

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA  
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



## Control hormonal y nutricional de frutos partenocárpicos de níspero japonés (*Eriobotrya japonica* Lindl.)

TRABAJO FIN DE GRADO

ALUMNO/A: Daniel Iranzo Ricart

TUTOR/A: Carmina Reig Valor

COTUTOR/A: Manuel Agustí Fonfría

*Curso Académico: 2014/2015*

**VALENCIA, 7 de julio de 2015**

**Título:** Control hormonal y nutricional del crecimiento de frutos partenocárpicos de níspero japonés (*Eriobotrya japonica* Lindl).

**RESUMEN:**

El cuajado asexual en el níspero japonés es un fenómeno poco común. No obstante, en algunas ocasiones, dependiendo fundamentalmente de las bajas temperaturas durante el cuajado, aparecen frutos aspermos. Este fenómeno existe en muchas especies frutales y se conoce como estenospermocarpia. También existen cultivares poliploides de níspero japonés con capacidad partenocárpica. Finalmente, se pueden conseguir frutos partenocárpicos desacoplando el periodo de polinización efectiva mediante la aplicación de ácido giberélico ( $GA_3$ ) durante la floración. En todos los casos, el tamaño final que alcanzan estos frutos no es adecuado comercialmente.

En este trabajo se obtuvieron frutos partenocárpicos mediante la emasculación de flores y se trataron con  $GA_3$  para provocar su cuajado, y se ensayaron técnicas capaces de mejorar su tamaño final. Con este fin, al inicio de la fase lineal del crecimiento del fruto se aplicó una auxina de síntesis, el ácido 3, 5, 6-tricloro-2-piridoxilacético (3, 5, 6-TPA), y se rayaron las ramas para estimular su crecimiento.

A los frutos tratados se les midió el diámetro en el momento de la cosecha, y se determinó su concentración en sólidos solubles totales (SST), la acidez libre, y el color en el momento de la recolección. Asimismo se siguió la evolución de la concentración de carbohidratos de transporte y reductores, y de hormonas vegetales.

Los resultados revelan que, la aplicación de 3, 5, 6-TPA consigue aumentar el diámetro final del fruto respecto de los emasculados sin tratar, sin que ello se corresponda con una mayor acumulación de azúcares. Por otro lado, se ha observado un adelanto en la maduración de los frutos partenocárpicos respecto a los frutos con semillas.

**Palabras clave:** Partenocarpia, emasculación, carbohidratos, fitorreguladores.

**ABSTRACT:**

The asexual flower set in the loquat is a rare phenomenon. However, in some cases, depending mainly on the low temperatures during filling, aspermos fruits appear. This phenomenon exists in many fruit species and is known as stenospermocarpy. There are also polyploid cultivars of loquat with parthenocarpic capacity. Finally, you can get parthenocarpic disengaging the effective pollination period by applying gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) during flowering. In all cases, the final size reached these fruits is not suitable commercially.

In this paper they were obtained by parthenocarpic flower emasculation and treated with GA<sub>3</sub> to cause it flower set, and techniques able to improve their final size were tested. To this end, the beginning of the linear phase of fruit growth auxin synthesis was applied, the 3, 5, 6-trichloro-2-piridoxilacético (3, 5, 6-TPA), acid and streaked for branches stimulate growth.

In the treated fruits they were measured the diameter at the time of harvest, and their concentration in total soluble solids (TSS), the free acid content and color in the time of harvest was determined. Likewise the development of carbohydrate concentration and reducing transport continued, and plant hormones.

The results show that the application of 3, 5, 6-TPA able to increase the final diameter of the fruit on the untreated castrated without this corresponds to an increased accumulation of sugars. Moreover, there has been a breakthrough in parthenocarpic fruit ripening compared to fruits with seeds.

**Keywords:** parthenocarpy, emasculation, carbohydrates, plant growth regulators.

# Índice

Índice	IV
Índice de figuras	VI
Índice de tablas	IX
Índice de fotografías	X
I. <b>Introducción</b>	1
1. ORIGEN E IMPORTANCIA DEL CULTIVO	1
2. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA	1
3. CICLO VEGETATIVO	2
4. CUAJADO ASEXUAL Y DESARROLLO DEL FRUTO PARTENOCÁRPICO EN EL NÍSPERO JAPONÉS	3
5. Objetivo	7
II. <b>Material y métodos</b>	8
1. UBICACIÓN Y MATERIAL VEGETAL	8
2. TRATAMIENTOS	8
3. VARIABLES ANALIZADAS	9
3.1 Análisis hormonal	9
3.2 Análisis de azúcares solubles	10
3.3 Análisis estadístico	11
III. <b>Resultados y discusión</b>	12
1. Influencia del rayado de ramas y de la aplicación de 3, 5, 6-TPA en el desarrollo y maduración de los frutos partenocárpico	12
2. Influencia del rayado de ramas y la aplicación de 3, 5 6-TPA en el balance nutricional de frutos partenocárpico	16

3. Influencia del rayado de ramas y de la aplicación de 3, 5, 6-TPA a frutos partenocárpicos de níspero japonés en su crecimiento y maduración	20
4. Conclusiones	28

<b>Bibliografía</b>	29
---------------------	----

# Índice de figuras

Figura 1: Evolución de la producción y superficie total de níspero japonés 2007-2013.....	1
Figura 2: Representación del ciclo anual del níspero japonés. (Fuente: Cuevas <i>et al.</i> 1997).....	3
Figura 3: Desarrollo de un fruto partenocárpico de níspero japonés cv. 'Algerie' en comparación con un fruto con semillas. Cada valor es la media de 10 frutos y 5 árboles. Las barras verticales indican el error estándar.....	6
Figura 4: Influencia del rayado de ramas y la aplicación de 3, 5, 6-TPA en el diámetro (A) y el peso fresco de los frutos partenocárpicos de níspero japonés obtenidos mediante la emasculación en botón floral y aplicación de GA <sub>3</sub> . Cada valor es la media de 4 frutos. Las barras verticales indican el error estándar. Los tratamientos se realizaron en el estado 703 BBCH.....	12
Figura 5: Influencia del rayado de ramas y la aplicación de 3, 5, 6-TPA en el diámetro (A) y el peso fresco de los frutos con semillas de níspero japonés obtenidos. Cada valor es la media de 4 frutos. Las barras verticales indican el error estándar. Los tratamientos se realizaron en el estado 703 BBCH.....	13
Figura 6: Influencia del rayado de ramas y la aplicación de 3, 5, 6-TPA en la relación a/b de las coordenadas Hunter de los frutos partenocárpicos de níspero japonés obtenidos mediante la emasculación en botón floral y aplicación de GA <sub>3</sub> . Cada valor es la media de 4 frutos. Las barras verticales indican el error estándar. Los tratamientos se realizaron en el estado 703 BBCH.....	13
Figura 7: Influencia del rayado de ramas y la aplicación de 3, 5, 6-TPA en la concentración de sólidos solubles totales (SST) (A) y la acidez (B) de los frutos partenocárpicos de níspero japonés obtenidos mediante la emasculación en botón floral y aplicación de GA <sub>3</sub> . Cada valor es la media de 4 frutos. Las barras verticales indican el error estándar. Los tratamientos se realizaron en el estado 703 BBCH.....	15
Figura 8: Influencia del rayado de ramas y la aplicación de 3, 5, 6-TPA en la concentración de azúcares de transporte en los frutos partenocárpicos de níspero japonés obtenidos mediante la emasculación en botón floral y aplicación de GA <sub>3</sub> . Cada valor es la media de 3 frutos. Las barras verticales indican el error estándar. Los tratamientos se realizaron en el estado 703 BBCH.....	16

Figura 9: Influencia del rayado de ramas y la aplicación de 3, 5, 6-TPA en la concentración de azúcares de transporte en los frutos con semillas de níspero. Cada valor es la media de 3 frutos. Las barras verticales indican el error estándar. Los tratamientos se realizaron en el estado 703 BBCH.....17

Figura 10: Influencia del rayado de ramas y la aplicación de 3, 5, 6-TPA en la concentración de azúcares de transporte en los frutos partenocárpicos de níspero japonés obtenidos mediante la emasculación en botón floral y aplicación de GA<sub>3</sub>. Cada valor es la media de 3 frutos. Las barras verticales indican el error estándar. Los tratamientos se realizaron en el estado 703 BBCH.....17

Figura 11: Influencia del rayado de ramas y la aplicación de 3, 5, 6-TPA en la concentración de azúcares reductores en los frutos con semillas de níspero. Cada valor es la media de 3 frutos. Las barras verticales indican el error estándar. Los tratamientos se realizaron en el estado 703 BBCH.....18

Figura 12: Influencia del rayado de ramas y la aplicación de 3, 5, 6-TPA en la concentración de G-6-fosfato en los frutos partenocárpicos de níspero japonés obtenidos mediante la emasculación en botón floral y aplicación de GA<sub>3</sub>. Cada valor es la media de 3 frutos. Las barras verticales indican el error estándar. Los tratamientos se realizaron en el estado 703 BBCH.....19

Figura 13: Influencia del rayado de ramas y la aplicación de 3, 5, 6-TPA en el contenido de GA<sub>9</sub> (A), GA<sub>51</sub> (B) y GA<sub>4</sub> (C) de los frutos partenocárpicos de níspero japonés obtenidos mediante la emasculación en botón floral y aplicación de GA<sub>3</sub>. Cada valor es la media de 4 frutos. Las barras verticales indican el error estándar. Los tratamientos se realizaron en el estado 703 BBCH.....21

Figura 14: Influencia del rayado de ramas y la aplicación de 3, 5, 6-TPA en el contenido de GA<sub>20</sub>, GA<sub>29</sub> Y GA<sub>8</sub> de los frutos partenocárpicos de níspero japonés obtenidos mediante la emasculación en botón floral y aplicación de GA<sub>3</sub>. Cada valor es la media de 4 frutos. Las barras verticales indican el error estándar. Los tratamientos se realizaron en el estado 703 BBCH.....22

Figura 15: Influencia del rayado de ramas y la aplicación de 3, 5, 6-TPA en el contenido de AIA de los frutos partenocárpicos de níspero japonés obtenidos mediante la emasculación en botón floral y aplicación de GA<sub>3</sub>. Cada valor es la media de 4 frutos. Las barras verticales indican el error estándar. Los tratamientos se realizaron en el estado 703 BBCH.....24

Figura 16: Influencia del rayado de ramas y la aplicación de 3, 5, 6-TPA en el contenido de Tz de los frutos partenocárpicos de níspero japonés obtenidos mediante la emasculación en botón floral y aplicación de GA<sub>3</sub>. Cada valor es la media de 4 frutos. Las barras verticales indican el error estándar. Los tratamientos se realizaron en el estado 703 BBCH.....25

Figura 17: Influencia del rayado de ramas y la aplicación de 3, 5, 6-TPA en el contenido de ABA de los frutos partenocárpicos de níspero japonés obtenidos mediante la emasculación en botón floral y aplicación de GA<sub>3</sub>. Cada valor es la media de 4 frutos. Las barras verticales indican el error estándar. Los tratamientos se realizaron en el estado 703 BBCH.....26



# Índice de tablas

Tabla 1: Tratamientos realizados.....	9
---------------------------------------	---

# Índice de fotografías

Fotografía 1: Ubicación de la parcela experimental de árboles de níspero japonés en la Ciudad Politécnica de la Innovación de la Universitat Politècnica de València.....	8
---	---

# I. INTRODUCCIÓN

## 1. Origen e importancia del cultivo

El níspero japonés es originario del SE de China, donde se inició su cultivo alrededor de 1800. Desde allí se extendió su cultivo, y llegó a Europa en el siglo XVIII, adaptándose bien a las condiciones climáticas de la cuenca mediterránea. (Agustí, 2010)

China es el principal país productor a nivel mundial con una producción que ronda 1.200.000 t, seguido por España con alrededor de 40.000 t. Argelia, Brasil, Chile, Estados Unidos, Grecia, Italia, Japón y Portugal producen cantidades apreciables de este fruto. (Agustí, 2010)

Respecto a la producción (Figura 1 A) y a la superficie cultivada (Figura 2 B) de níspero en España, se mantienen constantes a lo largo de los últimos años, siendo las zonas más importantes del cultivo la Comunidad Valenciana, alcanzando más de la mitad de la producción nacional con unas 16.000 t, y Andalucía con casi 12.000 t. (Magrama, 2013)



Figura 1: Evolución de la producción y superficie total de níspero 2007-2013

## 2. Descripción botánica

El níspero japonés (*Eriobotrya japonica* Lindl) es una especie perteneciente a la familia de las Rosaceae, en la cual se incluyen más de 100 géneros y hasta 3500 especies (Mabberley,

2008; Takhtajan, 2009) distribuidas en zonas templadas del mundo que se cultivan mayoritariamente como árboles frutales.

