

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA
ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



**EFFECTO DE LA APLICACIÓN DE ÁCIDO GIBERÉLICO PARA RETRASAR
LA MADURACIÓN DEL FRUTO DEL CAQUI EN LA LATENCIA DE LAS YEMAS
Y SU INFLUENCIA SOBRE EL TAMAÑO FINAL DEL FRUTO. TÉCNICAS PARA
MEJORARLO**

**TRABAJO FIN DE GRADO EN INGENIERIA AGROALIMENTARIA Y DEL
MEDIO RURAL**

Autora: Mireia Martínez Masià

Tutora: Carmina Reig Valor

Cotutor: Manolo Agustí Fonfría

Curso académico: 2018/2019

Valencia, noviembre de 2018

Efecto de la aplicación de ácido giberélico para retrasar la maduración del fruto del caqui en la latencia de las yemas y su influencia sobre el tamaño final del fruto. Técnicas para mejorarlo.

Resumen

La utilización de ácido giberélico al inicio del cambio de color retrasa la maduración del fruto del caqui y consigue posponer su recolección, lo que se utiliza como estrategia comercial para ordenar la comercialización del mismo. Aunque la concentración saturante de esta materia se estableció en $30 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, en la práctica se utilizan $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, y, además se repite la aplicación hasta 4 ó 5 veces con el fin de conseguir el máximo retraso posible en la recolección del fruto. Pero, el tratamiento, por una parte, y, el retraso de la cosecha por otra, retardan la caída de hojas, y la entrada en latencia de las yemas, las cuales en primavera brotan sin completar su maduración, y desarrollan, por tanto, frutos que no alcanzan el tamaño adecuado.

El efecto de los tratamientos sobre la latencia se desconoce, y ello, se aborda en este Trabajo Final de Grado, con el fin de conocer la razón del desarrollo deficiente de las flores y frutos. Para ello, se estudia el efecto comparado de ambas concentraciones de AG, y su acción sobre el avance hormonal de las yemas y el consumo de reservas de carbohidratos almacenados en la corteza de las ramas próxima a las yemas.

Por otra parte, y dado que la aplicación de auxinas de síntesis al inicio de la fase lineal de crecimiento aumentan el tamaño final del fruto en el caqui, la utilización del ácido 3,5,6 – tricloro – 2 – piridiloxiacético (3,5,6 – TPA) y la realización del rayado se presentan como técnicas que podrían ser de utilidad para restituir la pérdida del tamaño del fruto, derivada de las aplicaciones de ácido giberélico en otoño y del retraso en la recolección, aspecto que también se aborda en este trabajo.

Nuestros resultados concluyen que i) la aplicación de $30 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ retrasa con la misma intensidad que $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ la coloración del caqui ‘Rojo Brillante’, pero con un menor grado de afección de la latencia y, por tanto, de la brotación y desarrollo inicial del fruto, y ii) la aplicación de $15 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de la auxina de síntesis 3,5,6-TPA aumentó el tamaño final del fruto hasta valores similares a los del control sin tratar y sin retrasar la recolección.

Palabras clave: Auxinas; Desarrollo vegetativo; Desarrollo del fruto; Giberelinas; Latencia; Retraso de la maduración.

Efecte de l'aplicació d'àcid giberèlic per a retardar la maduració del fruit del caqui en la latència dels rovells i la seua influència sobre la grandària final del fruit. Tècniques per a millorar-ho.

Resum

La utilització d'àcid giberèlic a l'inici del canvi de color retarda la maduració del fruit del caqui i aconsegueix posposar la seua recol·lecció, la qual cosa s'utilitza com a estratègia comercial per a ordenar la comercialització del mateix. Encara que la concentració saturant d'esta matèria es va establir en $30 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, en la pràctica s'utilitzen $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, i, a més es repeteix l'aplicació fins a 4 o 5 vegades a fi d'aconseguir el màxim retard possible en la recol·lecció del fruit. Però, el tractament, d'una banda, i, el retard de la collita d'una altra, retarden la caiguda de fulls, i l'entrada en latència de les gemmes, les quals a la primavera brollen sense completar la seua maduració, i desenvolupen, per tant, fruits que no aconsegueixen la grandària adequada.

L'efecte dels tractaments sobre la latència es desconeix, i això, s'aborda en aquest Treball Final de Grau, a fi de conèixer la raó del desenvolupament deficient de les flors i fruits. Per a això, s'estudia l'efecte comparat d'ambdues concentracions d'AG, i la seua acció sobre l'avanç hormonal de les gemmes i el consum de reserves de carbohidrats emmagatzemats en la corfa de les branques pròxima a les gemmes.

D'altra banda, i atès que l'aplicació d'auxines de síntesi a l'inici de la fase lineal de creixement augmenten la grandària final del fruit en el caqui, la utilització de l'àcid 3,5,6 – tricloro – 2 – piridiloxiacètic (3,5,6 – TPA) i la realització del ratllat es presenten com a tècniques que podrien ser d'utilitat per a restituir la pèrdua de la grandària del fruit, derivada de les aplicacions d'àcid giberèlic a la tardor i del retard en la recol·lecció, aspecte que també s'aborda en aquest treball.

Els nostres resultats conclouen que i) l'aplicació de $30 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ retarda amb la mateixa intensitat que $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ la coloració del caqui 'Roig Brillant', però amb un menor grau d'afecció de la latència i, per tant, de la brotació i desenvolupament inicial del fruit, i ii) l'aplicació de $15 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de l'auxina de síntesi 3,5,6-TPA va augmentar la grandària final del fruit fins a valors similars als del control sense tractar i sense retardar la recol·lecció.

Paraules clau: Auxines; Desenvolupament vegetatiu; Desenvolupament del fruit; Giberelines; Latència; Retard de la maduració.

Effect of gibberellic acid applied to delay fruit ripening on bud dormancy and final fruit size of persimmon. Techniques to improve it.

Abstract

Gibberellic acid (AG) applied at the beginning of fruit colour change significantly delays fruit ripening and harvest date of persimmon, thus increasing growers returns. However, although GA shows a saturating effect for $30 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, growers apply $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ and repeat the application by three in order to delay harvesting as long as possible. However, leaf also delays the senescence process and abscission, and, hence, the onset of dormancy is significantly delayed. Consequently, buds do not accumulate chilling enough for an appropriated sprout and flower development, and, finally, fruit size is dramatically reduced.

The effect of this kind of treatments on dormancy remains unknown, and it is addressed in this Final Degree Project in order to know the reason for the deficient development of flowers and fruits. The comparative effect of both concentrations of GA, and their effect on the time-course of the hormonal content and carbohydrate consumption along the bud dormancy was studied with this purpose.

Besides, since the application of some synthetic auxins has been proved to increase final fruit size when applied at the onset of fruit growth, 3,5,6 - trichloro - 2 - pyridyloxyacetic acid (3,5,6 - TPA) was used to improve fruit development to overcome the depressive effect of AG when applied to delay fruit ripening.

Our results conclude that i) the application of $30 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ delays fruit ripening of 'Rojo Brillante' persimmon with the same intensity as $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, and with a lower negative effect on bud dormancy, allowing a better sprouting and fruit development, and ii) the application of $15 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ of 3,5,6-TPA significantly increased final fruit size up to similar values to those of the untreated and not delayed harvesting trees.

Key words: Auxins; Bud dormancy; Gibberellins; Fruit development; Ripening; Vegetative growth.

Alumna: Mireia Martínez Masià

Tutor Académico: Prof. Dña. Carmina Reig Valor

Cotutor Académico: Prof. D. Manuel Agustí Fonfría

Valencia, noviembre de 2018

AGRADECIMIENTOS

Gracias,

A Manolo y a Carmina por la oportunidad de conocer y formar parte de este departamento. Por toda la dedicación, tiempo, apoyo y conocimientos transmitidos. Gracias por contagiar la pasión por este trabajo.

A Amparo por toda la ayuda prestada en el laboratorio, por su paciencia y amabilidad.

A Carlos, por sus consejos y por ofrecer su ayuda en todo momento.

A Vicent por toda su colaboración y dedicación en el campo.

A mi familia, mis padres y mi hermano, por todo su apoyo incondicional y el esfuerzo realizado día a día. Por ser mi ejemplo a seguir, gracias. 'No te compliques'.

A Vicent por hacerlo todo infinitamente más fácil, por estar siempre ahí. Gracias.

A mis amigos, compañeros del TFG, Patri, Victoria, Edu y Fedro, que suerte compartir toda esta etapa. Esto es solo el principio.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	OBJETIVOS.....	3
3.	MATERIAL Y MÉTODOS	4
3.1	DISEÑO EXPERIMENTAL Y TOMA DE MUESTRAS.....	4
3.2	ANÁLISIS DE CARBOHIDRATOS.....	7
3.3	ANÁLISIS HORMONAL.....	8
3.4	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	9
4.	RESULTADOS.....	10
4.1.	INFLUENCIA DE LA ÉPOCA DE RECOLECCIÓN Y LA APLICACIÓN DE AG SOBRE LA COSECHA DEL AÑO SIGUIENTE Y SUS COMPONENTES.....	10
4.2.	INFLUENCIA DE LA ÉPOCA DE RECOLECCIÓN Y LA APLICACIÓN DE AG SOBRE LA BROTAÇÃO Y FLORACIÓN.....	12
4.3.	VARIACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE AG APLICADA.	16
4.4.	EFFECTO COMPARADO DE LA APLICACIÓN DE 30 ó 50 mg·l ⁻¹ DE AG SOBRE LA CONSERVACIÓN DEL FRUTO EN EL ARBOL.....	16
4.5.	EVOLUCIÓN DE LOS CARBOHIDRATOS DURANTE LA LATENCIA. INFLUENCIA DE LA APLICACIÓN DE AG Y LA FECHA DE RECOLECCIÓN.	18
4.6.	EVOLUCIÓN DE LAS FITOHORMONAS DURANTE LA LATENCIA. INFLUENCIA DE LA APLICACIÓN DE AG Y LA FECHA DE RECOLECCIÓN	23
4.7.	ESTÍMULO DEL DESARROLLO DEL FRUTO	27
5.	DISCUSIÓN	29
6.	CONCLUSIÓN.....	33
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Influencia de la fecha de recolección y la aplicación de ácido giberélico (50 mg·l⁻¹; AG) para retrasarla sobre el número de frutos recolectados por árbol de ‘Rojo Brillante’ en la cosecha siguiente. Cada valor es la media de 10 árboles. No existen diferencias significativas entre tratamientos.....10

Tabla 2. Influencia de la fecha de recolección y la aplicación de ácido giberélico (50 mg·l⁻¹; AG) para retrasarla sobre el peso medio de los frutos del caqui ‘Rojo Brillante’ recolectados en la cosecha siguiente. Cada valor es la media de 15 frutos por árbol y 10 árboles. Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).....11

Tabla 3. Influencia de la concentración de AG aplicada sobre la evolución de la coloración del fruto del caqui. Valores expresados en coordenadas Hunter. Cada valor es la media de 25 frutos \pm ES. Letras distintas para una misma fecha indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).....17

Tabla 4. Influencia de la aplicación de la auxina de síntesis 3,5,6-TPA (15 mg·l⁻¹) al inicio de la fase lineal del desarrollo del fruto sobre el diámetro medio de los frutos del caqui ‘Rojo Brillante’ que iniciaron su desarrollo la primavera siguiente al tratamiento con 50 ó 30 mg·l⁻¹ de ácido giberélico para retardar la recolección (otoño de 2017). El tratamiento se efectuó el 16 de julio de 2018. Cada valor es la media \pm ES de los frutos de 5 árboles...28

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diseño de los tratamientos con AG realizados en otoño y de las fechas de recolección. Cada fila tenía 30 árboles y cada parte dividida 10. La recolección *pronto* se llevó a cabo el 6 de noviembre, y la *tarde* el 5 de diciembre.....5

Figura 2. Diseño de los tratamientos con 3,5,6-TPA. En él aparecen, también, el tratamiento duplicado con 30 mg·l⁻¹ y por triplicado de 50 mg·l⁻¹ AG en otoño, y las fechas de recolección.....6

Figura 3. Relación entre el número de frutos por árbol y su peso individual en el caqui ‘Rojo Brillante’. Influencia de la fecha de recolección del año anterior. Pronto: 11 noviembre, azul. Tarde: 14 de diciembre, rojo.....11

Figura 4. Relación entre el número de frutos por árbol y su peso individual en el caqui “Rojo Brillante”. Influencia de la aplicación de 50 mg·l⁻¹ de ácido giberélico (AG) aplicada para retrasar la coloración de los frutos del año anterior y la fecha de recolección. Pronto: 11 noviembre, azul. Tarde: 14 de diciembre, rojo.....12

Figura 5. Influencia de la concentración de AG aplicada (30 y 50 mg·l⁻¹) y de la fecha de recolección sobre el porcentaje de yemas brotadas en el caqui ‘Rojo Brillante’. Cada valor es la media de 8 ramas de 8 árboles. Pronto: 6 de noviembre; tarde: 5 de diciembre. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$).....13

Figura 6. Influencia de la aplicación de AG y de la época de recolección sobre el peso medio de las hojas. Cada valor es la media de 50 hojas y 8 árboles. Valores para el 4 de abril. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$). Pronto: 6 noviembre; tarde: 5 diciembre.....14

Figura 7. Influencia de la aplicación de AG y de la época de recolección sobre el peso de la flor en antesis (A) y del fruto recién cuajado (B). El peso de la flor es de árboles tratados con $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ y recolectados el 5 de diciembre (tarde). Cada valor es la media de 50 flores o frutos. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$). Pronto: 6 noviembre.....15

Figura 8. Influencia de la concentración de AG aplicada sobre la coloración de las hojas del caqui 'Rojo Brillante'. Valores para el 28 de noviembre. Cada valor es la media de 10 hojas. Las barras verticales indican el error estándar. Letras distintas indican significación estadística ($p \leq 0.05$).....18

Figura 9. Influencia de la concentración de AG aplicada para retardar la coloración del fruto y la época de recolección sobre la evolución de los monosacáridos y sacarosa del floema de las ramas de un año de edad de caqui. Cada valor es la media de 10 ramas y 2 repeticiones analíticas. A: Control recolectado pronto; B: Control recolectado tarde, C: AG $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ recolectado pronto, D: AG $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ recolectado tarde; E: AG $30 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ recolectado pronto, F: AG $30 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ recolectado tarde.....21

Figura 10. Influencia de la recolección tardía y la aplicación de $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de AG sobre el contenido en almidón de reserva del floema de ramas de un año de edad del caqui 'Rojo Brillante'. Valores para el 14 de febrero. Cada valor es la media de 3 repeticiones biológicas y 2 réplicas químicas. Las barras verticales indican el error estándar. Letras distintas indican significación estadística ($p \leq 0.05$).....22

Figura 11. Influencia de la concentración de AG aplicada (A) para retardar la coloración del fruto y la época de recolección (B) sobre la evolución del ácido abscísico en las yemas de caqui 'Rojo Brillante' en latencia. Cada valor es la media de 15 yemas y 2 repeticiones analíticas. * indica diferencia significativa ($p \leq 0.05$).....23

Figura 12. Influencia de la concentración de AG aplicada (A) para retardar la coloración del fruto y la época de recolección (B) sobre la evolución del ácido indol-3-acético en las yemas de caqui 'Rojo Brillante' en latencia. Cada valor es la media de 15 yemas y 2 repeticiones analíticas. * indica diferencia significativa ($p \leq 0.05$).....24

Figura 13. Influencia de la concentración de AG aplicada (A) para retardar la coloración del fruto y la época de recolección (B) sobre la evolución de la *trans*-zeatina en las yemas de caqui en latencia. Cada valor es la media de 15 yemas y 2 repeticiones analíticas. * indica diferencia significativa ($p \leq 0.05$).....25

Figura 14. Influencia de la concentración de AG aplicada (A) para retardar la coloración del fruto y la época de recolección (B) sobre la evolución de la relación ácido indol-3-acético/*trans* zeatina en las yemas de caqui ‘Rojo Brillante’ en latencia. Cada valor es la media de 15 yemas y 2 repeticiones analíticas.....26

Figura 15. Influencia de la concentración de AG aplicada (A) para retardar la coloración del fruto y la época de recolección (B) sobre la evolución de la relación ácido abscísico/ácido indol-3-acético en las yemas de caqui ‘Rojo Brillante’ en latencia. Cada valor es la media de 15 yemas y 2 repeticiones analíticas.....27

1. INTRODUCCIÓN

El caqui (*Diospyros kaki* Thunb.) es una especie caducifolia, de origen subtropical, que se adapta bien a zonas templadas, entre 40º de latitud Norte y Sur. Sus árboles en climas templados inician la latencia a finales del otoño. No es muy exigente en frío y se estima que son necesarias algo menos de 200 horas por debajo de 7ºC para una brotación y floración adecuadas, pero este aspecto no ha sido evaluado de manera precisa (Giordani *et al.*, 2015). En condiciones normales de cultivo, la brotación se inicia en el mes de marzo y con ella tiene lugar la diferenciación floral de las yemas. Las flores son visibles a principios de abril.

