 (Tabla 2).

Tabla 2. Cebadores elegidos para el análisis de expresión génica.

Gen	Descripción	5'-3' Forward primer	5'-3' Reverse primer
<i>CiFT2</i>	Inductor de la floración	TCTAGCAGGGACAGAGATCCT	AGAACATCACCAACAACGCG
<i>ACO</i>	ACC-oxidasa (Síntesis de etileno)	TGGAGCACAGAGTGGTTTCTC	GGATAGATCACAGCATCACTTCC
<i>SnRK1</i>	Serina, treonina quinasa	TGAATGATCACCGCCGTTGA	TGGGAAATGCAAACGGGAGA
<i>RbcS</i>	Rubisco	CACCAACTGGCTTGAAGAAG	CACCCATCCTTTCTCCTCAACT
<i>β-actin</i>	Gen de referencia (housekeeper)	GTCTGGTCCATCCATTGTCCA	GTCTGGTCCATCCATTGTCCA

2.2.3. Rt-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 μ l 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 (alineamiento) 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 μ M. 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.

2.3. Análisis metabólico

Se tomaron 3 réplicas por tratamiento de hojas y del floema, en el momento de la inducción de la floración (03/12/18). Las muestras fueron molidas con nitrógeno líquido. Se emplearon 100 ± 5 mg de cada réplica para medir carbohidratos, aminoácidos y poliaminas.

Se midieron un total de 11 metabolitos primarios, que son aquellos que están directamente implicados en el crecimiento, desarrollo y reproducción del organismo, de las siguientes clases: azúcares (fructosa, glucosa, glucosa-6P, sacarosa, maltosa y trehalosa), aminoácidos (triptófano, glutamina y metionina), y poliaminas (espermidina y putrescina). La cuantificación de metabolitos se realizó en el servicio de metabolómica del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (Ana Espinosa y Teresa Caballero). El protocolo empleado consiste en el análisis de compuestos volátiles (GC-MS) de los tejidos vegetales mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. En este análisis se realiza la extracción de la muestra y la derivatización, así como un análisis dirigido, que incluye la identificación y cuantificación relativa de los 11 metabolitos anteriormente mencionados, que están disponibles en la base de datos del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP).

2.4. Análisis estadístico

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

III. Resultados y discusión

1. Influencia del rayado sobre la brotación y floración de las yemas axilares cercanas al fruto.

1.1. Comportamiento reproductivo de la variedad Nadorcott. Establecimiento del modelo experimental.

La diferencia de producción entre los años ON y OFF en el mandarino cv. 'Nadorcott' es muy acentuada. Este cultivar presenta una época de recolección tardía, con lo que la presencia del fruto en el árbol se solapa con los periodos de inducción y diferenciación floral. Las ramas del árbol son independientes respecto de la inhibición de la floración. Así, el estudio de brotes vegetativos (C.OFF) y brotes fructíferos (C.ON) en los mismos árboles muestra cómo el fruto es capaz de anular la floración de las yemas adyacentes, mientras que las yemas de los brotes sin fruto son capaces de florecer (Figura 8). Los resultados obtenidos con el cv. 'Nadorcott' son los esperados y comparables con los de otros estudios anteriores realizados con otras variedades y especies, que responsabilizan al fruto de la inhibición de la floración.

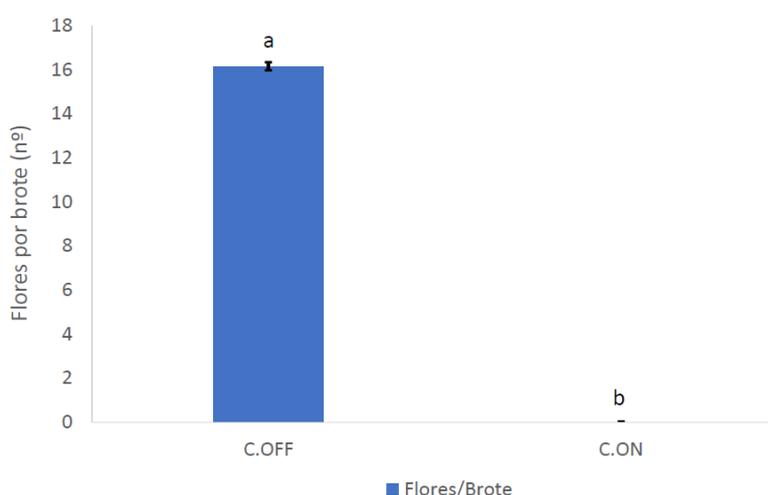


Figura 8. Número de flores en brotes sin fruto (OFF) y brotes con fruto (ON). Cada valor es la media de 15 brotes.

Así, en estudios realizados sobre naranjo dulce cv. 'Valencia', también de recolección tardía, la eliminación de frutos de forma temprana afectó directamente a la floración del año siguiente pasando de 6,9 flores/nudo a 43 flores/nudo (Martínez-Fuentes et al, 2010). Por tanto, la presencia del fruto condiciona la inducción y diferenciación de las yemas a flor, y lo hace, según Muñoz-Fambuena et al (2011; 2012), alterando la expresión de los genes encargados de la inducción de la floración en las hojas (*CiFT2*) y la diferenciación en las yemas (*CiLFY* y *CiAPI*).

En árboles de 'Nadorcott' con un número elevado de frutos (>150 kg árbol⁻¹) la inhibición de la floración es prácticamente total, iniciando así los ciclos de alternancia (Martínez-Fuentes et al., 2013). Para solucionar el problema, se han estudiado distintas opciones, como el aclareo de frutos o los tratamientos con reguladores del crecimiento o rayado de ramas. En el primer caso, se plantearon aclareos a distintas intensidades, 0, 33, 66, 100%, los cuales mejoraron la floración del año siguiente, pero los árboles recuperan el comportamiento alternante de modo natural (Muñoz-Fambuena et al., 2013).

Por otro lado, los tratamientos con retardadores del crecimiento, paclobutrazol (PBZ) en el momento de la inducción floral, solamente mejoraron la floración en aquellos árboles con un número reducido de frutos, que, de modo natural, ya son capaces de expresar los genes *CiFT2* y *LFY*, encargados de la inducción y diferenciación floral respectivamente. En cambio, en aquellos árboles con una elevada cosecha, los tratamientos hormonales no consiguen estimular la floración (Martínez-Fuentes et al., 2013). De un modo similar, el rayado de ramas estimula la floración, pero no en árboles con una elevada carga de frutos (Goldschmidt et al., 1985; Agustí et al., 1992).

Por tanto, queda patente que el fruto ejerce un papel determinante en la floración, pero se desconoce el mecanismo mediante el cual reprime el proceso y, por ello, las técnicas agronómicas que pretenden resolver la alternancia estimulando la floración son ineficaces.

El modelo experimental para estudiar el mecanismo de inhibición de la floración por efecto del fruto se basó en 1) la técnica del rayado de ramas y 2) la independencia de ramas respecto de la floración. Como el rayado de ramas no es efectivo en árboles con muchos frutos se planteó estudiar el efecto del rayado apical, junto al fruto, y su combinación con el rayado basal (en la base del brote) con la intención de aislar completamente las yemas tanto de la influencia del fruto como del resto de la planta para estimular la floración. Además, todos los tratamientos se hicieron en los todos los árboles para independizar el efecto del tratamiento del estado nutricional del árbol.

1.2. Respuesta de las yemas al rayado.

1.2.1. Efecto sobre la brotación y la floración

La respuesta de los tratamientos, realizados el 20/9, no se observó hasta la primavera siguiente. Al cuantificar la brotación total del brote campanero, se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 9A). Así, los rayados simples, bien por la zona apical (RA) o bien por la zona basal (RB), presentaron una brotación significativamente mayor (3,5 brotes vegetativos brote⁻¹) que el brote control con fruto (1,9 brotes vegetativos brote⁻¹). En cambio, el aislamiento total de las yemas axilares respecto a la incidencia del fruto y del resto de la planta (RAB), redujo la brotación a valores prácticamente nulos. Por otro lado, al evaluar la brotación por nudo (Figura 9B), los tratamientos RA y RB la incrementaron ligeramente en los nudos 2, 3 y 4 respecto de los brotes control con fruto.

Los resultados obtenidos con el rayado apical y basal son los esperados y comparables a estudios anteriores (Martínez-Montagud, 2015; Alcántara-Quílez, 2018). El rayado modifica el balance hormonal y nutricional en la rama (Mason et al., 2014), lo que permite estimular la brotación (Agustí et al. 1992). En el caso del RA, el aumento de la brotación también se relaciona con la pérdida de capacidad sumidero y dominancia apical por parte del fruto, debido a la interrupción del transporte por el floema. En el caso del RB el brote no queda aislado de la presencia del fruto, pero aun así las yemas son capaces de brotar en primavera, tras la recolección del fruto.