Es una especie perennifolia que alcanza una altura media de 5 a 6 metros. Sus hojas son de forma oblongo-lanceolada, bordes aserrados y una longitud que oscila entre los 18 y los 40 cm. La coloración del haz es verde oscuro brillante, mientras que el envés es de color gris ceniza. (Martínez-Calvo y col., 1999)

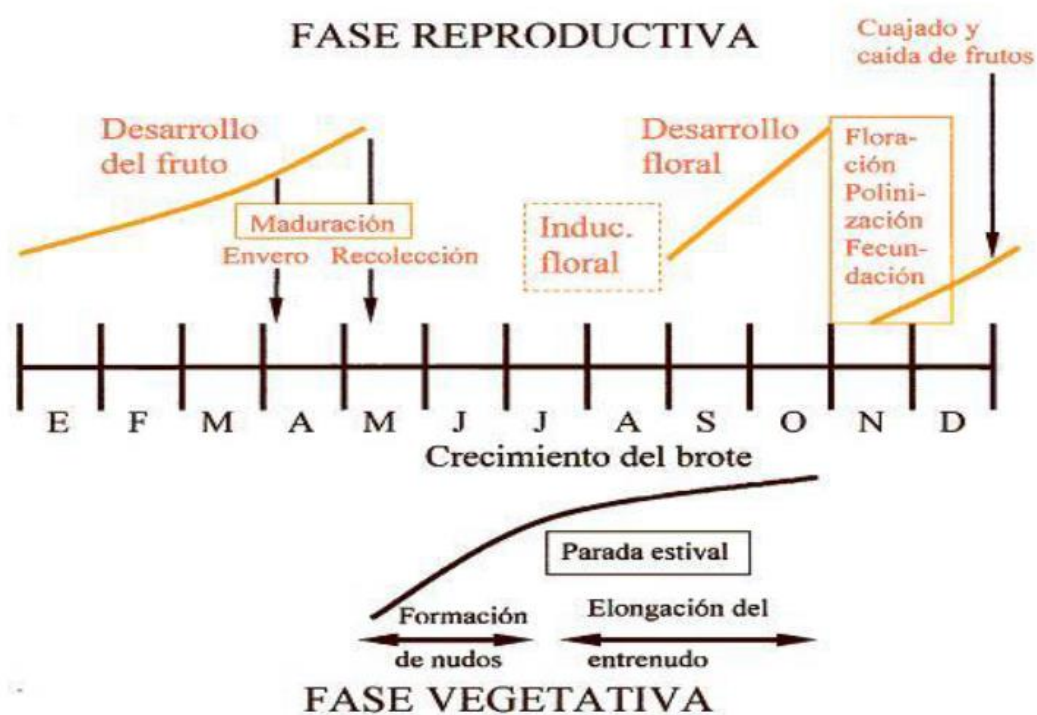
Las inflorescencias son panículas de forma piramidal de entre 18 y 40 cm de longitud. Las flores son hermafroditas, formadas por 5 pétalos blancos libres, 5 sépalos y 5 estigmas libres que se unen basalmente a un ovario ínfero (Roher et al, 1994).

El fruto es un pomo, de diferente forma según la variedad y con una coloración que varía desde el amarillo pálido a naranja intenso y con un número de semillas que oscila entre 2 y 5 agrupadas y recubiertas por un tegumento de color castaño. (Martínez-Calvo *et al*, 1999).

### **3. Ciclo vegetativo**

La fase vegetativa de esta especie tiene lugar principalmente durante el verano en el que se desarrolla los brotes que iniciaron su brotación al final de la primavera, tras la recolección. La fase reproductiva se inicia al final del verano con la diferenciación floral y elongación de las panículas, una vez superada la parada estival. El periodo de floración, por tanto, se extiende desde septiembre hasta noviembre en función de la variedad. (Badenes et al; 2000).

En este sentido se observa una clara separación entre la fase vegetativa y reproductiva de esta especie, situándose la primera de ellas principalmente en verano y la segunda durante el otoño. (Gavilán, 1998)



**Figura 2:** Representación del ciclo anual del níspero japonés. (Fuente: Cuevas *et al.* 1997)

La floración se extiende aproximadamente a lo largo de 2 meses, dependiendo de las condiciones climáticas, hasta que todas las flores están en anthesis. Tras la polinización y fecundación de algunas de ellas se produce el cuajado que tan sólo alcanza entre el 10% y 15% de las flores inicialmente formadas hasta alcanzar su nivel definitivo a principios de invierno y su posterior desarrollo hasta madurar en primavera. (Cuevas et al; 1997)

#### **4. Cuajado asexual y desarrollo del fruto partenocárpico en el níspero japonés**

Los principales factores que controlan la partenocarpia en las plantas son de origen genético y, por tanto, el **control de la esterilidad genética** se ha convertido en un importante enfoque de estudio. Yahata *et al* 2005, utilizando técnicas de cruzamiento de parentales con diferente ploidía, han creado un programa de producción de plantas de níspero triploides, que presentan *esterilidad citológica*, de modo que, cuando son autopolinizadas o polinizadas por plantas con diferente ploidia, principalmente diploides, producen frutos sin

semillas pero éstos son pequeños, alargados y de maduración precoz. La triploidía natural del níspero japonés se debe a la autopolinización o a la ovogénesis en ausencia de meiosis (Liang *et al.* 2006). Guo *et al.* (2006) han estudiado la ploidía de más de 45000 semillas de 21 variedades y han encontrado 311 poliploides estables de los cuales el 73% son triploides, el 16% tetraploides y el resto pentaploides y mixoploides.

Por otra parte, se ha demostrado una relación directa entre la capacidad partenocárpica de una variedad y la síntesis de giberelinas en su ovario. Así, la mutación recesiva del tomate, *pat-2*, induce el desarrollo partenocárpico del fruto a través de un incremento en la síntesis de GAs en el ovario desde el estado de nudo floral hasta el momento de la antesis (Fos *et al.*, 2004). En la mandarina Satsuma, con elevada capacidad partenocárpica y un periodo de receptividad del óvulo corto (Mesejo *et al.* 2007), también se produce un incremento en el contenido en GAs del ovario en el momento de la antesis (Talón *et al.*, 1992). Pero en el mandarino Clementino, con escasa capacidad partenocárpica y un periodo de receptividad del óvulo extenso (Mesejo *et al.* 2007), este incremento no se produce (Talón *et al.*, 1992). Aparentemente, pues, existe una relación inversa entre el periodo de receptividad del óvulo de una variedad dada y su capacidad para sintetizar GAs durante la antesis.

En este sentido, en el níspero japonés la aplicación de 250-500 mg l<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> a panículas individuales en estados precoces del desarrollo de la flor (504-507 de la escala BBCH) se ha mostrado eficaz impidiendo la fecundación y provocando la formación de frutos partenocárpicos (Sadamatsu *et al.*, 2004; Matsui *et al.*, 2004), demostrándose así que esta hormona participa en el cuajado del fruto de esta especie. Se desconoce, sin embargo, si su efecto es sobre el desarrollo del óvulo, del tubo polínico o de ambos.

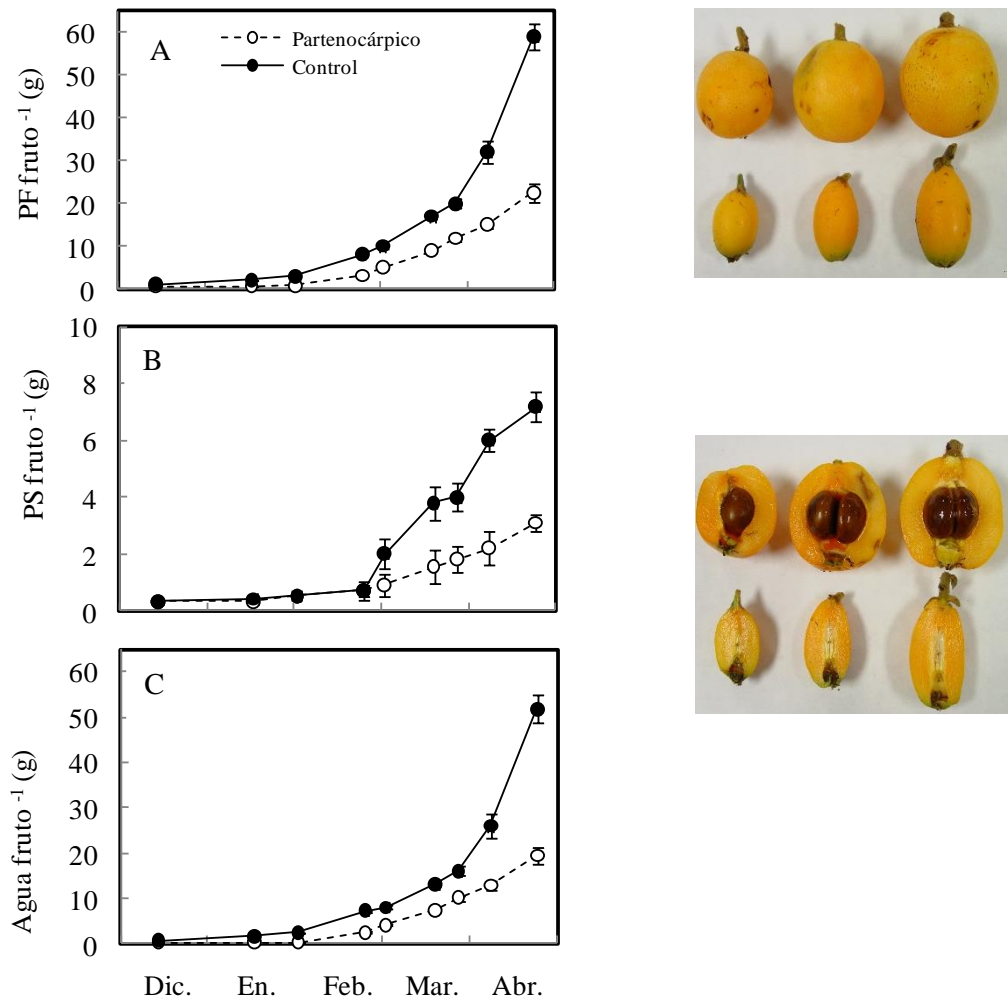
Por otra parte, la aplicación exógena de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) inmediatamente después de la emasculación de las flores consigue cuajar las flores y desarrollar frutos totalmente partenocárpicos. En este sentido, la aplicación exógena de ácido giberélico a flores emasculadas de níspero japonés sustituyendo la síntesis endógena de giberelinas en el embrión en desarrollo, consigue desarrollar frutos en ausencia de fecundación cuando en condiciones normales las flores no fecundadas caen.

El **desarrollo de los frutos** con semillas depende, entre otras cosas, de las hormonas que en ellas se sintetizan por la capacidad sumidero que le confieren. En el níspero japonés, éste puede mejorarse con técnicas agronómicas que mejoren la disponibilidad de carbohidratos,

por una parte como el rayado, o técnicas que aumenten la capacidad sumidero de los frutos como la aplicación de auxinas de síntesis, por otra (Agustí et al 2003).

