

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



Control hormonal del desarrollo del fruto en el níspero japonés (*Eriobotrya japonica* Lindl.)

TRABAJO FIN DE GRADO

ALUMNO/A: Luis Molina Almela

TUTOR/A: Carmina Reig Valor

COTUTOR/A: Manuel Agustí Fonfría

Curso Académico: 2013/2014

VALENCIA, 27 de junio de 2014

TÍTULO: Control hormonal del desarrollo del fruto en el níspero japonés (*Eriobotrya japonica* Lindl.)

RESUMEN:

El tamaño que alcanzan los frutos de níspero japonés no es aceptable de acuerdo con la demanda del mercado. Con el fin de incrementar el calibre de los frutos se emplean técnicas de cultivo como el rayado de ramas o la aplicación de auxinas de síntesis. Sin embargo, se desconoce su mecanismo de acción.

El objetivo de este trabajo es estudiar el control hormonal y nutricional del crecimiento del fruto de esta especie con el fin de relacionarlo con la disponibilidad de carbohidratos y/o la elasticidad de las paredes celulares y poder explicar el mecanismo de acción de estas técnicas.

Para ello se ha analizado el contenido endógeno en giberelinas, auxinas, citoquininas, ácido abscísico y otros reguladores del desarrollo en el fruto, desde el inicio de su desarrollo (701 BBCH) hasta el cambio de color (801 BBCH). Paralelamente se ha estudiado el potencial hídrico, osmótico y parietal, así como el contenido en carbohidratos, en frutos de árboles rayados, tratados con auxinas de síntesis y control.

Nuestros resultados revelan que, aunque tanto la aplicación de auxinas de síntesis como el rayado de ramas incrementan el tamaño final del fruto, el mecanismo de acción es diferente. El rayado de ramas actúa a través de la acumulación de solutos mientras que la aplicación de auxinas de síntesis aumenta la elasticidad de la pared celular. Se ha comprobado que la aplicación de auxinas de síntesis a los frutos es una técnica más potente que el rayado de ramas en la consecución de un mayor tamaño final del fruto, al permitirse una mayor acumulación de agua producida por la relajación de la pared celular.

Palabras clave: Expansión celular, Relaciones hídricas, Extensibilidad de pared, Control hormonal, Disponibilidad de carbohidratos

ABSTRACT:

In loquat, attained fruit size is not acceptable for commercial demands. In order to increase fruit size, different techniques, such as branch scoring or synthetic auxins, are employed. However, their mechanism of action remains unknown.

The objective of this work is to study hormonal and nutritional control of fruit growth in this species in order to connect it with carbohydrates availability and cell walls plasticity and, thus, explain the mechanism of action of these techniques.

With this purpose, the endogenous contents of gibberellins, auxins, cytokinins, abscisic acid and other fruit growth regulators have been analyzed, from the beginning of its development (701 BBCH) until color change (801 BBCH). At the same time, water, solute and pressure potentials, as well as carbohydrate content in fruits from control, scored, and synthetic auxin 3,5,6-TPA treated trees were assessed.

Our results show that although both branch scoring and the application of the synthetic auxin increase final fruit size, their mechanism of action is different. Branch scoring acts upon solute accumulation whereas the application of the synthetic auxin enhances cell walls plasticity. It has been demonstrated that the application of the synthetic auxin, compared to branch scoring, is a more powerful technique in increasing final fruit size, by improving water accumulation due to cell wall loosening.

Keywords: cell expansion, hydric relations, wall extensibility, hormonal control, carbohydrate availability

ALUMNO/A: Luis Molina Almela

TUTOR/A: Carmina Reig Valor

COTUTOR/A: Manuel Agustí Fonfría

VALENCIA, junio de 2014

A Carmina y Manolo, por todo.

A Amparo y el resto de compañeros del IAM.

A Nacho y Jaume. Lo hemos conseguido.

A las mujeres de mi familia: mi madre, mi hermana, mi sobrina.

A los hombres también.

A mis amigos.

Índice

| | |
|--|-----------|
| Índice | VII |
| Índice de tablas | IX |
| Índice de figuras | X |
| I. Introducción | 1 |
| 1. Importancia de la especie | 1 |
| 2. Descripción botánica y ciclo vegetativo | 2 |
| 3. Crecimiento del fruto y su control | 4 |
| 3.1. Control nutricional | 6 |
| 3.2. Control hídrico | 7 |
| 3.3. Control hormonal | 9 |
| 4. Objetivo | 10 |
| II. Material y métodos | 11 |
| 1. Material vegetal | 11 |

| | |
|--|-----------|
| 2. Experimentos _____ | 12 |
| 3. Análisis _____ | 12 |
| 3.1. Determinación del potencial hídrico y sus componentes _____ | 12 |
| 3.2. Determinaciones hormonales _____ | 13 |
| 3.3. Determinaciones de azúcares solubles _____ | 14 |
| 3.4. Análisis estadístico de los resultados _____ | 14 |
| III. Resultados y discusión _____ | 15 |
| 1. Potencial hídrico y sus componentes _____ | 15 |
| 2. Crecimiento del fruto _____ | 16 |
| 3. Evolución del contenido hormonal del fruto durante su crecimiento _____ | 19 |
| 4. Contenido en azúcares solubles _____ | 25 |
| 5. Conclusiones _____ | 26 |
| Bibliografía _____ | 27 |

Índice de tablas

Tabla 1: Potencial hídrico y sus componentes de frutos de níspero japonés cv. Cardona en los estados fenológicos 708 y 801 de la escala BBCH. Cada valor es la media de dos repeticiones. Valores expresados en MPa. 15

Tabla 2: Influencia de la aplicación de 3,5,6-TPA (15 mg l^{-1}) sobre la maduración del níspero japonés cv. Algerie. Cada valor es la media de diez frutos. 17

Tabla 3: Influencia de la aplicación de 3,5,6-TPA (15 mg l^{-1}) sobre el porcentaje de frutos de níspero japonés cv. Algerie cosechados en cada fecha de recolección. Primera fecha de recolección: 3 de abril. 17

Tabla 4: Contenido en azúcares reductores y de transporte en el fruto de níspero japonés cv. Algerie en el estado fenológico 801-BBCH. Valores expresados en mg g^{-1} ps. 25

Índice de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1: Evolución de la superficie (A) y producción (B) del cultivo del níspero japonés en España entre los años 2001 y 2011. Fuente: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. | 2 |
| Figura 2: Ciclo vegetativo del níspero japonés. | 3 |
| Figura 3: Curva sigmoideal y doble sigmoideal del crecimiento y desarrollo de los frutos..... | 4 |
| Figura 4: Modelo del crecimiento exponencial del fruto del níspero japonés..... | 5 |
| Figura 5: Evolución del tamaño medio de los frutos de árboles rayados, tratados con 15 mg l ⁻¹ de 3,5,6-TPA y sin ningún tratamiento (control). Letras distintas en un mismo gráfico indican diferencias significativas (P≤0,05). | 17 |
| Figura 6: Acción del 3,5,6-TPA (15 mg l ⁻¹) sobre el desarrollo inmediato del fruto. Efecto depresivo. Cada valor es la media de 30 frutos. Fecha de tratamiento: 14 de marzo. Letras distintas en un mismo gráfico indican diferencias significativas (P≤0,05). | 18 |
| Figura 7: Evolución de la concentración de AIA (A), Tz (B), DHz (C) e IP (D) en el fruto durante su crecimiento. | 19 |
| Figura 8: Evolución de la concentración de ABA en el fruto durante su crecimiento ... | 21 |
| Figura 9: Evolución de la concentración de JA (A) y SA (B) en el fruto durante su crecimiento | 22 |
| Figura 10: Ruta metabólica de síntesis de la GA ₄ y GA ₁ . Evolución de las concentraciones de sus componentes en el fruto durante su crecimiento..... | 23 |
| Figura 11: Comparación de la concentración de GA ₄ (A) y GA ₁ (B) presente en frutos en estado 801 BBCH para los distintos tratamientos realizados (Control, rayado y TPA). Letras distintas en un mismo gráfico indican diferencias significativas (P≤0,05). | 24 |

I. Introducción

1. Importancia de la especie

El níspero japonés (*Eriobotrya japonica* Lindl) es un árbol frutal perennifolio perteneciente a la familia Rosaceae. Su origen se localiza en el valle del río Daduhe, en el sur de China, donde actualmente sigue en cultivo. A pesar de ser conocido en el resto del mundo como árbol ornamental, el cultivo de este frutal no se extendió a otros países, como Japón, hasta el siglo XIX y más tarde hasta la India, islas Mauricio, Europa y América (Calabrese, 2006).

En la actualidad este frutal se cultiva en la mayoría de los continentes, desde América, en las costas sureste y suroeste de los Estados Unidos, Centroamérica y Sudamérica; hasta África, fundamentalmente en Madagascar y Mauricio; pasando por Europa, en países de la cuenca mediterránea, como España, Italia, Turquía y Grecia entre otros. Sin embargo es en el continente asiático, principalmente China y Japón, donde este frutal ha adquirido mayor relevancia. De hecho, China es el primer país productor a nivel mundial, con cerca de 1 200 000 t, seguido de lejos por España, que con cerca de 30 000 t se sitúa en segundo lugar.

Introducción

En España las zonas productivas más importantes son la Comunidad Valenciana, sobre todo la provincia de Alicante, que lidera la producción nacional con 16 000 t anuales, y Andalucía, mayoritariamente Granada, donde se producen cerca de 12 000 t anuales. Sin embargo, en los últimos años tanto la superficie cultivada como el volumen de producción de este frutal han disminuido de manera considerable (Magrama, 2012).

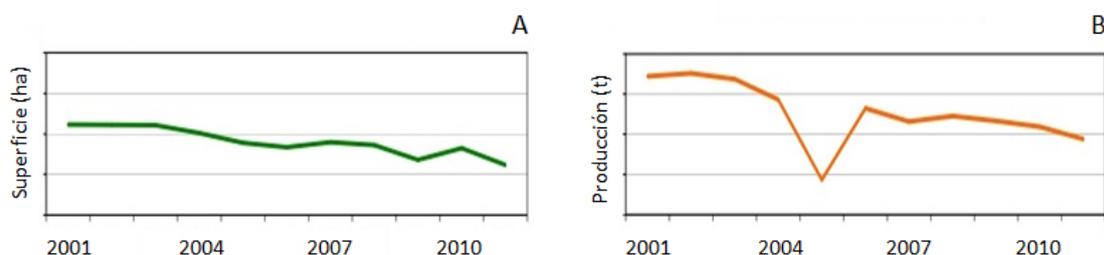


Figura 1: Evolución de la superficie (A) y producción (B) del cultivo del níspero japonés en España entre los años 2001 y 2011. Fuente: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente.

Sin embargo, el plan de mejora y renovación de variedades establecido recientemente en España en vistas a mejorar el cultivo podría contribuir a potenciar su cultivo y ampliar su calendario de producción.

