

¿El estrés nutricional promueve la inducción floral en los cítricos?

Marzal A¹, Mesejo C¹, Martínez-Fuentes A¹, Reig C¹, Agustí M¹

¹Instituto Agoforestal Mediterráneo, Universitat Politècnica de València.
Camino de Vera s/n, 46022, València.

RESUMEN

El fruto inhibe la floración a través de la activación del gen *CcMADS19*, represor del gen responsable de la inducción floral (*CiFT2*). Pero se desconoce qué señal(es) produce o acumula el fruto, para activar dicha represión. Y, si las produce, se desconoce si se transportan, y hasta qué distancia. Con el fin de avanzar en el conocimiento de la señal represora del fruto sobre la floración, se planteó la siguiente hipótesis: el aislamiento de las yemas axilares respecto de la influencia del fruto y del resto de la planta mediante el anillado promueve la inducción floral a través de un cambio del metabolismo primario. El modelo experimental fue el brote ‘campanero’ de mandarina ‘Nadorcott’, con 1 fruto en posición terminal y 8-10 yemas axilares, que en estas condiciones nunca florecen. El anillado se realizó entre el fruto y la primera yema (apical, RA), entre la última yema del brote y la rama (basal, RB) o en ambas posiciones (RAB). Los tratamientos se realizaron en septiembre, antes de la inducción floral. El efecto de los tratamientos se comparó con el comportamiento de brotes sin anillar (control) y brotes vegetativos, capaces de florecer. Mientras los brotes control brotaron escasamente y no florecieron, los tratamientos RA y RB aumentaron significativamente la brotación en la primavera siguiente, pero no promovieron la floración. Sin embargo, el anillado doble RAB provocó que todas las yemas axilares florecieran. Este tratamiento promovió una mayor expresión del gen *CiFT2* que la registrada espontáneamente en los brotes vegetativos y la adelantó significativamente, y ello con independencia de la señal exógena inductora (la baja temperatura). Los resultados del estudio del metabolismo primario sugieren la implicación de cambios en el metabolismo de los carbohidratos en las hojas y el brote en el estímulo de la floración.

Palabras clave: Alternancia de cosechas, Carbohidratos, Floración, Fruto, Inducción floral, Rayado.

INTRODUCCIÓN

La alternancia de cosechas es un problema en los árboles frutales, caracterizado por la sucesión de años de floración-producción muy elevada (ON) y años de floración-producción escasa o incluso nula (OFF). Esta inhibición de la floración está asociada con la presencia del fruto. En los cítricos, cuando este alcanza su tamaño final ejerce un efecto inhibitorio, irreversible, sobre las yemas axilares próximas (Martínez-Fuentes et al., 2010) al reprimir la expresión del gen responsable de la inducción floral (*CiFT2*) (Muñoz-Fambuena et al., 2011) por la activación epigenética del gen inhibidor *CcMADS19* (Agustí et al., 2020). La concentración de giberelinas y auxinas en hojas y yemas de ramas con frutos se ha correlacionado con la inhibición de la floración, y, además, la aplicación de giberelinas inhibe la floración (Guardiola et al., 1982). Pero se desconoce si el transporte de estas hormonas desde el fruto a las yemas es la señal que

directamente reprime la inducción floral. La relación entre el metabolismo de los carbohidratos y la floración también ha sido estudiada comparando árboles ON y OFF, o mediante aclareo de frutos o rayado de ramas, sin encontrar una relación clara con la inducción floral (Martínez-Fuentes et al., 2010). Aunque en especies herbáceas se ha demostrado el papel de los carbohidratos como señal relacionada con la floración, en los cítricos su papel se ha limitado a la necesidad de un nivel umbral mínimo para que la diferenciación de flores y la brotación tengan lugar (Goldschmidt et al., 1985). Con el fin de avanzar en el conocimiento de la señal represora del fruto sobre la floración, se planteó la siguiente hipótesis: el aislamiento de las yemas axilares de la influencia del fruto y del resto de la planta mediante el anillado promueve la inducción floral a través de un cambio del metabolismo primario.

