



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

Mecanismo de acción de las auxinas de síntesis en el  
control de la floración de los cítricos.

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Ingeniería Agronómica

AUTOR/A: Carbonell Copoví, Raúl

Tutor/a: Agustí Fonfría, Manuel

Cotutor/a: Reig Valor, Carmina

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023

**TREBALL FI DE MÀSTER**

Curs acadèmic 2021-2022

València, setembre de 2022

---

# **MECANISME D'ACCIÓ DE LES AUXINES EN EL CONTROL DE LA FLORACIÓ DELS CÍTRICS.**

---

AUTOR:

**RAÚL CARBONELL COPOVÍ**

TUTOR ACADÈMICO:

**MANUEL AGUSTÍ FONFRÍA**



**UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA**



**Escola Tècnica Superior  
d'Enginyeria Agronòmica  
i del Medi Natural**

---

ETS de Enginyeria Agronòmica y del Medi Natural  
Universitat Politècnica de Valencia

## RESUM

L'aplicació de la giberelina ( $GA_3$ ) durant l'època d'inducció floral redueix significativament la floració dels cítrics. Tot i això, el seu paper endogen no està clar i encara que reprimeix l'expressió del gen inductor *CiFT3*, no ho realitza de la mateixa manera que el fruit. Per altra part, les auxines també redueixen la floració, cosa que planteja la possibilitat de que les dues hormones actuen amb interacció al procés.

En aquest TFM, s'han utilitzat en tres espècies de cítrics, taronger dolç, mandarí Clementí i llimoner, dues auxines de síntesis d'ús comercial: la sal dimetilamina de l'àcid 2,4-diclorfenoxiacètic (2,4-D) i l'àcid naftalenacètic (ANA) per estudiar el seu efecte sobre la floració. La seua acció s'ha comparat amb l'àcid giberèl·lic ( $GA_3$ ).

Els tractaments es realitzaren a l'època d'inducció floral, i a la primavera s'avalua la floració i la seva distribució amb els tipus de brots. Periodicament s'avalua l'expressió dels gens de inducció i la diferenciació floral en fulles i llemes, respectivament.

Les auxines reduïren significativament la floració i alteraren la distribució dels brots d'un mode similar a com ho va fer el  $GA_3$ . En coherència amb açò, reprimiren l'expressió de *CiFT3* a les fulles, però no la de *CcMADS19*. A les llemes les auxines reduïren els gens de diferenciació floral, en particular la de *CsLFY*. Els tractaments també augmentaren l'expressió del gen *CsCEN* a les llemes en el moment de la brotació.

**Paraules clau:** Auxina; Cítrics; Floració; *CsFT3*, *CcMADS19*, *CsAP1*, *CsLFY*; *CsCEN*

## RESUMEN

La aplicación de giberelinas ( $GA_3$ ) durante la época de inducción floral reduce significativamente la floración de los cítricos. Sin embargo, su papel endógeno no está aclarado y aunque reprime la expresión del gen inductor *CiFT3* no lo hace del mismo modo que el fruto. Por otra parte, las auxinas también reducen la floración, lo que plantea la posibilidad de que ambas hormonas actúen en interacción en el proceso.

En este TFM se han utilizado en tres especies de cítricos, naranjo dulce, mandarino Clementino y limonero, dos auxinas de síntesis de uso comercial: la sal dimetilamina del ácido 2,4-diclorfenoxiacético (2,4-D), y el ácido naftalenacético (ANA) para estudiar su efecto sobre la floración. Su acción se ha comparado con la del ácido giberélico ( $GA_3$ ). Los tratamientos se realizaron en la época de inducción floral, y en la primavera se evaluó la floración y su distribución en tipos de brotes. Periodicamente se determinó la expresión de los genes de inducción y diferenciación floral en hojas y yemas, respectivamente.

Las auxinas redujeron significativamente la floración y alteraron la distribución de los brotes de un modo similar a como lo hizo el  $GA_3$ . En coherencia con ello, reprimieron la expresión de *CiFT3* en las hojas, pero no la de *CcMADS19*. En las yemas, las auxinas redujeron los genes de diferenciación floral, en particular la de *CsLFY*. Los tratamientos también aumentaron la expresión del gen *CsCEN* en las yemas en el momento de la brotación.

**Palabras clave:** Auxinas; Cítricos; Floración, *CsFT3*, *CcMADS19*, *CsAP1*, *CsLFY*; *CsCEN*

## ABSTRACT

The application of gibberellins ( $GA_3$ ) during the floral bud inductive period significantly reduces citrus flowering. However, its endogenous role is not yet clarified and although it represses the expression of the *CiFT3* gene, it does not work in the same way as the

fruit. On the other hand, auxins also reduce flowering, raising the possibility that both hormones act in interaction in the process.

In this TFM, two commercially available synthetic auxins, the dimethylamine salt of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and naphthaleneacetic acid (ANA), were used in three citrus species, sweet orange, Clementine mandarin and lemon, to study their effect on flowering. Their action has been compared with that of gibberellic acid (GA<sub>3</sub>).

Treatments were carried out at the floral bud inductive period, and flowering and its distribution in shoots was evaluated in the spring, as well as their. Periodically gene expression of floral induction and bud differentiation was evaluated in leaves and buds, respectively. Auxins significantly reduced flowering and altered shoot distribution in a similar way as GA<sub>3</sub>. Consistent with this, they repressed *CiFT3* expression in leaves, but not *CcMADS19*. Auxins also reduced floral bud differentiation genes expression, in particular that of *CsLFY*, and increased that of *CsCEN* at bud break.

**Key words:** Synthetic auxin; Citrus; Flowering; *CsFT3*, *CcMADS19*, *CsAP1*, *CsLFY*; *CsCEN*

## ÍNDIX

<b>I. INTRODUCCIÓ</b> .....	<b>1</b>
1. Classificació botànica.....	2
2. Importància econòmica.....	2
3. Brotació i tipus de brots.....	3
4. La floració dels cítrics.....	3
<b>II. OBJETIUS DEL</b> .....	<b>6</b>
<b>III. MATERIAL IMÈTODES</b> .....	<b>8</b>
1. Material vegetal.....	9
2. Tractaments.....	9
3. Presa de dades i procés a laboratori.....	10
4. Anàlisi estadístic.....	12
<b>IV. RESULTATS</b> .....	<b>13</b>
1. Efecte de l'aplicació de 2,4-D sobre la floració del llimoner 'Eureka' .....	14
2. Efecte de l'aplicació d'auxines sobre la floració del taronger 'Navelina'.....	15
3. Efecte de l'aplicació d'auxines de síntesi sobre la floració de la mandarina Clementina 'Oronules'.....	16
<b>V. DISCUSIÓ</b> .....	<b>22</b>
<b>VI. CONCLUSIONS</b> .....	<b>24</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>26</b>
Haim, D., Ben Michael, T.E., Rozenblat, L., Shemesh-Mayer, E., et al., (2020). From Embryo to Adult: Low Temperatures Affect Phase Transitions of <i>Allium sativum</i> L. from Germination to Flowering. <i>Agronomy</i> , 10 (11), .....	28
1651; <a href="https://doi.org/10.3390/agronomy10111651">https://doi.org/10.3390/agronomy10111651</a> .....	28

## ÍNDIX FIGURES

Figura. 1: Imatge aèria de la parcel·la de Pedralba (Valencia) on s'indica els tractaments control, 2,4-D, AG <sub>3</sub> y ANA. Les files marcades de blau son la barrera física per evitar les derives del producte en el moment d'aplicació. ....	9
Figura. 2: Aspecte de les llemes de l'arbre al moment dels tractaments (Estat 00 de l'escala BBCH).....	10
Figura. 3: Influència de l'aplicació de la sal dimetilamina del 2,4-D (12 mg l <sup>-1</sup> ) a l'època d'inducció floral sobre la intensitat de floració del llimoner 'Eureka'. Cada valor es la mitja ± ES de 20 rames de tardor amb, almenys, 20 nucs per rama.....	14
Figura. 4: Influència de l'aplicació de la sal dimetilamina del 2,4-D (12 mg l <sup>-1</sup> ) a l'època d'inducció floral sobre la intensitat de floració al taronger dolç 'Navelina'. Cada valor es la mitja ± ES de 20 rames de tardor amb, almenys, 20 nucs per rama.....	15
Figura. 5: Influència de l'aplicació d'àcid giberèlic (GA <sub>3</sub> ; 25 mg l <sup>-1</sup> ), la sal dimetilamina del 2,4-D (12 mg l <sup>-1</sup> ), y l'àcid naftalenacètic (ANA; 60 mg l <sup>-1</sup> ) a l'època de inducció floral sobre la intensitat de floració del mandarí Clementí 'Oronules'. Cada valor es la mitja ± ES de 20 rames de tardor amb almenys, 20 nucs per rama. Lletres diferents indiquen diferència estadísticament significativa (p<0.05). ....	16

Figura 6: Efecte de les auxines 2,4-D (12 mg l <sup>-1</sup> ), ANA (60 mg l <sup>-1</sup> ) y de l'àcid giberèlic (AG; 25 mg l <sup>-1</sup> ) sobre l'expressió del gen CiFT3 a les fulles a) del llimoner 'Eureka', b) Taronger dolç 'Navelina' i c) mandarí Clementí 'Oronules'. Cada valor es la mitjana de tres rèpliques biològiques i dos determinacions analítiques. ....	18
Figura 7: Efecte de l'auxina 2,4-D (12 mg l <sup>-1</sup> ) y de l'àcid giberèlic (AG; 25 mg l <sup>-1</sup> ) sobre l'expressió del gen CcMADS19 a les fulles del a) llimoner 'Eureka', b) Taronger dolç 'Navelina' i c) mandarí Clementí 'Oronules'. Cada valor es la mitja de tres rèpliques biològiques i dos determinacions analítiques. ....	19
Figura 8: Efecte de les auxines 2,4-D (12 mg l <sup>-1</sup> ), ANA (60 mg l <sup>-1</sup> ) y de l'àcid giberèlic (AG; 25 mg l <sup>-1</sup> ) sobre l'expressió dels gens CsAP1 i CsLFY a les llemes del mandarí Clementí 'Oronules'. Cada valor es la mitja de tres repeticions biològiques i dos determinacions analítiques ....	20
Figura 9: Efecte de les auxines 2,4-D (12 mg l <sup>-1</sup> ), ANA (60 mg l <sup>-1</sup> ) y de l'àcid giberèlic (AG; 25 mg l <sup>-1</sup> ) sobre l'expressió del gen CsCEN a les llemes del mandarí Clementí 'Oronules'. Cada valor es la mitja de tres repeticions biològiques i dos determinacions analítiques. ....	21