El origen del caqui se localiza en China, donde hay referencias de su cultivo a. C. Así, en el S. VII ya existen referencias de su cultivo en Japón, y en el S. XIV en Corea. En Europa su cultivo en los países mediterráneos data del S. XVII (Badenes *et al.*, 2015).

Las especies del género *Diospyros* son más de 400, pero sólo se cultiva *D. kaki*, de la que se han descrito más de dos mil cultivares. Éstos se clasifican según el origen del fruto por fecundación o partenocarpia y su astringencia en la maduración (Giordani *et al.*, 2015). La astringencia está originada por los taninos solubles presentes en la pulpa y por la propiedad de las semillas de generar sustancias volátiles capaces de inhibir su solubilización (Sugiura y Tomana, 1983). Si los taninos solubles se diluyen y se coagulan con compuestos tánicos insolubles, la astringencia se pierde (Yonemori *et al.*, 2002).

En España se cultivan los cultivares ‘Triumph’, mayoritariamente en Andalucía, y ‘Rojo Brillante’, sobre todo en la Comunidad Valenciana. Éste surgió en Carlet (Valencia), de una mutación gemaria espontánea, probablemente del cultivar ‘Cristalino’ (Juan *et al.*, 2002). Este cultivar, de gran aceptación comercial, se caracteriza por su capacidad para ser comercializado antes de que alcance el climaterio, consumiéndose, por tanto, con una consistencia dura que le confiere un gran valor comercial. Para ello es necesario eliminar, previamente, su astringencia (Toye *et al.*, 1987). Desde 1998, cuando se funda el Consejo Regulador de la Denominación de Origen (CRDO) *Kaki Ribera del Xúquer*, se comercializa bajo la marca *Persimmon*®.

Según datos de la FAO, en España, en el año 2016 se produjeron aproximadamente 311.000 t de caqui. En la Comunidad Valenciana, a comienzos de los años 2000 se producían unas 40.000 t, y para la campaña 2017-2018 se han estimado 275.000 t. Este aumento de la producción de un solo cultivar ha generado un problema de comercialización dado el carácter climatérico de este fruto. En efecto, su recolección y comercialización resultan inviables si no se adoptan técnicas para escalonarlas, ya que la capacidad de almacenamiento en cámaras de frigoconservación para regular la oferta es limitada. Para ello se han puesto a punto técnicas específicas para adelantar su maduración (Juan *et al.*, 2002) y retrasarla (Agustí *et al.*, 2004).

La anticipación de la maduración se logra con la aplicación de $15 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de ácido 2-cloroetilfosfónico (etefón), un liberador de etileno, que consigue anticipar la entrada en color del fruto y su climaterio cuando se aplica a principios de septiembre, con los frutos iniciando el cambio de color. En el momento de la primera recolección (finales de septiembre) este tratamiento permite recolectar, aproximadamente, el 25% de los frutos, cuando de los árboles sin tratar no se puede recolectar ninguno (Juan *et al.*, 2002). Pero la vida poscosecha del fruto es escasa ya que éste inicia el climaterio con antelación y esta técnica, por tanto, ve limita su eficacia.

Para retrasar la maduración se aplica ácido giberélico. Las giberelinas, son compuestos naturales que actúan como reguladores endógenos del crecimiento y el desarrollo de los vegetales superiores. Estas fitohormonas son, también, responsables de la senescencia de los tejidos y se han utilizado para retrasar la coloración y recolección de los frutos (Seymour *et al.*, 1993). En el caqui, la aplicación de ácido giberélico retrasa el cambio de color del fruto y, con ello, su recolección y la vida poscosecha (Ben-Arie *et al.*, 1986). La eficacia de este tratamiento se satura para una concentración de $30 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ y se muestra eficaz cuando se aplica veinticinco días antes del cambio de color (Agustí *et al.*, 2004). Pero la elevada producción y el escaso tiempo de comercialización del caqui 'Rojo Brillante' suponen tal presión comercial que el agricultor aumenta la concentración hasta $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ y el número de tratamientos, con el fin de retrasar la recolección hasta principios de enero.

Pero el tratamiento no sólo afecta a los frutos, también retrasa la senescencia de las hojas, y éstas abscinden un mes más tarde que los árboles no tratados. Este retraso en la abscisión de las hojas y en la recolección del fruto retrasa, a su vez, la entrada en latencia de las yemas. En consecuencia, éstas no acumulan el frío necesario y aunque el árbol retrasa la brotación de las yemas, no lo hace en tiempo equivalente a su entrada en latencia, y aquella sucede de modo anómalo, produciendo hojas de tamaño más pequeño y flores de baja calidad. Con ello, la cosecha siguiente reduce sensiblemente su calidad.

Estudiar la evolución de la latencia de los árboles en estas condiciones, esto es, tratados repetidamente con $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de AG, recolectados a principios de enero, y con un retraso de un mes, aproximadamente, en la entrada en latencia de sus yemas, y las vías de solución a las deficiencias en la brotación y la cosecha siguientes es el objetivo de este Trabajo Final de Grado.

La Hipótesis de Trabajo es que la aplicación repetida de $30 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de AG consigue retrasar satisfactoriamente la recolección del fruto sin los efectos negativos sobre la latencia, brotación, floración y desarrollo del fruto que muestra la aplicación de $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Y que $15 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de la auxina de síntesis 3,5,6-TPA (ácido 3,5,6-tricloro-2-piridiloxiacético) aplicados al inicio de la fase lineal del crecimiento del fruto mejora su tamaño final en los árboles tratados hasta igualarlo al de los árboles sin tratar.

2. OBJETIVOS

De acuerdo con ello los objetivos del presente Trabajo Fin de Grado son:

- (i) Estudiar la eficacia de $30 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ en comparación con $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ para retrasar la recolección del caqui 'Rojo Brillante' y sus efectos sobre la latencia, brotación y floración.
- (ii) La eficacia del 3,5,6-TPA para aumentar el tamaño del fruto y superar el efecto depresivo provocado por los tratamientos con AG y el retraso de la recolección.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

El experimento se llevó a cabo en una plantación comercial de árboles adultos de caqui (*Diospyros caqui* Thunb.), cv. Rojo Brillante, de nueve años de edad, injertados sobre patrón *D. lotus*, con un marco de plantación de 3 x 5 m, podados en vaso, con riego localizado, y suelo franco-arcilloso, localizada en L'Alcudia (Valencia), que disponía 10 filas de 30 árboles cada una.

3.1 DISEÑO EXPERIMENTAL Y TOMA DE MUESTRAS

El trabajo se llevó a cabo entre octubre de 2016 y septiembre de 2018.

En otoño de 2016, para retrasar la coloración y recolección del fruto, se realizó un tratamiento con ácido giberélico (AG) a una concentración de $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, dejando árboles sin tratar como controles.

En otoño de 2017, los tratamientos para retrasar la coloración del fruto fueron:

- Control
- (1) Ácido giberélico (AG), a una concentración de $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$
- (2) AG, a una concentración de $30 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$

En ambos años, cada tratamiento se llevó a cabo en una fila completa de 30 árboles cada una. En 2016, los tratamientos se realizaron el 30 de septiembre, el 24 de octubre y el 8 de noviembre sobre los mismos árboles, y se recolectaron en dos fechas, 11 de noviembre (pronto) y 12 de diciembre (tarde). En 2017, los tratamientos se efectuaron el 21 septiembre y 10 de octubre para la concentración de $30 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, y además el 30 de octubre para la de $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, también sobre los mismos árboles, pero de filas distintas. Este año las filas se dividieron transversalmente en tres partes de 10 árboles cada una. Las dos extremas se recolectaron pronto (6 noviembre) y la del centro tarde (5 diciembre), y de este modo, *pronto* y *tarde*, y para ambos años, se refiere la época de recolección a lo largo del texto. Así, los tratamientos de 2017 con AG y *fecha de recolección* estuvieron cruzados (Figura 1).

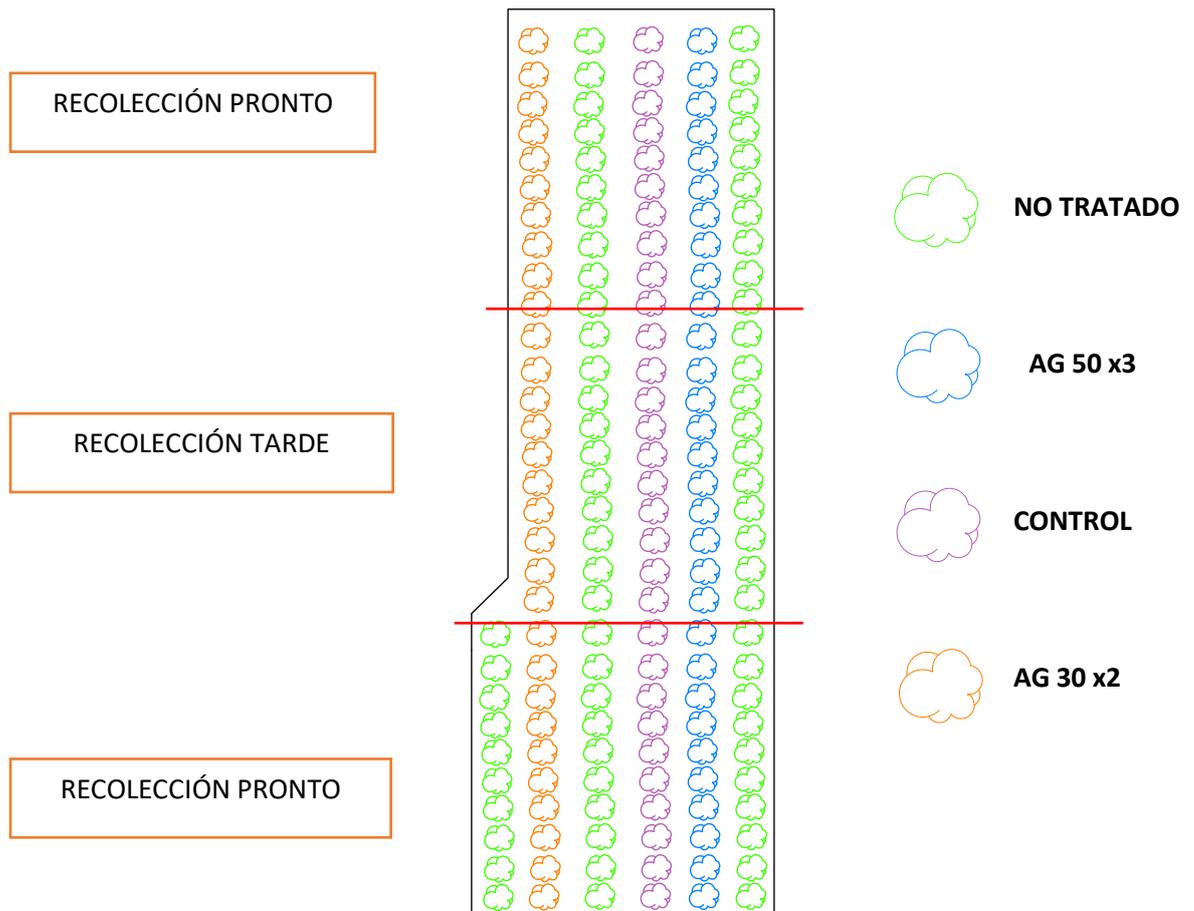


Figura 1. Diseño de los tratamientos con AG realizados en otoño y de las fechas de recolección. Cada fila tenía 30 árboles y cada parte dividida 10. La recolección *pronto* se llevó a cabo el 6 de noviembre, y la *tarde* el 5 de diciembre.

Al inicio de la fase lineal del desarrollo del fruto (16 de julio de 2018), 4 árboles por fila de cada una de las partes en que se dividieron éstas, por tanto, 4 árboles de cada tratamiento para retrasar la coloración y de fecha de recolección, fueron tratados con $15 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de 3,5,6-TPA (ácido 3,5,6-tricloro-2-piridiloxiacético) (Figura 2).