Pero la ausencia de semillas en los frutos del níspero japonés y, dada su escasa capacidad partenocárpica, impide el normal desarrollo del fruto. Así, los frutos sin semillas son más pequeños, alargados y con un menor contenido en azúcares. La sustitución de la acción de las semillas por la aplicación exógena de CPPU, una citoquinina de síntesis, (Sadamatsu et al, 2004) durante la fase de cuajado y al inicio de la fase II, ha resultado eficaz respecto del tamaño final alcanzado por los frutos sin semillas. Sin embargo, las características del fruto no son, por el momento, de calidad suficiente para su comercialización y, además, las citoquininas son de difícil acceso para el agricultor.

La comparación del desarrollo de un fruto partenocárpico y un fruto con semillas del cv. 'Algerie' revela el menor peso final que alcanza el primero respecto del segundo (Fig. 4) indicando la dependencia que tiene el peso final con la capacidad de absorción de agua determinada por la capacidad sumidero del fruto. Dado que ésta depende de un control hormonal y la diferencia crucial entre ambos tipos de fruto es la presencia de semillas, es en éstas en las que queda demostrado, al menos indirectamente, que radica la capacidad hormonal del desarrollo del fruto.



**Figura 3: Desarrollo de un fruto partenocárpico de níspero japonés cv. 'Algerie' en comparación con un fruto con semillas. Cada valor es la media de 10 frutos y 5 árboles. Las barras verticales indican el error estándar.**

El desarrollo del fruto de níspero depende de la capacidad sumidero que las semillas le confieren. De este modo, la ausencia de semillas dificulta su desarrollo por lo que el fruto alcanza un tamaño final muy inferior al que alcanza de modo habitual.

Por ello, la aplicación de auxinas de síntesis para mejorar el desarrollo de los frutos sin semillas, a través de un estímulo de su capacidad sumidero, tiene un efecto positivo. De esta manera, los frutos partenocárpicos tratados con  $25 \text{ mg l}^{-1}$  de 2,4-D al inicio de la fase II de crecimiento del fruto, consigue aumentar el tamaño final del fruto hasta en un 25%. Sin embargo, el aclareo manual de frutos en el estado 701 BBCH no mejora la respuesta. La ausencia de capacidad sumidero, a pesar de la reducción de la competencia o la competencia establecida con frutos con semillas del mismo árbol, debe ser la principal razón.



## **5. Objetivo**

El objetivo de este trabajo, por tanto, es estudiar el efecto de la aplicación de una auxina de síntesis (3, 5, 6-TPA) y del rayado de ramas en el estado 703 de la escala BBCH a frutos partenocárpicos de níspero japonés, en su desarrollo y maduración, bajo un punto de vista nutricional y hormonal.

## II. MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. Ubicación y material vegetal

El experimento se realizó en árboles jóvenes de aproximadamente 10-12 años de edad del cv. Algerie de níspero japonés (*Eriobotrya japonica* Lindl.) injertados sobre patrón franco y localizados en una parcela de la Ciudad Politécnica de la Innovación de la Universitat Politècnica de València, (39°28' N, 00° 20'W) (Foto 1), los árboles estaban bajo riego localizado y en perfectas condiciones fitosanitarias.



**Fotografía 1: Ubicación de la parcela experimental de árboles de níspero japonés en la Ciudad Politécnica de la Innovación de la Universitat Politècnica de València**

### 2. Tratamientos

Se seleccionaron 13 panículas completamente al azar repartidas en 3 árboles a las que se les dejó entre 3 y 4 flores que se emascularon en estado de botón floral (505 BBCH) y se trataron inmediatamente después con GA<sub>3</sub> (10 ppm).

Posteriormente, una vez cuajados los frutos partenocárpicamente, a 25 de ellos, se les aplicó ácido 3,5,6-tricloro-2-piridiloxiacético, ácido libre, (3, 5, 6-TPA) cuando los frutos tenían aproximadamente el 30% de su tamaño (estado 703 de la escala BBCH); a otros 25 se les rayaron las ramas secundarias sobre las que habían fructificado en el mismo estado y otros 25 se dejaron como control partenocárpico. Adicionalmente se seleccionaron 25 frutos con semillas y, por tanto, con cuajado sexual o natural a los que les repitieron los tratamientos anteriores. Los tratamientos realizados se resumen a continuación:

<b>Cuajado sexual</b>	<b>Cuajado asexual (Emas+GA<sub>3</sub>)</b>
Control semillas	Control partenocárpico
Rayado en 703 BBCH	Rayado en 703 BBCH
3, 5, 6-TPA en 703 BBCH	3, 5, 6-TPA

**Tabla 1: Tratamientos realizados**

Se siguió la evolución del diámetro de cada uno de ellos hasta su maduración con ayuda de un pie de rey y se determinaron los parámetros de maduración externa e interna, sólidos solubles totales (SST) y acidez. Para los SST se utilizó un refractómetro digital (Atago, Tokyo).

Para determinar el color, se determinaron las coordenadas Hunter (a, b y L), utilizando un colorímetro Minolta Chroma Meter CR-300 (Minolta, Tokyo). En el caso de la acidez, se valoró con una solución de NaOH 0,1 N, utilizando fenolftaleína como indicador.

Paralelamente se tomaron muestras de frutos de todos los tratamientos a lo largo de su crecimiento (505, 703 y 706BBCH) y en el momento de su maduración (809 BBCH) que se congelaron inmediatamente con nitrógeno líquido para la determinación de carbohidratos y hormonas.

### **3. VARIABLES ANALIZADAS**

#### **3.1 Análisis hormonal**

Para el análisis, se prepararon alícuotas de 50 mg de cada muestra. Dichas muestras 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- 2H]-GAn, [2H5]-IAA y [2H6]-ABA). Estos estándares fueron añadidos para la cuantificación de cada una de las diferentes giberelinas (GAn), ácido indolacético (AIA) y ácido abscísico (ABA). En el caso de la citouinina más importante, la transzeatina (tZ), 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 CH<sub>3</sub>CN80: 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 acetronilo 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 14 curvas de calibración realizadas previamente. La interpretación de los resultados se realizó mediante los programas Xcalibur 2.2 SP1 y TraceFinder.

### **3.2. Análisis de azúcares solubles**

Para el análisis de azúcares solubles se siguió el protocolo de Esghi et al. (2007) con algunas modificaciones. Una vez obtenido el polvo fino de las muestras liofilizadas, se tomaron alícuotas de 100 mg de cada muestra y se introdujeron en tubos correctamente etiquetados. En dichos tubos se introdujeron 5 ml de Petroleum ether (40-60º) con el objetivo de limpiar de impurezas la muestra. Los tubos fueron centrifugados a 4000 rpm, 4º C durante 6 minutos, y el extracto obtenido de Petroleum con contenidos de lípidos, clorofilas y otros contaminantes, fue eliminado mediante el uso de pipetas. A la muestra sobrante se le añadió 100 μl de manitol, un azúcar no presente en los tejidos vegetales y que se utiliza como estándar para cuantificar las pérdidas a lo largo del proceso de extracción de los azúcares solubles. Posteriormente se realizaron dos extracciones con etanol al 80% (v/v), se mantuvieron en un baño a 65ºC durante 20 min y se centrifugaron a 4000 rpm, 4ºC durante 10 minutos, y se juntaron ambos sobrenadantes que se llevaron a Speed Vac Concentrator (Savantt®).

Para la inyección de las muestras en un equipo de HPLC (Thermo Electron Corporation) se diluyeron las muestras en 100 μl de agua Mili-Q. El equipo dispone de una columna APS-2 hypersil (250 x 4,6 mm, Thermo Electron Corporation) y con un detector de Índice de

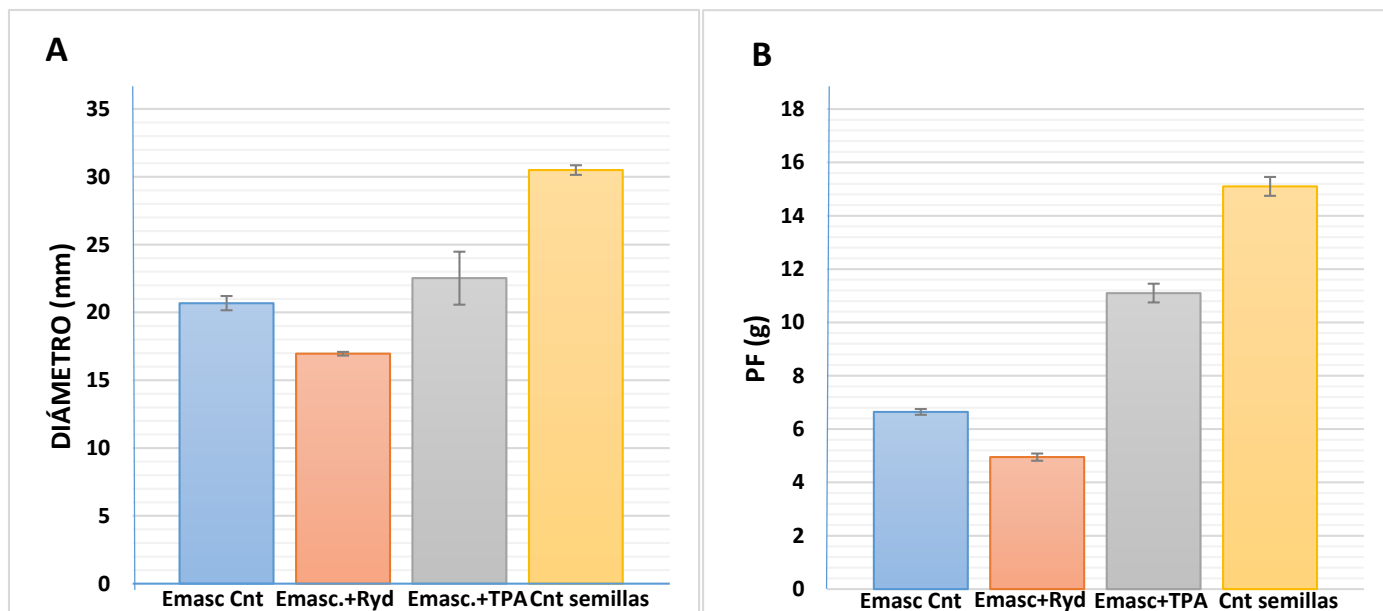
Refracción. Los azúcares fueron identificados y cuantificados según los tiempos de retención y las curvas de calibración realizadas previamente con las diferentes concentraciones de azúcares estándar. Cada muestra fue extraída por duplicado e inyectada dos veces. Los resultados se expresaron como  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  de peso seco.

### **3.3 Análisis estadístico**

El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante un análisis simple de la varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95%.

### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 1. Influencia del rayado de ramas y de la aplicación de 3, 5, 6-TPA en el desarrollo y maduración de los frutos partenocárpicos



**Figura 4: Influencia del rayado de ramas y la aplicación de 3, 5, 6-TPA en el diámetro (A) y el peso fresco de los frutos partenocárpicos de níspero japonés obtenidos mediante la emasculación en botón floral y aplicación de GA<sub>3</sub>. Cada valor es la media de 4 frutos. Las barras verticales indican el error estándar. Los tratamientos se realizaron en el estado 703 BBCH.**

La aplicación de 3, 5, 6-TPA a frutos partenocárpicos de níspero japonés, es decir, emasculados y tratados con GA<sub>3</sub>, consiguió aumentar su diámetro (22'6 mm) respecto de su control (20,7 mm), pero sin alcanzar la significación estadística (Figura 4A). El rayado de ramas, sin embargo, no se mostró eficaz en este tipo de frutos y el diámetro de estos fue hasta 3,8 mm menor que el control. La razón de esto fue que el rayado se realizó en una rama secundaria sobre la cual se encontraban frutos partenocárpicos y frutos con semillas que por su mayor capacidad sumidero compitieron notablemente con los primeros haciendo que se perdiera su efecto. Por la misma razón, el peso final que alcanzaron los frutos partenocárpicos rayados fue significativamente menor (4'9 g) que el de los tratados con TPA y control que alcanzaron 11'1 g y 6'7 g, respectivamente (Figura 4B). En este caso, sí que hubo diferencias significativas entre los tratados con TPA y el control a diferencia de lo encontrado con el diámetro. A pesar de ello, tanto el diámetro (30'5 mm) como el peso (15'1 g) siempre fue significativamente superior en los frutos con semillas que en los partenocárpicos, independientemente de la técnica utilizada (Figura 4A y 4B). Estos resultados apoyan la idea de la ineffectividad del rayado en frutos partenocárpicos cuando éstos compiten con frutos de cuajado sexual y, por tanto, embriones en desarrollo. En efecto, los frutos con semilla poseen una mayor capacidad sumidero que les permite alcanzar mayores valores de diámetro y peso fresco (Gómez-Martínez, 2014).