MATERIAL Y MÉTODOS

El experimento se realizó en una explotación de mandarino cv. “Nadorcott” localizada en Valencia, seleccionando 40 brotes por tratamiento, repartidos aleatoriamente entre 20 árboles. Se escogieron brotes fructíferos (ON), con un fruto en posición terminal (incapaces de florecer), y brotes vegetativos (OFF, capaces de florecer), con al menos 5 yemas axilares. Con el fin de interrumpir la(s) señal(es) inhibidora(s) del fruto, se anillaron brotes ON entre el fruto y la primera yema axilar (anillado apical, RA). Para interrumpir la(s) señal(es) de la planta hacia el fruto, el anillado se realizó en la zona basal de brotes ON (RB), entre la última yema y la rama. En otros brotes ON se realizó anillado doble; apical y basal (RAB). El efecto de los tratamientos sobre estos brotes se comparó con el comportamiento de brotes ON (control) y brotes OFF, ambos sin anillar. Los tratamientos se realizaron en septiembre (20/9/18), antes de que el fruto alcanzara su máximo tamaño y antes del periodo de inducción floral. Se tomaron muestras de hojas y brotes para el estudio del contenido en carbohidratos, y de la expresión de genes relacionados con la floración y el metabolismo primario mediante RT-qPCR. Finalmente, se evaluó la floración y la brotación en primavera. Los resultados se analizaron estadísticamente mediante ANOVA ($p < 0,05$) con el programa Statgraphics Centurion.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los tratamientos diseñados para interrumpir la señal desde el fruto (RA) o hacia el fruto (RB) tuvieron el mismo efecto sobre las yemas axilares: un aumento significativo de la brotación vegetativa de primavera respecto del control, que brotó escasamente (datos no mostrados), y ausencia de flores (Figura 1A). El resultado del anillado basal (RB) es coincidente con resultados previos, en los que se demuestra que la presencia del fruto anula el efecto del rayado de ramas en la promoción de la floración (Goldschmidt et al., 1985). Por otra parte, el resultado del anillado apical (RA) sugiere 2 hipótesis: 1) que el resto de la planta influye en la floración de las yemas con independencia de haberlas aislado de la influencia del fruto, ó 2) que *la(s) señal(es)* inhibitoria(s) producidas por el fruto hasta el momento del anillado, antes de que el fruto alcanzara su máximo tamaño, fueron suficientes para impedir la floración. A la vista de la fecha de rayado, esta segunda hipótesis parece menos probable. Sin embargo, el rayado doble (RAB) provocó que todas las yemas axilares del brote se transformaran en yemas reproductivas, aún en presencia del fruto. En particular, el tratamiento RAB