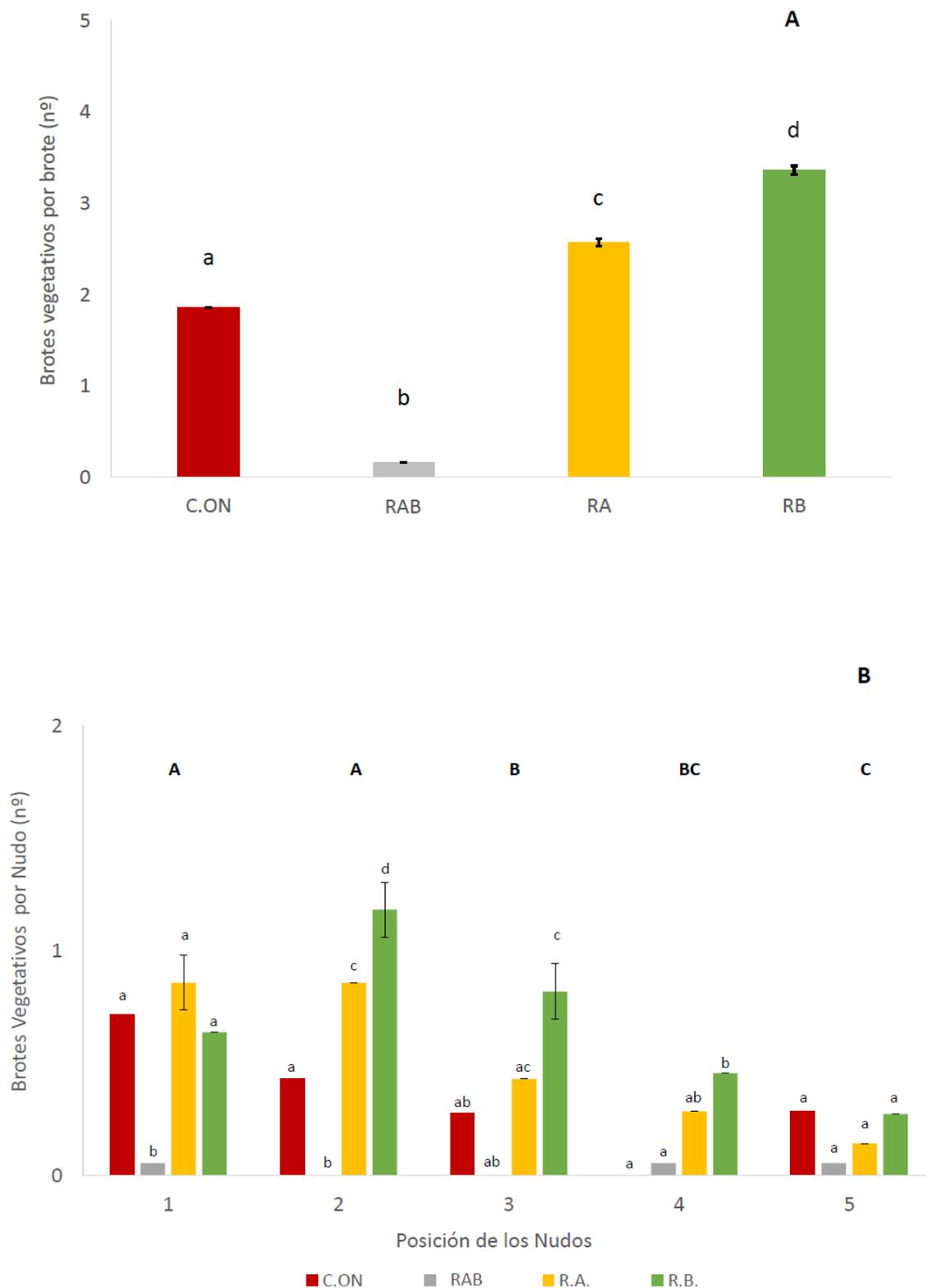


Figura 9. Efecto del rayado junto al fruto (apical, RA), en la base del brote (RB) o ambos (RAB) sobre la brotación de primavera de brotes campaneros del año anterior. A: Brotación promedio por brote. B: Brotación promedio por nudo. Cada valor representa el promedio de 15 brotes campaneros por tratamiento. Las barras verticales indican el error estándar. Letras minúsculas diferentes muestran diferencias significativas entre tratamientos. Letras mayúsculas muestran diferencias significativas entre los nudos.

Pero el resultado más sorprendente fue el obtenido con el rayado doble realizado en el mes de septiembre. Todas las yemas axilares del brote se transformaron en yemas reproductivas, aún en presencia del fruto, (Figura 10A y 10B) y ninguna fue capaz de desarrollar brotación vegetativa (Figura 9B). En particular, el tratamiento doble rayado (RAB), alcanzó un promedio de 11-12 flores por brote (Figura 10A).

Estudios previos demostraron que al reiniciar el crecimiento vegetativo de un meristemo axilar en un brote con fruto antes del periodo inductivo, mediante un anillado en verano, reactiva la capacidad de florecer del nuevo brote (Alcántara-Quílez, 2018). Pero, en este caso, el rayado se realizó en otoño, de modo que la nueva brotación no llegó a desarrollarse hasta la primavera, es decir, después del momento de inducción floral, ya que las temperaturas de la zona no lo permitieron. Es por ello que, por una parte no se encontró floración en los tratamientos que solamente estimularon la brotación vegetativa, rayado apical RA y rayado basal RB (Figuras 9A y 10A), y, por otra, la floración producida a través del doble rayado ha sido a través de otro mecanismo endógeno.

La evaluación de la floración para cada nudo muestra diferencias significativas entre el tratamiento RAB (con un promedio de 2 flores por nudo) y el resto (sin floración), pero no entre los nudos (Figura 10B).

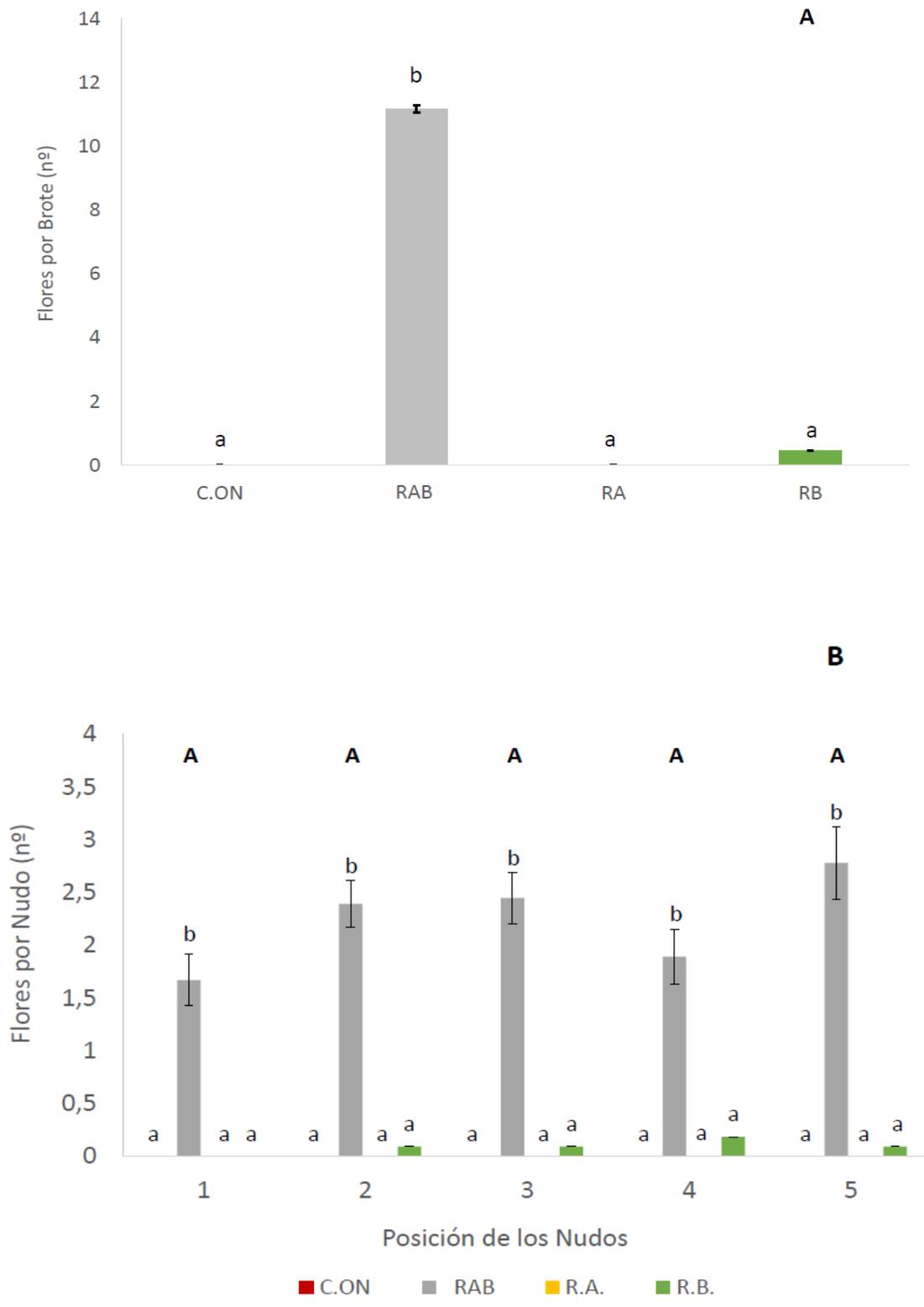


Figura 10. Efecto del rayado junto al fruto (apical, RA), en la base del brote (RB) o ambos (RAB) sobre la floración de brotes campaneros del año anterior. A: Floração promedio por brote. B: Floração promedio por nudo. Cada valor representa el promedio de 15 brotes campaneros por tratamiento. Las barras verticales indican el error estándar. Letras minúsculas diferentes muestran diferencias significativas entre tratamientos. Letras mayúsculas muestran diferencias significativas entre los nudos.

La evaluación de la distribución de la floración permite entender mejor el efecto del tratamiento (Tabla-3). Al comparar la floración que experimenta el mandarino ‘Nadorcott’ de forma natural (brotes OFF) y la producida por el tratamiento de rayado doble (RABS) se observa un cambio en la distribución por tipo de brote. En el rayado doble se observó un incremento de las flores e inflorescencias sin hojas del 23,11% y 9,85%, respectivamente, y un descenso considerable del porcentaje de brotes mixtos, -31,24%. En el caso de los brotes campaneros la variación fue menor (Tabla 3).

Tabla 3. Comparación de la distribución de la floración entre brotes OFF y el tratamiento de rayado apical y basal (RAB), evaluada en la primavera de 2019. Tipos de brotes florales; (S) flor solitaria, (C) brote campanero, (I) inflorescencia y (M) brote mixto. En cada tratamiento se evaluó un total de 15 brotes.