## ÍNDIX TABLES

Tabla 1: Principals països productors de cítrics al món. ....	2
Tabla 2: Seqüència dels primers utilitzats en aquest estudi. ....	11
Tabla 3: Efecte de l'aplicació de la sal dimetilamina del 2,4-D (12 mg l <sup>-1</sup> ) a l'època d'inducció floral sobre la distribució dels tipus de brots al llimoner 'Eureka'. Cada valor es la mitjana de 20 rames de tardor amb almenys 20 nucs per rama. Lletres diferents indiquen diferència estadísticament significativa (p<0.05). Valors expressats per 100 nucs. Veure la clau dels tipus de brots al text. ....	14
Tabla 4: Efecte de l'aplicació de la sal dimetilamina del 2,4-D (12 mg l <sup>-1</sup> ) a l'època d'inducció floral sobre la xifra de fulles i flors a cada tipus de brot al llimoner 'Eureka'. Lletres diferents indiquen diferència estadísticament significativa (p<0.05). Veure la clau dels tipus de brots al text. ....	15
Tabla 5: Efecte de l'aplicació de la sal dimetilamina del 2,4-D (12 mg l <sup>-1</sup> ) a l'època d'inducció floral sobre la distribució dels tipus de brots en el taronger dolç 'Navelina'. Cada valor es la mitjana de 20 rames de tardor amb almenys 20 nucs per rama. Lletres diferents indiquen diferència estadísticament significativa (p<0.05). Valors expressats per 100 nucs. Veure la clau dels tipus de brots al text. ....	15
Tabla 6: Efecte de l'aplicació de la sal dimetilamina del 2,4-D (12 mg l <sup>-1</sup> ) a l'època d'inducció floral sobre la xifra de fulles i flors a cada tipus de brot al taronger dolç 'Navelina'. Lletres diferents indiquen diferència estadísticament significativa (p<0.05). Veure la clau dels tipus de brots al text. ....	16
Tabla 7: Efecte de l'aplicació d'àcid giberèlic (GA3; 25 mg l <sup>-1</sup> ), la sal dimetilamina del 2,4-D (12 mg l <sup>-1</sup> ) i l'àcid naftalenacètic (60 mg l <sup>-1</sup> ) a l'època d'inducció floral sobre la distribució dels tipus de brots al mandarí clementí 'Oronules'. Cada valor es la mitja de 20 rames de tardor per arbre amb, almenys, 20 nucs per rama, y 5 arbres. Valors expressats en brots per 100 nucs. Lletres diferents indiquen diferència estadísticament significativa (p<0.05) Veure la clau dels tipus de brots al text. ....	17
Tabla 8: Efecte de l'aplicació d'àcid giberèlic (GA3; 25 mg l <sup>-1</sup> ), la sal dimetilamina del 2,4-D (12 mg l <sup>-1</sup> ) i l'àcid naftalenacètic (60 mg l <sup>-1</sup> ) a l'època d'inducció floral sobre les característiques dels brots al mandarí clementí 'Oronules'. Cada valor es la mitja de 20 rames de tardor per arbre amb, almenys, 20 nucs per rama, y 5 arbres. Valors expressats en número de fulles i/o flors per brot. Lletres diferents indiquen diferència estadísticament significativa (p<0.05). Veure la clau dels tipus de brots al text. ....	17

# I. INTRODUCCIÓ

## 1. Classificació botànica

Els cítrics que es cultiven amb interès comercial, pertanyen a família Ruteacea subfamília Aurantioideae.

Una de les característiques més importants d'aquesta subfamília es el fenomen conegut com a monofilètic, que te com a significat que tots els individus de la rama provenen d'una única població ancestral.

Encara que l'ordenació d'aquesta subfamília es complexa per la facilitat d'hibridació de les seues espècies, aquesta presenta dos tribus *Claustenae* i *Citreae*, aquesta última vertebrant-se amb 3 sub-tribus mes (Swingle y Reece, 1967). Es la subtribu *Citrinae*, composta per 6 gèneres, la que recull els cítrics verdaders, sent: 1) *Fortunella* (Kumquat), 2) *Poncirus* (L.) Raf. (utilitzat com a portaempelt) 3) *Citrus*, sent aquest últim, el que recull les espècies més importants que es cultiven comercialment al mon: taronger dolç [*Citrus sinensis* (L.) Osb.], mandarina (*C. reticulata* Blanco), mandarí Satsuma (*C. unshiu* Marc.), llimoner [*C. limon* (L.) Burm.], pomelo (*C. paradisi* Macf.).

A Espanya, actualment, les varietats que més es cultiven son de taronger dolç, on es troben els tres grups següents amb les seues varietats: grup Navel ('Navelina', 'Washington navel', 'Lane late', 'Navel powel'), grup Blanques ('Salustiana' i 'Valencia late'), i grup sanguines ('Sanguinelli', 'Torocco rosso').

En quant a les mandarines, les principals varietats cultivades es classifiquen en 3 espècies, sent, mandarí Satsuma ('Owari' i 'Okitsu'), mandarina Clementina ('Oronules', 'Oroval' i 'Clemenules'), i mutacions per irradiació ('Orri', 'Tango' i 'Leanri').

Respecte als híbrids de mandarí, es cultiven majoritàriament els Tangors (híbrid de mandarina amb taronger dolç), com 'Ortanique', i 'Nadorcott' i el Tangelo (híbrid de mandarina amb pomelo) 'Nova'.

Per últim, les principals varietat de llimoners cultivats son 'Eureka', 'Verna' i 'Fino'.

## 2. Importància econòmica

Els cítrics tenen una producció mundial d'aproximadament 125 milions de tones a l'any (MAPA, 2021), sent la fruita que més es cultiva al mon. Els països amb la major producció de cítrics son:

Tabla 1: Principals països productors de cítrics al món.

Producció de Taronja dolça, Taronja menuda i Llimes	
PAIS	CANTITAT
CHINA	35,50%
BRASIL	17%
ESPANYA	7,50%
MÈXIC	7%
EEUU	6%
SUD-ÀFRICA	2,40%
ALTRES	27%

Encara que la major producció es realitzà a Xina, la major part de la producció es destina al seu propi consum del país, com passa també al Brasil, per el que el major exportador de cítrics en fresc es España, amb unes xifres que superen alguns anys un total de



4 milions de tones. Les següents en quan a número total de tones exportades al món son Sud-Àfrica i EEUU.

La producció a Espanya es situa actualment a la Comunitat Valenciana i Andalusia, i amb xifres menors a Murcia, representant respectivament un 50%, 33% i 11%, mentre que a la resta de comunitats on hi ha producció representen el 6%.

Respecte a les varietats més cultivades al país, la taronja dolça es la més present a tots els territoris, amb un total del 50% del cultiu, seguit per les mandarines, que representen el 30%, 19% les llimes, i 1% els pomelos (MAPA, 2021).

### 3. Brotació i tipus de brots

Als cítrics, els factors que determinen la brotació no es coneixen adequadament, ja que no pareixen tindre requeriments de fred i les llemes poden brotar en qualsevol moment de l'any sempre que la temperatura del sòl superi els 12°C, mentre que condicions de dies llargs redueixen aquest període.

L'arbre del cítric presenta fins a tres brotacions en condicions ambientals del Hemisferi Nord, a la primavera, a finals de primavera i principi d'estiu, i a la tardor.

Sols la brotació de primavera produeix flors, mentre que la d'estiu sol ser de major longitud i amb una mida de fulles més gran que les altres dos.

Per tant, els brots de primavera seran els que determinen la quantitat de flor que hi ha, mentre que la d'estiu i tardor seran les encarregades del creixement vegetatiu de la planta (Davies i Albrigo, 1994; Primo-Millo i Agustí, 2020).

En quant als tipus de brots que es poden desenvolupar a la primavera, son els següents:

- Brot campaner, format per varies fulles i una flor en posició terminal (BC).
- Brot mixt, format per varies flors i fulles (BM).
- Brot vegetatiu, format únicament per fulles (BV).
- Flor solitària, amb una única flor i sense fulles (FS).
- Ram de flor, format per un ram amb varies flors i sense fulles (RF).

### 4. La floració dels cítrics

#### 4.1. Els gen de la floració

La floració s'indueix en el moment de repòs del cítric, que es on més sensibilitat presenta per a que el meristema vegetatiu identifiqui la senyal tèrmica de baixa temperatura que el convertirà a meristema floral. Al Clima Mediterrani aquesta senyal es rebuda per el meristema de les fulles a la tardor, durant la segona quinzena de novembre i la primera de desembre, excepte a les Satsumes, on la senyal es rep al gener.

A continuació, es produeix la segon fase, la diferenciació floral, per acabar amb el desenvolupament dels primordis florals, formant la flor. Aquesta fase es desenvolupa durant la segona part de l'hivern, al mes de febrer, on les llemes trenquen la latència i els primordis comencen a desenvolupar-se. La floració està regulada genèticament per els gens d'inducció *FLOWERING LOCUS T* (*CsFT1*, *CsFT2* Y *CsFT3*), dos ortòlegs de *SUPRESOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1* (*SOC1*) (*CsSL1* i *CsSL2*), els *FD-like FLOWERING LOCUS D* (*CsFD*), els de la diferenciació floral *APETALA1* (*CsAP1*) i *LEAFY* (*CsLFY*), i els de identitat floral *SEPALLATA* (*CiSEP*), *PISTILATA* i *AGAMOUS*. Junt a aquests gens promotors es troben els gens repressors *CcMADS19*, un ortòleg de *FLC*, repressor de *CsFT3*, *TERMINAL FLOWER1* (*CsTFL1*), repressor de *CsFD*, i un ortòleg de *TEMPRANILLO1* (*TEM1*), un repressor de *FT* que regula la juvenilitat.

El gen *CENTRORADIALIS* (*CsCEN*), es un gen homòleg de *TERMINAL FLOWER1* (*CsTFL1*), que s'expressa als meristemes axil·lars on interactua amb *CsFD*, mantenint-los indeterminats (Zhang et al., 2021).