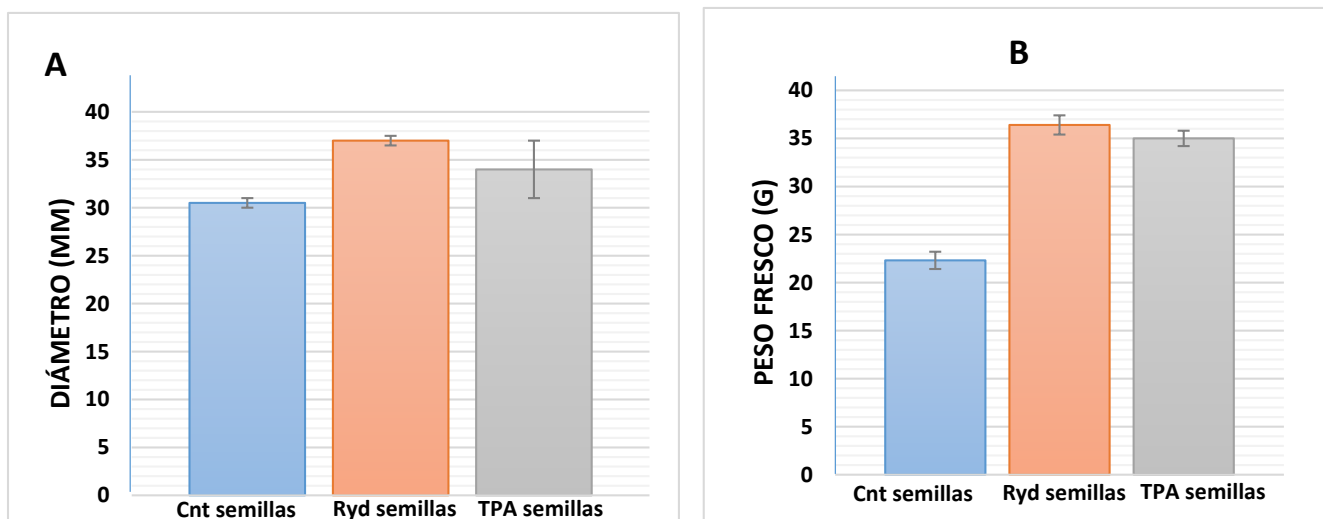


Figura 5: Influencia del rayado de ramas y la aplicación de 3, 5, 6-TPA en el diámetro (A) y el peso fresco de los frutos con semillas de níspero japonés obtenidos. Cada valor es la media de 4 frutos. Las barras verticales indican el error estándar. Los tratamientos se realizaron en el estado 703 BBCH.

No obstante, cuando el rayado se hizo a ramas con todos los frutos con semillas, esta técnica fue eficaz y aumentó significativamente tanto el diámetro (37 mm) como el peso (36.4 g) respecto del control (frutos con semillas) que fue 30.5 mm y 22.3 g (Figura 5A y 5B). De hecho, en este caso mejoró la respuesta respecto a la aplicación de 3, 5, 6-TPA que tan solo aumentó 4 mm y 1.7 g, el diámetro y el peso del fruto, respectivamente, con respecto al control.

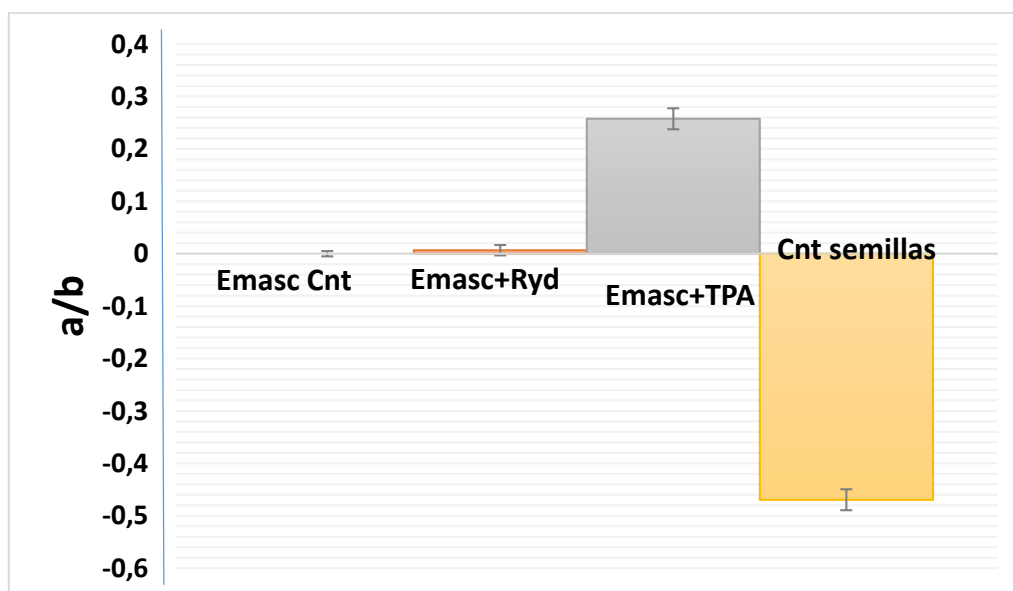


Figura 6: Influencia del rayado de ramas y la aplicación de 3, 5, 6-TPA en la relación a/b de las coordenadas Hunter de los frutos partenocárpico de níspero japonés obtenidos mediante la emasculación en botón floral y aplicación de GA<sub>3</sub>. Cada valor es la media de 4 frutos. Las barras verticales indican el error estándar. Los tratamientos se realizaron en el estado 703 BBCH.

Cabe destacar, que los frutos partenocárpicos maduraron el 16 de abril mientras que los frutos control con semilla lo hicieron alrededor de 15 días más tarde.

Los tratamientos realizados también afectaron a la maduración de los frutos partenocárpicos. Así, en el momento de la recolección, los frutos tratados con 3, 5, 6-TPA presentaron mejor coloración expresada mediante la relación de las coordenadas a y b de Hunter (0'26) que los frutos rayados o control que fue prácticamente entorno al 0 (Figura 6). Coherentemente a lo observado anteriormente, estos frutos ausentes de semilla, es decir, partenocárpicos, fueron también los que mejor tamaño alcanzaron (Diámetro: 22'6 mm; Peso fresco: 11'1 g) seguidos del control y de los que se rayaron en el estado 703 de la BBCH.

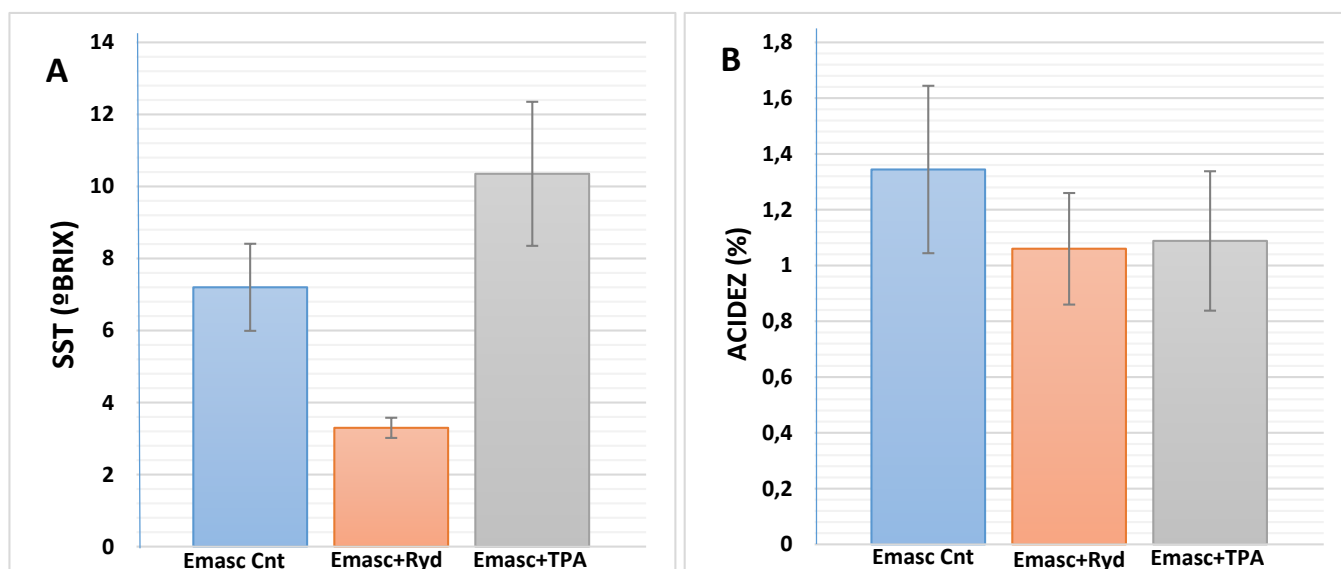
A la vista de estos resultados parece que el efecto de la auxina en el color del fruto sea indirectamente a través del aumento del tamaño del fruto, es decir, acelerando su desarrollo y por tanto, anticipando la entrada en color como se ha visto en otros frutales como cítricos (Furr et al, 1995), cerezos y ciruelos (Agustí *et al*, 1997), y melocotoneros y nectarinos (Agustí,*et al*, 1998) e incluso en níspero japonés (Agustí *et al*, 2005) pero con frutos con semillas.

El hecho de que el color de los frutos con semillas sea significativamente más bajo (a/b: -0'47) en el momento en que los frutos partenocárpicos ya habían cambiado de color, independientemente del tratamiento, así lo confirma (Figura 6). Es más, cuando se recolectaron todos los frutos partenocárpicos, los que tenían semillas estaban verdes y su recolección se pospuso 18 días después. El hecho de que los controles partenocárpicos recolectaran al mismo tiempo que los tratados con 3, 5, 6-TPA y los rayados y antes que los controles con semillas (Figura 6) no le atribuye a la auxina el efecto directo sobre la maduración de estos frutos sino más bien a la ausencia de semillas.

De acuerdo con Gambetta (2009) la aplicación de auxinas de síntesis en cítricos provoca un retraso en la senescencia y la abscisión de frutos, lo que confirma que la hormona en el caso del níspero japonés sea la responsable del adelanto en la maduración, sino de la ausencia de semilla que anticipa el desarrollo y por tanto la maduración de frutos partenocárpicos.

Como consecuencia de ello, los frutos partenocárpicos cambiaron antes de color y por tanto, se recolectaron 18 días antes que lo hicieron los frutos con semillas sin encontrarse diferencias significativas entre los 3 tipos de frutos partenocárpicos, esto es, entre los controles, los rayados o los tratados con 3, 5, 6-TPA.





**Figura 7: Influencia del rayado de ramas y la aplicación de 3, 5, 6-TPA en la concentración de sólidos solubles totales (SST) (A) y la acidez (B) de los frutos partenocárpicos de níspero japonés obtenidos mediante la emasculación en botón floral y aplicación de GA<sub>3</sub>. Cada valor es la media de 4 frutos. Las barras verticales indican el error estándar. Los tratamientos se realizaron en el estado 703 BBCH.**

No obstante, estos tratamientos sí que afectaron a los parámetros de maduración interna. Así, los tratados con 3, 5, 6-TPA presentaron en el momento de la recolección mayor concentración de sólidos solubles totales (SST) (10'3º Brix) que los rayados y el control que fue de (3'3º Brix) y (7'2º Brix), respectivamente (Figura 7A). La acidez, por el contrario, fue menor en los primeros (1%) que en los segundos que fue del (1'3%) en término medio (Figura 7B).