	Sin hojas				Con hojas			
	S		I		C		M	
	RABS	C.OFF	RABS	C.OFF	RABS	C.OFF	RABS	C.OFF
nº Flores	101	57	60	42	9	13	31	98
%	50,25%	27,14%	29,85%	20,00%	4,48%	6,19%	15,42%	46,67%
RABS - C.OFF	23,11%		9,85%		-1,71%		-31,24%	

En resumen, el aislamiento de las yemas axilares tanto de la influencia del fruto, como del resto de la planta, de forma simultánea a través de la interrupción del transporte floemático consiguió inducir la floración sin la necesidad de reiniciar el desarrollo vegetativo, aún en presencia del fruto. El mecanismo por el cual esto sucede es desconocido, por lo que se estudió la expresión del gen *CiFT2* en las hojas del brote RAB en comparación con las del brote control que no florece (ON) y las del brote control que sí florece (OFF).

2. Expresión del gen *CiFT2* en hojas durante el periodo de inducción floral. Efecto del doble rayado (RABS).

En el clima mediterráneo, la inducción floral sucede a partir del mes de noviembre promovida por el frío. En esta época el gen *CiFT2* inicia su expresión en las hojas. Según Nishikawa et al. (2007) y sus estudios realizados en laboratorio con el mandarino Satsuma, son necesarios 1,5 meses a 15 °C para que la planta culmine el proceso inductivo, lo que sugiere que el proceso es cuantitativo (duración e intensidad del frío). En las condiciones ambientales de Godolleta durante el experimento, la acumulación de horas frío (horas por debajo de 7,2 °C) se inició 40 días después del tratamiento (finales de octubre), cuando la temperatura mínima se mantuvo consistentemente por debajo de 15 °C (Figura 11A). A mediados de diciembre (100 días después del tratamiento) la acumulación de horas frío experimentó un aumento lineal que se mantuvo hasta el final del experimento.

Los brotes sin fruto (C. OFF) respondieron de modo natural al frío incrementando la expresión relativa del gen *CiFT2* a partir de los 100 días después del tratamiento, y alcanzaron un nivel 15 veces superior que los brotes con fruto (ON) 130 días después del tratamiento, como muestran otros estudios (Muñoz-Fambuena et al., 2011) (Figura 11B y 11C).

Por otro lado, el doble rayado (RAB) provocó una sobreexpresión del gen *CiFT2* en las hojas adultas, llegando a multiplicar x250 su valor relativo respecto de los brotes control con fruto (ON). Además, y más importante aún, el incremento de la expresión se adelantó en más de 50 días al C.OFF, y sucedió antes de que se dieran las condiciones óptimas de baja temperatura (Figura 11A). Así, ya en el primer muestreo, a los 49 días después del tratamiento, la expresión relativa de *CiFT2* en el rayado doble (RAB) ya mostró diferencias estadísticamente significativas respecto de los brotes ON y OFF, y alcanzando el valor final que lograba el C.OFF al final del ciclo (x14).

Este resultado indica que el tratamiento RAB indujo la floración de modo independiente a las condiciones ambientales y, probablemente, a través de señales endógenas, lo que constituye una nueva ruta de inducción floral en los cítricos. El estrés nutricional ya ha sido propuesto como una vía de inducción de la floración en plantas herbáceas (Wada y Takeno, 2010).

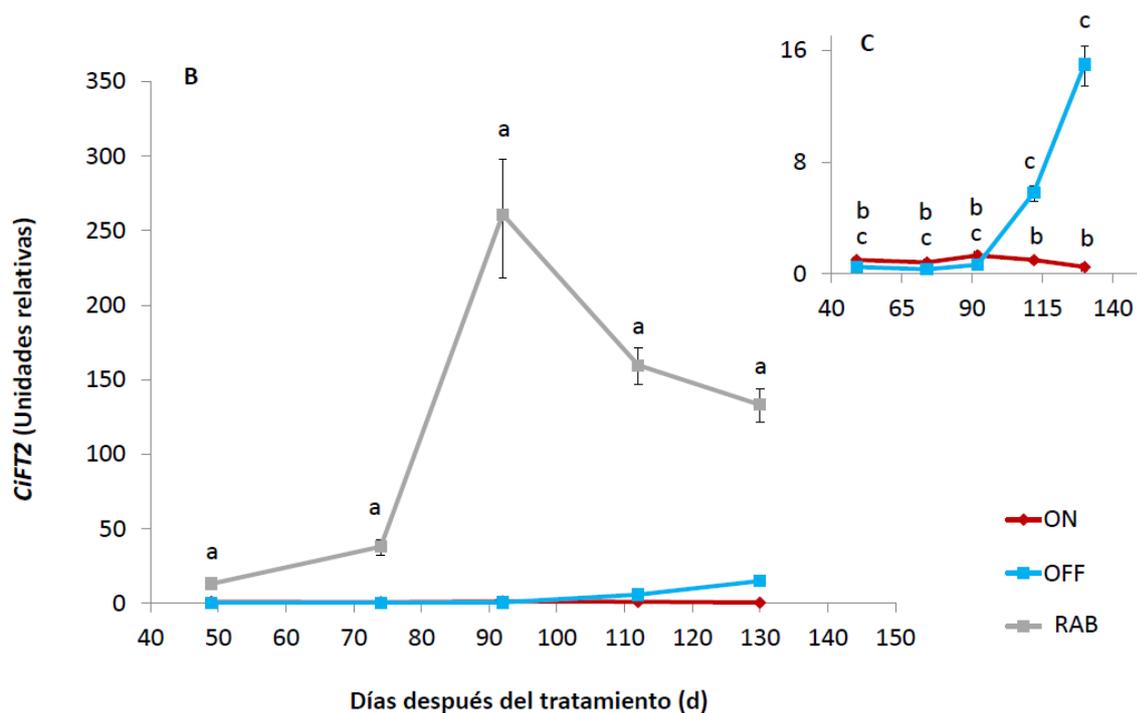
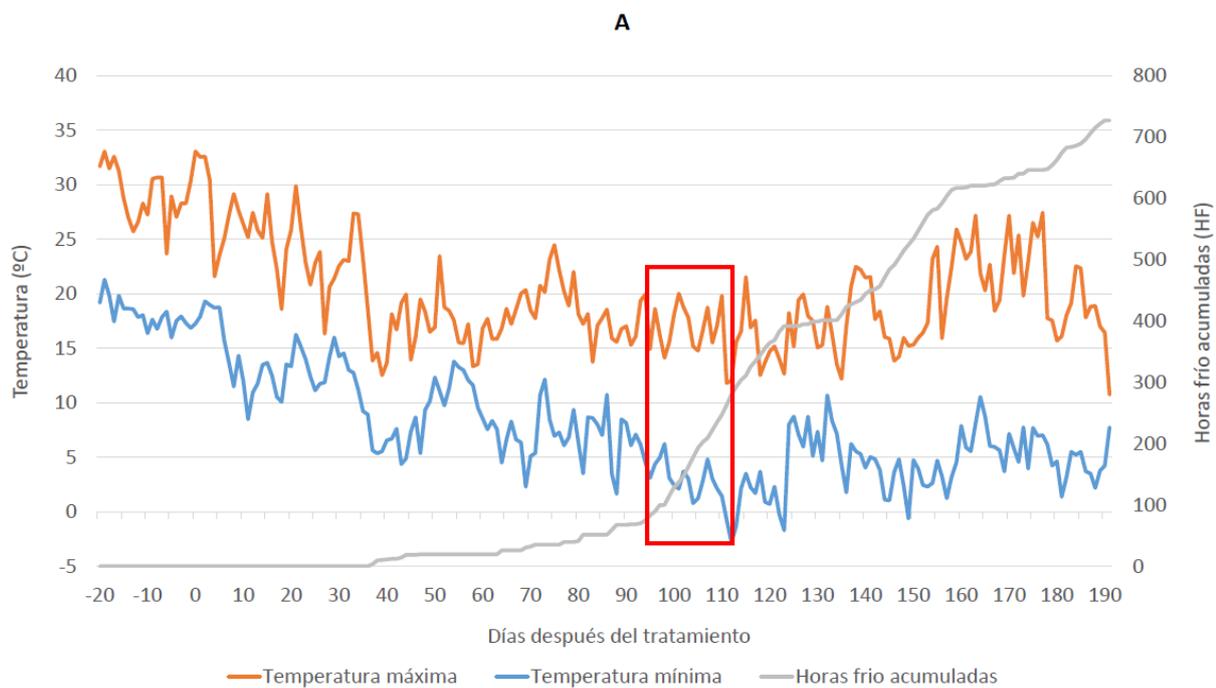


Figura 11. (A); Evolución de la temperatura mínima y máxima del día y las horas frío (<math><7,2^{\circ}\text{C}</math>) durante el experimento. (B); Expresión relativa del gen CiFT2 en hojas adultas. Cada valor es la media de la expresión de 4 hojas de cada muestra y fecha. (RAB) rayado doble, (C. ON) control con fruto y (C. OFF) control sin fruto. (C); Ampliación de la escala para los tratamientos (C. ON) control con fruto y (C. OFF) control sin fruto. Letras diferentes muestran diferencias significativas.

3. Efecto del doble rayado (RABS) sobre el estado nutricional y metabólico del brote.

Por todo ello, para comprender mejor el mecanismo endógeno por el cual el doble rayado (RAB) influye en la sobreexpresión de *CiFT2* de forma prematura, se realizó un estudio metabolómico y de expresión génica en el periodo de inducción floral, 74 días después del tratamiento (3/12), cuando la expresión relativa del tratamiento RAB era 38 veces mayor que la de los controles con fruto (0,83) y sin fruto (0,33) (Figura 11B). También, se evaluó el efecto del rayado doble sobre el desarrollo y la coloración final del fruto.

3.1. *Efecto sobre el desarrollo del fruto.*

La interrupción del transporte de fotoasimilados afectó de forma directa al desarrollo del fruto, deteniéndolo, ya que los carbohidratos producidos en las hojas no eran capaces de llegar a éste (Gambetta et al., 2012). El tamaño del fruto de los brotes con doble rayado (RAB) no se modificó entre septiembre y enero (momento de la recolección), como era de esperar, mientras que el fruto control continuó su desarrollo. Así, en el momento de la recolección los frutos del tratamiento RAB presentaron una reducción del diámetro del 15,5% respecto del fruto control (C. ON), y una reducción del peso del 33,6% (Figura 12).