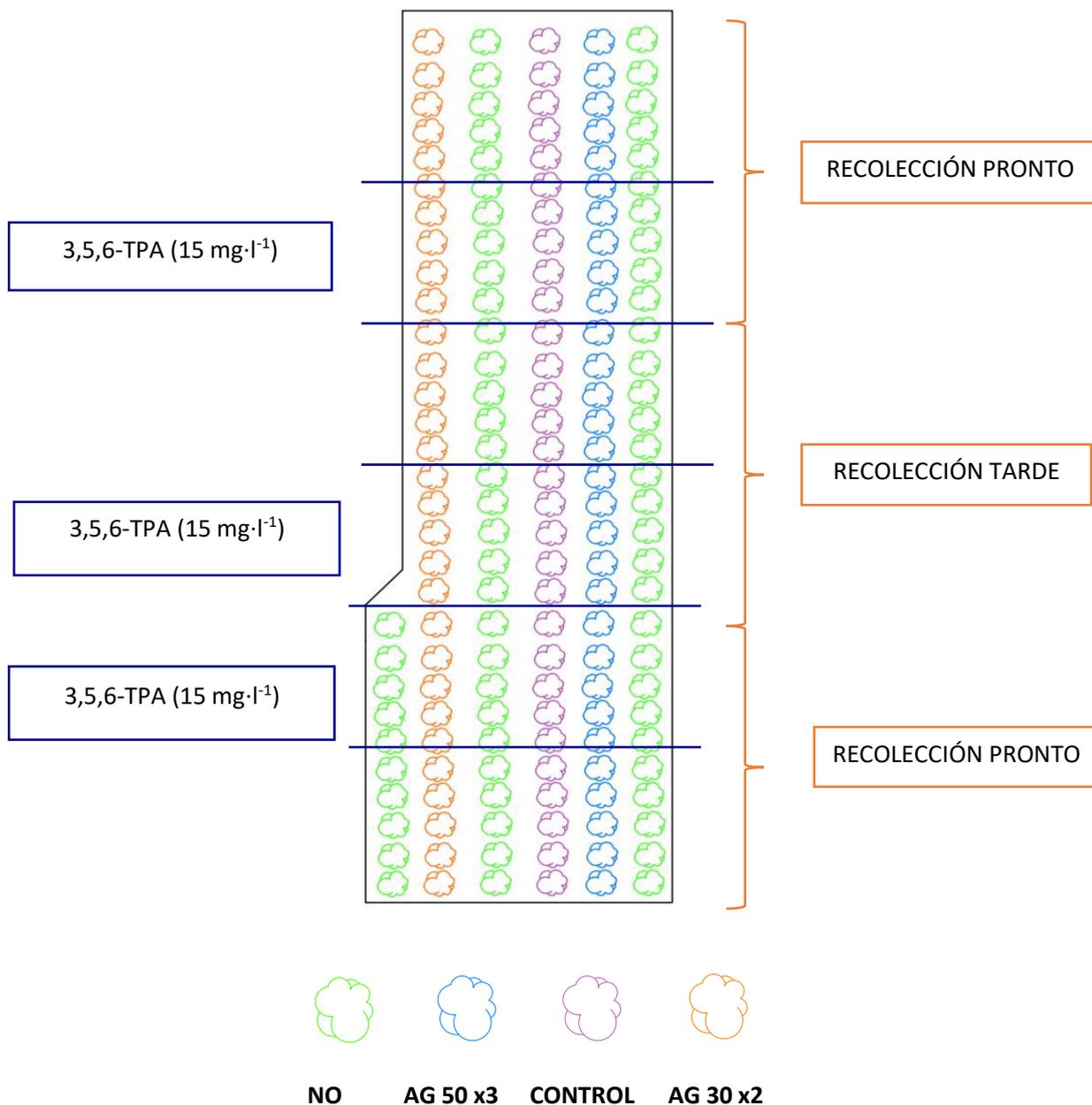


Figura 2. Diseño de los tratamientos con 3,5,6-TPA. En él aparecen, también, el tratamiento duplicado con 30 mg·l⁻¹ y por triplicado de 50 mg·l⁻¹ AG en otoño, y las fechas de recolección.

Desde el 27 de noviembre y hasta la brotación se tomaron, periódicamente, muestras de 10 ramas, de unos 40 cm de longitud, repartidas entre los árboles de cada tratamiento, se llevaron al laboratorio a baja temperatura y de ellas se separó el floema, el xilema, y las yemas. Las muestras se conservaron a -30°C hasta su liofilización y posterior análisis de carbohidratos y hormonas.

El color del fruto se evaluó el 6 y el 27 de noviembre de 2017, determinando las coordenadas a y b de Hunter. Se utilizaron para ello 10 frutos por árbol, de 5 árboles por tratamiento, tomando 3 mediciones por fruto en su zona ecuatorial con un colorímetro Chroma Meter CR-400 (Konica Minolta

Optics Inc., Osaka, Japan). La coordenada a indica color verde cuando es negativa y rojo cuando es positiva, y la b azul cuando es negativa (inexistente en el caqui) y amarillo cuando es positiva. La relación a/b se ha utilizado también en este estudio para expresar la coloración del fruto.

El 28 de noviembre de 2017 se determinó el color de 10 hojas por árbol, de 5 árboles por tratamiento, utilizando un medidor de clorofilas Chlorophyll Meter SPAD-502 (Minolta Corp., NJ, USA), expresando los resultados en unidades SPAD. La unidad SPAD es un indicador del color verde de las hojas.

El porcentaje de yemas brotadas se determinó el 2 de marzo, contando las que habían iniciado la brotación a partir de 8 ramas por tratamiento de unos 60 cm de longitud, repartidas entre todos los árboles de cada uno.

Cuando la brotación ya era evidente (4 de abril) se determinó el peso de 10 hojas por árbol de 5 árboles por tratamiento. El peso de las flores se determinó en antesis (28 de abril) a partir de 10 flores por árbol y 5 árboles por tratamiento. Y el del fruto recién cuajado a partir de 5 frutos por árbol de 5 árboles por tratamiento.

3.2 ANÁLISIS DE CARBOHIDRATOS

Para determinar el contenido endógeno de azúcares solubles se utilizó el protocolo de Eshghi *et al.*, (2007) con ciertas modificaciones. Las muestras de floema congeladas y posteriormente liofilizadas se molieron a polvo fino. Se pesaron 2 o 3 repeticiones de 100 mg de material liofilizado y molido. Se añadió Petroleum ether (40-60º) para facilitar la limpieza de lípidos, clorofilas y otros posibles contaminantes. Las muestras se centrifugaron (4000 rpm; 4º; 6 min) en una centrífuga Digicen 20R-ortoalresa. El sobrenadante fue eliminado, mientras que, al residuo sólido se le agregó 4 ml de etanol al 80% para facilitar la extracción y 100 µl de fucosa, azúcar que no está presente en los tejidos vegetales y que se utiliza como estándar interno para cuantificar las pérdidas del resto de azúcares durante este proceso de extracción.

Las muestras se mantuvieron 25 min en un baño termostático a 65°C para facilitar la extracción de los azúcares solubles. Posteriormente fueron centrifugadas a 4000 rpm; 4°C; 6 min, y se extrajo el sobrenadante.

Se realizó otra extracción con etanol 80% para mejorar la concentración de azúcares conseguida. Se juntaron ambos sobrenadantes obtenidos. El residuo sólido resultante de las dos extracciones alcohólicas se conservó para posterior análisis de almidón.

El sobrenadante final con los carbohidratos solubles se trasladó a un Speed Vac Concentrator (Savant®) donde fueron reducidos a sequedad.

Al residuo seco obtenido se le añadió 4 ml de agua Milli-Q para facilitar la disolución de azúcares y se incorporaron 20 mg de Activated Charcoal, para la purificación, limpieza de la muestra. Éstas se centrifugaron (4000 rpm, 4°C, 10 min) y se recogió el sobrenadante limpio que se filtró a través de un filtro de nylon 0,45 µm.

Este líquido ya filtrado se redujo a sequedad mediante el Speed Vac, de la misma manera que se realizó anteriormente.

La muestra seca diluida en 100 µl de agua Milli-Q, fue inyectada en un equipo de detección HPLC (Thermo Fisher, USA), utilizando una mezcla de acetonitrilo:agua (80:20) como fase móvil, a un flujo de 1 ml·min⁻¹ equipado con una columna APS-2 hypersil (250 x 4,6 mm), una bomba de vacío de P2000, un refractómetro diferencial R150 y un sistema de procesamiento de datos Chrom Quest.

Las cantidades de glucosa, fructosa y sacarosa presentes en las disoluciones fueron identificadas y cuantificadas según los tiempos de retención, y las áreas de sus picos de integración. Los resultados obtenidos fueron expresados en mg·g PS⁻¹.

El equipo fue calibrado previamente con distintas concentraciones de los azúcares analizados hasta obtener los tiempos de retención y las curvas de calibración adecuados.

Para el análisis de almidón se recuperó el residuo sólido anteriormente congelado, obtenido a partir de la extracción de carbohidratos solubles.

A este residuo sólido se le agregó 0.1 ml de fucosa como estándar interno, 0.5 ml de acetato sódico (pH 4.5) y 1 ml de Amyloglucosidase (Sigma-Aldrich), para a continuación ser incubado durante 2 horas a 55 °C, facilitando así la digestión enzimática.

La cantidad de glucosa obtenida se determinó mediante HPLC tal y como previamente se ha descrito para los azúcares solubles y el contenido de almidón se expresó como glucosa liberada (mg·g PS⁻¹).

3.3 ANÁLISIS HORMONAL

Para la determinación del contenido endógeno de ácido abscísico (ABA), ácido indolacético (IAA) y *trans*-zeatina (tZ), se pesaron dos alícuotas de 50 mg del material congelado, liofilizado, y molido hasta polvo fino, de las yemas recogidas de los árboles de nuestro experimento.

Las hormonas fueron extraídas con metanol 80%, ácido acético 1% (v/v) en presencia de diferentes estándares internos (hormonas marcadas con Deuterium para cuantificar las pérdidas de cada hormona inherentes al proceso de extracción [proporcionadas por Prof. L Mander- Camberra, OIChemim Ltd – Olomouc, o Cambridge Isotope Lab – Andover]: [17, 7-2H]-Gan, [2H5]-IAA y [2H6]-ABA). Estos estándares fueron añadidos para la cuantificación de ABA y IAA. En el caso de las citoquininas (tZ), se utilizaron diferentes citoquininas deuteradas como estándares internos (D-tZ)

Para la recuperación de la fracción ácida donde se localizan las IAA, ABA, y tZ, los extractos pasaron consecutivamente a través de columnas HLB en fase reversa, MCX (intercambio catiónico) y WAX (intercambio iónico) (Oasis 30 mg. Waters) como se describe en Seo *et al.*, (2011). Asimismo, para la recuperación de la fracción básica donde podemos encontrar las citoquininas, las muestras pasaron por un cartucho HLB (elución acetonitrilo 80%: Ácido acético 1%) y seguidamente a través de una columna MCX. Las muestras se llevaron a sequedad mediante rotovapor.

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

Por último, la interpretación de los resultados se realizó mediante los programas Xcalibur 2.2 SP1 y TraceFinder (Luo & Wang, 2008).

3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

A los resultados se les aplicó el análisis de la varianza, utilizando el test de Student-Newman-Keuls para la separación de medias. A los valores porcentuales se les aplicó la transformación $\text{arc sen } \sqrt{p}$ para normalizar la muestra. Se utilizó el programa STATGRAPHICS Centurion (Statistical Graphics Corporation, Englewood Cliffs, NJ, USA).

4. RESULTADOS

4.1. INFLUENCIA DE LA ÉPOCA DE RECOLECCIÓN Y LA APLICACIÓN DE AG SOBRE LA COSECHA DEL AÑO SIGUIENTE Y SUS COMPONENTES.

El retraso en la recolección del fruto (noviembre vs diciembre 2016) no alteró el número de frutos de la cosecha siguiente (noviembre 2017). Y ello independientemente de la aplicación de 50 mg·l⁻¹ de AG. De los árboles control recolectados en la primera fecha se cosecharon 415 frutos el año siguiente, mientras que los recolectados en la segunda, 597 frutos (Tabla 1). En el caso de los árboles tratados con AG se recolectaron 639 y 508 frutos por árbol, respectivamente. Estas diferencias, aun siendo amplias, no alcanzaron la significación estadística.

Tabla 1. Influencia de la fecha de recolección y la aplicación de ácido giberélico (50 mg·l⁻¹; AG) para retrasarla sobre el número de frutos recolectados por árbol de 'Rojo Brillante' en la cosecha siguiente. Cada valor es la media de 10 árboles. No existen diferencias significativas entre tratamientos.

Tratamientos	Nº frutos	
	11 nov	12 dic
Control	414.9 ± 47.6	597.4 ± 40.4
AG 50	639.5 ± 57.7	508.0 ± 93.7

Una situación distinta se dio con en el peso de los frutos. El retraso en la recolección en 2016 redujo el peso de los frutos de la cosecha del año 2017 de 316 a 186 g fruto⁻¹ (Tabla 2), y de 225 a 176 g fruto⁻¹ en los árboles tratados con AG. Es de destacar que este efecto del ácido giberélico se mostró adicional al del retraso en la recolección. Así, al comparar el peso de los frutos de los árboles control y AG ambos recolectados pronto, éste se redujo de 316 a 225 g fruto⁻¹ por efecto del AG, y el de los recolectados tarde de 185 a 176 g fruto⁻¹, respectivamente. La interacción entre ambas variables, fecha de recolección y aplicación de AG, también alcanzó la significación estadística.

Tabla 2. Influencia de la fecha de recolección y la aplicación de ácido giberélico (50 mg·l⁻¹; AG) para retrasarla sobre el peso medio de los frutos del caqui ‘Rojo Brillante’ recolectados en la cosecha siguiente. Cada valor es la media de 15 frutos por árbol y 10 árboles. Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Tratamientos	Peso fruto ⁻¹ (g)	
	11 nov.	14 dic.
Control	315.9 ± 28.3 c	185.5 ± 9.5 a
AG 50	224.9 ± 9.8 b	175.9 ± 12.7 a

El tamaño medio de los frutos estuvo significativamente condicionado por el número de frutos por árbol, tanto en los árboles control como en los tratados con AG para retrasar la recolección. Al comparar los árboles recolectados pronto (11 noviembre) y tarde (14 diciembre) de ambos tratamientos, control (Figura 3) y tratado con AG (Figura 4), siempre los árboles recolectados pronto presentaron una recta de regresión con ordenada en el origen significativamente mayor que los recolectados tarde, demostrando que el retraso en la recolección fue responsable de la reducción del tamaño del fruto con independencia de la aplicación de AG.

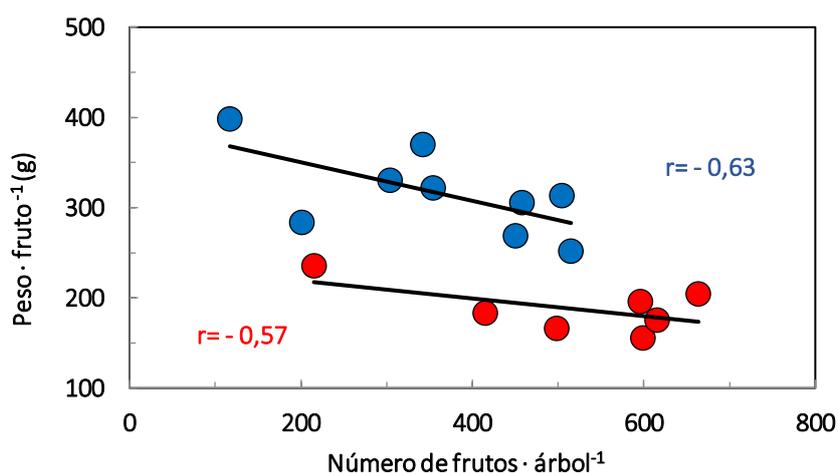


Figura 3. Relación entre el número de frutos por árbol y su peso individual en el caqui ‘Rojo Brillante’. Influencia de la fecha de recolección del año anterior. Pronto: 11 noviembre, azul. Tarde: 14 de diciembre, rojo.

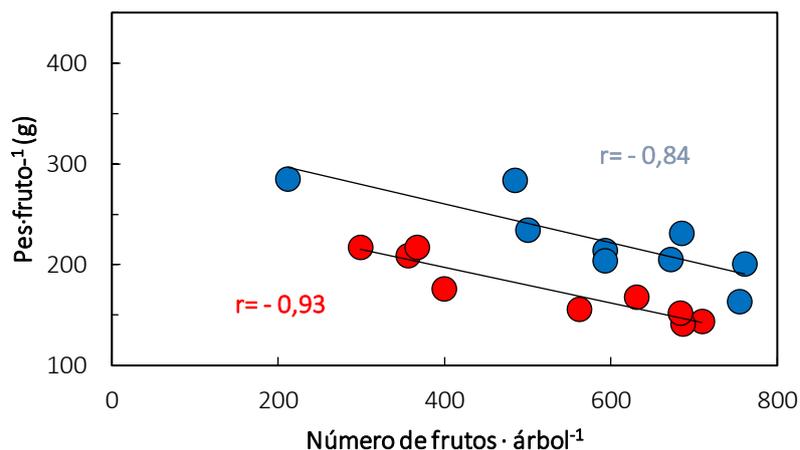


Figura 4. Relación entre el número de frutos por árbol y su peso individual en el caqui “Rojo Brillante”. Influencia de la aplicación de $50 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de ácido giberélico (AG) aplicada para retrasar la coloración de los frutos del año anterior y la fecha de recolección. Pronto: 11 noviembre, azul. Tarde: 14 de diciembre, rojo.