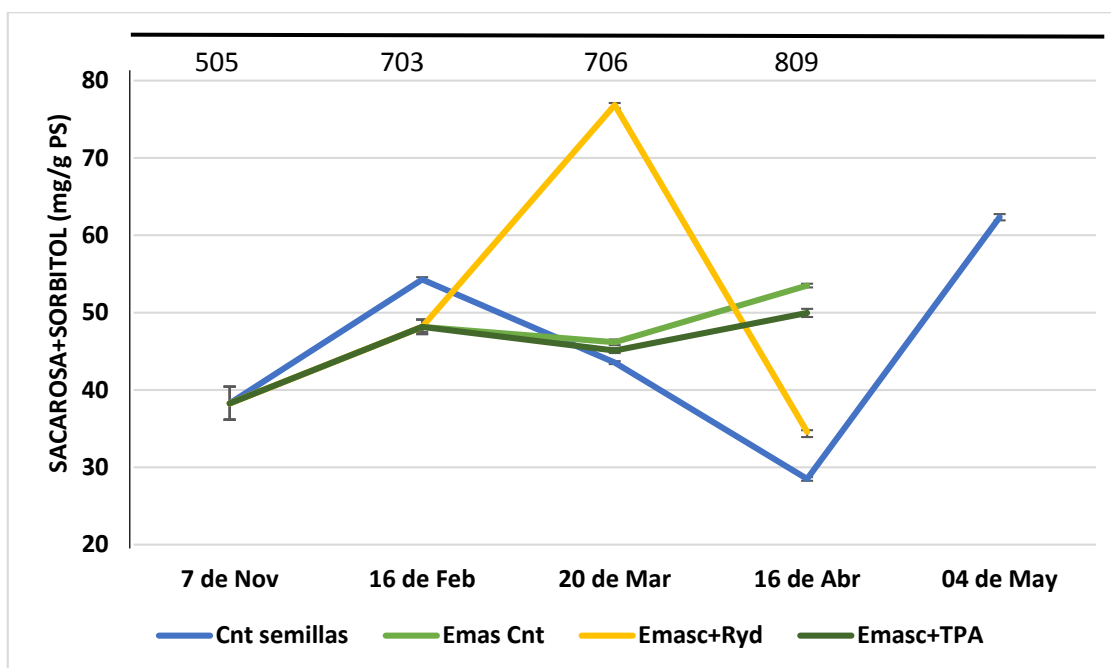
Estos resultados están en coherencia con los encontrados en el tamaño y la coloración, de manera que los frutos partenocárpicos tratados con la auxina obtuvieron el mayor tamaño en cuanto a diámetro y peso (Figura 4), el color más intenso (Figura 6) y una anticipación de la maduración interna (Figura 7). Esta mejora en la calidad del fruto partenocárpico por acción de la auxina permitió consumirlos en el momento de la maduración a diferencia de los conseguidos por otros autores (Mesejo et al; 2010).

Es más, al compararlos con los frutos que tenían semillas, los partenocárpicos presentaron la misma acidez y una concentración mayor de SST (+ 2'3º Brix). En este sentido, la auxina consiguió disminuir la acidez hasta valores idénticos al control con semilla que se consume con normalidad y aumentar hasta 2º Brix su concentración en SST.

Algo parecido ocurrió cuando el 3, 5, 6-TPA se aplicó a frutos cuajados sexualmente y, por tanto, con semillas, cuando estos tenían aproximadamente el 30% de su tamaño final. También en este caso, la auxina aumentó el tamaño y la concentración de SST, disminuyó la acidez y no modificó el color.

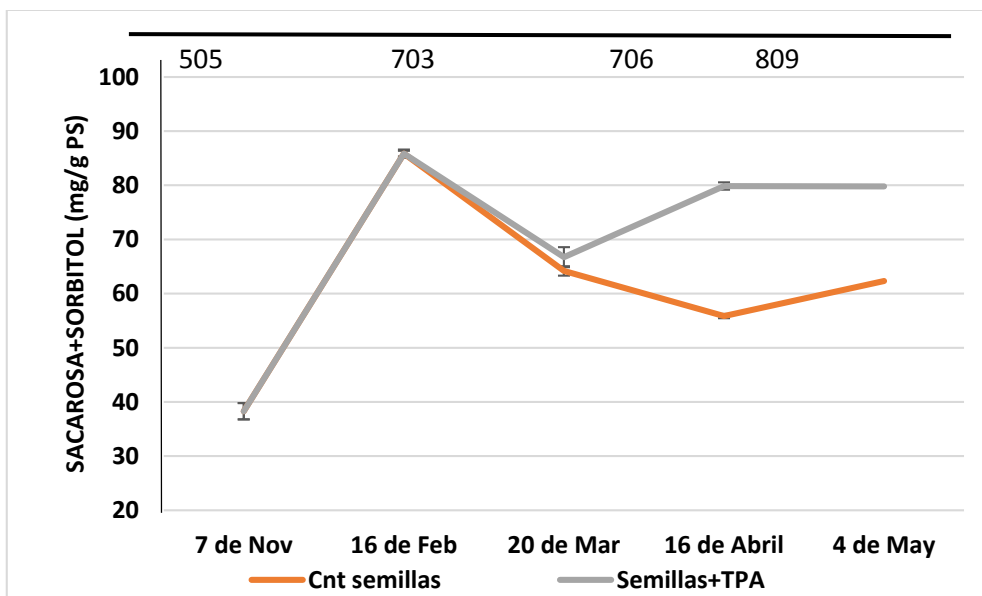
Esto a su vez coincide con lo obtenido por Agustí et al (2003) en esta misma especie con el 2, 4-DP.

## 2- Influencia del rayado de ramas y la aplicación de 3, 5, 6-TPA en el balance nutricional de frutos partenocárpicos



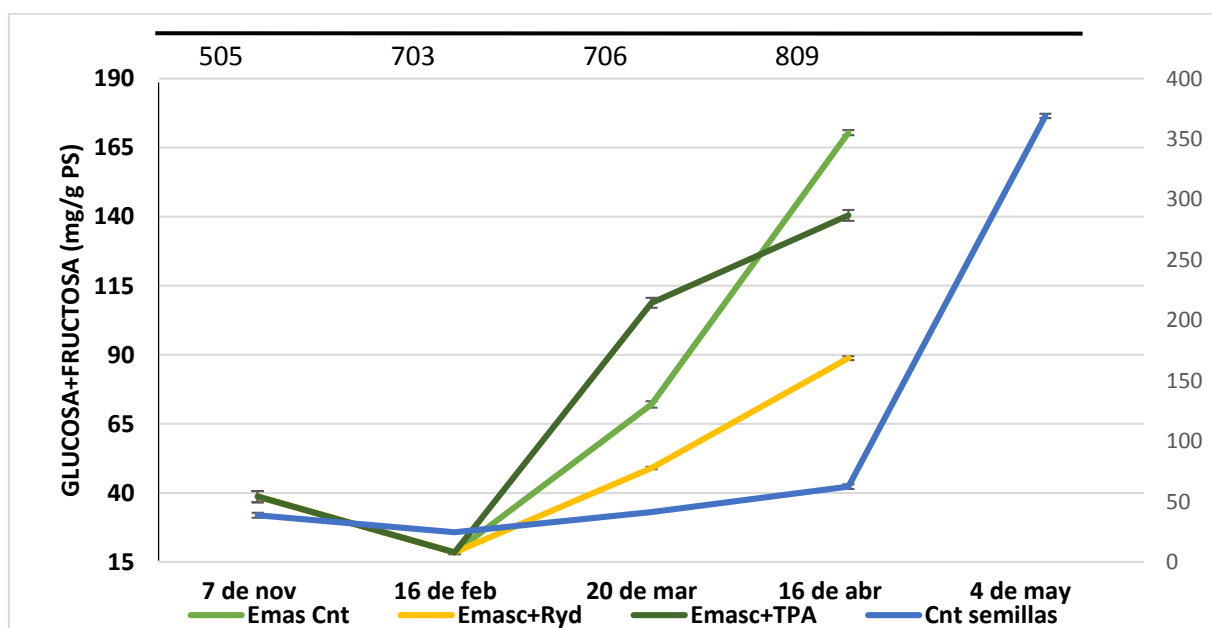
**Figura 8:** Influencia del rayado de ramas y la aplicación de 3, 5, 6-TPA en la concentración de azúcares de transporte en los frutos partenocárpicos de níspero japonés obtenidos mediante la emasculación en botón floral y aplicación de GA<sub>3</sub>. Cada valor es la media de 3 frutos. Las barras verticales indican el error estándar. Los tratamientos se realizaron en el estado 703 BBCH.

El rayado de ramas y la aplicación del 3, 5, 6-TPA también alteraron el metabolismo de los carbohidratos en los frutos partenocárpicos. Así, mientras en los primeros la concentración de azúcares del transporte (sacarosa+sorbitol) aumentó significativamente durante el crecimiento, es decir, desde el momento del cuajado hasta que el fruto había alcanzado prácticamente su tamaño final, en los segundos, al igual que en el control se mantuvo prácticamente constante (Figura 8). Es más, mientras en el control y en los tratados con 3, 5, 6-TPA la concentración de sacarosa+sorbitol aumentó ligeramente en las últimas fases del desarrollo hasta su maduración en 51'5 mg/g ms de promedio, en los rayados, por el contrario, descendió drásticamente desde 76'8 mg/g ms hasta 34'5 mg/g ms (Figura 8).



**Figura 9:** Influencia del rayado de ramas y la aplicación de 3, 5, 6-TPA en la concentración de azúcares de transporte en los frutos con semillas de níspero. Cada valor es la media de 3 frutos. Las barras verticales indican el error estándar. Los tratamientos se realizaron en el estado 703 BBCH.

El comportamiento de los frutos con semillas fue completamente diferente. En este caso, la concentración de azúcares de transporte aumentó en las primeras fases de desarrollo del fruto hasta 54'2 mg/g ms, descendiendo a continuación progresivamente hasta el final del crecimiento del fruto con valores mínimos (28'5 mg/g ms) y aumentando significativamente después hasta valores máximos de 65 mg/g de ms en el momento de la maduración (Figura 8).

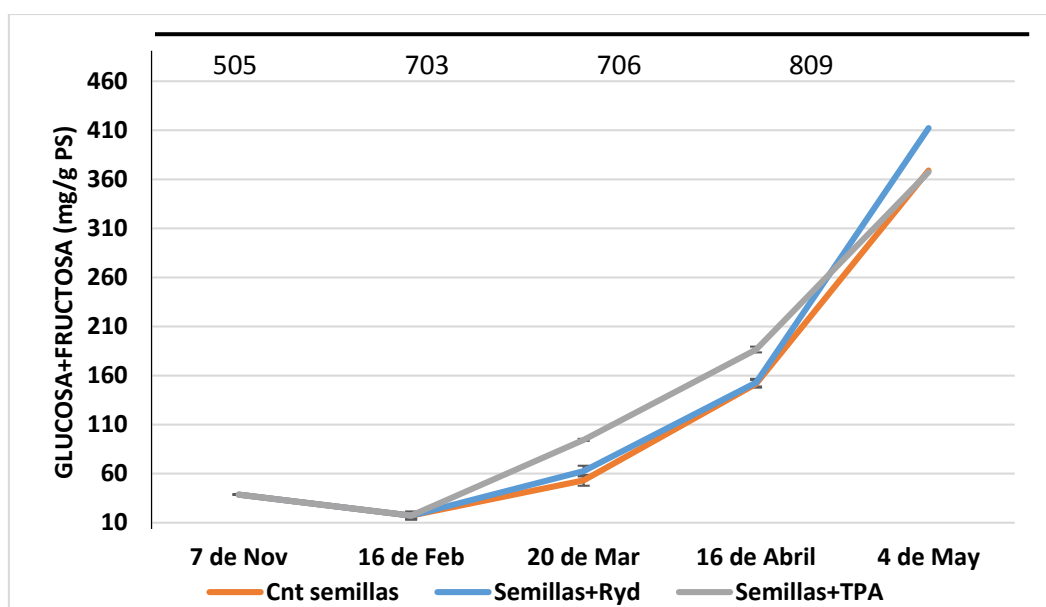


**Figura 10:** Influencia del rayado de ramas y la aplicación de 3, 5, 6-TPA en la concentración de azúcares de transporte en los frutos partenocárpico de níspero japonés obtenidos mediante

la emasculación en botón floral y aplicación de GA<sub>3</sub>. Cada valor es la media de 3 frutos. Las barras verticales indican el error estándar. Los tratamientos se realizaron en el estado 703 BBCH.