El rayado doble también retrasó la maduración del fruto de modo que la mayoría de los frutos no fueron capaces de completar el cambio de color del exocarpo, y el 87% permanecieron verdes ($a/b < 0$; Figura 12C). Por otro lado, en el caso del endocarpo, aún presentando diferencias significativas, sí que fue capaz de cambiar de color. Teniendo el exocarpo verde, el endocarpo adquirió una tonalidad anaranjada ($a/b > 0$; Figura 12D), lo que sugiere que el fruto siguió manteniendo actividad metabólica que, por otra parte, impidió su abscisión.

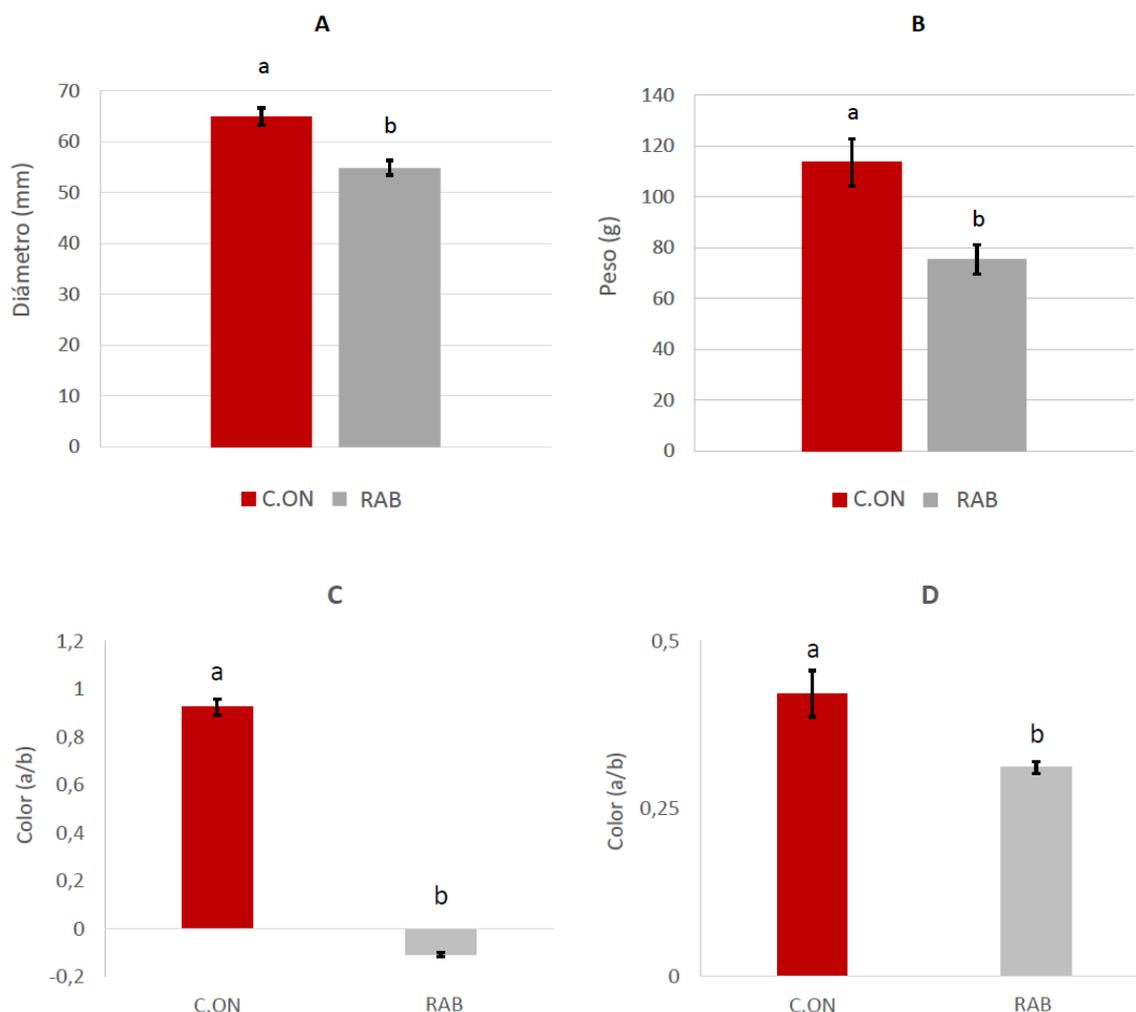


Figura 12. Efecto del rayado apical y basal (RAB) de brotes campaneros sobre el crecimiento y maduración del fruto. A: diámetro; B: peso; C: color del exocarpo; D: color de la pulpa. Cada valor es el promedio de 15 frutos por tratamiento, evaluados en el momento de la recolección. Letras distintas indican diferencias significativas.

Estudios realizados por Gambetta et al. (2012) establecieron que el efecto del rayado sobre el cambio de color y el desarrollo del fruto era causa de una menor acumulación de sacarosa y a una mayor acumulación de giberelinas y nitrógeno. Por ello, el fruto no es capaz de madurar adecuadamente, ya que este proceso se inicia con la reducción de la concentración de las giberelinas activas en el flavedo, que están involucradas en la regulación de los azúcares, la acumulación de ABA y en la reducción de la concentración de N (Iglesias et al., 2002).

3.2. *Cambios en el metabolismo primario del brote debido al doble rayado (RAB).*

3.2.1. *Cambios en el contenido en aminoácidos, poliaminas y rutas metabólicas relacionadas.*

Los aminoácidos son las unidades estructurales de las proteínas y elementos esenciales de las enzimas que catalizan la síntesis de azúcares y otros compuestos en los órganos de la planta. Estos ejercen un papel vital en el metabolismo de los seres vivos interviniendo en todas las etapas del desarrollo (Manresa., 1983).

Entre los aminoácidos analizados en las hojas del brote, la metionina (Figura 13A) y la glutamina (Figura 13B) no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos, aunque en el caso de la metionina la concentración relativa se redujo un 25% por efecto del rayado. El triptófano (Figura 13C), presentó diferencias significativas entre los tratamientos que florecen y el brote con fruto que no llega a florecer. El triptófano, entre otras funciones, es la molécula precursora de la síntesis de AIA (auxinas). Estas dos moléculas guardan una relación inversa (Allen y Baker, 1980), de modo que niveles elevados de triptófano indican una menor síntesis de AIA. La concentración de AIA en el brote correlacionó con el la concentración de triptófano (datos no mostrados).

Por otro lado, la poliamina más abundante en los cítricos, la putrescina, sí que presentó diferencias significativas, de modo que su concentración relativa fue 20 veces superior en el brote sin fruto (C. OFF) que en los demás tratamientos (Figura 13D). Su relación con el estímulo de la floración provocado por el doble rayado, por tanto, no parece relevante al no encontrarse diferencias significativas entre el control con fruto (C. ON) y el rayado (RAB). La relación entre el contenido en putrescina y la inducción de la floración por efecto del frío fue estudiada en el naranjo dulce, aunque no se obtuvo una conclusión consistente (Ali y Lovatt, 1995). No obstante, en algunas especies como *Sinapis alba L.*, la putrescina ha sido relacionada con la floración (Havelange et al., 1996). Por otra parte, en los análisis metabolómicos realizados, no se detectó la espermidina (datos no mostrados).

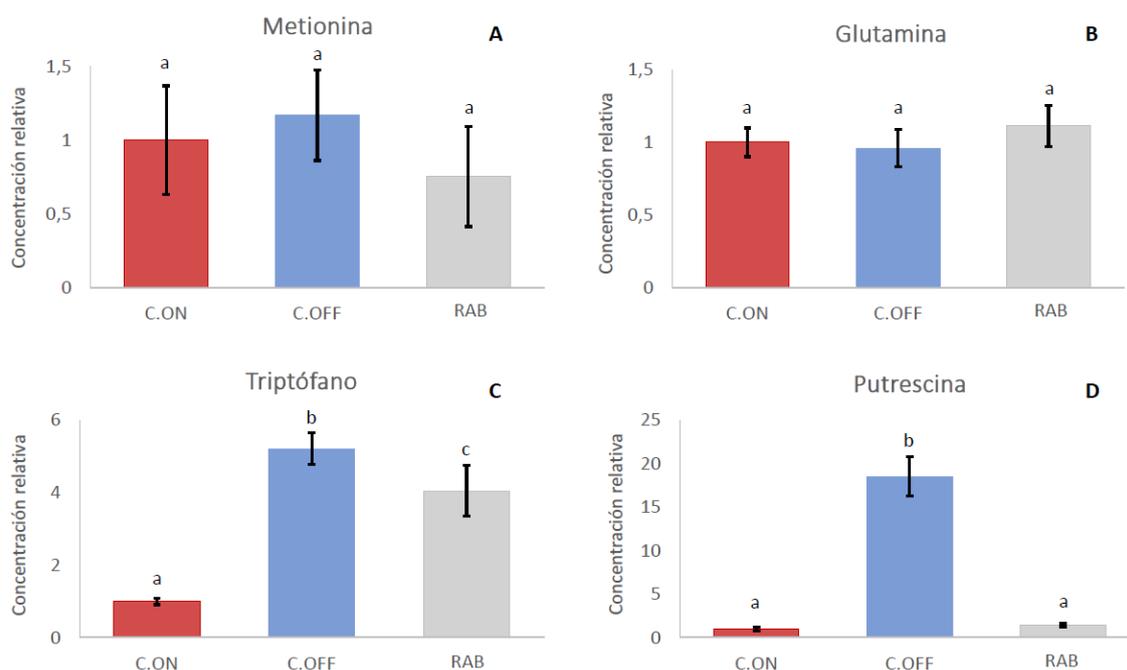


Figura 13. Concentración relativa de aminoácidos y poliaminas en hojas de brotes campaneros con fruto (C.ON) y sin fruto (C.OFF), y con fruto y rayados en el ápice y la base (RAB). Cada valor es la media de tres repeticiones biológicas. Letras distintas indican diferencias significativas. (A) Metionina, (B) Glutamina, (C) Putrescina y (D) Triptófano. Análisis realizado a los 74 días del rayado apical y basal (RAB).

