

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



Influencia de la aplicación de las auxinas de síntesis 2,4-DP y 3,5,6-TPA durante la fase lineal del crecimiento del fruto en el tamaño final y maduración del níspero japonés (*Eriobotrya japonica* Lindl).

TRABAJO FINAL DE GRADO

ALUMNO: Diego Cabrera Vicente

TUTORA: Carmina Reig Valor

COTUTOR: Manuel Agustí Fonfría

Curso Académico 2014 – 2015

VALENCIA, 1 de Septiembre de 2015

TÍTULO: Influencia de la aplicación de las auxinas de síntesis 2,4-DP y 3,5,6-TPA durante la fase lineal del crecimiento del fruto en el tamaño final y maduración del níspero japonés (*Eriobotrya japonica* Lindl).

RESUMEN:

La aplicación de 2,4-DP (éster etilhexil del ácido 2,4-diclorofenoxipropiónico) y el 3,5,6-TPA (ácido 3,5,6-tricloro-2-piridiloxiacético), a una concentración de 35 y 15 mg l⁻¹, respectivamente, en la fase lineal del crecimiento del fruto anticipó la recolección de los frutos de níspero japonés cv. Algerie 7 días, aproximadamente, sin cambios apreciables en la composición interna y coloración de los frutos recolectados.

La aplicación de las dos auxinas de síntesis consiguió, también, aumentar el diámetro final del fruto hacia calibres comerciales de mayor calidad.

El análisis del contenido endógeno en carbohidratos de transporte y de consumo indica un incremento de la capacidad sumidero de los frutos tratados, cuyo contenido en sacarosa y fructosa fue significativamente superior al de los frutos control. Estos efectos están regulados hormonalmente de modo que los frutos tratados anticipan la síntesis de ácido abscísico y el descenso de su concentración de ácido indolacético y *t*-zeatina, lo que explica la anticipación de su maduración.

Palabras clave: Carbohidratos, Fitorreguladores, Desarrollo del fruto, Tamaño del fruto, Maduración.

TITLE: The effect of the synthetic auxins 2,4-DP and 3,5,6-TPA applied during the linear fruit growth stage on fruit size and ripening of loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl).

SUMMARY:

The synthetic auxins 2,4-DP (ethyl hexyl ester of 2,4-dichlorophenoxypropionic acid) and 3,5,6-TPA (3,5,6-trichloro-2-pyridyl-oxyacetic acid), applied at the concentration of 35 and 15 mg l⁻¹, respectively, during the linear fruit growth stage, advanced harvest date 7 days on average, with no changes on internal fruit characteristics and colour.

Frequency distribution of fruit diameter was also significantly modified by treatments, treated fruit enhanced commercial value.

Sucrose and fructose concentration increased in treated fruit with regard to control fruit, suggesting and enhanced fruit sink capacity due to the auxins. Treated fruit advanced the biosynthesis of abscisic acid and catabolism of indoleacetic acid and *t*-zeatin, in accordance with advanced fruit ripening.

Keywords: Carbohydrates, plant growth regulators, Fruit development, Fruit size, Ripening

A Manolo y Carmina por su entrega y dedicación.

A Carlos, Amparo, Vicent y todos los componentes del IAM sin vosotros la investigación no sería lo mismo.

A la cooperativa de Callosa.

A Sebastià Balasch, por su ayuda altruista.

A los Repes Team juntos lo hemos logrado.

A Alejandro, por hacer amenos los largos días de laboratorio.

A mi familia, por tener mucha paciencia conmigo y por darme esta oportunidad.

A todos: GRACIAS

Los grandes hombres pasan, pero las buenas obras perduran.

ÍNDICE

Índice.....	VII
Índice de figuras	VIII
Índice de tablas	IX
I. INTRODUCCIÓN	1
1. Importancia económica del níspero japonés.	1
2. Ciclo vegetativo.....	2
3. Crecimiento del fruto y su control	3
3.1. Control hormonal del crecimiento	4
3.2. Control nutricional.....	6
4. Técnicas agronómicas para mejorar el desarrollo del fruto	7
4.1. Aclareo manual de frutos	7
4.2. Aclareo químico.....	8
4.3. Rayado de ramas.....	9
4.4. Aplicación exógena de auxinas de síntesis	10
5. OBJETIVO	11
II. MATERIALES Y MÉTODOS	12
1. MATERIAL VEGETAL	12
2. DISEÑO EXPERIMENTAL Y TOMA DE MUESTRAS	12
3. DETERMINACIONES ANALÍTICAS.....	13
3.1 Tamaño del fruto.....	13
3.2 Parámetros de maduración.....	13
3.3 Análisis de azúcares.....	13
3.4 Análisis hormonal.....	14
3.5 Análisis estadístico.....	15
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
1. CRECIMIENTO DEL FRUTO	16
2. RECOLECCIÓN Y MADURACIÓN DEL FRUTO.....	18
IV. Conclusiones.....	34

BIBLIOGRAFÍA	35
ANEJOS	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Evolución superficie (ha) (A) y producción (t) (B) de níspero japonés en España. Fuente: MAGRAMA 2012.	2
Figura 2. Representación esquemática de las tres primeras fases de crecimiento del fruto de níspero japonés según Ateyyeh y Qrunfleh (1998).	4
Figura 3. Influencia de la aplicación de 2,4-DP (37.5 mg l ⁻¹), 3,5,6-TPA (15 mg l ⁻¹) y su combinación sobre la evolución del diámetro del fruto del níspero japonés cv. ‘Algerie’. Cada valor es la media de 60 frutos tomados al azar de 3 árboles por tratamiento. Las barras verticales indican el error estándar. Letras distintas en la misma fecha indican diferencia significativa (P≤0,05). En el eje horizontal superior se presentan los estados fenológicos en la escala BBCH.	16
Figura 4. Influencia de la aplicación de 2,4-DP (35 mg·l ⁻¹) y 3,5,6-TPA (15 mg·l ⁻¹), y su mezcla, sobre el porcentaje acumulado de frutos de níspero japonés cv. Algerie cosechados en las diferentes fechas de recolección. Cada valor es la media de 4 árboles. Las barras verticales indican el error estándar.	20
Figura 5. Efecto de la aplicación de 2,4-DP (35 mg·l ⁻¹), 3,5,6-TPA (15 mg·l ⁻¹) y su mezcla, sobre la distribución de calibres comerciales de los frutos recolectados. Los calibres más pequeños son los M y los más grandes GGG. Cada valor la media de 70 frutos y 3 árboles. La distribución para cada uno de los tratamientos difiere significativamente de acuerdo con el test de contraste de homogeneidad Chi-cuadrado (p ≤ 0.002).	22
Figura 6. Influencia de la aplicación de 37.5 mg l ⁻¹ de 2,4-DP y 15 mg l ⁻¹ de 3,5,6-TPA sobre la evolución de la concentración de azúcares reductores y de transporte en el fruto	

del níspero japonés cv. Algerie. Cada valor es la media de 4 repeticiones. Las barras verticales indican el ES. En algunos casos el ES es inferior al tamaño del símbolo. En la parte superior se presentan los estados fenológicos de la escala BBCH.....25

Figura 7. Influencia de la aplicación de 37.5 mg l⁻¹ de 2,4-DP y 15 mg l⁻¹ de 3,5,6-TPA sobre la evolución de la concentración de sacarosa y sorbitol en el fruto del níspero japonés cv. Algerie. Cada valor es la media de 4 repeticiones. Las barras verticales indican el ES. En algunos casos el ES es inferior al tamaño del símbolo. En la parte superior se presentan los estados fenológicos de la escala BBCH.27

Figura 8. Influencia de la aplicación de 37.5 mg l⁻¹ de 2,4-DP y 15 mg l⁻¹ de 3,5,6-TPA sobre la evolución de la concentración de fructosa y glucosa en el fruto del níspero japonés cv. Algerie. Cada valor es la media de 4 repeticiones. Las barras verticales indican el ES. En algunos casos el ES es inferior al tamaño del símbolo. En la parte superior se presentan los estados fenológicos de la escala BBCH.30

Figura 9. Influencia de la aplicación de 2,4-DP (37.5 mg l⁻¹), 3,5,6-TPA (15 mg l⁻¹) y su combinación sobre la evolución de la concentración de ABA, AIA y tZ del fruto del níspero japonés cv. ‘Algerie’.32

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla: 1. Influencia de la aplicación de 2,4-DP (35 mg l⁻¹) y 3,5,6-TPA (15 mg l⁻¹) sobre la coloración del fruto del níspero japonés cv. Algerie. Valores correspondientes a los 21 días de efectuado el tratamiento. Valores expresados en coordenadas Hunter. Cada valor es la media ± ES de 20 frutos tomados al azar. Letras distintas en una misma línea indican diferencia significativa ($p \leq 0,05$). 19

Tabla: 2. Influencia de la aplicación de 3,5,6-TPA (15 mg l⁻¹) y 2,4-DP (35 mg l⁻¹) sobre las características del fruto maduro del níspero japonés cv. Algerie en el momento de la recolección. Cada valor es la media de 20 frutos y tres árboles. Letras distintas en una misma columna indican diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0,05$). 23

I. INTRODUCCIÓN

1. Importancia económica del níspero japonés.

El níspero japonés (*Eriobotrya japonica* Lindl) es una especie frutícola de la familia *Rosaceae*. Su origen está en el valle del río Daduhe, en el Sur de China. La primera descripción del níspero se registra en 1690 y se debe a un botánico alemán, Engelbert Kaempfer.

Entre los siglos XVIII y XIX esta especie se extendió desde Japón hasta Europa, introduciéndose por las islas Mauricio, desde donde llegó a Inglaterra, Italia, España, Malta, Argelia, Grecia y Turquía. A finales del siglo XIX comenzó el interés por su cultivo por los estadounidenses, que lo plantaron en zonas de Florida, Carolina del Sur y California. Hoy en día el níspero se cultiva entre las franjas 25° y 38° Norte y Sur, y tiene importancia comercial en China, Japón y la Cuenca Mediterránea (Italia, Turquía y España). La producción anual total en el mundo es de poco más de 549.220 t, siendo China el mayor productor con 460.000 t, seguido de España con 43.300 t. (Lin *et al.*, 2007). España es, a su vez, la primera exportadora del mundo, con cerca de 19.000 t, siendo Italia y Portugal sus principales clientes.

En España el níspero se cultiva mayoritariamente en dos zonas. En la provincia de Alicante (los valles del río Algar y Guadalest), con 26.000 t anuales, y en las provincias de Málaga y Almería. Los cultivares que se cultivan en Alicante son autóctonos, procedentes de selección de mutaciones, siendo el más importante el ‘Algerie’ seguido del Magdal (Badenes *et al.*, 2006). En Andalucía se cultiva mayoritariamente el cultivar ‘Golden Nugget’.

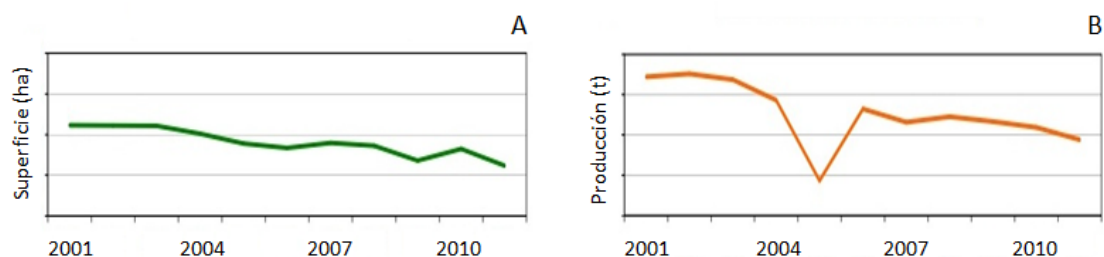


Figura 1. Evolución superficie (ha) (A) y producción (t) (B) de níspero japonés en España. Fuente: MAGRAMA 2012

El cultivo del níspero en nuestro país está disminuyendo de forma lenta. La razón más importante se debe al desconocimiento de su fruto por el consumidor.

2. Ciclo vegetativo

El níspero japonés es un árbol vigoroso, de hoja perenne y con entrada rápida en producción (2-3 años). Las hojas son coriáceas, duras, elíptico-lanceoladas con los bordes aserrados, lo que, en ocasiones, representa un problema al depreciar la calidad del fruto con su roce; presentan pubescencia blanquecina en el haz y el envés, sobre todo cuando son jóvenes (Reig y Agustí, 2006).

La floración se presenta en inflorescencia en panícula, con más de cien flores por panícula. Las flores son hermafroditas de color blanco, pequeñas, con cinco sépalos y cinco pétalos, tiene veinte estambres, cinco estilos, con sus estigmas, que se unen al llegar al ovario. Éste posee cinco lóculos con dos óvulos cada uno.

Las yemas del níspero pueden ser vegetativas o mixtas. En clima templado, a lo largo del periodo vegetativo, presenta tres brotaciones: la brotación de primavera, la más importante, que se inicia una vez el fruto ha completado su crecimiento, adquiriendo mayor desarrollo después de la recolección, la brotación de verano, consistente en brotes anticipados que crecen rápidamente en ésta época, y la de otoño, de escasa importancia y no produce flores (Gariglio *et al.*, 2002).