4.2. INFLUENCIA DE LA ÉPOCA DE RECOLECCIÓN Y LA APLICACIÓN DE AG SOBRE LA BROTACIÓN Y FLORACIÓN.

Estas diferencias en el peso del fruto tuvieron su origen en el mismo momento de la brotación. Así, los árboles control recolectados pronto brotaron antes que los recolectados tarde, de modo que el 2 de marzo mientras de los árboles recolectados pronto habían brotado el 90 % de las yemas, en los recolectados tarde solo lo había hecho el 40% (Figura 5). Pero este retraso fue mucho más pronunciado en los árboles tratados con AG para retrasar la recolección, de los que solo habían brotado el 5% y el 3% de las yemas, respectivamente.

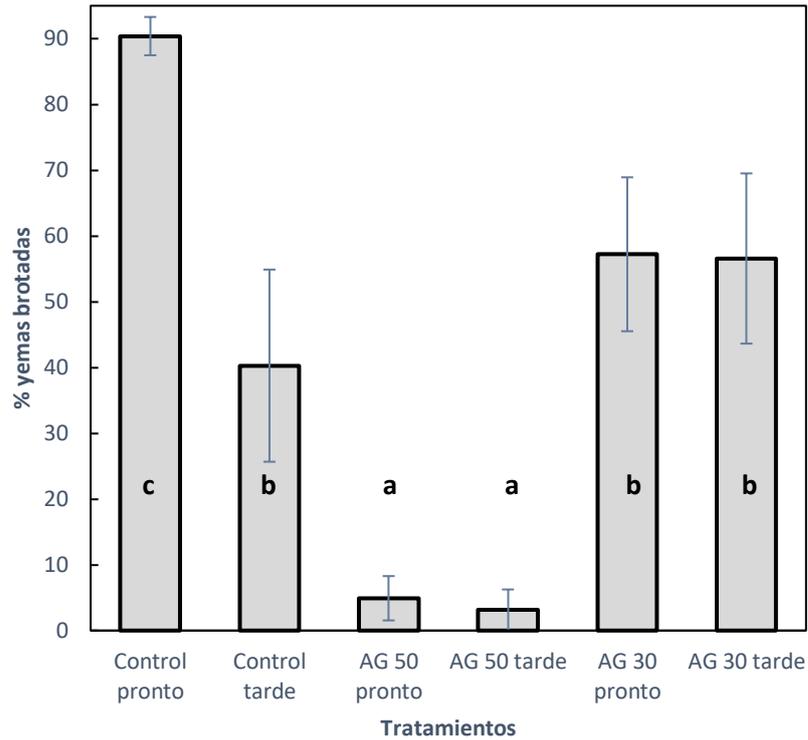


Figura 5. Influencia de la concentración de AG aplicada (30 y 50 mg·l⁻¹) y de la fecha de recolección sobre el porcentaje de yemas brotadas en el caqui ‘Rojo Brillante’. Cada valor es la media de 8 ramas de 8 árboles. Pronto: 6 de noviembre; tarde: 5 de diciembre. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$).

El peso de la hoja también fue significativamente reducido al retrasar la recolección, pero este efecto solo fue detectable en los controles cuyas hojas, en el momento de la brotación, pasaron de pesar 920 mg en los árboles recolectados pronto a 710 mg en los recolectados tarde (Figura 6). En los árboles tratados con AG el peso de las hojas se redujo marcadamente respecto de los árboles control, independientemente de su fecha de recolección. La media general en estos últimos fue de 815 mg, mientras que en los tratados con AG fue de 610 mg.

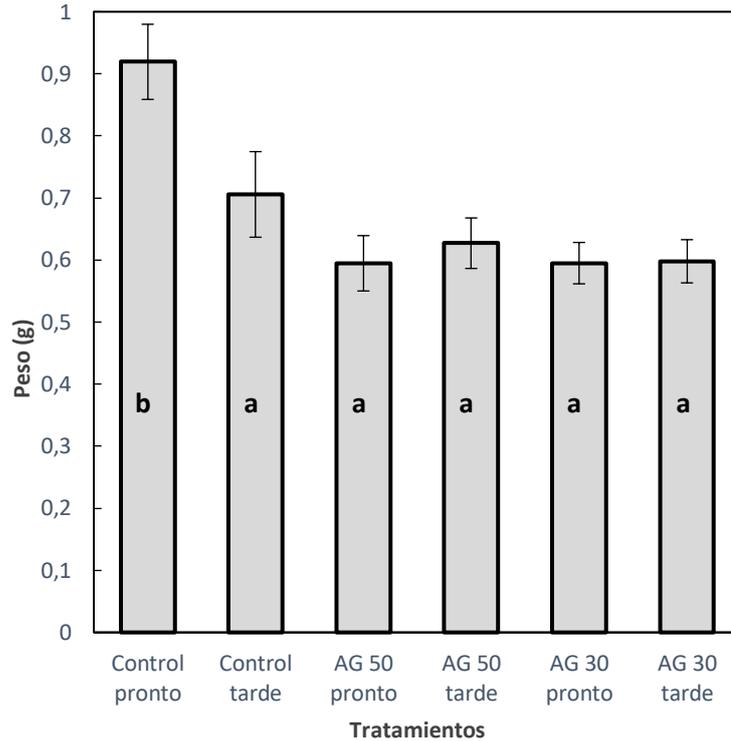


Figura 6. Influencia de la aplicación de AG y de la época de recolección sobre el peso medio de las hojas. Cada valor es la media de 50 hojas y 8 árboles. Valores para el 4 de abril. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$). Pronto: 6 noviembre; tarde: 5 diciembre.

Como consecuencia de ambos efectos, retraso en la brotación y reducción del tamaño foliar, el peso de las flores en el momento de la antesis descendió un 14% (Figura 7A) y los frutos recién cuajados de los árboles control y tratados con $50 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de AG, pesaban 14.7 g y 11.4 g, respectivamente, y cuando, además, se recolectaron tarde pesaron 13.3 y 10.7 g, respectivamente (Figura 7B). Del mismo modo que en el caso de las hojas, la media general de los árboles control fue de 14 g y la de los árboles tratados de 11 g, lo que indica un efecto directo de la hormona sobre el peso del fruto recién cuajado.

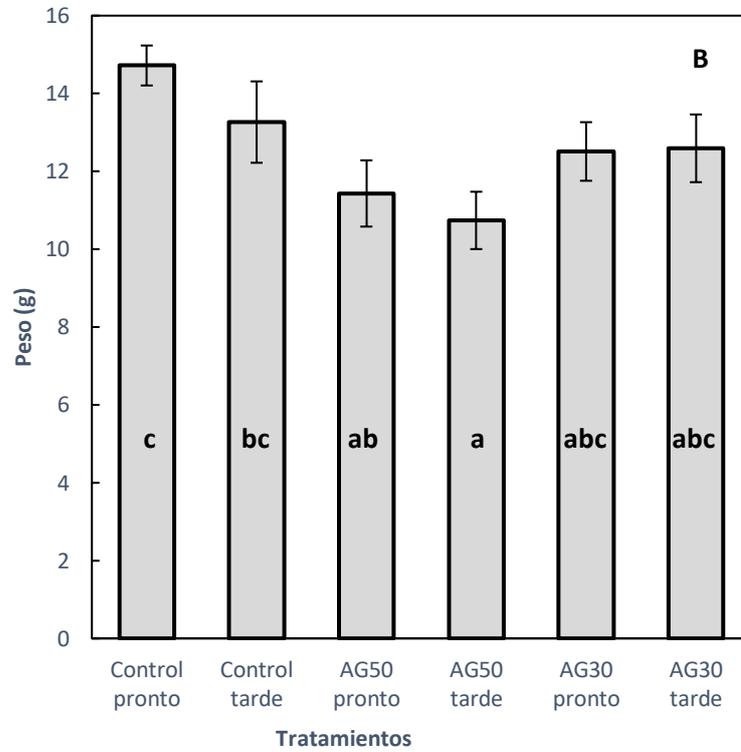
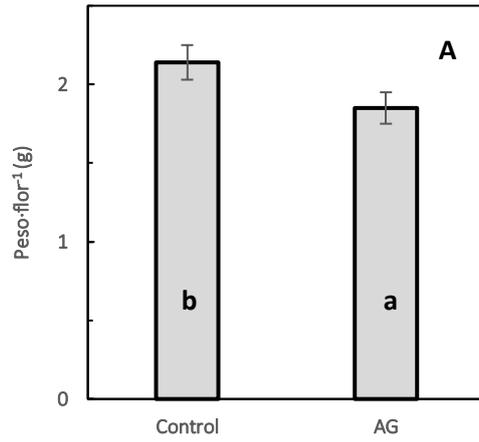


Figura 7. Influencia de la aplicación de AG y de la época de recolección sobre el peso de la flor en antesis (A) y del fruto recién cuajado (B). El peso de la flor es de árboles tratados con 50 mg·l⁻¹ y recolectados el 5 de diciembre (tarde). Cada valor es la media de 50 flores o frutos. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$). Pronto: 6 noviembre.

4.3. VARIACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE AG APLICADA.

La aplicación de $30 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de AG para retrasar la coloración mejoró marcadamente la brotación de los árboles respecto de los tratados con $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, y ello con independencia de la fecha de recolección. Así, el 2 de marzo, tanto en los recolectados pronto como en los recolectados tarde, el 57% y el 56% de sus yemas, respectivamente, habían brotado, sin diferir significativamente entre ellos, pero sí del porcentaje de las brotadas en los árboles tratados con $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (Figura 5). Esta brotación no difirió significativamente de la de los árboles control recolectados tarde (40%), pero sí de los recolectados pronto (90%).

Las hojas de estos árboles pesaron, en el momento de la brotación, 600 mg tanto en los recolectados pronto como en los recolectados tarde, sin que éstas últimas difirieran significativamente de las de los árboles tratados con $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (590 y 630 g, respectivamente) (Figura 6). Tampoco difirieron de las de los árboles control recolectados tarde (710 mg), pero sí de los recolectados pronto (920 mg).

Finalmente, los frutos recién cuajados de árboles tratados con $30 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ alcanzaron un peso de 12.5 g para ambas fechas de recolección, similar al de los árboles control recolectados tarde (13.3 g), pero estadísticamente inferior a los recolectados pronto (14.7 g) y superior a los tratados con AG $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ y recolectados tarde (11.4 g), con diferencias estadísticamente significativas entre ellos (Figura 7).

4.4. EFECTO COMPARADO DE LA APLICACIÓN DE 30 ó 50 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ DE AG SOBRE LA CONSERVACIÓN DEL FRUTO EN EL ARBOL.

La aplicación de AG antes del cambio de color del fruto (21 de septiembre) retrasó significativamente su coloración respecto de los controles sin tratar. Así, el 6 de noviembre, 46 días después del tratamiento, mientras el valor de la coordenada a de Hunter era de 21.6 en los frutos control, en los tratados con $30 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de AG alcanzaba el valor de 9.7, y en los tratados con $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de 2.1 (Tabla 3). Ambos valores de los frutos tratados diferían significativamente del de los frutos control, pero también entre sí, de modo que para esa fecha los frutos tratados con $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ presentaban un retraso en su coloración significativamente mayor que los tratados con $30 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Debe tenerse en cuenta, no obstante, que para esta fecha ambos valores de la coordenada Hunter indican una coloración inviable, todavía, para la recolección del caqui, por lo que comercialmente ambos frutos eran indistinguibles.

Sin embargo, 10 días más tarde, el 27 de noviembre, los frutos tratados con 30 ó $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de AG presentaban un valor prácticamente idéntico de la coordenada a , 18.1 y 20.1,

respectivamente, sin diferencia estadística entre ellos, y significativamente distinto del que presentaban los frutos sin tratar, 28.6 (Tabla 3).

El valor de la coordenada *b* de Hunter no se alteró la primera fecha de medición (6 de noviembre) por efecto de la concentración de AG aplicada, 31.1 y 30.6 para 30 mg·l⁻¹ y 50 mg·l⁻¹, respectivamente, y no mostró, a su vez, diferencia estadística con el valor de los frutos control, 32.0 (Tabla 3). Diez días más tarde (27 de noviembre) el valor de *b* fue significativamente mayor, 30.7, para ambas concentraciones de AG aplicadas, que el de los frutos control, 23.7, lo que indica una coloración aún más retrasada en los frutos tratados con 30 mg·l⁻¹ si se toma como parámetro de referencia la relación *a/b*. Así, el 6 de noviembre dicha relación era de 0.68, 0.31 y 0.07 para los frutos control y tratados con 30 ó 50 mg·l⁻¹ de AG, y para el 27 de noviembre de 1.21, 0.59 y 0.65, respectivamente.

Tabla 3. Influencia de la concentración de AG aplicada sobre la evolución de la coloración del fruto del caqui. Valores expresados en coordenadas Hunter. Cada valor es la media de 25 frutos ± ES. Letras distintas para una misma fecha indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Tratamientos	Coordenadas Hunter			
	a		b	
	6 nov	27 nov	6 nov	27 nov
Control	21.6 ± 1.4 c	28.6 ± 0.4 b	32.0 ± 0.8	23.7 ± 0.7 a
AG 50	9.7 ± 1.8 b	18.1 ± 0.4 a	31.1 ± 0.5	30.7 ± 0.3 b
AG 30	2.1 ± 0.7 a	20.1 ± 0.5 a	30.6 ± 0.5	30.7 ± 0.2 b

La concentración de AG aplicada tampoco modificó la evolución de la senescencia de las hojas, que, no obstante, se retrasó significativamente respecto de la de los árboles control sin tratar. Así, el 28 de noviembre, las hojas de estos últimos tenían un valor de 23.1 unidades SPAD, significativamente distinto del de las hojas de los árboles tratados con 30 ó 50 mg·l⁻¹ de AG, que presentaban un valor de 41.0 y 40.4 unidades SPAD, respectivamente, sin que esta diferencia alcanzara la significación estadística (Figura 8).