En cuanto a los azúcares reductores (glucosa+fructosa), los frutos partenocárpicos tratados con 3, 5, 6-TPA presentaron de nuevo la misma tendencia que el control, disminuyendo ligeramente su concentración desde el momento del cuajado (38'6 mg/g ps) descendiendo ligeramente a continuación hasta los 18'47 mg/g ms, para aumentar su concentración progresivamente durante el desarrollo hasta la maduración alcanzando valores de 140'4 mg/mg ms, inferiores al control 170'4 mg/g ms (Figura 10).

En este caso, también el rayado mostró una evolución del contenido en glucosa+fructosa similar al resto de tratamientos aunque el aumento fue menor y por tanto en el momento de la maduración la concentración de estos azúcares fue un 43% menor a la de los anteriores (Figura 9).



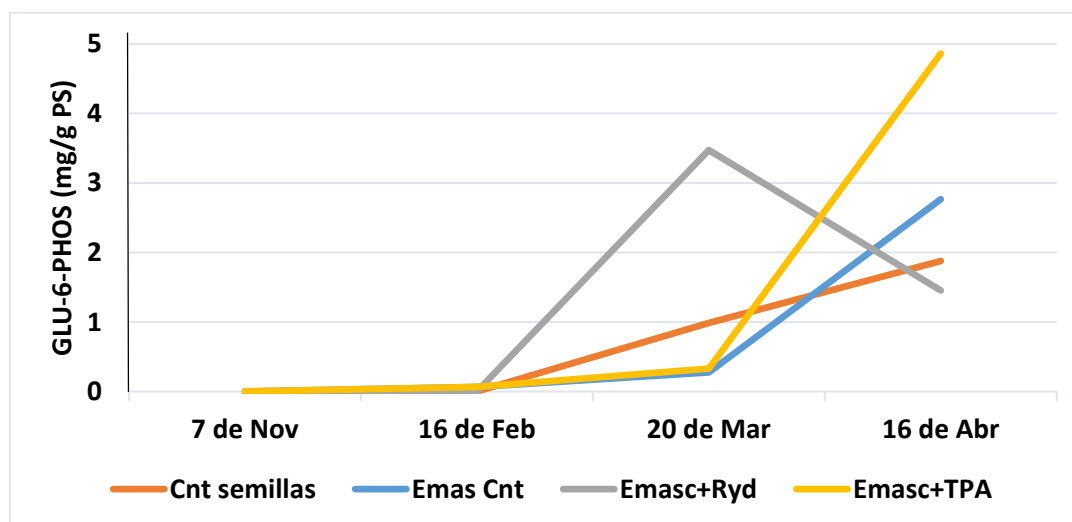
**Figura 11: Influencia del rayado de ramas y la aplicación de 3, 5, 6-TPA en la concentración de azúcares reductores en los frutos con semillas de níspero. Cada valor es la media de 3 frutos. Las barras verticales indican el error estándar. Los tratamientos se realizaron en el estado 703 BBCH.**

A pesar de ello, la concentración de glucosa y fructosa fue significativamente superior en los frutos maduros con semillas (369 mg/g ms) que en los partenocárpicos que (132'6 mg/g ms por término medio), independientemente de si se rayaron, se trataron con 3, 5, 6-TPA o no (Figura 10).

El aumento gradual de la concentración de glucosa y fructosa durante el crecimiento y maduración de los frutos partenocárpicos tratados con 3, 5, 6-TPA y control, fue paralelo a los valores prácticamente estables de sacarosa y sorbitol en este mismo periodo, indicando una hidrólisis de la primera y, por tanto, un consumo de energía.

Sin embargo, la concentración de los azúcares de transporte aumentó espectacularmente en un 158% en los frutos partenocárpicos rayados a los 32 días después del tratamiento mientras que apenas lo hicieron los azúcares reductores durante las primeras fases del desarrollo del fruto, eso es, desde el momento del cuajado hasta que estos alcanzaron el 60% de su tamaño final. (Figura 8 y 10).

No obstante, en las últimas fases del crecimiento y hasta el momento de la maduración, la tendencia fue opuesta y mientras la concentración de sacarosa y sorbitol descendió drásticamente hasta valores mínimos de 34'5 mg/g ms, la de glucosa y fructosa aumentó hasta valores máximos de 88'7 mg/g ms.



**Figura 12: Influencia del rayado de ramas y la aplicación de 3, 5, 6-TPA en la concentración de G-6-fosfato en los frutos partenocárpicos de níspero japonés obtenidos mediante la emasculación en botón floral y aplicación de GA<sub>3</sub>. Cada valor es la media de 3 frutos. Las barras verticales indican el error estándar. Los tratamientos se realizaron en el estado 703 BBCH.**

Esto indica un mayor consumo de carbohidratos en las últimas fases del desarrollo de este fruto, es decir, desde el estado 706 BBCH hasta la maduración, como se refleja en la evolución de la G-6-fosfato (Figura 12).

Merece la pena destacar el efecto inmediato del rayado en la movilización de los azúcares puesto que el aislamiento temporal de los frutos del resto del brote aumentó espectacularmente el contenido de sacarosa+sorbitol hasta un 158% (Figura 8).

Por otra parte, el efecto de la auxina (3, 5, 6-TPA) en el metabolismo de los carbohidratos demuestra que su mecanismo de acción es diferente ya que se encontraron diferencias significativas con respecto al control tanto en el contenido en azúcares de transporte como en el de azúcares de consumo inmediato a los 35 días del tratamiento. (Figura 8 y 10)

Por otra parte, el menor contenido de carbohidratos, tanto de transporte como reductores en los frutos con semilla respecto de los partenocárpicos durante todo el periodo de crecimiento, es decir, desde el cuajado hasta el cambio de color, refleja la importancia de las semillas y, por tanto, de la mayor capacidad sumidero, en el reparto de carbohidratos a su favor estableciendo una relación directa con el mayor tamaño adquirido.

### **3. Influencia del rayado de ramas y de la aplicación de 3, 5,6 –tpa a frutos partenocárpicos de níspero japonés en su crecimiento y maduración**

El balance hormonal de los frutos durante su crecimiento también se vio alterado por efecto de los tratamientos. En los frutos con semillas, el contenido en GA<sub>9</sub> descendió al igual que el de su catabolito (GA<sub>51</sub>) durante el cuajado y las primeras fases del desarrollo, en un 62'8% y en un 61'54%, respectivamente. Este descenso se correspondió con el mantenimiento del nivel de GA<sub>4</sub>, lo cual indica que esta hormona activa está presente durante el proceso del cuajado de esta especie.

La GA<sub>1</sub> no fue detectada en nuestros análisis. Sin embargo, el descenso de su precursor GA<sub>20</sub> fue paralelo un aumento significativo de su catabolito GA<sub>29</sub>, hasta 4 veces, lo cual justifica la ausencia de la GA<sub>1</sub> en este proceso y sugiere que la ruta de la 13-hidroxilación de las giberelinas es meramente catabólica. Estos resultados coinciden con los vistos por Gómez-Martínez (2014) en esta misma especie, en los que los niveles de GA<sub>4</sub> aumentaron significativamente durante el proceso del cuajado mientras que los de GA<sub>1</sub> se mantuvieron estables y en niveles bajos.

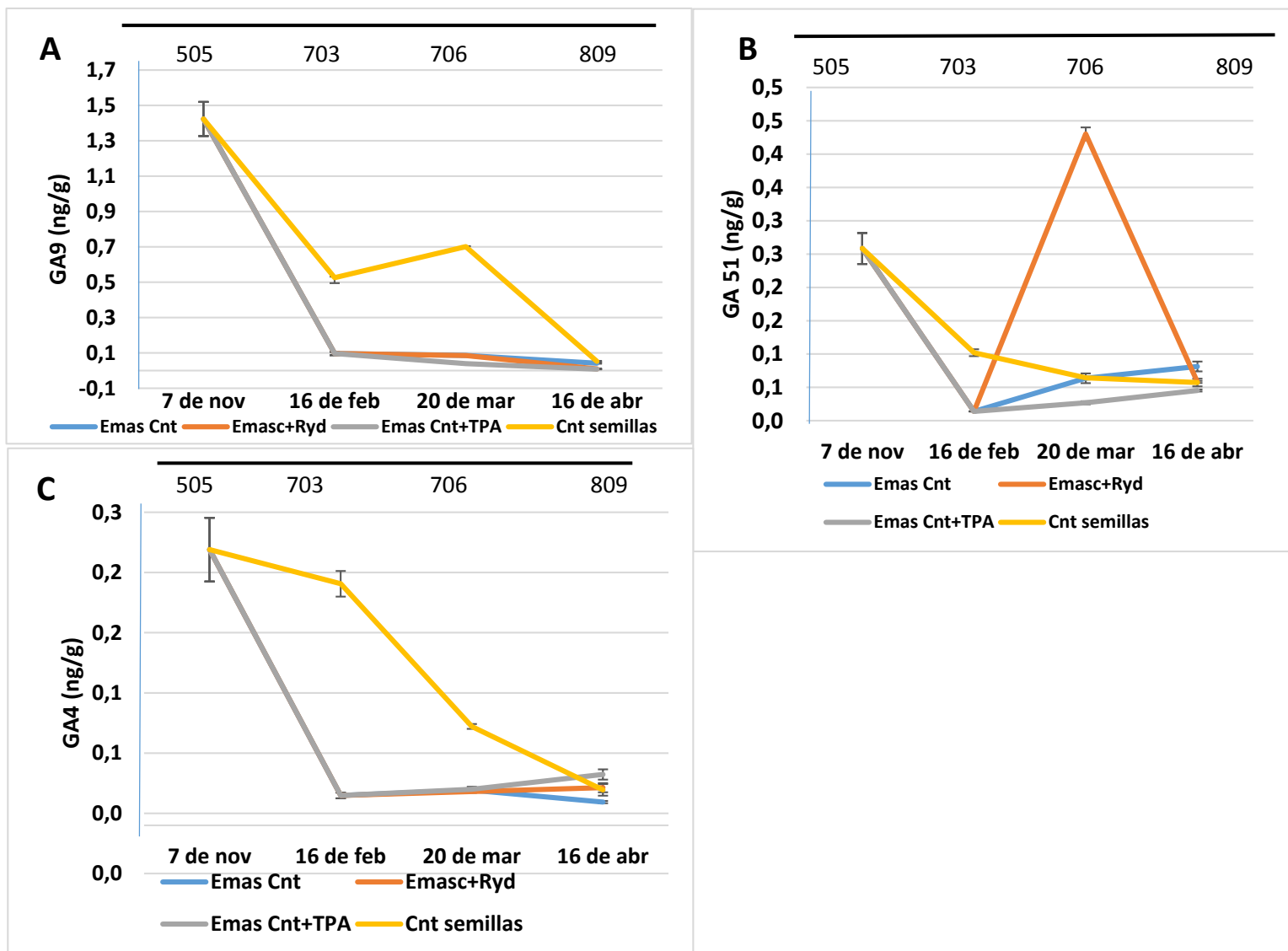


Figura 13: Influencia del rayado de ramas y la aplicación de 3, 5, 6-TPA en el contenido de GA<sub>9</sub> (A), GA<sub>51</sub> (B) y GA<sub>4</sub> (C) de los frutos partenocárpicos de nispero japonés obtenidos mediante la emasculación en botón floral y aplicación de GA<sub>3</sub>. Cada valor es la media de 4 frutos. Las barras verticales indican el error estándar. Los tratamientos se realizaron en el estado 703 BBCH.