Es un frutal de pepita, con el fruto en pomo y forma oval, no alcanzando más de 7 cm, en algunos cultivares, de pulpa carnosa y succulenta, y posee entre 2 y 5 semillas, grandes con cubiertas de color marrón oscuro. La epidermis es dura y fina y está cubierta de vellosidad. El color de ésta va de amarillo pálido al anaranjado, y el de la

pulpa de blanco a naranja. En este fruto el cambio de color avanza desde la zona estilar hacia la peduncular.

El desarrollo radicular de esta especie es peculiar, contrariamente con lo que ocurre con otros frutales, ya que es coincidente con el desarrollo vegetativo, teniendo su máximo en verano y otoño. En invierno, y como consecuencia del crecimiento del fruto, reduce progresivamente su crecimiento para reiniciarlo después de la recolección (Reig *et al.*, 2015).

Después de la inducción floral a finales de primavera, se produce una parada vegetativa en verano. A la salida de ésta, se retoma el crecimiento y se inicia la diferenciación floral, que finaliza a finales de verano con la emergencia de las inflorescencias. En las zonas de clima templado, como son las de Clima Mediterráneo, desde el momento de la diferenciación floral hasta la antesis transcurren unos tres meses.

El níspero japonés se considera una especie autocompatible, pero existen algunas variedades que son parcialmente autocompatibles y otras autoincompatibles (Agustí y Reig, 2006). La polinización es entomófila, siendo las abejas de la familia Apidae y los insectos del género *Bombus* los agentes polinizadores más comunes. El cuajado de esta especie se presenta bajo, siendo de un 10-15% de las flores inicialmente formadas, en condiciones óptimas de polinización. Se ha observado que la polinización cruzada mejora la producción un 15-20% (Agustí y Reig, 2006). Aún así, el aclareo, tanto manual como químico, es imprescindible para lograr un calibre del fruto comercialmente aceptable (Agustí y Reig, 2006).

3. Crecimiento del fruto y su control

El fruto del níspero es, como corresponde a un fruto en pomo, un falso fruto. En su formación intervienen órganos auxiliares extracarpelares, esto es, la base de los sépalos. La curva de crecimiento de este tipo de frutos es sigmoideal, con tres fases bien diferenciadas: la fase de división celular, el periodo de engrosamiento celular y la fase de senescencia, durante la cual el fruto deja de crecer, cambia de color, y madura (Agustí 2004). Pero en el caso del níspero japonés, la fase de engrosamiento celular adquiere una evolución exponencial hasta su maduración (Blumenfeld, 1980), adquiriendo prácticamente el 80% de su tamaño final en apenas 30-35 días, lo que ha llevado a algunos autores a redefinir su cinética de crecimiento. Así, según Ateyyeh y Grunfleh (1998) aproximadamente dos meses después del cuajado la tasa de

crecimiento es muy lenta (Fase I), a la que sigue una fase de división celular masiva (Fase II), que dura unas cuatro semanas, seguida de un periodo de crecimiento rápido hasta completar su tamaño definitivo (Fase III), coincidente con la primavera, y finalmente el fruto deja de crecer, cambia de color y madura (Fase IV). Algunos autores consideran, sin embargo, que el crecimiento del níspero japonés sigue una curva sigmoide típica de los pomos (Rodríguez, 1893; Cuevas *et al.*, 2003).

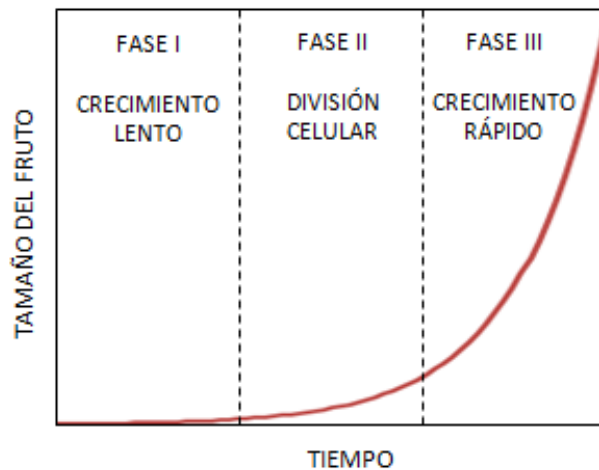


Figura 2. Representación esquemática de las tres primeras fases de crecimiento del fruto de níspero japonés según Ateyyeh y Qrunfleh (1998).

En los 45 últimos días del crecimiento del fruto éste acumula el 85% del peso fresco y el 80% del peso seco. El agua se acumula, sobre todo, en la pulpa, y la materia seca se reparte entre la pulpa y la semilla, en un 37% y 73%, respectivamente (Gariglio *et al.*, 2002).

3.1. Control hormonal del crecimiento

Aquellas sustancias capaces de influir sobre la expresión genética, la actividad enzimática y la funcionalidad de las membranas, se denominan hormonas. Pueden promover o inhibir procesos del desarrollo de los órganos. En el caso de los frutos, muchas de ellas se sintetizan en las semillas y ejercen su acción a través del desarrollo de las mismas. En los frutos partenocárpicos, la ausencia de semillas es sustituida por las paredes del ovario, capaces de sintetizar hormonas en etapas bien concretas del desarrollo del fruto, particularmente durante el paso de ovario de la flor a fruto en

desarrollo, facilitando, de este modo, el cuajado de este tipo de frutos. El control hormonal del proceso de cuajado, tanto sexual como partenocárpico, fue demostrado en los años 50, por Abbott, eliminando las semillas del fruto en etapas muy precoces de su formación, provocando, de este modo, la abscisión del fruto. Con la aplicación de una auxina exógena fue capaz de sustituir la acción de las semillas, demostrando, de este modo, que el cuajado es un proceso regulado hormonalmente, que son las semillas el órgano de síntesis de las hormonas, y que aquellas pueden ser sustituidas por éstas obteniéndose frutos partenocárpico. La partenocarpia, en la mayoría de los frutos, está regulada por las giberelinas, aunque existen algunas excepciones.

La fase de expansión celular está regulada por las auxinas, aunque también en el control de este proceso existen excepciones. Así, por ejemplo, en frutales de hueso, se han detectado dos picos en la concentración de ácido indolacético (AIA), después de las fases I y II, que coincide con la lignificación del endocarpo (Monselise, 1986) y en los cítricos es posible aumentar su tamaño final con la aplicación exógena de auxinas de síntesis (Agustí *et al.*, 1994).

Una demostración indirecta del papel de las hormonas vegetales en el desarrollo del fruto es la relación entre el número de semillas por fruto y su crecimiento, mayor cuanto mayor es el número de éstas. Esta relación se ha observado en frutos como el kiwi, cítricos, manzana, níspero japonés, etc.

Pero las hormonas también regulan el cambio de color del fruto y su maduración. Aunque el níspero japonés es un fruto no climatérico (Reig *et al.*, 2015), se ha demostrado la existencia de un incremento en la síntesis de etileno previo al cambio de color del fruto (Amorós *et al.*, 2003; Reig *et al.*, 2015), pero éste carece de la capacidad de autocatálisis y no está acompañado de incremento alguno en el proceso de respiración (Reig *et al.*, 2015). Posteriormente al incremento de etileno se origina la síntesis de ácido abscísico y la reducción de la concentración de giberelinas, ácido indolacético y citoquininas como requisitos previos al cambio de color del fruto y su maduración (Reig *et al.*, 2015).

3.2. Control nutricional

El papel de los carbohidratos en el desarrollo de los frutos ha sido ampliamente estudiado, y Agustí (2004) lo revisó en profundidad. Su papel durante el cuajado está relacionado con el aporte de energía en un proceso altamente exigente como lo es la división celular. Cuando la disponibilidad de carbohidratos falla, el ovario no es capaz de reiniciar el crecimiento tras la fecundación o partenocarpicamente y abscinde. Es más, si el cuajado lo consiguen un número elevado de ovarios pero el aporte de carbohidratos desde las hojas es insuficiente para satisfacer el crecimiento de todos ellos, aquellos situados en mejor posición (cerca de las hojas) o procedentes de flores mejor desarrolladas (flores terminales de las inflorescencias) consiguen progresar en su desarrollo y el resto se desprenden. Este proceso se describe como un fenómeno de competencia por carbohidratos entre los frutos en desarrollo y aunque está regulado hormonalmente (ver más arriba) controla, en gran medida, el cuajado. En efecto, las hormonas son responsables del reclamo de carbohidratos (*capacidad sumidero*) y puesto que son sintetizadas por las semillas todos los frutos lo poseen, las diferencias entre ellos se establecen por su posición y, por tanto, por su crecimiento previo, de modo que aquellos que adquieren ventaja prosiguen el proceso y los que no, se desprenden de la planta.

Durante la fase de expansión celular, la exigencia energética de los tejidos del fruto es muy inferior puesto que éste no divide sus células, pero precisa de los carbohidratos para aumentar su tamaño. En efecto, la acumulación de carbohidratos lleva implícito el reclamo de agua ya que el gradiente osmótico entre tejidos determina el flujo de ésta, de modo que cuanto mayor es la concentración de carbohidratos mayor lo es su potencial osmótico y, por tanto, más bajo el potencial hídrico con lo que el agua fluye por difusión al órgano que, en estas condiciones, la reclama. El papel de la auxina en el proceso es establecer la capacidad sumidero del fruto en desarrollo (De Jong y Walton, 1989). En esta fase, una reducción del aporte de carbohidratos al fruto no provoca su abscisión, pero restringe su crecimiento. Bajo este punto de vista, aquellos frutos capaces de reclamar más carbohidratos crecen más y cuando son muchos los que inician el desarrollo los fenómenos de competencia en esta fase se convierten en una reducción del tamaño final de los frutos que compiten entre sí. El fenómeno ha sido demostrado en

melocotonero (Genard *et al.*, 2003), manzano (Archbold, 1992) y cítricos (Agustí *et al.*, 2002).

Pero la auxina también juega un papel clave bajo el punto de vista funcional, y distinto al nutricional. Esta sustancia provoca la acidificación del apoplasto mediante el bombeo de protones (H^+) al exterior de la célula, lo que provoca una relajación de los enlaces de los carbohidratos estructurales de la pared celular (celulosa, lignina,...) y reduce de este modo la presión parietal, permitiendo a la célula incorporar agua (con carbohidratos) y aumentar, de este modo, su volumen (Rayle y Cleland, 1970). Es así como se ha explicado la acción de las auxinas de síntesis aumentando el tamaño de los frutos (El-Otmani *et al.*, 1993).

4. Técnicas agronómicas para mejorar el desarrollo del fruto

El níspero japonés presenta un porcentaje de cuajado de flores bajo, del orden del 10% (Ateyyeh y Qruenfleh, 1998), y el tamaño que alcanza el fruto en su madurez depende significativamente, como se ha dicho, de la disponibilidad de carbohidratos durante su desarrollo y, por tanto, del número de frutos que se desarrollan por panícula. Es por ello que para aumentar el tamaño final del fruto se recurra a técnicas que reduzcan su número, sea el aclareo manual, sea el químico.

Pero también existen técnicas capaces de aumentar la concentración de carbohidratos en el fruto bien sea indirectamente, aumentando su disponibilidad, bien directamente, aumentando su capacidad sumidero. Lo primero se consigue con el rayado de ramas, lo segundo con la aplicación de auxinas de síntesis.

4.1. Aclareo manual de frutos

Esta técnica consiste en la eliminación de frutos de un árbol con el fin de eliminar competencias entre ellos y alcanzar un tamaño final mayor. Para que sea eficiente hay que eliminar al menos el 50% de los frutos.

En níspero japonés se puede realizar un aclareo manual de flores, eliminando parte de la panícula y, de este modo, parte de sus flores. Pero el aclareo, propiamente dicho, se fundamenta en la reducción de competencia por carbohidratos entre los frutos que

inician el desarrollo. El aclareo de frutos al inicio de la fase exponencial del crecimiento modifica su tasa de crecimiento, y lo hace en proporción directa a la intensidad de aclareo. Así, hasta el momento del cambio de color, el fruto de panículas aclaradas a 3 y 1 frutos crece 2.0 y 2.5 veces más rápido, respectivamente, que el de panículas no aclaradas (Gariglio *et al.*, 2003). En general, para obtener un tamaño comercialmente aceptable se suelen dejar entre 2 y 4 frutos por panícula. El mayor problema de esta técnica es el elevado coste de la mano de obra, que alcanza hasta un 25% - 30% de los costes de cultivo.

4.2. Aclareo químico

En el níspero japonés se puede realizar un aclareo químico con ácido naftalenacético (ANA) que reduce significativamente el número de frutos que inician su desarrollo. La auxina impide la germinación del grano de polen o detiene (y hasta destruye) el crecimiento del tubo polínico, impidiendo la fecundación de las flores que todavía no lo han sido y, por tanto, su cuajado (Reig *et al.*, 2014).