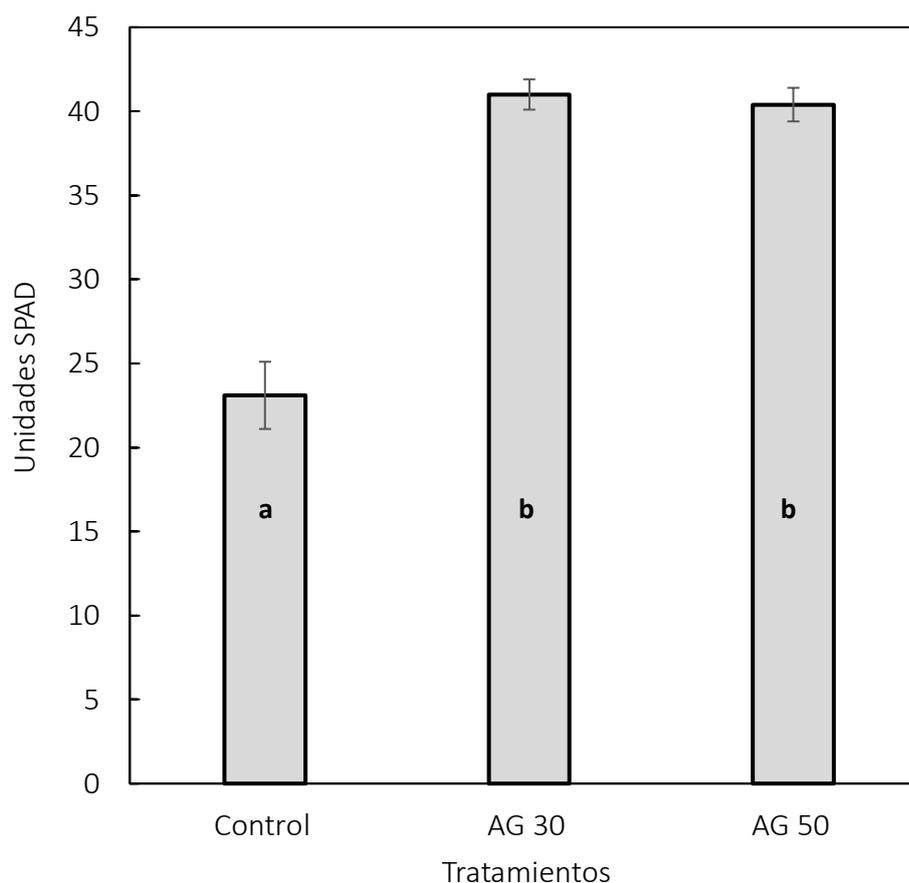


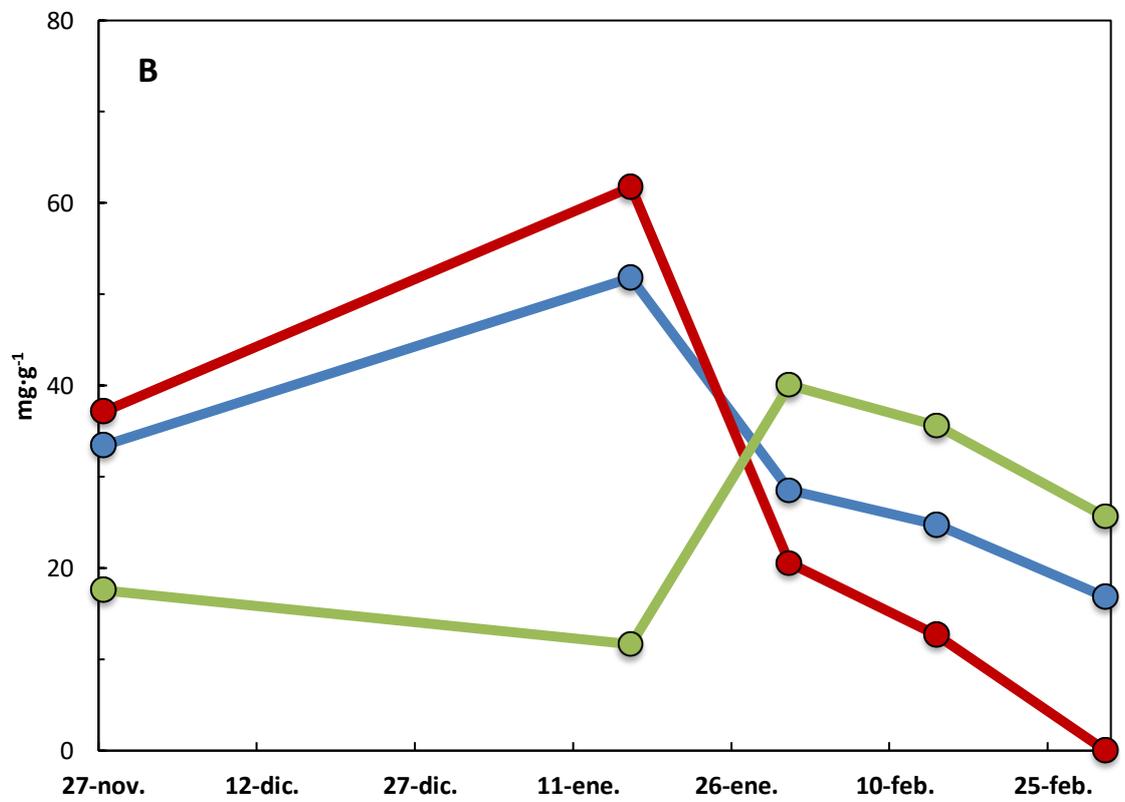
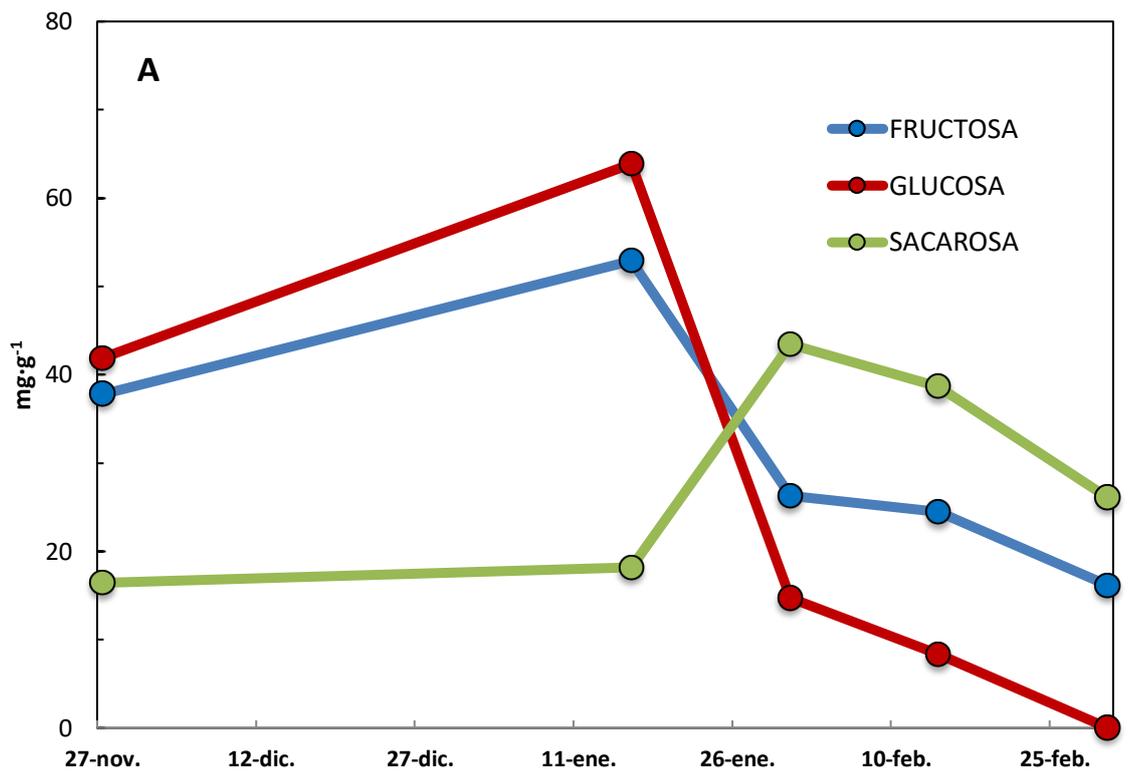
Figura 8. Influencia de la concentración de AG aplicada sobre la coloración de las hojas del caqui 'Rojo Brillante'. Valores para el 28 de noviembre. Cada valor es la media de 10 hojas. Las barras verticales indican el error estándar. Letras distintas indican significación estadística ($p \leq 0.05$).

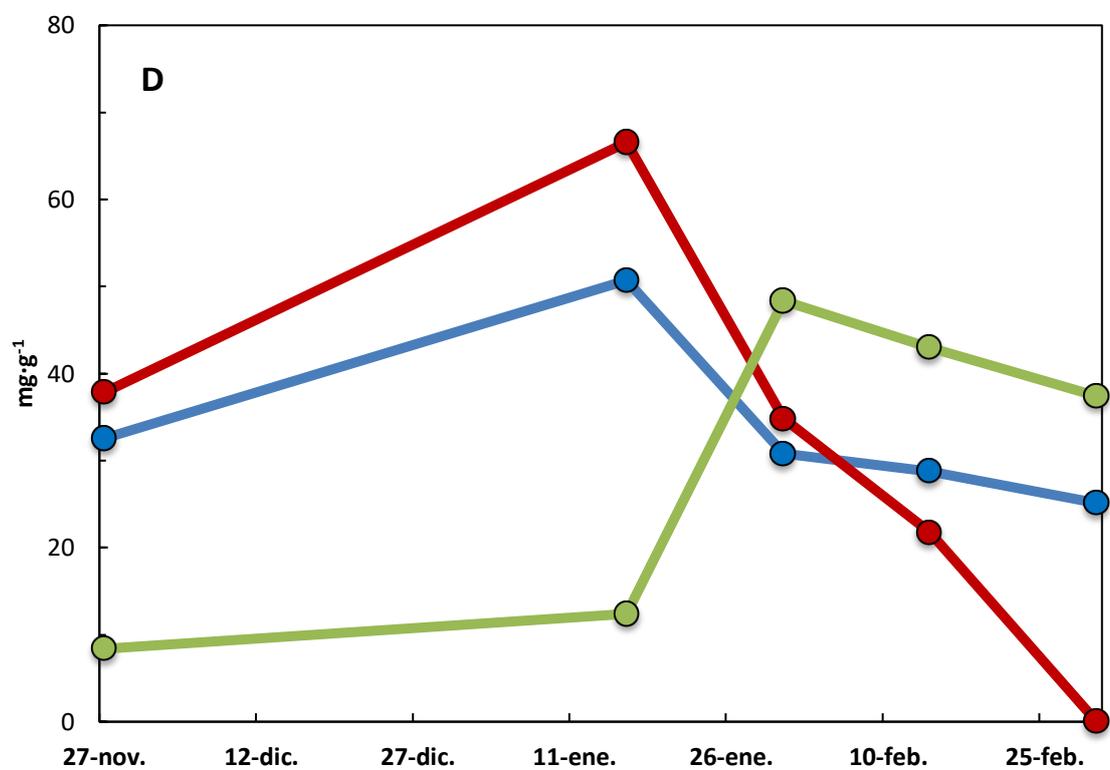
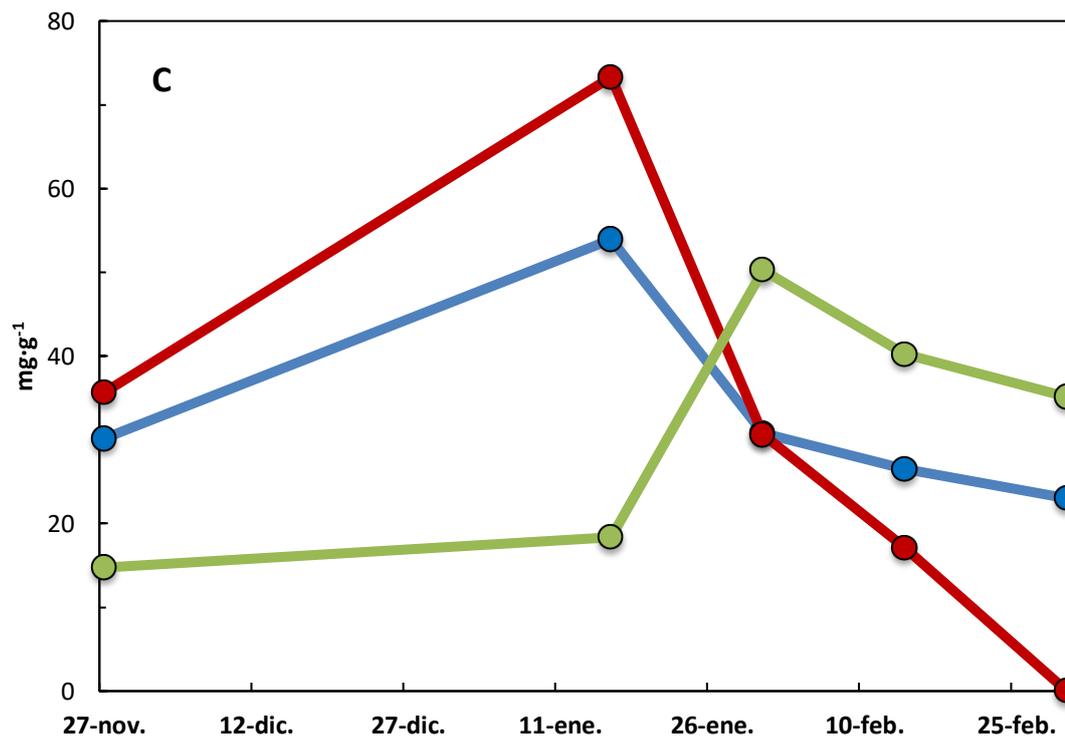
4.5. EVOLUCIÓN DE LOS CARBOHIDRATOS DURANTE LA LATENCIA. INFLUENCIA DE LA APLICACIÓN DE AG Y LA FECHA DE RECOLECCIÓN.

Ninguno de los tratamientos, recolección precoz o tardía y aplicación de 30 ó 50 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de AG, alteró la evolución de la concentración de los monosacáridos (glucosa y fructosa) y de la sacarosa durante la latencia (Figura 9).

En el transcurso de ésta, la glucosa y la fructosa aumentaron de 30-40 a 50-80 $\text{mg} \cdot \text{g} \cdot \text{PS}^{-1}$ desde el 27 de noviembre al 16 de enero, para disminuir a continuación progresivamente hasta el momento de la brotación. Este descenso fue más acusado para la glucosa, que alcanzó valores próximos a 0 en todos los casos (Figura 9).

La sacarosa, sin embargo, no aumentó hasta 25 días más tarde, presentando un máximo el 31 de enero y un ligero descenso posterior hasta el momento de la brotación (Figura 9).





