



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

EFEECTO DE LA APLICACIÓN DE GIBERELINAS ANTES
DEL PERIODO INDUCTIVO SOBRE LA EXPRESIÓN DEL
GEN CiFT3 Y LA FLORACIÓN DEL NARANJO (*Citrus
sinensis* L.)

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Ingeniería Agronómica

AUTOR/A: Prades Aznar, Guillem

Tutor/a: Mesejo Conejos, Carlos

Cotutor/a: Marzal Blay, Andrés

CURSO ACADÉMICO: 2021/2022



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escuela Técnica Superior
de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

**EFFECTO DE LA APLICACIÓN DE GIBERELINAS ANTES DEL PERIODO
INDUCTIVO SOBRE LA EXPRESIÓN DEL GEN CIFT3 Y LA FLORACIÓN DEL
NARANJO (*Citrus sinensis* L.)**

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Curso 2021-2022

Valencia, septiembre de 2022

Alumno: Guillem Prades Aznar

Tutor: Carlos Mesejo Conejos

Cotutor: Andrés Marzal Blay

RESUMEN:

La aplicación de giberelinas (GAs) para regular la floración es una técnica eficaz en la mayoría de especies de cítricos. La respuesta al tratamiento depende críticamente de la época de aplicación, en interacción con la especie.

En el naranjo dulce, existen dos momentos de mayor sensibilidad bien definidos: 1) durante el reposo invernal, de finales de noviembre a principios de diciembre, y 2) al inicio de la brotación, cuando los brotes aún no han superado los 1-3 mm de longitud. En ambos casos, un tratamiento con GAs reduce significativamente la brotación y la floración en la mayor parte de los cultivares ensayados. En el segundo caso, el periodo de sensibilidad es más corto. Pero, en algunos cultivares de recolección tardía estos tratamientos pueden interferir en el cambio de color del fruto, por lo que resulta de interés el estudio de otras épocas de sensibilidad.

La inducción floral de los cítricos cultivados en clima Mediterráneo sucede durante el reposo invernal cuando la baja temperatura activa la expresión del gen inductor de la floración *CiFT3*. El tratamiento con GAs en ese momento interfiere en la expresión de ese gen, reduciendo la intensidad de floración. La aplicación de GAs en etapas previas al periodo inductivo, septiembre, también ha mostrado ser efectiva, pero se desconoce su modo de acción.

El objetivo de este TFM es estudiar el mecanismo de acción de la aplicación de GAs en el mes de septiembre para el control de la floración del naranjo dulce.

Para ello se realizaron 2 experimentos utilizando el naranjo dulce 'Lane late': en el primero se estudió el efecto temporal del AG aplicándolo a brotes antes, durante y después de la inducción floral, y en el segundo se estudió el efecto espacial, aplicando AG a brotes, hojas y yemas en septiembre. Se evaluó la floración y la expresión de los genes *CiFT3* (gen relacionado con la inducción floral), *CsLFY* (gen relacionado con la diferenciación floral) y *CsCEN* (gen relacionado con el crecimiento vegetativo del meristemo) para estudiar el mecanismo de acción del AG aplicado en septiembre.

Los resultados de este TFM confirman el efecto inhibitorio que presenta el AG aplicado antes de la inducción floral. Las ramas tratadas con AG en septiembre tuvieron menor brotación y floración que el control y la mayoría de brotes fueron vegetativos en detrimento de los ramos de flor. El retraso en la aplicación al mes de diciembre modificó el fenotipo obtenido (aumento de brotes mixtos), lo que pone en evidencia que el estado fenológico de la yema influye en el efecto del AG.

En septiembre, el AG aumentó la expresión de *CsCEN* en las yemas tratadas, promoviendo el crecimiento indeterminado de los meristemos, pero no inhibió a corto plazo la expresión del gen *CiFT3* en las hojas. No obstante, la expresión de *CiFT3* se redujo 2,5 meses después del tratamiento, durante la inducción floral. Los resultados sugieren que el mecanismo de acción del AG aplicado en septiembre es a través de su efecto sobre la yema, de modo que el aumento de la expresión del gen *CsCEN* en la yema inhibió de forma indirecta la expresión del gen *CiFT3*.

Palabras clave: ácido giberélico, brotación, cítricos, inducción floral, floración.

ABSTRACT:

The use of gibberellins (GAs) to regulate flowering is an effective technique in most citrus species. The response to the treatment critically depends on the time of application, in interaction with the species.

In sweet orange, there are two well-defined moments of greatest sensitivity: 1) during the winter rest, from the end of November to the beginning of December, and 2) at the beginning of bud sprouting, when the shoots have not yet exceeded 1-3 mm length. In both cases, a treatment with GAs significantly reduces sprouting and flowering in most of the cultivars tested. In the second case, the sensitivity period is shorter. But, in some late-harvest cultivars these treatments can interfere with the color change of the fruit. Therefore, the study of other periods of sensitivity is of great interest.

Floral induction of citrus grown in the Mediterranean climate occurs during winter rest, when low temperature activates the expression of the gene *CiFT3* that induces flowering. The treatment with GAs at that time interferes with the expression of the *CiFT3* gene, reducing the intensity of flowering. The application of GAs in stages prior to the inductive period, September, has also been shown to be effective, but its mode of action is unknown.

The objective of this TFM is to study the mechanism of action of the application of GAs in September to control flowering in sweet orange (*Citrus sinensis* L.).

To this end, two experiments were carried out on the sweet orange cv. 'Lane late': in the first, the temporal effect of GA was studied by applying it to shoots before, during and after floral induction period; in the second, the local effect was studied, applying GA to shoots, leaves and buds in September. Subsequently, flowering and the expression of the genes *CiFT3* (related to floral induction), *CsLFY* (related to floral differentiation) and *CsCEN* (related to the vegetative growth of the meristem) were evaluated in order to better understand the effect of GA on September.

The results of this TFM confirm the inhibitory effect of the AG applied before floral induction. The branches treated with GA in September had lower sprouting and flowering than the control and most of the shoots were vegetative to the detriment of the leafless inflorescences. The delay in the GA treatment to December modified the phenotype obtained (increase of mixed shoots), which shows that the phenological state of the bud influences the effect of AG.

In September, GA increased *CsCEN* expression in treated buds, promoting indeterminate meristem growth, but did not inhibit *CiFT3* gene expression in the short-term. However, *CiFT3* expression was reduced 2.5 months after treatment, during floral induction. The results suggest that the mechanism of the GA applied in September is through its effect on the bud, so that the increase in the expression of the *CsCEN* gene in the bud indirectly inhibited the expression of the *CiFT3* gene.

Key words: citrus, gibberellic acid, flower induction, flowering, sprouting.

RESUM:

L'aplicació de giberelines (GAs) per a regular la floració és una tècnica eficaç a la majoria d'espècies de cítrics. La resposta al tractament depèn críticament de l'època d'aplicació en interacció amb l'espècie.

Al taronger dolç, hi ha dos moments de més sensibilitat ben definits: 1) durant el repòs hivernal, de finals de novembre a principis de desembre, i 2) a l'inici de la brotació, quan els brots encara no han superat els 1-3 mm de longitud. En tots dos casos, un tractament amb GAs redueix significativament la brotació i la floració en la major part dels cultivars assajats. En el segon cas, el període de sensibilitat és més curt. Però, en alguns cultivars de recol·lecció tardana, aquests tractaments poden interferir en el canvi de color del fruit, per la qual cosa resulta interessant l'estudi d'altres èpoques de sensibilitat.

La inducció floral dels cítrics cultivats en clima Mediterrani succeeix durant el repòs hivernal quan la baixa temperatura activa l'expressió del gen inductor de la floració CiFT3. El tractament amb GAs en aquest moment interfereix en l'expressió d'aquest gen, reduint la intensitat de floració. L'aplicació de GAs en etapes prèvies al període inductiu, el setembre, també ha mostrat ser efectiva, però se'n desconeix el mode d'acció.

L'objectiu d'aquest TFM és estudiar el mecanisme d'acció de l'aplicació de GAs al setembre per al control de la floració del taronger dolç.

Per a això es van realitzar 2 experiments utilitzant el taronger dolç 'Lane late': al primer es va estudiar l'efecte temporal de l'AG aplicant-lo a brots abans, durant i després de la inducció floral, i al segon es va estudiar l'efecte espacial, aplicant AG a brots, fulles i gemmes al setembre. Es va avaluar la floració i l'expressió dels gens CiFT3 (gen relacionat amb la inducció floral, CsLFY (gen relacionat amb la diferenciació floral) i CsCEN (gen relacionat amb el creixement vegetatiu del meristem) per estudiar el mecanisme d'acció de l'AG aplicat a setembre.

Els resultats d'aquest TFM confirmen l'efecte inhibitori que presenta l'AG aplicat abans de la inducció floral. Les branques tractades amb AG al setembre van tenir menor brotació i floració que el control i la majoria de brots van ser vegetatius en detriment dels rams de flor. El retràs en l'aplicació a desembre va modificar el fenotip obtingut (augment de brots mixtos), el que posa en evidència que l'estat fenològic de la gemma influeix a l'efecte de l'AG.

A setembre, l'AG va augmentar l'expressió de CsCEN a les gemmes tractades, promovent el seu creixement indeterminat dels meristemes, però no va inhibir a curt plaç l'expressió del gen CiFT3 a les fulles. No obstant, l'expressió de CiFT3 es va reduir 2,5 mesos després del tractament, durant la inducció floral. Els resultats suggereixen que el mecanisme d'acció de l'AG aplicat a setembre es per mitjà del seu efecte sobre la gemma, de forma que l'augment de l'expressió del gen CsCEN a la gemma va inhibir de forma indirecta l'expressió del gen CiFT3.

Paraules clau: àcid giberèlic, brotació, cítrics, inducció floral, floració.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. La producción de los cítricos. Justificación del problema.	1
1.1.2. Justificación del problema. El control de la floración.	3
1.2. La brotación y floración en los cítricos.	4
1.3. Factores promotores e inhibidores de la floración.....	6
1.3.1. Factores promotores. Bajas temperaturas y estrés hídrico.	6
1.3.2. Factores inhibidores: La presencia del fruto.	6
1.3.3. Factores inhibidores. La acción de las giberelinas.	8
1.4. Hipótesis de trabajo y objetivos.	10
2. MATERIAL Y MÉTODOS	11
2.1. Material vegetal.	11
2.2. Diseño experimental.....	11
2.3. Preparación de muestras.....	13
2.4. Extracción del mRNA.	13
2.4. Rt-qPCR.....	14
2.5. Análisis estadístico.	14
3. RESULTADOS.....	16
3.1. Efecto de la aplicación de AG antes, durante y después de la inducción floral sobre la floración del naranjo dulce cv. Lane Late.	16
3.2. Efecto de la aplicación localizada de AG, antes de la inducción floral, sobre la floración del naranjo dulce var. Lane Late.	19
3.3. Efecto de la aplicación de AG en la expresión de los genes <i>CiFT3</i> en la hoja y <i>CsLFY</i> y <i>CsCEN</i> en la yema.	22
4. DISCUSIÓN.....	25
5. CONCLUSIONES	28
6. BIBLIOGRAFÍA	29

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Genes y cebadores elegidos para el análisis de expresión génica.....	15
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Evolución de la superficie destinada a cítricos en España durante los últimos años. Fuente: Elaboración propia a partir de datos del Ministerio de agricultura, pesca y alimentación. 2
- Figura 2.** Evolución de la producción total de cítricos en España durante los últimos años. Fuente: Elaboración propia a partir de datos del Ministerio de agricultura, pesca y alimentación..... 2
- Figura 3.** Superficie (A) y producción (B) de las principales provincias productoras de cítricos en España el 2020. Fuente: Elaboración propia a partir de datos de MAPAMA..... 3
- Figura 4.** Esquema resumen de los procesos de inducción y diferenciación floral que se dan en la hoja y el meristemo (Zeevaart, 2008). El gen FT se expresa en las hojas en las células acompañantes del floema. La proteína FT se transporta vía floema hacia el meristemo apical. Allí forma un heterodímero con el gen FD. El conjunto FD/FT activa la expresión de SOC1, AP1 y LFY que desencadenará la diferenciación floral. FT: FLOWERING LOCUS T; FD: FLOWERING LOCUS D; SOC1: SUPPRESSOR OF OVEREXPRESION OF CONSTANS 1; AP1: APETALA1; LFY: LEAFY..... 5
- Figura 5.** Evolución de la temperatura máxima, mínima y media durante el periodo del experimento. La flechas indican el momento de los tratamientos y los muestreos. Fuente: Elaboración propia a partir de los datos de la estación meteorológica del IVIA de Picassent. ... 12
- Figura 6.** Efecto de la aplicación de AG (50 mg l-1) a ramas sin fruto (OFF) en septiembre (6 de septiembre), noviembre (25 de noviembre) y diciembre (28 de diciembre), sobre la floración del naranjo cv. “Lane late”. Las ramas con fruto (ON) se evaluaron como control incapaz de florecer. Cada valor es la media de 24 brotes. Las barras verticales indican el error estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$)..... 17
- Figura 7.** Efecto de la aplicación de AG (50 mg l-1) a ramas sin fruto (OFF) en septiembre (6 de septiembre), noviembre (25 de noviembre) y diciembre (28 de diciembre), sobre la brotación (A) y el número de brotes múltiples (B) del naranjo cv. “Lane late”. Las ramas con fruto (ON) se evaluaron como control incapaz de florecer. Cada valor es la media de 24 brotes. Las barras verticales indican el error estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$). 17
- Figura 8.** Efecto de la aplicación de AG (50 mg l-1) a ramas sin fruto (OFF) en septiembre (6 de septiembre), noviembre (25 de noviembre) y diciembre (28 de diciembre), sobre la floración del naranjo cv. “Lane late”. Las ramas con fruto (ON) se evaluaron como control incapaz de florecer. Cada valor es la media de 24 brotes. Las barras verticales indican el error estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$)..... 18
- Figura 9.** Efecto de la aplicación de AG (50 mg l-1) a ramas sin fruto (OFF) en septiembre (6 de septiembre), noviembre (25 de noviembre) y diciembre (28 de diciembre), sobre la distribución

porcentual del tipo de brotes del naranjo cv. "Lane late". Cada valor es la media de 24 brotes. Las ramas con fruto (ON) se evaluaron como control incapaz de florecer. RF: ramo de flor; FS: flor solitaria; BM: brote mixto; BV: brote vegetativo; BC: brote campanero. 19