De acuerdo con ello la época de aplicación y la concentración son factores decisivos. Los mejores resultados se obtienen cuando son visibles dos frutos por panícula (Agustí *et al.*, 2000). Con concentraciones entre 10 y 50 mg l⁻¹ de ANA se reduce entre un 20% y un 45% el número de frutos por panícula, y el diámetro de los que finalmente se recolectan aumentan entre 2.5 y 5 mm, dependiendo de la concentración utilizada. Se establece la concentración óptima en 20 mg l⁻¹, reduciendo un 30% los frutos por panícula y aumentando un 10% el diámetro final del fruto (Agustí *et al.*, 2000).

La reducción del número medio de semillas por fruto como consecuencia de la aplicación de ANA no afecta al tamaño del fruto, los frutos tratados crecen más que los no tratados, ya que, por una parte, el factor responsable del crecimiento del fruto es el peso de las semillas y no tanto su número (Uchino *et al.*, 1994), y, por otra, son las auxinas sintetizadas por ellas las que regulan el crecimiento del fruto (Agustí *et al.*, 2000).

Con este aclareo de frutos, la frecuencia de distribución de sus diámetros se desplaza hacia rangos mayores en comparación con los controles sin aclarar. Aún así, en los árboles tratados con ANA los frutos de mayor calidad (GG y GGG) solo representan el

60% de los recolectados, frente a un 75% de los aclarados manualmente (Agustí *et al.*, 2000). La capacidad de selección del hombre en el momento de aclarar no puede ser sustituida por el aclareo químico.

El contenido en sólidos solubles totales (SST) sólo aumenta en los frutos tratados con ANA y no en los aclarados manualmente, y la firmeza de la pulpa se reduce tanto con el aclareo químico como con el manual, en relación con los frutos de panículas no aclaradas, lo que indica, a su vez, una aceleración de su crecimiento. El aumento del tamaño del fruto, el adelanto en la coloración y la mejora de los SST, hacen que se anticipe la recolección en los árboles aclarados.

4.3. Rayado de ramas

El rayado de ramas consiste en la interrupción, por medios mecánicos, del transporte floemático de las ramas o el tronco. Se usa en agricultura para acelerar el desarrollo de los frutos, aumentar su tamaño final y anticipar la maduración, entre otros fines.

El rayado consiste en la realización de un corte en la corteza de las ramas que afecte sólo a los tejidos floemáticos e interrumpa temporalmente el transporte del fluido floemático al sistema radicular. Su mecanismo de acción se basa en la activación en las hojas del transporte electrónico del PSII (Rivas *et al.*, 2007), aumentando de este modo su capacidad fotosintética. Con todo ello se modifican las relaciones fuente-sumidero en la planta y se consigue una acumulación de carbohidratos en la parte que queda por encima de la zona de la rama que se ha rayado, favoreciendo el proceso de desarrollo del fruto que tenga lugar en el momento y dependiendo, por tanto, de la época en que se realice.

Para aumentar el tamaño final del fruto el rayado de ramas se ha utilizado en los cítricos (Furr *et al.*, 1945), cerezos y ciruelos (Agustí *et al.*, 1997), y melocotoneros y nectarinas (Agustí *et al.*, 1998), y también en el níspero japonés (Agustí *et al.*, 2005). En éste último debe efectuarse cuando el fruto alcanza el 20% - 40% de su tamaño final y la respuesta es máxima pasados 35 días del rayado, manteniéndose constante hasta la recolección. El resultado final es un incremento de hasta un 10% en el diámetro medio de los frutos de árboles rayados en comparación con el de los no rayados.

El rayado se practica sobre ramas secundarias o terciarias, dependiendo de la edad del árbol, y se lleva a cabo utilizando unas tijeras de filo curvo o de doble filo, separados \approx 1 cm, capaces de realizar un corte en toda la circunferencia de la rama o eliminar un anillo completo de corteza, respectivamente. En el primer caso se denomina propiamente rayado, en el segundo anillado. La eficacia para aumentar el tamaño del fruto es idéntica en ambos casos (Agustí *et al.*, 2005), pero la cicatrización es más rápida en el rayado.

4.4. Aplicación exógena de auxinas de síntesis

La aplicación de auxinas de síntesis con el objetivo de aumentar el tamaño del fruto se utiliza en muchos frutales. De entre estas sustancias las más empleadas son el éster etilhexil del ácido 2,4-diclorofenoxipropiónico (2,4-DP) y el ácido 3,5,6-tricloro-2-piridiloxiacético (3,5,6-TPA) en su formulación ácido libre.

Estas sustancias, aplicadas al inicio de la fase de crecimiento rápido, aumentan el tamaño de las células sin modificar el número (El-Otmani *et al.*, 1993). El aumento de su plasticidad al reducir la presión parietal y el incremento de solutos en la vacuola celular crea un flujo osmótico que dirige la incorporación de agua a la vacuola, de acuerdo con el proceso descrito más arriba.

En el níspero japonés, la aplicación de 25 mg l^{-1} de 2,4-DP cuando el fruto posee el 30% de su tamaño final (12-15 mm) incrementa el diámetro de éste en más de un 7% (\approx 3 mm) y la distribución de sus calibres comerciales (Agustí *et al.*, 2003). Los tratamientos no alteran el número de frutos recolectados, que viene determinado por el aclareo manual o químico, pero sí la cosecha que aumenta en proporción directa al incremento.

Aunque estos trabajos describen con precisión la época y la concentración más adecuadas para lograr frutos de gran calidad, no explican cómo actúan bajo un punto de vista hormonal y nutricional. En este trabajo se estudia la acción de las auxinas de síntesis 2,4-DP y 3,5,6-TPA en solitario y en combinación, sobre la evolución del contenido en el fruto en desarrollo de carbohidratos de transporte y reductores y de las hormonas AIA, ABA y transceatina (tZ).

5. OBJETIVO

Estudio del efecto de la aplicación de auxinas de síntesis durante la fase lineal del crecimiento del fruto del níspero japonés sobre su desarrollo y maduración y su relación con el balance nutricional y hormonal.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIAL VEGETAL

El trabajo se llevó a cabo en una parcela experimental propiedad de la Cooperativa Agrícola de Callosa d'En Sarrià (Alicante, España, 38° 39' N, 0° 7' W), durante la campaña 2014-2015.

Se utilizaron árboles adultos de níspero japonés (*Eriobotrya japonica* Lindl), cv. Algerie., de 20 - 25 años de edad, injertados sobre patrón franco, podados en vaso, con un marco de plantación de 4 x 5 m, y aclarados químicamente en el momento del cuajado (estado fenológico 609 de la escala BBCH) y repasados manualmente hasta dejar tres frutos por panícula (estado 701 de la escala BBCH). En el momento del tratamiento los árboles presentaban un aspecto, volumen de copa y carga productiva similares. El cultivo y manejo fitosanitario fueron los normales para el cultivo de esta especie.

2. DISEÑO EXPERIMENTAL Y TOMA DE MUESTRAS

Se diseñó un experimento de bloques al azar, con 4 bloques de 3 árboles cada uno, que se trataron cuando los frutos tenían entre el 50% y el 60% de su tamaño final, es decir, entre los estados 705 y 706 de la escala BBCH, con 37.5 mg l⁻¹ del éster etil hexil del ácido 2,4-diclorofenoxipropiónico (2,4-DP), 15 mg l⁻¹ del ácido libre 3,5,6-tricloro-2-piridoxilacético (3,5,6-TPA), una mezcla de 2,4-DP y 3,5,6-TPA a las concentraciones indicadas, dejando un árbol por bloque sin tratar como control.

Los tratamientos realizados se aplicaron foliarmente con tanque a presión, utilizando una presión de trabajo de 25 atmósferas, y añadiendo en todos los casos un agente tensoactivo (éter nonilfenil-polyietilen glicol, 20% p/p), a una concentración de 0.05%.

Periódicamente, hasta la maduración, se muestrearon frutos de tamaño medio de cada tratamiento, para su análisis hormonal y de carbohidratos. En el laboratorio se separaron la piel y la pulpa de las semillas y se congelaron para su posterior análisis.

3. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

3.1 Tamaño del fruto

Periódicamente se midió el diámetro de 20 frutos por árbol, seleccionados al azar a una altura del suelo de 1.5 – 2 m, con un pie de rey digital de precisión 0,01 mm (Mitutoyo, Tokyo).

Los frutos medidos se clasificaron en cuatro categorías comerciales, GGG (>53 mm), GG (46-52 mm), G (39-45 mm) y M (32-38 mm), de acuerdo con las normas de calidad para frutas y hortalizas (MAPA, 1992).

3.2 Parámetros de maduración.

En el momento de la recolección se tomaron 70 frutos por tratamiento. En el laboratorio se dividieron en tres grupos de frutos de los que se determinó la concentración de sólidos solubles totales (SST) y acidez libre (A) de su zumo, y su coloración.

Para la determinación de la concentración de SST se utilizó un refractómetro digital (Atago, Tokyo), expresando los resultados en °Brix. La acidez se determinó por valoración con NaOH 0,1 N, utilizando fenolftaleína como indicador, expresando los resultados en %. El color se determinó midiendo las coordenadas *a* y *b* de Hunter mediante un colorímetro digital Minolta Chroma Meter CR-300 (Minolta, Tokyo). Los valores de *a* indican color verde cuando son negativos y rojo cuando son positivos, y los de *b* azul cuando son negativos (inexistentes en el níspero japonés) y amarillo cuando son positivos.

3.3 Análisis de azúcares.

El análisis de azúcares solubles se realizó según el protocolo de Eshghi *et al.* (2007) con modificaciones. A partir de las muestras de frutos liofilizadas y trituradas, se tomaron alícuotas por duplicado de cada una (100 mg) y se introdujeron en tubos de centrífuga, debidamente etiquetados, a los que se añadieron 5 ml de Petroleum ether (40-60°). Las alícuotas fueron centrifugadas (4000 rpm. 4° C, 7 min) y el extracto de Petroleum, conteniendo los lípidos, clorofilas y otros contaminantes, fue eliminado mediante pipeteo cuidadoso; a la muestra restante se añadieron 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 incubaron a 65° C durante 20 min y se centrifugaron (4000 rpm, 4° C, 7 min) retirando el sobrenadante; de la fase sólida restante se realizó una re-extracción y posteriormente se juntaron ambos sobrenadantes que se llevaron a sequedad en Speed Vac Concentrator (Savant®) (Savant Instruments, INC., Hicksville, NY, USA).

Se añadieron 4 ml de agua Milli-Q al residuo seco para la dilución de los azúcares. Para homogeneizarlo, la dilución se incubaron 20 min con sucesivas pasadas de vórtex. Se añadieron 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 Spectra System® (Spectra, San Jose, CA, EEUU) conectado a un refractómetro diferencial (Spectra R150), una bomba de vacío (Spectra P2000), y a una base de datos ChromQuest® Chromatography Data System for Windows NT (Thermo Quest Inc., San Jose, CA, EEUU) y equipado con una columna Hypersil® APS-2 (250 x 4.6 mm) (Thermo Quest Inc., San Jose, CA, EEUU). La columna se mantuvo a 85° C en un horno y como solvente se utilizó agua Milli-Q a un flujo de 0.5 ml min⁻¹. 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 e inyectada dos veces. Los resultados se expresan como mg g⁻¹ de peso seco.

3.4 Análisis hormonal.

Las muestras recogidas en el campo se conservaron congeladas y posteriormente se liofilizaron. Una vez liofilizadas, se trituraron hasta polvo fino. Para la extracción hormonal, alícuotas duplicadas de cada muestra (50 mg) fueron extraídas con metanol 80%: ácido acético 1% (v/v) en presencia de los estándares internos específicos (hormonas marcadas con deuterio para cuantificar las pérdidas de cada hormona inherentes al proceso de extracción [OIChemim Ltd - Olomouc, o Cambridge Isotope Lab - Andover]: [²H5]-AIA y [²H6]-ABA). Estos estándares fueron añadidos para la

cuantificación del ácido indolacético (AIA) y ácido abscísico (ABA). En el caso de la *trans*-zeatina (tZ) se utilizó esta citoquinina deuterada (D-tZ) como estándar interno.

Para recuperar la fracción ácida donde se localizan los AIA y ABA, los extractos pasaron consecutivamente a través de columnas HLB (Waters Cromatografía, S.A., Barcelona, Spain) en fase reversa, MCX (intercambio catiónico) y WAX (intercambio iónico) (Oasis 30 mg, Waters Cromatografía S.A., Barcelona, España) 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 CH₃CN80: 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 Inc., Waltham, MA, EEUU) 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 Inc., Waltham, MA, EEUU). Las concentraciones hormonales finales de los extractos fueron determinadas usando las curvas de calibración realizadas previamente. La interpretación de los resultados se realizó mediante los programas Xcalibur 2.2 SP1 build 48 y TraceFinder.

