

El crecimiento del fruto depende de la acumulación de materia seca y agua y está determinado, y puede ser limitado, por su capacidad de sumidero y la disponibilidad de metabolitos en la planta (Guardiola y García-Luís, 2000). La capacidad sumidero del fruto es considerada como el factor dominante en la competencia por fotoasimilados y está determinada inicialmente por la calidad de la flor, que a su vez depende de la naturaleza de la inflorescencia y del número de flores formadas en el árbol (Guardiola., 1997).

El crecimiento y desarrollo del fruto está regulado por procesos hormonales endógenos (Ozga et al., 2003) que además influyen sobre el metabolismo de fotoasimilados en la planta (Brenner et al., 1995). La acción del contenido hormonal endógeno en cada estado de desarrollo de frutos cítricos ha sido estudiada a través de la aplicación exógena de reguladores de crecimiento.

La aplicación de auxinas exógenas a frutos en desarrollo produce varios efectos. Pueden actuar directamente sobre el comportamiento de los tejidos del fruto o modificar las condiciones que determinan la relación fuente – sumidero (Guardiola y García-Luís, 2000). La importancia de dichos efectos depende de la naturaleza y concentración de la auxina aplicada, del estado de desarrollo del fruto, de las condiciones climáticas y del cultivar. (Hirose., 1981; Greenberg et al., 1992; Ortola et al., 1998; Guardiola y García-Luís, 2000).

La respuesta *in vivo* de frutos cítricos a la aplicación exógena de auxinas, ha sido correlacionada con el comportamiento *in vitro* de los tejidos del fruto, dependiendo del estado de desarrollo. Trabajos realizados por Guardiola et al. (1993) proporcionan evidencias de que la intensidad de respuesta *in vitro* de explantos de frutos de mandarina Satsuma (*Citrus unshiu* Marc.) con la adición de hormonas al medio, cambia marcadamente durante sus distintas fases de desarrollo.

Estos cuatro aspectos, que son afectados por los diversos procesos que tienen lugar en la planta y por parámetros ambientales, son objetivos de este trabajo.

1. LA FLORACIÓN EN LOS CÍTRICOS

1.1. Características de la brotación

Aunque en las regiones tropicales, y algunas semitropicales, la brotación tiene lugar durante todo el año en ciclos de corta duración, separados por períodos de inactividad. (Cassin et al. 1969; Fouqué 1980), en los climas subtropicales, la formación y desarrollo de nuevos brotes se presenta en 3 o 4 ciclos definidos. La más importante es la brotación de primavera, que ocurre tras el período de bajas temperaturas invernales (Guardiola et al. 1977; Monselise 1985; García-Luis et al. 1988; Davenport 1990).

Durante el resto del año se producen dos o tres brotaciones más que normalmente no forman flores y que tienen lugar a finales de Junio (brotación de verano) y en el mes de Septiembre (brotación de otoño),

reguladas fundamentalmente por el fruto en desarrollo (Goldschmidt y Golomb 1982; García-Luis et al. 1986).

Los factores que determinan el número de brotaciones y la floración no son bien conocidos. En los trópicos se sugiere que el estrés hídrico es el principal factor que afecta la floración, mientras que en los subtrópicos son las bajas temperaturas de invierno las que concentran la floración en primavera (Guardiola, 1981; Monselise, 1985; García-Luis, et al, 1988). Se sabe que una prolongada sequía o temperaturas del suelo inferiores a 12 °C provocan la entrada en latencia de las yemas. El aumento en la temperatura del suelo incrementa el porcentaje de nudos brotados, al modificar el balance en la síntesis y/o transporte de hormonas de la raíz al brote (Hall et al., 1977).

1.2. Tipos de inflorescencias

En cítricos se distinguen normalmente cinco tipos de brotes (Figura 1) y dependiendo de la proporción de flores y hojas se clasifican en: multifloral con hojas, multifloral sin hojas, unifloral con hojas, unifloral sin hojas y vegetativo (Sauer, 1951; Lenz, 1966; Moss, 1969). En plantas adultas de la mayor parte de las especies de cítricos, las flores se desarrollan lateralmente en el tallo a partir de yemas axilares en reposo. Los brotes florales originados son de crecimiento determinado, estando culminados por una flor, y los vegetativos de crecimiento indeterminado (Agustí et al., 1982; Spiegel-Roy y Goldschmidt, 1996).

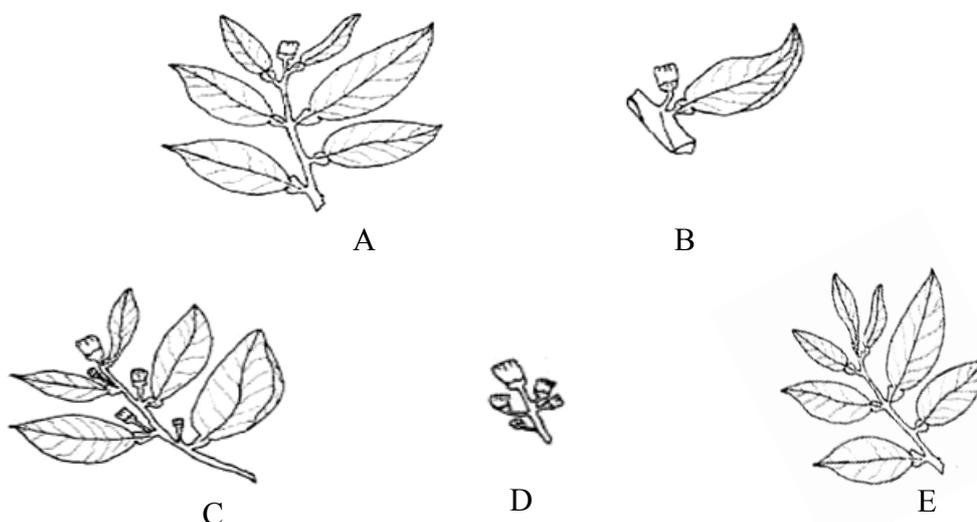


Figura 1. Tipos de inflorescencias: A) Uniflorales con hojas, B) Uniflorales sin hojas, C) Multiflorales con hojas, D) Multiflorales sin hojas y E) Vegetativos

La proporción en la que se presenta cada tipo de brote depende de factores endógenos como la variedad y el nivel de brotación, y de factores ambientales (Becerra y Guardiola, 1984).

2. CUAJADO Y ABSCISIÓN DEL FRUTO

2.1. Cuajado

El cuajado se define como la fase del desarrollo que marca la transición de una flor (ovario) a un frutito que se desarrollará hasta la madurez (Leopold y Kriedman, 1975). En *Citrus*, la tasa final de cuajado solo puede ser determinada después que la abscisión se ha detenido, 10 a 12

semanas después de antesis (Spielgel-Roy y Goldschmidt, 1996). En este sentido, Agustí et al. (1982) diferencian entre cuajado inicial, como el porcentaje de ovarios que reanudan el crecimiento después de la antesis, y cuajado final, medido como porcentaje del número de flores que forman finalmente un fruto.

La transición del ovario a un fruto en desarrollo con capacidad potencial para convertirse en un fruto maduro, es regulada por hormonas, específicamente por giberelinas (Talón et al., 1992; Guardiola, 2000). La deficiencia de giberelinas durante este periodo, resulta en una caída masiva de ovarios, bajo cuajado de fruto y en una reducción de la cosecha (Talón et al., 1992; Ben-Cheik et al., 1997).

En los cultivares con semilla el cuajado depende de la polinización y la fecundación. Buena parte de los cultivares de cítricos son partenocárpicas, y por tanto capaces de producir frutos sin semillas. Ejemplos notables de este comportamiento son las naranjas del tipo navel, las mandarinas del grupo Satsuma, diversas selecciones de clementinas y la lima Tahití (Talón et al., 1990; Guardiola, 1997). También el naranjo dulce Salustiana, utilizado en este estudio, produce frutos sin semillas (González-Sicilia, 1968).

El aporte hormonal para el cuajado del fruto en variedades partenocárpicas, esta referido al contenido hormonal de las paredes del ovario (Talón et al., 1997). En algunos cultivares de mandarina Clementina y algunos híbridos, el cuajado de frutos partenocárpicas puede ser incrementado con la aplicación de giberelinas exógenas, lo que sugiere una deficiencia en los niveles endógenos de esta hormona (Guardiola, 2000).

El rol de las giberelinas en el cuajado del fruto en cítricos, está generalmente aceptado (Talón et al., 1997). Sin embargo, en mandarina Satsuma así como en las naranjas del tipo Navel, la aplicación exógena de giberelinas tuvo solamente un efecto transitorio en el crecimiento del fruto y retrasó la abscisión, pero no se obtuvo un aumento en la cosecha final (Agustí et al., 1982).

Las variedades con semillas cuajan con más facilidad que las que no tienen semillas. Sin embargo, en la mayor parte de las variedades de cítricos el número de flores formado es suficiente para obtener una cosecha máxima. El número de flores producido por la planta llega a estar inversamente relacionado con el porcentaje de frutos finalmente cuajados (Goldschmidt y Monselise, 1977; Agusti et al., 1981; Becerra y Guardiola, 1984).

2.1. El proceso de la abscisión

La abscisión es un proceso selectivo que es afectado por las características de las flores / frutos. Los frutos pequeños que presentan una menor velocidad de crecimiento, son los de mayor probabilidad de caer del árbol (Zucconi et al., 1978; Agustí et al., 1982), aunque esta relación entre vigor y abscisión no es estricta, y con frecuencia frutos de elevado vigor presentan una reducción brusca en su velocidad de crecimiento, que precede a su abscisión (Ruiz y Guardiola, 1994).

En árboles de Citrus, se distinguen dos ondas de abscisión sucesivas que afectan la floración y el desarrollo de los frutitos, aunque en algunos casos la abscisión se presenta como un proceso continuo que alcanza un valor máximo entre 6 y 8 semanas después de la floración y se completa

alrededor de 12 semanas después de su inicio (Duarte y Guardiola, 1996). La primera onda, induce masivamente la abscisión de flores y ovarios, mientras que la segunda, reduce el número de frutos que ya presentan un crecimiento significativo, durante la caída de junio (Goldschmidt, 1999; Guardiola, 2000; Goren et al., 2000; Iglesias et al., 2005).