Figura 10. Efecto de la aplicación localizada de AG (50 mg l-1) a ramas, hojas y yemas sobre la floración de naranjo cv. "Lane late". Las ramas con fruto (ON) se evaluaron como control incapaz de florecer. Los tratamientos se realizaron el 6 de septiembre. Cada valor es la media de 30 brotes. Las barras verticales indican el error estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$). 20

Figura 11. Efecto de la aplicación de AG (50 mg l-1) a rama, hoja y yema sobre el número de brotes (A) y sobre la cantidad de nudos múltiples (B) del naranjo cv. "Lane late". Las ramas con fruto (ON) se evaluaron como control incapaz de florecer. Los tratamientos se realizaron el 6 de septiembre. Cada valor es la media de 30 brotes. Las barras verticales indican el error estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$). 21

Figura 12. Efecto de la aplicación de AG (50 mg l-1) a rama, hoja y yema sobre el tipo de brotes en naranjo cv. "Lane late". Las ramas con fruto (ON) se evaluaron como control incapaz de florecer. Los tratamientos se realizaron el 6 de septiembre. Cada valor es la media de 30 brotes. Las barras verticales indican el error estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$). 22

Figura 13. Evolución de la expresión relativa del gen CiFT3 en hojas de ramas con fruto (ON), sin fruto (OFF) y tratadas con AG en septiembre en el naranjo cv. "Lane late". El muestreo de septiembre se realizó 48 h después del tratamiento con AG. Los tratamientos se realizaron el 6 de septiembre. Cada valor es la media de 3 RT-qPCR independientes. Las barras verticales indican el error estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$). 23

Figura 14. Expresión relativa de los genes CsLFY (A) y CsCEN (B) en las yemas de ramas con fruto (ON) sin fruto (OFF) y tratadas con AG en septiembre en el naranjo cv. "Lane late". Los tratamientos se realizaron el 6 de septiembre. Cada valor es la media de 3 RT-qPCR independientes. El muestreo se realizó 48 h después del tratamiento con AG. Las barras verticales indican el error estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$). 24

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La producción de los cítricos. Justificación del problema.

Los cítricos son un conjunto de especies pertenecientes a los géneros *Citrus*, *Poncirus* y *Microcitrus*. Las más importantes pertenecen al género *Citrus*, y son *C. sinensis* (naranja dulce), *C. clementina* (mandarino clementina), *C. reticulata* (mandarino común), *C. limon* (limonero) y *C. paradisi* (pomelo). Requieren de climas subtropicales, aunque también pueden cultivarse en climas tropicales y, si la disponibilidad de agua es adecuada, en climas desérticos. Son especies perennifolias y policárpicas, que retoman su crecimiento vegetativo todos los años para poder reiniciar su desarrollo reproductivo.

La producción mundial de naranjas, mandarinas, limones y pomelos es de casi 144 millones de toneladas (Mt) (FAO, 2019). China es el principal productor con más de 38 Mt, seguida de Brasil, con 19,7 Mt, Estados Unidos, con 15 Mt, India, con 13,3 Mt, México, con 8,4 Mt, y en sexto lugar España, con 6 Mt. Esta tendencia se ha mantenido en los últimos 9 años. España es el primer país exportador de cítricos para consumo en fresco a nivel europeo y tercero mundial tras China y EEUU (MAPAMA, 2020).

España cultiva una superficie cercana a las 300 mil hectáreas de cítricos, que en el año 2020 produjeron más de 7 Mt (MAPAMA, 2020). Durante los últimos años, la superficie destinada al cultivo de cítricos se ha visto reducida (Figura 1); sin embargo, la producción total se ha mantenido o incluso ha aumentado ligeramente, aunque mostrando unos picos de alternancia muy significativos (Figura 2). La reducción de la superficie destinada a esta especie ha sido debida, principalmente, al abandono del cultivo. Los motivos que han causado este abandono de tierras son complejos, no obstante, se podrían resumir en: 1) aumento de costes de cultivo y escaso precio del producto que causan una baja rentabilidad especialmente en las fincas pequeñas, 2) el aumento de la competencia con productores de fuera de la Unión Europea (principalmente países del norte de África y de Sudáfrica), 3) aparición de usos del suelo más rentables (usos urbanos u otras especies de cultivos), 4) políticas de importación europeas desfavorables, 5) ineficiencias

propias del sector cítrico valenciano (como por ejemplo el minifundismo y la falta de tecnificación), etc. (Compés et al., 2019).

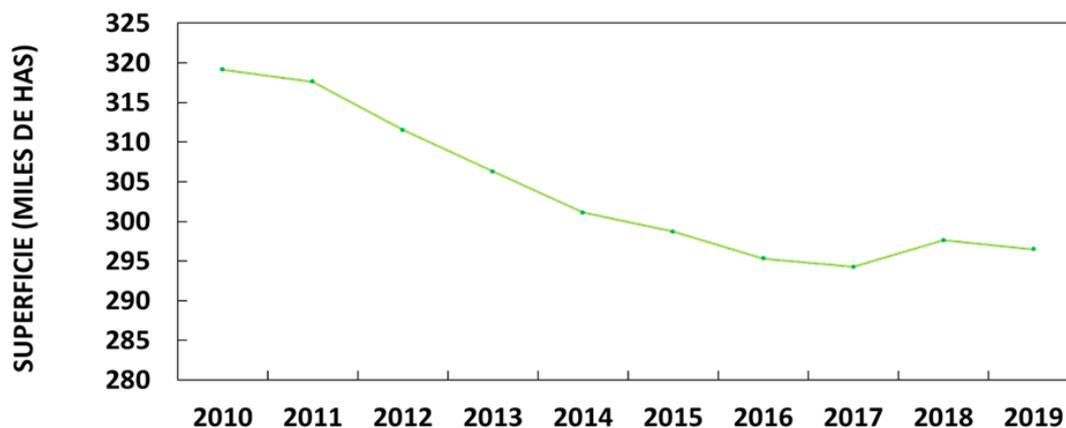


Figura 1. Evolución de la superficie destinada a cítricos en España durante los últimos años. Fuente: Elaboración propia a partir de datos del Ministerio de agricultura, pesca y alimentación.

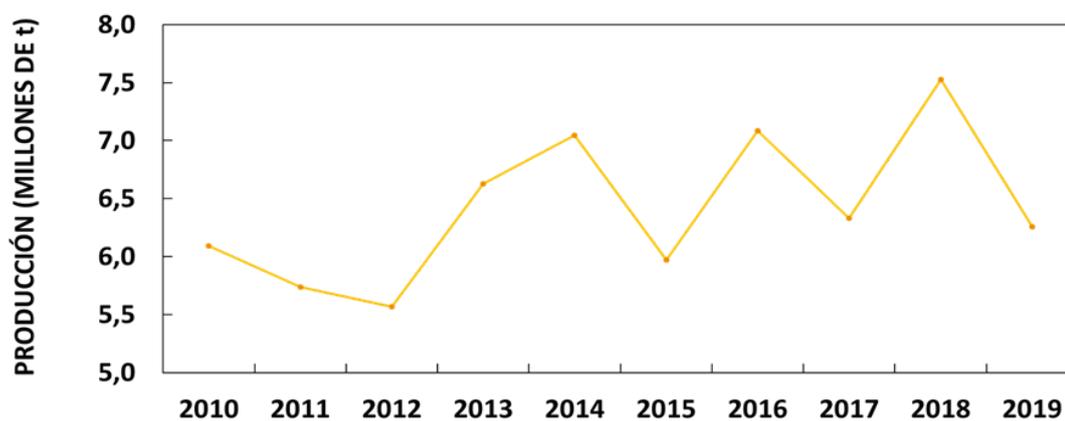


Figura 2. Evolución de la producción total de cítricos en España durante los últimos años. Fuente: Elaboración propia a partir de datos del Ministerio de agricultura, pesca y alimentación.

Por provincias, la Comunidad Valenciana es la principal productora de cítricos, seguida de Andalucía y, en tercer lugar, la Región de Murcia (Figura 3). El mismo orden sigue con la superficie dedicada a los cítricos (Figura 3).

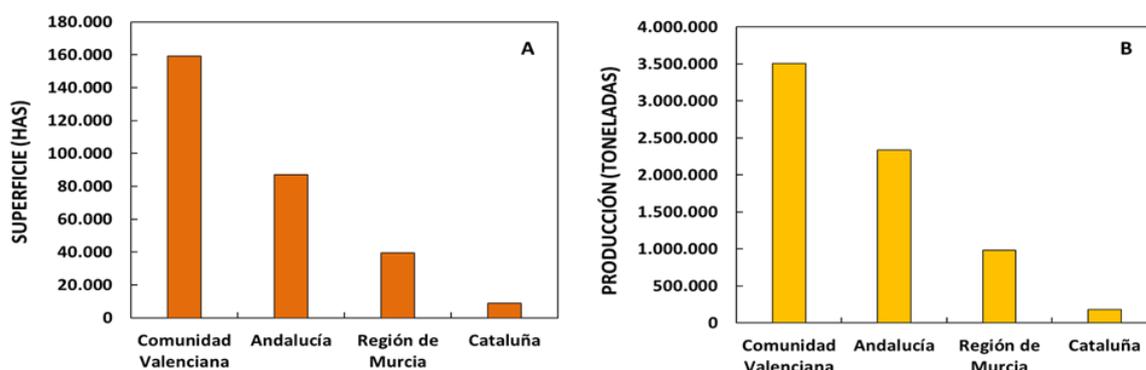


Figura 3. Superficie (A) y producción (B) de las principales provincias productoras de cítricos en España el 2020. Fuente: Elaboración propia a partir de datos de MAPAMA.

1.1.2. Justificación del problema. El control de la floración.

Martínez-Fuentes et al. (2010) determinaron el efecto inhibitorio que tiene el fruto sobre la brotación y la floración a partir del momento en que alcanza su máximo tamaño (septiembre, en el naranjo dulce). Este efecto es mayor en las variedades de recolección más tardía, pues el tiempo de permanencia del fruto en el árbol es mayor. Es decir, en estas variedades, después de un año de una cosecha elevada (año ON), le sigue un año con falta de brotación y, por tanto de floración, causando un año con baja o nula cosecha (año OFF). Este fenómeno se conoce como alternancia de cosechas. Por tanto, 1) las yemas son sensibles a la inhibición de la floración a partir del mes de septiembre, y 2) en árboles con fruto, esa inhibición es mayor cuantos más frutos hay y más tiempo permanecen en el árbol. Se desconoce qué señal(es) produce el fruto para inhibir la floración, por lo que se carece de una técnica eficaz para resolver la alternancia de cosechas.

La hipótesis hormonal apunta a las giberelinas, pero su papel en el proceso de inhibición no se conoce con precisión. Esta hipótesis procede del efecto inhibitorio que tiene el ácido giberélico (AG) para inhibir la floración. Su aplicación sobre variedades como *Citrus unshiu* durante el

periodo de inducción floral, principalmente, o justo antes de la brotación, redujeron la floración (García-Luís et al., 1986). Pero la aplicación de AG en esa época para controlar la floración también retarda la pérdida de clorofilas del fruto, y reduce la concentración de pigmentos carotenoides coloreados (Gambetta, 2009), lo que supone un problema en variedades de recolección de media estación. En estos casos, un adelanto de la aplicación de AG al mes de septiembre, que tiene un efecto similar al del momento de la inducción, serviría para reducir la incidencia del AG en el cambio de color del fruto. Pero se desconoce qué efecto provoca en las yemas y las hojas la aplicación de AG en etapas previas a la inducción floral.

1.2. La brotación y floración en los cítricos.

La brotación de los cítricos cultivados en clima Mediterráneo ocurre en tres épocas: primavera, inicio de verano y final de verano. La brotación de primavera es la que da las flores que producen frutos comerciales, mientras que las de verano son en su mayoría brotaciones vegetativas. En la brotación de primavera, los brotes pueden ser de varios tipos: brotes vegetativos (BV), aquellos que solo poseen hojas, brotes mixtos (BM), brotes vegetativos que diferencian flores en la axila de las nuevas hojas y una flor terminal, ramos florales (RF), inflorescencias sin hojas, flor solitaria (FS), y brotes campaneros (BC), que son brotes vegetativos que diferencian una flor terminal (Agustí, 2012).