2. Descripción botánica y ciclo vegetativo

El níspero japonés es un árbol vigoroso, con tendencia a la verticalidad, pudiendo alcanzar alturas de 5-6 metros en condiciones de crecimiento espontáneo, de rápida entrada en producción y muy productivo. Es perennifolio, con hojas grandes, duras y de bordes aserrados. Presenta dos tipos de yemas, a saber, vegetativas y mixtas. Las flores son pequeñas, hermafroditas, de pétalos blancos y ovario ínfero. Florece en inflorescencias de tipo panícula, situadas en posición terminal de los ramos, pudiendo contener cada panícula más de cien flores. El fruto es un falso fruto, en el que la parte aprovechada es la resultante del desarrollo de los órganos extracarpelares del ovario; es de tamaño mediano-pequeño, forma redondeada, oval o piriforme, piel dura, fina y amarilla o anaranjada, pulpa carnosa y succulenta de color blanco, amarillento o anaranjado, y contienen de dos a cuatro semillas grandes de cubierta marrón oscuro (Reig y Agustí, 2006).

Al tratarse de una planta de origen subtropical, no pasa el invierno en latencia ni la brotación primaveral se ve afectada por la acumulación de horas frío. La brotación se origina en primavera, tras la recolección, a partir de yemas terminales de brotes vegetativos o de yemas laterales de los brotes reproductivos, en ambos casos del año

anterior. La inducción floral se produce a finales de la primavera. Durante el verano el meristemo detiene temporalmente su crecimiento vegetativo, en lo que se conoce como parada estival, para retomarlo después brevemente hasta concluirlo a finales de verano con la diferenciación floral y la emisión de las panículas florales.

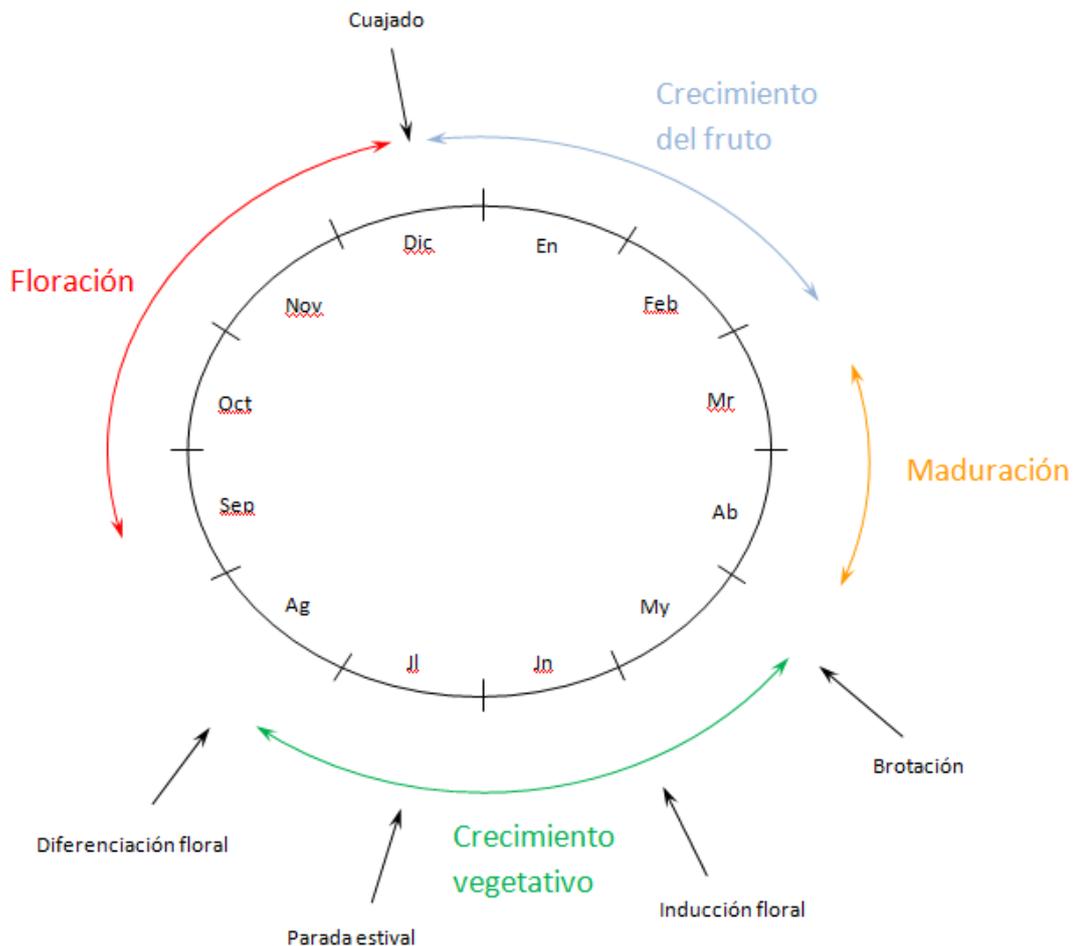


Figura 2: Ciclo vegetativo del níspero japonés.

La época de floración varía según las condiciones climáticas, concentrándose en los climas templados del hemisferio norte desde mediados de septiembre, en los cultivares más precoces, hasta finales de diciembre, en los más tardíos, pudiendo verse adelantada o retrasada tanto por el descenso de las temperaturas como por efecto del estrés hídrico. La duración de la floración es de unos dos meses, aproximadamente, entre la antesis de la primera y de la última flor, y es muy abundante. El momento de antesis depende también de la posición de la panícula en el árbol, abriéndose antes y con mayor rapidez las panículas situadas en ramas principales y en zonas más soleadas del árbol.

La polinización en esta especie es entomófila, llevada a cabo, fundamentalmente, por abejas y abejorros. A pesar de tratarse de una especie autocompatible, la polinización cruzada mejora en un 15-20% la producción, motivo por el que resulta conveniente

Introducción

incluir en el cultivo árboles de diversos cultivares. Es importante tener en cuenta que la actividad de estos insectos polinizadores se ve afectada negativamente por las bajas temperaturas, el viento o la lluvia, y aun cuando la polinización sea óptima, el porcentaje de cuajado de esta especie es notablemente bajo, no superando el 10-15% de las flores inicialmente formadas. A pesar de ello, el aclareo de frutos resulta imprescindible si se quiere lograr una cosecha de frutos comercialmente aceptables.

A diferencia de otras rosáceas, el crecimiento del fruto tiene lugar durante el invierno y la maduración a principios de la primavera, dependiendo de las condiciones climáticas y de la variedad. El cambio de color, que avanza desde la zona estilar a la peduncular, se produce, aproximadamente, quince días antes de la recolección, y puede llegar a durar hasta un mes y medio, según el área de cultivo.

3. Crecimiento del fruto y su control

Tras la polinización y la fecundación de un óvulo, el ovario comienza su desarrollo, que culminará en la producción de un fruto maduro. Como ya se ha dicho, en algunos casos, cuando en su formación intervienen de modo decisivo órganos extracarpelares, éstos reciben el nombre de falsos frutos. También puede desarrollarse el ovario en ausencia de fecundación, y por tanto de semillas, fenómeno conocido como partenocarpia. En cualquier caso, el crecimiento y desarrollo de un fruto en general sigue una curva sigmoideal en la que se distinguen tres fases sucesivas, una primera fase exponencial caracterizada por la división celular, una segunda fase lineal de engrosamiento celular y una tercera en la que el crecimiento se detiene y da paso a una serie de cambios físicos y bioquímicos que conducen a la maduración del fruto. En algunos frutos que poseen el endocarpo duro (hueso), la transición de la fase I a la fase II se caracteriza por presentar un estado intermedio en el que el crecimiento se detiene y éste se lignifica. Esta fase sin crecimiento es la que da lugar a una curva doble sigmoide.

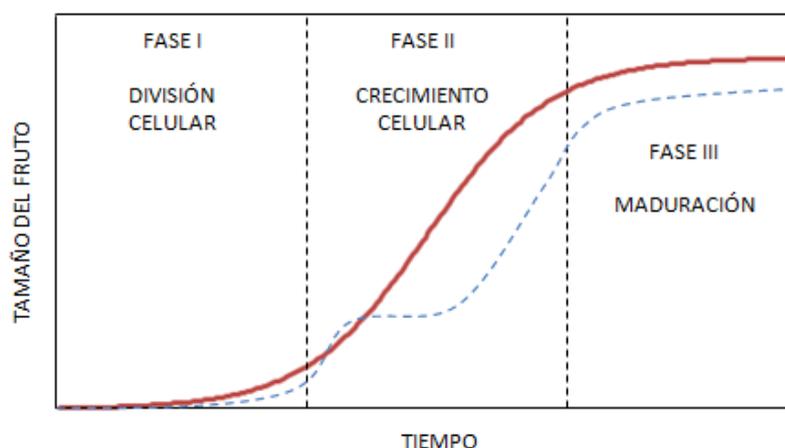


Figura 3: Curva sigmoideal y doble sigmoideal del crecimiento y desarrollo de los frutos

En el caso del níspero japonés, el crecimiento del fruto no sigue la curva de crecimiento sigmoideal como le correspondería a un frutal de pepita, sino exponencial hasta la maduración (Blumenfeld, 1980). La tasa de crecimiento es muy lenta durante las seis semanas que siguen al cuajado, esto es, a finales de otoño-principios de invierno (Ateyyeh y Qrunfleh, 1998); a ésta le siguen una fase de división celular que dura cuatro semanas y una tercera fase que tiene lugar en primavera en la que el fruto crece a gran velocidad hasta completar su tamaño final. Sin embargo algunos autores indican que estos frutos crecen siguiendo el modelo sigmoideal característico de los pomos (Rodríguez, 1983; Cuevas et al., 2003).

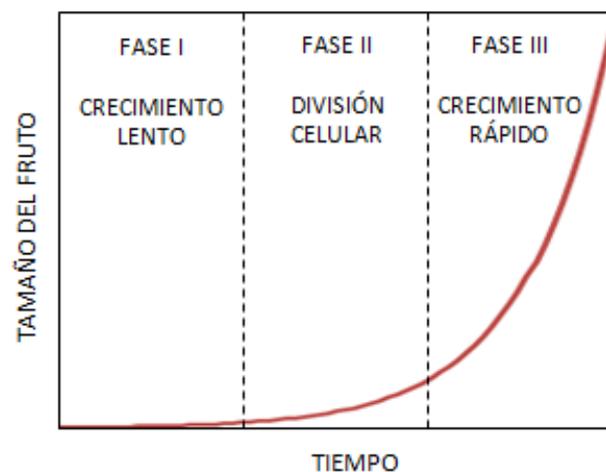


Figura 4: Modelo del crecimiento exponencial del fruto del níspero japonés

La evolución de los componentes del fruto sigue pautas diferentes durante el crecimiento. Por una parte, en las primeras fases, el peso seco de la pulpa es superior al de la semilla, pero con el tiempo esta situación se invierte y en la maduración el peso seco de la semilla es superior al de la pulpa. En términos de peso fresco, la pulpa siempre pesa más que la semilla, particularmente a partir del cambio de color del fruto, llegando a representar hasta el 80% de su peso fresco en el momento de maduración. La comparación entre el peso seco (6 g, aproximadamente) y fresco (30 g, aproximadamente) totales de un fruto medio pone de relevancia la contribución del agua al crecimiento de los frutos (Gariglio et al., 2002).