La abscisión de flores y ovarios se presenta por la zona de abscisión del pedicelo (ZA) al inicio del periodo de cuajado. Esta zona se vuelve progresivamente inactiva, mientras que la zona de abscisión del cáliz (ZC) es activada durante la caída de junio (Schneider, 1968; Spiegel-Roy y Goldschmidt, 1996; Guardiola y García-Luis, 2000; Iglesias et al., 2005). En ambos casos la abscisión es mediada por la síntesis de etileno (Goren, 1993; Ortola et al., 1997; Burns et al., 1998; Iglesias et al., 2005).

La abscisión es el resultado de una compleja combinación entre factores nutricionales y señales hormonales (Goren, 1993; Gyllaspý et al., 1993; Talón et al., 1997). Los factores nutricionales actúan como factores limitantes que afectan al crecimiento provocando su abscisión, mientras que el componente hormonal, actúa como estímulo, regulando los procesos de abscisión (Gómez – Cadenas et al., 2000). En naranjas, se ha sugerido un aumento en la abscisión del fruto por estimulación directa o indirecta en la producción de etileno, seguido por una secuencia de eventos que involucran: la iniciación en la expresión de genes de la celulasa y poligalacturonasa, síntesis *de novo* de enzimas hidrolíticas en las zonas de abscisión del fruto, degradación de polímeros de la pared celular y finalmente separación de órganos (Goren 1993; Kazokas y Burns, 1998)

La abscisión por el pedicelo no parece estar relacionada con la disponibilidad de carbohidratos, ya que esta ocurre cuando las reservas de

carbohidratos en el árbol se mantienen altas (García – Luis et al., 1988; Erner, 1989; Ruiz y Guardiola., 1994; Ruiz et al., 2001). Esta abscisión está precedida por una reducción en la tasa de crecimiento. La disminución en el transporte de carbohidratos al parecer se debe a una baja capacidad de sumidero, más que a la limitación en la fuente (Ruiz y Guardiola., 1994; García – Luis et al., 2002).

Trabajos realizados por Iglesias et al. (2005), con anillado en mandarina Satsuma, plantean la existencia de una correlación entre el contenido en carbohidratos, la producción de etileno y la abscisión del fruto por la base del pedicelo. Estos autores sugieren que las condiciones que determinan niveles altos de azúcares (anillado de ramas) incrementan el contenido en carbohidratos, disminuyendo la producción de etileno y la tasa de abscisión y que una condición opuesta (anillado del pedicelo), reduce la disponibilidad de carbohidratos e incrementa el etileno y la abscisión. Aunque no encontraron evidencias claras del papel regulador del etileno, sugieren que el contenido en carbohidratos y el etileno liberado son dos componentes principales de los procesos de abscisión por esta zona.

La abscisión posterior del fruto es principalmente determinada por factores nutricionales tales como fotoasimilados (Ruiz y Guardiola, 1994; Mehouchi et al., 1995; Ruiz et al., 2001; Iglesias et al., 2003). En este periodo la tasa de acumulación de materia seca del fruto excede la capacidad fotosintética de las hojas de la inflorescencia (Moss et al., 1972; Martínez – Cortina et al., 1991). En efecto, se establece una competencia por los carbohidratos disponibles en el resto de la planta, con un consiguiente agotamiento de las reservas. El nivel de sacarosa en las hojas cae a valores bajos, demostrando una limitación en el suministro de carbohidratos (Sanz

et al., 1978; Ruiz et al., 2001). La disminución en la abscisión de frutos durante este periodo, cuando la disponibilidad de carbohidratos fue incrementada por un aumento en la fotosíntesis (Downton et al., 1987) o por anillado (Ruiz et al., 2001) refuerzan la hipótesis de que la abscisión esta relacionada con la competencia entre frutos por carbohidratos.

La abscisión en relación con el déficit de carbohidratos que se presenta por la competencia entre sumideros (fruto – fruto), ha sido explicada por Gómez – Cadena et al (2000), refiriéndose a un incremento en los niveles de ABA y ACC, y a una mayor liberación de etileno.

2.2. Tipos de inflorescencia, cuajado y crecimiento del fruto

Las características de los frutos en los distintos tipos de inflorescencias se determinan tempranamente en su desarrollo y la tasa de crecimiento inicial se relaciona con la probabilidad de abscisión y con su tasa de crecimiento posterior. Trabajos publicados previamente revelan que las diferencias en la tasa de crecimiento son determinadas en floración. En anthesis, los ovarios son más grandes en inflorescencias con hojas (Guardiola et al., 1984). Estas inflorescencias cuajan una mayor proporción de frutos y forman frutos con una mayor tasa de crecimiento inicial que los de inflorescencias sin hojas (Moss et al., 1972; Guardiola y Lázaro, 1987). En buen número de variedades como los naranjos Valencia (Jahn, 1973), Shamouti (Erner y Bravdo, 1983), Washington navel (Ruiz et al., 2001) y Navelate (Primo-Millo et al., 1977) y la mandarina Clementina (Van-Rensburg et al., 1996), se ha señalado que el porcentaje de cuajado es mayor en las inflorescencias que tienen hojas.

El modelo de abscisión descrito en inflorescencias con y sin hojas, es similar. Inicialmente se presenta una reducción en el número de flores/frutos por inflorescencia, seguido por una reducción en el número de inflorescencias con un fruto al menos (Primo – Millo, et al., 1977; Guardiola, 2000; Ruiz. et al., 2001). En inflorescencias multiflorales la reducción en el número de frutos por inflorescencia puede ser causada por un efecto de dominancia de una flor/fruto (Bangerth., 1989), siendo la flor apical la de antesis más precoz y la primera en iniciar el crecimiento (Sauer, 1951; Lenz, 1966). La presencia de varias flores en la inflorescencia tuvo efecto en la tasa de crecimiento de los frutos más vigorosos cuando se comparan con frutos de inflorescencias uniflorales (Guardiola et al., 1984).

La reducción en el número de flores en el árbol esta acompañada de un incremento en el porcentaje de inflorescencias con hojas y un crecimiento vegetativo más vigoroso (Moss, 1969; Guardiola, 1981)

3. CRECIMIENTO Y DESARROLLO DEL FRUTO

3.1. Estados de desarrollo del fruto

El modelo de crecimiento de frutos cítricos presenta una curva sigmoideal simple, descrito en 1958 por Bain para la variable peso fresco en frutos de naranjo. Posteriormente, Goren y Monselise (1964) para la misma especie y Guardiola y Lázaro (1987), en frutos de mandarina Satsuma (*Citrus unshiu* Marc), encontraron el mismo tipo de curva.

Este modelo se presenta desde la antesis hasta la maduración y en el se distinguen tres fases. La fase I, caracterizada por un aumento en grosor del pericarpio como resultado de una alta división celular. Esta fase es

considerada como de crecimiento exponencial y se inicia desde antesis hasta la caída fisiológica del fruto. La fase II se caracteriza por la vacuolización y alargamiento de las células de las vesículas e incremento de los lóculos, y se considera como fase de crecimiento lineal. En la fase III se presenta una reducción marcada en la tasa de crecimiento, indicando la entrada a la etapa de maduración del fruto (Schneider, 1968; Guardiola y Lázaro, 1987; Tisserat et al., 1987; Tadeo et al., 1988; Coggins, 1988; Burns, 1992).

Durante el crecimiento inicial del fruto (Fase I), el mesocarpo se encuentra dividido en: mesocarpo externo compuesto por células pequeñas, poco vacuoladas, paredes delgadas y abundante citoplasma, el cual es considerado como un meristemo activo que origina células hacia el interior, y en mesocarpo interno, compuesto de células de mayor diámetro, con paredes que se van engrosando hacia el final de esta fase (Tadeo et al., 1988). En o antes de antesis, las vesículas se inician como primordios a lo largo de la superficie adaxial de la pared del endocarpo. Las vesículas surgen como resultado de divisiones anticlinales y periclinales de células epidérmicas y subepidérmicas del endocarpo (Roth, 1977; Burns, 1992).

La duración de la segunda fase de desarrollo del fruto depende de la variedad, variando entre 2 a 3 meses para variedades precoces y más de 5 para variedades tardías. En este periodo, cesa la actividad meristemática de las vesículas en el endocarpo y sus células se vuelven altamente vacuoladas, llegando a alcanzar su máxima longitud y volumen (Roth, 1977; Burns, 1992). En términos absolutos y relativos, el crecimiento en tamaño durante el estado II se debe principalmente al crecimiento de los segmentos. Al respecto, Bain (1958) describe que al final del estado I, el eje central y los segmentos ocupan solo el 5% del volumen total del fruto, mientras que al

final del estado II, representan el 58% del volumen y el 67% del peso fresco del fruto.

Trabajos realizado por Guardiola y Lázaro (1987) señalan que en Satsuma (*Citrus unshiu*) más del 70% de la superficie transversal corresponde a la corteza al momento de la antesis, hasta alcanzar un máximo de 84% a mitad de junio, momento a partir del cual disminuye su porcentaje. Los lóculos mostraron una variación inversa, con un porcentaje creciente desde junio hasta octubre.

En la fase de maduración del fruto (Fase III), la elongación celular se detiene, hay acumulación de sólidos solubles especialmente azúcares y compuestos nitrogenados y los ácidos libres disminuyen como consecuencia de su dilución y metabolización (Roth, 1977; Burns, 1992).

3.2. Factores que determinan el tamaño del fruto

El tamaño del fruto esta determinado por factores internos, que expresados en términos de transporte en la planta hace referencia a su capacidad de sumidero, determinado en parte, pero no exclusivamente por el potencial genético del fruto, y factores externos, que determinan la disponibilidad de metabolitos para el crecimiento del fruto (Guardiola, 1987, 1988; Guardiola y García – Luis, 2000). Estos parámetros están relacionados de un modo sutil, y una reducción en el suministro de metabolitos durante el desarrollo temprano del fruto, puede ocasionar daños irreversibles en la capacidad de sumidero y reducir su tasa de crecimiento en estados posteriores, cuando el suministro no constituye un factor limitante (Guardiola y García – Luis, 2000)

3.2.1. Factores internos del fruto

La capacidad sumidero del fruto es considerada como el factor dominante en la competencia por fotoasimilados y está determinada inicialmente por la calidad de la flor, que a su vez depende de la naturaleza de la inflorescencia y del número de flores formadas en el árbol (Guardiola., 1997).