En cada brotación, la yema axilar puede tener 3 destinos posibles: 1) puede quedar latente y no brotar, 2) puede brotar y adquirir un crecimiento indeterminado, es decir, convertirse en un brote vegetativo, y 3) puede llegar a ser un brote floral con crecimiento determinado. Para florecer, es necesario que se reúnan unas condiciones ambientales determinadas y que haya expresión de los genes responsables de la inducción e identidad floral del meristemo. Entre ellos, se encuentran los genes *FLOWERING LOCUS T (FT)*, *LEAFY (LFY)* y *APETALA1 (AP1)*. Por otra parte, *CENTRORADIALIS (CEN)* y *TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)*, son genes encargados de dotar al meristemo de un crecimiento indeterminado o vegetativo (Pnueli et al., 1998; Mohamed et al., 2010).

La inducción floral es el proceso a través del cual las yemas vegetativas son promovidas a florecer (Davenport, 1990). En los cítricos, el proceso se inicia con la bajada de las temperaturas por debajo de unos 15 °C durante unos 45 días (Nishikawa et al., 2007), y se localiza en las hojas,

donde se genera una señal proteica, la proteína FT, que se transporta al meristemo (Corbesier et al., 2007). El proceso se divide en dos fases: 1) una fase reversible en la que si se modifican las condiciones que determinan el desarrollo del proceso, no se da la iniciación floral y la yema continúa vegetativa, y 2) otra irreversible durante la cual, aunque se modifiquen las condiciones, el proceso de inducción floral se lleva a cabo, y el meristemo sufre la diferenciación floral (Urbina, 2002).

Posteriormente, ocurre la diferenciación floral. La diferenciación floral es la transición anatómica y morfológica de los meristemos vegetativos a meristemos florales (Davenport, 1990). Una vez la proteína FT llega al meristemo, esta forma un complejo heterodímero con la proteína FLOWERING LOCUS D (FD) y con ello activa la expresión en cascada de los genes responsables de la diferenciación floral, *LFY*, *AP1* y *SOC1* (Figura 4).

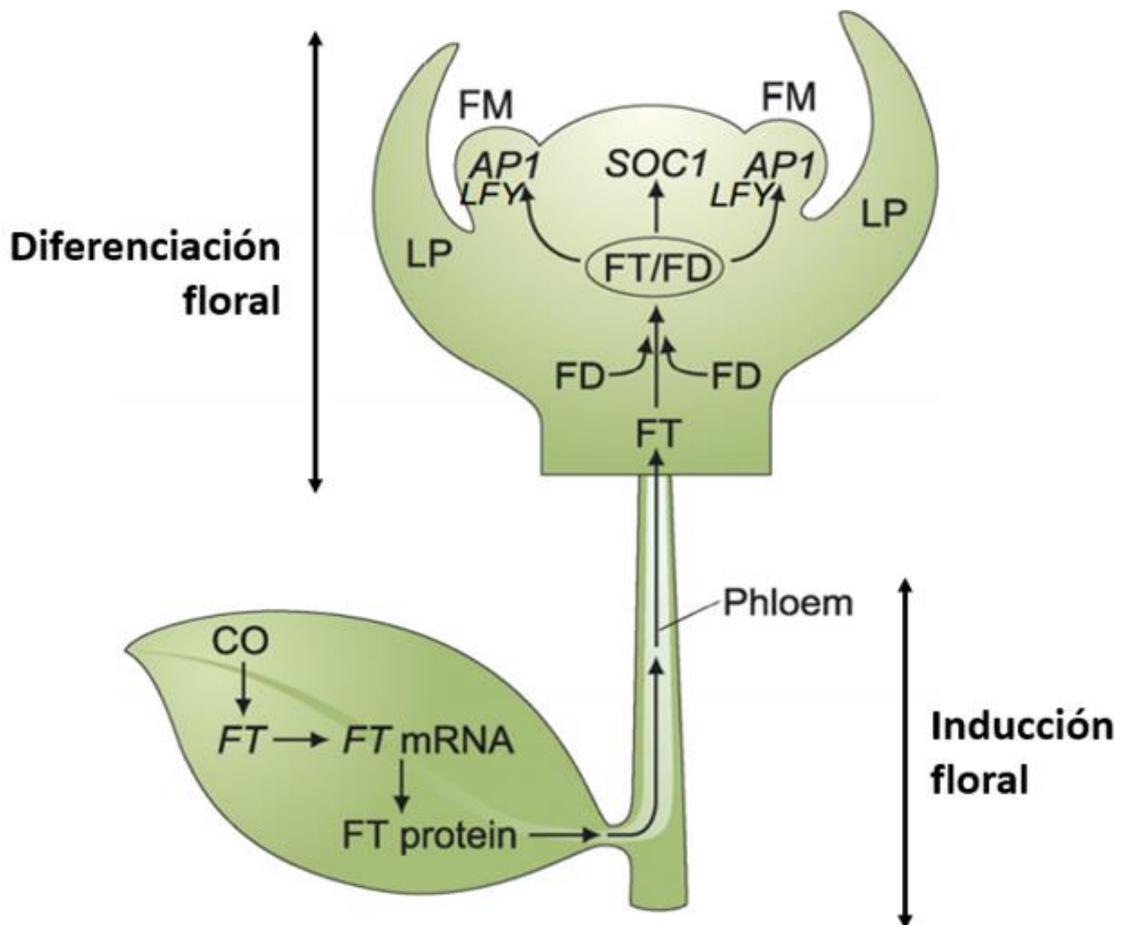


Figura 4. Esquema resumen de los procesos de inducción y diferenciación floral que se dan en la hoja y el meristemo (Zeevaart, 2008). El gen *FT* se expresa en las hojas en las células acompañantes del floema. La proteína *FT* se transporta vía floema hacia el meristemo apical. Allí forma un heterodímero con el gen *FD*. El conjunto *FD/FT* activa la expresión de *SOC1*, *AP1* y *LFY* que desencadenará la diferenciación floral. *FT*: FLOWERING LOCUS T; *FD*: FLOWERING LOCUS D; *SOC1*: SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1; *AP1*: APETALA1; *LFY*: LEAFY.

1.3. Factores promotores e inhibidores de la floración.

1.3.1. Factores promotores. Bajas temperaturas y estrés hídrico.

Los principales factores promotores de la floración en los cítricos son las bajas temperaturas y el estrés hídrico, mientras que la duración del día (horas de luz) no tiene ningún efecto (Lord y Eckart, 1985).

En clima tropical, la inducción floral se inicia con un déficit hídrico (Cassin et al., 1969). Este déficit prolongado hace que aumente la expresión en las hojas del gen *FT*, involucrado en la inducción floral. Una vez recuperado el estado hídrico se produce la diferenciación floral, por el aumento de la expresión en las yemas de los genes involucrados en este proceso, *LFY* y *AP1* (Chica y Albrigo, 2013). Para que haya una cantidad suficiente de yemas inducidas es necesario que el déficit hídrico se prolongue durante, al menos, un mes (Davies y Albrigo, 1994).

En el clima Mediterráneo, la inducción de la floración se produce como consecuencia de las bajas temperaturas en otoño (Valiente y Albrigo, 2004). Estas bajas temperaturas, que no deben ser inferiores a 5°C ni superiores a 20°C, siendo las óptimas entre 10 y 15°C (Chica y Albrigo, 2013), provocan un aumento de la expresión del gen *FT* en las hojas, iniciándose la inducción floral (Nishikawa et al., 2007). Una vez vuelven a subir las temperaturas a finales del invierno ocurre la diferenciación floral, aumentando la expresión de los genes *LFY* y *AP1*, involucrados en este proceso (Nishikawa et al., 2007).

1.3.2. Factores inhibidores: La presencia del fruto.

Es ya conocido el efecto inhibitorio sobre la floración que tiene la presencia del fruto en el árbol (García-Luís et al., 1986). Este efecto se ve incrementado cuanto más tiempo permanece el fruto en el árbol y cuanto mayor es la cosecha (Monselise y Goldschmidt, 1982; Valiente y Albrigo, 2004; Martínez-Fuentes, 2010). El fruto también inhibe el desarrollo vegetativo, por lo que reduce el número de yemas brotadas y, por tanto, la cantidad de posibles yemas diferenciadas en flor (Muñoz-Fambuena et al., 2012). Las hipótesis que tratan de explicar estos efectos son:

1. Hipótesis nutricional o balance de carbohidratos.

Las reservas movilizadas tienen dos destinos o sumideros, las yemas y los frutos. De este modo, el fruto tiene un efecto sumidero mayor que las yemas y reduce la cantidad de reservas (C principalmente) que llegan a estas. No obstante, existen algunos experimentos que no contemplan a los carbohidratos como un factor limitante para la floración en condiciones normales de cultivo (García-Luís et al., 1986; Agustí et al., 2020).

2. Hipótesis hormonal.

El contenido de giberelinas (GAs) endógenas entre octubre y diciembre es mayor en las yemas (naranja dulce cv. 'Valencia') y en las hojas (mandarino cv. 'Satsuma') de los brotes con fruto que no florecen que en los brotes vegetativos sin fruto que florecen abundantemente. Posteriormente, en febrero, las diferencias son mínimas (Jones et al., 1977; Koshita et al., 1999). Además, la aplicación exógena de AG reduce la floración (Guardiola et al., 1982). Estos resultados dieron lugar a proponer que las GAs producidas por el fruto podrían ser un factor regulador de la floración en los cítricos (Monselise y Goldschmidt, 1982; Martínez-Fuentes et al., 2004).

3. El mecanismo de inhibición por acción del fruto también se debe a la activación epigenética durante la inducción floral del gen represor de la floración *FLOWERING LOCUS C (FLC)*, cuyo homólogo en cítricos es el *CcMADS19* (Agustí et al., 2020). Este gen es el encargado de reprimir la acción del gen *CiFT3* (homólogo de *FT* en los cítricos y promotor de la floración), aunque la planta se encuentre en condiciones de baja temperatura favorables para la inducción floral, impidiendo el desarrollo de las flores en la siguiente brotación. Las yemas axilares y sus nuevos brotes vegetativos se reprograman epigenéticamente, reprimiendo el gen *CcMADS19* y permitiendo que en la siguiente inducción pueda expresarse el gen *CiFT3* (Mesejo et al., 2022).

Por otro lado, la presencia del fruto también influye sobre la brotación. Martínez-Fuentes et al. (2010) demostraron, en el mandarino cv. 'Nadorcott', que el retraso de la época de recolección de árboles con diferente intensidad de cosecha provoca una reducción de la brotación paralela a una reducción de la floración. No obstante el número de órganos por brote (número de hojas y/o flores) no fue alterado en ningún caso, lo que indica un efecto directo del fruto sobre la yema

impidiéndole brotar. El fruto, por tanto, no altera el número de flores por yema sino el número de yemas que brotan.

En resumen, la floración es inhibida por el fruto de dos formas (Guardiola et al., 1982; García-Luís et al., 1986): una directa, como consecuencia de la inhibición que provoca el fruto al reprimir los genes responsables de la inducción floral y una indirecta, reduciendo la cantidad de yemas brotadas y, por tanto, de flores emergidas (Muñoz-Fambuena et al., 2011; 2012).

1.3.3. Factores inhibidores. La acción de las giberelinas.

Las GAs son fitohormonas diterpenoides que desempeñan y regulan diversas funciones en el desarrollo de las plantas, tales como la germinación de las semillas, el alargamiento del tallo, la expansión de las hojas, el desarrollo del fruto y la floración (Achard y Genschik 2009, Daviere y Achard 2013, Wang et al., 2020).

Existen más de 130 estructuras de giberelinas diferentes, aunque sólo unas pocas son bioactivas; estas son las GA₁, GA₃, GA₄ y GA₇ (Yamaguchi, 2008). Las demás GAs son precursoras o formas inactivas. Las GAs bioactivas promueven la transducción de señales que involucran a dos conjuntos de reguladores, las proteínas DELLA y los receptores de GAs (Olszewski et al., 2002). En un primer momento se unen al receptor de las mismas, *GA-INTENSITIVE DWARF1 (GID1)*, y posteriormente, después de una cadena de sucesos, se degradan las proteínas DELLA y se desencadenan la respuesta de las GAs (McGinnis et al., 2003, Sasaki et al., 2003).

En los cítricos se ha demostrado ampliamente que la aplicación de GA₃ (ácido giberélico, AG) inhibe la floración, desde 1964, cuando se demostró la reducción de la floración en naranjo dulce cv. 'Shamouti' (Monselise y Halevy, 1964). Existen dos momentos de mayor sensibilidad en los que la aplicación de GA₃ reduce la floración, cada uno interfiriendo en un proceso distinto. El primero es más largo, durante la inducción floral (entre noviembre y diciembre, dependiendo de las temperaturas). En este momento el AG reduce la expresión del gen *CiFT3* (Muñoz-Fambuena et al., 2012; Goldberg-Moeller et al., 2013). El segundo momento de mayor sensibilidad tiene una duración menor, pero también tienen un efecto inhibitorio significativo en la floración. Ocurre al inicio de la diferenciación floral (Monselise y Halevy, 1964; Guardiola et al., 1982), e inhibe la expresión de los genes *AP1* y *AP2* (Tang y Lovatt, 2019)

La aplicación de GA₃ provoca una redistribución de los tipos de brotes en la siguiente brotación, haciendo que estos tengan una menor proporción de flores y un mayor crecimiento vegetativo (Guardiola et al., 1982). Así pues, existe un mayor número de brotes florales con hojas que brotes florales sin ellas. El GA₃ también reduce el número de yemas brotadas, teniendo un efecto similar al del fruto, sin embargo, mientras el fruto reduce la floración de las yemas más próximas de forma completa, el GA₃ activa su represión de forma parcial.