#### 4.2. L'efecte repressor del fruit.

L'efecte del fruit com a repressor de la floració ha sigut contrastat repetidament. Aquest efecte està basat amb la seua acció repressora a les fulles pròximes del gen *CiFT3* (Muñoz-Fambuena et al., 2011) a través de l'activació epigenètica del gen repressor *CcMADS19* (Agustí et al., 2020). No obstant, la senyal repressora que el fruit envia a la fulla no està identificada. A l'arbre, aquesta acció del fruit es, lògicament, tant més general quan major es la xifra de fruits, començant a produir-se quan aquests arriben al seua màxima mida i inicien la maduració (Martínez-Fuentes et al., 2010). Aquesta acció repressora es distribueix a les llemes, reprimint-se l'expressió dels gens d'identificació floral, *CsAP1* i *CsLFY* (Muñoz-Fambuena et al., 2012a; Shalom et al., 2012).

Tanmateix, les llemes conserven una versió silenciada del gen *CcMADS19* i, per tant, les fulles dels brots que sorgeixen d'elles poden rebre i expressar, amb absència dels fruits, la senyal inductora a la tardor següent i florir a la primavera (Mesejo et al., 2021).

#### 4.3. El control hormonal de la floració.

Als llocs de clima templat, el fruit inicia el canvi de color a partir del moment en que comença el descens de la temperatura a la tardor. Aquest procés s'observa junt a una reducció del contingut en gibberel·lines al flavedo que són transportades basípetament per el brot que sustenta el fruit (Gambetta et al., 2012) fins les llemes.

Per altra part, les gibberel·lines s'identifiquen com hormones amb capacitat d'inhibir parcialment la floració quan s'apliquen a l'època d'inducció floral (Monselise i Halevy, 1964). Aquesta tècnica ha sigut àmpliament utilitzada per la seva eficàcia a la reducció de la floració en totes les espècies de cítrics en cultiu, depenent la resposta de la varietat, la concentració aplicada i la data de aplicació (Agustí et al., 2022). El resultat es una disminució dels brots multi-florals sense fulla i un augment dels brots vegetatius, obtenint, per una part, augment del quallat espontani (Agustí et al., 1982a), al reduir la competència entre òrgans en desenvolupament, i, per altra, augment de l'eficàcia dels tractaments específics per millorar-la (Agustí et al., 1982b), resolent d'aquesta manera el problema d'algunes varietats partenocàrpiques d'intensitat de floració elevada.

L'acció inhibidora de la floració del  $GA_3$  s'ha relacionat amb la repressió del gen *CiFT3* a la fulla i de *CsAP1*, *CcPI*, *CcSEP3* i *CsAP2* a la llema (Muñoz-Fambuena et al., 2012b; Goldberg — Möeller et al., 2013; Tang i Lovatt., 2019). L'expressió de *CcMADS19* a la fulla, però, no es modificada per el  $GA_3$ , i tampoc la de *CsTFL1* en la llema (Goldberg-Möeller et al., 2013).

Les auxines també s'han observat eficaces com a inhibidores de la floració (Garcia-Luis et al., 1986; Haim et al., 2021). El 2,4-D aplicat a una concentració de 12mg/l redueix la floració del taronger dolç 'Navelate' en un 30% aproximadament (Guadiola et al., 1977).

El paper de l'àcid abscísic no està actualment correctament definit, així mentre la seua aplicació a les llemes inhibeix la floració (Garcia-Luis et al., 1986), als arbres cultivats baix un període inductiu a 15°C la concentració de ABA correlaciona positivament amb la floració (Li et al., 2017; Endo et al., 2018). Si l'efecte inductor del estres hídric es mitjançant l'acumulació de ABA, està actualment per demostrar.

Les citoquinines, per la seva part, han mostrat ser inductores de la floració. Així, en la llimera 'Eureka' (Tisserat et al., 1990) i a la mandarina 'Satsuma' (Garcia-Luis et al.,

1989), les llemes axil·lars cultivades *in vitro* a temperatura inductiva floreixen quan el mig es suplementat amb sacarosa i beciladenina.

L'etilè també s'ha proposat com promotor de la floració, però no amb els cítrics. Donat que aquesta substància inhibeix el transport polar de les auxines, la forma d'actuar podria ser indirecta mitjançant el metabolisme de l'àcid indolacètic (AIA).

D'entre tots aquests efectes, el coneixement de la relació de les auxines amb les gibberel·lines i la floració han merescut l'interès als últims anys. Així, mentre que les gibberel·lines s'observen efectives per a reduir la floració quan s'apliquen exògenament, el seu paper endogen no es clar. La seua forma d'actuar ha sigut qüestionada ja que: 1) mentre que el seu contingut en fulles es major als brots que contenen fruits i que no floreixen al any vinent, el seu contingut a les llemes no mostra diferències en les dels brots amb fruits i sense fruits (Koshita et al., 1999 i Jones et al., 1977), 2) no està correctament determinat en el moment el qual s'originen els canvis endògens de gibberel·lines durant la inducció i la diferenciació floral, 3) no es coneix si existeix un valor llindar de gibberel·lines superat el qual inhibeixi la floració, 4) els inhibidors de la síntesi de gibberel·lines no aconsegueixen promoure la floració amb presència del fruit i 5) l'aplicació de GA<sub>3</sub> redueix l'expressió de *CiFT3* però no altera la del seu repressor *CsMADS19*. Per altra part, estudis recents han demostrat que als cítrics el AIA modula el metabolisme de les gibberel·lines, promovent l'expressió dels gens de la seva síntesi i reprimint el seu catabolisme, donant lloc a canvis marcats als nivells de la gibberel·lina GA<sub>1</sub> als òvuls i al pericarpí que, finalment, promou el quallat de les varietats amb llavors (Bermejo et al., 2018).

D'acord amb açò, l'estudi de les auxines a la floració dels cítrics mereix ser abordat.

## II. OBJETIUS DEL TREBALL

Hipòtesi de treball: L'auxina regula la floració dels cítrics.

Objectiu del Treball Final de Màster:

Estudi de l'efecte de les auxines de síntesi sobre l'expressió dels gens reguladors de la floració als cítrics.

# III. MATERIAL I MÈTODES

## 1. Material vegetal.

L'experiment s'ha portat a cap als arbres adults de mandarí Clementí 'Oronules', taronja dolça 'Navelina' i llimera 'Eureka' localitzats en Pedralba (València; 39° 29' 2" N, -0° 20' 26" E, 2msnm; m. 'Oronules') i València (València; 39° 32' 58" N, 0° 44' 25" E, 155 msnm; t. 'Navelina' i ll. 'Eureka').

Els arbres es trobaven en plena producció, en perfecte estat fitosanitari, amb reg localitzat i fertilitzats i podats d'acord amb les tradicions generals de la zona de cultiu.

## 2. Tractaments.

Els tractaments al n. dolç 'Navelina' i ll. 'Eureka' es realitzaren a l'època d'inducció floral (meitat de novembre) a rames individuals, sense fruit i amb almenys 10 nucs per rama. S'utilitzaren 40 rames de l'última brotació (tardor), de les quals, 20 foren tractades amb 12mg l<sup>-1</sup> de sal dimetilamina del 2,4-D (àcid 2,4-diclorofenoxiacètic, 10% p/v) i un agent tens actiu (èter de alquilglicol) a una concentració de 0.01%, mentre que les altres 20 es deixaren com a control. Les rames tractades i les control es situaven prop d'entre elles i orientades en totes les direccions al voltant de l'arbre.

El tractament es portà a cap amb un polvoritzador manual mullant completament les fulles i llemes fins arribar al degoteig.

A la parcel·la de m. Clementí 'Oronules' es seleccionaren quatre tires de 20 arbres cadascuna, deixant una fila guarda entre cadascuna de elles (Fig. 1), aplicant a l'època d'inducció floral a cadascuna d'elles un tractament: àcid giberèl·lic (GA<sub>3</sub>) a una dosi de 25mg l<sup>-1</sup>, àcid naftalenacètic (ANA) a 60 mg l<sup>-1</sup>, sal dimetilamina del 2,4-D, 12 mg l<sup>-1</sup>, i deixant una fila d'arbres com a control. Els tractaments van ser realitzats amb pistola de polvoritzar connectada a una cubà de polvoritzar, a 40 atm de pressió, mullant la totalitat de l'arbre fins el degoteig. Per al control de flors i mostrejos es dividiren les files en 5 sectors de 4 arbres cadascun, sent utilitzats com blocs al disseny experimental.

Els tractaments realitzats a les parcel·les van ser realitzats a l'època d'inducció floral (repòs hivernal) (Fig. 2).



Figura. 1: Imatge aèria de la parcel·la de Pedralba (València) on s'indica els tractaments control, 2,4-D, AG<sub>3</sub> y ANA. Les files marcades de blau son la barrera física per evitar les derives del producte en el moment d'aplicació. La línia groga indica els arbres utilitzats per als mostrejos.



*Figura. 2: Aspecte de les llemes de l'arbre al moment dels tractaments (Estat 00 de l'escala BBCH)*

### **3. Presa de dades i procés a laboratori**

Des del dia 26 de novembre fins meitat gener s'agafaren mostres de fulles del t. dolç i del llimoner, mentre que s'agafaren de fulles i llemes de m. 'Oronules'. La primera recollida es realitzà als 7 dies d'efectuar els tractaments i les altres tres es repetiren quinzenalment. De les dues primeres espècies es recolliren tres rèpliques de fulles i de la tercera varietat tres rèpliques de cada fulla i cada llema en cada mostreig.

Les fulles i les llemes van ser congelades amb nitrogen líquid en el moment de la seva presa i posteriorment congelades a  $-80^{\circ}\text{C}$  fins el moment d'anàlisi.

A la primavera, quan els brots eren clarament visibles i diferenciables, abans de l'antesi (estat 59 BBCH), es va procedir amb l'avaluació dels brots i les flors de les tres espècies. Al t. dolç i al llimoner s'avaluaren les 40 rames de la brotació de la tardor prèviament senyalades.

De cada un dels nucs es contà la xifra de llemes brotades i no brotades, la xifra de brots desenvolupats, classificant aquests d'acord amb l'apartat 3 de la Introducció, i de cadascun d'ells la xifra de fulles i flors que contenien.

Els resultats de la brotació y de la intensitat de floració s'expressen per 100 nucs (N) per compensar les diferències en el xifra de nucs entre les rames seleccionades.