3.5 Análisis estadístico.

A los resultados obtenidos se les aplicó el análisis de la varianza, usando el test de LSD para la comparación de medias con un nivel de confianza $p \leq 0.05$. Las distribuciones poblacionales de los diámetros de los frutos fueron sometidas a un test de contrastes de homogeneidad mediante la prueba Chi-cuadrado, con un nivel de confianza $p \leq 0,05$.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. CRECIMIENTO DEL FRUTO

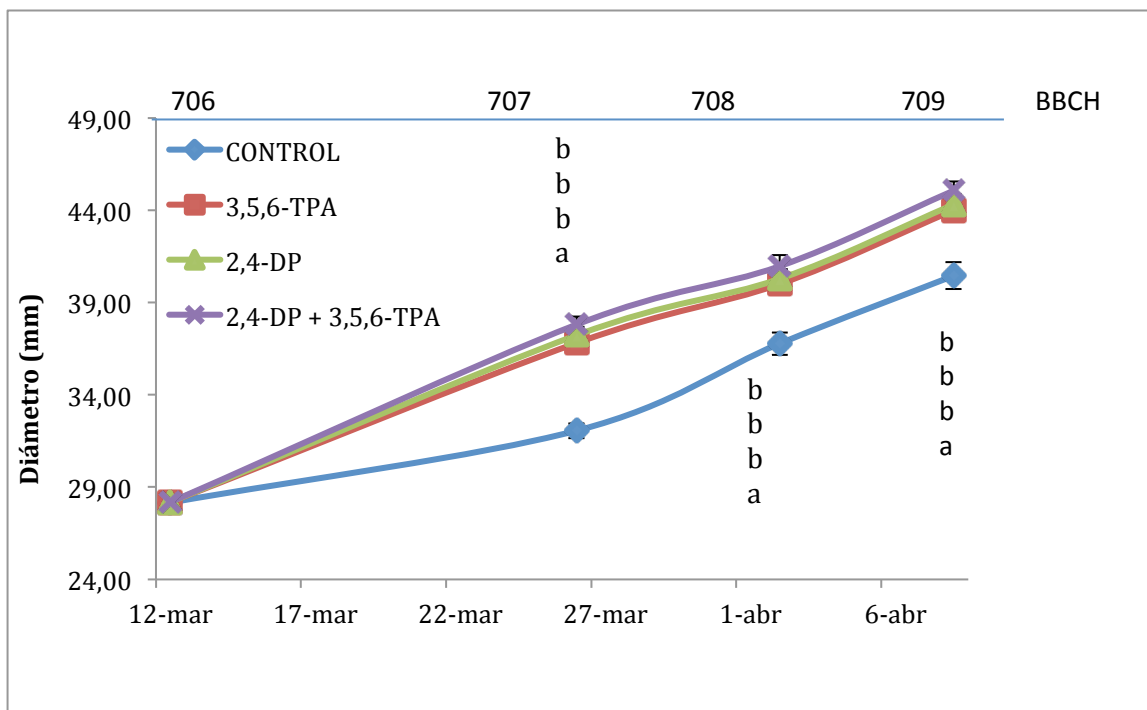


Figura 3. Influencia de la aplicación de 2,4-DP (37.5 mg l^{-1}), 3,5,6-TPA (15 mg l^{-1}) y su combinación sobre la evolución del diámetro del fruto del níspero japonés cv. ‘Algerie’. Cada valor es la media de 60 frutos tomados al azar de 3 árboles por tratamiento. Las barras verticales indican el error estándar. Letras distintas en la misma fecha indican diferencia significativa ($P \leq 0,05$). En el eje horizontal superior se presentan los estados fenológicos en la escala BBCH.

La aplicación de auxinas de síntesis modificó la cinética del crecimiento del fruto del níspero japonés cv. ‘Algerie’. Dos semanas después del tratamiento (26 de marzo), los frutos de árboles tratados con 3,5,6-TPA presentaban un diámetro medio significativamente superior en un 15% (36.8 mm) al de los frutos control (32.1 mm) (Figura 3). El 2,4-DP, no mostró un efecto significativamente diferente (37.2 mm) al logrado por el 3,5,6-TPA. Y el mismo resultado se consiguió con la mezcla de ambas auxinas de síntesis (37.8 mm). Las diferencias se mantuvieron, aproximadamente, con el tiempo, y en el momento de la recolección, cuando habían transcurrido 30 días del

tratamiento, el diámetro de los frutos tratados era un 12% superior, en promedio (44.5 mm), a los control (40.5 mm) (Figura 3).

En el transcurso de las dos semanas tras el tratamiento, el diámetro de los frutos control aumentó 4 mm, esto es un 14%, mientras que el de los frutos tratados con las auxinas lo hizo entre 8,5 y 9,5 mm, es decir, un 32%. En ese momento, el diámetro de los frutos tratados era significativamente mayor que el de los frutos control, con independencia de auxina aplicada. Entre los frutos tratados, el de los que habían recibido la auxina 2,4-DP o la mezcla de 2,4-DP y 3,5,6-TPA era significativamente mayor ($p \leq 0.05$) que el de los que habían recibido el 3,5,6-TPA (Figura 3)

Seis días más tarde (2 de abril) las diferencias entre los tratados y el control mantenían la significación estadística, aumentando el diámetro medio de los frutos tratados con auxinas en un 8%, frente a un 15% que lo había hecho el de los frutos control.

Estos resultados indican que el efecto de las auxinas se produjo en las dos semanas siguientes al tratamiento. Y este aspecto resulta relevante ya que en el momento del tratamiento el fruto ya se encontraba en un estado avanzado (estado fenológico 706 de la escala BBCH) de su crecimiento.

En el níspero japonés, se ha demostrado que la aplicación de 2,4-DP en los estados fenológicos 703 y 705 de la escala BBCH consigue aumentar significativamente el tamaño medio de los frutos (entre 3 y 2 mm, respectivamente) respecto de los frutos control sin tratar (Agustí *et al.*, 2003). Estos resultados fueron similares a los obtenidos en el mandarino Satsuma, en el que la aplicación de 2,4-DP una vez finalizada la fase de división celular incrementó el tamaño medio, pero no el número, de las células de las vesículas de zumo (El-Otmani *et al.*, 1993). Asimismo, la aplicación de este tipo de hormonas vegetales a los frutales del género *Prunus* sp., consiguen acelerar el crecimiento del fruto cuando se aplican una vez superada la fase de lignificación del endocarpo (Agustí *et al.*, 1994c). Dicho de otro modo, cuando el 2,4-D (Agustí *et al.*, 1994^a; 1994c) o el 3,5,6-TPA (Agustí *et al.*, 1994b) se aplican al inicio de la fase lineal de crecimiento del fruto consiguen aumentar significativamente el tamaño final del fruto a través de un mecanismo de incremento del tamaño individual de las células de los tejidos del fruto, perdiéndose su eficacia con el tiempo, esto es, a medida que se retrasa

el tratamiento. Sin embargo, nuestros resultados demuestran que es posible conseguir un estímulo del desarrollo del fruto del níspero japonés y un aumento de su tamaño final tratándolo aun en fases bien avanzadas de su crecimiento. El peculiar desarrollo de los tejidos de los frutos en pomo de las Maloideas, en comparación con las drupas del género *Prunus* o los hesperidios de los cítricos, podría explicar la persistencia en el tiempo de desarrollo de su sensibilidad a las auxinas de síntesis para estimular su desarrollo.

En el momento del cambio de color del fruto, el tratamiento más eficaz para aumentar el diámetro final del fruto fue la mezcla de las dos auxinas, 2,4-DP y 3,5,6-TPA, con frutos de 45,1 mm de diámetro, seguido por el 2,4-DP, con frutos de 44,3 mm; el 3,5,6-TPA se mostró menos eficaz, dando lugar a frutos de un diámetro medio de 44,0 mm. El diámetro medio de los frutos control fue de 40,5 mm, esto es, 3.5 – 4.5 mm inferior al de los frutos tratados..

2. RECOLECCIÓN Y MADURACIÓN DEL FRUTO

La aplicación de 2,4-DP, 3,5,6-TPA o su mezcla aceleró la entrada en color del fruto del níspero japonés cv. Algerie. Veintiún días después del tratamiento (2 de abril) todos los tratamientos habían aumentado significativamente el valor de la coordenada *a* de Hunter de la epidermis del fruto en un 44%, en promedio, respecto de los frutos control sin tratar (Tabla 1). Del mismo modo, la coordenada *b* había aumentado en un 145% en promedio. Como consecuencia de ello, el ratio *a/b* pasó de -0.53 en los controles a -0.22 en el promedio de los frutos tratados (Tabla 1). En ningún caso las diferencias entre los tratamientos con auxinas de síntesis alcanzaron la significación estadística (Tabla 1).

Tabla: 1. Influencia de la aplicación de 2,4-DP (35 mg l⁻¹) y 3,5,6-TPA (15 mg l⁻¹) sobre la coloración del fruto del níspero japonés cv. Algerie. Valores correspondientes a los 21 días de efectuado el tratamiento. Valores expresados en coordenadas Hunter. Cada valor es la media ± ES de 20 frutos tomados al azar. Letras distintas en una misma línea indican diferencia significativa ($p \leq 0,05$).

Coordenadas Hunter	CONTROL		3,5,6-TPA		2,4-DP		2,4-DP + 3,5,6-TPA	
<i>a</i>	-15,34±0,21	a	-9,74±0,88	b	-6,87±2,03	b	-9,03±2,14	b
<i>b</i>	29,34±0,99	a	43,17±1,22	b	44,19±1,15	b	40,48±1,73	b
<i>a/b</i>	-0,53±0,02	a	-0,23±0,02	b	-0,17±0,05	b	-0,25±0,06	b

Estos resultados correlacionan con el efecto que las auxinas tienen sobre el desarrollo del fruto. En efecto, los frutos más grandes, esto es, los tratados con las auxinas de síntesis, cambiaron antes de color. Agustí *et al.* (1999) trabajando con el melocotonero ‘Flordastar’ ya demostraron que la aplicación de 3,5,6-TPA tras la lignificación del endocarpo aceleraba el crecimiento del fruto que adquiriría antes su tamaño definitivo y, por tanto, cambiaba antes de color. Nuestros resultados son coincidentes con estos, de modo que los frutos del níspero japonés ‘Algerie’ tratados esta auxina, o el 2,4-DP, o su mezcla, ven acelerado su crecimiento y consiguen cambiar antes de color que los frutos control sin tratar. Y esta respuesta no es distinta a la encontrada por Agustí *et al.* (2003), con la aplicación de 2,4-DP, y Amorós *et al.* (2004), aplicando ácido naftalenacético o Fenotiol, en el mismo cultivar.

Dado que los factores determinantes de la recolección del fruto son su tamaño y color, no resulta extraño que en el momento de ésta el porcentaje de cosecha recolectada fuera significativamente mayor en los árboles tratados que en los controles (Figura 4). En efecto, en la primera recolección, de los árboles tratados con 3,5,6-TPA se recolectó un 8% más de frutos que de los árboles sin tratar. Pero fue en la segunda cuando las diferencias alcanzaron los valores más elevados. Mientras de los árboles control se recolectó el 13%, de los tratados con 3,5,6-TPA y 2,4-DP se recolectó el 41% y el 39%, respectivamente, y una cuantía similar de los árboles tratados con la mezcla de ambas

auxinas (36%). En consecuencia, tras la segunda recolección, de los árboles tratados con las auxinas se había recolectado, en promedio, el 62% de los frutos, destacando los tratados con 3,5,6-TPA con un 73%, mientras que de los árboles control solo se había recolectado el 36%, y éstos solo alcanzaron valores similares a los de aquellos al final de la tercera recolección (78%) (Figura 4).

Dicho de otro modo, y con los valores porcentuales de las dos primeras recolecciones, la aplicación de 2,4-DP o 3,5,6-TPA, en nuestro experimento, adelantó la recolección en 7 días, en promedio.

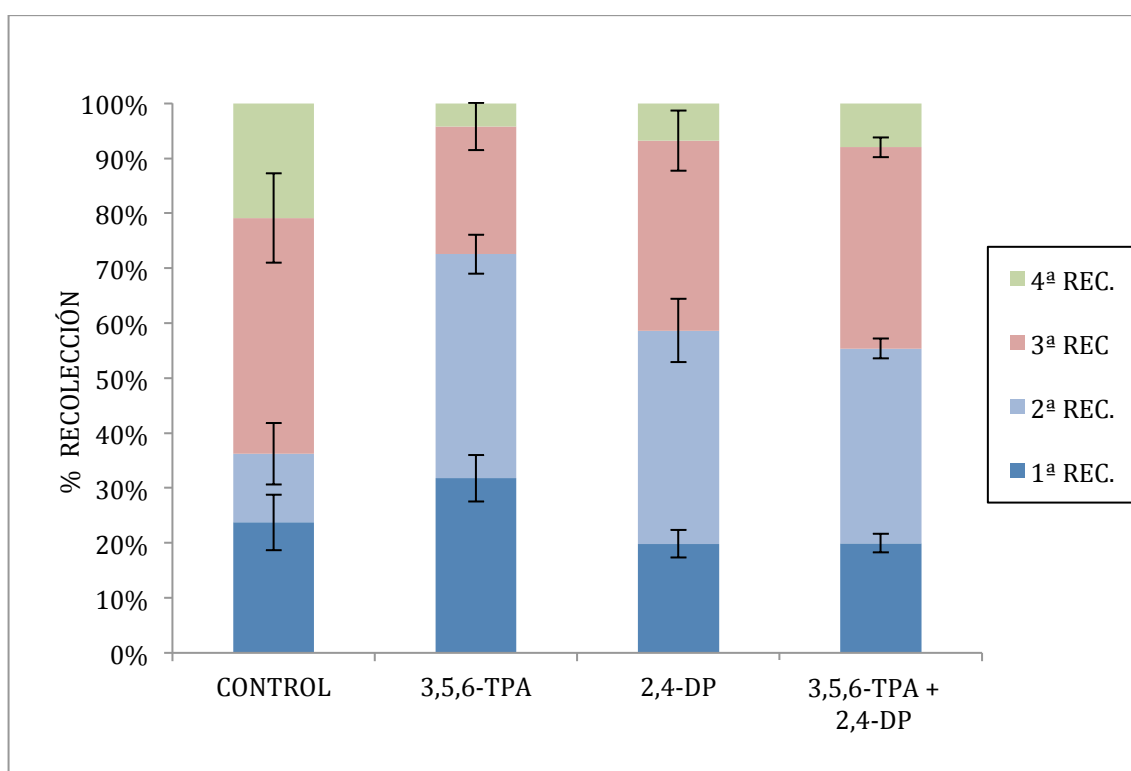


Figura 4. Influencia de la aplicación de 2,4-DP ($35 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) y 3,5,6-TPA ($15 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$), y su mezcla, sobre el porcentaje acumulado de frutos de níspero japonés cv. Algerie cosechados en las diferentes fechas de recolección. Cada valor es la media de 4 árboles.