El efecto de las GAs también se puede explicar con inhibidores de su síntesis, como el paclobutrazol (PBZ). El PBZ es un inhibidor sintético de la enzima kaureno oxidasa, que participa al inicio de la ruta de biosíntesis de GAs (Rademacher, 2000). La aplicación de PBZ durante la inducción floral promueve la floración en cítricos (Delgado et al., 1986; Harty y Van Staden, 1988a; 1988b; Martínez-Fuentes et al., 2004; Monteiro da Cruz et al., 2008; Ogata et al., 1996). Esto sugiere que las aplicaciones exógenas de GA₃ disminuyen los niveles de floración mediante la modificación del balance hormonal endógeno, como lo demuestra la aplicación de paclobutrazol aumentando la floración. El PBZ, al contrario que el GA₃, aumenta el número de nudos brotados y la cantidad de brotes florales, reduciendo el número de brotes vegetativos (Martínez-Fuentes et al., 2013). Muñoz-Fambuena et al. (2012) demostraron que la aplicación de PBZ a 2000 ppm a principios de diciembre sobre 'Salustiana' provoca un aumento directo de la expresión del gen *CiFT*, que posteriormente se traduce en un aumento de la expresión de *CsLFY* y de la floración.

Limitaciones de los tratamientos con AG y PBZ

Aunque se haya demostrado la efectividad del PBZ y del GA₃, esta se pierde en los casos más extremos. Así pues, cuando hay un exceso de floración o una falta de floración muy acusadas estos fitorreguladores no consiguen promover una cantidad de flores adecuada. En los cítricos, una intensidad de floración media (25-50 flores por 100 nudos) proporciona una cosecha adecuada. Cuando ésta supera las 150 flores por 100 nudos, el porcentaje de cuajado se reduce significativamente (Agustí et al., 1982). En experimentos realizados con el mandarino 'Fortune' y el tanger 'Ellendale', con una floración de más de 200 flores por 100 nudos, se realizaron tratamientos con GA₃ a una concentración de 25 mg/l, pero tan solo se consiguió una reducción de la floración hasta las 180 flores por 100 nudos. Haciendo un tratamiento con el doble de concentración tampoco se consiguió una reducción notable del número de flores (Martínez-Fuentes et al., 2004).

En cuanto al PBZ, su aplicación aumenta la floración en árboles sin fruto (OFF), no obstante a partir de una cantidad de frutos su efecto se anula (Martínez-Fuentes et al, 2013), precisamente

cuando sería de interés agronómico su aplicación. La efectividad del PBZ también depende del momento y tipo del tratamiento, ya que su efecto se debe a que este antagonista de las GAs tiene que llegar al destino antes de que las GAs se sinteticen (Monselise y Goldschmidt, 1982).

1.4. Hipótesis de trabajo y objetivos.

Con el objetivo general de conocer el papel de las GAs en la inhibición de la floración, el presente TFM plantea la siguiente hipótesis: “El efecto inhibitor de las giberelinas sobre la floración cuando se aplican en etapas previas a la inducción floral (septiembre) es debido al control génico de la identidad del meristemo.

Los objetivos del trabajo son:

1. Estudiar el efecto de la aplicación de AG antes de la inducción floral sobre la floración en el naranjo dulce ‘Lane late’.
2. Estudiar el mecanismo de acción del tratamiento con AG a través de la aplicación localizada de AG a hoja y yema y la cuantificación de
 - a. la expresión de los genes promotores de la floración *CiFT3* (en hoja) y *CsLFY* (en yema).
 - b. la expresión del gen *CsCEN* (en yema) relacionado con el crecimiento indeterminado del meristemo.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Material vegetal.

Los experimentos se han llevado a cabo con 25 árboles adultos y sanos de naranjo dulce (*Citrus sinensis* L.) variedad 'Lane late' de la finca 'La Reva' en el término municipal de Torrent (Valencia). El marco de plantación es de 6x4 metros, con orientación de los árboles norte-sur, y fertirrigación, control de plagas y enfermedades llevado a cabo por los técnicos de la finca según las normas de Producción Integrada.

2.2. Diseño experimental.

En el primer experimento se estudió el efecto temporal del AG (aplicado antes, durante y después de la época de inducción) sobre la brotación, floración y la expresión de los genes de la inducción floral (*CiFT3*) e identidad del meristemo (*CsLFY* y *CsCEN*); en el segundo experimento se estudió el efecto espacial del AG (aplicado a rama, hoja o yema) en la época anterior a la inducción.

Para el primer experimento, el día 6 de septiembre se marcaron brotes de primavera de entre 5 y 10 nudos. En total se marcaron 60 brotes por tratamiento:

- I. 180 brotes OFF (sin fruto) para tratar en septiembre (6/9), noviembre (25/11) y diciembre (28/12) con GA₃ a una concentración de 50 mg l⁻¹ mediante un pulverizador manual.
- II. 60 brotes OFF, como controles capaces de florecer.
- III. 60 brotes ON (con fruto en posición terminal), como controles incapaces de florecer.

El periodo de inducción floral se inicia cuando la temperatura se sitúa por debajo de 15°C, y se debe mantener durante más de 30 días (Nishikawa et al., 2007). En las condiciones del

experimento, la temperatura media se mantuvo por debajo de 15°C a partir del mes de noviembre (figura 5), lo que determinó la fecha de los tratamientos.

Para estudiar el efecto del tratamiento sobre la expresión de los genes de la floración se tomaron muestras 48h después de cada aplicación. En concreto, se recogieron 12 brotes tratados y de los controles ON y OFF en cada una de las fechas. Estos se transportaron a una temperatura de unos 4°C hasta el laboratorio, donde se separaron las hojas y las yemas y se congelaron con nitrógeno líquido. Las muestras se almacenaron a -80°C.

El resto de brotes, 24 por cada tratamiento, se utilizaron para evaluar la floración en primavera (23/3).

En el segundo experimento se aplicó GA₃ (50 mg l⁻¹) a brotes enteros, con un pulverizador manual, o de forma localizada sobre las hojas y las yemas mediante la ayuda de un pincel. El experimento se realizó en 45 brotes por tratamiento el día 6 de septiembre. Dos días después del tratamiento se muestreó 15 brotes por tratamiento para determinar el efecto de la aplicación localizada de GA₃ sobre la expresión de los genes de la floración, y, finalmente, el día 23 de marzo se evaluó la floración. Se hizo un conteo manual del número de flores, del número de brotes y del tipo de brotes emergidos de cada yema brotada (vegetativo, mixto, campanero, ramo de flor o flor solitaria).

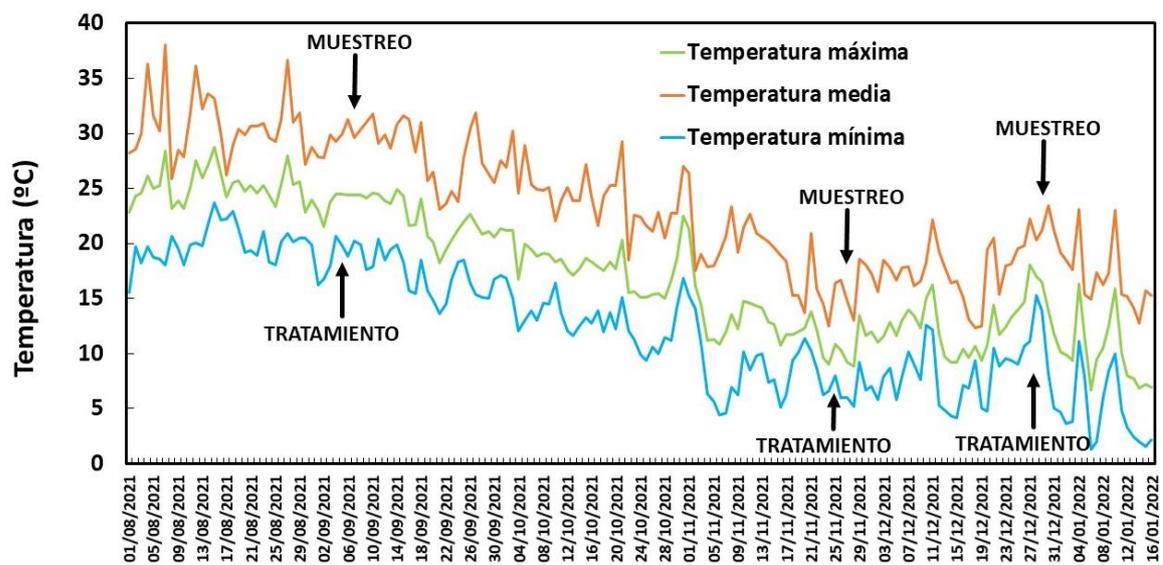


Figura 5. Evolución de la temperatura máxima, mínima y media durante el periodo del experimento. La flechas indican el momento de los tratamientos y los muestreos. Fuente: Elaboración propia a partir de los datos de la estación meteorológica del IVIA de Torrente.

2.3. Preparación de muestras.

Los 12 brotes de cada muestra se separaron, al azar, en 3 réplicas de 4 brotes cada una. Para determinar la expresión génica de *CiFT3* se tomaron 3 hojas de cada réplica, y para determinar la expresión de *CsCEN* y *CsLFY* se separaron las yemas de todos los brotes con la ayuda de un bisturí. Hojas y yemas se congelaron con nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C en tubos de ensayo. Posteriormente, y con la ayuda de N₂ líquido y un mortero especial, se molieron todas las muestras sin romper la cadena del frío para poder realizar la extracción del mRNA.

2.4. Extracción del mRNA.

La extracción de mRNA consiste en los procedimientos que permiten eliminar las barreras físicas y químicas del mRNA, tales como polifenoles, proteínas, metabolitos secundarios, polisacáridos, etc. El protocolo de extracción de mRNA tiene una duración de dos días y se divide en 2 partes. Durante la primera, realizada el primer día, se pesan 0,5 gramos del material vegetal pulverizado. Los 0,5 gramos de muestra se colocan en un tubo de 15 ml, en el que se añaden también 2 ml de TCES (0.2 Tris pH=8 + 0.2M NaCl + 50 mM EDTA + 2% SDS), 40 µl β-mercaptoetanol y 2 ml de fenol ácido. Posteriormente, con ayuda del vórtex se homogeniza la mezcla durante alrededor de 1 minuto y se coloca durante 20 minutos en un baño con agua a 50°C, homogeneizando la mezcla varias veces durante el proceso. Más tarde, se centrifuga durante otros 20 minutos a 10.500 r.p.m y después se recupera el sobrenadante mediante una pipeta y se deposita en un tubo de 15 ml. Posteriormente se añade la misma cantidad que la extraída de sobrenadante de cloroformo isoamílico (24:1), se homogeniza la mezcla con la ayuda del vórtex, y se centrifuga a 10.500 r.p.m. durante 5 minutos. Antes de terminar la primera etapa se extrae el sobrenadante del resultado de la centrifuga y se añade la mitad del volumen extraído de LiCl 6M (DEPC), y se deja precipitar a -20°C toda la noche.

En la segunda fase, al día siguiente, se comienza con el centrifugado de la muestra dejada reposar durante 20 minutos a 10.500 r.p.m para extraer el precipitado que queda en el fondo del tubo. El sobrenadante de LiCl se desecha y el precipitado se lava añadiendo 200 µl de EtOH 70% (a -20°C) y centrifugando, de nuevo, 5 minutos a 10.500 r.p.m. El sobrenadante de EtOH se elimina y se

deja secar al aire en la campana extractora durante 1 hora, y finalmente se suspende en 100 μ l de agua.

Por último, para cuantificar la cantidad y calidad del mRNA libre obtenido de la suspensión anterior, se utilizó un equipo NanoDrop ND-100 (NanoDrop Technologies).

2.4. Rt-qPCR.

Para la cuantificación relativa mediante PCR se utilizó el kit QuantiTect® SYBR® Green PCR Kit (Qiagen), según las instrucciones del fabricante. Para cada muestra se emplearon 2,5 μ l fruto de la reacción de retrotranscripción anterior. El programa que se utilizó 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). Al final del proceso de alineamiento se midió la fluorescencia. Los oligonucleótidos específicos para poder amplificar cada gen (Tabla 1) se emplearon a una concentración de 0,3 μ M. Al terminar cada qPCR se realizó otra operación consistente en el análisis de la curva del punto de fusión, y con ello poder detectar la presencia de amplificaciones inespecíficas o de dímeros. Se llevaron a cabo tres réplicas técnicas de cada muestra de cDNA, incluyéndose dos controles en los que para el molde de cDNA se usó agua para poder detectar la posible formación de dímeros o presencia de contaminación.

2.5. Análisis estadístico.

La evaluación estadística de los resultados se llevó a cabo mediante un análisis de la varianza (ANOVA), utilizando la mínima diferencia significativa (LSD) para comparar las medias. Los datos experimentales se analizaron con el software Statgraphics Centurion XVIII (Gráficos estadísticos, Englewood Cliffs, NJ, EE.UU). También se empleó la herramienta informática Excel para el análisis de los resultados.

Tabla 1. Genes y cebadores elegidos para el análisis de expresión génica.