El potencial de crecimiento del fruto parece estar determinado tempranamente en su desarrollo. El tamaño del ovario en antesis esta inversamente relacionado con el número de flores (Guardiola et al, 1984). Un mayor tamaño de ovario en antesis, se traduce en un crecimiento temprano más acelerado del fruto y un aumento en su tamaño final (Guardiola, 1988).

En varios cultivares de naranja y mandarina se ha establecido una relación inversa entre el número de flores y el tamaño del fruto (Guardiola, 1987). El número de flores también influye sobre la calidad de la flor. Una reducción en el número de flores esta acompañada de un incremento en el porcentaje de inflorescencias con hojas y un crecimiento vegetativo más vigoroso (Moss, 1969; Guardiola, 1981).

El número de frutos finalmente cosechados es una estimación incompleta de los fenómenos de competencia en la fructificación. Un número muy elevado de flores y de frutitos se desprenden durante diversos estadios de desarrollo y la cantidad de metabolitos utilizada en su formación puede representar un porcentaje importante del total utilizado en la fructificación (Guardiola et al., 1984).

Del total de flores formadas en el árbol, el número de frutos que finalmente cuajan se encuentran entre 0.1 y 10 % (Goldschmidt et al., 1977; Guardiola, 1984). El control del número final de frutos cuajados ha sido interpretado como un mecanismo de autorregulación de la planta en función de su capacidad para suministrar metabolitos (Goldschmidt et al., 1996).

3.2.2. Factores externos del fruto

El factor limitante para el crecimiento del fruto cambia durante los distintos estados de desarrollo del fruto. El peso individual del fruto en madurez, esta inversamente relacionado con la cantidad de frutos por árbol (Goldschmidt et al., 1977; Guardiola, 1988). La competencia por fotoasimilados entre frutos explica esta relación (Goldschmidt et al., 1977). Estudios que involucran la translocación de metabolitos con ^{14}C (Powell y Krezdorn 1977), o que indican el incremento en el cuajado y crecimiento inicial en naranja Valencia al crecer en una atmósfera enriquecida con CO_2 (Downton et al, 1987; Idso et al., 1991), confirman el efecto de la disponibilidad de carbohidratos en el desarrollo del fruto.

Independientemente del número de flores inicialmente formadas, la supervivencia de los frutos durante la caída de junio parece estar determinada por la capacidad del árbol para suministrar metabolitos. La capacidad fotosintética de las hojas, más que la demanda por el fruto, usualmente determina la disponibilidad de fotoasimilados (Guardiola, 1988; Goldschmidt y Koch 1996). En cítricos se ha establecido que los frutos en desarrollo importan asimilados de hojas viejas y que las hojas jóvenes no

exportan fotoasimilados hasta que su crecimiento es completado al inicio del periodo de elongación celular (Mehouachi et al., 1995).

La fotosíntesis parece ser crucial en determinar el cuajado del fruto (Iglesias et al., 2002). Una disminución en el número de hojas (Mehouachi et al., 1995), o una inhibición de la actividad fotosintética reduciendo la cantidad de luz (Berüter y Droz, 1991), inducen una mayor abscisión. Contrariamente, experimentos con anillado, aclareo de frutos o suplementación de sacarosa, resultan en un aumento del porcentaje de cuajado, por el incremento de la disponibilidad de azúcares para el fruto en desarrollo (Iglesias et al., 2003).

En árboles de *Citrus unshiu*, la defoliación total o parcial en antesis no reduce los niveles de carbohidratos en frutos en desarrollo pero si incrementa significativamente la primera onda de abscisión (Mehouachi et al., 1995). Agusti et al (2002) plantean en mandarina Satsuma cv “Okitsu”, una reducción en la disponibilidad de carbohidratos inducida por defoliación, que provoca la abscisión de frutos durante el estado de elongación celular.

Aparte de las limitaciones en la fuente o en la capacidad de sumidero, la tasa de crecimiento del fruto puede ser potencialmente limitada por la capacidad del camino de transporte. El sistema vascular del pedicelo muestra un aumento gradual en el número de tubos cribosos y vasos, hasta completar su desarrollo al final de la caída de junio, coincidiendo con la fase lineal de acumulación de materia seca. (Guardiola y García-Luís, 2000).

Bustan et al (1995) sugieren una posible dependencia entre la tasa de crecimiento del fruto y la capacidad del sistema de transporte, al demostrar

una estrecha relación entre tamaño de fruto y área en sección transversal del pedicelo. García Luis et al. (2002) encontraron que la relación entre la vascularización del pedicelo y el tamaño del fruto, parece ser más la consecuencia que la causa de las diferencias en la tasa de crecimiento del fruto y demuestran que las diferencias en vascularización siguen y no preceden las diferencias en la tasa de crecimiento.

3.3. Actividad invertásica y crecimiento del fruto

La reducción de dióxido de carbono a azúcares en presencia de agua y luz se constituye en una característica clave de las plantas. De igual forma se destaca su capacidad para transportar azúcares a tejidos no fotosintéticos (tejidos sumidero). Dependiendo de la actividad fisiológica y de las necesidades bioquímicas de estos tejidos, los azúcares pueden ser utilizados para la construcción de tejidos, para la producción de ATP y NADH o ser acumulados como reservas. Muchos de estos procesos pueden presentarse en la misma célula y en el mismo momento, por lo que requieren mecanismos de control eficientes y precisos para la distribución de la sacarosa (Sturn, 1999; Quick y Schaffer, 1999).

La utilización de sacarosa como fuente de carbono y energía en órganos sumidero, depende de la actividad de enzimas claves capaces de hidrolizarla. Las invertasas son un grupo de enzimas que convierten la sacarosa en los dos monosacáridos que la conforman y al parecer regulan su entrada en los distintos caminos de utilización. Las enzimas que metabolizan la sacarosa son importantes determinantes de la capacidad de sumidero, al generar un gradiente de concentración en la zona de descarga

del floema. Por esta razón, las enzimas responsables de la primera reacción metabólica de la sacarosa, son posiblemente enlaces críticos entre la producción de fotoasimilados en tejidos fuente y la capacidad de crecimiento de órganos sumidero (Farrar, 1996)

Las invertasas existen en varias isoformas con diferentes propiedades bioquímicas y localizaciones subcelulares. Muchas especies de plantas contienen al menos dos isoformas de invertasa vacuolar, acumulándose como proteínas solubles (invertasa ácida soluble), en el lumen de este compartimiento ácido. De igual forma se han detectado varias isoformas de invertasa extracelular (invertasa ácida ligada), que están ionicamente ligadas a la pared celular. La invertasa vacuolar y de la pared, comparten algunas propiedades bioquímicas, por ejemplo, ambas hidrolizan mas eficientemente la sacarosa a pH entre 4,5 y 5. Adicionalmente, las plantas tienen al menos 2 isoformas de invertasa citoplásmica (invertasas alcalinas) con pH óptimo para hidrolizar sacarosa en el rango neutro o ligeramente alcalino (Sturn, 1999; Quick y Schaffer, 1999).

En numerosos estudios, la función de las invertasas fue deducida de una correlación entre su actividad y procesos fisiológicos tales como crecimiento de tejidos o utilización y acumulación de azúcares en órganos sumidero (Lowell et al., 1989). En tejidos que crecen rápidamente se encontró una alta actividad invertasa ácida (Ricardo y Ap Rees, 1970; Lowell et al., 1989), en que el contenido en sacarosa fue bajo o disminuyó rápidamente. Así, la función de la invertasa ácida en estos tejidos es hidrolizar sacarosa bajo condiciones en que haya una alta demanda por hexosas.

La invertasa ácida parece regular la concentración de sacarosa en muchos órganos de la planta (Hubbard et al., 1989; Ross y Davis, 1992). En frutos de mandarina Satsuma, Kubo et al. (2001) encontraron una actividad alta de esta enzima en vesículas de frutos jóvenes, que disminuyó rápidamente con el desarrollo del fruto. Kato y Kubota (1978) también obtuvieron resultados similares. Estos autores plantean que la sacarosa que se transporta es hidrolizada por la invertasa ácida para producir sustrato para el crecimiento de frutos inmaduros, mientras que la enzima es inactivada con el avance del estado de desarrollo del fruto hasta maduración, resultando en una acumulación de sacarosa en el fruto.

Durante la purificación de invertasas de la pared en un cultivo en suspensión de células de tabaco, un pequeño polipéptido de 17 KD inhibió su actividad enzimática dependiendo del pH del medio (Well et al 1990). La alta inhibición fue encontrada a pH 4,5, que es el pH óptimo para la actividad de la invertasa ácida ligada. Se comprobó que los polipéptidos estaban localizados con la enzima en la pared celular, sugiriendo un importante rol fisiológico en la regulación de la actividad invertasa.

La invertasa alcalina generalmente muestra una máxima actividad a pH 7-8, aunque también puede mostrar actividad residual a pH 5. Si la actividad de la invertasa alcalina a pH 7 es aproximadamente $\frac{1}{4}$ de la obtenida a pH 5 puede considerarse que esta probablemente se deba a la actividad residual de la invertasa ácida. La separación de la invertasa alcalina de la ácida puede llevarse a cabo por precipitación diferencial con sulfato de amonio. La invertasa alcalina precipita a bajas concentraciones de sulfato de amonio (20 – 40 %) más no la invertasa ácida (Sturn, 1999; Quick y Schaffer, 1999). Resultados obtenidos por Lowell et al. (1989), en frutos

de pomelo de la variedad Marsh, indican una alta actividad de las invertasas alcalinas en los sacos de zumo, durante el segundo estado de desarrollo del fruto. Además plantean una actividad de degradación conjunta con la sacarosa sintetasa

Las invertasas también pueden estar involucradas en el transporte a larga distancia de sacarosa, al generar un gradiente de concentración necesario entre los sitios de carga y descarga del floema (Eschrich, 1980). Los productos de la hidrólisis de sacarosa, pueden incrementar considerablemente la presión osmótica de las células, sugiriendo una posible función en la expansión celular y crecimiento de las plantas (Gibeaut et al 1990).