alcanzó un promedio de 12 flores brote⁻¹ (Figura 1A), similar al alcanzado por los brotes OFF (16 flores brote⁻¹), pero aumentando significativamente el porcentaje de inflorescencias sin hojas (datos no mostrados), y sin mostrar diferencias en función de la posición de la yema en el brote (Figura 1B). El tratamiento RAB provocó una sobreexpresión del gen *CiFT2* x250 respecto de los brotes sin anillar ON y OFF. Además, y más importante aún, el inicio de la transcripción se adelantó en más de 50 días a los brotes OFF, de forma autónoma, antes de la llegada del frío (Figura 2A). La expresión de *CiFT2* en los brotes OFF alcanzó su máxima expresión relativa 130 DDT, respondiendo al frío (Figura 2B), como muestran estudios previos (Muñoz-Fambuena et al., 2011). La diferencia cuantitativa de la expresión relativa del brote RAB respecto del brote OFF no tiene una explicación clara, dado que los 2 tipos de brotes florecieron de un modo similar, pero plantea la hipótesis de la existencia de mecanismos *feedback* que estimularían su propia regulación, como ocurre en *Arabidopsis* (Chen y Penfield, 2018). El adelanto de la inducción y la diferenciación de la floración, por el contrario, no ofrece dudas, a la vista de la transcripción de *CiFT2*, así como la activación de la transcripción de los genes encargados de la diferenciación floral en las yemas (Figura 2C). En la planta anual *Ipomea nil*, el *estrés nutricional* promueve la floración a través de la activación del gen *FT* (Wada y Takeno, 2010), y el cultivo de *Arabidopsis* con concentraciones elevadas (5%) de sacarosa retrasa significativamente el tiempo de floración. El tratamiento RAB redujo la concentración de sacarosa, fructosa y glucosa en las hojas respecto de la de los brotes ON y OFF, mostrando una reducción relativa del 20%, 30% y 40%, respectivamente (Figura 3). El nivel bajo de azúcares en este tratamiento promovió el aumento de la expresión de *SNRK1* (conjunto proteico señalizador del estrés nutricional) (Crepin y Roland, 2019) y del gen *RbcS* (Subunidad S de RubisCO) un 25% respecto de los controles (datos no mostrados). El incremento de *SNRK1*, viene relacionado con una demanda de energía, la cual podría estar asociada a las yemas aisladas por el rayado, lo que también explicaría el aumento de expresión de *RbcS*. En efecto, las yemas anticiparon la expresión de los genes de la diferenciación floral (Figura 2C), y en el floema se observó un mayor contenido en maltosa, que sugiere mayor hidrólisis de almidón (Figura 3). En conclusión, los resultados sugieren que la interrupción basípeta y acrópeta del transporte floemático en el brote modifica el metabolismo de los carbohidratos y ello correlaciona con la promoción de la inducción floral.

BIBLIOGRAFÍA

- Agustí, M., Mesejo, C., Muñoz-Fambuena, N., Vera-Sirera, F., de Lucas, M., Martínez-Fuentes, A., ... & Blázquez, M. A. (2020). Fruit-dependent epigenetic regulation of flowering in Citrus. *New Phytologist*, 225(1), 376-384.
- Chen, M., & Penfield, S. (2018). Feedback regulation of COOLAIR expression controls seed dormancy and flowering time. *Science*, 360(6392), 1014-1017.
- Guardiola, J. L., Monerri, C., & Agusti, M. (1982). The inhibitory effect of gibberellic acid on flowering in Citrus. *Physiologia Plantarum*, 55(2), 136-142.
- Crepin, N., & Rolland, F. (2019). SnRK1 activation, signaling, and networking for energy homeostasis. *Current opinion in plant biology*, 51, 29-36.

Martínez-Fuentes, A., Mesejo, C., Reig, C., & Agustí, M. (2010). Timing of the inhibitory effect of fruit on return bloom of ‘Valencia’ sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(11), 1936-1943.

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

Wada, K. C., & Takeno, K. (2010). Stress-induced flowering. *Plant signaling & behavior*, 5(8), 944-947.