Las barras verticales indican el error estándar.

Los tratamientos también mejoraron la distribución de los calibres comerciales de los frutos, que se desplazaron, significativamente, hacia calibres mayores (Figura 5). El mayor porcentaje de frutos de calibre más bajo (M) se registró en los árboles control con el 10%, mientras que los árboles tratados apenas dieron frutos de este calibre. El

porcentaje de frutos de calibre medio (G) fue muy similar en todos los tratamientos, con un 41% en los árboles control, seguido de un 40% en los tratados con 3,5,6-TPA, y un 37% en los tratados con 2,4-DP; la mezcla de ambas auxinas, sin embargo, lo redujo, significativamente, hasta el 26% de los frutos recolectados. Pero para el calibre de mayor valor comercial (GG) la distribución cambió marcada y significativamente a favor de los árboles tratados, aunque sin diferencias significativas entre ellos. Así, los árboles tratados con 2,4-DP y 3,5,6-TPA produjeron un 61% y un 59%, respectivamente, de frutos GG, mientras que el control no alcanzó el 46%; en los árboles tratados con la mezcla de ambas auxinas el porcentaje de frutos GG alcanzó el 67%. Los resultados para el calibre de fruto más grande (GGG) apenas alcanzó importancia, aunque el tratamiento con la mezcla de auxinas dio lugar a un porcentaje de frutos (6%) significativamente superior al que lograron los tratamientos individuales con 3,5,6-TPA y 2,4-DP (2%, en ambos casos) y los árboles control (3%).

El análisis de la distribución poblacional mediante el test de contraste de homogeneidad Chi-cuadrado indica que se trata de tres grupos de poblaciones estadísticamente distintas ($p \leq 0.002$). La correspondiente a los frutos procedentes de los árboles control, sin tratar, desplazada hacia calibres comerciales más bajos, la de los frutos de árboles tratados con 3,5,6-TPA o 2,4-DP, sin diferencias estadísticamente diferentes entre ellas, y la de los frutos de árboles tratados con su mezcla, desplazada hacia los calibres de mayor valor comercial (ver Anejo 1).

La eficacia de los tratamientos con estas auxinas de síntesis para aumentar el tamaño final del fruto del níspero japonés cv. *Algerie* alcanza, por tanto, a modificar la población de los frutos. Este efecto ya fue demostrado para el 2,4-DP en las mandarinas ‘Fortune’ (El-Otmani *et al.*, 1993) y Satsuma (Agustí *et al.*, 1994a), y para el 3,5,6-TPA en la naranja ‘Valencia’ y el pomelo ‘Marsh’ (Aranguren *et al.*, 2011), en las mandarinas ‘Clausellina’ (Agustí *et al.*, 1994) y Clementina (Agustí *et al.*, 1995) y en el caqui (Agustí *et al.*, 2004). En el níspero japonés se obtuvo un resultado similar con el 2,4-DP pero cuando se aplicó al inicio de la fase lineal del crecimiento del fruto (estado 703 de la escala BBCH), lo que por otra parte es respuesta común en la mayor parte de los frutales, en contraste con los resultados de este trabajo en el que la auxina se aplicó en etapas bien avanzadas del crecimiento (estado 706 de la escala BBCH).

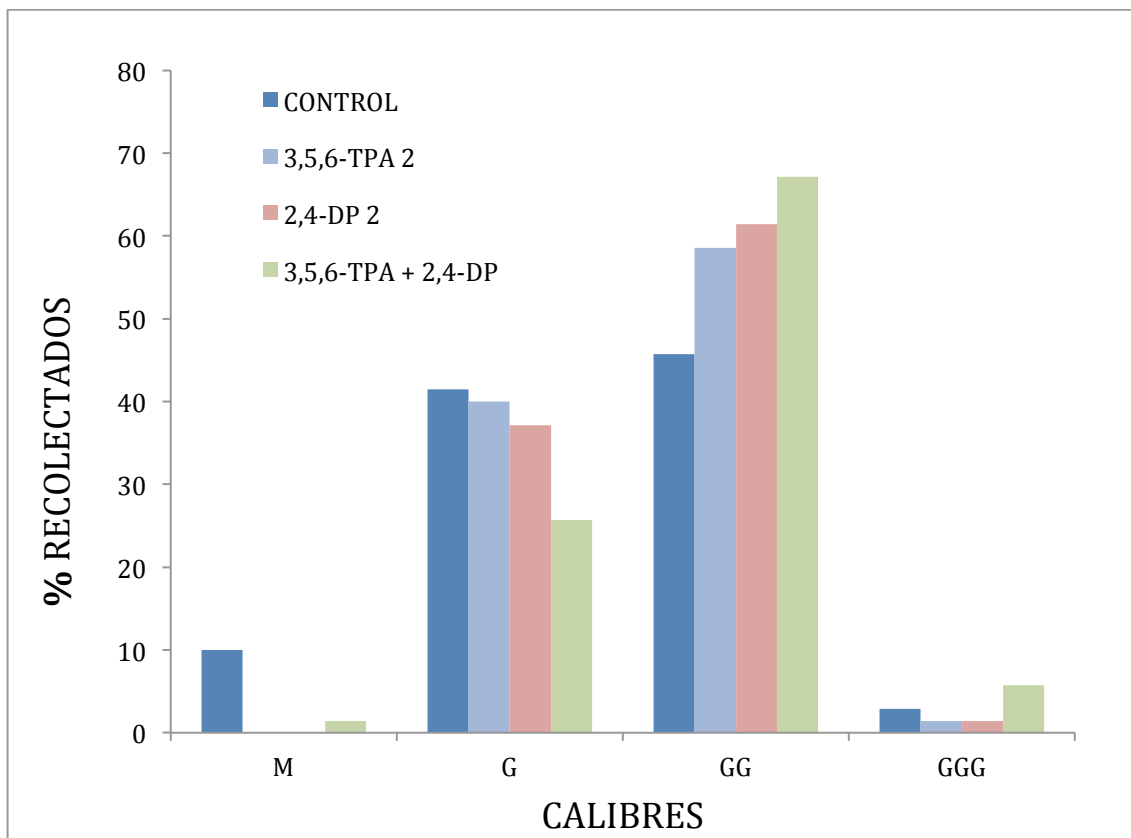


Figura 5. Efecto de la aplicación de 2,4-DP ($35 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), 3,5,6-TPA ($15 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) y su mezcla, sobre la distribución de calibres comerciales de los frutos recolectados. Los calibres más pequeños son los M y los más grandes GGG. Cada valor la media de 70 frutos y 3 árboles. La distribución para cada uno de los tratamientos difiere significativamente de acuerdo con el test de contraste de homogeneidad Chi-cuadrado ($p \leq 0.002$).

Las diferencias encontradas 21 días después de efectuados los tratamientos en los parámetros de la maduración interna no pudieron ser ratificados en el momento de la recolección. En efecto, dado que el criterio comercial de ésta fue por tamaño y color, los frutos recolectados fueron iguales con independencia del tratamiento, variando solo el porcentaje de los que se recolectaron de cada uno de ellos (Figura 4). Por tanto, en el momento de la recolección las características internas y el color del fruto no fueron modificados significativamente por acción de las auxinas (Tabla 2).

Tabla: 2. Influencia de la aplicación de 3,5,6-TPA (15 mg·l⁻¹) y 2,4-DP (35 mg·l⁻¹) sobre las características del fruto maduro del níspero japonés cv. Algerie en el momento de la recolección. Cada valor es la media de 20 frutos y tres árboles. Letras distintas en una misma columna indican diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0,05$).

TRATAMIENTO	SST		Color					Acidez		
	° Brix		<i>a</i>		<i>b</i>		<i>a/b</i>		%	
CONTROL	12,02±0,34	ab	11,45±0,81	a	38,95±5,92	b	0,31±0,05	a	1,1±0,95	a
3,5,6 TPA	11,35±0,5	a	10,62±1,17	a	37,46±5,94	a	0,31±0,06	a	1,2±1,24	a
2,4-DP	12,01±0,48	ab	10,58±0,7	a	38,38±6,36	b	0,30±0,05	a	1,2±0,89	a
MEZCLA	12,48±0,27	b	11,03±0,94	a	37,44±6,22	a	0,32±0,06	a	1,2±0,59	a

Esta respuesta del níspero japonés es general para todas las auxinas de síntesis aplicadas (Agustí *et al.*, 2003; Amorós *et al.*, 2004).

El crecimiento del fruto está determinado por la acumulación de carbohidratos y agua y regulado por las hormonas. En el níspero japonés, la concentración de azúcares reductores (fructosa y glucosa) aumentan progresivamente hasta el momento en que el fruto completa su crecimiento y cambia de color (Gariglio *et al.*, 2008; Reig *et al.*, 2015). En nuestro experimento, su concentración se incrementó desde 53.1 mg·g PS⁻¹, en el momento de la aplicación de las auxinas, hasta 369 mg·g PS⁻¹ (Figura 6) en el momento del cambio de color, lo que supone un aumento de casi 7 veces su valor inicial en un mes y medio, desde el estado 706. Los frutos tratados con 2,4-DP siguieron una pauta similar, pero con valores finales significativamente mayores que los de los frutos control. Así, en el mismo periodo, la concentración de estos azúcares se incrementó en casi 8.5 veces, pasando de 53.1 a 446.7 mg·g PS⁻¹ (Figura 6). El 3,5,6-TPA se situó en una posición intermedia, elevando la concentración inicial en más de 7.5 veces, pasando

de 53.1 a 405.5 mg·g PS⁻¹ (Figura 6). Las diferencias entre los tres tratamientos alcanzaron la significación estadística.

La concentración de azúcares de transporte (sacarosa y sorbitol), por el contrario, permanecieron prácticamente constante en los frutos control a lo largo del periodo de estudio, en coincidencia con los resultados de Reig *et al.* (2015). Así, desde el estado 706 de la escala BBCH hasta la recolección (estado 809) pasaron de una concentración de 64.2 a 62.4 mg·g PS⁻¹ (Figura 6). En los frutos tratados con 3,5,6-TPA su concentración descendió de modo notable, pasando de 64.4 a 55.8 mg/g (Figura 6), esto es, más de un 13% . Sin embargo, en los frutos tratados con 2,4-DP la concentración de los azúcares de transporte pasó de 64.2 a 79.9 mg·g PS⁻¹ (Figura 6), es decir, se incrementó en casi un 25% (Figura 6).