3.1. Control nutricional

La fase de división celular es un periodo de gran demanda energética, en la que todos los carbohidratos captados por el sumidero, es decir, el ovario u órganos extracarpelares en crecimiento, se invierten en nutrir los procesos de duplicación del material genético y la citocinesis, es decir, la división celular. En la fase de engrosamiento celular las células han alcanzado ya su número definitivo y dejan de dividirse, expandiéndose a continuación sus tejidos en desarrollo por la acumulación de carbohidratos en el citoplasma celular, principalmente en la vacuola. Este incremento de la concentración de sólidos solubles produce un aumento del potencial osmótico en el interior de la célula que provoca la acumulación de agua. Finalmente, en la fase de maduración la acumulación de carbohidratos se detiene para dar paso a una serie de cambios metabólicos, como la degradación de clorofilas, la síntesis de carotenoides, la pérdida de firmeza, el descenso del contenido en almidón o la reducción de la acidez libre (Agustí, 2003).

Bajo este punto de vista, si el árbol no es capaz de satisfacer las exigencias del fruto durante la fase inicial de su crecimiento, éste pierde su ritmo de crecimiento y se cae. Si por el contrario estas exigencias no son cubiertas durante la fase II o el número de frutos supera la capacidad de la planta para nutrirlos, el tamaño final del fruto es pequeño. A este respecto, las hojas juegan un papel esencial por su capacidad para sintetizar y exportar metabolitos al fruto en desarrollo. Pero este papel no es uniforme con el tiempo. En efecto, mientras se desarrolla un brote sus hojas actúan como sumidero reclamando carbohidratos, pero a medida que maduran se convierten en órganos de exportación y ello coincide con la intensificación de la capacidad sumidero del fruto. Estudios realizados sobre la compartimentación y distribución de azúcares marcados con ^{13}C ratifican el transporte de estas sustancias desde las hojas a los frutos en desarrollo.

Por tanto es evidente que la demanda de fotoasimilados en el árbol será proporcional al número de frutos en desarrollo. De esta manera, si la masa foliar del árbol, y por tanto su capacidad fotosintética, son fijas, cuanto mayor sea el número de frutos en crecimiento mayor será la competencia existente entre ellos y menor será su tamaño. Esta relación inversa entre el número de frutos y su tamaño se atribuye a la competencia, sobre todo por carbohidratos, existente entre los frutos. El desarrollo de los frutos es consecuencia de la acumulación de metabolitos, que puede estar limitada por la incapacidad del propio fruto para acumularlos o por la falta de disponibilidad en la planta. Esto último puede modificarse favorablemente si se reduce la competencia entre frutos mediante la eliminación manual o química de una parte de ellos mediante el aclareo.

En el níspero japonés, aunque el porcentaje de cuajado es bajo, aproximadamente el 10% de las flores formadas (Ateyyeh y Qrunfleh, 1998), el tamaño de los frutos presentes no es aceptable de acuerdo con las exigencias del mercado. Es por esta razón que se llevan a cabo técnicas de aclareo de frutos, reduciendo el número de éstos hasta

tres o cuatro por panícula. Esta técnica de cultivo se inicia con un aclareo previo con ácido naftalenacético (ANA) en el momento del cuajado que reduce significativamente el porcentaje de flores cuajadas y por tanto el número de frutos que inician el desarrollo, consiguiendo reducir los costes de cultivo (Agustí et al., 2000). Posteriormente, cuando los frutos tienen el 10% de su tamaño final se realiza un aclareo manual complementario dejando, por término medio, sólo tres frutos por panícula.

Otra técnica que se lleva a cabo para aumentar la disponibilidad de carbohidratos por parte de los frutos en desarrollo y, por tanto, permitir un incremento de su tamaño final es el rayado de ramas. Como en la mayoría de las especies frutales, esta técnica consigue aumentar hasta en un 10% el diámetro de los frutos del níspero japonés, cuando se realiza al final de la fase I del desarrollo, es decir, cuando el fruto ha alcanzado el 20% de su tamaño final (Agustí et al., 2005).

El contenido y composición de los carbohidratos del fruto varían a lo largo del desarrollo y la maduración del mismo. Así, mientras en la pulpa el sorbitol es el azúcar más abundante durante la etapa de crecimiento y el contenido en sacarosa es muy variable, en la maduración son sacarosa, fructosa y glucosa los azúcares predominantes (Gariglio et al., 2002). Un aspecto a destacar lo constituye el hecho de que en los últimos quince días previos a la recolección el fruto acumule el 90 % de los azúcares, siendo la sacarosa el predominante (Hirai, 1980). Por otra parte, la concentración de elementos minerales en la pulpa desciende durante el desarrollo del fruto alcanzando los valores más bajos en el momento de la maduración. Estos cambios de concentración son debidos, mayoritariamente, a un proceso de dilución más que a su metabolización (Gariglio y Agustí, 2005).

3.2. Control hídrico

El tamaño final de un fruto está directamente relacionado con la cantidad de agua que acumula. Esto indica que a los frutos más grandes les llega, proporcionalmente, mayor cantidad de agua que de materia seca; es decir, que las variaciones en tamaño detectadas entre frutos de un mismo árbol deben ser consecuencia de las relaciones hídricas que el árbol establece con cada fruto, más que de las variaciones fuente-sumidero existentes en el árbol. Esta dependencia de la absorción de agua que tiene el crecimiento del fruto queda ilustrada cuando el 80% de la fracción comestible del fruto del níspero japonés es agua. Aunque el fruto es sumidero de materia seca, las variaciones en peso fresco son más rápidas que las de acumulación de materia seca. De hecho, es la acumulación de azúcares en el fruto la responsable de reclamar agua por efecto de un aumento de la presión osmótica y, por tanto, se podría decir que es la concentración de solutos reclamando agua la responsable del tamaño final del fruto. Pero además existe una influencia hormonal en la absorción de agua, que reduce la presión parietal de las células y disminuye el potencial hídrico Ψ_h para facilitar así la entrada de líquido al citoplasma (Agustí y Reig, 2006). Concretamente las auxinas estimulan algún tipo de

Introducción

comunicación entre la célula y la pared que la envuelve causando un rápido incremento de su extensibilidad celular. Rayle y Cleland (1970) plantearon que los protones podrían ser el factor de ablandamiento celular. Su Hipótesis Ácida del Crecimiento sostiene que la acidificación de la pared celular producida por la auxina que estimula el crecimiento se debe a la excreción de protones hacia el apoplasto, con reducción de su pH por debajo de 5,5 y la consiguiente alteración en la estabilidad de los enlaces de la pared o la actividad de ciertas enzimas, lo que facilita su extensión.

En la planta, el agua circula entre dos puntos siempre que el potencial hídrico entre éstos sea diferente. Puesto que el potencial hídrico siempre es negativo, cuanto menor es su valor, es decir, cuanto mayor es en valor absoluto, mayor es la fuerza con la que el agua es reclamada. Del mismo modo, cuanto más próximo está a cero, menor es la fuerza con la que se reclama el agua, que siempre se desplaza a favor de su gradiente de potencial, es decir, de puntos de mayor potencial hídrico a puntos con menor potencial hídrico, o lo que es lo mismo, de puntos con un potencial hídrico próximo a cero a puntos con un potencial hídrico más negativo. Así, cuando una planta absorbe agua a través de sus raíces, lo hace porque su potencial hídrico es menor (más negativo) al del suelo. En el caso de un suelo salino la mayor concentración de sales hace que el potencial hídrico del suelo sea menor al de la planta, y por tanto el agua se desplaza de la planta hacia el suelo, deshidratándola. Del mismo modo, al acumularse solutos en el fruto, su potencial hídrico disminuye, y al ser menor al del resto de la planta, se convierte en principal sumidero de agua haciendo que ésta fluya hacia él.

El potencial hídrico (Ψ_h) se define como:

$$\Psi_h = p + \pi$$

siendo p el potencial de presión o de pared y π el potencial osmótico o de solutos en una célula vegetal, que consta de una pared celular elástica, de un citoplasma con el núcleo y los orgánulos y, por último, de una vacuola central que contiene una solución diluida de azúcares, iones y ácidos orgánicos y que representa el 80-90% del volumen total celular. Se considera por tanto que los intercambios de agua celular están controlados por la vacuola. El potencial osmótico π representa la atracción al agua que induce la concentración de solutos contenida en la vacuola y el citoplasma de la célula, y su criterio de signos es similar al del potencial hídrico, es decir, siempre es menor que cero y cuanto más negativo sea mayor será la fuerza de atracción de agua. Por su parte, el potencial de pared p representa la presión a la que se ve sometida la pared de la célula debida a la acumulación de agua en la vacuola y su consiguiente aumento de volumen, indicando un valor negativo de p que la pared está relajada y no ofrece por tanto resistencia al aumento del volumen celular, mientras que un valor positivo pone de manifiesto que la pared celular ofrece resistencia a la presión ejercida desde el interior y se muestra resistente a la expansión celular.

Así pues, el potencial hídrico en la pulpa del fruto del níspero japonés se mantiene estable durante todo el periodo de crecimiento del fruto, con valores entre -0,7 y -1 MPa. En cambio el potencial osmótico aumenta hasta el momento del cambio de color, pasando de -1,35 MPa a -0,7 MPa, disminuyendo después hasta -1,1 MPa. De estas cifras se desprende que el potencial de pared comienza con valores altos (0,40 MPa), para ir decreciendo hasta tomar incluso valores negativos, en el momento del cambio de color, lo cual representa ausencia de turgencia, y finalmente se recupera y vuelve a aumentar alcanzando valores en torno a 0,2 MPa (Agustí y Reig, 2006).

3.3. Control hormonal

En la mayor parte de los casos los óvulos en desarrollo sintetizan las hormonas que confieren al fruto la capacidad sumidero para atraer carbohidratos y consecuentemente agua. Por este motivo existe una relación positiva entre el número de semillas por fruto y su tamaño final, en la mayoría de las especies frutales, como el kiwi, cítricos, manzana, níspero, etc., y, por tanto, cuanto mayor es el número de semillas, mayor es la capacidad sumidero del fruto y mayor será su tamaño final. La excepción más notable son los frutos partenocárpicos, cuyo desarrollo también está regulado hormonalmente. La actividad hormonal se explica a través de la acción que las hormonas ejercen sobre la expresión de algunos genes, la actividad enzimática y la funcionalidad de las membranas. El resultado final es consecuencia de la interacción entre todas ellas, unas promoviendo procesos, otras inhibiéndolos. En la mayoría de las especies, la fase de expansión celular parece estar regida por las auxinas, si bien hay excepciones notables, como en la uva, en que están ligadas a la fase I.

Estudios realizados en tomate en los que se compara la evolución de la concentración de ácido indolacético (AIA) en los tejidos del fruto con su tasa de crecimiento no muestran una relación clara entre ambas variables. Es más, la tasa de crecimiento diaria del fruto alcanza sus valores máximos diez días antes que la de la concentración de AIA, de modo que el fruto sigue creciendo cuando la concentración de AIA de la placenta ha alcanzado sus valores más bajos. Ello indica que el AIA no tiene un efecto directo sobre su desarrollo y que su acción debe estar restringida al crecimiento del embrión, sobre el que crea un potente efecto sumidero del que se aprovecha el pericarpo para crecer.