FIGURAS

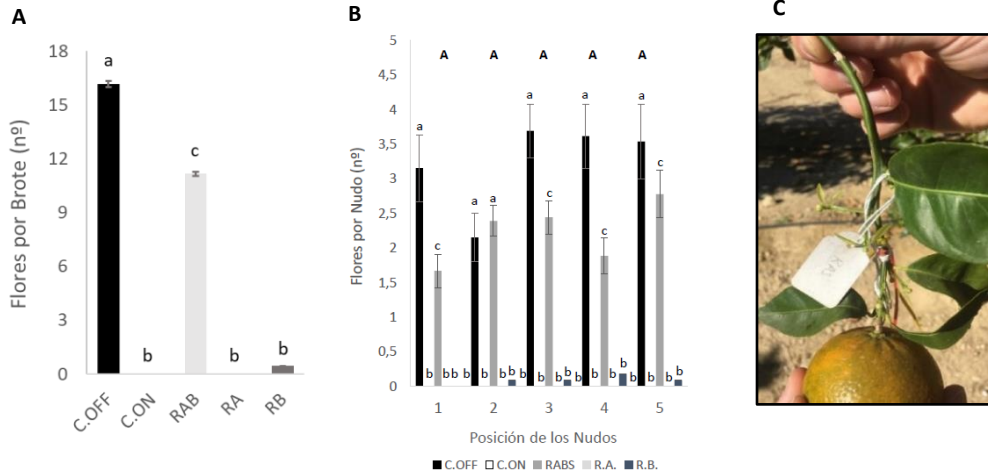


Figura 1. (A) Media del número de flores de 15 brotes campaneros completos, de los distintos tratamientos. (B) Media del número de flores por nudo en las primeras cinco posiciones axilares de 15 brotes campaneros en los distintos tratamientos. (C) Resultado del tratamiento rayado doble (RAB) en abril de la primavera del año siguiente, 2019.

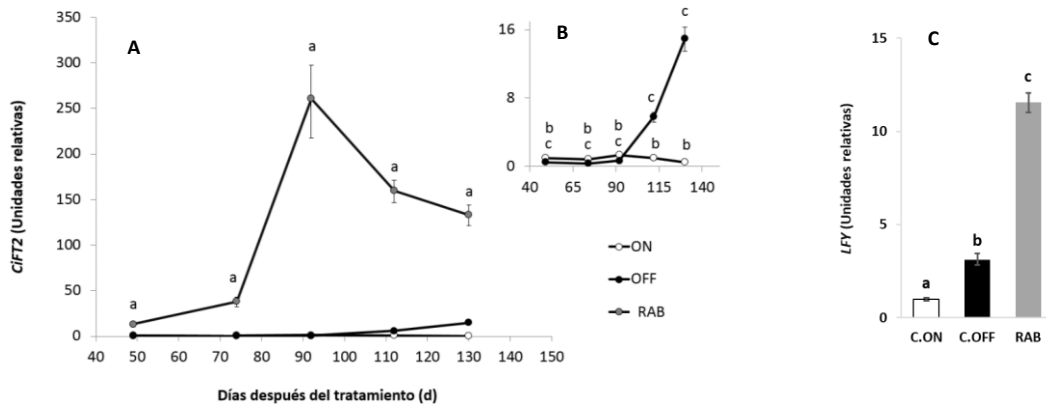


Figura 2. (A) Expresión relativa del gen *CiFT2* encargado de la inducción floral desde el mes de septiembre hasta febrero, para el tratamiento rayado doble (RAB) y los controles con fruto (C.ON) y sin fruto (C.OFF). (B) Comportamiento natural de la señal inductora C.ON y C.OFF. (C) Expresión relativa del gen *LFY* encargado de la diferenciación floral 72 DDT, antes de las condiciones óptimas de frío para la inducción floral.

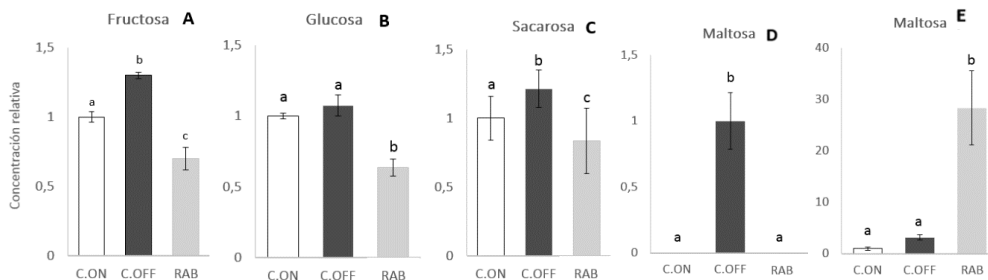


Figura 3. (A, B, C, D) Carbohidratos analizados en las hojas a los 72 DDT de rayado doble (RAB) y los controles con fruto (C.ON) y sin fruto (C.OFF). (E) Maltosa analizada en el floema a los 72 días después del tratamiento.