L'extracció d'ARN i l'anàlisi de RT-PCR es portà a terme mitjançant el següent procediment:

#### **1) Extracció i purificació de l'ARN**

Les fulles seleccionades a la presa de mostres, i prèviament congelades a  $-80^{\circ}\text{C}$ , es trituren amb un morter pre-refredat amb nitrogen líquid fins obtenir pols fina.

A continuació, es pesen 0.5 g de cada mostra i es transfereixen a tubs de 30ml, on s'afegeixen 2ml de tampó d'extracció prèviament escalfat a  $50^{\circ}\text{C}$  (Tris 0.2M pH 8 + NaCl 0.2M + EDTA 50mM + SDS 2% en TCES), a més de 2 ml de fenol àcid i 40  $\mu\text{l}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol.

Les mostres es mantenen al bany termostatitzat a  $65^{\circ}\text{C}$  durant 15 min, agitant cada 2 min. Posteriorment, els tubs es centrifuguen durant 30 minuts a 4000 r.p.m./ $4^{\circ}\text{C}$  afegint-se un volum de cloroformo:alcohol isoamílic (24:1) al sobrenedant, per eliminar les restes de fenol. Després d'agitació i nova centrifugació durant 30 min (4000 r.p.m./ $4^{\circ}\text{C}$ ),



s'afegeix LiCl 6M (½ volum) al sobrenedant deixant que precipita durant tota la nit a 20°C.

Posteriorment, les mostres es centrifuguen durant 20 minuts a 11000 rpm, conservant el sediment. Després de llavar el ethanol 70% refrigerat, s'assequen les mostres i es resuspèn el sediment amb aigua lliure de RNAses.

La qualitat de l'ARN i la concentració d'aquest s'avalua en NanoDrop ND-2000™ (Thermo Fisher, USA). Les extraccions de ARN purificat es conserven a -80°C fins la seua posterior utilització.

## 2) Retrotranscripció

Per a la síntesi de cDNA es fa servir 1 µg d'ARN, utilitzant el kit TAKARA (TakaraBIO inc. PrimeScript™ RT reagent kit) amb un volum de 10 µl com indica les instruccions del fabricant. S'utilitzà una mescla de oligo-dT i de random primers a un buffer específic i amb la enzima PrimeScript RT EZzume Mix-I, també inclosos al kit. El programa emprat fou de 15 minuts a 42°C seguits de 5 segons a 85°C.

## 3) qPCR

Per a la quantificació relativa mitjançant PCR s'utilitza el kit (TakaraBIO inc., TB Green™ Premix Ex Taq™) segons les instruccions del fabricant. El cDNA diluït s'utilitza com a motlle per a l'amplificació a un volum final de reacció de 10.5 µl amb una concentració de 0.3 µM de cada oligonucleòtid i 14.5 µl de la mescla dels continguts al kit.

El programa utilitzat fou de 30 segons a 95°C per a l'activació de la Taq polimerasa, seguits de 40 cicles de 5 segons a 95°C (desnaturalització), 30 segons a 60°C (anellament o alienament dels cebadors).

S'utilitzà l'equip RotorGene® Q 2-Plex (Qiagen) i els resultat foren avaluats mitjançant el software Rotor GENE 2.0.2. Es realitzaren tres replicues tècniques de cada mostra biològica per a utilitzar-les als anàlisi RT-qPCR.

## 4) Primers

Per avaluar l'evolució dels gens relacionats amb la floració a cada una de les espècies de cítrics es van prendre com a referència el gen *ACTINA* (*ACTIN*) i com a gens de interès *CiFT3*, *CcMADS19*, *CsAP1*, *CsLFY* i *CsFD*. Les seqüències dels primers utilitzats es presenten a la Tabla 2.

Tabla 2: Seqüència dels primers utilitzats en aquest estudi.

GEN	Código EST	Forward primer (5'-3') Reverse primer (5'-3')
<b>ACTIN</b>	Ciclev1002 5866m	TTAACCCCAAGGCCAACAGATCCCTCATAGATTGGTAG ACTATGAGAC
<b>CiFT3</b>	Ciclev100129 05m	TCTAGCAGGGACAGAGATCCTAGAACATCACCAACAAC GCG
<b>CcMADS 19</b>	Ciclev100334 20m	GGCAACTTGAAGGTTCCAAACGCCCAATGAGCATAGGA TG
<b>CsAP1</b>	Ciclev100129 05m	TCTAGCAGGGACAGAGATCCTAGAACATCACCAACAAC GCG
<b>CsLFY</b>	Ciclev1003 3942m	TCTTGATCCAGGTCCAGAACATCTAGTCACCTTGGTTG GGCATT
<b>CsFD</b>	Ciclev100038 45m	TGGAAGAAGTTTGGCAGGATGTTTGGGATGGAGTGTGT T

#### **4. Anàlisi estadístic.**

A les dades obtingudes se'ls ha aplicat l'anàlisi de la variància amb un nivell de confiança de  $P \leq 0.05$ . Per a la separació de mitges s'utilitza el test Newman-Keuls mitjançant el programa informàtic Statgraphics.

## IV. RESULTATS

## 1. Efecte de l'aplicació de 2,4-D sobre la floració del llimoner 'Eureka'

L'aplicació de 12 mg l<sup>-1</sup> de la sal dimetilamina del 2,4-D a l'època d'inducció floral redueix significativament la intensitat de floració al llimoner 'Eureka'. La primavera següent, les rames tractades reduïren la floració en un 53% respecte de les rames control sense tractar, passant de 190 flors per 100 nuscs en aquestes últimes a 90 flors per 100 nuscs a les primeres (Fig. 3).

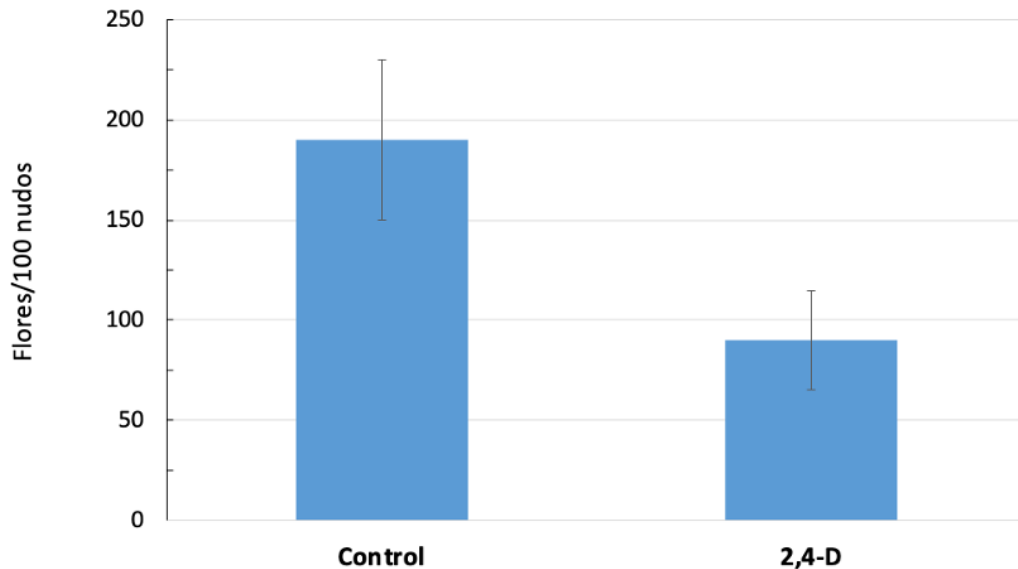


Figura. 3: Influència de l'aplicació de la sal dimetilamina del 2,4-D (12 mg l<sup>-1</sup>) a l'època d'inducció floral sobre la intensitat de floració del llimoner 'Eureka'. Cada valor es la mitja ± ES de 20 rames de tardor amb, almenys, 20 nuscs per rama. Les diferències són estadísticament significatives ( $p < 0.05$ ).

L'auxina redueix significativament la xifra de brots amb flors (RF, FS, BC, i BM), i augmenta els brots vegetatius (BV) amb relació a les rames control. Particularment intensa fou la reducció dels BM que de 15.4 brots per cada 100 nuscs (N) als controls passa a 8.3 als tractats (Tabla 3), sent reduïts en un 46%. Les RF i FS ho foren ambdós casos en un 15% aproximadament, passant de tenir 40.5 brots per 100 N als control a 34.3 brots als tractats i de 36.2 a 30.8 brots per 100N, respectivament (Tabla 3). La reducció dels brots campaners, de 10.7 a 8.5 brots per 100 N, no arriba a la significació estadística. En contrast amb açò, els brots vegetatius augmentaren un 68%, passant de 12.1 brots per 100 N als controls a 20.3 als tractats (Tabla 3).

Tabla 3: Efecte de l'aplicació de la sal dimetilamina del 2,4-D (12 mg l<sup>-1</sup>) a l'època d'inducció floral sobre la distribució dels tipus de brots al llimoner 'Eureka'. Cada valor es la mitjana ± ES de 20 rames de tardor amb almenys 20 nuscs per rama. Lletres diferents indiquen diferència estadísticament significativa ( $p < 0.05$ ). Valors expressats per 100 nuscs. Veure la clau dels tipus de brots al text.

	RF	FS	BC	BM	BV
<b>Control</b>	40.5 ± 2.7a	36.2 ± 3.7a	10.7 ± 4.4	15.4 ± 3.3a	12.1 ± 0.1b
<b>Tractat</b>	34.3 ± 0.7b	30.8 ± 2.0b	8.5 ± 1.1	8.3 ± 1.1b	20.3 ± 1.1a

La xifra de flors i fulles per brot sols s'alterà significativament als BM, que passen de tindre una mitja de 4.0 flors i 3.7 fulles per brot a 1.5 i 1.0, respectivament (Tabla 4). La xifra de fulles als BV no s'alterà.

Tabla 4: Efecte de l'aplicació de la sal dimetilamina del 2,4-D ( $12 \text{ mg l}^{-1}$ ) a l'època d'inducció floral sobre la xifra de fulles i flors a cada tipus de brot al llimoner 'Eureka'. Cada valor es la mitjana  $\pm$  ES dels broys de 20 rames de tardor amb almenys 20 nucs per rama. Lletres diferents indiquen diferència estadísticament significativa ( $p < 0.05$ ). Veure la clau dels tipus de brots al text.