A pesar de ello, es decir, aunque se trate de un efecto indirecto, la acción de las auxinas sobre la expansión celular se ha aprovechado para acelerar el desarrollo del fruto y/o aumentar su tamaño final. En muchas especies frutales, como en los cítricos, los frutales de hueso o el níspero japonés entre otros, la aplicación de auxinas de síntesis al inicio de la expansión celular promueve el desarrollo del fruto, logrando los resultados señalados. En todos los casos, su acción se ha explicado a través de un incremento del contenido en materia seca del fruto, es decir, de su capacidad sumidero. Pero ello es consecuencia del mayor tamaño que adquieren las células, y en todo caso, ratifica su acción de control sobre la fase de engrosamiento celular.

Introducción

El papel de las giberelinas (GAs), citoquininas y ácido abscísico (ABA) en esta fase de desarrollo del fruto es menos relevante. No obstante, el nivel de giberelinas se ha relacionado con la expansión celular de algunos frutos como el melocotón y la ciruela. Los contenidos en ABA son en general muy bajos durante esta fase del desarrollo en la mayor parte de los frutos.

En el caso del níspero japonés, los cambios hormonales descritos al final de la fase de división celular se caracterizan por un aumento en el contenido de AIA y citoquininas. En la fase de expansión celular o crecimiento rápido, las concentraciones de AIA y de citoquininas alcanzan sus mínimos valores, mientras que la de ABA aumenta paralelamente a la de producción de etileno (Ding y Zhang, 1988; Ye, 1988). Sin embargo no se conoce nada sobre su acción durante el crecimiento lineal del fruto y, en particular, acerca del papel que las giberelinas ejercen en el control del desarrollo de este fruto.

4. Objetivo

El objetivo de este trabajo es estudiar la evolución del contenido hormonal a lo largo de la fase lineal del desarrollo del fruto del níspero japonés, así como su relación con las variaciones hídricas y nutricionales endógenas en condiciones normales de cultivo y bajo la acción de factores exógenos como el rayado de ramas y la aplicación de auxinas de síntesis.

II. Material y métodos

1. Material vegetal

Los experimentos se realizaron en una plantación comercial de níspero japonés (*Eriobotrya japonica* Lindl.) cv. Cardona, bajo condiciones normales de cultivo, con riego localizado y fertirrigación, localizada en Callosa d'En Sarrià (Alicante, España, 38° 39' N, 0° 7' W).

Los árboles adultos, de entre veinte y veinticinco años de edad, estaban injertados sobre patrón franco, podados en vaso, con un marco de plantación de 4 x 5 m y aclarados química y manualmente a tres frutos por panícula en el estado 701 de la escala BBCH.

Paralelamente se utilizó un árbol adulto de características similares y bajo las mismas condiciones de cultivo situado en la parcela de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agroalimentaria y del Medio Natural de la Universidad Politécnica de Valencia (UPV).

2. Experimentos

Se seleccionaron doce árboles de la plantación comercial de Callosa d'En Sarrià de cosecha y volumen de copa similares. A cuatro de ellos se les aplicó 3,5,6-TPA (ácido 3,5,6-tricloro-2-piridiloxiacético, ácido libre) a una concentración de 15 ppm, a otros cuatro se les realizó un rayado de ramas y los cuatro restantes se dejaron como control. Ambos tratamientos se realizaron cuando los frutos tenían entre el 20% y el 30% de su tamaño final, esto es, entre los estados 702 y 703 de la escala BBCH. Periódicamente se midieron los diámetros de quince frutos por árbol y se tomaron muestras de los frutos durante todo el periodo de crecimiento en diferentes estados fenológicos del desarrollo para su posterior análisis hormonal, de carbohidratos y de potencial hídrico.

En el momento de maduración se midieron los parámetros de maduración externa (color) e interna (firmeza, sólidos solubles totales (SST) y acidez (A)). La firmeza se determinó con un penetrómetro FT-011, utilizando una varilla de 1,5 mm de diámetro. Para la concentración de SST se utilizó un refractómetro digital (Atago, Tokyo) y la acidez se valoró con NaOH 0,1N utilizando fenolftaleína como indicador. El color se midió determinando las coordenadas Hunter (a, b y L), utilizando un colorímetro Minolta Chroma Meter CR-300 (Minolta, Tokyo).

También se trató la mitad del árbol de la UPV con el mismo producto (3,5,6-TPA) e idéntica concentración, a fecha 14 de marzo. En este árbol no se llevó a cabo ningún aclareo de frutos previo al tratamiento.

3. Análisis

3.1. Determinación del potencial hídrico y sus componentes

Para la determinación del potencial hídrico de los frutos (piel y pulpa conjuntamente) se tomaron, con ayuda de un sacabocados, discos de tejido de un centímetro de diámetro de cada fruto y se colocaron en cámaras (C-52, Wescor Inc., Logan, UT, USA) conectadas a un psicrómetro (Ps-10) y a un microvoltímetro de determinación de punto de rocío (HT-33T). El higrómetro de punto de rocío fue calibrado previamente con soluciones de NaCl de concentración conocida. Las cámaras se cerraron herméticamente y se dejaron así durante cuarenta minutos para permitir que se llegase al equilibrio térmico y de vapor de agua. Posteriormente se enfrió el termopar durante quince segundos para condensar el agua sobre el mismo, se cortó la corriente de enfriamiento e inmediatamente después se realizó la lectura del contenido en agua. Este valor, expresado en microvoltios, es comparado con el obtenido de las soluciones de NaCl de potencial hídrico conocido, transformando así en valores de Ψ_h los datos obtenidos en microvoltios.

La determinación del potencial osmótico se realizó de igual modo, pero las muestras debieron ser previamente congeladas para forzar la rotura de las membranas celulares, y así eliminar el componente parietal del potencial hídrico (Milad y Shackel, 1992; Sánchez y Aguirreolea, 2008). El potencial parietal o de presión se calculó por diferencia entre el potencial hídrico total (Ψ_h) y el potencial osmótico (π) siguiendo la ecuación antes descrita:

$$\Psi_h = p + \pi$$

Los resultados se expresan en MPa.

3.2. Determinaciones hormonales

Las muestras recogidas en el campo se conservaron congeladas y posteriormente se liofilizaron. Una vez liofilizadas, las muestras fueron trituradas hasta polvo fino, con ayuda de un molinillo y un mortero, a baja temperatura.

Para la extracción hormonal alícuotas (50 mg) duplicadas de cada muestra fueron extraídas con metanol 80%: ácido acético 1% (v/v) en presencia de diferentes estándares internos (hormonas marcadas con deuterio para cuantificar las pérdidas de cada hormona inherentes al proceso de extracción [OlChemim Ltd - Olomouc, o Cambridge Isotope Lab - Andover]: [$^{17,17-^2}\text{H}$]-GAn, [$^{2}\text{H}_5$]-IAA y [$^{2}\text{H}_6$]-ABA). Estos estándares fueron añadidos para la cuantificación de cada una de las diferentes giberelinas (GAn), ácido indolacético (AIA) y ácido abscísico (ABA). Para la cuantificación del ácido jasmónico (JA) se usó el compuesto dhJA como estándar interno. En el caso de las citoquininas (CK), transzeatina (tZ), dihidrozeatina (dhZ) e isopentiladenina (iP), se utilizaron diferentes citoquininas deuteradas como estándares internos (D-DHZ, D-iP y D-tZ).

Para recuperar la fracción ácida donde se localizan las GAn, IAA, ABA y JA, 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). Para la recuperación de la fracción básica, donde se localizan las citoquininas, las muestras pasaron en primer lugar a través de un cartucho HLB (elución $\text{CH}_3\text{CN}80$: Ácido acético 1%) y a continuación a través de una columna MCX. Las muestras se llevaron a sequedad en 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 masas/masas (Q-exactive Orbitrap detector, Thermo Fisher Scientific). Las concentraciones hormonales finales de los extractos fueron determinadas usando las

Material y métodos

curvas de calibración realizadas previamente. La interpretación de los resultados se realizó mediante los programas Xcalibur 2.2 SP1 y TraceFinder.

3.3. Determinaciones de azúcares solubles

El análisis de azúcares solubles se realizó según el protocolo de Eshghi et al. (2007) con ciertas modificaciones. A partir de las muestras liofilizadas y trituradas de frutos, se tomaron alícuotas (100 mg) por duplicado de cada una y se introdujeron en tubos debidamente etiquetados a los que se añadió 5 ml de Petroleum ether (40-60°). Los tubos fueron centrifugados (4000 rpm, 4°C, 10 min) y el extracto de Petroleum, conteniendo los lípidos, clorofilas y otros contaminantes, fue eliminado mediante pipeteo cuidadoso; a la muestra restante se añadió 100 µl de manitol, un azúcar no existente en los tejidos vegetales y que se usa como estándar para cuantificar las pérdidas del resto de azúcares durante el proceso de extracción y purificación de los mismos, y posteriormente se realizaron dos extracciones sucesivas con etanol 80% (v/v), las muestras con el etanol se mantuvieron en baño a 65°C durante 20 min, se centrifugaron (4000 rpm, 4°C, 10 min) y se juntaron ambos sobrenadantes que se llevaron a sequedad en Speed Vac Concentrator (Savant®).

Se añadieron 4 ml de agua Milli-Q al residuo seco para la dilución de los azúcares mediante vortex. Se añadió 20-30 mg de activated Charcoal a las muestras y posteriormente se centrifugaron (4000 rpm, 4°C, 10 min). El sobrenadante se recogió y se filtró a través de filtros de nylon 0,45 µm. Las muestras se llevaron a sequedad en Speed Vac.

Las muestras fueron diluidas en 100 µl de agua Milli-Q para su posterior inyección en un equipo de detección HPLC (Thermo Electron Corporation) equipado con una columna APS-2 hypersil (250 x 4,6 mm, Thermo Electron Corporation) y con un detector de Índice de Refracción. Los azúcares presentes en las muestras fueron identificados y cuantificados según sus tiempos de retención y las curvas de calibración, realizadas previamente con las diferentes concentraciones de azúcares estándar. Cada muestra fue extraída por duplicado y fue inyectada dos veces. Los resultados se expresaron como $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ peso seco.

3.4. Análisis estadístico de los resultados

El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo aplicando el análisis de la varianza simple con un nivel de confianza $P \leq 0,05$. Para la separación de las medias se empleó el test de Tukey de comparaciones múltiples.