GEN	ID EST code	DESCRIPCIÓN	ORIENTACIÓN DEL PRIMER	SECUENCIA (5'-3')
CiFT3	Ciclev10012905m	Promotor de la inducción floral	F	AGACTGTTTATGCACCGGGG
			R	AGTTGAAGTAGACAGCGGCC
CsLFY	aC34107C06EF_c	Promotor de la diferenciación	F	TCTTGATCCAGGTCCAGAACATC
			R	TAGTCACCTTGTTGGGCATT
CsCEN	Ciclev10029782mCDS	Promotor del crecimiento indeterminado	F	CCAGCTTCAAGGGATCGGTT
			R	GAGCAGCAGTCTCCCTTTGT
LYC	Ciclev10025866m	Gen de referencia	F	GAACCAGGAGCTTAGGTCTG
			R	GCTAGGTCTACAACAAGGCC

3. RESULTADOS

3.1. Efecto de la aplicación de AG antes, durante y después de la inducción floral sobre la floración del naranjo dulce cv. Lane Late.

Las ramas sin fruto (OFF) de los árboles del cv. Lane late presentaron una intensidad de floración de 413,3 flores/100 nudos en promedio. El tratamiento con AG redujo significativamente la floración respecto de las ramas OFF, con diferente respuesta en función de la época de aplicación. Así, el tratamiento realizado en septiembre redujo la intensidad de floración un 96% (17,4 flores/100 nudos en promedio). Este tratamiento no mostró diferencias significativas con el tratamiento de AG realizado en noviembre, que redujo la floración un 85% (64,7 flores/100 nudos en promedio), pero sí difirió significativamente del tratamiento realizado en diciembre, cuya eficacia reduciendo la floración fue significativamente menor, un 15% (311,3 flores/100 nudos en promedio). Las ramas con fruto (ON), utilizadas como control negativo, no florecieron (Figura 6).

En cuanto a la brotación de primavera, las ramas OFF tuvieron 105,4 brotes/100 nudos, en promedio, las ramas OFF tratadas con AG en septiembre tuvieron 18,3 brotes/100 nudos, las tratadas en noviembre tuvieron 39,7 brotes/100 nudos y las tratadas en diciembre tuvieron 75,9 brotes/100 nudos. Las ramas ON brotaron escasamente, 13,6 brotes/100 nudos en promedio (Figura 7A). La formación de más de un brote por nudo (nudos múltiples) presentó una pauta similar a la brotación general. En las ramas OFF se cuantificaron 30,5 nudos múltiples/100 nudos, mientras que se cuantificaron 1,5, 3,2 y 15,9 nudos múltiples/100 nudos en las ramas tratadas con AG en septiembre, noviembre y diciembre, respectivamente. En el caso de las ramas ON no hubo brotes múltiples (Figura 7B).

La reducción de la floración correlacionó significativamente con la reducción de la brotación ($y = 0,197x + 1,4275$; $r = 0,89$), y la eficacia del tratamiento con AG dependió significativamente de la época de aplicación, siendo menor cuanto más cerca estaba el momento de la diferenciación.

Pero la reducción de la floración no se debió exclusivamente a la reducción de la brotación sino también a la reducción del número de flores por yema brotada, de modo que los tratamientos con AG en septiembre y noviembre también redujeron significativamente el número de flores por

yema brotada, de 4 a 1 en comparación con las ramas OFF, mientras que el tratamiento de diciembre no difirió del control (Figura 8).

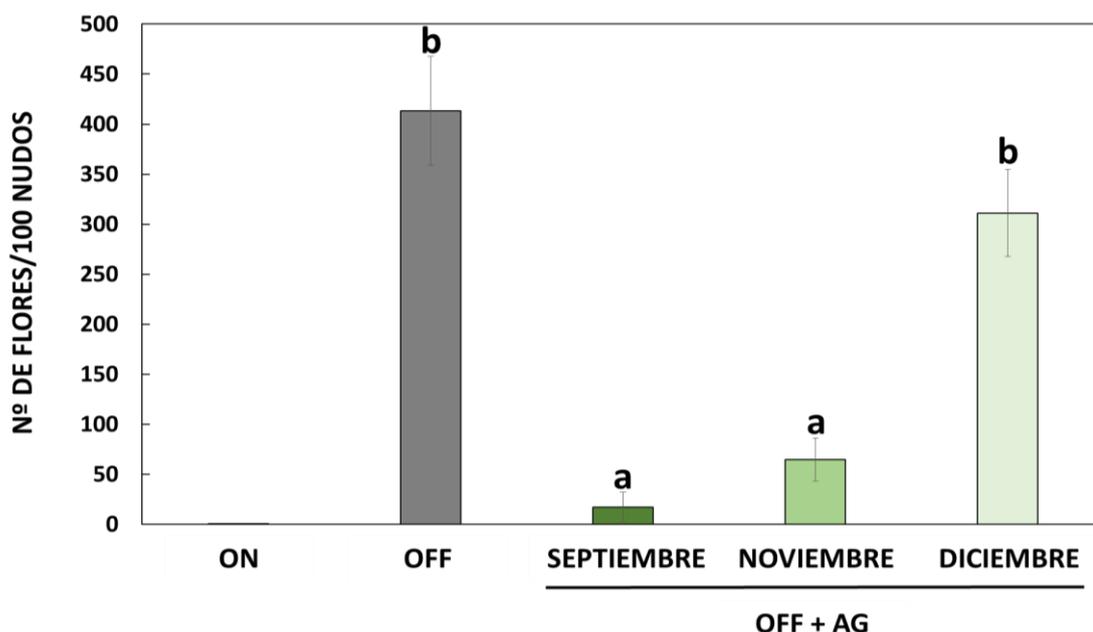


Figura 6. Efecto de la aplicación de AG (50 mg l^{-1}) a ramas sin fruto (OFF) en septiembre (6 de septiembre), noviembre (25 de noviembre) y diciembre (28 de diciembre), sobre la floración del naranjo cv. "Lane late". Las ramas con fruto (ON) se evaluaron como control incapaz de florecer. Cada valor es la media de 24 brotes. Las barras verticales indican el error estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

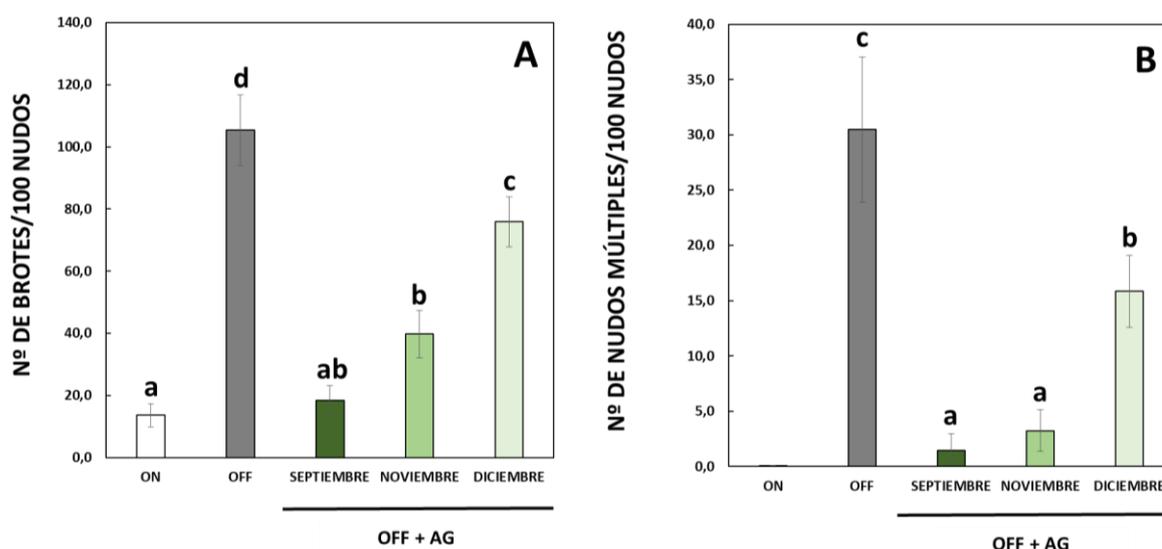


Figura 7. Efecto de la aplicación de AG (50 mg l^{-1}) a ramas sin fruto (OFF) en septiembre (6 de septiembre), noviembre (25 de noviembre) y diciembre (28 de diciembre), sobre la brotación (A) y el número de brotes múltiples (B) del naranjo cv. "Lane late". Las ramas con fruto (ON) se evaluaron como control incapaz de florecer. Cada valor es la media de 24 brotes. Las barras verticales indican el error estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

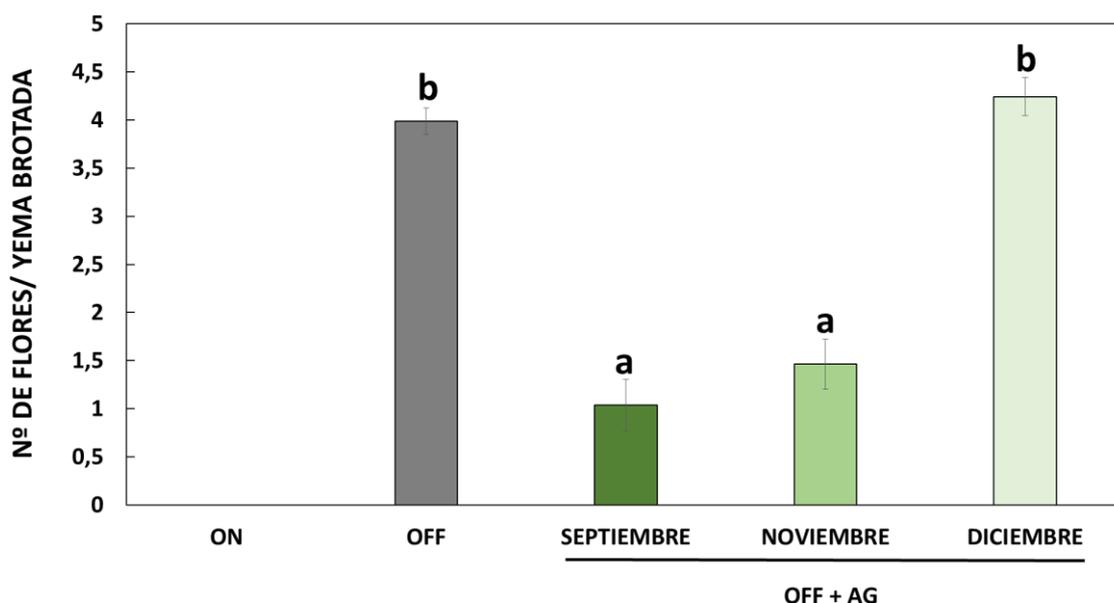


Figura 8. Efecto de la aplicación de AG (50 mg l^{-1}) a ramas sin fruto (OFF) en septiembre (6 de septiembre), noviembre (25 de noviembre) y diciembre (28 de diciembre), sobre la floración del naranjo cv. "Lane late". Las ramas con fruto (ON) se evaluaron como control incapaz de florecer. Cada valor es la media de 24 brotes. Las barras verticales indican el error estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

Los tratamientos con AG también modificaron significativamente la distribución de los tipos de brotes, tanto en términos absolutos como relativos. Así, en las ramas OFF la mayoría de brotes fueron ramos de flor (RF), con $82,3 \text{ RF} / 100 \text{ nudos}$, es decir, el 77% de los brotes. El resto de brotes de las ramas OFF fueron mayoritariamente reproductivos [$9,85 \text{ flores solitarias (FS)} / 100 \text{ nudos}$, $8,76 \text{ brotes mixtos (BM)} / 100 \text{ nudos}$ y $2,04 \text{ brotes campaneros} / 100 \text{ nudos}$], y tan solo $3,9 \text{ brotes vegetativos (BV)} / 100 \text{ nudos}$. En las ramas ON todos los brotes fueron vegetativos, en concreto había $13,61 \text{ brotes vegetativos}$ por cada 100 nudos (Figura 9).

Las ramas tratadas con AG en septiembre mostraron una reducción significativa de los RF ($2,9/100 \text{ nudos}$) y las FS ($1,48/100 \text{ nudos}$) respecto de las ramas sin tratar, y un aumento de los BV ($12,02 \text{ BV}/100 \text{ nudos}$), que representaron el 63,4 % del total. El efecto del tratamiento fue muy similar al provocado por el fruto. Pero mientras el fruto anuló la floración, en las ramas tratadas con AG en septiembre hubo un 37% de brotes florales, además de los RF y FS citados anteriormente, $1,87 \text{ brotes mixtos}/100 \text{ nudos}$ y $0,94 \text{ brotes campaneros}$ (Figura 9).

La distribución de brotes de las ramas tratadas con AG en noviembre fue muy similar a la de las ramas tratadas en septiembre, con la excepción de las FS, ya que su número no se redujo por efecto del tratamiento en comparación a las ramas OFF. En las ramas tratadas con AG en diciembre la mayoría de brotes fueron brotes mixtos, con 61,45 BM/100 nudos (el 77% de los brotes) (Figura 9).

En resumen, los tratamientos con AG en cualquier época reducen significativamente los ramos de flor y aumentan, en general, los otros tipos de brotes, destacando el incremento de brotes vegetativos provocado por el tratamiento de septiembre y de brotes mixtos en el tratamiento de diciembre, lo que sugiere diferencias en el mecanismo de acción.