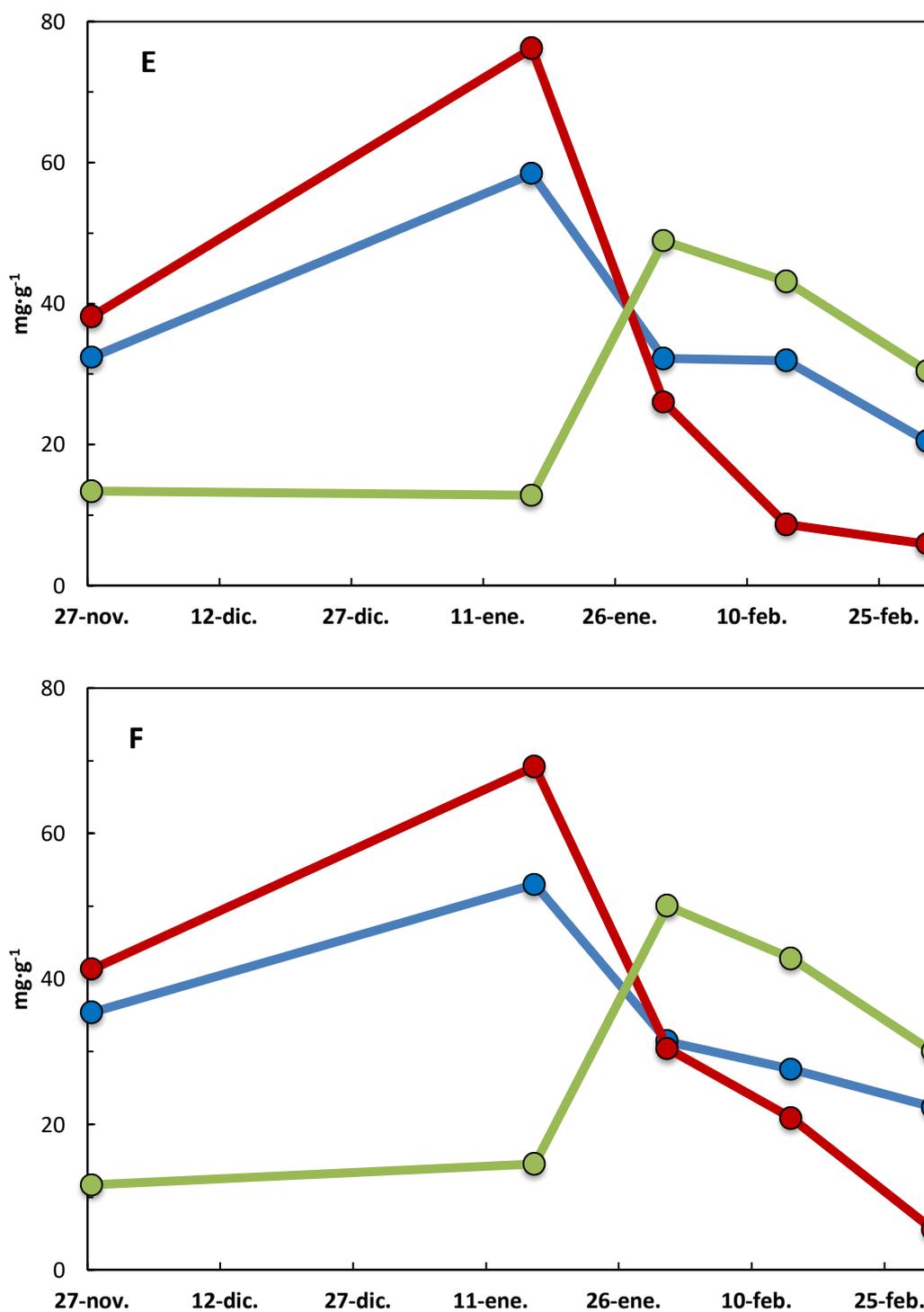


Figura 9. Influencia de la concentración de AG aplicada para retardar la coloración del fruto y la época de recolección sobre la evolución de los monosacáridos y sacarosa del floema de las ramas de un año de edad de caqui. Cada valor es la media de 10 ramas y 2 repeticiones analíticas. A: Control recolectado pronto; B: Control recolectado tarde, C: AG 50 mg·l⁻¹ recolectado pronto, D: AG 50 mg·l⁻¹ recolectado tarde; E: AG 30 mg·l⁻¹ recolectado pronto, F: AG 30 mg·l⁻¹ recolectado tarde.

Quince días antes de ésta, el contenido en almidón del floema de las ramas de un año de edad de los árboles control recolectados pronto (29,7 mg·g PS⁻¹) era significativamente mayor que el de los recolectados tarde (19,2 mg·g PS⁻¹), y en ambos, a su vez, marcada y significativamente más alto que el de los tratados con 50 mg·l⁻¹ de AG y recolectados tarde (0,2 mg·g PS⁻¹) (Figura 10).

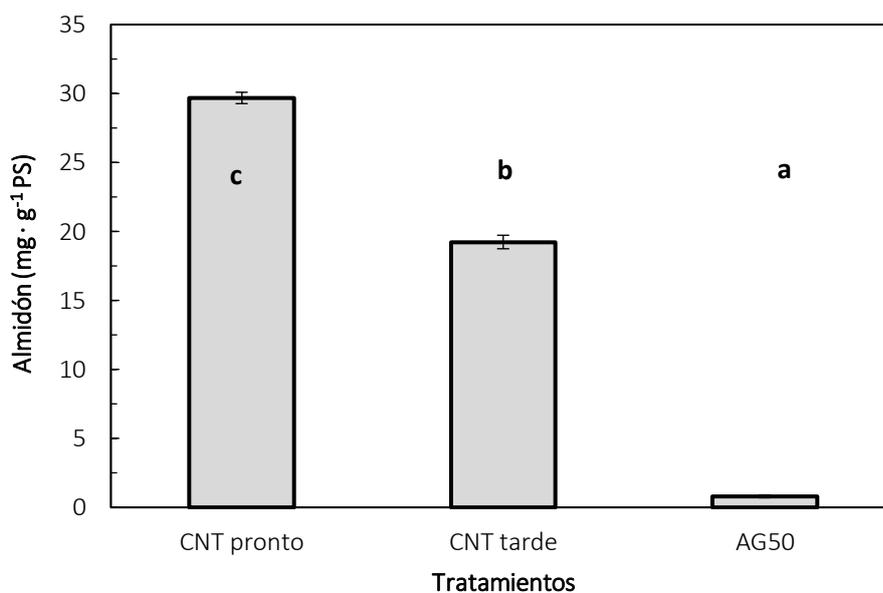


Figura 10. Influencia de la recolección tardía y la aplicación de 50 mg·l⁻¹ de AG sobre el contenido en almidón de reserva del floema de ramas de un año de edad del caqui 'Rojo Brillante'. Valores para el 14 de febrero. Cada valor es la media de 3 repeticiones biológicas y 2 réplicas químicas. Las barras verticales indican el error estándar. Letras distintas indican significación estadística ($p \leq 0.05$).

Es de destacar que esta concentración de almidón está en estricta correspondencia con el retraso en la brotación (Figura 5) y, en menor cuantía, con el peso de la hoja en el momento de la brotación (4 de abril; Figura 6) y del fruto recién cuajado (5 de junio; Figura 7).

4.6. EVOLUCIÓN DE LAS FITOHORMONAS DURANTE LA LATENCIA. INFLUENCIA DE LA APLICACIÓN DE AG Y LA FECHA DE RECOLECCIÓN

Durante la latencia la concentración de ácido abscísico y ácido indolacético se redujo con el tiempo, con independencia de la época de recolección. Así, en las yemas de los árboles control recolectados tarde, el ácido abscísico pasó de una concentración próxima a $4.2 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ PS, el 27 de noviembre, a $2.9 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ PS el 5 de enero, $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ PS el 31 del mismo mes, y a valores próximos a 0 ($0.15 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ PS) en el inicio de la brotación, mientras que estos valores en los recolectados pronto fueron de 3.8, 2.3, 0.4 y $0.16 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ PS, respectivamente, difiriendo significativamente entre sí los contenidos de las dos primeras fechas (Figura 11A). En los árboles tratados con $50 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de AG la evolución de esta hormona fue similar, si bien, el 27 de noviembre presentó una concentración de $3,5 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ PS, el 16 de enero de $3.1 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ PS y el 31 de enero de $1,4 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ PS; en el momento de la brotación su valor fue idéntico al de los árboles control (0,18 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ PS) (Figura 11B). La aplicación de $30 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de AG no alteró significativamente este comportamiento, aunque con valores el 31 de enero y al inicio de la brotación ligeramente superiores (0,82 y $0,44 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ PS, respectivamente) a los de los árboles tratados con $50 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de esta hormona.

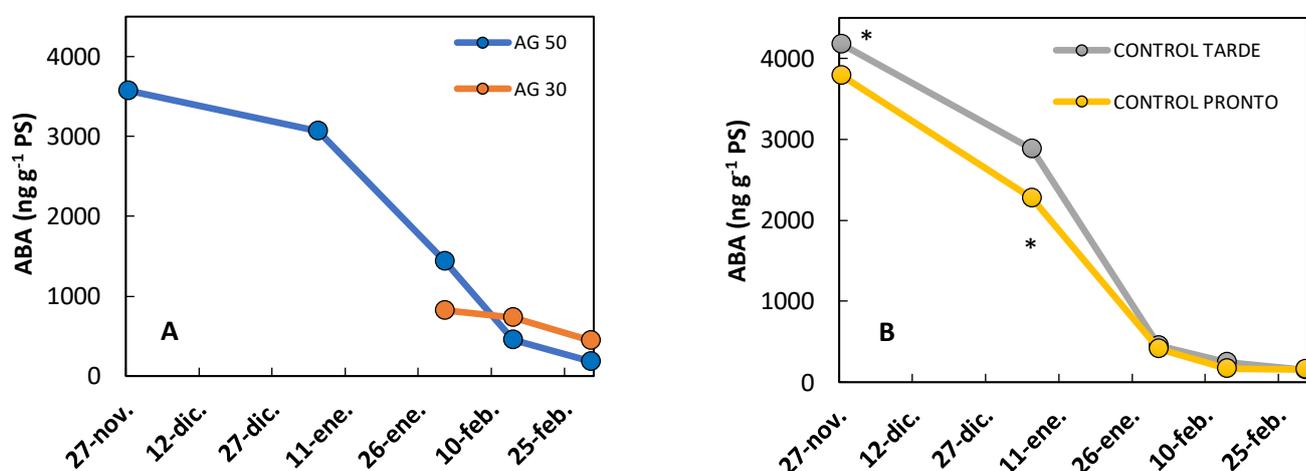


Figura 11. Influencia de la concentración de AG aplicada (A) para retardar la coloración del fruto y la época de recolección (B) sobre la evolución del ácido abscísico en las yemas de caqui 'Rojo Brillante' en latencia. Cada valor es la media de 15 yemas y 2 repeticiones analíticas. * indica diferencia significativa ($p \leq 0.05$).

La evolución del ácido indolacético también se alteró por efecto de la fecha de recolección. Así, mientras su contenido en las yemas de los árboles control recolectados pronto

fue prácticamente constante (alrededor de $20 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1} \text{ PS}$) durante el periodo de latencia estudiado, en las de los árboles recolectados tarde su valor, el 27 de noviembre, era de $109 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1} \text{ PS}$ (Figura 12A). Veinticinco días más tarde, su concentración apenas se había reducido ($90 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1} \text{ PS}$), pero a mediados de febrero descendió drásticamente para igualarse con la de los árboles recolectados pronto (15 y $12 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1} \text{ PS}$, respectivamente). Desde esa fecha hasta el momento de la recolección el contenido de ambos tipos de yemas fue idéntico y se mantuvo prácticamente constante (Figura 12A). La evolución de esta fitohormona en las yemas de los árboles tratados con 30 ó $50 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ fue similar a las de los árboles control recolectados pronto, con un valor promedio prácticamente constante a lo largo de todo el periodo estudiado de $25 \mu\text{g} \cdot \text{g} \text{ PS}^{-1}$ para ambas concentraciones de AG (Figura 12B).

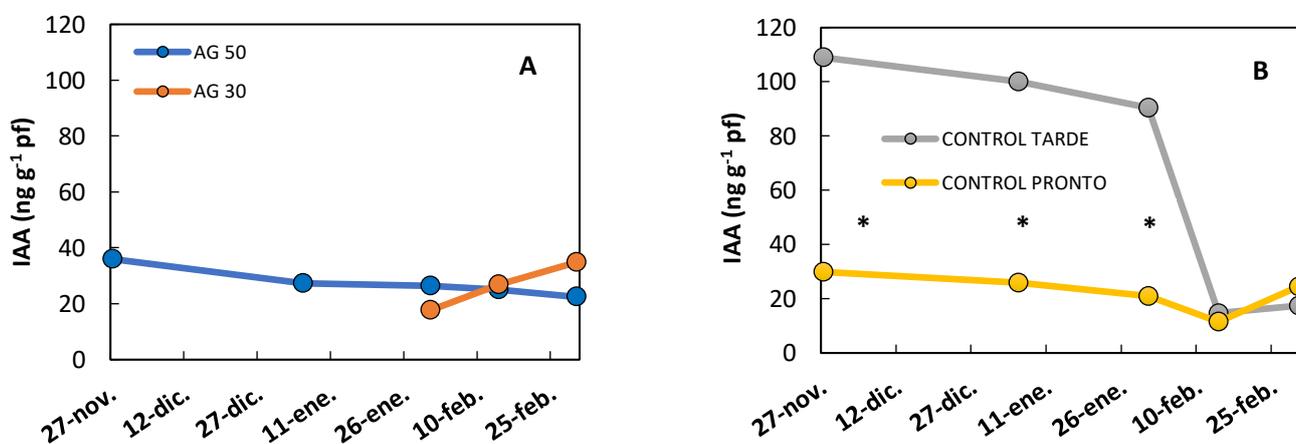


Figura 12. Influencia de la concentración de AG aplicada (A) para retardar la coloración del fruto y la época de recolección (B) sobre la evolución del ácido indol-3-acético en las yemas de caqui 'Rojo Brillante' en latencia. Cada valor es la media de 15 yemas y 2 repeticiones analíticas. * indica diferencia significativa ($p \leq 0.05$).

La evolución de la tZ fue similar en los árboles control y tratados, con independencia de la fecha de recolección y la concentración de AG aplicada (Figura 13). En los árboles control y recolectados pronto, entre el 31 de enero y el 14 de febrero (15 días antes de la brotación) la concentración de esta hormona en las yemas pasó de $0,1$ a $0,7 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1} \text{ PS}$, mientras que en los recolectados tarde apenas alcanzó en valor de $0,2 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1} \text{ PS}$ ($p \leq 0.05$). Desde ese momento hasta el inicio de la brotación la concentración en las yemas de ambos tipos de árboles aumentó hasta $2,6$ y $2,7 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1} \text{ PS}$, respectivamente, sin que esta diferencia alcanzara la significación estadística (Figura 13A). La aplicación de $30 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de AG no alteró significativamente, en ningún caso, los valores de tZ encontrados en los árboles control y recolectados tarde, mientras que la

aplicación de $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ redujo significativamente la concentración ($1,6 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ PS) en el momento de la brotación (Figura 13B).

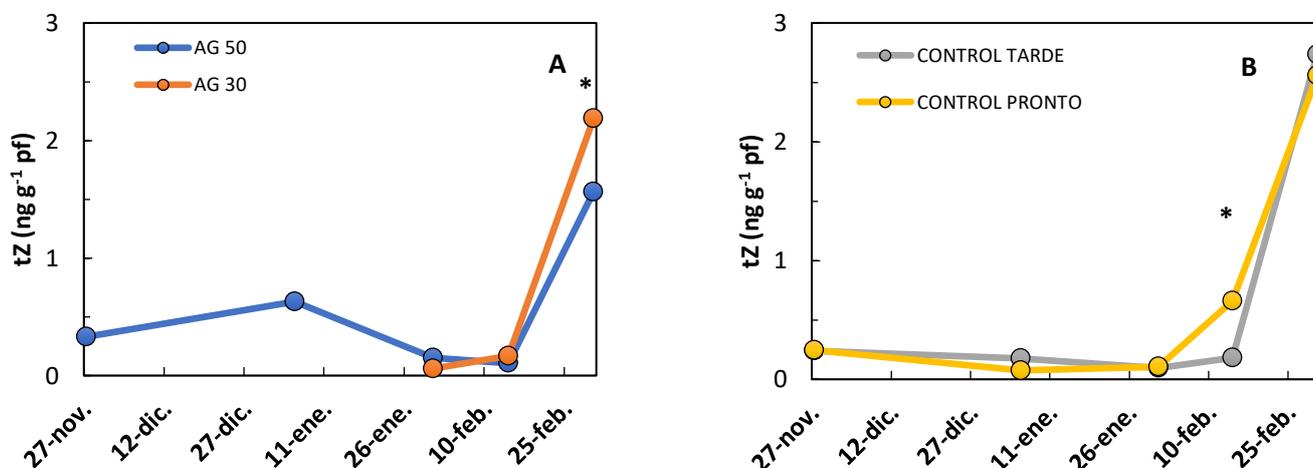


Figura 13. Influencia de la concentración de AG aplicada (A) para retardar la coloración del fruto y la época de recolección (B) sobre la evolución de la *trans*-zeatina en las yemas de caqui en latencia. Cada valor es la media de 15 yemas y 2 repeticiones analíticas. * indica diferencia significativa ($p \leq 0.05$).