III. Resultados y discusión

1. Potencial hídrico y sus componentes

Los valores del potencial hídrico y sus componentes para los estados fenológicos 708 y 801 de la escala BBCH y los tres tratamientos aplicados se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1: Efecto del rayado de ramas y la aplicación de 3,5,6-TPA (15 mh l^{-1}) sobre el potencial hídrico y sus componentes de frutos de níspero japonés cv. Cardona en los estados fenológicos 708 y 801 de la escala BBCH. Los tratamientos se realizaron en el estado 702-703 de la escala BBCH. Cada valor es la media de dos repeticiones. Valores expresados en MPa.

| Tratamiento | | P. hídrico | P. osmótico | P. parietal |
|-------------|-----|------------|-------------|-------------|
| Control | 708 | -0,95 | -1,02 | 0,07 |
| Rayado | 708 | -1,02 | -0,95 | -0,07 |
| TPA | 708 | -1,15 | -1,08 | -0,07 |
| Control | 801 | -1,35 | -1,38 | 0,03 |
| Rayado | 801 | -0,92 | -1,08 | 0,16 |
| TPA | 801 | -1,12 | -0,98 | -0,13 |

Resultados y discusión

Al final del desarrollo del fruto (estado fenológico 708 de la escala BBCH) el potencial hídrico de los frutos que no han sido sometidos a ningún tratamiento (frutos control) es el menor en valor absoluto de todos los estudiados, lo cual indica que demandan agua con menor intensidad, a la vez que su potencial parietal positivo señala que la célula ha alcanzado ya un tamaño tal que la pared opone resistencia a una mayor acumulación de agua. Ello sugiere que la capacidad de acumulación de agua promovida por la acumulación de sólidos solubles se halla dificultada por la firmeza de las paredes celulares.

Los frutos de árboles rayados y tratados con 3,5,6-TPA poseen un potencial hídrico más bajo, lo que indica una mayor demanda de agua, que al arrastrar consigo sólidos solubles explica por qué el potencial osmótico es también mayor en valor absoluto. Sin embargo para ambos tratamientos el potencial parietal es idéntico, lo que sugiere que su mecanismo de acción es distinto. En efecto, si la pared celular tiene el mismo grado de relajación en ambos tratamientos, pero el TPA induce una mayor capacidad de acumulación de agua (el potencial hídrico es menor) que el rayado de ramas, el mecanismo de acción de la auxina debe ser más potente.

Un comportamiento similar se observa al cambio de color de los frutos (estado 801-BBCH). En los provenientes de árboles rayados, el potencial osmótico es mayor en valor absoluto que el de los frutos tratados con 3,5,6-TPA, lo cual señala que la demanda de agua debida a la concentración de sólidos solubles es mayor, pero dado que el potencial parietal es positivo, indicando que las paredes celulares están ofreciendo gran resistencia al aumento de volumen, la célula ya no es capaz de acumular más agua. Por el contrario, en los frutos provenientes de árboles tratados con 3,5,6-TPA, la pared celular está más relajada que la de los frutos provenientes de árboles rayados y por lo tanto, a pesar de poseer un potencial osmótico menor en valor absoluto, aún es posible la acumulación de agua. El valor del potencial hídrico, menor en este caso, así lo confirma. El comportamiento de los frutos de los árboles control, similar al de los frutos de los árboles rayados, indica que están dejando de crecer.

2. Crecimiento del fruto

En la Figura 5 puede observarse la evolución del tamaño medio de los frutos a lo largo de su periodo de desarrollo, medido como el diámetro medio de los frutos muestreados.

El diámetro medio de los frutos de árboles rayados o tratados con 3,5,6-TPA, superó al de los frutos control a partir del estado 705 de la escala BBCH (Figura 5). Al final del desarrollo (estado fenológico 708-BBCH) los frutos tratados con 3,5,6-TPA alcanzaron un diámetro significativamente mayor (44,8 mm) que los controles sin tratar (42,3 mm). El rayado también aumentó el diámetro medio de los frutos (43,5 mm), pero sin alcanzar la significación estadística.

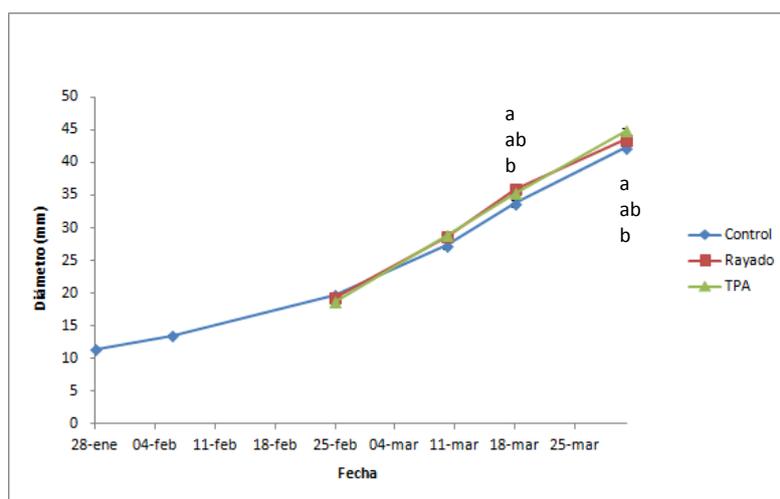


Figura 5: Evolución del tamaño medio de los frutos de árboles rayados, tratados con 15 mg l^{-1} de 3,5,6-TPA y sin ningún tratamiento (control). Letras distintas para una misma fecha indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$).

Este efecto de la auxina sobre el desarrollo del fruto implica, por tanto, una aceleración del crecimiento. Así, los frutos tratados alcanzaron antes la coloración y el reblandecimiento de sus tejidos (Tabla 2). Como consecuencia de ello se anticipó la recolección cosechando cerca del 30% de los frutos de árboles tratados en la primera recolección frente al 19% de los árboles sin tratar (Tabla 3). La maduración interna (SST y acidez libre) no fue modificada por el 3,5,6-TPA (Tabla 2).

Tabla 2: Influencia de la aplicación de 3,5,6-TPA (15 mg l^{-1}) sobre la maduración del níspero japonés cv. Algerie. Cada valor es la media de diez frutos.

| | Coordenadas Hunter | | | Resistencia (N) | SST ($^{\circ}$ Brix) | Acidez (%) |
|-----------|--------------------|----------------|----------------|-----------------|------------------------|----------------|
| | a | b | L | | | |
| Control | -0.89 ± 2.5 | 29.7 ± 0.6 | 59.8 ± 1.0 | 20.6 ± 1.1 | 10.7 ± 0.3 | 1.41 ± 0.1 |
| 3,5,6-TPA | 5.49 ± 2.1 | 30.5 ± 0.5 | 61.3 ± 0.7 | 16.7 ± 1.0 | 10.2 ± 0.4 | 1.45 ± 0.1 |
| Signific. | $P \leq 0.05$ | n.s. | $P \leq 0.05$ | $P \leq 0.05$ | n.s. | n.s. |

Tabla 3: Influencia de la aplicación de 3,5,6-TPA (15 mg l^{-1}) sobre el porcentaje de frutos de níspero japonés cv. Algerie cosechados en cada fecha de recolección y la producción total. Primera fecha de recolección: 3 de abril.

| Tratamiento | Frutos recolectados (%) | | | Total (kg árbol^{-1}) |
|-------------|-------------------------|----------------|----------------|----------------------------------|
| | 1ª recolección | 2ª recolección | 3ª recolección | |
| Control | 19.2 | 56.7 | 24.1 | 40.6 |
| 3,5,6-TPA | 27.7 | 51.8 | 20.5 | 39.4 |
| Signific. | $P \leq 0.05$ | n.s. | $P \leq 0.05$ | n.s. |

Resultados y discusión

Es importante destacar que el 3,5,6-TPA produjo un efecto depresivo inmediato sobre el crecimiento del fruto, que trece días después del tratamiento había crecido un 6,5% menos (24,5 mm) que el control sin tratar (26,1 mm) (Figura 6). Diez días más tarde las diferencias persistían, siendo el diámetro medio de los tratados (26,9 mm) significativamente inferior al de los controles sin tratar (28,2 mm) (Figura 6). Finalmente los frutos tratados superaron a los controles y su tamaño final fue significativamente superior (Figura 5).

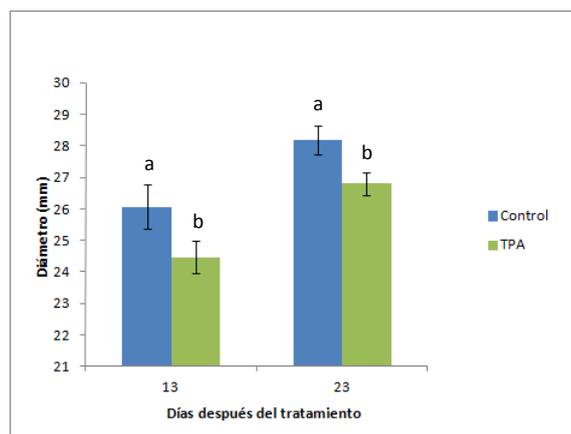


Figura 6: Acción del 3,5,6-TPA (15 mg l⁻¹) sobre el crecimiento inicial del fruto. Efecto depresivo. Cada valor es la media de 30 frutos. Fecha de tratamiento: 14 de marzo. Letras distintas en un mismo gráfico indican diferencias significativas (P≤0,05).

Este efecto depresivo del 3,5,6-TPA se ha señalado también para los cítricos (Mesejo et al., 2012) y no es privativo ni de esta especie (Romero-Puertas et al., 2004; Untiedt y Blanke, 2001) ni de esta auxina (Mauk et al., 1986; Iwahori y Oohata, 1976; (Romero-Puertas et al., 2004; Untiedt y Blanke, 2001). Esta auxina de síntesis provoca una clorosis foliar que reduce la concentración de clorofila (a y b) y de carotenoides, reduce el transporte de electrones del fotosistema II (Φ PSII) y la capacidad de reducción de quinonas (q_p), aumenta la extinción de clorofilas (q_z), previene la disipación del exceso de energía y reduce la asimilación de CO₂ (Mesejo et al., 2012). Como consecuencia de ello el aporte de carbohidratos al fruto desciende y éste reduce su tamaño. En algunas especies, particularmente las que producen frutos partenocárpicos, la consecuencia de esto es la producción de etileno (Agustí et al., 2002) y el fruto se desprende del árbol (Mesejo et al., 2012). Pero en aquellas especies de cuajado sexual, como es el caso del níspero japonés, el fruto supera el efecto depresivo inicial y consigue crecer más que el fruto sin tratar, favorecido por el efecto de la auxina sobre el potencial hídrico celular (ver apt. 1), y finalmente adquiere un tamaño superior a éste (Figura 5).

3. Evolución del contenido hormonal del fruto durante su crecimiento

El balance hormonal del fruto durante su crecimiento se vio marcadamente modificado por su estado de desarrollo, independientemente de la hormona estudiada. Así, la concentración de AIA descendió progresivamente en las primeras fases del desarrollo del fruto, desde $88,2 \text{ ng g}^{-1}$ cuando éste tenía el 10% de su tamaño final (701 BBCH) hasta 53 ng g^{-1} cuando ya había alcanzado el 50% (705 BBCH), aumentando significativamente hasta alcanzar valores máximos de 156 ng g^{-1} cuando prácticamente había alcanzado su tamaño final (709 BBCH). Con el cambio de color del fruto (801 BBCH) la concentración de esta auxina descendió significativamente en un 58% hasta alcanzar valores prácticamente iguales a los encontrados 35 días antes (estado 705 BBCH) (Figura 7A). Algo parecido ocurrió al observar la evolución del contenido en citoquininas (Tz, DHZ, IP). En este caso, aunque la tendencia también fue decreciente en los primeros estados de desarrollo del fruto, esto es, desde el 701 hasta el 705 de la escala BBCH, con valores para la Tz de $2823,7 \text{ ng g}^{-1}$ y $20,9 \text{ ng g}^{-1}$ respectivamente, se observó un aumento puntual de dicha concentración en $2171,4 \text{ ng g}^{-1}$, alcanzando el valor máximo cuando el fruto tenía el 20% de su tamaño final (702 BBCH) (Figura 7B).