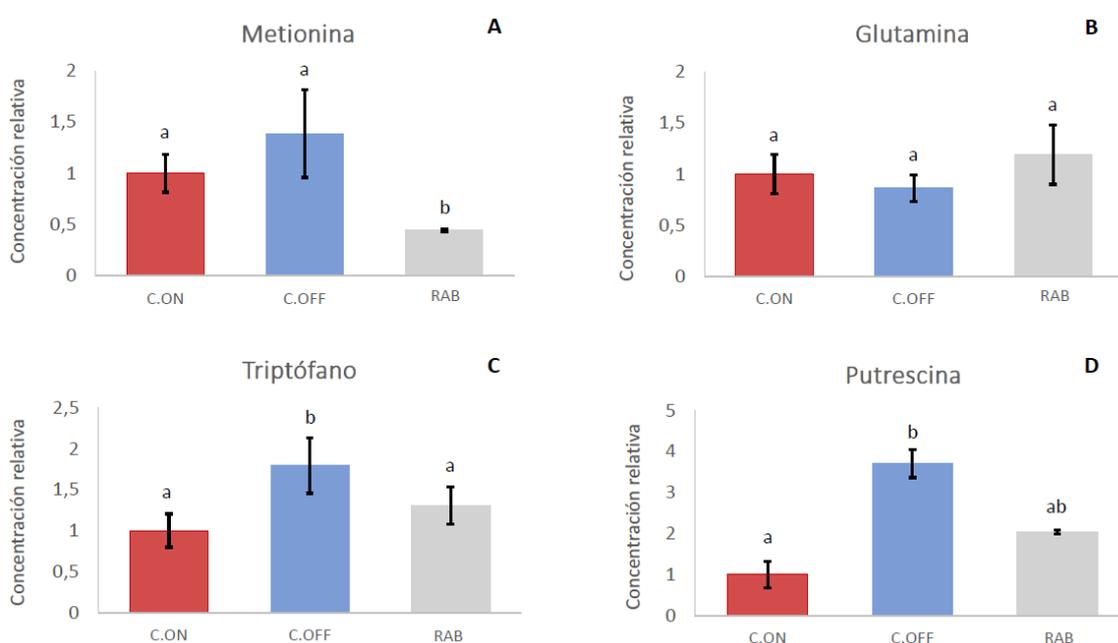


Figura 14. Concentración relativa de aminoácidos y poliaminas en el floema de brotes campaneros con fruto (C.ON) y sin fruto (C.OFF), y con fruto y rayados en el ápice y la base (RAB). Cada valor es la media de tres repeticiones biológicas. Letras distintas indican diferencias significativas. (A) Metionina, (B) Glutamina, (C) Putrescina y (D) Triptófano. Análisis realizado a los 74 días del rayado apical y basal (RAB).

Los aminoácidos del floema mostraron un comportamiento similar al de las hojas (Figura 14), a excepción de la metionina que sí alcanzó la significación estadística. Así, el rayado doble (RAB) redujo significativamente la concentración relativa de metionina un 70% (Figura 14A). Este aminoácido está estrechamente ligado a la biosíntesis del etileno y el Ciclo de Yang (Wang et al., 2002; Buchanan et al., 2015). Este ciclo se inicia con la conversión de la metionina a S-Adenosil-L-metionina (SAM). En el siguiente paso, la enzima ACC sintasa convierte la SAM a ACC, que por acción del enzima ACC oxidasa (ACO) se sintetiza etileno (C₂H₄).

Las hojas del tratamiento RAB mostraron una reducción del contenido en clorofila (determinada por las unidades SPAD) respecto de las hojas de brotes con fruto (Figura 15), y una mayor síntesis de etileno (determinada por la expresión relativa de la ACO) que las hojas de brotes sin fruto (Figura 16), lo que podría estar relacionado con el estrés inducido por el rayado. Sin embargo, las hojas de los brotes con fruto mostraron la misma expresión de ACO que las hojas de brotes RAB, descartando cualquier relación entre el etileno y la inducción de la floración.

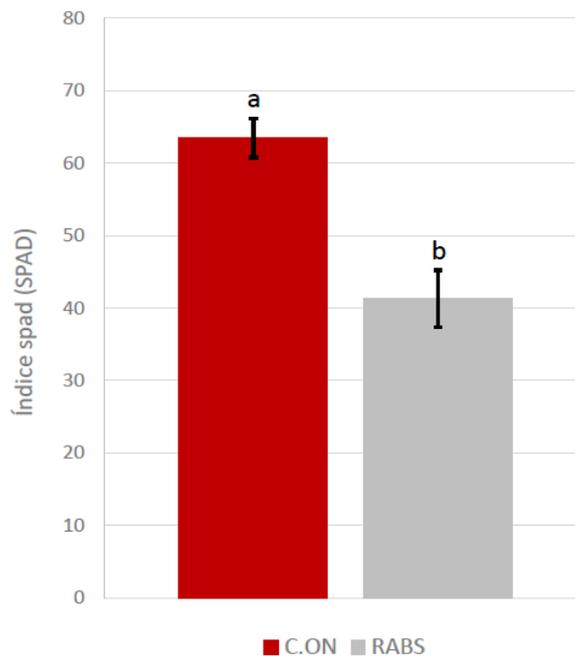


Figura 15. Efecto del rayado apical y basal sobre índice SPAD de las hojas, evaluado al final del periodo inductivo (13/03/19). Se evaluaron unos 15 brotes por tratamiento. Letras diferentes muestran diferencias significativas.

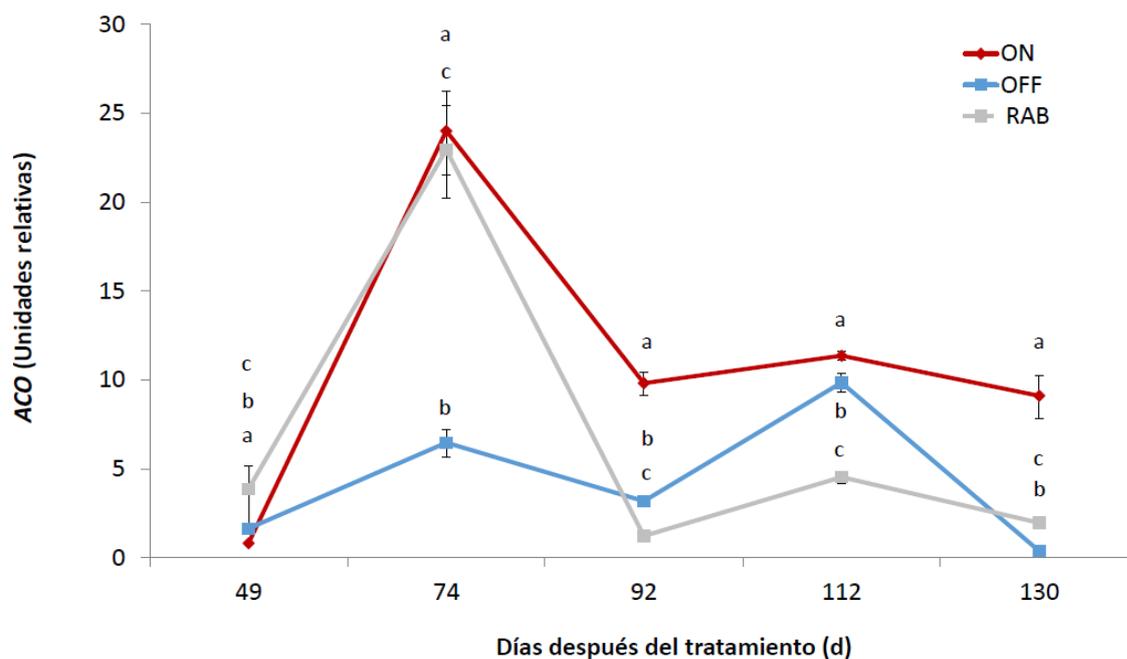


Figura 16. Expresión relativa del gen ACO en hojas adultas. Cada valor es la media de la expresión de 4 hojas de cada muestra y fecha. (RAB) rayado doble, (ON) control con fruto y (OFF) control sin fruto.

3.2.2. Cambios en el contenido en carbohidratos y rutas metabólicas relacionadas

La concentración relativa de carbohidratos en las hojas se modificó significativamente por efecto del rayado doble (RAB). Así, el nivel de sacarosa, fructosa y glucosa en las hojas de los brotes RAB fue significativamente menor que la de los dos controles (C.ON y C.OFF), mostrando una reducción relativa del 20%, 30% y 40% respectivamente (Figura 17 A,B,C). La concentración de trehalosa-6-fosfato (Figura 17D) no mostró diferencias significativas, pese a reducirse un 20% respecto del control con fruto. En las hojas de los brotes con fruto no se detectó la maltosa, producto de la hidrólisis del almidón.

La menor concentración de azúcares activó el sistema de señalización de deficiencia nutricional, determinado por la expresión del gen de la quinasa SNRK1, que actúa conjuntamente con otra quinasa (TOR). Ambas ejercen un papel regulador, detectando los niveles de nutrientes, promoviendo o inhibiendo el crecimiento de forma antagónica. Los niveles bajos de azúcar promueven la expresión de SNRK1 y los niveles altos regulan la actividad de TOR (Deprost et al., 2007).