	<b>RF</b> Nº flors	<b>BC</b> Nº fulles	<b>BM</b> Nº fulles	<b>BM</b> Nº flors	<b>BV</b> Nº fulles
<b>Control</b>	4,1 $\pm$ 0,3	4,2 $\pm$ 0,4	3,7 $\pm$ 0,1a	4.0 $\pm$ 0,1a	6,4 $\pm$ 0,7
<b>Tractat</b>	3,9 $\pm$ 1.0	3,2 $\pm$ 0,1	1.0 $\pm$ 0,1b	1,5 $\pm$ 0,3b	6,8 $\pm$ 0,8

## 2. Efecte de l'aplicació d'auxines sobre la floració del taronger 'Navelina'

Al taronger dolç 'Navelina', el 2,4-D també redueix la intensitat de floració, passant de 230 flors per 100 N als controls a 130 flors per 100 N als tractats (Fig. 4).

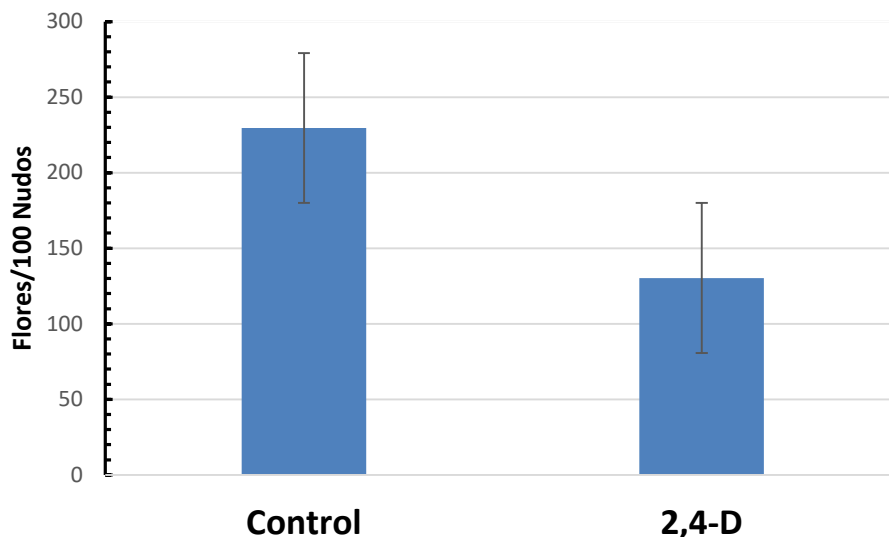


Figura 4: Influència de l'aplicació de la sal dimetilamina del 2,4-D ( $12 \text{ mg l}^{-1}$ ) a l'època d'inducció floral sobre la intensitat de floració al taronger dolç 'Navelina'. Cada valor es la mitja  $\pm$  ES de 20 rames de tardor amb, almenys, 20 nucs per rama. Les diferències son estadísticament significatives ( $p < 0.05$ ).

Les diferències més importants es detectaren als BC, on la xifra de fulles va ser reduïda en quasi un 50%, mentre que la resta de brots no s'observen canvis significatius en la xifra de flors i fulles.

Tabla 5: Efecte de l'aplicació de la sal dimetilamina del 2,4-D ( $12 \text{ mg l}^{-1}$ ) a l'època d'inducció floral sobre la distribució dels tipus de brots en el taronger dolç 'Navelina'. Cada valor es la mitja  $\pm$  ES de 20 rames de tardor amb almenys 20 nucs per rama. Lletres diferents indiquen diferència estadísticament significativa ( $p < 0.05$ ). Valors expressats per 100 nucs. Veure la clau dels tipus de brots al text.

	<b>RF</b> Nº flors	<b>BC</b> Nº fulles	<b>BM</b> Nº fulles	<b>BM</b> Nº flors	<b>BV</b> Nº fulles
<b>Control</b>	4,9 $\pm$ 0,3	6.0 $\pm$ 0,1a	3.3 $\pm$ 0,9	5.9 $\pm$ 0,5	6.5 $\pm$ 0,8
<b>Tractat</b>	5.0 $\pm$ 0.1	3.3 $\pm$ 0,7b	4.6 $\pm$ 0,3	6.4 $\pm$ 0,6	7.4 $\pm$ 0,9

En quan als tipus de brots, s'observa una reducció significativa de RF, sent al control d'una xifra de 17.7 brots per cada 100 N i disminuint dràsticament amb un quasi 60%, fins a la xifra de 7.1 brots per cada 100 N. En quan als brots tipus FS, aquests queden anul·lats completament per l'efecte del 2,4-D.

Tabla 6: Efecte de l'aplicació de la sal dimetilamina del 2,4-D ( $12 \text{ mg l}^{-1}$ ) a l'època d'inducció floral sobre la xifra defulles i flors a cada tipus de brot al taronger dolç 'Navelina'. Cada valor es la mitja  $\pm$  ES de 20 rames de tardor ambalmenys 20 nucs per rama. Lletres diferents indiquen diferència estadísticament significativa ( $p < 0.05$ ). Veure la clau dels tipus de brots al text.

	RF	FS	BC	BM	BV
<b>Control</b>	$17.7 \pm 1.3a$	$18.2 \pm 0.1a$	$5.0 \pm 0.1$	$28.8 \pm 1.8$	$35.5 \pm 3.1$
<b>Tractat</b>	$7.1 \pm 0.1ab$	$0.0 \pm 0.0b$	$5.1 \pm 0.2$	$37.9 \pm 2.3$	$32.5 \pm 2.8$

### 3. Efecte de l'aplicació d'auxines de síntesi sobre la floració de la mandarina Clementina 'Oronules'

Al mandarí 'Oronules', l'aplicació d'àcid naftalenacètic ( $60 \text{ mg l}^{-1}$ ) va donar una resposta similar al 2,4-D (Fig. 5), amb una reducció de la floració del 36%. La intensitat de floració dels arbres control fou de 47.4 flors per 100 N, mentre que als arbres tractats amb ANA i 2,4-D fou de 30.4 i 30.3 per cada 100 N, respectivament. La resposta a l'àcid giberèlic ( $25 \text{ mg l}^{-1}$ ) fou significativament superior, reduint la intensitat de floració a 22.2 flors per 100 N (Fig. 5), sent d'un 53%.

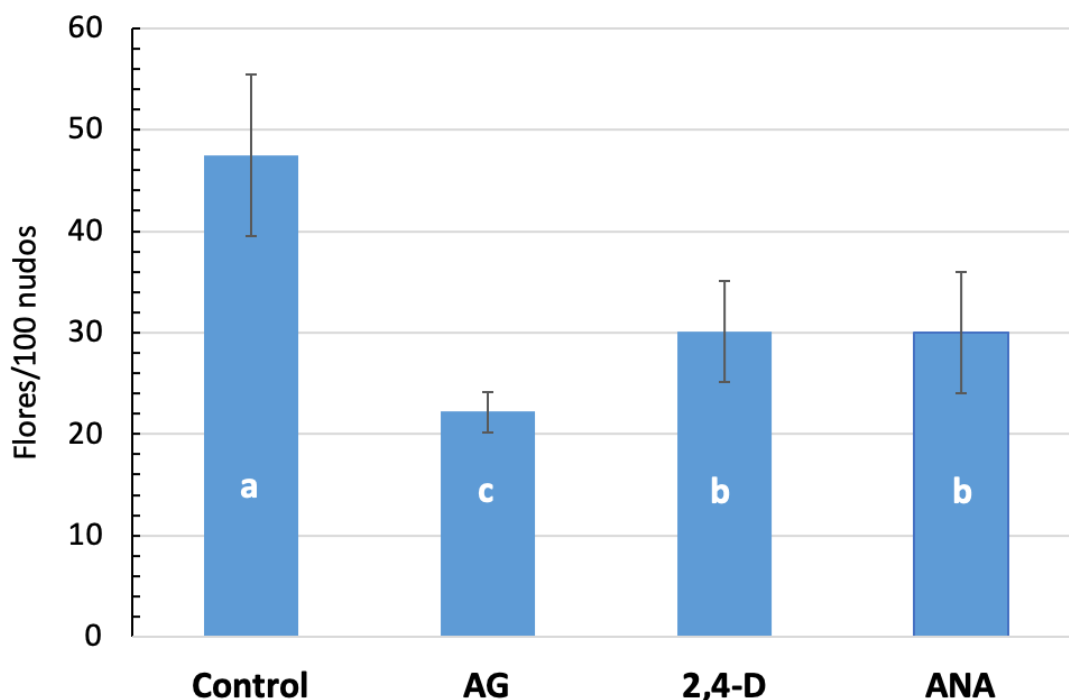


Figura 5: Influència de l'aplicació d'àcid giberèlic ( $GA_3$ ;  $25 \text{ mg l}^{-1}$ ), la sal dimetilamina del 2,4-D ( $12 \text{ mg l}^{-1}$ ), y l'àcid naftalenacètic (ANA;  $60 \text{ mg l}^{-1}$ ) a l'època de inducció floral sobre la intensitat de floració del mandarí Clementí 'Oronules'. Cada valor es la mitja  $\pm$  ES de 20 rames de tardor amb almenys, 20 nucs per rama. Lletres diferents indiquen diferència estadísticament significativa ( $p < 0.05$ ).

També en aquest cv. els brots més afectats van ser els uniflorals, passant de 15.0 brots per 100 N a 9.0 i 8.6 per al 2,4-D i ANA, respectivament (Tabla 7), el que suposa una reducció del 40% i el 43%. L'àcid giberèlic (GA<sub>3</sub>) reduí aquest tipus de brots fins a 4.7 per 100 N, açò es, un 69%. Els BC també es van veure reduïts significativament de 25.6 brots per cada 100 N als arbres control fins a 19.6 i 18.1 als tractats amb 2,4-D i ANA, respectivament (Tabla 7), es a dir, un 23 i un 29% per a cada cas. El GA<sub>3</sub> reduí aquest tipus de brots en un 47% fins als 13.5 brots per cada 100 N. La reducció dels RM, encara que significativa, manca de importància donat la seua reduïda xifra (Tabla 7); i similar ocorre als BM. Mentre els BV, per contra, augmentaren significativament de 23.9 brots per 100 N als controls a 37.7, 41.2 i 38.4 brots per cada 100 N als tractats amb 2,4-D, ANA i GA<sub>3</sub>, respectivament, sense que entre aquests existiren diferències estadísticament significatives (Tabla 7). Aquest augment representa entre el 56 i 72%.