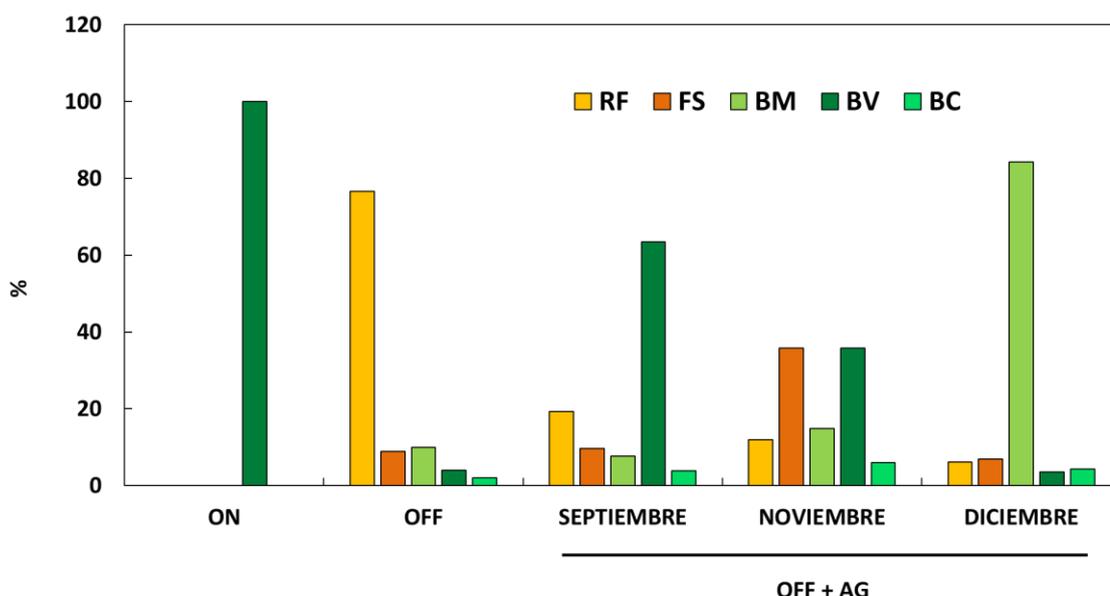


Figura 9. Efecto de la aplicación de AG (50 mg l^{-1}) a ramas sin fruto (OFF) en septiembre (6 de septiembre), noviembre (25 de noviembre) y diciembre (28 de diciembre), sobre la distribución porcentual del tipo de brotes del naranjo cv. "Lane late". Cada valor es la media de 24 brotes. Las ramas con fruto (ON) se evaluaron como control incapaz de florecer. RF: ramo de flor; FS: flor solitaria; BM: brote mixto; BV: brote vegetativo; BC: brote campanero.

3.2. Efecto de la aplicación localizada de AG, antes de la inducción floral, sobre la floración del naranjo dulce var. Lane Late.

Con el fin de determinar el modo de acción de la aplicación de AG en la hoja y en la yema, se estudió el efecto individual del AG en la hoja y en la yema. La intensidad de floración de las ramas control fue abundante (413,35 flores/100 nudos), y los tratamientos localizados con AG la redujeron con independencia del órgano tratado. Así, la aplicación de AG a toda la rama redujo la floración hasta 116,06 flores/100 nudos, el tratamiento localizado a hojas la redujo hasta 94,15 flores/100 nudos, y el tratamiento localizado a yemas la redujo hasta 200,07 flores/100 nudos. En las ramas ON no hubo flores (Figura 10).

La brotación también se redujo por efecto de los tratamientos localizados, pero en este caso sí que hubo diferencias entre los tratamientos. La aplicación de AG a las hojas y ramas redujo significativamente la brotación respecto de las ramas OFF sin tratar (30, 46 y 105 brotes/100 nudos, respectivamente). El tratamiento localizado a yemas fue significativamente menos eficaz que el tratamiento a hojas (Figura 11A).

La cuantía de nudos múltiples también se redujo por efecto de los tratamientos localizados, de 30 nudos múltiples/100 nudos en el control a 3, 4 y 12 nudos múltiples/100 nudos en las ramas con tratamiento localizado a hoja, rama y yema, respectivamente. Sin embargo, en este caso, no se alcanzó la significación estadística (Figura 11B).

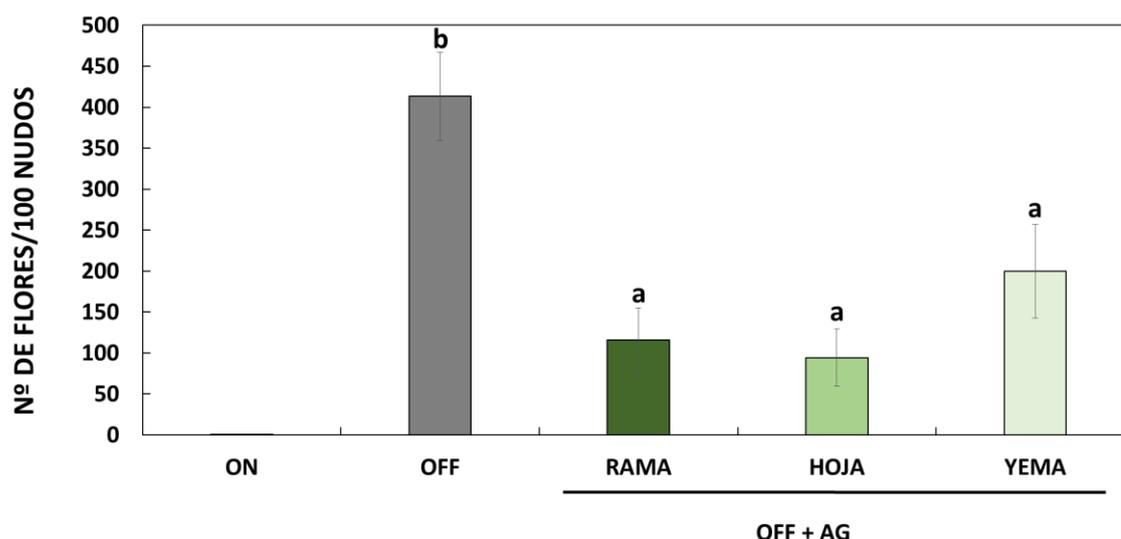


Figura 10. Efecto de la aplicación localizada de AG (50 mg l⁻¹) a ramas, hojas y yemas sobre la floración de naranjo cv. "Lane late". Las ramas con fruto (ON) se evaluaron como control incapaz de florecer. Los tratamientos se realizaron el 6 de septiembre. Cada valor es la media de 30 brotes. Las barras verticales indican el error estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (P<0,05).

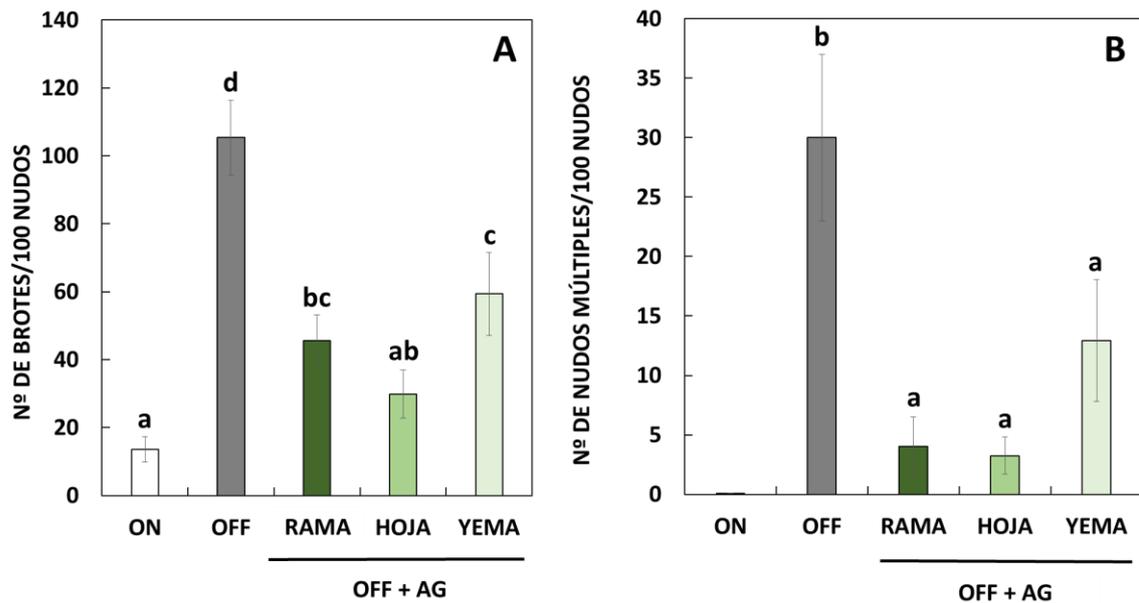


Figura 11. Efecto de la aplicación de AG (50 mg l^{-1}) a rama, hoja y yema sobre el número de brotes (A) y sobre la cantidad de nudos múltiples (B) del naranjo cv. "Lane late". Las ramas con fruto (ON) se evaluaron como control incapaz de florecer. Los tratamientos se realizaron el 6 de septiembre. Cada valor es la media de 30 brotes. Las barras verticales indican el error estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

Por último, los tratamientos localizados también modificaron la distribución de los tipos de brotes respecto del control, especialmente reduciendo las inflorescencias sin hojas. Así, los tres tratamientos redujeron significativamente el número de RF de 80 RF/100 nudos en el control a 19, 16 y 21 RF/100 nudos en los tratamientos a ramas y localizados a hojas y yemas, respectivamente (Figura 12), y el número de FS de 10 a 0, 2 y 5 FS/100 nudos, en el control, y los tratamientos a rama, hoja y yema, respectivamente.

El tratamiento a yema promovió la formación de BM hasta los 23,6 BM/100 nudos, mientras que aunque en general se aumentó la formación de BC y BV no se alcanzó la significación estadística respecto del control (Figura 12).

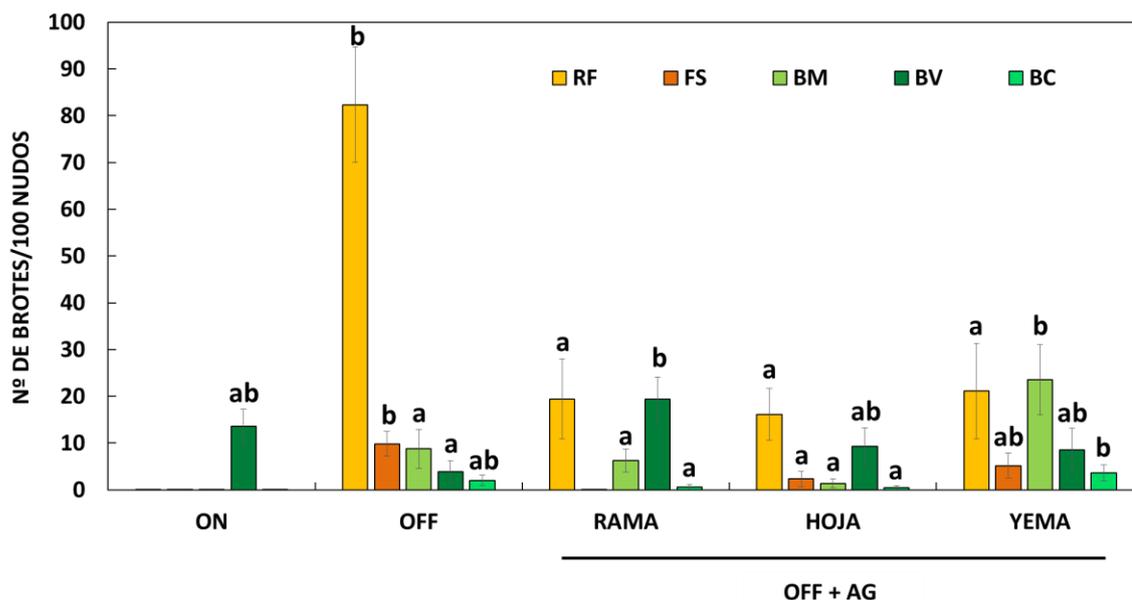


Figura 12. Efecto de la aplicación de AG (50 mg l⁻¹) a rama, hoja y yema sobre el tipo de brotes del naranjo cv. “Lane late”. Las ramas con fruto (ON) se evaluaron como control incapaz de florecer. Los tratamientos se realizaron el 6 de septiembre. Cada valor es la media de 30 brotes. Las barras verticales indican el error estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (P<0,05).

3.3. Efecto de la aplicación de AG en la expresión de los genes *CiFT3* en la hoja y *CsLFY* y *CsCEN* en la yema.

Para determinar el mecanismo de acción a través del cual la aplicación de AG dos meses antes de la inducción floral reduce la floración en el naranjo dulce cv. “Lane late” se determinó la expresión relativa del gen *CiFT3* en la hoja, responsable de la inducción floral, y de los genes *CsLFY*, que participa en la identidad floral del meristemo, y del gen *CsCEN*, uno de los genes encargados del crecimiento indeterminado del meristemo.

La aplicación de AG a la rama en el mes de septiembre no tuvo ningún efecto en la expresión relativa de *CiFT3* a corto plazo (48h después del tratamiento) respecto de las ramas OFF. Sin embargo, el efecto a largo plazo sí se modificó significativamente por efecto del tratamiento. Así, tanto en noviembre como en diciembre la expresión de *CiFT3* en las hojas de las ramas OFF aumentó significativamente por efecto de las bajas temperaturas, pero el AG, como la presencia

del fruto (ON), bloqueó el aumento de la expresión de *CiFT3* anulando el efecto de la baja temperatura (Figura 13).