Al evaluar la expresión de SNRK1 74 días después del rayado, antes de la activación de la inducción en el control OFF por efecto del frío, se encontraron diferencias significativas entre todos los tratamientos. Los brotes sin fruto (C. OFF) presentaron valores bajos de expresión de SNRK1 respecto a los brotes con fruto (C. ON) (Figura 18), correlacionando con los mayores niveles de sacarosa, fructosa y maltosa (Figura 17). Por otro lado, la expresión relativa del rayado doble (RAB) aumentó significativamente, multiplicando x3 el valor respecto al C.ON. Cuando los niveles de SNRK1 son elevados, se promueven procesos catabólicos requeridos para responder a las necesidades de energía de la planta (Delatte et al., 2011). Es decir, el incremento de SNRK1, viene relacionado con una demanda de energía, la cual podría estar asociada a las yemas aisladas por el rayado.

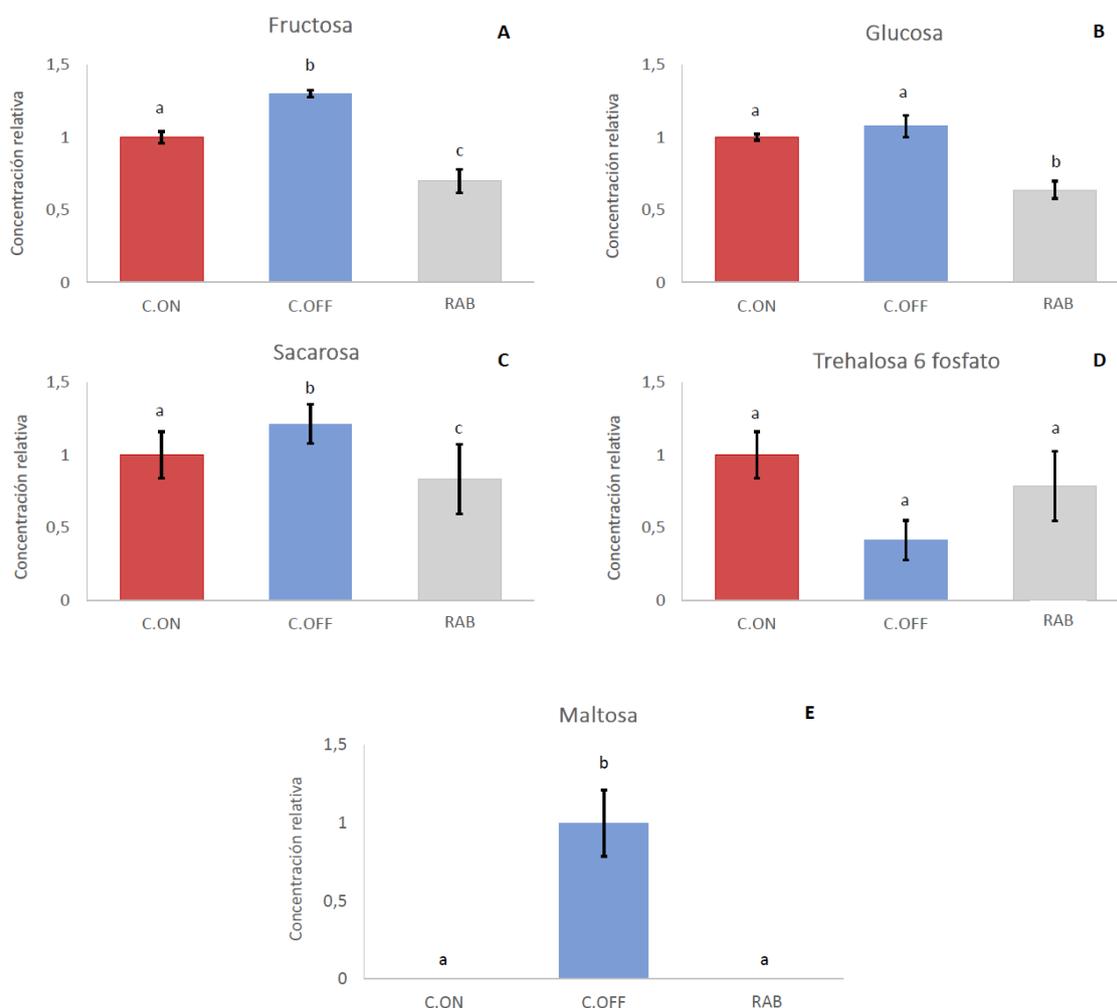


Figura 17. Concentración relativa de carbohidratos en hojas de brotes campaneros con fruto (C.ON) y sin fruto (C.OFF), y con fruto y rayados en el ápice y la base (RAB). Cada valor es la media de tres repeticiones biológicas. Letras distintas indican diferencias significativas. (A) Fructosa, (B) Glucosa, (C) Sacarosa y (D) Trehalosa-6-fosfato y (E) Maltosa. Análisis realizado a los 74 días del rayado apical y basal (RAB).

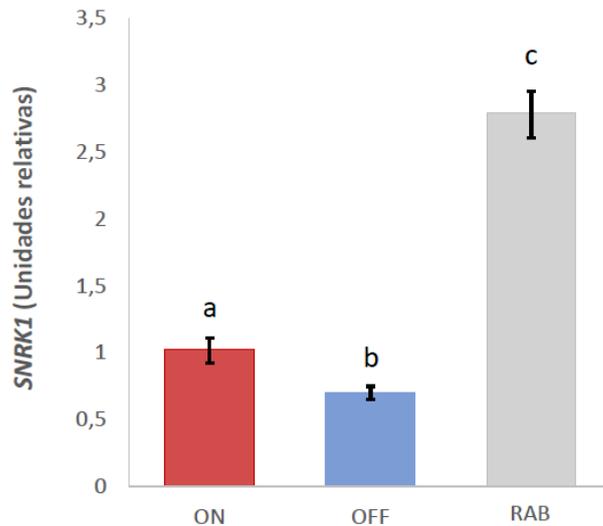


Figura 18. Expresión relativa del gen *SNRK1* en las hojas de brotes campaneros con fruto (C.ON) y sin fruto (C.OFF), y con fruto y rayados en el ápice y la base (RAB). Cada valor es la media de tres repeticiones biológicas. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Por ello, se evaluó de forma indirecta la actividad fotosintética a partir de la expresión relativa de la subunidad pequeña del enzima Rubis (ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa), es decir, RbcS. Rubisco está formada por 16 cadenas polipeptídicas de dos tipos: una grande, denominada subunidad larga “large chain” (subunidad L) y otra pequeña “small chain” (subunidad S). La primera contiene el sitio catalítico de la enzima y la segunda ejerce la actividad reguladora, sintetizándose en el núcleo y exportándose al citoplasma en los momentos de necesidad. El gen RbcS, codifica esta pequeña cadena polipeptídica que regula la actividad de la Rubisco (Spreitzer et al., 2005).

El rayado doble incrementó significativamente la expresión del gen RbcS un 25% respecto de los controles (Figura 19). Este incremento de expresión de RbcS, podría estar relacionado con un incremento de la fijación de CO₂ (actividad carboxilasa) o un incremento de la fotorrespiración (actividad oxidasa de la enzima) (Taylor et al., 1996), debido al estrés nutricional generado por el rayado y señalado por SNRK1 y la demanda de las yemas.

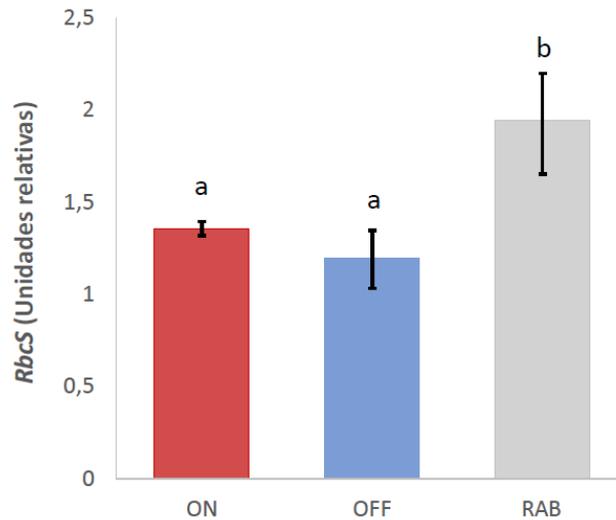


Figura 19. Expresión relativa del gen *RbcS* en las hojas de de brotes campaneros con fruto (C.ON) y sin fruto (C.OFF), y con fruto y rayados en el ápice y la base (RAB). Cada valor es la media de tres repeticiones biológicas. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

De hecho, el contenido en carbohidratos en el floema del brote no se redujo significativamente (Figura 20), pese a la respiración del tejido y a la ausencia de transporte desde/hacia otras partes de la planta. La reducción de la concentración de carbohidratos en las hojas de brotes RAB, aún aumentando la expresión de *RbcS*, sugiere un transporte hacia el brote para suplir la demanda de las yemas. Los resultados no mostraron diferencias significativas en el contenido relativo de fructosa (Figura 20A), glucosa (Figura 20B), sacarosa (Figura 20C) y trehalosa-6-fosfato (Figura 20D).

En cambio, destacó en gran medida el elevado nivel relativo de maltosa, multiplicando x30 su valor respecto al brote con fruto (C.ON) y x8 respecto al brote sin fruto (C.OFF) (Figura 20E). La acumulación de maltosa está relacionada con la hidrólisis del almidón en respuesta a la alta actividad de la β -amilasa (Lavon y Goldschmidt., 1999). Así pues, estos niveles altos de maltosa sugieren un incremento de la hidrólisis de almidón en el floema a causa del requerimiento de las yemas axilares aisladas por efecto del rayado. Algunos estudios relacionan la movilización de las reservas de almidón y un aumento del transporte de carbohidratos al meristemo apical con la diferenciación floral. El aumento de azúcar en el floema es transitorio y previo a la actividad mitótica del meristemo, con lo que se mantiene la hipótesis de que el nivel de carbohidratos es una señal de la floración *per se* y no solamente una fuente de energía para sustentar el desarrollo (Corbesier et al., 1998; Wahl et al. 2013). Los resultados de Wahl et al (2013) demuestran que, en la planta modelo *Arabidopsis*

thaliana, los azúcares, a través de la trehalosa 6-P, regulan la floración en dos sitios de la planta: en las hojas, para la inducción del gen FT, y en el meristemo, afectando a los genes de la identidad floral. Sin embargo, los resultados no muestran una correlación entre la concentración de trehalosa 6-P (Figura 10) y la expresión de *CiFT2* (Figura 11B) en los cítricos, al menos en el momento analizado (74 días después del tratamiento). La realización de nuevos experimentos con muestreos a corto plazo podría aclarar esta discrepancia.