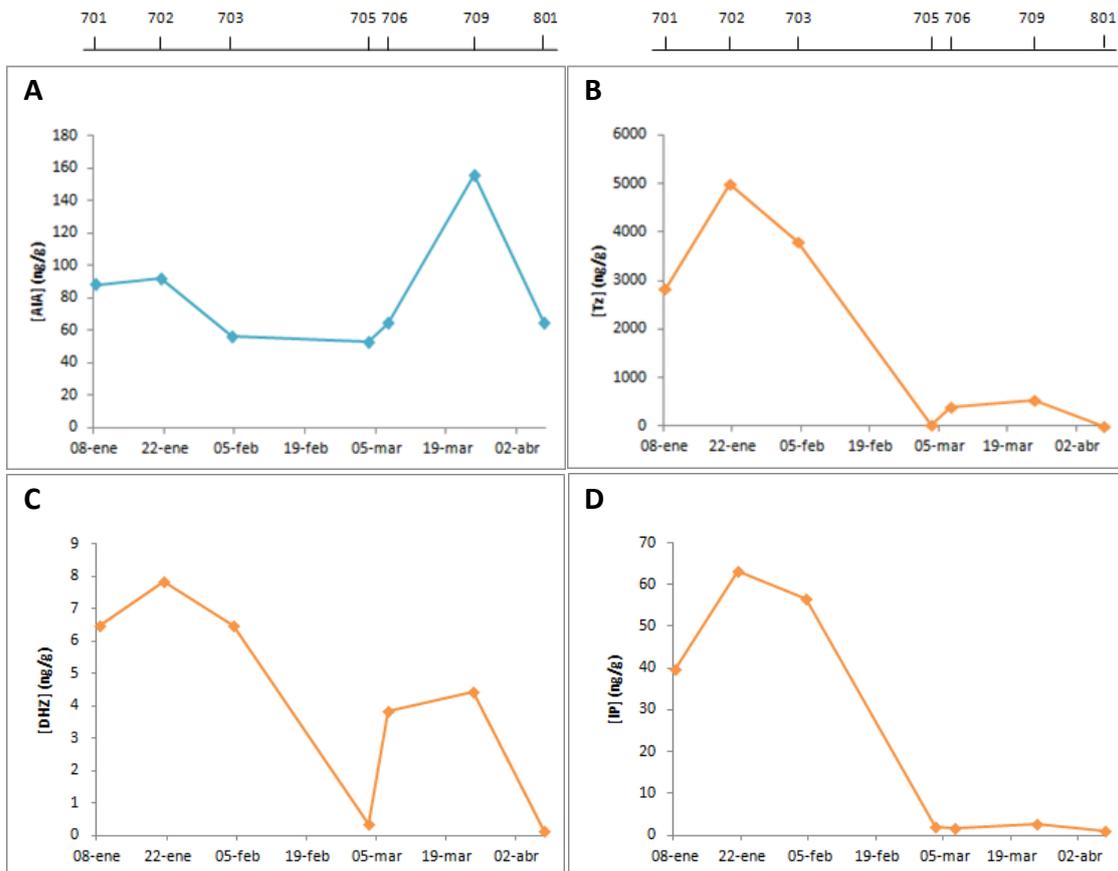


Figura 7: Evolución de la concentración de AIA (A), Tz (B), DHZ (C) e IP (D) en el fruto durante su crecimiento.

Resultados y discusión

En el periodo de máximo crecimiento del fruto, es decir, hasta que alcanzaron prácticamente su tamaño final e iniciaron el cambio de color (709-801 BBCH), su concentración de Tz fue baja y se mantuvo prácticamente estable en torno a valores de 312,2 ng g⁻¹ por término medio (Figura 7B). El comportamiento del resto de citoquininas fue idéntico, si bien en el caso de DHz, aunque su concentración también fue más baja en pleno crecimiento activo del fruto (es decir, desde que el fruto tenía el 50% de su tamaño final hasta que se inició el cambio de color), ésta aumentó notablemente hasta 4 ng g⁻¹ en los momentos previos a finalizar su crecimiento (Figura 7C). Sin embargo, en el caso de la IP no se detectó este incremento de la concentración en las etapas finales del crecimiento sino que ésta se mantuvo en valores prácticamente nulos desde que el fruto había alcanzado el 50% de su tamaño final (Figura 7D).

Merece la pena destacar la importancia de la Tz respecto a las otras dos citoquininas. Así, mientras la concentración máxima de la primera fue de 5000 ng g⁻¹, la de las otras dos fue de 8 y 60 ng g⁻¹ respectivamente, indicando que la concentración de Tz fue 625 y 83,5 veces superior a la de DHz e IP, respectivamente (Figura 7 B, C y D).

Al comparar la evolución de la concentración de AIA con la de las citoquininas, se observó que el comportamiento era diferente, independientemente de la citoquinina estudiada. Así, mientras en la primera la concentración era alta en el periodo de máximo crecimiento del fruto, en las segundas era bajo y viceversa (Figura 7). Estos resultados sugieren que el AIA regula el crecimiento lineal o de expansión celular en esta especie, coincidiendo con lo observado por otros autores que atribuyen a esta hormona la capacidad de aumentar la elasticidad de la pared celular y, por tanto, de aumentar el volumen celular (Rayle y Cleland, 1970). En coherencia con ello, la aplicación de auxinas de síntesis consigue aumentar el tamaño final del fruto en muchas especies frutales como cítricos (Agustí et al., 2002) y níspero japonés (Agustí et al., 2003). El descenso progresivo del contenido en citoquininas hasta valores mínimos al final del crecimiento del fruto y en etapas próximas al cambio de color sugiere que estas sustancias, en el caso del níspero japonés, están más relacionadas con el proceso de maduración que con el crecimiento lineal, como ya han señalado Reig et al (2014). De hecho, la aplicación de kinetina en etapas próximas al cambio de color retrasa la maduración del níspero japonés (Lou et al., 2012). En coherencia con ello, nuestros frutos tratados con 3,5,6-TPA tuvieron en el momento del cambio de color un menor contenido de citoquininas (1,8 ng g⁻¹) que los rayados (3 ng g⁻¹), y éstos a su vez que los controles (6,3 ng g⁻¹), presentando una anticipación de la coloración y un mayor reblandecimiento de sus tejidos, esto es, una maduración más avanzada (Tabla 2).

Sin embargo, estos resultados están parcialmente de acuerdo con los encontrados por Ding y Zhang (1988) en esta especie, puesto que en nuestro caso, durante el periodo de rápido crecimiento del fruto (desde 705 hasta 709 BBCH), la concentración de AIA no alcanzó valores mínimos, sino que fueron máximos, pero son coincidentes completamente con los observados por Reig et al. (2014) en el mismo cultivar de níspero japonés y bajo las mismas condiciones climáticas.

La concentración de ABA descendió progresivamente a medida que el fruto crecía, desde 4000 ng g⁻¹ en las primeras fases del desarrollo, cuando éste sólo tenía el 10% de su tamaño final, hasta 500 ng g⁻¹ cuando ya había alcanzado la mitad de su tamaño definitivo (Figura 8). A partir de este momento la concentración de esta hormona aumentó significativamente hasta alcanzar valores máximos de 14000 ng g⁻¹ cuando el fruto había completado su crecimiento e iniciaba el cambio de color. Reig et al. (2014) también observaron en esta especie un aumento significativo de ABA en etapas próximas a la maduración, siendo máximo cuando el fruto había alcanzado su madurez fisiológica. Por lo tanto, el papel del ABA en esta especie parece estar ligado al proceso de maduración y no al de crecimiento del fruto, como ocurre en la mayoría de las especies frutales.

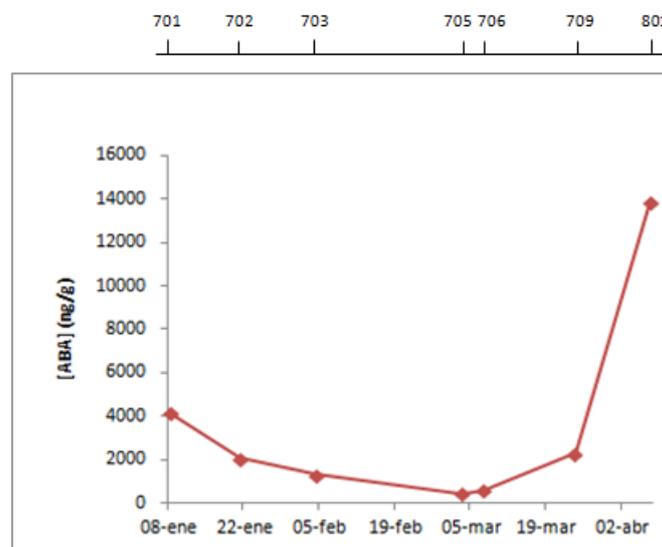


Figura 8: Evolución de la concentración de ABA en el fruto de níspero japonés cv. Algeria durante su crecimiento.

Respecto al comportamiento de otros reguladores del desarrollo como el ácido jasmónico (JA) y el ácido salicílico (SA), ambos mostraron una tendencia decreciente a lo largo del desarrollo del fruto, si bien en el segundo de ellos se detectó un aumento puntual de la concentración del 30% cuando el fruto tenía el 20% de su tamaño final (702 BBCH) (Figura 9). En los dos casos, la concentración fue mínima durante el periodo activo de crecimiento del fruto, es decir, desde que éste había alcanzado la mitad de su tamaño final (705 BBCH) hasta que había completado su crecimiento (801 BBCH). Merece la pena destacar la importancia del ácido jasmónico respecto al salicílico, puesto que mientras en el primero se alcanzaron valores máximos de hasta 3500 ng g⁻¹, en el segundo apenas se alcanzaron los 600 ng g⁻¹ (Figura 9). La disminución de las concentraciones de JA y SA en estados próximos al cambio de color sugiere que estas hormonas están implicadas en la regulación de la maduración más que del desarrollo del fruto, lo cual coincidiría con lo estudiado por Kondo y Fukuda (2001), Srivastava y Dwivedi (2000), Mo et al. (2008) y Zhang et al. (2003).