Tabla 7: Efecte de l'aplicació d'àcid giberèlic (GA<sub>3</sub>; 25 mg l<sup>-1</sup>), la sal dimetilamina del 2,4-D (12 mg l<sup>-1</sup>) i l'àcid naftalenacètic ANA; (60 mg l<sup>-1</sup>) a l'època d'inducció floral sobre la distribució dels tipus de brots al mandarí clementí 'Oronules'. Cada valor es la mitja de 20 rames de tardor per arbre amb, almenys, 20 nucs per rama, y 5 arbres. Valor s expressats en brots per 100 nucs. Lletres diferents indiquen diferència estadísticament significativa (p<0.05) Veure la clau dels tipus de brots al text.

	<b>RF</b>	<b>FS</b>	<b>BC</b>	<b>BM</b>	<b>BV</b>
<b>Control</b>	1,0 a	15,0 a	25,6 a	1,5 a	23,9 b
<b>AG</b>	0,6 b	4,7 c	13,5 c	1,0 a	38,4 a
<b>2,4-D</b>	0,5 b	9,0 b	19,6 b	0,2 b	37,3 a
<b>ANA</b>	0,4 b	8,6 b	18,1 b	1,5 a	41,2 a

Els tractaments no alteraren la xifra de flors per RM i RF. Únicament el 2,4-D els va reduir significativament en el BM, encara que amb una xifra molt reduïda, de 2.6 a 2.0 flors per brot (Tabla 8). Un resultat molt similar es produeix amb la xifra de fulles en els brots florals en els que únicament, de nou, el 2,4-D aconseguí reduir-la significativament als BC i augmentar als BM (Tabla 8). Les fulles als BV augmentaren significativament en nombre de 5.5 als control a 7.6 i 7.1 als tractats amb 2,4-D i ANA, respectivament (Tabla 8). L'aplicació de GA<sub>3</sub> no alterà la xifra de flors per brot en cap cas, i sols aconseguí augmentar significativament el nombre de fulles als BM (Tabla 8).

Tabla 8: Efecte de l'aplicació d'àcid giberèlic (GA<sub>3</sub>; 25 mg l<sup>-1</sup>), la sal dimetilamina del 2,4-D (12 mg l<sup>-1</sup>) i l'àcid naftalenacètic (ANA; 60 mg l<sup>-1</sup>) a l'època d'inducció floral sobre les característiques dels brots al mandarí clementí 'Oronules'. Cada valor es la mitja de 20 rames de tardor per arbre amb, almenys, 20 nucs per rama, y 5 arbres. Valores expressats en número de fulles i/o flors per brot. Lletres diferents indiquen diferència estadísticament significativa (p<0.05). Veure la clau dels tipus de brots al text.

	<b>RF (Nº flors)</b>	<b>BC (Nº fulles)</b>	<b>BM (Nº fulles)</b>	<b>BM (Nº flors)</b>	<b>BV (Nº fulles)</b>
<b>Control</b>	2.0	3.6 a	2.3 a	2.6 b	5.5 a
<b>AG</b>	2.0	3.0 ab	3.2 b	3.2 b	5.9 a
<b>2,4-D</b>	3.0	2.7 b	4.0 c	2.0 a	7.6 b
<b>ANA</b>	2.0	3.0 ab	2.7 a	2.5 ab	7.1 b

#### 4. INFLUÈNCIA DELS TRACTAMENTS SOBRE LA EXPRESSIÓ DELS GENS DE L'INDUCCIÓ I DIFERENCIACIÓ FLORAL.

L'aplicació del 2,4-D i GA<sub>3</sub> a l'època d'inducció floral redueix significativament l'expressió del gen *CiFT3* a les tres espècies estudiades (Fig. 6).

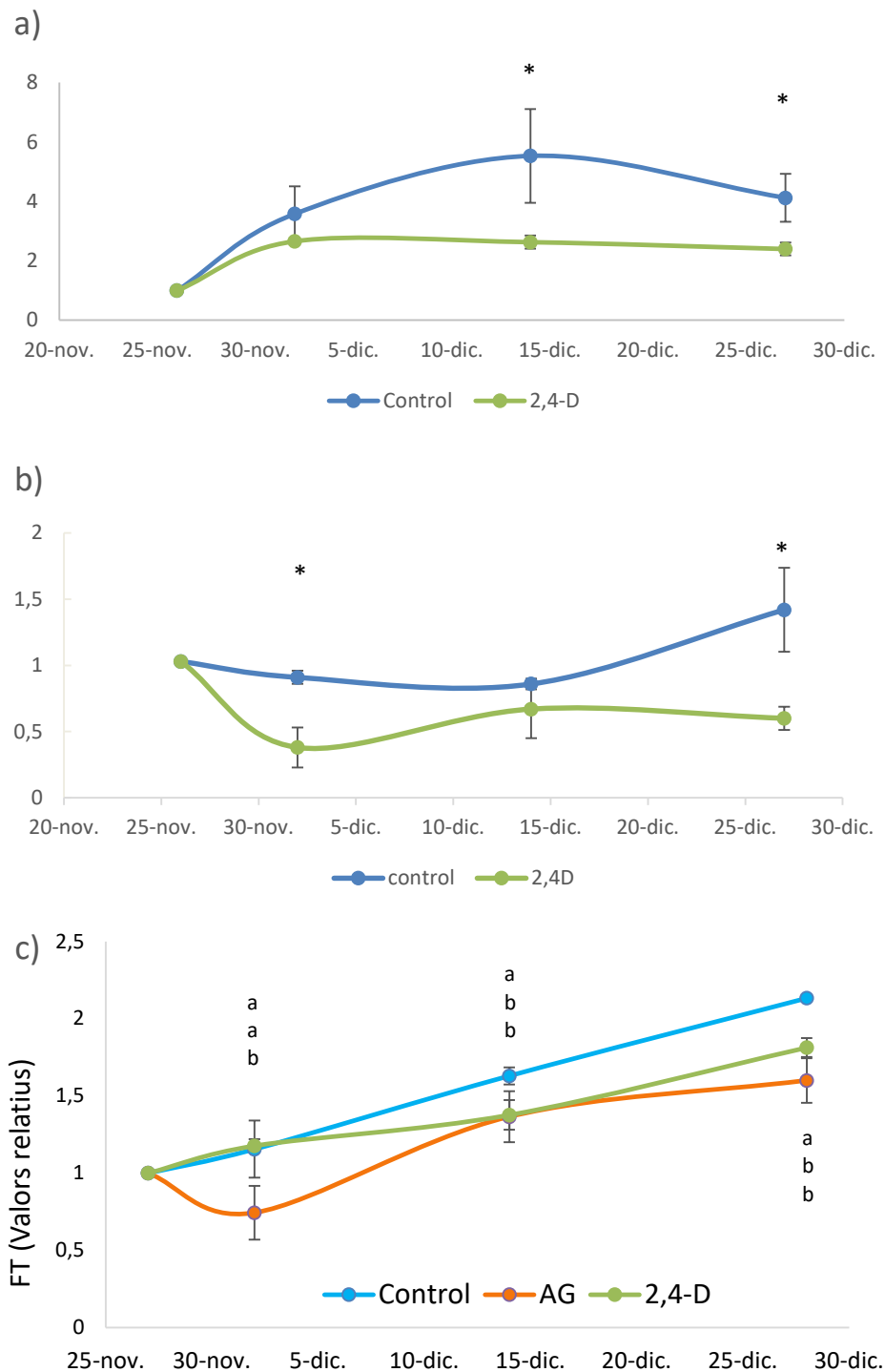


Figura 6: Efecte de les auxines 2,4-D (12 mg l<sup>-1</sup>), ANA (60 mg l<sup>-1</sup>) i de l'àcid giberèlic (AG; 25 mg l<sup>-1</sup>) sobre l'expressió del gen *CiFT3* a les fulles a) del llimoner 'Eureka', b) taronger dolç 'Navelina' i c) mandarí Clementí 'Oronules'. Cada valor és la mitja ± ES de tres rèpliques biològiques i dos determinacions analítiques. El asterisc o lletres diferents indiquen diferències estadísticament significatives (P<0.05)



Però, la resposta del gen *CcMADS19* fou erràtica. Mentre que al llimoner la seua expressió augmentà per efecte del tractament, al taronger dolç no es mostra una tendència clara i al mandarí Clementí disminueix (Fig. 7).