A diferencia del efecto sobre la hoja, el tratamiento con AG sí que tuvo efecto a corto plazo (48h) en la expresión de los genes de la identidad floral de las yemas. La expresión de *CsLFY* fue ligeramente superior en los tratamientos a yema y rama, en comparación con las yemas de las ramas OFF sin tratar. Pero el hecho de que no difirieran significativamente de las yemas de las ramas ON, que no son capaces de inducir la floración, sugiere que esta diferencia es irrelevante desde el punto de vista de la floración (Figura 14A). Por otra parte, la expresión relativa del gen *CsCEN* sí que mostró un aumento consistente y significativo por efecto de la aplicación de AG, tanto en los tratamientos a ramas como a yemas, pero no a hojas, respecto de ambos controles con fruto (ON) y sin fruto (OFF) (Figura 14B).

Estos resultados sugieren que, en septiembre, 1) la identidad floral del meristemo axilar todavía no se ha promovido, y 2) que las yemas muestran sensibilidad a las GAs para promover, o mantener, la identidad vegetativa del meristemo axilar.

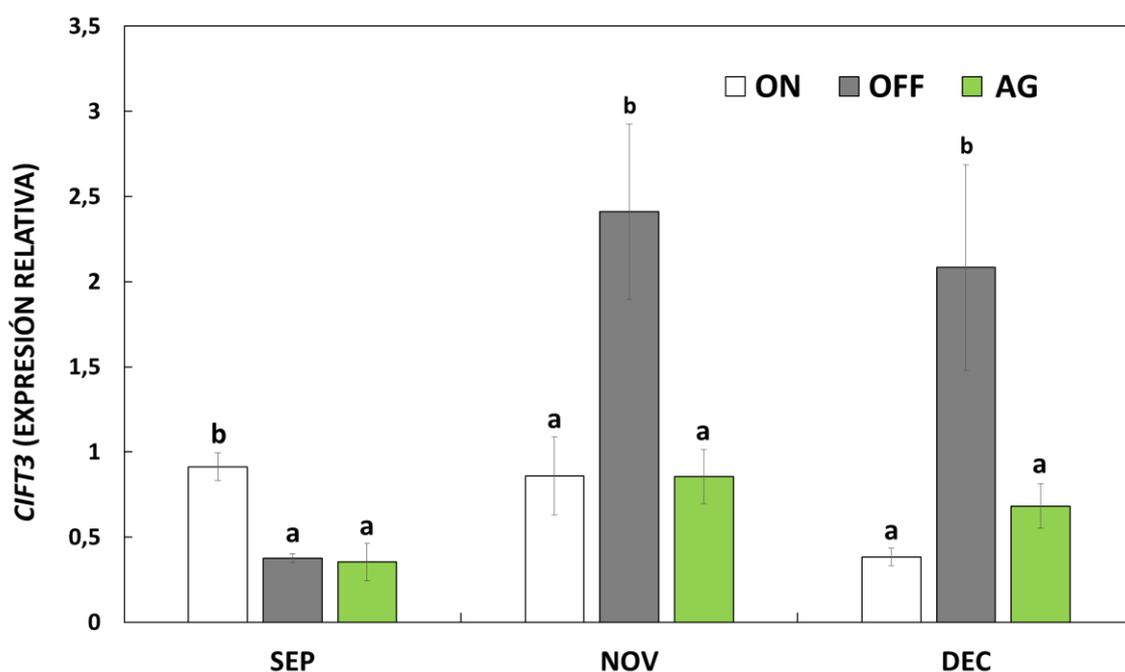


Figura 13. Evolución de la expresión relativa del gen *CiFT3* en hojas de ramas con fruto (ON), sin fruto (OFF) y tratadas con AG en septiembre en el naranjo cv. "Lane late". El muestreo de septiembre se realizó 48 h después del tratamiento con AG. Los tratamientos se realizaron el 6 de septiembre. Cada valor es la media de 3 RT-qPCR independientes. Las barras verticales indican el error estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

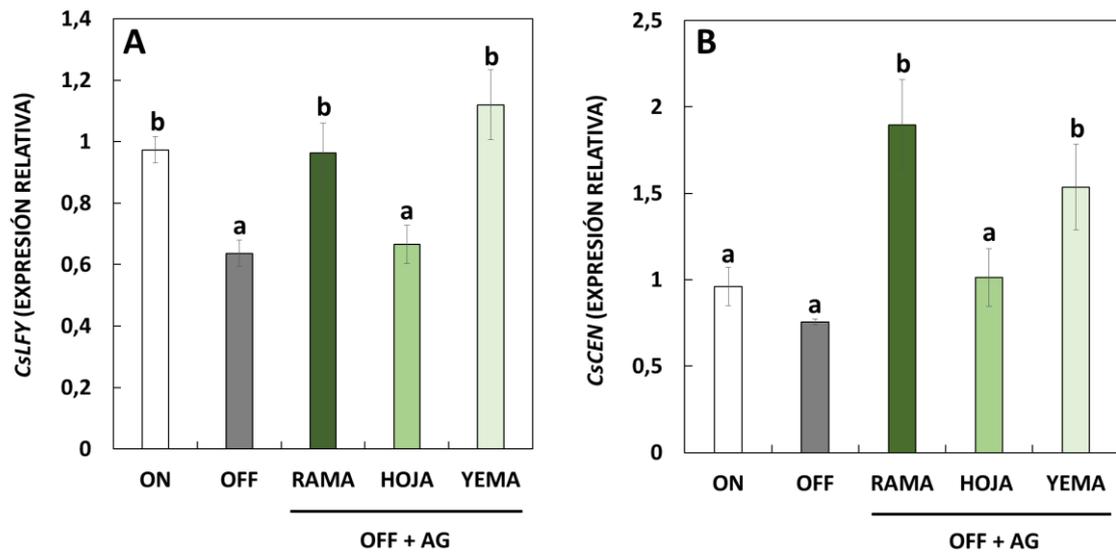


Figura 14. Expresión relativa de los genes *CsLFY* (A) y *CsCEN* (B) en las yemas de ramas con fruto (ON) sin fruto (OFF) y tratadas con AG en septiembre en el naranjo cv. "Lane late". Los tratamientos se realizaron el 6 de septiembre. Cada valor es la media de 3 RT-qPCR independientes. El muestreo se realizó 48 h después del tratamiento con AG. Las barras verticales indican el error estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

4. DISCUSIÓN

El periodo de inducción floral de los cítricos tiene lugar a finales de otoño para el naranjo dulce y los mandarinos Clementinos e híbridos, y un mes más tarde para el mandarino Satsuma (Guardiola et al., 1982; García-Luís et al., 1986; Lord y Eckart 1987; Nishikawa et al., 2007; Muñoz-Fambuena et al., 2011). Sin embargo, es posible encontrar épocas de gran sensibilidad al tratamiento con AG muy alejadas de dicho periodo, como demuestran los resultados de este TFM para el naranjo dulce, que confirman los obtenidos anteriormente por Guardiola et al., (1982) y Martínez-Fuentes (2010), y para el mandarino Satsuma (García-Luís et al., 1986). En este último estudio, se determinó la presencia de dos periodos de máxima respuesta frente al AG, uno entre septiembre y noviembre, y otro en el mes de enero. Entre los dos periodos, se observa una pérdida de sensibilidad a la aplicación de AG (Guardiola et al., 1982; García-Luís et al., 1986), como también se confirma en este TFM con la aplicación a finales de diciembre respecto de las de septiembre y noviembre (**Figuras 6 y 7A**).

La eficacia del tratamiento realizado en septiembre presenta importancia desde el punto de vista agronómico, porque permitiría regular la floración sin afectar el periodo de recolección del fruto en variedades de media estación, ya que aplicaciones tempranas de AG no influye en el cambio de color (Gambetta, 2009). Pero, más allá de esta consecuencia práctica, los resultados de este TFM aportan nueva información para la comprensión del proceso de transformación de una yema vegetativa en floral, y el papel regulador que las GAs tienen en él.

La reducción de la floración obtenida mediante el tratamiento de AG en septiembre fue muy eficaz, como lo fue el fruto (**Figura 6**), y no solo se debió a la reducción de la brotación y número de nudos múltiples (**Figura 7**), sino también a la reducción del número de flores por yema brotada (**Figura 8**) y a una redistribución de los tipos de brotes formados. Particularmente importante fue la reducción porcentual de ramos de flor y el aumento de brotes vegetativos (**Figura 9**). Por el contrario, la aplicación de diciembre solo redujo ligeramente la brotación y el número de nudos múltiples, y no promovió la formación de brotes vegetativos. En este tratamiento destacó la transformación de ramos de flor en brotes mixtos, sin modificar el número de flores por yema brotada, lo que podría ser debido a un estímulo del desarrollo de los entrenudos y las hojas que no desarrolla el ramo de flor (Cervera, 2021).

Todo ello indica la importancia del estado de la yema en el momento del tratamiento. La hipótesis mayormente aceptada, respecto del estado de la yema, propone que la yema es vegetativa por defecto, y se transforma a floral promovida por señales exógenas. Mientras en septiembre las yemas no deben haber adquirido la identidad floral siendo, por tanto, vegetativas, a finales de diciembre ya pueden haberla adquirido, lo que justificaría las diferencias en la formación de brotes vegetativos entre la aplicación de AG de septiembre y diciembre (Lord y Eckart, 1985; 1987). Los resultados de expresión génica del mes de septiembre apoyan, en parte, esta hipótesis. Así, la expresión del gen *CsLFY* en las yemas no mostró diferencias significativas entre las ramas OFF y tratadas con AG (**Figura 14**). Pero también es cierto que las yemas, en septiembre, ya son sensibles a la presencia del fruto, ya que el aclareo provoca un aumento de la expresión de los genes *CsLFY* y *CsSPL5* (Shalom et al., 2014). Es decir, la eliminación del factor que *mantiene la identidad vegetativa de la yema* (fruto) provoca un estímulo de la expresión de genes de identidad floral, incluso antes del periodo de inducción. Sin embargo, la aplicación de un factor inhibidor (AG) a ramas sin fruto (que no tienen reprimida la capacidad de florecer) no redujo la expresión del gen *CsLFY*. Todo ello sugiere que el fruto regula la identidad de la yema por un mecanismo diferente a la aplicación de AG, o que la hormona actúa aguas abajo en la ruta de señalización. De lo que no hay duda es que el AG activa la expresión de *CsCEN*, lo que podría relacionarse con el *mantenimiento de la identidad vegetativa de la yema*. Este resultado también ha sido observado cuando el tratamiento se realiza en noviembre y diciembre (Cervera, 2021).

El tratamiento con AG en septiembre no redujo la expresión del gen *CiFT3* en las hojas a corto plazo (48 h) respecto de las ramas OFF (**Figura 13**), lo que no es de extrañar porque su activación requiere la presencia de la señal inductiva (frío) (Nishikawa et al., 2007). No obstante, sí que hubo un efecto represivo de la expresión de *CiFT3* a largo plazo (dos meses) cuando el frío activó la expresión del gen en las ramas sin tratar, similar al que se produce cuando el tratamiento se realiza en plena época de inducción, es decir, noviembre (Muñoz-Fambuena et al., 2012; Goldberg-Moeller et al., 2013). El mecanismo a través del cual el AG reprime la expresión de *CiFT3* y la inducción floral es desconocido. Por una parte, la aplicación de AG no promueve la expresión del gen inhibidor *CcMADS19* como sí hace el fruto (Agustí et al., 2020; Mesejo et al., 2022 a y b), por lo que su acción a largo plazo debe ser explicada de otro modo. Una posibilidad sería que la aplicación de AG modificara los mecanismos de señalización GID1-DELLA, como ocurre por ejemplo con el control de la brotación lateral por el factor de transcripción NGR5 del tipo AP2 en función de la presencia de nitrógeno (Wu et al., 2020). Otra opción sería que, al mantener/promover la identidad vegetativa de la yema mediante el aumento de la expresión de

CsCEN, se reprime indirectamente la expresión de *CiFT3*, lo que sugiere que el efecto principal del AG sería en la yema y no en la hoja.

5. CONCLUSIONES

1. El tratamiento con AG antes de la inducción floral redujo eficazmente la floración y brotación en el naranjo dulce 'Lane late'.
2. El estado de la yema influyó en el efecto del AG. Su aplicación en septiembre aumentó los brotes vegetativos y en diciembre los brotes mixtos, reduciendo, en ambos casos, los ramos de flor.
3. El AG aplicado septiembre no modificó la expresión de *CsLFY* a corto plazo, pero sí la de *CsCEN*, promoviendo el crecimiento indeterminado del meristemo.
4. La expresión de *CiFT3* no fue inhibida por el AG a corto plazo, pero sí a largo plazo, durante el periodo de inducción floral.

6. BIBLIOGRAFÍA

Achard, P. y Genschik, P. (2009). Releasing the brakes of plant growth: how Gas shutdown DELLA proteins. *Journal of experimental botany*, vol. 60, issue 4, pp. 1085-1092.

Agustí, M. (2012). *Citricultura*. Capítulo 6. Brotación y floración. Pp. 121-138. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid-México.

Agustí, M., García-Marí, F. y Guardiola, J. L. (1982). The influence of flowering intensity on the shedding of reproductive structures in sweet orange. *Scientia Horticulturae*, vol. 17, issue 4, pp. 343-352.