4. AUXINAS SINTÉTICAS Y CRECIMIENTO DEL FRUTO

La aplicación de auxinas exógenas a frutos en desarrollo produce varios efectos. Pueden actuar directamente sobre el comportamiento de los tejidos del fruto o modificar las condiciones que determinan la relación fuente – sumidero (Guardiola y García-Luis, 2000). La importancia de dichos efectos depende de la naturaleza y concentración de la auxina aplicada, del estado de desarrollo del fruto, de las condiciones climáticas y del cultivar. (Hirose., 1981; Ortola et al., 1998; Greenberg et al., 1992; Guardiola y García-Luis, 2000).

Tras la aplicación exógena de auxinas, de manera general se presentan cuatro efectos principales (a) una reducción transitoria en la tasa de crecimiento del fruto (b) un efecto directo en la tasa de abscisión del fruto (c) un incremento en la abscisión del fruto que es mediado por síntesis

de etileno inducida por auxinas y (d) un incremento en la capacidad sumidero del fruto. (Guardiola y García-Luis, 2000).

4.1. Incremento del tamaño del fruto

El efecto directo de las auxinas en el crecimiento del fruto en cítricos ha sido reconocido a lo largo del tiempo, y el uso potencial de estos compuestos para incrementar el tamaño de fruto ha sido ampliamente investigado. Las primeras investigaciones sobre el efecto del 2,4-D en el crecimiento del fruto fueron realizadas por Stewart y colaboradores en los años 50 (Stewart et al., 1951, 1952; Stewart y Parker, 1954) en naranjas y pomelos. Sin embargo los parámetros que afectaban la respuesta no fueron caracterizados y los resultados obtenidos condujeron a errores, para ser recomendados luego en prácticas comerciales (Monselise, 1979).

Posteriormente, en los años 80 se realizaron estudios sistemáticos para separar el efecto de la auxina como promotor del crecimiento y su efecto aclarante, y para determinar las condiciones óptimas para su aplicación, en las mandarinas Clementina (Guardiola, 1981; Vanniere et al., 1987, 1989) y Satsuma (Guardiola, 1981, 1988; Guardiola y Lázaro, 1987). Con los resultados obtenidos se plantean dos estrategias para su aplicación: En floración y al final de la caída de junio (Guardiola y García-Luis, 2000).

El aumento en la capacidad sumidero de fruto por la aplicación de auxinas resulta en un crecimiento acelerado de los frutos tratados hasta la maduración (Guardiola y Lázaro, 1987; Ortola et al., 1988; Agusti et al., 1994). La respuesta máxima de este efecto se presenta en muchos cultivares cuando la auxina es aplicada en o poco después de floración (Coggins et al,

1968; Duarte et al., 1996). Aplicaciones localizadas de una mezcla auxínica de 2,4-D y 2,4,5-T en antesis o a los 12, 25 y 45 días después, con aspersiones al árbol entero, incrementaron el peso del fruto por un efecto directo en su capacidad de sumidero (Guardiola et al., 1986)

En mandarina clementina Esbal, la aplicación de 2,4-D (17-20 ppm) en floración, incrementó la tasa de crecimiento del fruto y retrasó la abscisión, resultando en una abscisión posterior más intensa, varias semanas después de la aplicación. El total de frutos cosechados disminuye y los valores de cosecha no variaron de modo significativo (Duarte et al., 1996). En este cultivar, se obtiene una respuesta significativa con aplicaciones realizadas hasta 6 semanas después de floración. Sin embargo, su efecto en el tamaño del fruto es menor que cuando se realiza en floración.

En mandarina Nova se encontró una respuesta similar. En este cultivar la aplicación de 2,4-D es efectiva cuando se realiza hasta 8 semanas después de floración, aunque el efecto en el tamaño del fruto se vuelve marcadamente menor después de 4 semanas. Esta aplicación resultó en una menor (alrededor del 10%) aunque significativa, reducción en la cosecha (Guardiola, 1996).

La aplicación de 2,4-D es también efectiva en incrementar el tamaño de fruto en varios cultivares de naranja. Se encontró una mayor respuesta tanto en el cuajado como en el tamaño de fruto en las naranjas Valencia y Shamouti, cuando se aplica 2,4-D (20 ppm) 6-8 semanas después de floración (Erner et al., 1993). La aplicación en floración no fue efectiva.

Cuando la aplicación de auxinas se realiza antes de la caída de junio, el aumento en la tasa de crecimiento del fruto incrementa la competencia

entre sumideros y causa alguna abscisión de frutos. La abscisión no está relacionada con la síntesis de etileno inducida por auxinas y puede presentarse varias semanas después de la aplicación de la auxina (Guardiola y Lázaro, 1987; Ortola et al., 1988; Ortola et al., 1991)

La aplicación de 2,4-DP (como éster butilglicólico), en mandarina clementina fina al finalizar la caída de junio, tuvo un efecto directo sobre el tamaño final del fruto, no modificó el número de frutos que permanecieron en el árbol hasta su recolección (un ligero efecto aclarante) y no se presentó el efecto depresivo transitorio que ocurre con otras auxinas. (Agusti et al., 1991). En este mismo cultivar, con aspersiones al árbol entero de 3,5,6-TPA en concentraciones de 10, 15, 20, 25 y 30 mg/l, cuatro semanas después de la caída de junio, (Diámetro 20 – 21.5 mm), se incrementó significativamente el peso y tamaño final del fruto, sin ninguna reducción en el número y cosecha final. La concentración más efectiva fue de 15 mg/l (Georgiu, 1998).

Ronca et al. (1997) obtuvieron en el cultivar de limón “Lisbon”, una respuesta diferencial sobre el tamaño del fruto, dependiente del tipo de auxina, de la fecha de aspersión y de la concentración usada. Estos autores asperjaron al árbol entero 2,4-DP (37.5 y 75 mg/l) o 3,5,6-TPA (10, 15 y 20 mg/l), al final de la caída de junio y 14 días después, y encontraron que la aplicación de 3,6,5-TPA en la primera fecha incrementó el peso del fruto independientemente de la concentración usada. En la segunda fecha de aplicación, solo altas concentraciones estimularon un mayor incremento en el peso fresco. La aplicación de 2,4-DP en una concentración de 75 mg/l, incremento el peso final del fruto en las dos fechas de aplicación, pero en la primera tuvo un efecto aclarante y una reducción en la cosecha.

El tamaño del fruto es marcadamente afectado por las características de los frutos del árbol (floración y carga de cosecha), factores ambientales y prácticas culturales, y estos factores determinan la estrategia a tener en cuenta en la aplicación de auxinas (Guardiola y García – Luis, 2000).

4.2 Auxinas sintéticas y abscisión

El efecto directo de la auxina en la abscisión, causa un retraso en la misma resultando eventualmente en un incremento del cuajado (Coggins et al, 1968; Germberg et al., 1992; Erner et al., 1993). La auxina retrasa la abscisión que ocurre en el pedicelo tempranamente en el desarrollo del fruto, pero este efecto no es observado en la abscisión que se presenta posteriormente por la base del ovario. Este efecto en la abscisión es más marcado cuando la aplicación se realiza tempranamente en el desarrollo del fruto y la síntesis de etileno es baja o inhibida. Las auxinas fenoxiacéticas son las más efectivas en favorecer este retraso en la abscisión.

Duarte et al. (1996) obtuvieron con la aplicación de 2,4-D en floración, una reducción en el número de frutos en mandarina clementina Esbal. Este efecto aclarante no parece estar relacionado con la síntesis de etileno inducida por auxinas, el cual se completa usualmente dentro de 3 semanas después de la aplicación (Guardiola, 1996). El efecto aclarante en el número de frutos se presentó 6 a 7 semanas después de la aplicación de auxinas. Este efecto parece estar más relacionado con cambios en la relación fuente sumidero, más que con un efecto directo de la auxina en el fruto.

La aplicación localizada de diferentes soluciones de auxinas (2,4-D; 2,4,5-T; NAA; BNOA; 2,4,5-TPA; IZAA), por inmersión de frutos de

mandarina Satsuma (Guardiola et al., 1987) y con la aspersión a todo el árbol de 3,5,6-TPA en mandarina Oronules (Aznar et al., 1995), provocó una reducción transitoria en la tasa de crecimiento del fruto, presentando además un alto poder abscisor. A pesar de este efecto en la abscisión, el aumento en el peso y tamaño final del fruto compensaron la producción final.

A diferencia de las auxinas fenoxiacéticas, la aplicación localizada de NAA a frutos de mandarina Ssatsuma, entre 20 y 70 días después de anthesis, incrementó la abscisión del fruto y fue disminuyendo con la edad hasta hacerse insignificante al final de la abscisión natural (55 dda); esta abscisión es inducida por síntesis de etileno. Con aplicaciones al inicio de la caída de junio, se presentó un efecto aclarante, selectivo para frutos pequeños, y un efecto directo en el incremento de la tasa de crecimiento del fruto. (Ortola et al., 1997)

5. AUXINAS Y DESARROLLO IN VITRO DE LOS TEJIDOS DEL FRUTO

Los resultados obtenidos hasta el momento sobre el cultivo *in vitro* del fruto, confirman que este sistema sirve como modelo de estudio de la biosíntesis, metabolismo y regulación de los constituyentes y factores que determinan el crecimiento y desarrollo del fruto. La respuesta *in vitro* de células, tejidos y órganos, puede variar de acuerdo con las condiciones de cultivo, el tipo de explanto y el genotipo de la planta, y esta regulada por la interacción y balance entre reguladores de crecimiento suministrados al

medio y sustancias de crecimiento producidas endogenamente por el explanto (George, 1993)

Las células de las plantas usualmente no retienen la característica original del tejido u órgano fuente. Cuando un tejido aislado es introducido en un ambiente estéril, con frecuencia pierde su integridad estructural y se diferencia en una masa de células que se divide rápidamente (Kordan, 1977). La rápida división celular iniciada cuando un tejido es transferido a un medio nutritivo, usualmente se presenta en meristemos que se forman alrededor de la periferia del explanto (George, 1993).