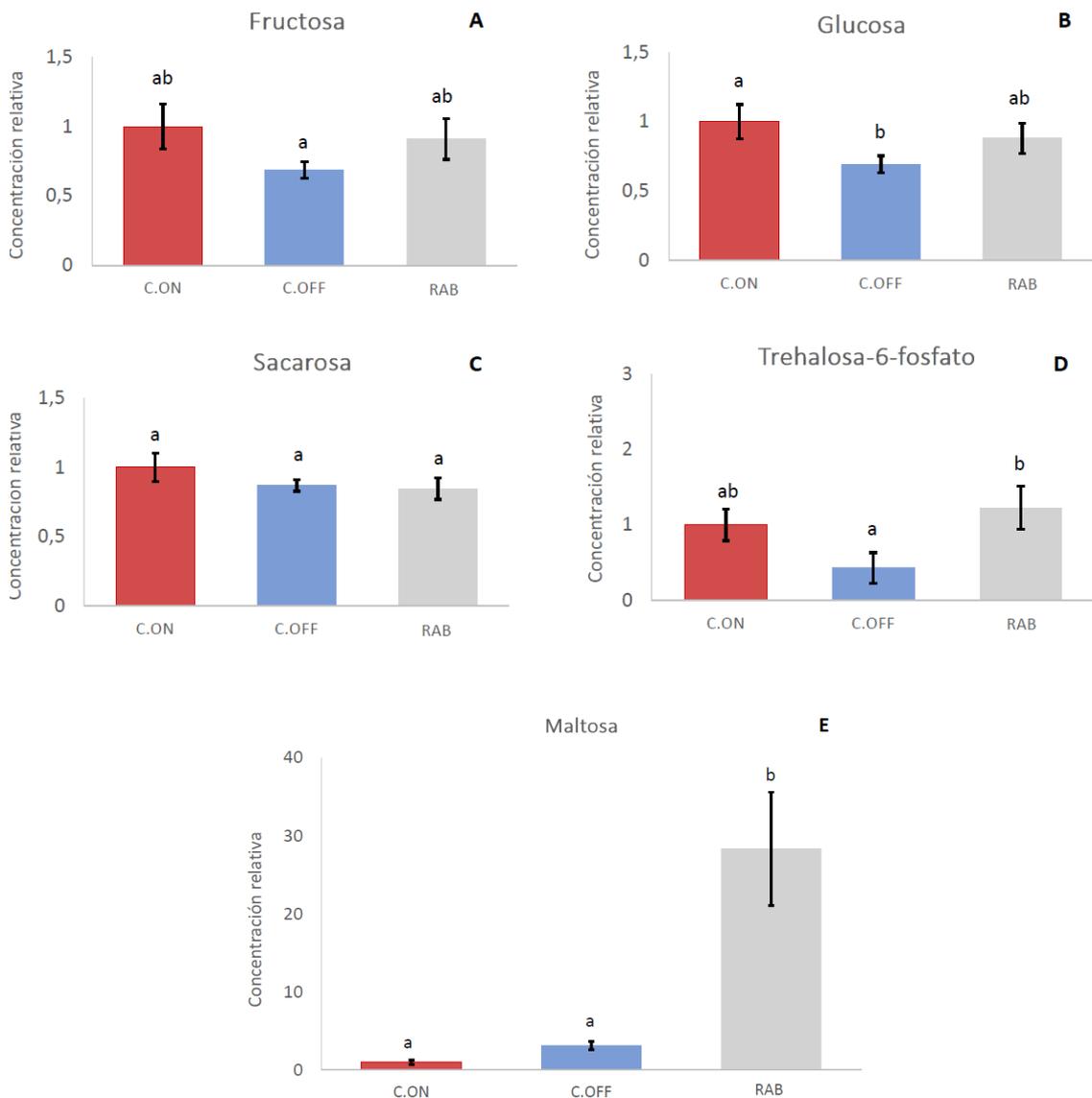


Figura 20. Azúcares esenciales. Cada valor es la media de tres repeticiones biológicas de una mezcla de 4 hojas adultas. Letras distintas indican diferencias significativas. (A) Fructosa, (B) Glucosa, (C) Sacarosa y (D) Trehalosa-6-fosfato y (E) Maltosa. El análisis se realizó 70 días después del tratamiento.

IV. Conclusiones

Conclusiones:

1. El rayado apical (RA) y el rayado basal (RB) de brotes campaneros, fueron capaces de inducir la brotación en primavera. En cambio, la combinación de ambos, doble rayado (RAB), promovió la floración en todas las yemas axilares.
2. El doble rayado (RAB), incrementó la expresión de *ClFT2* en las hojas desde el inicio del tratamiento anticipándose al periodo de inducción floral, es decir, por un mecanismo endógeno independiente de la baja temperatura.
3. El doble rayado (RAB) provocó un estrés nutricional que modificó el metabolismo primario, alterando la concentración de azúcares tanto en las hojas como en el tejido floemático del brote.

V. Bibliografía

- Agustí, M., Almela, V., & Pons, J.** (1992). Effects of girdling on alternate bearing in citrus. *Journal of horticultural science*, 67(2), 203-210.
- Agustí, M., Martínez-Fuentes, A., Mesejo, C., Juan, M., & Almela, V.** (2003). Cuajado y desarrollo de los frutos cítricos. *Generalitat Valenciana. Conselleria D' Agricultura, Peixca I Alimentacio*.
- Agustí, M.** (2003). *Citricultura* (No. 634.3 A3). **Agustí, M.** (2010). *Fruticultura*. Mundi-Prensa Libros.
- Ali, A. G., & Lovatt, C. J.** (1995). Relationship of polyamines to low-temperature stress-induced flowering of the 'Washington' navel orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Journal of Horticultural Science*, 70(3), 491-498.
- Azcón-Bieto, J.** (2008). "Floración y su control ambiental" en *Fundamentos de fisiología vegetal 2ª edición*, M. Roldán y J. Martínez Zapater. Madrid: S.A. McGraw-hill / interamericana de España, p. 499-501. p. 511-513.
- Bäurle, I., & Dean, C.** (2006). The timing of developmental transitions in plants. *Cell*, 125(4), 655-664.
- Berry, J. O., Yerramsetty, P., Zielinski, A. M., & Mure, C. M.** (2013). Photosynthetic gene expression in higher plants. *Photosynthesis research*, 117(1-3), 91-120
- Betancourt M, Martínez-Fuentes A, García M.E, Mesejo C, Sánchez CD, Nuñez M Reig C and Agustí M.** (2008). The influence of fruit load on flowering intensity of grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.) under tropical climatic conditions. 2008 ISC Congress, Abstract P249.
- Blázquez, M. A., Piñeiro, M., & Valverde, F.** (2011). Bases moleculares de la floración. *Investigación y ciencia*, 416, 28-36.
- Bowman, K. D., & Garnsey, S. M.** (2001). A comparison of five sour orange rootstocks and their response to citrus tristeza virus. In Proc. Fla. State Hort. Soc (Vol. 114, pp. 73-77).
- Buchanan, B. B., Gruissem, W., & Jones, R. L. (Eds.).** (2015). *Biochemistry and molecular biology of plants*. John Wiley & Sons.

- Chica, E. J., & Albrigo, L. G.** (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.
- Cho, L. H., Yoon, J., & An, G.** (2017). The control of flowering time by environmental factors. *The Plant Journal*, 90(4), 708-719.
- Corbesier, L., Lejeune, P., & Bernier, G.** (1998). The role of carbohydrates in the induction of flowering in *Arabidopsis thaliana*: comparison between the wild type and a starchless mutant. *Planta*, 206(1), 131-137.
- Davies, F. S., & Albrigo, L. G.** (1994). Citrus. CAB International. *Wallingford, UK*, 30-33.
- Dawson, W. O., Bar-Joseph, M., Garnsey, S. M., & Moreno, P.** (2015). Citrus tristeza virus: making an ally from an enemy. *Annual Review of Phytopathology*, 53, 137-155.
- Delatte, T. L., Sedijani, P., Kondou, Y., Matsui, M., de Jong, G. J., Somsen, G. W., ... & Schluepmann, H.** (2011). Growth arrest by trehalose-6-phosphate: an astonishing case of primary metabolite control over growth by way of the SnRK1 signaling pathway. *Plant Physiology*, 157(1), 160-174.
- Dennis, F. G., & Neilsen, J. C.** (1999). Physiological factors affecting biennial bearing in tree fruit: the role of seeds in apple. *HortTechnology*, 9(3), 317-322.
- Deprost, D., Yao, L., Sormani, R., Moreau, M., Leterreux, G., Nicolai, M., ... & Meyer, C.** (2007). The Arabidopsis TOR kinase links plant growth, yield, stress resistance and mRNA translation. *EMBO reports*, 8(9), 864-870.
- Distefano, G., Las Casas, G., Caruso, M., Todaro, A., Rapisarda, P., La Malfa, S., ... & Tribulato, E.** (2009). Physiological and molecular analysis of the maturation process in fruits of clementine mandarin and one of its late-ripening mutants. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(17), 7974-7982
- Gambetta, G., Martínez-Fuentes, A., Bentancur, O., Mesejo, C., Reig, C., Gravina, A., & Agustí, M.** (2012). Hormonal and nutritional changes in the flavedo regulating rind color development in sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osb.]. *Journal of plant growth regulation*, 31(3), 273-282.