La tendencia de la giberelinas de la ruta de la no hidroxilación en los frutos partenocárpicos fue similar a la de los frutos con semillas excepto para la GA<sub>4</sub> que fue divergente. En este caso, mientras en los primeros descendió significativamente hasta valores prácticamente nulos en los segundos se acumuló. Esto indica que a diferencia de los frutos con semilla, los partenocárpicos derivaron la síntesis de GA<sub>4</sub> a su catabolito (Figura 13). Merece la pena

destacar que la aplicación de ácido giberélico ( $GA_3$ ) aunque fue capaz de provocar el cuajado asexual en esta especie, no tiene un reflejo en la ruta de síntesis de las giberelinas.

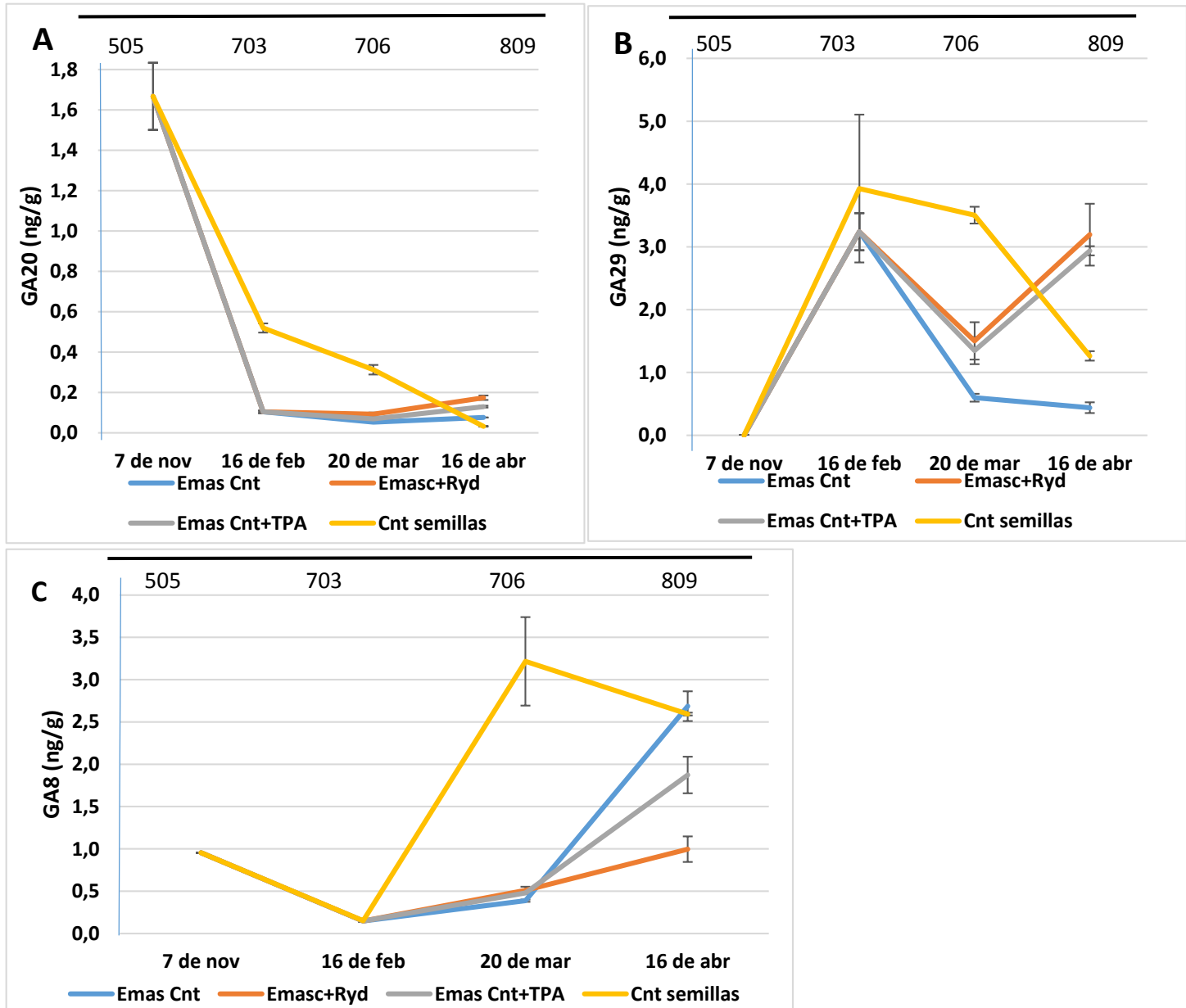


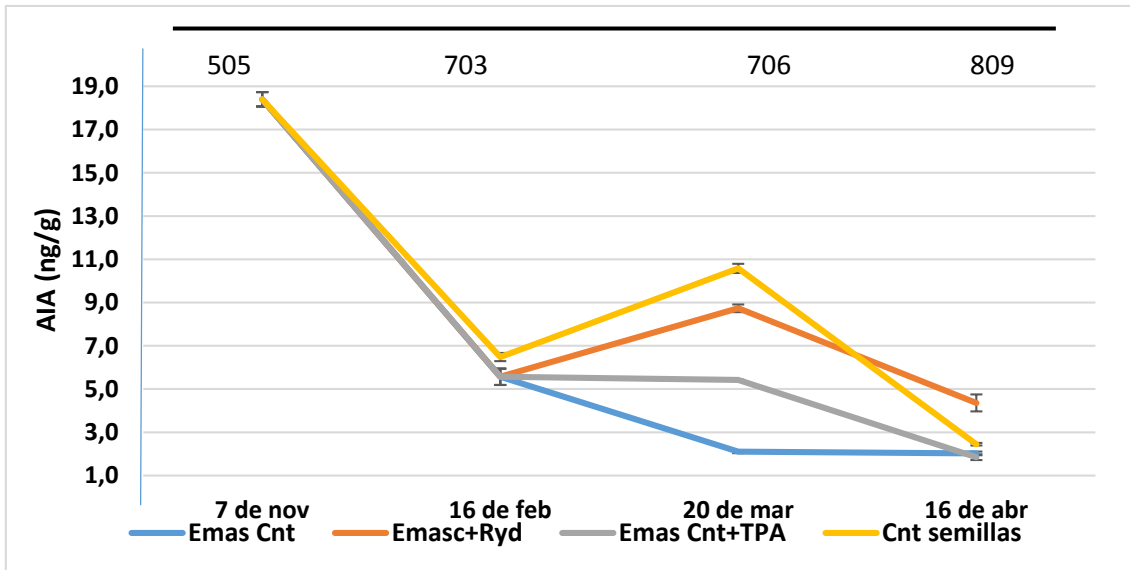
Figura 14: Influencia del rayado de ramas y la aplicación de 3, 5, 6-TPA en el contenido de GA<sub>20</sub>(A), GA<sub>29</sub> (B) Y GA<sub>8</sub> (C) de los frutos partenocárpicos de níspero japonés obtenidos mediante la emasculación en botón floral y aplicación de GA<sub>3</sub>. Cada valor es la media de 4 frutos. Las barras verticales indican el error estándar. Los tratamientos se realizaron en el estado 703 BBCH.



La tendencia de la síntesis de las giberelinas de la ruta de la 13-hidroxilación mostró tendencias iguales en ambos tipos de frutos, solo que en los partenocárpicos el contenido fue menor. Este comportamiento no es distinto de los observado en cultivares partenocárpicos del género *Citrus* en comparación con los que tienen semillas, e incluso entre especies partenocárpicas que difieren en su capacidad partenocárpica ((Talón *et al*, 1992; Bermejo *et al*, 2015)

El descenso progresivo en la concentración de las giberelinas de la ruta de la no hidroxilación en los frutos con semillas durante el crecimiento del fruto y su maduración, no les atribuyen un papel regulador de estos procesos. Algo semejante se observa en los frutos partenocárpicos en los cuales los valores se mantienen estables en torno a 0'1 ng/g ms para las tres hormonas relacionadas con esta ruta independientemente del tratamiento. Sin embargo, el aumento puntual del contenido en GA<sub>51</sub> de los frutos partenocárpicos rayados en las últimas fases de su desarrollo no se justifica con un descenso de su precursor (Figura 13).

Por el contrario, en la ruta de la 13-hidroxilación mientras el contenido en GA<sub>20</sub> descendió durante todo el desarrollo del fruto y hasta su maduración, el de su catabolito GA<sub>29</sub> descendió paralelamente al aumento de la GA<sub>8</sub> (catabolito de la GA<sub>1</sub>), independientemente del tipo de fruto. Este comportamiento indica que la acción de las giberelinas en estas fases del desarrollo del fruto es a través del catabolito de la giberelina activa (GA<sub>8</sub>). Aunque la tendencia en ambos tipos de frutos fue idéntica el contenido de cada una de ellas fue significativamente superior en los frutos con semilla (Figura 14). Estos resultados serían coherentes con los del control hormonal del desarrollo del fruto de la mayoría de las especies en los que la fase lineal está regulada a través de la acción de las auxinas y coinciden con los encontrados por Molina Almela (2014) en esta misma especie.

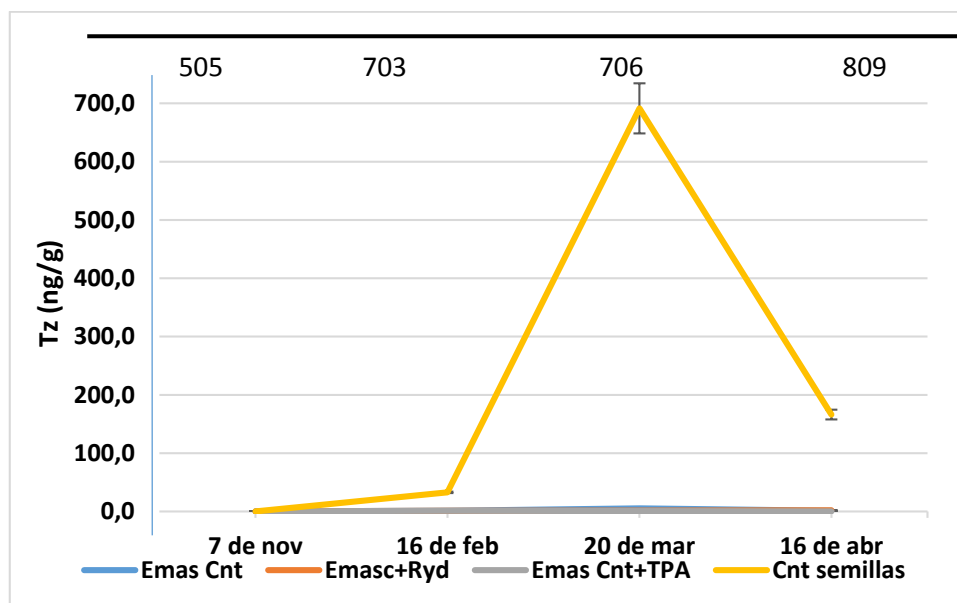


**Figura 15: Influencia del rayado de ramas y la aplicación de 3, 5, 6-TPA en el contenido de AIA de los frutos partenocárpicos de níspero japonés obtenidos mediante la emasculación en botón floral y aplicación de GA<sub>3</sub>. Cada valor es la media de 4 frutos. Las barras verticales indican el error estándar. Los tratamientos se realizaron en el estado 703 BBCH.**

Por este motivo al estudiar la concentración de AIA a lo largo del crecimiento del fruto, se observó que mientras en los frutos que tenían semillas y los partenocárpicos rayados aumentó durante su desarrollo y hasta el cambio de color, en los tratados con 3, 5, 6-TPA y control se mantuvo estable en los primeros y descendió ligeramente en los segundos (Figura 15). Desde el cambio de color y hasta la maduración, la tendencia de todos los frutos, independientemente del tratamiento y de la presencia o ausencia de semillas, fue descendente hasta alcanzar valores medios 4 y 2'5 ng/g ms. El mayor contenido en AIA encontrado en los frutos con semillas durante su crecimiento coincide con el mayor diámetro alcanzado por estos frutos en el momento de la recolección.