La inducción y crecimiento consistente de callo en explantos de albedo de *Citrus limon*, fue investigada en 1969 por Murashige y Tucker, encontrando una respuesta progresiva en la inducción de crecimiento con la adición de 2,4-D en concentraciones de 3×10^{-6} M. Posteriormente Amo – Marco y Picazo (1994), utilizando el mismo tipo de auxina y adicionando además, distintos niveles de concentración de zumo de naranja, encontraron el mismo tipo de respuesta en explantos de albedo de frutos de naranja de Washintong Navel. Estos autores obtuvieron el máximo crecimiento de callo en explantos de albedo de frutos que se encontraban entre el inicio y la mitad del estado II de desarrollo, en que se presenta una alta actividad fisiológica.

Kordan (1975), encontró en una serie de estudios que las vesículas de zumo de cítricos son unidades de crecimiento dinámicas que con frecuencia forman callo, independientemente de la composición del medio. Gulsen et al (1981) y Altman (1982), hicieron las primeras observaciones sobre el desarrollo organizado de vesículas sin formación de callo y encontraron que los reguladores de crecimiento benziladenina (BA), ácido

giberelico (GA₃) o ácido naftilacético (ANA), estimularon en mayor grado este proceso.

Trabajos realizados por Guardiola et al (1993), plantean la formación de callo en explantos de endocarpo de frutos de *Citrus unshiu*, de 5 a 50 días de edad, independientemente del tratamiento hormonal. Con explantos de frutos de 60 días y con concentraciones ligeramente altas (10^{-7} a 10^{-8} M), de 2,4,5-T, obtuvieron un desarrollo organizado de vesículas, con poco o sin formación de callo. Estos autores relacionaron la respuesta de los tejidos del fruto con su estado de desarrollo. Estos resultados son confirmados por Harada et al (2001), quienes plantean que la formación de callo es característica de tejidos que se dividen activamente y que en explantos de endocarpo se puede presentar cuando la actividad meristemática de las vesículas se mantiene; una vez esta actividad meristemática cesa, la respuesta de los explantos se manifiesta en el desarrollo organizado de vesículas.

La respuesta del tamaño del explanto de frutos de *Citrus limon* a varios niveles de concentración de carbohidratos y utilizando como fuente de auxina el 2,4-D, fue investigada por Tisserat et al (1989), concluyendo que al cultivar pequeñas piezas de fruto se obtiene una mayor formación de callo, al parecer debido al daño que se produce al tejido al momento de obtener el explanto. Utilizando como explanto la mitad del fruto, las vesículas contenidas en la cavidad locular manifestaron un desarrollo organizado.

OBJETIVOS DEL TRABAJO

Se contempla como objetivo de esta investigación, realizada en el naranjo dulce *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, variedad Salustiana, los siguientes aspectos:

1. Caracterizar los procesos de abscisión y crecimiento del fruto, determinando la influencia del tipo de inflorescencia y del nivel de floración del árbol.
2. Determinar la influencia de la aplicación de 2,4-D sobre el patrón de abscisión y de crecimiento del fruto, caracterizando en cada estado de desarrollo, los niveles de concentración de azúcares en el fruto y la evolución de la actividad invertásica
3. Caracterizar la respuesta *in vitro* de los tejidos del fruto con la adición de auxinas al medio, determinando la influencia de la edad y tipo de explanto y del nivel de concentración de la auxina aplicada.

1. MATERIAL VEGETAL

El estudio se realizó en un huerto de naranjo dulce, (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) cv. Salustiana, injertado sobre patrón citrange Troyer (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf) con árboles de 20 años de edad. Las plantas presentan vecería y su intensidad de floración esta determinada por la floración del año anterior. En la parcela utilizada se encuentran en un mismo año árboles con intensidades de floración muy diferentes, lo que ha permitido en años consecutivos evaluar la abscisión y los procesos de crecimiento del fruto en árboles con diferentes niveles de floración.

Los detalles de los experimentos realizados y el tipo de material muestreado se describen en el apartado de resultados.

2. ABSCISIÓN Y CRECIMIENTO DEL FRUTO

2.1. Determinación de la abscisión en inflorescencias con hojas

Se marcaron 132 inflorescencias distribuidas en 11 árboles el año de 2003, y el año de 2004 se distribuyó 200 inflorescencias en 10 árboles. Periódicamente se contabilizó el porcentaje de inflorescencias con flor / fruto y el número de flores / frutos por inflorescencia. Estos datos se utilizaron para el cálculo de la abscisión absoluta, calculada como porcentaje del número de frutos caídos en cada periodo considerado, en relación a los iniciales y para el cálculo de la tasa media de abscisión diaria

(abscisión relativa) entre los periodos de observación, calculada como porcentaje de frutos o de inflorescencias con fruto presentes al inicio del periodo considerado, del modo:

$$AA = \frac{Ni_p - Nt}{Ni \cdot d} \times 100$$

$$AR = \frac{Ni_p - Nt}{Ni_p \cdot d} \times 100$$

Donde:

Ni = nº de flores / frutos presentes al principio

Ni_p = nº de flores / frutos al inicio de cada periodo

Nt = nº de flores / frutos presentes al final

d = N° de días

2.2. Determinación de la abscisión total.

Para la determinación de la abscisión, el 6 de abril de 2004 se extendieron lonas debajo de cada árbol para recoger las flores/frutos caídos. Periódicamente se recogió el material que se encontraba en las lonas. En el laboratorio, el material recogido se pesó, se seleccionaron dos alícuotas para hacer el conteo del número de flores/frutos, y se determinó la zona de abscisión por la cual habían caído.

2.3. Variables de crecimiento del fruto

Se evaluaron las variables diámetro, peso fresco y peso seco del fruto. Las mediciones se realizaron en cada fecha de muestreo, desde antesis hasta la cosecha. Para determinar el diámetro de fruto se utilizó un pie de rey digital con una precisión de 0,05 mm, midiendo la región ecuatorial de los frutos de las inflorescencias etiquetadas. Con base en el diámetro medio de estos frutos, se cogieron muestras representativas de cada tipo de inflorescencia, para determinar su peso fresco, para lo cual se utilizó una balanza digital con una precisión de 0,001 g. Posteriormente los frutos se desecaron en estufa a 70 °C durante 72 horas para determinar su peso seco.

3. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

3.1. Estimación de la actividad invertasa

Se evaluó la actividad invertasa del fruto completo (experimento de 2003) y de los tejidos separados: corteza y vesículas (experimento de 2004), en inflorescencias multiflorales con hojas.

En los dos años de experimento se tomaron dos muestras de frutos en árboles testigos y tratados con 2,4-D, en cada fecha de muestreo. El número de frutos en cada muestra dependió de su tamaño al momento de realizar el muestreo. Los frutos completos o los tejidos separados se trocearon y se mantuvieron en nevera hasta ser procesados.

Para la extracción, se maceró 1 gramo de peso fresco en mortero, enfriado previamente en nevera, con arena de cuarzo y tampón citrato - fosfato 10 mM, pH 7,5 (tampón de extracción), hasta adquirir consistencia

de pasta homogénea. El tampón permaneció en nevera previo a su utilización.

El macerado se lavó tres veces con 10 ml de tampón de extracción y se filtró a través de cuatro capas de gasa, centrifugando cada filtrado a 12.000 r.p.m. durante 20 min, hasta completar al final de la tercera centrifugación 30 ml. El sobrenadante se aforó a 50 ml con tampón de extracción y con él se determinó la actividad de invertasas solubles. El precipitado se resuspendió en 50 ml con tampón de extracción y con él se determinó la actividad de invertasas ligadas. Todo el proceso se realizó sobre una bandeja con hielo con el fin de mantener inactivas las enzimas.

3.1.1. Incubación

A partir del extracto obtenido se hicieron tres repeticiones por muestra en cada tratamiento. Para la incubación, se tomó 1 ml de extracto y se agregó 1 ml de solución de sacarosa 0.2 M, en los siguientes tampones (1 ml):

1. Citrato – fosfato 50 mM, pH 4,5: para determinar invertasas ácidas.
2. Citrato – fosfato 10 mM, pH 7,5: para determinar invertasa alcalinas.
Dado que en este pH se presenta cierta actividad de invertasas ácidas, es necesario efectuar una tercera incubación para definir la actividad de invertasas alcalinas.
3. TRIS, 10 mM, pH 7,2: Inhibe en 100 % la actividad de invertasas alcalinas, pero no la de ácidas (Kato y Kubota, 1978). Por diferencia con el valor anterior se obtiene la actividad de invertasa alcalina propiamente dicha.

Para los dos primeros tampones, se preparó por separado una solución 10 mM de ácido cítrico y fosfato bisodico y posteriormente se mezclaron hasta ajustar el pH indicado. El pH del tampón Tris se ajustó con ácido clorhídrico.

Los blancos contienen 1 ml de solución de sacarosa 0.2 M en los respectivos tampones; se incubó uno por cada muestra. Las muestras y sus blancos se incubaron en baño maría a 30°C durante 30 minutos

3.1.2. Determinación

Los azúcares liberados de la hidrólisis de sacarosa se determinaron por el método de Somogy – Nelson (Nelson, 1944). Los reactivos de Somogy y Nelson se prepararon como se describe a continuación:

Somogy

Se disuelven 28 g de fosfato bisodico y 40 g de tartrato sódico – potasico en 700 ml de agua destilada. Se añaden 100 ml de NaOH 1N. y manteniendo esta solución en agitación constante, se adicionan 80 ml de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 10% gota a gota y 180 g de sulfato de sodio anhidro, completando a 1 l con agua destilada. Se deja en reposo por 2 días y se filtra; guardar en frasco oscuro a 37 °C y filtrar antes de su uso.

Nelson

Se disuelven 25 g de molibdato de amonio en 450 ml de agua destilada. Cuidadosamente, se adicionan 26 ml de ácido sulfúrico concentrado y 3 g de arseniato dibasico de sodio disuelto en 25 ml de agua. Se mantiene en reposo en frasco oscuro durante dos días antes de su uso.