- García-Luís, A., Kanduser, M., Santamarina, P., & Guardiola, J. L.** (1992). Low temperature influence on flowering in Citrus. The separation of inductive and bud dormancy releasing effects. *Physiologia Plantarum*, 86(4), 648-652
- Gariglio, N., Castillo, A., Juan, M., Almela, V., & Agustí, M.** (2002). El níspero japonés. *Técnicas para mejorar la calidad del fruto. Serie Divulgació Técnica*, (52).
- Goldschmidt, E. E., Aschkenazi, N., Herzano, Y., Schaffer, A. A., & Monselise, S. P.** (1985). A role for carbohydrate levels in the control of flowering in citrus. *Scientia Horticulturae*, 26(2), 159-166.
- Gravina, A., Arbiza, H., Ferenczi, A., Orlando, L., Severino, V., Gambetta, G., ... & Agustí, M.** (2000). Estudio del comportamiento alternante de la naranja “Salustiana”[*Citrus sinensis* (L.) osb.] en diferentes condiciones productivas. *Agrociencia-Sitio en Reparación*, 4(1), 17-22.
- Hanano S, Goto K.** (2011). Arabidopsis TERMINAL FLOWER1 is involved in the regulation of flowering time and inflorescence development through transcriptional repression. *The Plant Cell* 23: 3172–3184.
- Havelange, A., Lejeune, P., Bernier, G., Kaur-Sawhney, R., & Galston, A. W.** (1996). Putrescine export from leaves in relation to floral transition in *Sinapis alba*. *Physiologia Plantarum*, 96(1), 59-65.
- Iglesias, D. J.** (2002) “Regulación Del Cambio de Color de Los Frutos Cítricos.” Levante Agrícola., no. 360, Ediciones y Promociones LAV, 2002, pp. 187–94.
- Jean Finnegan, E., Kovac, K. A., Jaligot, E., Sheldon, C. C., James Peacock, W., & Dennis, E. S.** (2005). The downregulation of FLOWERING LOCUS C (FLC) expression in plants with low levels of DNA methylation and by vernalization occurs by distinct mechanisms. *The Plant Journal*, 44(3), 420-432.
- Lahav, E., Gefen, B., & Zamet, D.** (1971). The effect of girdling on the productivity of the avocado. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 96(3), 396-398.
- Lavee, S.** (2007). Biennial bearing in olive (*Olea europaea* L.). In *Annales Ser His Nat* (Vol. 17, pp. 101-112).

Lavon, R., & Goldschmidt, E. E. (1999). Enzymatic methods for detection of mineral element deficiencies in citrus leaves: A mini-review. *Journal of plant nutrition*, 22(1), 139-150.

LI, C. Y., Weiss, D., & Goldschmidt, E. E. (2003). Girdling affects carbohydrate-related gene expression in leaves, bark and roots of alternate-bearing citrus trees. *Annals of Botany*, 92(1), 137-143.

Manresa, R. E. (1983). La fertilización foliar con aminoácidos. *Horticultura: Revista de industria, distribución y socioeconomía hortícola: frutas, hortalizas, flores, plantas, árboles ornamentales y viveros*, (12), 33-35.

Martínez-Fuentes, A & Agustí, M. (2010). *El tiempo de permanencia del fruto en el árbol y su relación con la floración en los cítricos* (Doctoral dissertation, Tesis Doctoral, Universidade Politecnica de Valencia-Departamento de Producción Vegetal, Valencia).

Martínez-Fuentes, A., Mesejo, C., Muñoz-Fambuena, N., Reig, C., González-Mas, M. C., Iglesias, D. J., Primo-Millo E., y Agustí, M. (2013). Fruit load restricts the flowering promotion effect of paclobutrazol in alternate bearing Citrus spp. *Scientia Horticulturae*, 151: 122-127.

Martínez Montagud, M. J. (2015). *Control hormonal de la brotación en los cítricos: dominancia del fruto* (Doctoral dissertation).

Mason, M. G., Ross, J. J., Babst, B. A., Wienclaw, B. N., & Beveridge, C. A. (2014). Sugar demand, not auxin, is the initial regulator of apical dominance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(16), 6092-6097.

Matsoukas IG, Massiah AJ, Thomas B (2012) Florigenic and antiflorigenic signaling in plants. *Plant Cell Physiol* 53:1827–1842

Mesejo, C., Martínez-Fuentes, A., Reig, C., & Agustí, M. (2019). The flower to fruit transition in Citrus is partially sustained by autonomous carbohydrate synthesis in the ovary. *Plant Science*

M 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

- Muñoz-Fambuena, N., Mesejo, C., Carmen González-Mas, M., Primo-Millo, E., Agustí, M., & Iglesias, D. J.** (2011). Fruit regulates seasonal expression of flowering genes in alternate-bearing 'Moncada' mandarin. *Annals of Botany*, 108(3), 511-519
- Muñoz-Fambuena, N., Mesejo, C., González-Mas, M. C., Primo-Millo, E., Agustí, M., & Iglesias, D. J.** (2012). Fruit load modulates flowering-related gene expression in buds of alternate-bearing 'Moncada' mandarin. *Annals of botany*, 110(6), 1109-1118.
- Muñoz-Fambuena, N.** (2013). Relación entre la presencia del fruto y la expresión temporal de los genes de la floración en cítricos.
- Muñoz-Fambuena, N., Nicolás-Almansa, M., Martínez-Fuentes, A., Reig, C., Iglesias, D. J., Primo-Millo, E., & Agustí, M.** (2018). Genetic inhibition of flowering differs between juvenile and adult Citrus trees. *Annals of Botany*.
- 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
- Ordúz-Rodríguez, J. O., & Garzón, D. L.** (2012). Alternancia de la producción y comportamiento fenológico de la naranja 'Valencia' (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck) en el trópico bajo húmedo de Colombia. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 13(2), 136-144.
- Peña, L., Martín-Trillo, M., Juárez, J., Pina, J. A., Navarro, L., & Martínez-Zapater, J. M.** (2001). Constitutive expression of Arabidopsis LEAFY or APETALA1 genes in citrus reduces their generation time. *Nature biotechnology*, 19(3), 263.
- Portis Jr, A. R.** (1990). Rubisco activase. *Biochim Biophys Acta*, 1015(1), 15-28.
- Rebolledo Roa, A.** (2012). Fisiología de la floración y fructificación en los cítricos. Corporación Universitaria Lasallista. (pág. 100)
- Rivas, F., Martínez-Fuentes, A., Mesejo, C., Reig, C., & Agustí, M.** (2007). Efecto hormonal y nutricional del anillado en frutos de diferentes tipos de brotes de cítricos. *Agrociencia Uruguay*, 14(1), 8-14.
- Seo E, Le H, Jeon J, et al.** (2009). Crosstalk between cold response and flowering in Arabidopsis is mediated through the flowering-time gene SOC1 and its upstream negative regulator FLC. *The Plant Cell* 21: 3185–3197.

- Sgamma T, Jackson A, Muleo R, Thomas B, Massiah A.** (2014). TEMPRANILLO is a regulator of juvenility in plants. *Scientific Reports* 4: 3704. DOI: 10.1038/srep03704.
- 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.
- Shalom, L., Shlizerman, L., Zur, N., Doron-Faigenboim, A., Blumwald, E., & Sadka, A.** (2015). Molecular characterization of SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL) gene family from Citrus and the effect of fruit load on their expression. *Frontiers in plant science*, 6, 389.
- Sohn EJ, Rojas-Pierce M, Pan S, et al.** (2007). The shoot meristem identity gene TFL1 is involved in flower development and trafficking to the protein storage vacuole. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 104: 18801–18806.
- Southwick, S. M., & Davenport, T. L.** (1986). Characterization of water stress and low temperature effects on flower induction in citrus. *Plant physiology*, 81(1), 26-29.
- Spiegel-Roy, P., & Goldschmidt, E. E.** (1996). Reproductive physiology: flowering and fruiting. *Biology of citrus*, 70-125.
- Spiegel-Roy, P., & Goldschmidt, E. E.** (1996). *The biology of citrus*. Cambridge University Press.
- Spreitzer, R. J., Peddi, S. R., & Satagopan, S.** (2005). Phylogenetic engineering at an interface between large and small subunits imparts land-plant kinetic properties to algal Rubisco. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(47), 17225-17230.
- Suárez Rodríguez, R., Raya Pérez, J. C., & Iturriaga de la Fuente, G.** (2015). la trehalosa: un azúcar osmoprotector con capacidad de señalización.
- Taylor, T. C.** (1996). *Crystallographic studies of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenases. Towards an understanding of the mechanism*. SLU.
- Tromp, J.** (1982). Flower-bud formation in apple as affected by various gibberellins. *Journal of Horticultural Science*, 57(3), 277-282.

Wada, Kaede C.; Takeno, Kiyotoshi. (2010). Stress-induced flowering. *Plant signaling & behavior*, vol. 5, no 8, p. 944-947.

Wahl V, Ponnu J, Schlereth A, Arrivault S, Langenecker T, Franke A, Feil R, Lunn JE, Stitt M, Schmid M (2013) Regulation of flowering by trehalose-6-phosphate signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Science* 339:704–707

Wang, K. L. C., Li, H., & Ecker, J. R. (2002). Ethylene biosynthesis and signaling networks. *The plant cell*, 14(suppl 1), S131-S151.

Páginas web:

MAPAMA. *Encuesta sobre superficies y rendimientos de cultivos.*

<https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticasagrarias/boletin2018_tcm30-504212.pdf> [Consulta: 07 de mayo de 2019]

MAPAMA. *Avances, superficies y producciones de cultivos.*

<https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticasagrarias/cuaderno_enero2018_tcm30-444494.pdf> [Consulta: 07 de mayo de 2019]

IVIA. *Gestión integrada de Plagas y Enfermedades en Cítricos.*

<<http://gipcitricos.ivia.es/citricultura-valenciana>> [Consulta: 07 de mayo de 2019]

Conselleria de Agricultura, Medio Ambiente, Cambio Climático y Desarrollo Rural. *Segundo aforo campaña de cítricos 2018/19 & Superficie regional de cítricos en el total nacional.* < <http://www.agroambient.gva.es/es/estadisticas1>> [Consulta: 28 de mayo de 2019]