Resultados y discusión

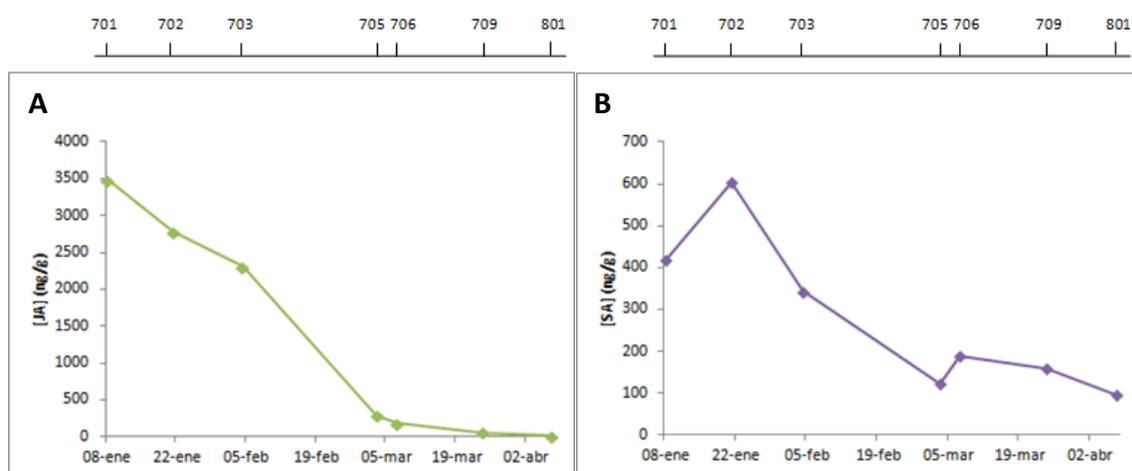


Figura 9: Evolución de la concentración de JA (A) y SA (B) en el fruto de níspero japonés cv. Algeria durante su crecimiento

En cuanto a las giberelinas, sólo las activas tienen la capacidad intrínseca de regular el desarrollo de las plantas y por tanto modificar la respuesta fisiológica a algunos procesos. En la mayoría de las plantas éstas se han identificado como GA_1 y GA_4 y en el cuajado del fruto es la GA_1 la que muestra mayor actividad en general. Nuestros resultados presentaron una evolución diferente en su acción. Así, mientras la concentración de la primera aumentó progresivamente en las primeras fases del desarrollo del fruto de $1,4 \text{ ng g}^{-1}$, cuando éste tenía el 10% de su tamaño final, hasta $3,2 \text{ ng g}^{-1}$, cuando ya había alcanzado el 30%, para después descender hasta valores mínimos de $0,6 \text{ ng g}^{-1}$, cuando había detenido su crecimiento, en la segunda la concentración descendió durante todo el periodo de crecimiento del fruto llegando a ser prácticamente nula en las etapas finales del mismo (Figura 10). Merece la pena destacar la importancia de la GA_4 respecto de la GA_1 en las primeras etapas del desarrollo estudiadas, ya que el máximo valor de la primera fue hasta diez veces superior al de la segunda ($32,5 \text{ ng g}^{-1}$ y $3,2 \text{ ng g}^{-1}$ respectivamente). Los resultados sugieren la posibilidad de que en el níspero japonés sea la GA_4 la que asuma el papel regulador del cuajado, a diferencia de otras especies, como los cítricos, en las que es la GA_1 (Talón et al., 1992).

A pesar de ello, y a la vista de nuestros resultados, no parece que las giberelinas estén relacionadas con el crecimiento lineal de este fruto, puesto que para ambas GAs su contenido fue muy bajo durante el periodo de crecimiento activo, es decir, desde el estado 705 hasta el 801 de la escala BBCH. Es más, las altas concentraciones encontradas durante las fases iniciales del desarrollo sugieren que éstas podrían estar relacionadas en el proceso de cuajado de esta especie más que en el de expansión celular. Estos resultados coinciden con los observados por Reig et al. (en preparación), quienes determinan que el cuajado de esta especie depende del contenido endógeno de giberelinas, fundamentalmente la GA_4 .

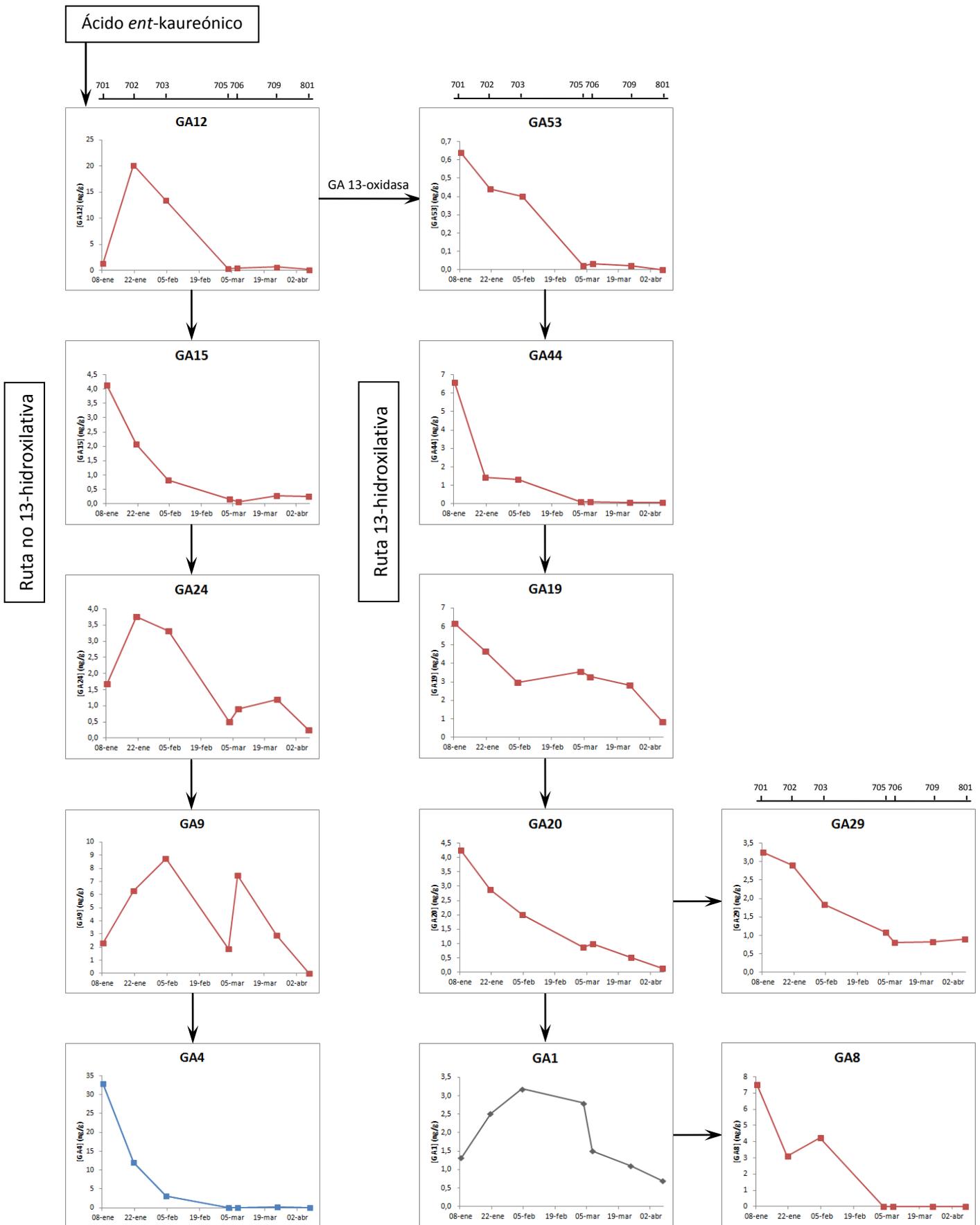


Figura 10: Ruta metabólica de síntesis de la GA₄ y GA₁. Evolución de las concentraciones de sus componentes en el fruto de níspero japonés cv. Algeria durante su crecimiento.

Resultados y discusión

Teniendo en cuenta que el primer paso en la ruta de síntesis de las GAs es la oxidación del ácido *ent*-kaureónico a GA₁₂ y que su metabolismo posterior depende de la especie, e incluso del tejido de la misma especie, su oxidación para la síntesis de las giberelinas activas puede seguir la ruta de la 13-hidroxilación, que es la predominante en la mayoría de las especies y deriva en GA₁, o la ruta de la no 13-hidroxilación, que deriva en la GA₄ (Hedden y Kamiya, 1997).

En cualquier caso, en ambas rutas se observa una secuencia decreciente y lógica de las GAs intermediarias, que indica que cada una de ellas se oxida de manera sincronizada hasta la síntesis de la GA₁ y GA₄ (activas). De hecho, en la ruta de la 13-hidroxilación el descenso progresivo de los precursores de la GA₁ coincide con un aumento de la misma en las primeras etapas del desarrollo del fruto, hasta que éste alcanza el 50% de su tamaño final, que después desciende hasta valores mínimos. Este descenso no está asociado a un aumento de la GA₈ lo cual indica que la GA₁ puede desactivarse mediante la 2β-hidroxilación o conjugarse de forma covalente con moléculas menores como la glucosa (Iglesias y Talón, 2008).

En el caso de la ruta de la no 13-hidroxilación el comportamiento fue similar, si bien la GA₁₂, GA₂₄ y GA₉ presentaron un aumento puntual de la concentración en las primeras fases del desarrollo del fruto (702-703 BBCH) que no se correspondió con el de la GA₄, que siguió disminuyendo, indicando que estos precursores podrían ser intermediarios transitorios sujetos a un alto nivel de transformación por parte de las enzimas oxidasas, como ya sugieren otros autores (Nelissen et al., 2012). En cualquier caso, la concentración de ambas giberelinas activas fue mínima durante el periodo de crecimiento activo del fruto, sugiriendo un papel menor en la fase de crecimiento lineal de este fruto.

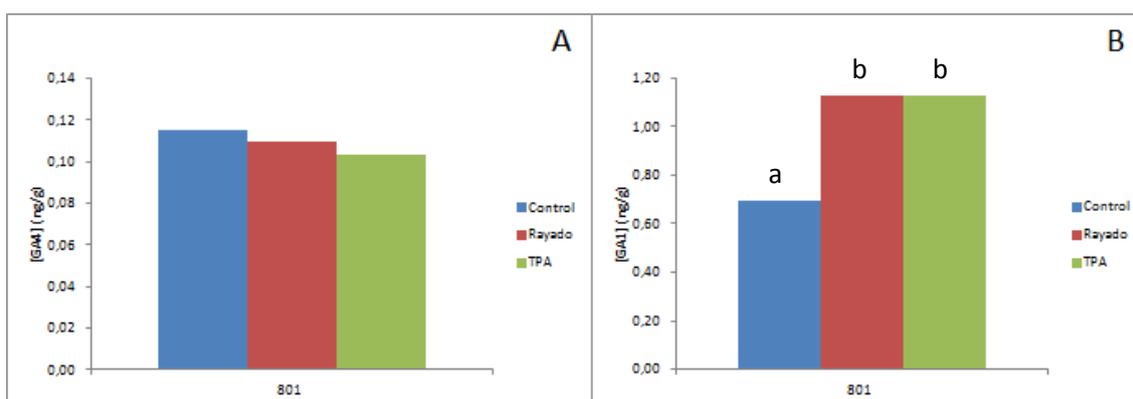


Figura 11: Comparación de la concentración de GA₄ (A) y GA₁ (B) presente en frutos de níspero japonés cv. Algerie en el estado 801 BBCH para los distintos tratamientos realizados (Control, rayado y TPA). Letras distintas en un mismo gráfico indican diferencias significativas (P≤0,05).