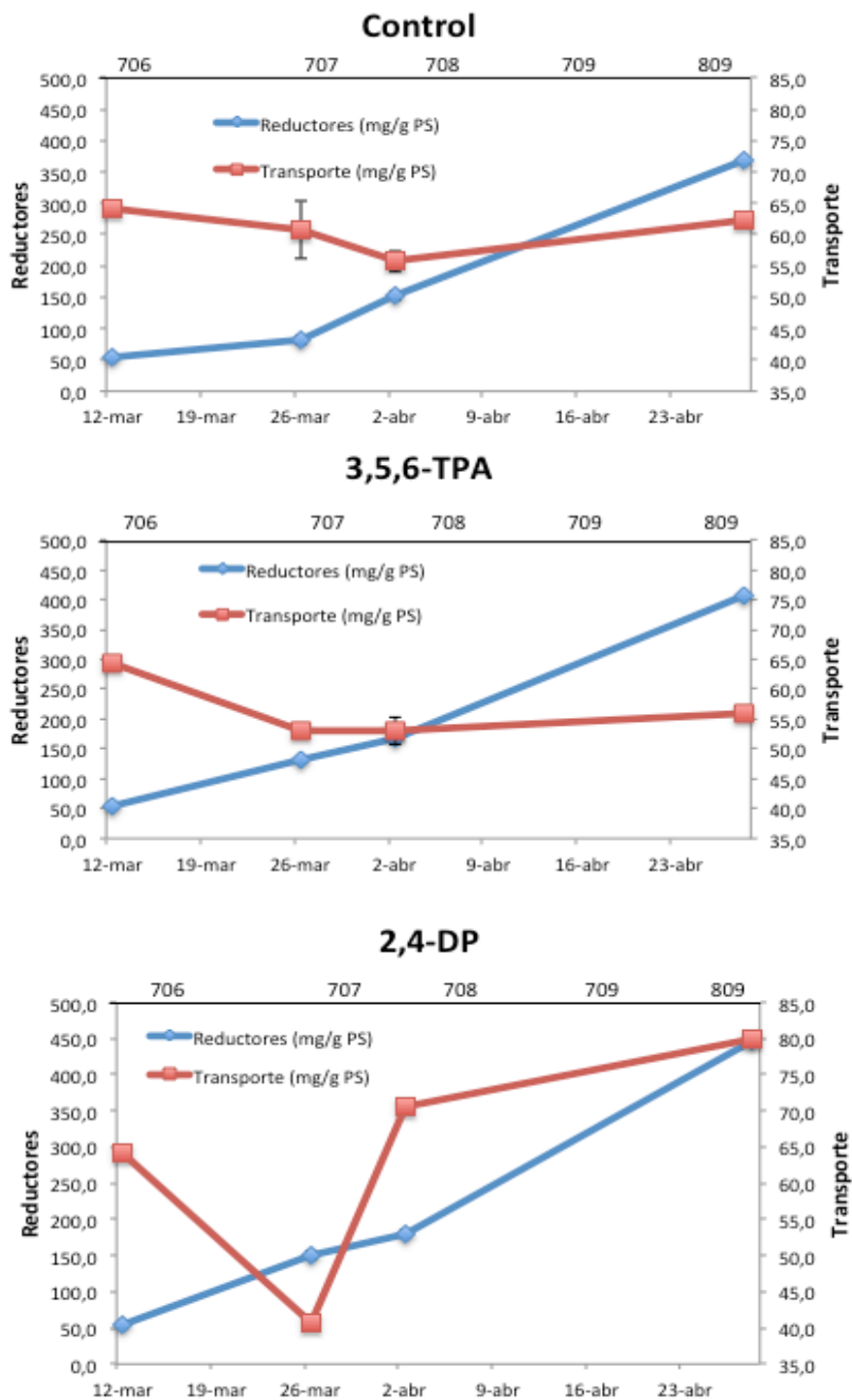


Figura 6. Influencia de la aplicación de 37.5 mg l⁻¹ de 2,4-DP y 15 mg l⁻¹ de 3,5,6-TPA sobre la evolución de la concentración de azúcares reductores y de transporte en el fruto del níspero japonés cv. Algerie. Cada valor es la media de 4 repeticiones. Las barras verticales indican el ES. En algunos casos el ES es inferior al tamaño del símbolo. En la parte superior se presentan los estados fenológicos de la escala BBCH.

Los resultados de ambas auxinas sugieren un mecanismo diferente de acción. Así, la reducción de la concentración de azúcares de transporte en el fruto tratado con 3,5,6-TPA en comparación con el fruto control en el que permanece constante coincide con un aumento significativo del tamaño del primero respecto del segundo, lo que podría explicarse por un aumento del contenido en agua en los frutos tratados, es decir, con un mayor aumento del volumen celular. Esta acción es general para todas las auxinas y está basada en el descenso de la presión parietal que provocan por acidificación de la pared celular (Cleland, 2010). Pero los frutos tratados con 2,4-DP contienen una concentración superior de estos azúcares, lo que indica que esta hormona además de incrementar el volumen celular (El-Otmani *et al.*, 1993), es decir, el contenido en agua, deben estimular la capacidad sumidero del fruto (De Jong y Walton, 1989), explicando de este modo su efecto más intenso sobre el crecimiento y el tamaño final que el fruto adquiere. Estas diferencias en el mecanismo de acción entre el 2,4-DP y el 3,5,6-TPA están, no obstante, por demostrar.

Resulta interesante que el contenido prácticamente constante de la concentración de azúcares de transporte en el fruto es consecuencia de un aumento y un descenso progresivos de la concentración de sacarosa y sorbitol, respectivamente (Figura 7), que compensan su contenido total. Gariglio *et al.*, (2002) y Gariglio y Agustí (2005) demostraron que el sorbitol es el azúcar más abundante en la pulpa del fruto del níspero japonés durante su fase de crecimiento. La evolución de este azúcar apenas se modificó por acción de los tratamientos, pasando de una concentración inicial de $59.9 \text{ mg} \cdot \text{g PS}^{-1}$ en el estado 706 (BBCH) a una final de $14.4 \text{ mg} \cdot \text{g PS}^{-1}$ en los frutos control, en los tratados con 3,5,6-TPA de $12.5 \text{ mg} \cdot \text{g PS}^{-1}$; y de $14 \text{ mg} \cdot \text{g PS}^{-1}$ en los tratados con 2,4-DP (Figura 7), sin que las diferencias alcanzaran la significación estadística en ningún caso. La sacarosa, por el contrario, mostró un comportamiento opuesto, aumentando su concentración a medida que el fruto maduró, pasando en los frutos control de un valor de $4.3 \text{ mg} \cdot \text{g PS}^{-1}$ en el estado 706 (BBCH) a $48.0 \text{ mg} \cdot \text{g PS}^{-1}$ en el estado 709 (BBCH). Los frutos tratados con 37.5 mg l^{-1} de 2,4-DP alcanzaron finales de $65.9 \text{ mg} \cdot \text{g PS}^{-1}$, difiriendo estadísticamente de los valores del control, mientras que los tratados con 15 mg l^{-1} de 3,5,6-TPA alcanzaron un valor final de $43.4 \text{ mg} \cdot \text{g PS}^{-1}$ no estadísticamente distinto del de los frutos control (Figura 7). El mayor contenido final en sacarosa de los frutos tratados con 2,4-DP apoya la idea de que esta auxina de síntesis une a su acción

sobre la plasticidad de la pared celular un aumento de la capacidad sumidero del tejido de la pulpa.

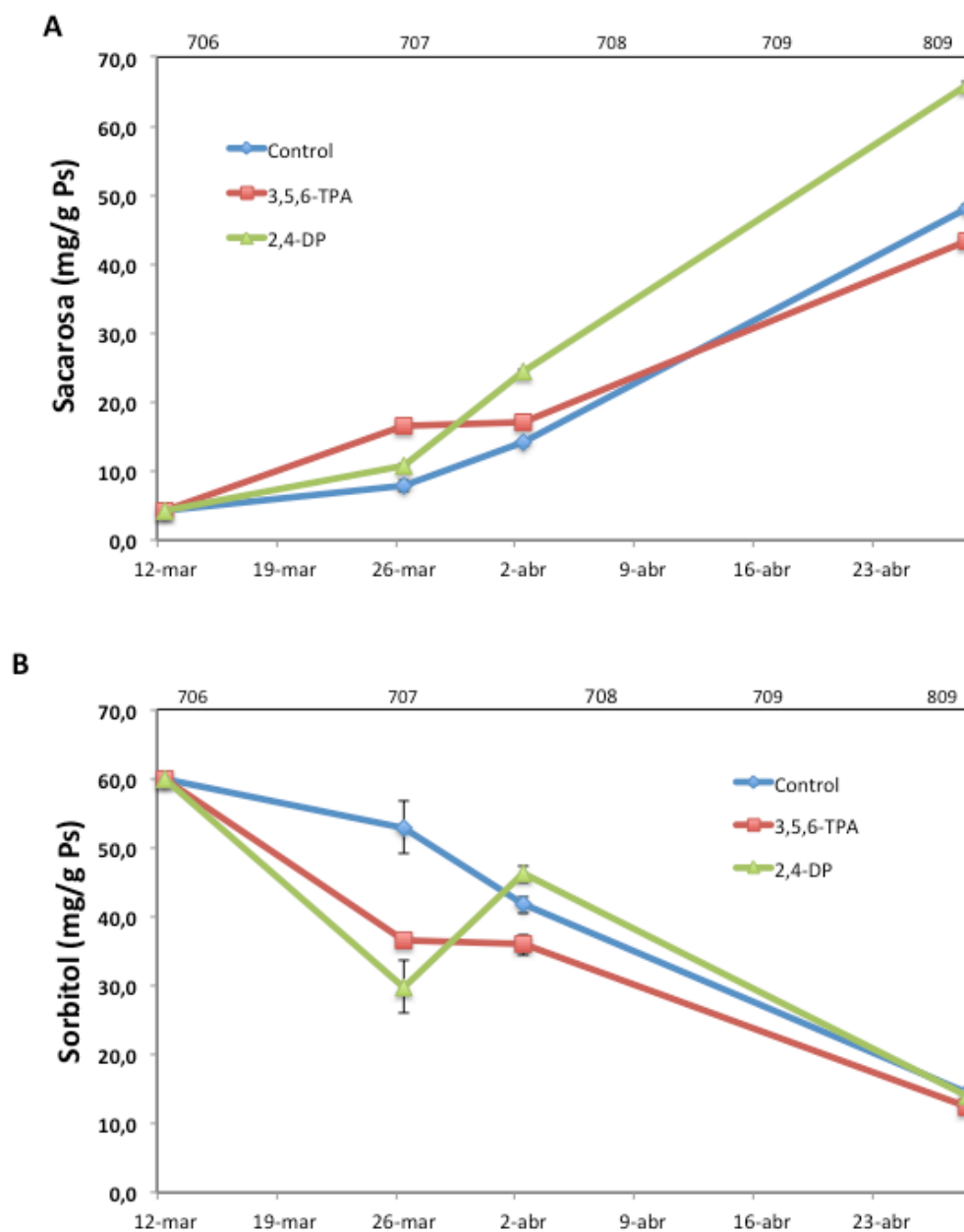


Figura 7. Influencia de la aplicación de 2,4-DP (37.5 mg l^{-1}) y de 3,5,6-TPA (15 mg l^{-1}) sobre la evolución de la concentración de sacarosa (A) y sorbitol (B) en el fruto del níspero japonés cv. Algerie. Cada valor es la media de 4 repeticiones. Las barras verticales indican el ES. En algunos casos el ES es inferior al tamaño del símbolo. En la parte superior se presentan los estados fenológicos de la escala BBCH.

Los azúcares reductores, glucosa y fructosa, aumentaron durante el desarrollo del fruto. La aplicación de auxinas de síntesis durante el crecimiento lineal del fruto apenas alteró la evolución de su concentración de glucosa, que siguió una pauta prácticamente idéntica para todos los tratamientos, alcanzando al final de su desarrollo una concentración 14 veces superior, por término medio, a la del momento del tratamiento, con independencia de éstos (Figura 8). La concentración de fructosa, sin embargo, progresó de modo distinto según la auxina aplicada. Así, mientras los frutos tratados con 2,4-DP aumentaron su concentración 6.5 veces durante el periodo de estudio, los tratados con 3,5,6-TPA lo hicieron 5.7 veces, y los control sin tratar 4.6 veces (Figura 8). La concentración final de fructosa no mostró diferencias significativas entre los frutos tratados con 2,4-DP o 3,5,6-TPA, pero sí con los frutos control sin tratar ($p \leq 0.05$).

La mayor concentración de fructosa en los frutos tratados con 2,4-DP respecto de los tratados con 3,5,6-TPA (Figura 8) no son solo consecuencia del mayor aporte de azúcares, como lo demuestra su mayor concentración de sacarosa (Figura 7). En efecto, la hidrólisis de ésta y el metabolismo del sorbitol pueden modificarla marcadamente. La sacarosa es hidrolizada en el citoplasma por acción de la invertasa y de la sacarosa sintasa. La primera forma una molécula de fructosa y una de glucosa por cada una de sacarosa, mientras que, la sintasa da una molécula de UDP-glucosa y una de fructosa. La UDP-glucosa es un precursor de la síntesis de polisacáridos estructurales utilizados en la formación de la pared celular. Aunque la actividad de ambas enzimas no es paralela ni independiente del propio metabolismo, en términos generales sugiere que la hidrólisis de sacarosa en el citoplasma forma más fructosa que glucosa. Si, por otra parte, el sorbitol es oxidado a fructosa por acción de la sorbitol deshidrogenasa, no resulta extraño que la concentración de fructosa sea superior a la de glucosa. (Figura 8).

Dicho de otro modo, la concentración de fructosa podría tomarse como un indicador indirecto de la actividad metabólica durante el crecimiento del fruto y, por tanto, de su estado de desarrollo y maduración. Resulta interesante, bajo este punto de vista, el paralelismo entre la acción de las auxinas sobre la evolución de la concentración de fructosa en el fruto (Figura 8) y su acción sobre la del diámetro del fruto (Figura 3). Sin embargo, la ausencia de diferencias en la concentración de glucosa en los frutos de cualquiera que sea el tratamiento recibido indica que aquella, la actividad metabólica, no debe ser estequiométricamente distinta y deriva la menor concentración de sacarosa

y fructosa en los frutos tratados con auxinas de síntesis a fenómenos de dilución que explicarían, por un lado, esta diferencia y, por otro, el aumento del tamaño final del fruto. La acción de estas sustancias reduciendo la presión parietal ha sido demostrada recientemente (Molina, 2014) y ayuda a comprender el fenómeno. Es más, la mayor concentración de ácido indolacético en la pulpa de los frutos tratados con esta auxina de síntesis en las semanas siguientes al tratamiento (Figura 9), momento en que se establecen las diferencias en el desarrollo del fruto y, por tanto, en su tamaño (Figura 3), es coherente con esta idea.