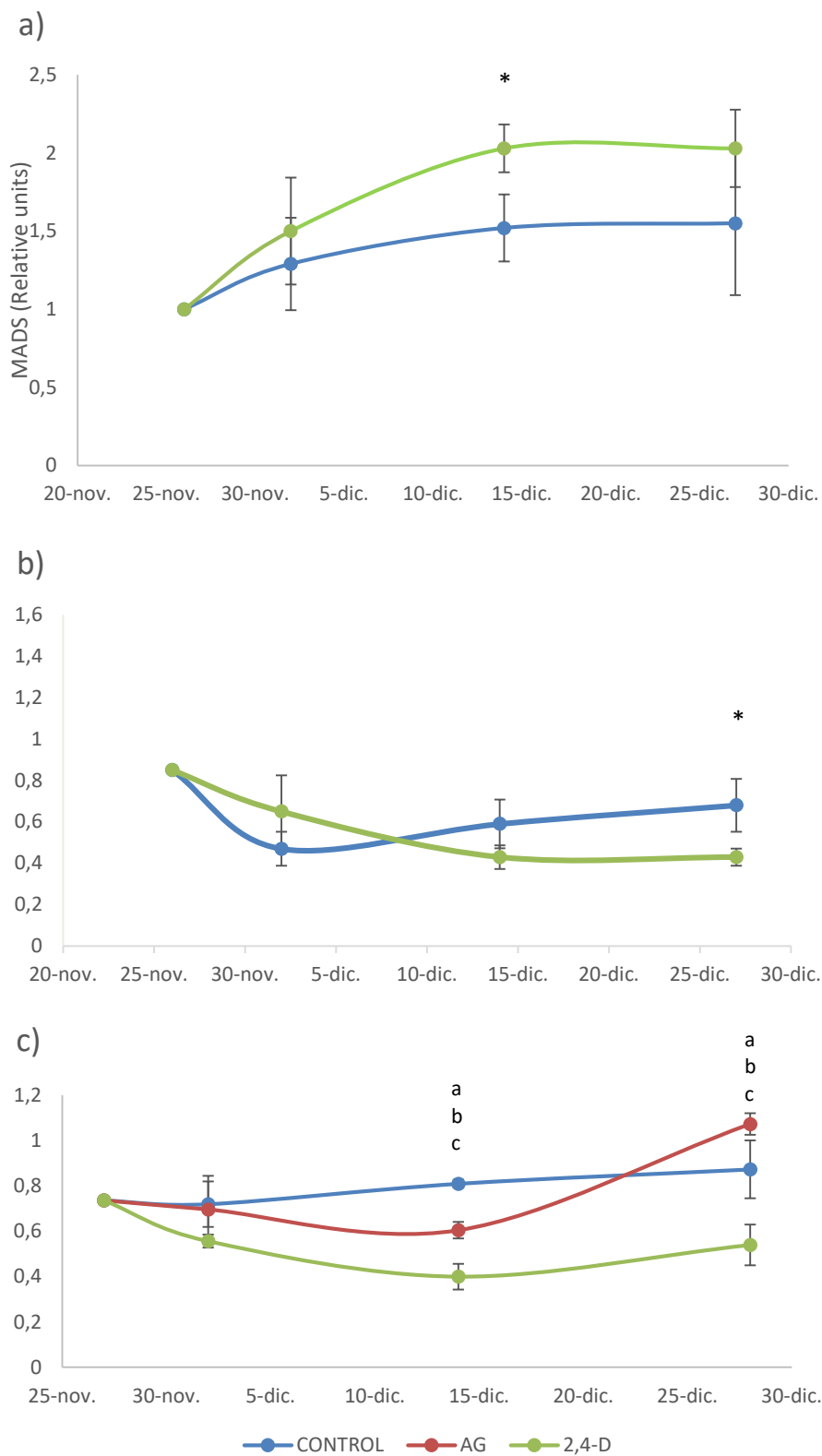
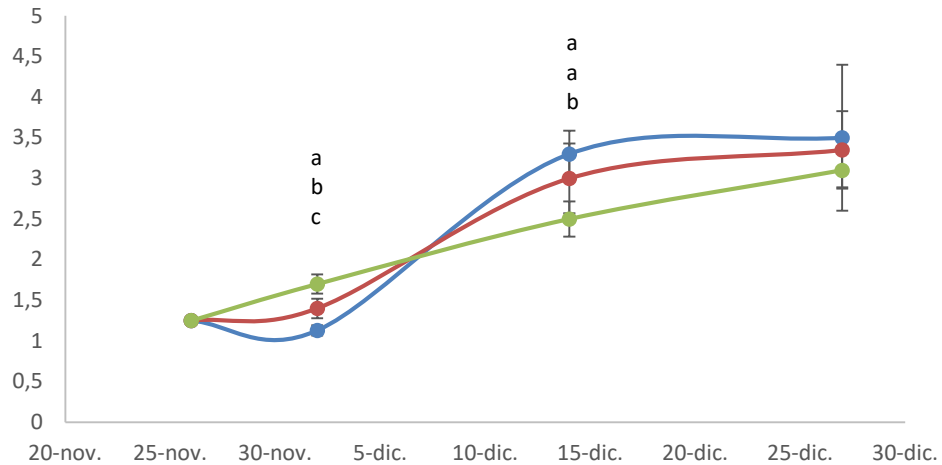


Figura 7: Efecte de l'auxina 2,4-D ( $12 \text{ mg l}^{-1}$ ) y de l'àcid giberèlic (AG;  $25 \text{ mg l}^{-1}$ ) sobre l'expressió del gen *CcMADS19* a les fulles del a) llimoner 'Eureka', b) taronger dolç 'Navelina' i c) mandarí Clementí 'Oronules'. Cada valor es la mitja  $\pm$  ES de tres repliques biològiques i dos determinacions analítiques. El asterisc o lletres diferents indiquen diferències estadísticament significatives ( $P < 0.05$ )

L'aplicació de GA<sub>3</sub> al mandarí Clementí 'Oronules' a l'època d'inducció floral no va mostrar una resposta clara sobre l'expressió de *CcMADS19* (Fig. 7).

L'expressió dels gens de la diferenciació floral a les llemes del mandarí Clementí 'Oronules' va ser reduït per l'acció dels tractaments, particularment la del gen *CsLFY* que la reduí en més d'un 100% (Fig. 8). També l'expressió de *CsAP1* fou reduïda per el 2,4-D, però no així per al tractament amb GA<sub>3</sub> (Fig. 8).

a)



b)

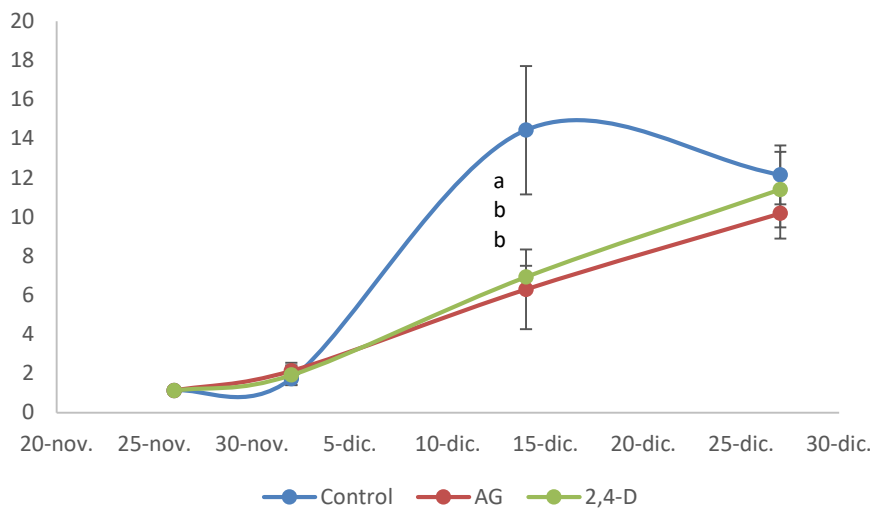


Figura 8: Efecte de les auxines 2,4-D ( $12 \text{ mg l}^{-1}$ ) y de l'àcid giberèlic (AG;  $25 \text{ mg l}^{-1}$ ) sobre l'expressió dels gens *CsAP1* i *CsLFY* a les llemes del mandarí Clementí 'Oronules'. Cada valor es la mitja  $\pm$  ES de tres repeticions biològiques i dos determinacions analítiques. Lletres diferents indiquen diferències estadísticament significatives ( $P < 0.05$ ).

L'expressió del gen *CsCEN* (homòleg del gen *CsTFL1*) que regula el creixement indeterminat, augmentà la seva expressió al moment de la brotació per efecte del 2,4-D i, en menor quantia, del GA<sub>3</sub> (Fig. 9).

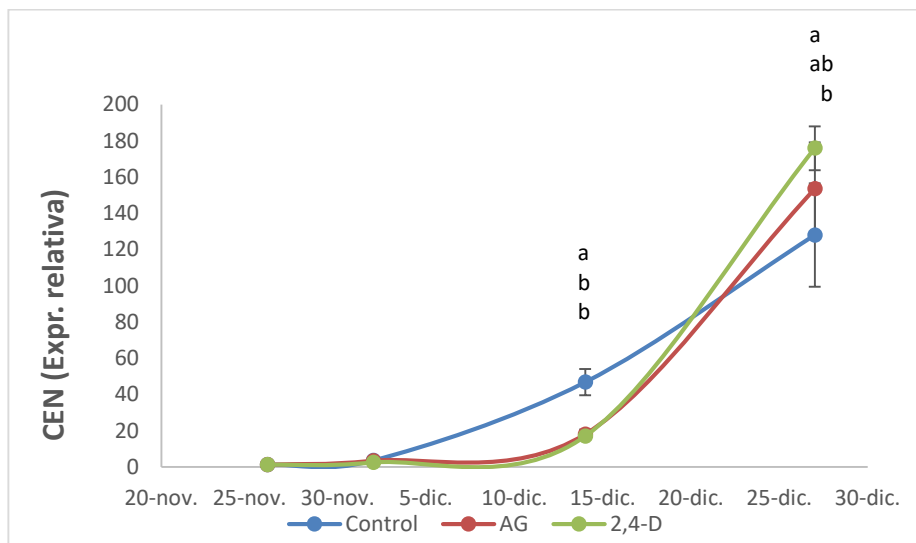


Figura 9: Efecte de les auxines 2,4-D (12 mg l<sup>-1</sup>), ANA (60 mg l<sup>-1</sup>) y de l'àcid giberèlic (AG; 25 mg l<sup>-1</sup>) sobre l'expressió del gen *CsCEN* a les llemes del mandarí Clementí 'Oronules'. Cada valor es la mitja de tres repeticions biològiques i dos determinacions analítiques. Lletres diferents indiquen diferències estadísticament significatives (P<0.05).

## V. DISCUSIÓ

L'efecte inhibidor de la floració de les auxines mostrat per els nostres resultats es mitjançant una reducció de l'expressió del gen inductor de la floració *CiFT3* a les fulles. Aquest efecte es idèntic al que exerceix el fruit i es coherent amb els resultats de Haim et al. (2020) que indiquen que el fruit podria generar una senyal auxínica a la llema i al meristema apical que interferiria amb la inducció floral, i amb els de Shalom et al. (2014), que trobaren majors continguts de AIA a les llemes dels arbres amb una elevada collita que als arbres sense fruit.

La hipòtesi de Haim et al. (2020) es basa en que el fruit origina un fort transport polar d'auxines que es deté quan s'elimina, permetent que les auxines surtin de les llemes, de mode similar a "l'autoinhibició" del transport d'auxina proposta per Bangerth (1989), i puguin així florir. Els nostres tractaments emplenarien de nou les llemes d'auxina i, per tant, impedirien la seva diferenciació floral.

No obstant, els nostres resultats demostren que l'acció del 2,4-D i de l'ANA sobre *CiFT3* no es mitjançant l'activació epigenètica de l'expressió de *CcMADS19*, com ho fa el fruit (Agustí et al., 2020), el que indica que la ruta inhibidora de les auxines i del fruit no es la mateixa. La presència del fruit anul·la l'acció del fred sobre el repressor *CcMADS19* i l'auxina no, posant en dubte que la senyal inhibidora del fruit sigui l'auxina. Malgrat això, els tractaments reduïren l'expressió dels gens d'identitat floral *CsAP1* i *CsLFY* a la llema, com ocorre per acció del fruit (Muñoz-Fambuena et al., 2012b), el que resulta lògic donat que si la proteïna FT no arriba a la llema el procés de la diferenciació floral no s'inicia. Encara que es donen aquestes evidències, la presència del fruit a partir del moment que arriba a la seva mida definitiva, açò es, a l'època d'inducció floral, redueix la floració (Martinez-Fuentes et al., 2010) i, tot i això, i) el transport d'AIA de la llema, mesurat per l'expressió dels gens *PIN1*, *PIN3* i *ABCB19*, també augmenta (Haim et al., 2021), el que deuria augmentar la floració, i ii) les nostres aplicacions d'auxina redueixen significativament la floració. Tot açò indica que el paper de les auxines en la floració es difícil d'entendre i encara desconegut.