Una vez terminado el proceso de incubación, se adicionaron 2 ml de reactivo de Somogy a las muestras y sus blancos, para detener la reacción enzimática. A los blancos además se les adicionó 1 ml de la muestra respectiva. Los tubos se agitaron y se hirvieron en baño maría durante 15 minutos, posteriormente, se enfriaron en agua corriente y se adicionaron 2 ml de reactivo de Nelson y 4 ml de agua destilada. Después de 10 minutos, las muestras correspondientes a invertasas ligadas y sus blancos se filtraron a través de papel whatman N° 2. Finalmente todos los tubos se agitaron en agitador mecánico y la densidad óptica se leyó a 500 nM.

Los valores obtenidos se interpolaron en curvas standard para cada tampón por separado, la cual debe considerar: 1 ml de tampón de extracción, tres disoluciones de glucosa entre 0 y 200 ppm y 1 ml del tampón respectivo. La curva patrón se procesó paralelo con las muestras a partir de la adición del reactivo de Somogy. Los resultados se expresaron como nkat/g.

3.2. Extracción y determinación de azúcares

Se cuantificaron los niveles de azúcares en frutos completos (experimento de 2003) y de los tejidos separados: corteza y vesículas (experimento de 2004), en inflorescencias multiflorales con hojas. Para ello, en todos los casos se desecó el material en estufa a 70 °C durante 72 horas, se trituró en molino de paletas y se pasó por un tamiz de metal CISA N° 30 de 0,2 mm.

3.2.1. Extracción

A 400 mg de muestra molida se añadieron 15 ml de etanol al 80% previamente calentado durante 5 minutos. Se dejó hervir la solución durante 10 minutos agitando constantemente. Posteriormente se centrifugó durante 10 minutos a 7500 rpm. y a 22-23 °C. Tras el centrifugado, el sobrenadante se colocó en un erlemeyer. Este proceso se repitió dos veces más.

El extracto resultante se evaporó en rotavapor a 50 °C y se resuspendió con 10 ml de ácido acético 0,05 M. Posteriormente se centrifugó a 15.000 rpm durante 15 minutos y el sobrenadante se recogió en botellas color topacio.

3.2.2. Purificación del extracto

Los extractos se purificaron utilizando cartuchos de extracción en fase sólida C18 Sep-Pak (Waters) conectados a jeringas plásticas desechables. Los cartuchos se acondicionaron pasando 10 ml de metanol y luego 10 ml de ácido acético 0,1 M. Posteriormente, las muestras se pasaron por los cartuchos y se recogió el eluido en un frasco de rotavapor. Los cartuchos se lavaron con 2 ml de ácido acético 0,1 M y el eluido se añadió al extracto anterior, y se evaporó con rotavapor a 50 °C hasta sequedad. Finalmente, se añadió 1 ml de agua Mili Q, se filtró con Milipore tipo HV de 0,45 µm y se guardó en el congelador en tubos de Eppendorf para su utilización en la cuantificación de carbohidratos por HPLC.

3.2.3. Separación cromatográfica y cuantificación de carbohidratos

La separación por HPLC se llevó a cabo en una columna Tracer Carbohidrat (25 x 0,46 cm.) de 5 μ de tamaño de partícula equipada con precolumna para carbohidratos de Teknokroma. Se tomaron 20 μ l del extracto conteniendo entre 100 y 500 μ g de azúcares y se eluyó con un flujo de 1,5 ml/min acetonitrilo : agua (80% de acetonitrilo para la separación de glucosa y fructosa y 75% de acetonitrilo para la separación de sacarosa).

La identificación y cuantificación de los azúcares se realizó utilizando un refractómetro diferencial R401 (Water Associates) y se comparó las áreas de los perfiles cromatográficos de las muestras procesadas con los obtenidos con patrones de glucosa, fructosa y sacarosa. El cálculo y análisis de los resultados se realizó utilizando el programa de procesamiento de datos cromatográficos Millennium 32 (Water Associates)

4. COMPORTAMIENTO IN VITRO DE LOS TEJIDOS DEL FRUTO

4.1. Preparación de explantos

La superficie de los frutos se lavó con un detergente no iónico y luego, varias veces, con agua destilada. Posteriormente se esterilizaron en cámara de flujo laminar, primero con etanol al 80% durante 2 minutos, seguido por una inmersión en hipoclorito de sodio al 30% durante 30 minutos. A esta solución se le añadió mojante Tween-20 para favorecer el proceso. Tras la esterilización, se realizaron tres lavados con agua destilada estéril, el primero de 5 minutos y los dos restantes de 10 minutos. Una vez esterilizados los frutos, se pasaron a placas petri y se hicieron cortes transversales por la región ecuatorial, aproximadamente de 3 mm de grosor, diferenciando la zona basal del explanto (corte más próximo a la zona de abscisión del pedicelo) de la apical, al momento de realizar la siembra.

4.2. Medio de cultivo

Los explantos se cultivaron en medio basal que contenía las sales inorgánicas de Murashige y Skoog (1962), con 100 mg/l de *m-inositol*, 1 mg/ml de Tiamina – HCl y 30 g de sacarosa. El medio se suplementó con 10% de zumo de naranja (v/v), para estimular la actividad de crecimiento in vitro de los tejidos.(Erner et al., 1975). Para la solidificación del medio, se añadió 8 g. de agar previo al autoclavado. El pH del medio se ajustó a 5.7 con 0.1 N KOH y se autoclavó por 30 minutos a 115 °C (Guardiola. et al., 1993).

Las hormonas se esterilizaron por filtración y se adicionaron al medio de cultivo ya estéril, tras alcanzar una temperatura que no inactivara su acción. Una vez incorporadas, el medio se agitó para distribuir las homogéneamente repartiéndose 50 ml. en cada recipiente de cultivo previamente esterilizado. Posteriormente, cada recipiente se cerró con tapa de plástico y se cubrió con papel aluminio. Tras la siembra, los recipientes se incubaron durante 35 días en oscuridad a 27 ± 1 °C. Los tratamientos se describen en la tabla 1.

Tabla 1. Diseño de tratamientos

Tipo de explanto		Concentración de AIA (mg/l)				No. Exp	No. Rep.
Región ecuatorial del fruto	F.G	17 (10^{-5} M)	1.7 (10^{-5} M)	0.17 (10^{-5} M)	0.017 (10^{-5} M)	15	3
	F.M					15	3
	F.P					10	2
Tejidos de fruto separados	Exocarpo	17 (10^{-5} M)	1.7 (10^{-5} M)	0.17 (10^{-5} M)	0.017 (10^{-5} M)	32	8
	Mesocarpo						
	Endocarpo						

F.G: Frutos grandes, F.M: Frutomedianos, F.P: Frutos pequeños, No. Exp: Número de explantos, No. Rep: Número de repeticiones.

4.3. Tratamiento histológico

4.3.1. Fijación y deshidratación

Se seleccionaron explantos tras 7 y 35 días de incubación. El tejido fijado fue sumergido en alcohol al 70% durante 5 minutos y posteriormente deshidratado en las soluciones de concentración creciente de alcohol butílico durante el tiempo indicado en la tabla 2. (Johansen, 1940)

Tabla 2. Composición de las series butílicas

Tiempo	Serie Butílica Terciaria	Agua	Alcohol Metílico	Alcohol Eílico	TBA puro
24h	TBA 70%	30	50	---	20
1'5h	TBA 85%	15	50	---	35
1'5h	TBA 95%	---	45	---	55
1'5h	TBA 100%	---	---	25	75
1'5h	TBA Absoluto	---	---	---	---
24h	TBA Absoluto	---	---	---	---

4.3.2. Infiltración e inclusión en parafina.

Una vez deshidratado el material, se depositó en viales de vidrio que contenían una mezcla líquida 1:1 de butanol y parafina (Parafin wax, de Fluka Chemika ®). El material se mantuvo en estufa a 60°C durante 24 horas y transcurrido este tiempo, se sustituyó por parafina pura y se mantuvo durante 24 horas.

Posteriormente, se colocó una capa de parafina líquida en moldes de papel parafinado, se tomó el material de los viales y se introdujo en el

molde, orientando el material antes que la parafina solidificara. Seguidamente, el molde se introdujo en agua helada para que la parafina formara un bloque sólido y uniforme.

4.3.3. Preparaciones histológicas

Una vez sólidos los bloques de parafina se montaron sobre tacos de madera, se ajustaron sobre un microtomo de deslizamiento R. Jung y se realizaron cortes de 12 μm de grosor.

Paralelamente, se colocaron portaobjetos con una capa de adhesivo Haupt como adhesivo y una gota de agua formolada al 2%, en una placa calefactora. Una vez realizado el corte, se colocó sobre el portaobjetos y se dejó en la placa calefactora aproximadamente durante 24 horas hasta que se secó el pegamento. El adhesivo Haupt se preparó añadiendo a 100 ml de agua destilada a 30°C, 1 g de gelatina, 2 g de cristales de fenol y 15 ml de glicerina; la mezcla se agitó hasta lograr la disolución de la gelatina.

4.3.4. Desparafinado

Antes de realizar la tinción, los cortes se hidrataron para poderlos pasar por safranina acuosa. El desparafinado e hidratación se detalla en la tabla 3.

Tabla 3. Procedimiento de desparafinado e hidratación

	Concentración	Tiempo
Desparafinado	Xileno	Inmersión durante 1 hora
Hidratación	Xileno – Etanol absoluto 1:1	30 minutos
	Etanol 70%	15 minutos
	Etanol 50%	15 minutos
	Etanol 30%	15 minutos
	Agua	15 minutos

4.3.5. Tinción y montaje de preparaciones

El procedimiento para realizar la tinción fue el siguiente:

- **KOH 0.1%**: Inmersión durante 5 minutos
- Dos lavados con **agua destilada** durante 5 minutos cada uno
- **Safranina acuosa**: Inmersión durante 10 minutos
- Lavado del exceso de colorante con **agua destilada**
- Para la deshidratación del tejido, inmersión en **etanol 70%** durante 5 minutos y en **etanol 96%** durante 5 minutos.
- **Verde luz**: Inmersión durante 1 minuto.
- Lavado muy rápido en **etanol 96%**

- **Etanol absoluto:** Dos inmersiones durante 2 minutos
- **Carbol tolueno:** Inmersión durante dos minutos.
- **Tolueno:** Dos inmersiones durante 1 minuto.