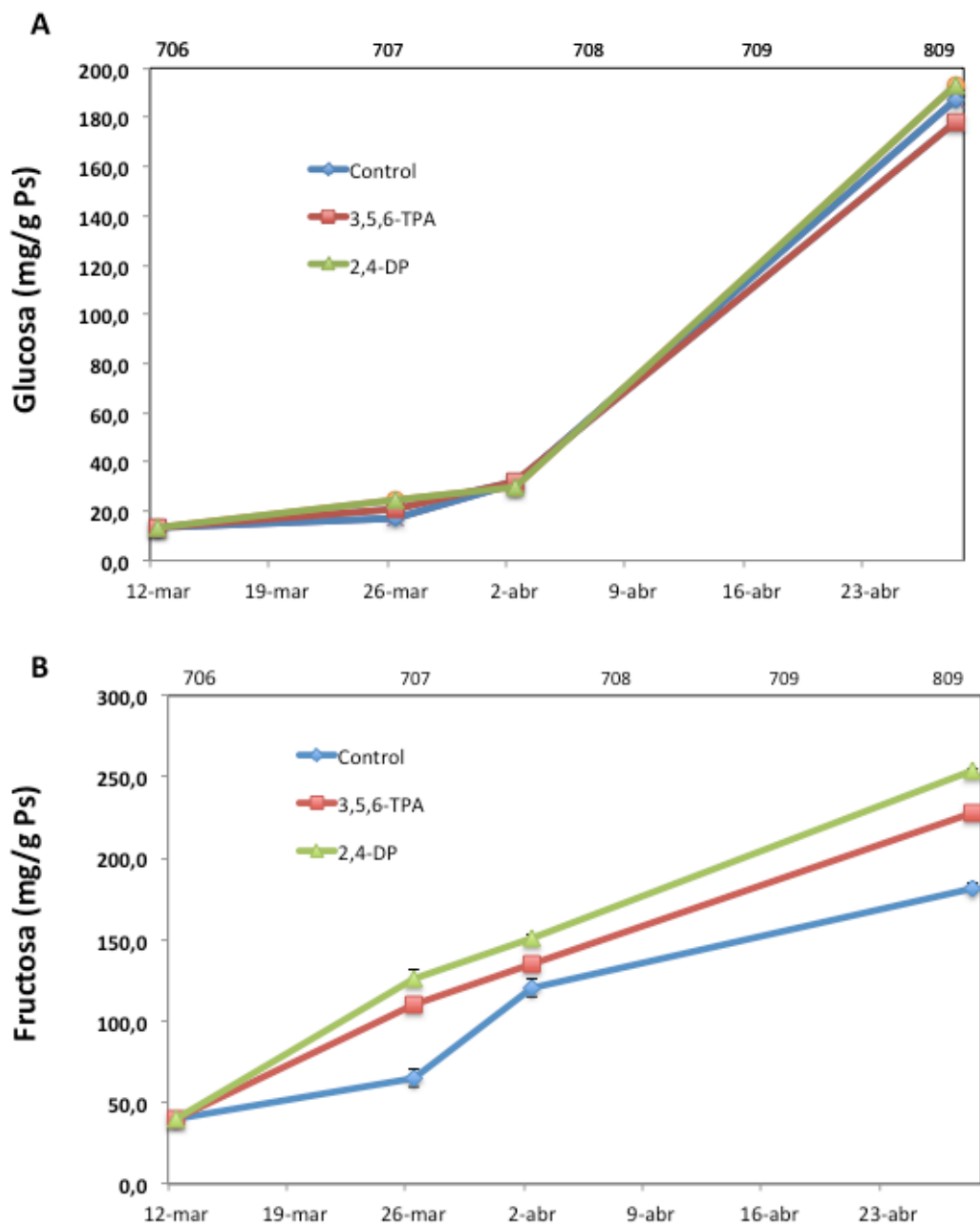


Figura 8. Influencia de la aplicación de 2,4-DP (37.5 mg l^{-1}) y de 3,5,6-TPA (15 mg l^{-1}) sobre la evolución de la concentración de glucosa (A) y fructosa (B) en el fruto del níspero japonés cv. Algerie. Cada valor es la media de 4 repeticiones. Las barras verticales indican el ES. En algunos casos el ES es inferior al tamaño del símbolo. En la parte superior se presentan los estados fenológicos de la escala BBCH.

La aplicación de auxinas de síntesis modificó el contenido hormonal del fruto en desarrollo. La concentración de ABA en la pulpa mostró niveles muy bajos hasta etapas próximas al cambio de color. En ese momento los árboles tratados tanto con 3,5,6-TPA como con 2,4-DP, alcanzaron niveles entre 15000 y 20000 ng·g PS⁻¹ frente a valores inapreciables (< 10 ng·g PS⁻¹) de los controles (Figura 9). El ABA se ha asociado con el cambio de color en los frutos no climatéricos (McAtee *et al.*, 2013), como lo es el níspero japonés. Sin embargo, su papel en este tipo de frutos no es bien conocido. Así, en los frutos climatéricos su síntesis precede a la de etileno y su inhibición retarda la coloración del fruto y el reblandecimiento de los tejidos (Leng *et al.*, 2014). Por el contrario, en los no climatéricos retarda diferentes procesos relacionados con la maduración del fruto (Rodrigo *et al.*, 2003) pero su síntesis es posterior a la de etileno (Reig *et al.*, 2015). Es más, se ha sugerido la posibilidad de que en estos frutos la síntesis de ABA sea más bien el resultado y no la causa del proceso, dado que es el último producto en la síntesis de carotenoides y, por tanto, su concentración aumenta paralelamente a la coloración del fruto. En todo caso, en los frutos climatéricos, cualquier retraso en la síntesis de ABA, espontáneo o provocado, reduce la intensidad del color del fruto (Gambetta *et al.*, 2014). De acuerdo con todo ello, la síntesis anticipada del ABA en los frutos tratados con auxinas de síntesis frente a la de los frutos control de nuestro experimento indica una anticipación de la entrada en color de éstos. En efecto, un adelanto en la síntesis del ABA (Figura 9) indica que el fruto alcanza antes su máximo tamaño y anticipa el cambio de color, en coherencia con nuestros resultados (ver Tabla 1 y Figura 3).

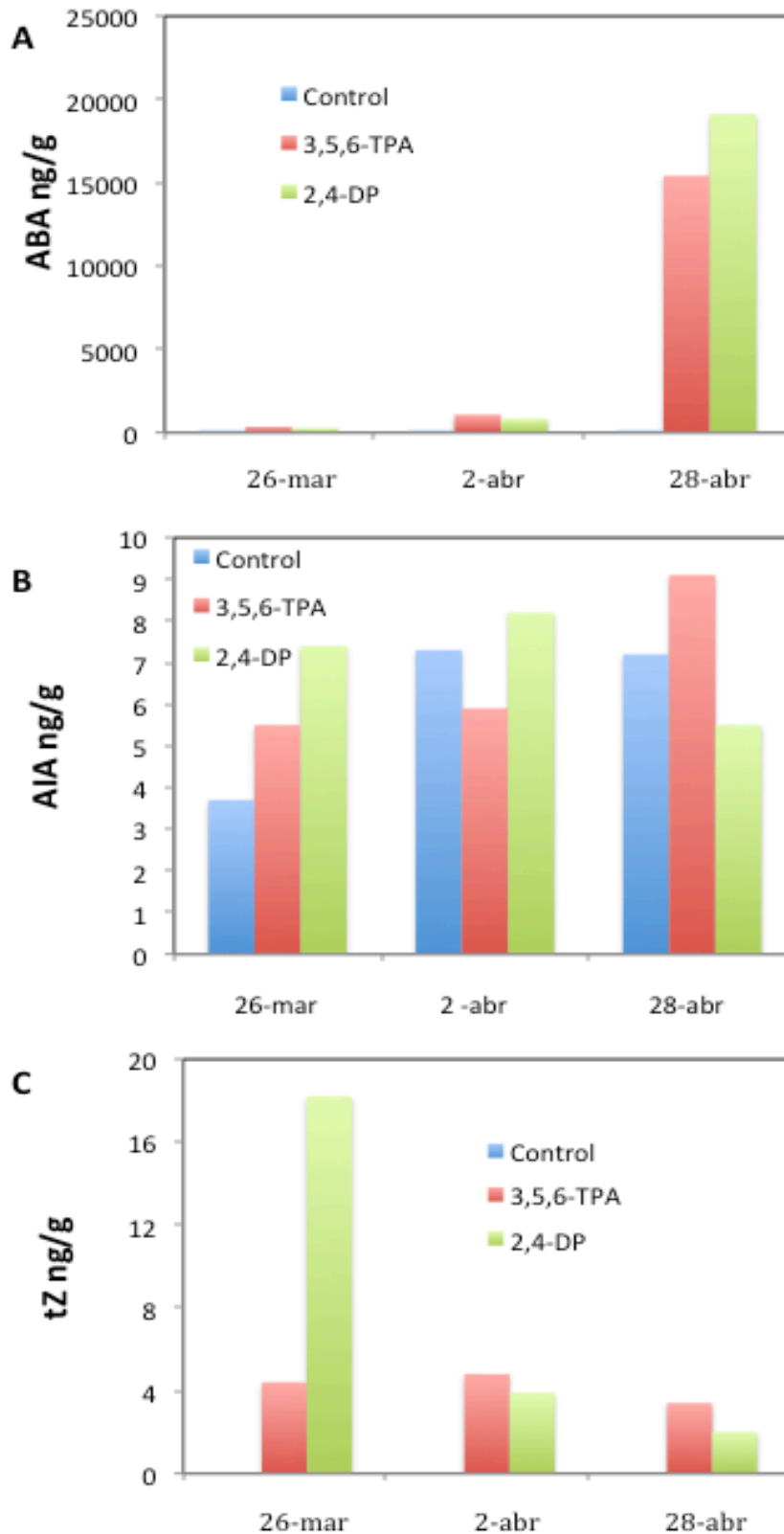


Figura 9. Influencia de la aplicación de 2,4-DP (37.5 mg l^{-1}), 3,5,6-TPA (15 mg l^{-1}) y su combinación sobre la evolución de la concentración de ABA (A), AIA (B) y tZ (C) del fruto del níspero japonés cv. ‘Algerie’.

La concentración de AIA en la pulpa del fruto aumenta con su crecimiento hasta que éste lo completa, descendiendo a continuación (Figura 9). Este descenso previo al cambio de color ya fue puesto de manifiesto en el níspero japonés (Reig *et al.*, 2015) y coincide con el bajo nivel de auxina requerido para que el fruto cambie de color (Manning, 1993), de acuerdo con el efecto inhibitor de la expresión de los genes de la maduración atribuido al AIA (Manning, 1994). De hecho se ha propuesto que el momento del cambio de color de los frutos podría estar modulado por cambios en la actividad biosintética de la auxina (Paul *et al.*, 2012). Nuestros resultados son coincidentes con ello y demuestran que los frutos tratados con 2,4-DP anticipan significativamente el descenso en la concentración de AIA respecto de los frutos control (Figura 9), en coincidencia con su adelanto del cambio de color. La evolución del contenido en auxinas de los frutos tratados con 3,5,6-TPA, sin embargo, sigue aumentando con el tiempo hasta más allá del cambio de color del fruto, sin que exista una explicación coherente para ello.

La concentración de *t*-zeatina disminuyó con el desarrollo del fruto hasta el cambio de color de éste (Figura 9). Este descenso tan acusado, véase cómo en los frutos tratados con 2,4-DP su concentración desciende de 18.2 a 2.0 ng g PS⁻¹, ha sido interpretado por Reig *et al.* (2015) como una muestra de su implicación en el proceso. De hecho, la aplicación de una concentración de 5 mg l⁻¹ o superior de kinetina antes del cambio de color del fruto consigue retrasar significativamente la entrada en color del níspero japonés ‘Jiajiao’ (Lou *et al.*, 2012). Los frutos tratados con 3,5,6-TPA mostraron la misma tendencia, si bien con valores de la concentración de tZ marcadamente inferiores (Figura 7). Las citoquininas están relacionadas con en el proceso de maduración de los frutos y se han relacionado con su papel antisenescente (Nooden, 1988; Richmond and Lang, 1957), de modo que se ha sugerido la necesidad de un descenso de su concentración en el fruto antes de que éste cambie de color para que el proceso se produzca (Reig *et al.*, 2015).