Sin embargo, al comparar el contenido de estas giberelinas en frutos de árboles tratados con la auxina de síntesis 3,5,6,-TPA y de árboles rayados, ambos tratamientos

realizados cuando el fruto tenía entre el 20% y el 30% de su tamaño final, no se encontraron diferencias significativas en la concentración de GA₄ entre ambos tratamientos, ni con el control (Figura 11). Sin embargo la concentración de GA₁ fue significativamente mayor en los tratados con 3,5,6-TPA y rayados que en el control, 1,1 ng g⁻¹ y 0,7 ng g⁻¹, respectivamente (Figura 11). Estos resultados podrían explicar el mayor diámetro alcanzado en estos frutos respecto del control, puesto que algunos autores atribuyen a las giberelinas un efecto directo sobre la extensibilidad de las paredes celulares a través de la expresión de algunos genes implicados en la elongación celular como las acuaporinas de la membrana del tonoplasto (Iglesias y Talón, 2008).

4. Contenido en azúcares solubles

En los frutos control, el contenido en azúcares solubles, glucosa y fructosa, es muy superior al de los azúcares de transporte, sorbitol y sacarosa (más del doble en conjunto), lo que es lógico puesto que se trata de un fruto entrando en maduración, y por tanto los segundos comienzan a reducir su transporte al fruto mientras que los primeros se acumulan en gran proporción.

Tabla 4: Contenido en azúcares reductores y de transporte en el fruto de níspero japonés cv. Algerie en el estado fenológico 801-BBCH. Valores expresados en mg g⁻¹ ps.

| | sorbitol | sacarosa | glucosa | fructosa |
|----------------|-----------------|-----------------|----------------|-----------------|
| Control | 12,26 | 52,81 a | 76,82 a | 88,70 a |
| Rayado | 12,98 | 57,79 ab | 103,32 b | 119,43 b |
| TPA | 13,67 | 63,23 b | 96,49 b | 114,74 b |

Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas (P≤0,05).

En el fruto rayado y tratado con 3,5,6-TPA, la concentración de los azúcares reductores es significativamente superior a la del control (Tabla 4). En los frutos tratados con 3,5,6-TPA la sacarosa también presentó una concentración superior a los frutos de los árboles control (Tabla 4).

Esta mayor concentración de sacarosa indica un aporte de azúcares al fruto que no se detecta en los otros, y está en coherencia con el mayor tamaño final que adquieren. La capacidad de seguir acumulando azúcares cuando los otros frutos han dejado de crecer está de acuerdo con la menor presión parietal que presentan los frutos tratados (ver Tabla 1), esto es, aun habiendo acumulado más azúcares que los frutos control o un contenido similar al de los rayados, reciben un mayor aporte de éstos (sacarosa), lo que es indicativo de que mantienen su capacidad de crecer (Cleland, 2010).

5. Conclusiones

A la vista de estos resultados, las conclusiones de este trabajo son:

- La fase de expansión celular del níspero japonés está regulada por el AIA.
- La aplicación de auxinas de síntesis y el rayado de ramas a mitad del crecimiento del fruto incrementan su tamaño final a través de un mecanismo de acción diferente.
- El rayado de ramas actúa a través de la acumulación de solutos. El 3,5,6-TPA aumenta la extensibilidad de la pared celular.

Bibliografía

- [1] Agustí, M. (2003). *Citricultura*. Ed. Mundi Prensa, Madrid.
- [2] Agustí, M. y Reig, C. (2006). Fisiología. En: M. Agustí, C. Reig y P. Undurraga (Eds.), *El cultivo del níspero japonés*. Gráficas Alcoy, Alcoy, pp 97-129.
- [3] Agustí, M., Gariglio, N., Castillo, A., Juan, M., Almela, V., Martínez-Fuentes, A. y otros. (2003). Effect of the synthetic auxin 2,4-DP on fruit development of loquat. *Plant Growth Regul.* 41 , 129-132.
- [4] Agustí, M., Gariglio, N., Juan, M., Almela, V., Mesejo, C. y Martínez-Fuentes, A. (2005). Effect of branch scoring on fruit development in loquat. *J. Hortic. Sci. & Biotechnol.* 80 , 370-374.
- [5] Agustí, M., Juan, M., Almela, V. y Gariglio, N. (2000). Loquat fruit size is increased through the thinning effect of naphthaleneacetic acid. *Plant Growth Regul.* 31 , 167-171.
- [6] Agustí, M., Zaragoza, S., Iglesias, D., Almela, V., Primo-Millo, E. y Talón, M. (2002). The synthetic auxin 3,5,6-TPA stimulates carbohydrate accumulation and growth in citrus fruit. *Plant Growth Regul.* 36 , 141-147.

Bibliografía

- [7] Ateyyeh, A.F., y Qrunfleh, M.M. (1998). Studies on the loquat *Eriobotrya japonica* Lindl cv. Tanaka. I. Vegetative and reproductive growth in the Jordan Valley. *Dirasat Agric. Sci.* 25 , 55-63.
- [8] Blumenfeld, A. (1980). Fruit growth of loquat. *J. Amer. Soc. Hortic. Sci.* 105 , 747-750.
- [9] Calabrese, F. (2006). Origen de la especie. En: M. Agustí, C. Reig y P. Undurruga (Eds), *El cultivo del níspero japonés*. Gráficas Alcoy, Alcoy, pp 17-26.
- [10] Cleland, R. (2010). Auxin cell elongation. En: P.J. Davies (Ed.) *Plant hormones. Biosynthesis, signal transduction, action*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 204-220.
- [11] Cuevas, J., Salvador-Sola, F., Gavilán, J., Lorente, N., Hueso, J. y González-Padierna, C. (2003). Loquat fruit sink strength and growth pattern. *Sci. Hortic.* 98 , 131-137.
- [12] Ding, C. K. y Zhang, H. Z. (1988). Effects of hormones on growth and development of loquat fruits. *Acta Hortic. Sinica* 15 , 148-153.
- [13] 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.
- [14] Gariglio, N. y Agustí, M. (2005). Effect of fruit thinning on the mineral composition of loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl) and its connection with purple spot. *Spanish J. Agric. Res.* 3 , 439-445.
- [15] Gariglio, N., Juan, M., Castillo, A., Almela, V. y Agustí, M. (2002). Histological and physiological study of purple spot of loquat fruit. *Sci. Hortic.* 92 , 225-263.
- [16] Hedden, P. y Kamiya, Y. (1997). Gibberellin biosynthesis: Enzymes, Genes and Their Regulation. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48 , 431-460.
- [17] Hirai, M. (1980). Sugar accumulation and development of loquat fruit. *J. Jap. Soc. Hortic. Sci.* 49 , 347-353.
- [18] Iglesias, D. y Talón, M. (2008). Giberelinas. En: J. Azcón-Bieto y M. Talón (Eds.), *Fundamentos de fisiología vegetal (2ª ed)*. McGraw-Hill y Ed. UB., Madrid., pp 399-420.
- [19] Iwahori, S. y Oohata, J. (1976). Chemical thinning of 'Satsuma' mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) fruit 1-naphtaleneacetic acid. Role of ethylene and cellulase. *Sci. Hortic.* 4 , 167-174.

- [20] Kondo, S. y Fukuda, K. (2001). Changes of jasmonates in grape berries and their possible roles in fruit development. *Sci. Hort.* , 275-288.
- [21] Lou, H., Chen, P., Zheng, H., Xu, C. y Lu, H. (2012). Effect of kinetin on quality and harvest date of loquat fruit. *African J. Agric. Res.* 7 , 1577-1583.
- [22] Mauk, C., Bausher, M. y Yelenosky, G. (1986). Influence of growth regulator treatments on dry matter production, fruit abscission and ¹⁴C-assimilate partitioning in Citrus. *J. Plant Growth Regul.* 5 , 111-120.
- [23] Mesejo, C., Rosito, S., Reig, C., Martínez-Fuentes, A. y Agustí, M. (2012). Synthetic auxin 3,5,6-TPA provokes Citrus clementinina (Hort. Ex Tan) fruitlet abscission by reducing photosynthate availability. *J. Plant Growth Regul.* 31 , 186-194.
- [24] Milad, R. y Shackel, K. (1992). Water relations of fruit end cracking in 'French' prune (*Prunus domestica* L. cv. French). *J. Amer. Soc. Hortic. Sci.* 117 , 824-828.
- [25] Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. 2012 *Anuario de estadística*, Madrid.
- [26] Mo, Y., Gong, D., Liang, G., Han, R., Xie, J. y Li, W. (2008). Enhanced preservation effects of sugar apple fruits by salicylic acid treatment during post-harvest storage. *J. Sci. Food Agric.* 88 , 2693-2699.
- [27] Nelissen, H., Rymen, B., Jikumaru, Y., Demuynck, K., Van Lijsebettens, M., Kamiya, Y. y otros. (2012). A local maximum in Gibberellin levels regulates maize leaf growth by spatial control of cell division. *Current Biology* 22 , 1183-1187.
- [28] Rayle, D. y Cleland, L. (1970). Enhancement of wall loosening and elongation by acid solutions. *Plant Physiol.* 46 , 250-253.
- [29] Reig, C. y Agustí, M. (2006). Morfología y anatomía. En: M. Agustí, C. Reig y P. Undurraga (Eds), *El cultivo del níspero japonés*. Gráficas Alcoy, pp 49-72.
- [30] Reig, C., Mesejo, C., Martínez-Fuentes, A., Martínez-Alcántara, B. y Agustí, M. (2014). Loquat fruit ripening is mediated by root depletion. Nutritional and hormonal changes. *Tree Physiol.* (en revisión).
- [31] Rodríguez, A. (1983). *El cultivo del níspero y el valle de Algar-Guadalest*. Sociedad Cooperativa de Crédito de Callosa d'En Sarrià, España.
- [32] Romero-Puertas, M., McCarthy, I., Gómez, M., Sandalio, L., Corpas, F., Del Río, L. y otros. (2004). Reactive oxygen species - mediate enzymatic systems involved in the oxidative action of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Plant Cell Environ.* 27 , 1135-1148.

Bibliografía

- [33] Sánchez, M. y Aguirreolea, J. (2008). El agua en la planta. Movimiento del agua en el sistema suelo-planta-atmósfera. En: Azcón J. y Talón M.(Eds.), *Fundamentos de fisiología vegetal (2ª ed.)*. Ed. McGraw-Hill y Ed. UB, Madrid, pp 25-38.
- [34] 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.
- [35] Srivastava, M. y Dwivedi, U. (2000). Delayed ripening of banana fruit by salicylic acid. *Plant Sci.* 158 , 87–96.
- [36] Talón, M., Zacarías, L. y Primo-Millo, E. (1992). Gibberellins and Parthenocarpic Ability in Developing Ovaries of Seedless Mandarins. *Plant Physiol.* 99 , 1575-1581.
- [37] Untiedt, R. y Blanke, M. (2001). Effects of fruit thinning agents on Apple tree canopy photosynthesis and dark respiration. *Plant Growth Regul.* 35 , 1-9.
- [38] Ye, S.Q. (1988). Relationship between ethylene and growth and development of loquat fruits. *China Fruits* 2 , 15-18.
- [39] Zhang, Y., Chen, K., Zhang, S. y Ferguson, I. (2003). The role of salicylic acid in postharvest ripening of kiwifruit. *Post. Biol. Technol.* 28 , 67-74.