Una vez finalizado, los portaobjetos se sacaron del último tolueno y se colocó encima de cada corte una gota de Entellan disuelto en tolueno. Seguidamente se colocó un cubreobjetos y con aguja se hizo presión para evitar la formación de burbujas.

4.3.6. Observación y fotografía

Las observaciones de las preparaciones se realizaron en un microscopio óptico Nikon – SE; las fotografías de las preparaciones completas se realizaron en una lupa de luz transmitida y los detalles en un microscopio Nikon – Optiphot – 2, con una cámara Nikon colpix de 3.34 mega píxeles.

5. Análisis estadístico

Para comparar las medias se realizó un análisis de varianza, utilizando como software el SPSS, en el que se incluye la prueba de DMS y los subconjuntos homogéneos según DUNCAN.

Se realizó un análisis de regresión de algunos parámetros (contenido en azúcares y actividad invertasa), y en los casos en que se generó un modelo lineal, se compararon las rectas de regresión para determinar el factor más determinante en la regresión y las diferencias en las pendientes y en el punto de corte. Para esto se utilizó como software el Statgraphics.

1. ABSCISIÓN Y CRECIMIENTO DEL FRUTO

El estudio se llevó a cabo durante 2 años consecutivos (2003 y 2004). En los dos años se seleccionaron árboles con un nivel alto de floración.

En el año 2003 se midió la abscisión y las variables de crecimiento: diámetro, peso fresco y peso seco del fruto, en inflorescencias multiflorales con hojas. Para ello se marcaron un total de 132 inflorescencias distribuidas en 11 árboles (12 inflorescencias por árbol) con 5 flores y 5 hojas y con un tamaño homogéneo de botón floral apical. La selección se realizó el 17 de abril y a partir de esta fecha se hicieron observaciones semanales para determinar el momento de la antesis. El 30 de abril, más del 50% de las flores se encontraban abiertas.

En el experimento realizado el año 2004, además de las inflorescencias multiflorales, se incluyó el estudio de inflorescencias con hojas portadoras de una única flor apical terminal, comparando su comportamiento con las inflorescencias multiflorales. Para ello se marcaron un total de 100 inflorescencias de cada tipo distribuidas en 10 árboles (10 inflorescencias de cada tipo por árbol). La selección se realizó el 15 de abril y en todos los casos se tomó como referente que el botón floral apical estuviera próximo a abrir. El 22 de abril más del 50% de las flores se encontraban abiertas. Las características de las inflorescencias seleccionadas (nº de hojas y de flores por inflorescencia) se presentan en la tabla 4.

Tabla 4. Características de las inflorescencias seleccionadas en el estudio 2004. De cada parámetro se presentan los valores medios y la desviación típica (entre paréntesis) de las poblaciones.

	Nº de Hojas	Nº de Flores	Nº de Inflorescencias
Uniflorales	5,5 (1)	1	100
Multiflorales	5,1 (0,8)	5,4 (1,2)	100

El comportamiento productivo de los árboles en los dos años de estudio difirió en el número de frutos cuajados, en el tamaño de fruto y en la cosecha (Tabla 5). Los valores del número de frutos y de la cosecha final fueron mayores en la recolección de enero de 2005, mientras que el peso del fruto fue significativamente mayor en la recolección del año anterior ($P \leq 0,03$).

El peso medio del fruto es afectado por el número de frutos por árbol. Al considerar los datos de cosecha de los dos años de estudio, se presenta una correlación significativa entre estas dos variables ($P \leq 0,018$; Figura 2).

Tabla 5. Datos de la cosecha de los árboles utilizados en los 2 años de experimento.

Año	Peso medio de fruto (g)	Cosecha (Kg./árbol)	Frutos (n° / árbol)
2004 (14 de febrero)	122	57	465
	131	75	576
	134	54	407
	131	36	270
	118	117	992
	133	147	1100
	120	37	312
	125	58	458
	171	157	914
	148	151	1026
	160	73	458
Media ± ES	136 ± 5	88 ± 14	634 ± 93
2005 (21 de enero)	95	203	2267
	110	121	1110
	89	203	2490
	144	163	1253
	103	154	1609
	145	178	1470
	111	238	2607
	125	180	1579
Media ± ES	115 ± 7	180 ± 11	1798 ± 182

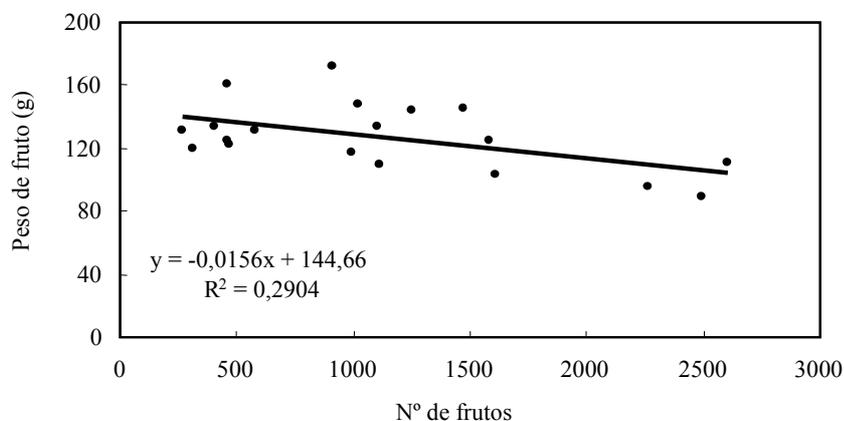


Figura 2. Regresión lineal del peso medio de fruto en función del número de frutos por árbol, para los datos de cosecha de los dos años de experimento.

La variación en el número de flores por árbol afectó al número de frutos cuajados. La correlación entre este parámetro y el porcentaje de cuajado es significativa ($P \leq 0,0015$). Se presenta una relación inversa entre estas dos variables hasta un nivel aproximado de 65.000 flores por árbol, con una tendencia a estabilizarse hacia un nivel de floración mayor. (Figura 3).

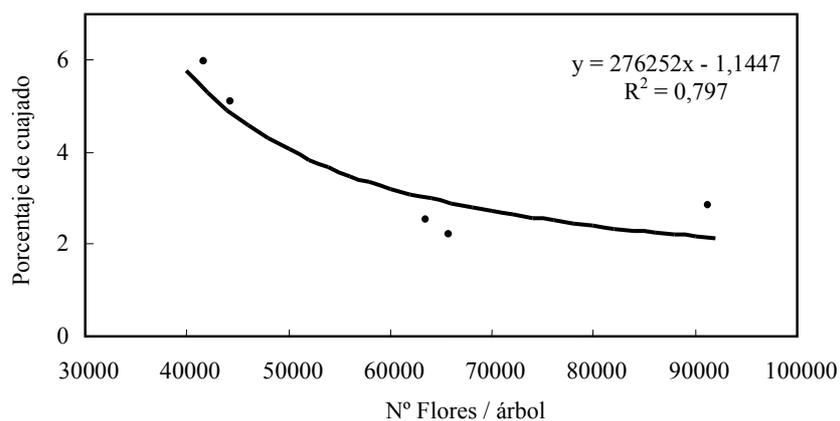


Figura 3. Relación entre número de flores por árbol y porcentaje de frutos cuajados.

Al considerar la abscisión del total de flores – frutos presentes en el árbol y teniendo en cuenta la zona de abscisión por la cual caen, se distinguen dos periodos (Figura 4). Un primer periodo se presenta desde antesis hasta 42 días después con un 58% de abscisión de flores y frutos que caen por la zona de abscisión del pedicelo; un segundo periodo, entre los días 42 y 74, representado por un 27 % de frutos que se desprenden por el cáliz frente al 12 % que lo hacen por el pedicelo. A partir del día 74 la abscisión se detiene.

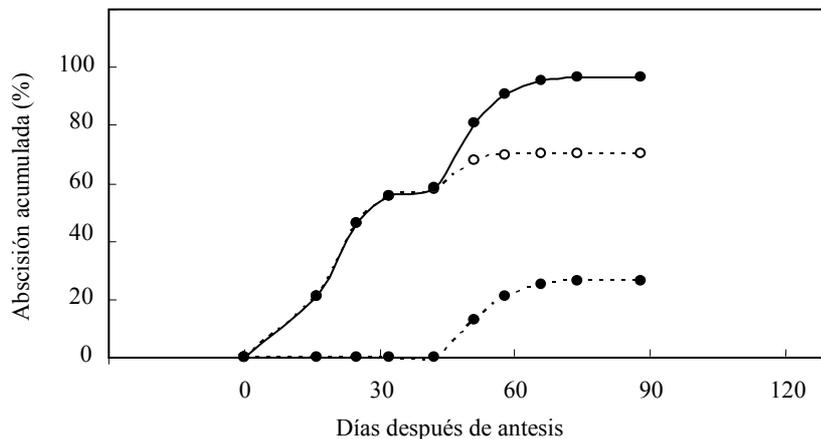


Figura 4. Abscisión acumulada de flores-frutos, teniendo en cuenta la zona de abscisión por la cual caen: Abscisión total (—●—), zona de abscisión del pedicelo (-○-), zona de abscisión del cáliz (-●-). Experimento realizado en el año 2004.

La tasa de abscisión en términos absolutos y relativos, presentó dos máximos, el primero el día 22, con una tasa media de abscisión relativa diaria de 4 % y el segundo del día 42 con un 9 % (Figura 5).