Agustí, M., Mesejo, C., Muñoz-Fambuena, N., Vera-Sirera, F., De Lucas, M., Martínez-Fuentes, A., Reig, C., Iglesias, D. J., Primo-Millo, E. y Blázquez, M. A. (2020). Fruit-dependent epigenetic regulation of flowering in *Citrus*. *New Phytologist Foundation*. Vol. 225, Issue 1, pp. 376-384.

Alquézar, B., Zacarías, L. y Rodrigo, M. J. (2009). Molecular and functional characterization of a novel chromoplast-specific lycopene β -cyclase from *Citrus* and its relation to lycopene accumulation. *Journal of Experimental Botany*, vol. 60, Issue 6, pp. 1783–1797.

Blázquez, M. A., Ferrándiz, C., Madueño, F. y Parcy, F. (2006). How floral meristems are built. *Plant Molecular Biology*, vol. 60, pp. 855–870.

Cassin, J., Bourdeaut, J., Fougue, A., Furon, V., Gaillard, J.P., LeBourdelle, J., Montagut, G. y Moreuil, C. (1969). The influence of climate upon blooming of *citrus* in tropical areas. *Proc. 1st Intl. Citrus Symp.* 1: 315-323.

Cervera, A. (2021). Efecto del tratamiento continuado con ácido giberélico y paclobutrazol sobre la floración del naranjo dulce. TFM. Valencia: Universitat Politècnica de València.

Chica, E. J. y Albrigo, L. G. (2013). Expression of Flower Promoting Genes in Sweet Orange during Floral Inductive Water Deficits. *American Society for Horticultural Science*, vol. 138, issue 2, pp. 88-94.

Compés, R., García, J.M., y Martínez, V. (2019). La crisis cítrica en la comunidad valenciana y el acuerdo de asociación económica con el sur de África. Valencia: Universitat Politècnica de València.

Corbesier, L., Vincent, C., Jang, S. H., Fornara, F., Fan, Q. Z., Searle, I., Giakountis, A., Farrona, S., Gissot, L., Turnbull, C. y Coupland, G. (2007). FT Protein Movement Contributes to Long-Distance Signaling in Floral Induction of Arabidopsis. *Science*, vol. 316, issue 5827, pp. 1030-1033.

Davenport, T. L. (1990). *Citrus* flowering. *Horticultural Reviews*. 12: 349-408.

Davière, J. M., y Achard, P. (2013). Gibberellin signaling in plants. *Development*, vol. 14, issue 6, pp. 1147-1151.

Davies, F. S. y Albrigo, L. G. (1994). *Citrus*. CAB International, Wallingford, UK. 254.

Delgado, P., Casamayor, R., Rodríguez, J. O., Cruz, P. y Fajardo, R. (1986). Paclobutrazol effects on mandarin under tropical conditions. *Acta Horticulturae* 179: 537-544.

Gambetta, G. (2009). Control endógeno y exógeno de la maduración externa de los frutos cítricos. Tesis. Valencia: Universitat Politècnica de València.

García-Luís, A., Almela, V., Monerri, C., Agustí, M. y Guardiola, J. L. (1986). Inhibition of flowering in vivo by existing fruits and applied growth regulators in *Citrus unshiu*. *Physiologia Plantarum*, vol. 66, issue 3, pp. 515-520.

Goldberg-Moeller, R., Shaloma, L., Shlizermana, L., Samuels, S., Zur, N., Ophir, R., Blumwald, E. y Sadka, A. (2013). Effects of gibberellin treatment during flowering induction period on global gene expression and the transcription of flowering-control genes in Citrus buds. *Plant science*, vol. 198, pp. 46-57.

Guardiola, J. L., Monerri, C. y Agustí, A. (1982). The inhibitory effect of gibberellic acid on flowering in *Citrus*. *Physiologia plantarum*, vol. 55, issue 2, pp. 136-142.

Harty, A. R. y Van Staden, J. (1988a). The use of growth retardants in citriculture. *Israel Journal of Botany* 37: 155-164.

Harty, A. R. y Van Staden, J. (1988b). Paclobutrazol and temperature effects on lemon. *Proceedings. 6th Int. Citrus Congress* 1: 343-353.

Jones, W. W., Coggins, C. W. Jr. y Embleton, T. W. (1977). Growth regulators and alternate bearing. *Proc. Int. Soc. Citricult.* 2, 657–660.

Koshita, Y., Takahara, T., Ogata, T. y Goto, A. (1999). Involvement of endogenous plant hormones (IAA, ABA, GAs) in leaves and flower bud formation of 'Satsuma' mandarin (*Citrus unshiu* Marc.). *Science Horticulturae*, vol. 79, issues 3-4, pp.185-194.

Lord, E. M. y Eckard, K. J. (1985). Shoot development in *Citrus Sinensis* L. (Washington Navel orange). I. Floral and inflorescence ontogeny. *Chicago journals*, vol.146, issue 3, pp. 320-326.

Martínez-Fuentes, A., Mesejo, C., Juan, M., Almela, V. y Agustí, M. (2013). Fruit load restricts the flowering promotion effect of paclobutrazol in alternate bearing *Citrus spp.* *Scientia horticulture*, vol. 151, pp. 122-127.

Martínez-Fuentes, A., Mesejo, C., Juan, M., Almela, V. y Agustí, M. (2004). Restrictions on the exogenous control of flowering in *citrus*. *Acta Horticulturae (ISHS)* 632: 91-98.

Martínez-Fuentes, A., Mesejo, C., Reig, C. y Agustí, M. (2010). Timing of the inhibitory effect of fruit on return bloom of 'Valencia' sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) osbeck). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 90, issue 11, pp. 1936-1943.

McGinnis, K. M., Thomas, S. G., Soule, J. D., Strader, L. C., Zale, J. M., Sun, T. P. y Steber, C. M. (2003) The Arabidopsis SLEEPY1 gene encodes a putative F-box sub- unit of an SCF E3 ubiquitin ligase. *Plant Cell*, vol. 15, issue 5, pp. 1120–1130.

Mesejo, C., Marzal, A., Martínez-Fuentes, A., Reig, C., De Lucas, M., Iglesias, D. J., Primo-Millo, E., Blázquez, M. A. y Agustí, M. (2022a). Reversion of fruit-dependent inhibition of flowering in *Citrus*

requires sprouting of buds with epigenetically silenced *CcMADS19*. *New phytologist*, vol. 233, issue 1, pp. 526-533.

Mesejo, C., Marzal, A., Martínez-Fuentes, A., Reig, C., de Lucas, M., Blázquez, M. A., y Agustí, M. (2022b). Inhibiting the inhibitor to allow flowering in *Citrus*: the seasonal epigenetic resetting of *CcMADS19*. In *Acta Horticulturae*, I International Symposium on Reproductive Biology of Fruit Tree Species 1342 (pp. 71-78).

Mohamed, R., Wang, C., Ma, C., Shevchenko, O., Dye, S., Puzey, J., Etherington, E., Sheng, X., Meilan, R., Strauss, S. y Brunner, A. (2010). *Populus* CEN/TFL1 regulates first onset of flowering, axillary meristem identity and dormancy release in *Populus*. *The plant journal*, vol. 62, issue 4, pp. 674-688.

Monselise S. P. y Halevy A. H. (1964). Chemical inhibition and promotion of citrus flower bud induction. *J. Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.* 84, pp. 141–146.

Monselise, S. P. y Goldschmidt, E. E. (1982). Alternate bearing in citrus and ways of control. *Proc. Of the International Society of Citriculture*. Vol. 1, ref.20, pp. 239-242.

Monteiro da Cruz, M. D., Siqueira, D. L. D., Salomão, L. C. C., y Cecon, P. R. (2008). Influência do paclobutrazol e da temperatura ambiente sobre o florescimento e frutificação da limeira ácida 'Tahiti'. *Ciência Agrotec*, vol. 32, issue 4, pp. 1148-1153.

Muñoz-Fambuena, N., Mesejo, C., González-Mas, M. C., Iglesias, D. J., Primo-Millo, E. y Agustí, M. (2012). Gibberellic Acid Reduces Flowering Intensity in Sweet Orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] by Repressing *CiFT* Gene Expression. *Journal of Plant Growth Regulation* 31, pp. 529–536.

Muñoz-Fambuena, N., Mesejo, C., González-Mas, M.C., Primo-Millo, E., Agustí, M. y Iglesias, D. J. (2011). Fruit regulates seasonal expression of flowering genes in alternate bearing 'Moncada' mandarin. *Annals of Botany*, vol. 108, issue 3, pp. 511-519.

Nishikawa, F., Endo, T., Shimada, T., Fujii, H., Shimizu, T., Omura, M. y Ikoma, Y. (2007). Increased *CiFT* abundance in the stem correlates with floral induction by low temperature in Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.). *Journal of experimental botanic*, vol. 58, issue 14, pp. 3915-3927.

Notaguchi, M., Abe, M., Kimura, T., Daimon, Y., Kobayashi, T., Yamaguchi, A. y Araki, T (2008). Long-Distance, Graft-Transmissible Action of *Arabidopsis* FLOWERING LOCUS T Protein to Promote Flowering. *Plant and cell physiology*, vol. 49, issue 11, pp. 1645-1658.

Ogata, T., Hasukawa, H., Shiozaki, S., Horiuchi, S., Kawase, K., Iwagaki, I. y Okuda, H. (1996). Seasonal changes in endogenous gibberellin contents in satsuma mandarin [*Citrus reticulata*] during flower differentiation and the influence of paclobutrazol on gibberellin synthesis. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science (Japan)*, vol. 65, issue 2, pp. 245-253.

Olszewsky, N., Sun, T. y Gubler, F. (2002). Gibberellin Signaling: Biosynthesis, Catabolism, and Response Pathways. *The plant cell*, vol. 14, issue suppl_1, pp. S61-S80.

Pnueli, L., Carmel-Goren, L., Hareven, D., Gutfinger, T., Alvarez, J., Ganai, M., Zamir, D. y Lifschitz, E. (1998). The SELF-PRUNING gene of tomato regulates vegetative to reproductive switching of sympodial meristems and is the ortholog of CEN and TFL1. *The company of biologists*, vol. 125, issue 11, pp. 1979-1989.

Rademacher W. (2000). Growth retardants: effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 51: 501-31.

Sasaki, A., Itoh, H., Gomi, K., Ueguchi-Tanaka, M., Ishiyama, K., Kobayashi, M., Jeong, D., An, G., Kitano, H., Ashikari, M. y Matsuoka, M. (2003). Accumulation of phosphorylated repressor for gibberellin signaling in an Fbox mutant. *Science*, vol.299, issue 5614, pp. 1896–1898.

SEGÚ-SIMARRO, J. M. 2011. *Biología y biotecnología reproductiva de las plantas*. Universidad Politécnica de Valencia. 464.

Shalom, L., Samuels, S., Zur, N., Shlizerman, L., Doron-Faigenboim, A., Blumwald, E. y Sadka, A. (2014). Fruit load induces changes in global gene expression and in abscisic acid (ABA) and indole acetic acid (IAA) homeostasis in citrus buds. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 65, Nº 12, pp. 3029-3044.

Tang, L. y Lovatt, C. (2019). Effects of low temperature and gibberellic acid on floral gene expression and floral determinacy in 'Washington' navel orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Scientia Horticulturae*, vol. 243, pp. 92-100.

Urbina, V. (2002). La fructificación de los frutales. Monografías de fruticultura nº6. España.

Valiente, J. I. y Albrigo, L. G. (2004). Flower Bud Induction of Sweet Orange Trees [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]: Effect of Low Temperatures, Crop Load, and Bud Age. *American Society for Horticultural Science*, vol. 129, issue 2, pp. 158-164.

Wang, B., Fang, R., Chen, F., Han, J., Liu, Y. G., Chen, L. y Zhu, Q. (2020). A novel CCCH-type zinc finger protein SAW1 activates OsGA20ox3 to regulate gibberellin homeostasis and anther development in rice. *Journal of integrative plant biology*, vol. 62, issue 10, pp. 1594-1606.

Wu, K., Wang, S., Song, W., Zhang, J., Wang, Y., Liu, Q., Yu, J., Ye, Y., Li, S., Chen, J., Zhao, Y., Wang, J., Wu, X., Wang, M., Zhang, Y., Liu, B., Wu, Y., Harberd, N. y Fu, X. (2020). Enhanced sustainable green revolution yield via nitrogen-responsive chromatin modulation in rice. *Science*. 367(6478):eaaz2046.

Yamaguchi, S. (2008) Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 225–251.

Zeevaart, J. (2008). Leaf-produced floral signals. *Current Opinion in Plant Biology*, vol. 11, issue 5, pp. 541-547.

Zhang, F., Wang, Y. y Irish, V. F. (2021). CENTRORADIALIS maintains shoot meristem indeterminacy by antagonizing THORN IDENTITY1 in *Citrus*. *Current Biology*, vol. 31, issue 10, pp. 2237-2242.e4.

Páginas web:

FAO. *Citrus* fruit fresh and processed. Statistical bulletin 2020.

<<https://www.fao.org/3/cb6492en/cb6492en.pdf>> [Consulta el 25 de mayo del 2022]

MAPAMA. Cifras del sector de frutas y hortalizas.

<<https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/producciones->

[agricolas/cifrasdelsectorfyhactualizado2020definitivo-junio2021_tcm30-563965.pdf](#)> [Consulta el 25 de mayo del 2022]