Por otra parte, el mayor contenido de esta hormona en los frutos partenocárpicos tratados con 3, 5, 6-TPA (hasta 2 veces) respecto de su control también aumentó su diámetro en el momento de la recolección. Sin embargo, el mayor contenido de esta hormona en los emasculados rayados no se correspondió con un aumento del tamaño final de estos frutos. Estos resultados que coinciden con los observados por Molina Almela (2014) reflejan la acción que el AIA tiene en el control del crecimiento de este fruto. Por otra parte, su

descenso en etapas finales de su crecimiento parece necesario para que este fruto inicie su maduración.



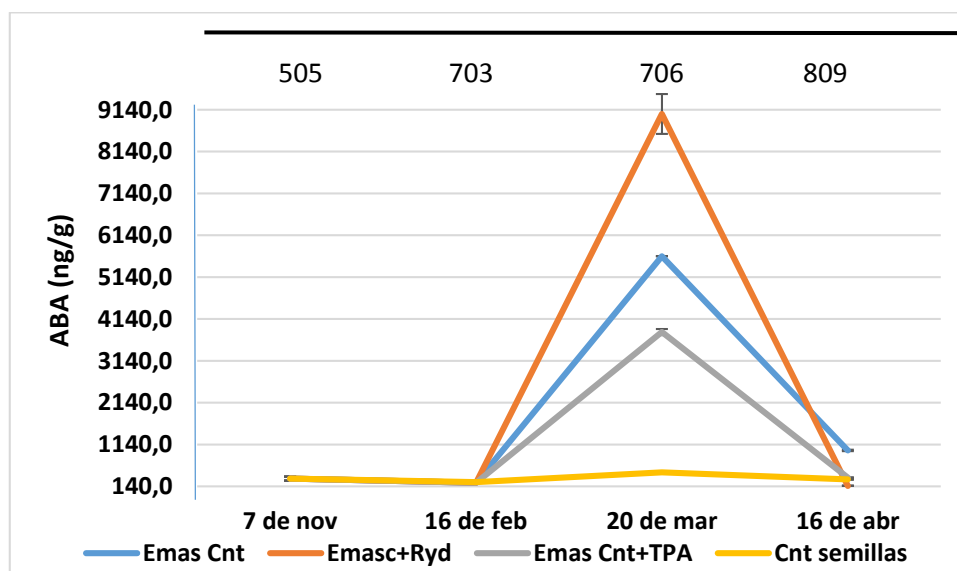
**Figura 16:** Influencia del rayado de ramas y la aplicación de 3, 5, 6-TPA en el contenido de Tz de los frutos partenocárpicos de níspero japonés obtenidos mediante la emasculación en botón floral y aplicación de GA<sub>3</sub>. Cada valor es la media de 4 frutos. Las barras verticales indican el error estándar. Los tratamientos se realizaron en el estado 703 BBCH.

Al estudiar la evolución de la concentración de la citoquinina más importante (Tz) se observó que en los frutos partenocárpicos, independientemente del tratamiento, los valores a lo largo del crecimiento del fruto y hasta su maduración se mantuvieron estables en torno a 1'5 ng/g ms. Los frutos con semillas, por el contrario, aumentaron significativamente su concentración hasta valores máximos de 700 ng/g ms cuando alcanzaron el 60% de su tamaño final, descendiendo significativamente 30 días después hasta 150 ng/g ms cuando completaron su desarrollo. (Figura 16)

El mayor contenido en esta hormona encontrado en los frutos con semilla durante el crecimiento del fruto, coincidió con el mayor diámetro alcanzado por éstos en el momento de la recolección (ver Figura 4A), sugiriendo un papel regulador de las citoquininas en la fase lineal de crecimiento de este fruto.

Por otra parte el brusco descenso del contenido de esta hormona en etapas próximas al cambio de color del fruto sugiere, al igual que lo observado con el AIA, que es necesario para

que el fruto inicie su maduración. De hecho, la aplicación de kinetina (30 ppm) en etapas próximas al cambio de color del fruto del níspero japonés retrasa su recolección en aproximadamente 15 días. (Lou *et al*,2012) (Figura 16)



**Figura 17: Influencia del rayado de ramas y la aplicación de 3, 5, 6-TPA en el contenido de ABA de los frutos partenocárpicos de níspero japonés obtenidos mediante la emasculación en botón floral y aplicación de GA<sub>3</sub>. Cada valor es la media de 4 frutos. Las barras verticales indican el error estándar. Los tratamientos se realizaron en el estado 703 BBCH.**

Los tratamientos también alteraron el contenido de ABA. Mientras en los frutos partenocárpicos se detectó un pico máximo de ABA, aproximadamente 30 días antes de su recolección, en los frutos con semillas se mantuvo prácticamente estable durante todo el periodo estudiado. Los valores encontrados en los frutos partenocárpicos difirieron significativamente con el tratamiento, 9140 ng/g ms para los rayados, seguido de 5640ng/g ms para los controles y 3828 ng/g ms tratados con 3, 5, 6-TPA, pero en todos ellos este pico máximo coincidió con el inicio del cambio de color (Figura 17). Es de destacar que los frutos partenocárpicos, independientemente del tratamiento, anticiparon su maduración respecto de los frutos con semillas. Esto coincide con lo observado en el aumento de la concentración de ABA y el descenso de la de Tz y AIA.

El papel del ABA en la coloración de los frutos, precede a la producción de etileno en los frutos climatéricos, y su inhibición retrasa el cambio de color y la firmeza del fruto (Leng *et*

*al.*, 2014). Por el contrario, en los no climatéricos su deficiencia puede causar retraso en diferentes procesos relacionados con la coloración (Romero et al., 2003). En el caso del níspero japonés, el papel del ABA en la coloración no está claro, ya que su presencia puede ser el resultado y no la causa del proceso, dado que el ABA es el último producto en la cadena biosintética de carotenoides, y puede acumularse al mismo tiempo que aumenta la concentración de carotenoides y, por tanto paralelamente a la coloración del fruto (Reig *et al.*, 2015). Por tanto, el papel del ABA en la maduración del níspero japonés es similar al encontrado para otros frutos no climatéricos, como los cítricos, y no hay evidencia de que sea el inductor del proceso de la coloración del fruto, o simplemente sea paralelo a éste (Jiang et al., 2013).

## 4. CONCLUSIONES

- La aplicación de 3, 5, 6-TPA a frutos emasculados consigue aumentar significativamente su peso final.
- La giberelina activa GA<sub>4</sub> podría regular las primeras fases de desarrollo del fruto del níspero japonés.
- Los frutos partenocárpicos adelantan su maduración respecto a los frutos con semillas.

## **BILIOGRAFÍA**

Agustí, M., Juan, M., Almela, V., Andreu, I. y Speroni, C. (1997). *Estímulo del desarrollo de los frutos de hueso*. Consellería de Agricultura, Pesca y Alimentación. Valencia, España.

Agustí, M., Andreu, I., Juan, M., Almela, V., y Zacarías, L. (1998). Effects of ringing branches on fruit size and maturity of peach and nectarine cultivars. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 73: 537-540.

Agustí, M; Gariglio, N; Castillo, A; Juan, M; Almela, V; Martínez-Fuentes, A; Mesejo, C. 2003. Effect of the synthetic auxin 2, 4-DP on fruit development of loquat

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

Agustí, M. 2010. Fruticultura. Ed. Mundiprensa

Badenes M.L, Martínez-Calvo J., Llácer G. 2000. Analysis of a germplasm collection of loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.).

Bermejo, A; Primo-Millo, E; Agustí, M; Mesejo, C; Reig, C y Iglesias, DJ. 2015. Hormonal profile in ovaries of mandarines varieties with differing reproductive behaviour. *Journal of Plant Growth Regulation* DOI 10.1007/s00344-015-9492-y

Cuevas, J., Gavilán, J. y Lorente N. 1997. Fenología del níspero japonés (cv. "Algerie") en la Costa de Almería. *Actas de Horticultura* 15:490-495.

Fos, M, Proaño K, Ellul, P. 2004. Papel de las auxinas y giberelinas en el cuajado y desarrollo de frutos con semillas y partenocárpicos pat-2 de tomate.

Furr, J.R., Reece, P.C. y Henciar G. (1945). Nitrogen absorption of ringed orange trees in sand culture. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, 46: 51-54.

Gavilán, J. 1998. Fenología del níspero japonés (*Eriobotrya japonica* Lindl.) cv. „Algerie“ en la Costa Occidental de Almería. Proyecto Fin Carrera, Universidad de Almería, España. 90 pp.

Gambetta, G. 2009. Control endógeno y exógeno de la maduración externa de los frutos cítricos.

Gómez-Martínez, H. 2014. Control hormonal y nutricional en el cuajado del níspero japonés (*Eriobotrya japonica* Lindl.)

Guo, Q.G.; Li, X.L.; Xing, W.W; He, Q; Liang, G.L. 2006. Occurrence of natural triploids in loquat. ISHS Acta Horticulturae 750: II International Symposium on Loquat

Jiang, Y.; Wu, K.; Lin, F.; Qu, Y.; Liu, X.; Zhang Q. 2013. Phosphatic acid integrates calcium signaling and microtubule dynamics into regulating ABA-induced stomatal closure in *Arabidopsis*. DOI 10.1007/s00425-013-1999-5

Leng, P.; Yaun, B.; Guo, Y.; Chen P. 2014. The role of abscisic acid in fruit ripening and responses to abiotic stress. Journal of Experimental Botany.

Lou, H; Chen, P; Zheng, H; Xu, C y Lu, H. 2012. Effect of kinetin on quality and harvest date of loquat fruit. African Journal of Agricultural Research Vol. 7(10), pp. 1577-1583

Mabberley, D. J. 2008. *The plant book*. Third edition.1021 pp. Cambridge University Press, Cambridge.

Martínez-Calvo J., Badenes M.L., Llácer G. Bleiholder H., Hack H., Meier U. 1999. Phenological growth stages of loquat tree. Annals of Applied Biology, 134: 353-357.



Mesejo, C.; Martínez-Fuentes, A.; Reig, C.; Agustí, M. 2007. The effective pollination peior in 'Clemenules mandarin, 'Owari' satsuma and 'Valencia' sweet orange. Plant science. Volume 173, Issue 2, pp223-230

Mesejo, C; Reig, C; Martínez-Fuentes, A; Agustí, M. 2010. Parthenocarpic fruit production in loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) by using gibberellic acid.

Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. 2013 *Anuario de estadística*, Madrid.

Molina Almela, L. 2014. Control hormonal del desarrollo del fruto fruto en el níspero japonés (*Eriobotrya japónica* Lindl.)

Romero, P.; Rodrigo, M.J.; Lafuente, L. 2003. Transcriptional regulation of the *Citrus sinensis* ABA-signalosome during fruit dehydration

Rohrer, J. R., Robertson, K. R., y Phipps, J. B. 1994: Floral morphology of Maloideae (Rosaceae) and its systematic relevance. Amer. J. Bot., 81: 574- 581.

Sadamatsu, M.; Keawladdagorn, V.; Ohara, K; Ohkawa, K.; Matsui, H. 2004. Induction of parthenocarpic fruit frowth with endogenous gibberellins of loquat. HIS Acta Horticulturae 653: IX International Symposium on Plant Bioregulators in Fruit Production

Talon, M.; Zacarias, L.; Primo-Millo, E. 1992. Gibberelins and parthenocarpic ability in developing ovaries of seedless mandarins. American Society of Plant Biologists

Yahata, S., Miwa, M., Ohara, H., Ohkawa, K., Matsui, H., 2006. Effect of application of gibberellins in combination with forchlorfenuron (CPPU) on induction of seedless fruit set and growth in triploid loquat. Acta Hortic., 727: 263'267.