Esta evolución de la concentración de IAA y tZ determina las diferencias en la brotación. En efecto, la relación IAA/tZ es determinante de ésta, de modo que mientras en los árboles control recolectados tarde este ratio aumentó hasta finales de enero para descender bruscamente el 14 de febrero, 15 días antes de la brotación, en los recolectados pronto su máximo valor se alcanzó el 5 de enero descendiendo progresivamente hasta mediados de febrero (Figura 14 A). En los árboles tratados con $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ el máximo se dio a mediados de febrero, 15 días más tarde que en los árboles control recolectados tarde y que los tratados con $30 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (Figura 14 B). En ambos casos, los valores fueron marcadamente inferiores a los registrados en los árboles control recolectados tarde.

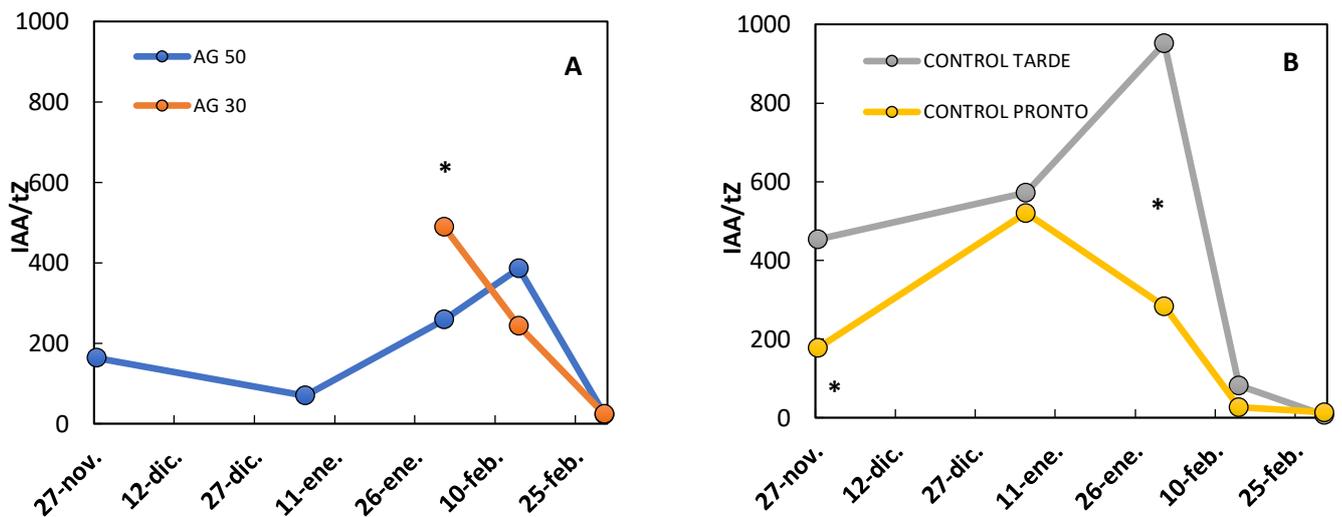


Figura 14. Influencia de la concentración de AG aplicada (A) para retardar la coloración del fruto y la época de recolección (B) sobre la evolución de la relación ácido indol-3-acético/*trans* zeatina en las yemas de caqui 'Rojo Brillante' en latencia. Cada valor es la media de 15 yemas y 2 repeticiones analíticas.

La evolución del ratio ABA/IAA indica un descenso progresivo en el tiempo hasta valores próximos a 0 en el momento de la brotación. Este descenso es mucho más marcado en los árboles recolectados pronto que en los recolectados tarde (Figura 15 A), consecuencia del menor contenido en IAA a lo largo de todo el periodo de latencia (Figura 12 A). De un modo similar, el descenso de este ratio en los árboles tratados con 50 mg·l⁻¹ de AG alcanzó el valor más bajo, también próximo a 0, en el momento de la brotación, y desde un mes antes de ésta los árboles tratados con 30 mg·l⁻¹ de AG siguieron una evolución idéntica (Figura 15 B)

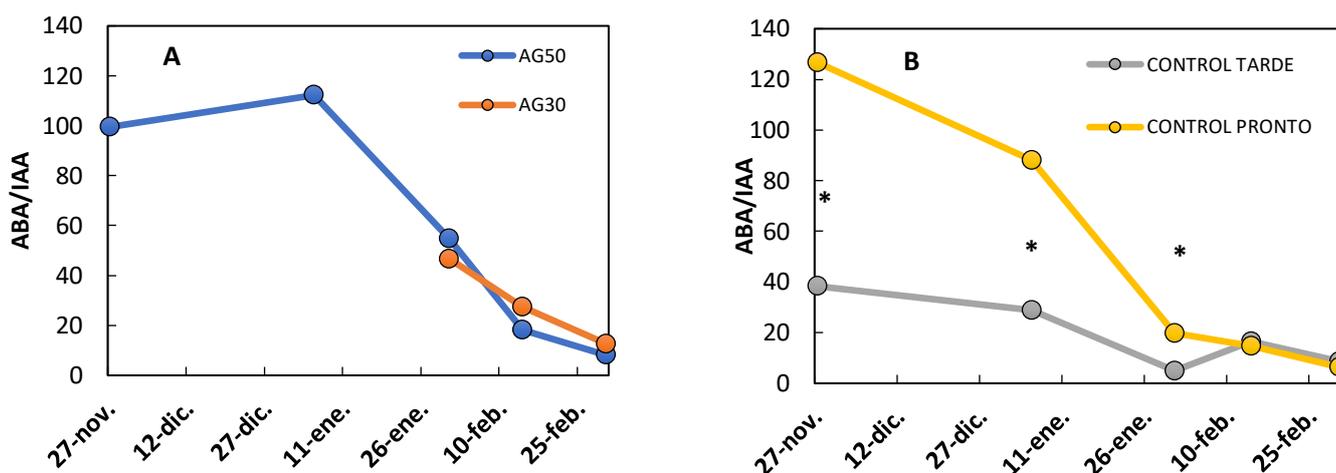


Figura 15. Influencia de la concentración de AG aplicada (A) para retardar la coloración del fruto y la época de recolección (B) sobre la evolución de la relación ácido abscísico/ácido indol-3-acético en las yemas de caqui ‘Rojo Brillante’ en latencia. Cada valor es la media de 15 yemas y 2 repeticiones analíticas.

4.7. ESTÍMULO DEL DESARROLLO DEL FRUTO

El menor tamaño de los frutos recolectados tarde y/o tratados repetidamente con $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de AG fue significativamente mejorado con la aplicación de $15 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de la auxina de síntesis ácido 3,5,6-tricloro-2-piridiloxiacético (3,5,6-TPA) cuando el fruto tenía un diámetro de 45-50 mm.

Los árboles tratados con $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de AG y recolectados tarde aumentaron su peso de 60,7 g a 69,6 g, por acción de la auxina, y los tratados con $30 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ y recolectados tarde de 63,9 g a 66,4 g (Tabla 4). Los árboles control y recolectados tarde también aumentaron el peso medio de sus frutos de 65,2 g a 70,0 g (Tabla 4). Es de destacar que los árboles tratados con 30 y $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de AG y recolectados tarde alcanzaron un tamaño similar, e incluso superior, al de los frutos control y recolectados pronto por acción del 3,5,6-TPA.

Tabla 4. Influencia de la aplicación de la auxina de síntesis 3,5,6-TPA ($15 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) al inicio de la fase lineal del desarrollo del fruto sobre el diámetro medio de los frutos del caqui 'Rojo Brillante' que iniciaron su desarrollo la primavera siguiente al tratamiento con 50 ó 30 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de ácido giberélico para retardar la recolección (otoño de 2017). El tratamiento se efectuó el 16 de julio de 2018. Cada valor es la media \pm ES de los frutos de 5 árboles.

Tratamientos	Pronto	Tarde	
	Sin tratar	Sin tratar	TPA
Control	66.5 \pm 1.1 a	65.2 \pm 0.9 a	70.0 \pm 1.7 b
AG 50	65.9 \pm 3.1 b	60.7 \pm 1.8 a	69.6 \pm 2.1 c
AG 30	66.3 \pm 1.4 b	63.9 \pm 1.2 a	66.4 \pm 0.6 b

5. DISCUSIÓN

Las giberelinas son hormonas del desarrollo relacionadas con el crecimiento vegetativo, la floración, la germinación de semillas, y la senescencia de los tejidos vegetales. Este último aspecto, se ha utilizado con éxito para retrasar la senescencia de hojas y pétalos (Thimann, 1980) y el retraso de la coloración y recolección de frutos (Seymour *et al.*, 1993). Así, el ácido giberélico se utiliza para retrasar la maduración de frutos no climatéricos, como el pomelo (McDonald *et al.*, 1997), las mandarinas (Guardiola *et al.*, 1981; Agustí *et al.*, 2002a) y naranjas (Coggins y Eask., 1964; Gambetta *et al.* 2014), y de los frutos climatéricos, como el melocotón (Dagar *et al.*, 2012), el mango (Khader *et al.*, 1988), el albaricoque (Abdel-Gawad *et al.*, 1974), y el caqui (Agustí *et al.*, 2003; 2004).

En el caso del caqui, la aplicación de $30 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de ácido giberélico al inicio del cambio de color del fruto se ha mostrado eficaz para este fin (Agustí *et al.*, 2004a), pero también retarda la senescencia de las hojas, retrasando su abscisión y, con ello, la entrada en latencia de las yemas. En consecuencia, la brotación de la primavera siguiente se retrasa, al mismo tiempo que se reduce el tamaño de las hojas y el peso de las flores y los frutos recién cuajados.

Pero el proceso endógeno a través del cual ocurre esto no había sido abordado hasta ahora. Así, no sabemos si dicho efecto es consecuencia de la aplicación de la hormona, del retraso de la recolección, o de ambos factores. La acción del fruto y su persistencia en el árbol sobre la brotación y floración siguientes, si bien, es conocido, se ha estudiado ampliamente como factor inhibidor de la floración de especies leñosas, como el olivo (Lavee, 2007), mango (Prasad y Patak, 1970; Nakagawa *et al.*, 2012), aguacate (Wolstenholme, 2010; Ziv *et al.*, 2014), cítricos (Betancourt *et al.*, 2014; Martínez-Fuentes *et al.*, 2010; Muñoz-Fambuena *et al.*, 2011), níspero japonés (Reig *et al.*, 2014), y rosáceas caducifolias (Reig *et al.*, 2006; González-Rossia *et al.*, 2007), pero no se ha abordado su acción sobre la latencia de especies caducifolias.

Al mismo tiempo, la posibilidad de que concentraciones de ácido giberélico superiores a $30 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, indicada como saturante para este fin (Agustí *et al.*, 2004), tuvieran un efecto más potente sobre el retraso en la entrada en latencia, y sobre ella misma, no se ha tenido en cuenta bajo el punto de vista agronómico, de modo que la presión comercial ha llevado al agricultor a aumentarla hasta $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ y a repetir los tratamientos con el fin de retrasar la recolección lo máximo posible, sin tener en cuenta los efectos secundarios que ello podía conllevar. Éstos, básicamente, consisten en un mayor retardo en la entrada en latencia de las yemas y una brotación y floración deficientes.

Dado que la concentración de $30 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ se ha mostrado saturante para lograr el objetivo (Agustí *et al.*, 2003), estudiar comparativamente, el efecto sobre la latencia de ambas

concentraciones, 30 y 50 mg·l⁻¹, y su efecto sobre la brotación y floración siguientes, se hacía necesario con el fin de determinar, por una parte, el efecto del retraso en la recolección, y, por otra, el efecto de la concentración de AG aplicada.

Nuestro estudio demuestra que el tratamiento con 50 mg·l⁻¹ de AG, repetido, acarrea problemas importantes en la cosecha del caqui y sus componentes, que ve reducido el peso de sus frutos en, aproximadamente, un 45% (ver Tabla 2). Este efecto es ya detectable en el momento de la anthesis, lo que indica una *calidad* de la flor deficiente desde el mismo momento de la brotación, respecto de los árboles control sin tratar. De acuerdo con ello, la acumulación de horas frío (HF) debe haber sido insuficiente para una brotación adecuada (Faust, 1989; Campoy *et al.*, 2011)), esto es, estas yemas deben haber visto alterado notablemente su periodo de latencia. Sin embargo, la aplicación de 30 mg·l⁻¹ de AG no retrasó la brotación de un modo tan intenso como 50 mg·l⁻¹, de modo que el porcentaje de yemas brotadas a principios de marzo no difirió significativamente de los árboles control recolectados tarde, indicando que dicha concentración no presentaba un efecto adicional al del retraso en la recolección, como sí lo hace la aplicación de 50 mg l⁻¹. Es más, el peso final del fruto de los árboles tratados con esta concentración no difirió del de los árboles control, como sí lo hizo, también, el de los frutos de los árboles tratados con 50 mg·l⁻¹ que fueron significativamente más pequeños. La aplicación de 30 mg·l⁻¹ presentó un efecto importante adicional, como es su eficacia similar a la de 50 mg·l⁻¹ para retrasar la coloración y, por tanto, la recolección del fruto.

La evolución de los azúcares reductores y la sacarosa durante la latencia no mostró diferencias en ningún caso atribuibles a la concentración de AG aplicada y/o al retraso en la recolección. Ello está de acuerdo con los conocimientos actuales puesto que la brotación finalmente se dio y, con ello, la diferenciación floral y la floración. Durante la brotación, estos azúcares contribuyeron energéticamente al proceso, facilitando un consumo inmediato para cubrir la demanda energética de la división celular. El descenso progresivo en la concentración de azúcares reductores desde principios de enero hasta la brotación observado en nuestro trabajo es coherente con ello. Y también, la evolución de la sacarosa, que desde finales de enero hasta la brotación disminuyó progresivamente.

Aunque son numerosos los trabajos que señalan el metabolismo de los azúcares como factor esencial determinante de la brotación y floración, nunca se ha demostrado una relación causa-efecto (Goldschmidt *et al.*, 1985; Reig *et al.*, 2006), y así también ocurre en nuestro caso. Sin embargo, la concentración de almidón en el floema de las ramas de un año de edad se redujo con el retardo de la recolección, y, todavía más, con la aplicación de 50 mg·l⁻¹ de AG. Esta reducción de la concentración puede deberse a una menor acumulación de las reservas de C, a

una mayor hidrólisis de éstas en las fechas previas a la brotación, o a ambos factores a la vez. De acuerdo con nuestros resultados, y dado que la concentración de azúcares reductores y sacarosa no se ve alterada durante la latencia por efecto de los tratamientos, es más probable que la permanencia del fruto en el árbol reduzca la acumulación de reservas previa a la latencia. Ello unido a una reducción en la acumulación de HF por efecto del retraso en el inicio de ésta, podría ser responsable del retraso en la brotación siguiente y del menor peso de las flores.