IV. Conclusiones

1. La aplicación de 15 mg l⁻¹ de 3,5,6-TPA o de 35 mg l⁻¹ de 2,4-DP en pleno desarrollo del fruto aumenta el tamaño final de éste y anticipa su maduración en el níspero japonés.
2. Este efecto se relaciona con un aumento de la capacidad sumidero del fruto que aumenta su concentración en azúcares de transporte (sacarosa) y de consumo (fructosa).
3. Su acción está regulada por una anticipación de la síntesis de ácido abscísico y por una reducción de la concentración de ácido indolacético y *t*-zeatina.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Agustí, M. (2003). *Citricultura*. Ed. Mundi-Prensa, Madrid. Pp 422.
- 2) Agustí, M. (2010). *Fruticultura*. Ed. Mundi-Prensa, 2da Edición. Madrid. Pp 507.
- 3) Agustí, M., Almela, V., Aznar M., El-Otmani, M. y Pons, J. (1994). Satsuma Mandarin Fruit Size Increase by 2,4-DP. *HortScience*, 4: 279-281.
- 4) Agustí, M., Almela V., Aznar M., El-Otmani y J. Pons. 1994a. Satsuma fruit size improved by 2,4-dichlorophenoxypropionic acid butylglycol ester. *HortScience*, 29: 279-281.
- 5) Agustí, M., Almela V., Aznar M., Juan M. y Eres V. 1995. Desarrollo y tamaño final del fruto en los agrios. Valencia. Generalitat Valenciana. 80p.
- 6) Agustí, M., Almela V., Juan M., Primo-Millo E., I. Trenor y S. Zaragoza. 1994b. Effect of 3,5,6-trichloro-2-pyridyl-oxyacetic acid on fruit size and yield of 'Clausellina' mandarin (Citrus unshiu Marc.). *J. Hortic. Sci.*, 69: 219-223.
- 7) 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.
- 8) Agustí, M., Gariglio, N., Castillo, A., Juan, M., Almela, V., Martínez-Fuentes, A. y Mesejo, C. (2003). Effect of the synthetic auxin 2,4-DP on fruit development of loquat. *Plant Growth Regulation*, 41: 129-132.
- 9) Agustí, M., Gariglio, N., Juan, M., Almela, V., Mesejo, C. y Martínez-Fuentes, A. (2005). Effect of branch scoring on fruit development in loquat. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 80: 370-374.
- 10) 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.
- 11) Agustí, M., Juan, M., Almela, V., Andreu, I. y Zacarias, L. (1999). Synthetic auxin 3,5,6-TPA promotes fruit development and climacteric in *Prunus persica* L. Batsch. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 74: 556-560.
- 12) Agustí, M., Juan, M., Almela, V. y Gariglio, N. (2000). Loquat fruit size is increased through the thinning effect of Naphthaleneacetic acid. *Plant Growth Regulation*, 31: 167-171.

- 13) Agustí, M., Juan, M., Almela, V., Primo-Millo, E., Trenor, I. y Zaragoza, S. (1994). Effect of 3,5,6-trichloro-2-pyridyl-oxyacetic acid on fruit size and yield of 'Clasellina' mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 69, 219-223.
- 14) Agustí, M., Juan, M., Mesejo, C., Martínez-Fuentes, A. and Almela, V. 2004. Persimmon fruit size and climacteric encouraged by 3,5,6-trichloro-2-pyridyloxyacetic acid *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 79: 171-174.
- 15) Agustí, M., Martínez-Fuentes, A. and Mesejo, C. (2002). Citrus fruit quality. Physiological basis and techniques of improvement. *Agrociencia*. VI (2): 1-16.
- 16) Agustí, M. y Reig, C. 2006. Fisiología. En: *El Cultivo del Níspero Japonés*, M. Agustí, C. Reig y P. Undurraga (Eds.), Gráficas Alcoy, España, pp 97-129.
- 17) Amorós, A., Zapata P., Pretel M.T., Botella M.A. y Serrano M. 2003. Physico-chemical and physiological changes during fruits development and ripening of five loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl) cultivars. *Food Sci. Technol. Int.*, 9: 43-51.
- 18) Amorós, A., Zapata, P., Pretel, M.T., Botella, M.A., Almansa, M.S. y Serrano, M. (2004). Role of Naphthaleneacetic acid and Phenothiol treatments on increasing fruit size and advancing fruit maturity in loquat. *Scientia Horticulturae*, 101: 387-398.
- 19) Aranguren, M., Sosa, G., Martínez, I., Rodríguez, J. y Alonso, E. (2011). Effects of 3,5,6-TPA on size composition and fruit quality in Valencia orange and Marsh grapefruit in Jagüey Grande conditions. *Centro Agrícola*, 38: 85-90.
- 20) Archbold, D.D. 1992. Cultivar-specific apple fruit growth rates in vivo and sink activities in vitro. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 117: 459-462.
- 21) 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.
- 22) Badenes, M. L., Castro, M., Gisbert, A. E., Martínez-Calvo, J. Y Llácer G. (2006). En: *El Cultivo del Níspero Japonés*, M. Agustí, C. Reig y P. Undurraga (Eds.), Gráficas Alcoy, España, pp 27-48.
- 23) Blumenfeld, A. (1980). Fruit growth of loquat. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 105: 747-750.

- 24) Cleland, R.E. (2010). Auxin and cell elongation. *Plant hormones*. pp 204-220.
- 25) 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.
- 26) De Jong, T.M. y Walton, E.F. (1989). Carbohydrates requirement of peach fruit growth and respiration. *Tree physiology*, 5: 229-335.
- 27) El -Otmami, M., Agustí, M., Aznar, M. y Almela, V. (1993). Improving the size of 'Fortune' mandarin fruits by the auxin 2,4-DP. *Scientia Horticulturae*, 55: 283-290.
- 28) 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.
- 29) 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.
- 30) Gambetta, G., Mesejo, C., Martínez-Fuentes, A., Reig, C., Gravina, A., Agustí, M. (2014). Gibberellic acid and norflurazon affecting the time-course of flavedo pigment and abscisic acid content in 'Valencia' sweet orange. *Scientia Horticulturae*, 180: 94– 101.
- 31) Gariglio, N. y Agustí, M. 2005. Effect of fruit thinning on the mineral composition of loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) fruit and its connection with purple spot. *Spanish J. Agric. Res.*, 3: 439-445.
- 32) Gariglio, N., Castillo, A., Juan, M., Almela, V. y Agustí, M. (2002). *El níspero japonés. Técnicas para mejorar la calidad del fruto*. Generalitat Valenciana. Sèrie Divulgació Tècnica no 52, Valencia, España, 61 pp.
- 33) Gariglio, N., Castillo, A., Juan, M., Almela, V. y Agustí, M. (2003). Effects of fruit thinning on fruit growth, sugars, and purple spot in loquat fruit (*Eriobotrya japonica* Lindl.). *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 78: 32-34.
- 34) Gariglio, N., Reig, C. y Agustí, M. (2008). Assimilate partitioning between the flesh and the rind is responsible for purple spot in loquat fruit. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 83: 37-42.
- 35) Gariglio, N., Reig, C., Martínez-Fuentes, A., Mesejo, C., Agustí, M. (2008). Purple spot in loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) is associated to changes in

- flesh-rind water relations during fruit development. *Scientia Horticulturae*, 119 (1): 55-58.
- 36) Genard M, Lescourret F., Gomez L., Habib R. (2003). Changes in fruit sugar concentrations in response to assimilate supply, metabolism and dilution: a modeling approach applied to peach fruit (*Prunus persica*). *Tree Physiology* 2003; 23: 373-385.
- 37) Leng P, Yuan B, Guo Y, Chen P. (2014). The role of abscisic acid in fruit ripening and responses to abiotic stress. *J. Exp. Bot.*, 65: 4577–4588.
- 38) Lin, S., Huang, X., Cuevas, J. y Janick, J. (2007). Loquat: an ancient fruit crop with a promising future. *Chronica Horticulturae*, 47: 12-15.
- 39) 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.
- 40) Manning, K. (1993). Soft fruit. En: Seymour GB, Taylor JE, Tucker GA (eds) *Biochemistry of fruit ripening*. *Chapman & Hall*, London, pp 347-378.
- 41) Manning, K. (1994). Changes in gene expression during strawberry fruit ripening and their regulation by auxin. *Planta*, 194: 62-68.
- 42) McAtee P, Karim S, Schaffer R, David K. (2013). A dynamic interplay between phytohormones is required for fruit development, maturation, and ripening. *Front. Plant Sci.*, 4:1–7.
- 43) Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. (2012) *Anuario de estadística*, Madrid.
- 44) Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (1995). *Normas de calidad para frutas y hortalizas*. M.A.P.A. Secretaría General técnica. Madrid. 481 p.
- 45) Molina, L. (2014). Control hormonal del desarrollo del fruto en el níspero japonés (*Eriobotrya japonica* Lindl.). (Tesis doctoral). Universitat Politècnica de València.
- 46) Monselise, S.P. (1986). *Handbook of fruit set and development*. CRC Press, Boca Ratón, Florida, EEUU., 586 pp.
- 47) Nooden L. D. (1988). The phenomenon of secescence and aging. En: Nooden L. D. y Leopold A. C. (Eds.) *Secescence and aging in plants*. Academic press, San Diego, EEUU, pp 1- 50.

- 48) Paul V, Pandey R, Srivastava GC. (2012). The fading distinctions between classical patterns of ripening in climacteric and nonclimacteric fruit and the ubiquity of ethylene. An overview. *J. Food Sci. Technol.*, 49:1–21.
- 49) Rayle, D. y Cleland, L. (1970). Enhancement of wall loosening and elongation by acid solutions. *Plant Physiology.*, 46: 250-253.
- 50) Reig, C. Y Agustí, M. 2006. Morfología y anatomía. En: El Cultivo del Níspero Japonés, M. Agustí, C. Reig y P. Undurraga (Eds.), Gráficas Alcoy, España, pp 49-72..
- 51) Reig, C., Farina, V., Mesejo C., Martínez-Fuente, A., Barone, F. y Agustí, M. (2014). Fruit regulates bud sprouting and vegetative growth in field-grown loquat trees (*Eriobotrya japonica* Lindl.). Nutritional and hormonal changes. *Journal of Plant Growth Regulation*, 33: 222-232.
- 52) Reig, C., Mesejo, C., Martínez-Fuentes, A., y Agustí, M. (2014). Naphthaleneacetic acid impairs ovule fertilization and early embryo development in loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.). *Scientia Horticulturae* 165, 246-251.
- 53) Reig, C., Mesejo, C., Martínez-Fuentes, A., Martínez-Alcántara, B. y Agustí, M. (2015). Loquat fruit ripening is associated with root depletion. Nutritional and hormonal control. *Journal of Plant Physiology*, 177: 51-59.
- 54) Reig, C., Martínez-Fuentes, A., Mesejo, C., Rodrigo, M.J., Zacarías, L. And Agustí, M. (2015). Loquat fruit lacks a ripening-associated autocatalytic rise in ethylene production. *J. Plant Growth Regul.*, doi 10.1007/s00344-015-9528-3.
- 55) Richmond AE, Lang A (1957). Effect of kinetin on protein content and survival of detached *Xanthium* leaves. *Science* 125: 650-651.
- 56) Rivas, F., Gravina, A. y Agustí, M. (2007). Girdling effects on fruit set and quantum yield efficiency of PSII in two *Citrus* cultivars. *Tree physiology* 27, 527-535.
- 57) Rodrigo, M.J., Marcos, J.F., Alférez, F., Mallent, M.D. y Zacarías, L. (2003). Characterization of Pinalate, a novel *Citrus sinensis* mutant with a fruit specific alteration that results in yellow pigmentation and decreased ABA content. *Journal of Experimental Botany*, 54 (383): 727-738.
- 58) Rodríguez, A. (1983). *El cultivo del níspero y el valle de Algar-Guadalest*. Sociedad Cooperativa de Crédito de Callosa De Ensarriá. 262p.

- 59) Uchino, K., Kono, A., Tatsuda, Y. y Sakoda, K. (1994). Some factors affecting fruit weight of loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl). *Japanese Journal of Tropical Agriculture*, 4: 286-292.

ANEJOS

Resumen del test de contraste de homogeneidad Chi-cuadrado de las poblaciones de calibres comerciales de los frutos de níspero japonés cv. Algerie procedentes de árboles control y tratados en el estado fenológico 706 de la escala BBCH con 3,5,6-TPA (15 mg·l⁻¹), 2,4-DP (35 mg·l⁻¹), y su mezcla.

Tabla de Frecuencias

	M	G	GG	GGG	Total por Fila
CONTROL	7	29	32	2	70
% Recolección	10,00%	41,43%	45,71%	2,86%	25,00%
Observada - Esperada	5,00	3,75	-8,75	0,00	
Chi-Cuadrada	12,50	0,56	1,88	0,00	
3,5,6-TPA	0	28	41	1	70
% Recolección	0,00%	40,00%	58,57%	1,43%	25,00%
Observada - Esperada	-2,00	2,75	0,25	-1,00	
Chi-Cuadrada	2,00	0,30	0,00	0,50	
2,4-DP	0	26	43	1	70
% Recolección	0,00%	37,14%	61,43%	1,43%	25,00%
Observada - Esperada	-2,00	0,75	2,25	-1,00	
Chi-Cuadrada	2,00	0,02	0,12	0,50	
MEZCLA	1	18	47	4	70
% Recolección	1,43%	25,71%	67,14%	5,71%	25,00%
Observada - Esperada	-1,00	-7,25	6,25	2,00	
Chi-Cuadrada	0,50	2,08	0,96	2,00	
Total por Columna	8	101	163	8	280
	2,86%	36,07%	58,21%	2,86%	100,00%

Pruebas de Independencia

<i>Prueba</i>	<i>Estadístico</i>	<i>Gl</i>	<i>Valor-P</i>
Chi-Cuadrada	25,924	9	0,0021