Resulta d'interès que el tractament amb GA<sub>3</sub> a l'època de inducció floral provocara un efecte similar al de les auxines assatjades. A la mandarina 'Oronules', el tractament també va reduir l'expressió de *CiFT3*, sense afectar al gen *CcMADS19*, i la de *CsLFY*. Aquest efecte sobre el gen inductor ja havia sigut senyalat per Muñoz-Fambuena et al., (2012a) al taronger dolç 'Salustiana', sense alterar l'expressió del *CsAP1* i *CsLFY*.

Deu destacar-se que l'aplicació d'auxines de síntesi, si be modifica la xifra de brots florals sense fulles, no altera la xifra de flors per brot en les tres espècies estudiades, particularment les de RF. En el cas dels BM, la resposta no es uniforme, encara que en general la xifra de flors no es alterada, com ocorre per a l'àcid giberèl·lic (Guardiola et al., 1977). Aquest efecte es lògic donat que el procés de la floració en una llema es dona o no es dona, es a dir, la llema si esta induïda i brota, floreix, i si no esta induïda i brota no floreix, però quan ho fa, la xifra d'òrgans florals no es alterat per el tractament (Agustí et al., 2022).

Els nostres resultats, per tant, determinen que en les rames sense fruit la circulació de AIA des de la llema es condició necessària per a que la llema floreixi, i recolzen la hipòtesi de que les gibberel·lines podrien ser el primer missatger a l'apex d'un brot en creixement, en el que s'estimularia la síntesi de AIA i el transport d'auxines podria actuar com segon missatger, sent la senyal de transport capaç de inhibir la floració (Haim et al., 2020).

# VI. CONCLUSIONS

Les auxines de síntesi redueixen significativament la intensitat de floració als cítrics.  
Aquest efecte es mitjançant la reducció de l'expressió del gen *CiFT3* sense modificar la del gen *CcMADS19*.

## VII. BIBLIOGRAFÍA



**Agustí, M., Almela, V., and Guardiola, J.L.** (1981). The regulation of fruit cropping in mandarins through the use of growth regulators. *Proc. Int. Soc. Citricut.* 1, 216-220.

**Agustí, M., Garcia-Marí, F. y Guardiola, J.L.** (1982a). Giubberellic acid and fruit set in sweet orange. *Sci. Hortic.*, 17: 257-264.

**Agustí, M. Garcia-Man, F. And Guardiola, J.L.** (1982b) The influence of flowering intensity on the shedding of reproductive structures in sweet Orange. *Sci. Hortic.* 17, 343-352.

**Agustí, M.** (2010). *Fruticultura*. Ed. Mundi-Prensa. 2a Ed. Madrid. 507 pp.

**Agustí, M., y Primo-Millo, E.** (2020). "Flowering and fruit set," in *The Genus Citrus*. eds. M. Talón, M. Caruso and F. G. Gmitter (Cambridge, UK: Woodhead Publishing), 219–244.

**Agustí, M., Mesejo, C., y Reig, C.** (2020). *Citricultura*. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, Spain, 488.

**Agustí, M., Reig, C., Martínez-Fuentes, A. y Mesejo, C.** (2022). Advances in Citrus Flowering: A review. *Front. Plant Sci.*, 13: 868831

**Bangerth, K. F.** (2009). Floral induction in mature, perennial angiosperm fruit trees: similarities and discrepancies with annual/biennial plants and the involvement of plant hormones. *Sci. Hortic.* 122, 153–163.

**Bermejo, A., Martínez-Alcántara, B., Martínez-Cuenca, M. R., Yuste, R., Mesejo, C., Reig, C., et al.** (2016). Biosynthesis and contents of gibberellins in seeded and seedless sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) cultivars. *J. Plant Growth Regul.* 35,1036–1048.

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

**Endo, T., Shimada, T., Nakata, Y., Fujii, H., Matsumoto, H., Nakajima, N., et al.** (2018). Abscisic acid affects expression of citrus *FT* homologs upon floral induction by low temperature in Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.). *Tree Physiol.* 38, 755– 771.

**Gambetta, G., Martínez-Fuentes, A., Betancour, O., Mesejo, C., Reig, C., Gravina, A., et al.** (2012). Hormonal and nutritional changes in the flavedo regulating rind color development in sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osb.]. *J. Plant Growth Regul.* 31, 273–282.

**García-Luis, 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*. *Physiol. Plant.* 66, 515–520.

**García-Luis, A., Santamarina, P., and Guardiola, J. L.** (1989). Flower formation from *Citrus unshiu* buds cultured *in vitro*. *Ann. Bot.* 64, 515–519.

**Goldberg-Moeller, R., Shalom, L., Shlizerman, L., Samuels, S., Zur, N., Ophir, R., et al.** (2013). Effects of gibberellin treatment during flowering induction period on global gene expression and the transcription of flowering-control genes in *citrus* buds. *Plant Sci.* 198, 46–57. doi: 10.1016/j.plantsci.2012.09.012

**Guardiola, J. L., Agustí, M., y Garcia -Marí, F.** (1977). Gibberellic acid and flower bud

development in sweet orange. *Proc. Int. Soc. Citricult.* 2, 696–699.

**Guardiola, J. L., Monerri, C., and Agustí, M.** (1982). The inhibitory effect of gibberellic acid on flowering in Citrus. *Physiol. Plant.* 55, 136–142

**Haim, D., Ben Michael, T.E., Rozenblat, L., Shemesh-Mayer, E., et al.,** (2020). From Embryo to Adult: Low Temperatures Affect Phase Transitions of *Allium sativum* L. from Germination to Flowering. *Agronomy*, 10 (11), 1651; <https://doi.org/10.3390/agronomy10111651>

**Haim, D., Shalom, I., Simhon, Y., Ahlizerman, L., Kamara, I., Morozov, M., et al.** (2021). Alternate bearing in fruit trees: fruit presence induces polar auxin transport in citrus and olive stem and represses IAA release from the bud. *J. Exp. Bot.* 72, 2450–2462.

**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, GA) in leaves and flower bud formation of satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.). *Sci. Hortic.* 79, 185–194.

**Li, J. X., Hou, X. J., Zhu, J., Zhou, J. J., Huang, H. B., Yue, J. Q., et al.** (2017). Identification of genes associated with lemon floral transition and flower development during floral inductive water deficits: a hypothetical model. *Front. Plant Sci.* 8:1013.

**MAPA** (2021). *Reunión sectorial de cítricos: desarrollo de la campaña de cítricos 2020-2021.* (17 de Julio 2022). [https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/analiscampana2020-218dejuliodede2021\\_tcm30-564744.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/analiscampana2020-218dejuliodede2021_tcm30-564744.pdf)

**Martínez-Fuentes, A., Mesejo, C., Reig, C., and Agustí, M.** (2010). Timing of the inhibitory effect of fruit on return bloom of ‘Valencia’ sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. *J. Sci. Food Agric.* 90, 1936–1943.

**Mesejo, C., Marzal, A., Martínez-Fuentes, A., Reig, C., de Lucas, M., Iglesias, D. J., et al.** (2021). Reversion of fruit-dependent inhibition of flowering in citrus requires sprouting of buds with epigenetically silenced *CcMADS19*. *New Phytol.* 233, 526–533.

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

**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. *Ann. Bot.* 108, 511–519.

**Muñoz-Fambuena, N., Mesejo, C., González-Mas, M. C., Iglesias, D. J., Primo-Millo, E., y Agustí, M.** (2012a). Gibberellic acid reduces flowering intensity in sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] by repressing CiFT gene expression. *J. Plant Growth Regul.*, 31: 529-536.

**Muñoz-Fambuena, N., Mesejo, C., González-Mas, M. C., Primo-Millo, E., Agustí, M., y Iglesias, D. J.** (2012b). Fruit load modulates flowering-related gene expression in buds of alternate-bearing ‘Moncada’ mandarin. *Ann. Bot.*, 110: 1109-1118.

**Nishikawa, F., Endo, T., Shimada, T., Fujii, H., Shimizu, T., Omura, M., et al.** (2007). Increased *CiFT* abundance in the stem correlates with floral induction by low temperature in Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.). *J. Exp. Bot.* 58, 3915–3927

**Ordúz-Rodríguez, J. O., y Garzón, D. L.** (2013). Alternancia de la producción y comportamiento fenológico de la naranja 'Valencia' (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck) en el trópico bajo húmedo de Colombia. *Cienc. Tecnol. Agropecu.* 13, 136–144

**Shalom, L., Samuels, S., Zur, N., Shlizerman, L., Zemach, H., Weissberg, M., et al.** (2012). Alternate bearing in citrus: changes in the expression of flowering control genes and in global gene expression in on-versus off-crop trees. *PlosOne* 7:e46930. doi: 10.1371/journal.pone.0046930

**Shalom, L., Samuels, S., Zur, N., Shlizerman, L., Doron-Faigenboim, A., Blumwald, E., et al.** (2014). Fruit load induces changes in global gene expression and in abscisic acid (ABA) and indole acetic acid (IAA) homeostasis in citrus buds. *J. Exp. Bot.* 65, 3029–3044

**Tang, L., and Lovatt, C. J.** (2019). Effects of low temperature and gibberellic acid on floral gene expression and floral determinacy in 'Washington' navel orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Sci. Hortic.* 243, 92–100.

**Tisserat, B., Galletta, P. D., y Jones, D.** (1990). *In vitro* flowering from *Citrus limon* lateral buds. *J. Plant Physiol.* 136, 56–60.

**Zhang, F., Wang, Y., and Irish, V. F.** (2021). *CENTRORADIALIS* maintains shoot meristem indeterminacy by antagonizing *THORN IDENTITY1* in citrus. *Curr. Biol.* 31, 2237–2242.e4.