Sin embargo, un efecto hormonal no puede descartarse, como se ha demostrado mediante aplicaciones de giberelinas en aguacate (Salazar-García y Lovatt, 2000), albaricoquero (Southwick *et al.*, 1995), y mango (Turnbull *et al.*, 1996). Este papel de las hormonas ligado a la evolución de los carbohidratos en la latencia es parte de la contribución de este trabajo, y ha sido posible estudiando la aplicación exógena de dos concentraciones de AG y el retraso en la recolección del caqui. En efecto, en el momento de la antesis, las flores de los árboles tratados con $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de AG y recolectados el 6 de diciembre pesaban un 15 % menos que las flores de los árboles sin tratar y recolectados en el momento de su madurez comercial. Dado que el aporte de carbohidratos no muestra una relación causa-efecto con este descenso en el peso de las flores, parece más lógico analizarlo bajo el punto de vista hormonal. Así, el retraso en la recolección muestra un retardo, a su vez, en el descenso en la concentración de IAA en las yemas, en comparación con los árboles recolectados pronto. A principios de enero la concentración de IAA en las yemas de los árboles recolectados tarde era 4 veces superior al de las yemas de los recolectados pronto. Asimismo, la evolución de la concentración de ABA, hormona a la que se atribuye la acción de los cambios ambientales inductores de la latencia (Trewavas y Jones, 1991) y la evolución de sus fases (Chen *et al.*, 2002; Jacobsen and Shaw, 1989) así como con la inhibición de la brotación (Gocal *et al.* 1991; Emery *et al.* 1998), también se vio retrasada por el retraso en la recolección, siendo las diferencias a principios de enero del 20 % superior para los árboles recolectados tarde. En consecuencia, la relación IAA/tZ, que indica la capacidad de brotación de las yemas (Sachs y Thimann (1967)), era a finales de enero 3.5 veces superior en las yemas de los árboles recolectados tarde en comparación con los recolectados pronto, justificando de este modo su retraso en la brotación. La relación IAA/tZ también fue mayor en los árboles tratados con AG, independientemente de la concentración aplicada. Sin embargo, el 14 de febrero, 15 días antes de la brotación, cuando los valores IAA/tZ de los árboles control recolectados tarde y pronto presentaban un valor inferior a 100, los árboles tratados con $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ era de 386 y los tratados con $30 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de 250, ambos recolectados tarde, lo que indica un efecto adicional de la hormona aplicada sobre el retraso en la recolección, explicando así la reducción en el peso inicial y final del fruto. Este, por tanto, se vio afectado tanto por la época

de recolección de la cosecha anterior como por la aplicación de AG. Una revisión sobre las condiciones ambientales reguladoras de la latencia y su control hormonal y molecular han sido recientemente publicada (Campoy *et al.*, 2011; Lloret *et al.*, 2018).

Puesto que controlar la latencia, y particularmente la *p*-endolatenia, es imposible en condiciones de cultivo, la única opción posible para mejorar esta respuesta negativa es estimular el desarrollo lineal del fruto. La auxina 3,5,6-TPA se ha mostrado eficaz para este fin en cítricos (Agustí *et al.*, 2002b), frutales de hueso (Agustí *et al.*, 1999; Stern *et al.*, 2007) níspero japonés (Reig *et al.*, 2016), y el propio caqui (Agustí *et al.*, 2004b). La acción de esta auxina de síntesis se ha demostrado a través de una reducción de la presión de turgencia (Reig *et al.*, 2016), de acuerdo con el mecanismo atribuido a las auxinas, por lo que la época de aplicación idónea se establece al inicio de la fase lineal del crecimiento. En nuestro experimento consiguió aumentar el tamaño final del fruto hasta valores idénticos a los de los árboles control sin tratar y sin retrasar la recolección, por lo que se muestra como una técnica útil para resolver los problemas derivados del retraso en la recolección del caqui.

6. CONCLUSIÓN

En conclusión, i) la aplicación de $30 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ retrasó con la misma intensidad que $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ la coloración del caqui 'Rojo Brillante', pero con un menor grado de afección de la latencia y, por tanto, de la brotación y desarrollo inicial del fruto, y ii) la aplicación de $15 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de la auxina de síntesis 3,5,6-TPA aumentó el tamaño final del fruto hasta valores similares a los del control sin tratar y sin retrasar la recolección.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Gawad, H., Romani, R.J. (1974). Hormone-Induced Reversal of Color Change and Related Respiratory Effects in Ripening Apricot Fruits. *Physiol. Plant.*, 32: 161-164.
- Agustí, M., Almela, V. Andreu, I., Juan, M., Zacarías, L. (1999). Synthetic auxin 3,5,6-TPA promotes fruit development and climacteric in *Prunus persica* L. Batsch. *J. Hortic. Sci. & Biotechnol.*, 74: 556-560.
- Agustí, M., Juan, M., Martínez-Fuentes, A., Mesejo, C., Almela, V. (2004a). Calcium nitrate delays climacteric of persimmon fruit. *Ann. Appl. Biol.*, 144: 65-69.
- Agustí, M., Juan, M., Martínez-Fuentes, A., Mesejo, C., Almela, V. (2004b). Persimmon fruit size and climacteric encouraged by 3,5,6-trichloro-2-pyridyloxyacetic acid. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.*, 79: 171-174.
- Agustí, M., Juan, M., Yagüe, B, Mesejo, C., Martínez-Fuentes, A. y Almela, V. (2003). Tratamientos para retrasar la maduración del fruto del caqui (*Dyospiros kaki* L.). *CV Agraria*, 24: 27-33.
- Agustí, M., Martínez-Fuentes, A. y Mesejo, C. (2002a). Citrus fruit quality. Physiological basis and techniques of improvement. *Agrociencia*, VI (2): 1-16.
- Agustí M., S. Zaragoza, D.J. Iglesias, V. Almela, E. Primo-Millo y M. Talón. (2002b). The synthetic auxin 3,5,6-TPA stimulates carbohydrate accumulation and growth in citrus fruit. *Plant Growth Regul.*, 32: 141-147.
- Badenes, M.L. Naval, M.M., Martínez-Calvo, J., Giordani, E. (2015). Material vegetal y mejora genética. En: *El cultivo del caqui*. Badenes, M.L., Intrigliolo, D., Salvador, A., Vicent, A. (Eds.), Generalitat Valenciana, Valencia, España, pp 56-80.
- Ben-Arie, R., Bazak, H. Blumenfeld, A. (1986). Gibberellin delays harvest and prolongs storage life of persimmon fruits. *Acta Hortic.*, 179: 807-813.
- Betancourt, M., Sistachs, V., Martínez-Fuentes, A., Mesejo, C., Reig, C. y Agustí, M. (2014). Influence of harvest date on fruit yield and return bloom in 'Marsh' grapefruit trees (*Citrus paradisi* Macf.) grown under tropical climate. *J. Hortic. Sci. & Biotechnol.*, 89: 435-440.
- Campoy, J.A., Ruiz, D. Egea, J. (2011). Dormancy in temperate fruit trees in a global warming context: A review. *Sci. Hortic.*, 130: 357-372.
- Chen, T.H.H., Howe, G.T., Bradshaw, H.D. (2002). Molecular genetic analysis of dormancy-related traits in poplars. *Weed Sci.* 50, 232-240.
- Coggins, C.W. Jr. Y Eaks, I.L. (1964). Rind staining and other rind disorders of navel orange reduced by gibberellin. *Calif. Citrograph*, 50: 2-47.

- Dagar, A., Weksler, A., Friedman, H., Lurie, S. (2012). Gibberellic acid (GA₃) application at the end of pit ripening: effect on ripening and storage of two harvests of 'September Snow' peach. *Sci. Hortic.*, 140: 125-130.
- Emery, R.J.N., Longnecker, N.E., Atkins, C.A. (1998). Branch development in *Lupinus angustifolius* L. II. Relationship with endogenous ABA, IAA and cytokinins in axillary and main stem buds. *J. Exp. Bot.*, 49: 555–562.
- Eshghi, S., Tafazoli, E., Dokhani, S., Rahemi, M. y Emam, Y. (2007). Changes in carbohydrate contents in shoot tips, leaves and roots of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) during flower-bud differentiation. *Sci. Hortic.* 113, 255-260.
- Faust, M. (1989). *Physiology of temperate zone fruit trees*. John Wiley & Sons, NY, 338 pp.
- Gambetta, G., Mesejo, C., Martínez-Fuentes, A., Reig, C., Gravina, A. y Agustí (2014). Gibberellic acid and norflurazon affecting the time-course of flavedo pigment and abscisic acid content in 'Valencia' sweet orange. *Sci. Hortic.*, 180: 94-101.
- Girodani, E., Picardi, E., radice, S. (2015). Morfología y Fisiología. En: *El cultivo del caqui*. Badenes, M.L., Intrigliolo, D., Salvador, A., Vicent, A. (Eds.), Generalitat Valenciana, Valencia, España, pp 36-55.
- Gocal, G.F.W., Pharis, R.P., Yeung E.C., Pearce, D. (1991). Changes after decapitation in concentrations of indole-3-acetic acid and abscisic acid in the larger axillary bud of *Phaseolus vulgaris* L. cv Tender Green. *Plant Physiol.*, 95: 344–350.
- Goldschmidt, E. E., Aschkenazi, N., Herzano, Y., Schaffer, A. A., Monselise, S. P. (1985). A role for carbohydrate levels in the control of flowering in citrus. *Sci. Hortic.*, 26: 159–166
- González-Rossia, D., Reig, C., Juan, M., Agustí, M. (2007). Horticultural factors regulating effectiveness of GA₃ inhibiting flowering in peaches and nectarines (*Prunus persica* L. Batsch). *Sci. Hortic.*, 111: 352-357.
- Guardiola, J.L., M. Agustí, J. Barberá, A. Sanz. (1981). Influencia del ácido giberélico en la maduración y senescencia del fruto de la mandarina "Clementina" (*Citrus reticulata* Blanco). *Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment.* 221: 225-239.
- Jacobsen, J.V., Shaw, D.C. (1989). Heat-stable proteins and abscisic acid action in barley aleurone cells. *Plant Physiol.* 91, 1520–1526.
- Khader, S.E.S.A., Singh, B.P., Khan, S.A. (1988) Effect of GA₃ as a post-harvest treatment of mango fruit on ripening, amylase and peroxidase activity and quality during storage. *Sci. Hortic.*, 36: 261-266.
- Juan, M., Yagüe, B., gariglio, N., Almela, V., Agustí, M. (2002). Estímulo de la maduración del caqui (*Dispyros kaki* Thunb) mediante la aplicación de etefón. *Frut. Prof.*, 129: 61-67.

- Lavee, S. (2007). Biennial bearing in olive (*Olea europea*). *Annales Ser. hist. nat*, 17: 101-112.
- Lloret, A., Badenes, M.L., Rios, G. (2018). Modulation of Dormancy and Growth Responses in Reproductive Buds of Temperate Trees. *Frontiers Plant Sci.*, Vol 9, art. 1368.
- Luo, Z., Wang, R. (2008) Persimmon in China: Domestication and traditional utilizations of genetic resources. *Advances in horticultural science.*, 239-243.
- 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). *J. Sci.f Food Agric.*, 90: 1936-1943.
- McDonald, R. E., Greany, P. D., Shaw, P. E., McCollum, T. G. (1997). Preharvest applications of gibberellic acid delay senescence of Florida grapefruit. *Hortic. Sci.*, 72: 461-468.
- Muñoz-Fambuena, N., C. Mesejo, M.C. González-Mas, E. Primo-Millo, M. Agustí y D.J. Iglesias. (2011). Fruit regulates seasonal expression of flowering genes in alternate-bearing ‘Monacad’ mandarin. *Ann. Bot.*, 108: 511-519
- Nakagawa, M., Honsho, C., Kanzaki, S., Shimizu, K., Utsunomiya, N. (2012). Isolation and expression analysis of *FLOWERING LOCUS T*-like and gibberellin metabolism genes in biennial-bearing mango trees. *Sci. Hortic.*, 139: 108-119.
- Prasad A., Patak, R.A. (1970). Biennial bearing of mango. *Trop. Agric.*, 126: 35-56.
- Reig, C., González-Rossia, D., Juan, M. y Agustí, M. (2006). Effects of fruit load on flower bud initiation and development in peach. *J.Hortic. Sci. & Biotechnol.y*, 81: 1079-1085.
- Reig, C., Mesejo, C., Martínez-Fuentes, A. y Agustí, M. (2014). In loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl) return bloom depends on the time the fruit remains on the tree. *J. Plant Growth Regul.*, 33: 778-787.
- Reig, C., Mesejo, C., Martínez-Fuentes, A., Agustí, M. (2016). Synthetic auxin 3,5,6-TPA increases fruit size of loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) by reducing cell turgor pressure. *Sci. Hortic.*, 210: 213-219.
- Sachs, T., Thimann, K. (1967). The role of auxins and CKs in the mesocotyl tissues to root-to-shoot signalling of abscisic acid. *J. Exp. Bot.*, 53: 297–302.
- Salazar- García, S., Lovatt, C.J. (2000). Use of GA3 to manipulate flowering and yield of “Hass” avocado. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 125: 25-30.
- Seo, M., Jikumaru, Y. Y Kamiya, Y. (2011). Profiling of Hormones and Related Metabolites in Seed Dormancy and Germination Studies. *Methods Mol. Biol.*, 773:99-111.

- Seymour, G.B., Taylor, J.B, Tucker, G.A. (1993). *Biochemistry of fruit ripening*. Springer-Science Bussines Media, B.V., Dordrecht, N.L., 453 pp.
- Southwick, S.M., Weis, K.G., Yeager, J.T., Zhou, H. (1995). Controlling cropping in “Loadel” cling peach using gibberellin: effects on flower density, fruit distribution, fruit firmness, fruit thinning and yield. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 120: 6. 1087-1095.
- Stern R.A., Flaishman M., Ben-Arie, R. (2007). Effect of synthetic auxins on fruit size of five cultivars of Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.). *Sci. Hortic.*, 23: 304-309.
- Sugiura, A., Tomana, T. (1983). Relationships of etanol production by seeds of different types of Japanese persimmons and their tannin content. *HosrtSci.*, 18: 319-321.
- Thimann, K.V. (1980) The senescence of leaves. En: Thimann KV (ed) *Senescence in plants*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 86-115.
- Trewavas, A.J., Jones, H.G., (1991). An assessment of the role of ABA in plant development. In: Davies, W.J., Jones, H.G. (Eds.), *Abscisic Acid: Physiology and Biochemistry*. BIOS Scientific Publishers, Oxford, pp. 169–188.
- Toye, J.D. Glucina, P.G., Minamide, T. (1987). Removal of astringency and storage of ‘Hiratanenashi’ persimmon fruits. *New Zealand J. Exp. Agric.*, 15: 351-355.
- Turnbull, C.G., Anderson, K.L., Winston, E.C. (1996). Influence of gibberellin treatment on flowering and fruiting patterns in mango. *Austr. J. Exp. Agric.*, 36: 603-611.
- Wolstenholme, B.N. (2010). Alternate bearing in avocado: an overview. Obtenido de: http://www.avocadosource.com/papers/southafrica_papers/wolstenholmenigel2010.pdf.
- Yonemori K., Kanzaki S., Sugiura A. (2002). Current situation of molecular markers for selecting pollination-constant and non-astringent type from breeding populations of Japanese persimmon. *Opt. Medit., Ser. A*. 51: 81-86.
- Ziv, D., Zviran, T., Zezak, O., Samach, A., Irihimovitch, V. (2014). Expression Profiling of *FLOWERING LOCUS T-Like* Gene in Alternate Bearing ‘Hass’ Avocado Trees Suggests a Role for *PaFT* in Avocado Flower Induction. *PLoS ONE* 9(10): e110613.