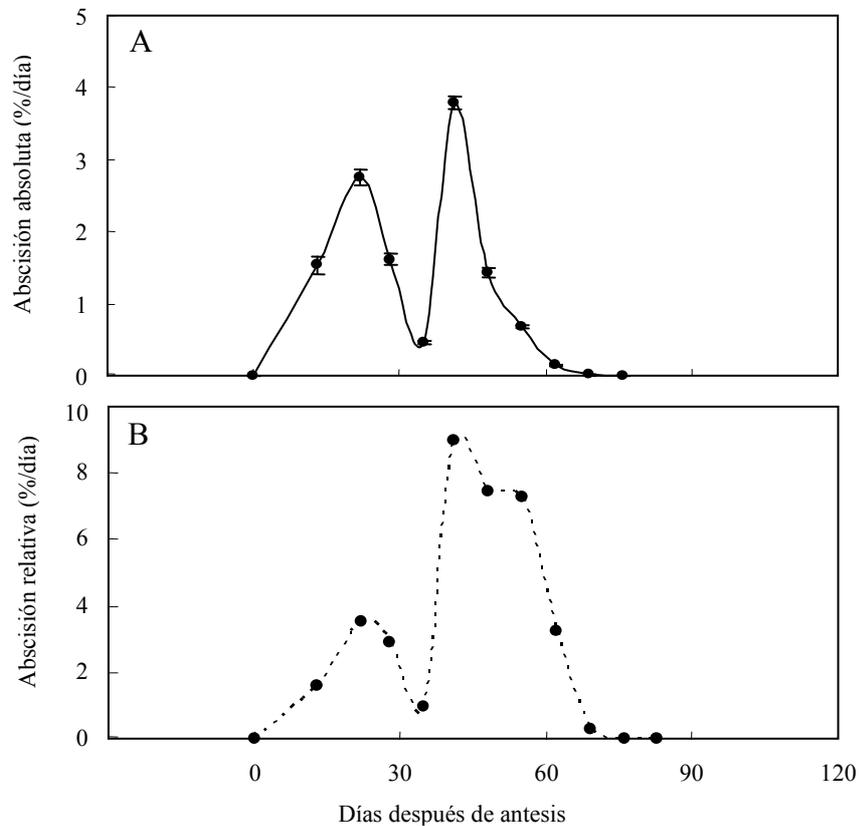


Figura 5. Abscisión en términos absolutos (A) y relativos (B).

1.1. Influencia del tipo de inflorescencia sobre el patrón de abscisión

En los dos años de estudio la abscisión de frutos en inflorescencias multiflorales es lenta hasta el día 22 en el 2003 y hasta el día 26 en el 2004. En este periodo el porcentaje de abscisión fue más elevado en el año 2004 (18 %) que en el 2003 (7 %). A partir de este momento la abscisión aumentó considerablemente hasta alcanzar su máximo el día 67, con un 89%, en que se detuvo (Figura 6).

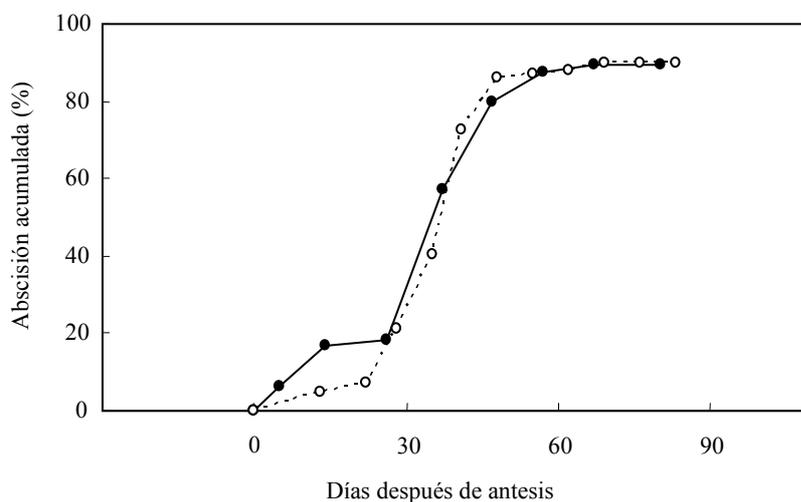


Figura 6. Abscisión acumulada en inflorescencias multiflorales con hojas, en los dos años de experimento: 2003 (·-o-·) y 2004 (—●—).

La pauta de abscisión fue afectada por el tipo de inflorescencia. Al considerar el porcentaje de inflorescencias que retienen algún fruto (Figura 7), el comportamiento difiere entre los dos tipos de brotes estudiados. En inflorescencias multiflorales, la reducción en el número de inflorescencias que conservan al menos un fruto se presenta a partir del día 26, mientras en las uniflorales, da inicio inmediatamente tras la antesis. En ambos tipos de inflorescencias, la reducción en el número de ellas con un fruto al menos se completó el día 67, en que se detuvo. El 55 % de inflorescencias multiflorales retiene algún fruto frente al 39 % de inflorescencias uniflorales.

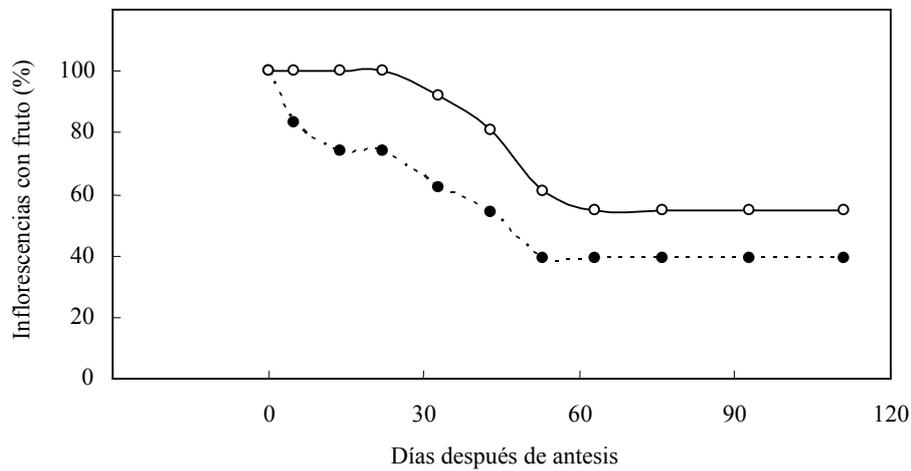


Figura 7. Porcentaje de inflorescencias con un fruto al menos en brotes multiflorales (—○—) y uniflorales (··◆···), durante la post-antesis. Antesis: 22 de abril de 2004.

La reducción en términos absolutos y relativos, alcanza un máximo el día 53 (Figura 8). En inflorescencias uniflorales se presentan dos máximos, el primero el día 14 y el segundo el día 53. La tasa de reducción en términos absolutos es mayor en brotes uniflorales desde antesis hasta 33 días después, y posteriormente es superior en multiflorales.

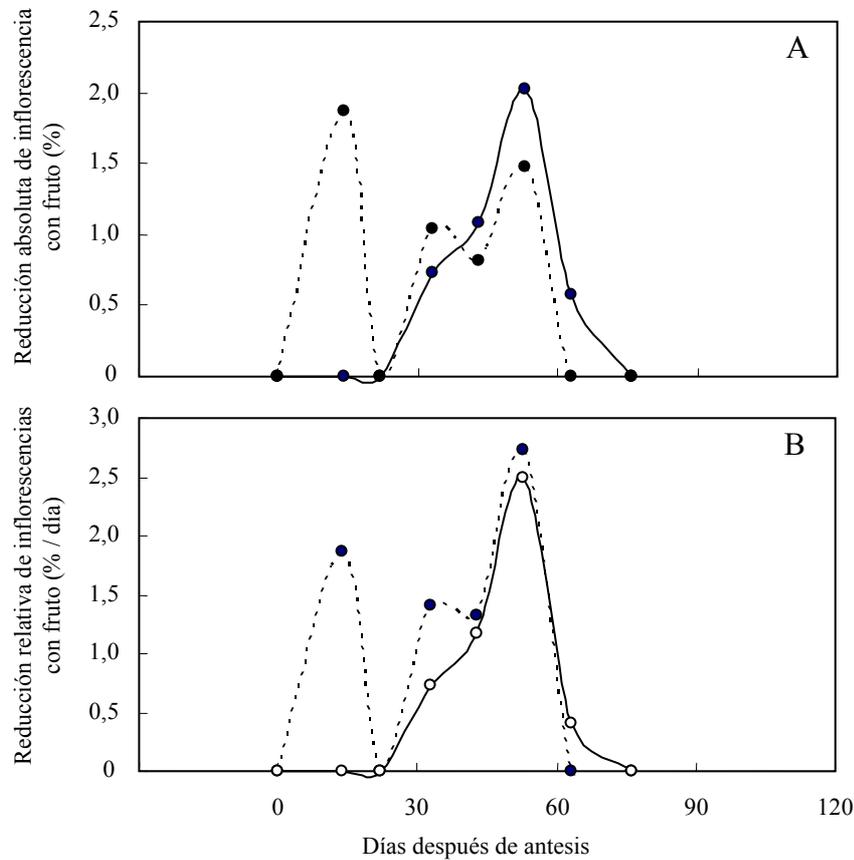


Figura 8. Reducción absoluta (A) y relativa (B) del número de inflorescencias que conservan al menos un fruto en inflorescencias multiflorales (—○—) y uniflorales (·-·-·).

1.2. Crecimiento del fruto

El aumento en diámetro de los frutos, tanto en inflorescencias multiflorales como en uniflorales, es lento desde antesis hasta 33 días después. En este momento se presenta una diferencia en diámetro de 4,4 mm entre frutos de los dos tipos de inflorescencia, mayor en las uniflorales (Figura 9 A). A partir de esta fecha el crecimiento aumenta y hasta el día 43, la tasa de crecimiento diaria es mayor en inflorescencias uniflorales. En este

momento se presenta la mayor diferencia entre los frutos en estudio (5,3 mm)

El aumento diario en diámetro alcanza su máximo entre los días 43 y 63, siendo mayor en frutos de inflorescencias multiflorales que en uniflorales (Figura 9 B). Posteriormente la velocidad de aumento en diámetro se reduce rápidamente hasta el día 93, alcanzando valores de 0,3 mm/día en frutos de inflorescencias multiflorales. A partir de esta fecha, la tasa de crecimiento se ralentiza hasta el final del estudio en frutos de los dos tipos de brotes.

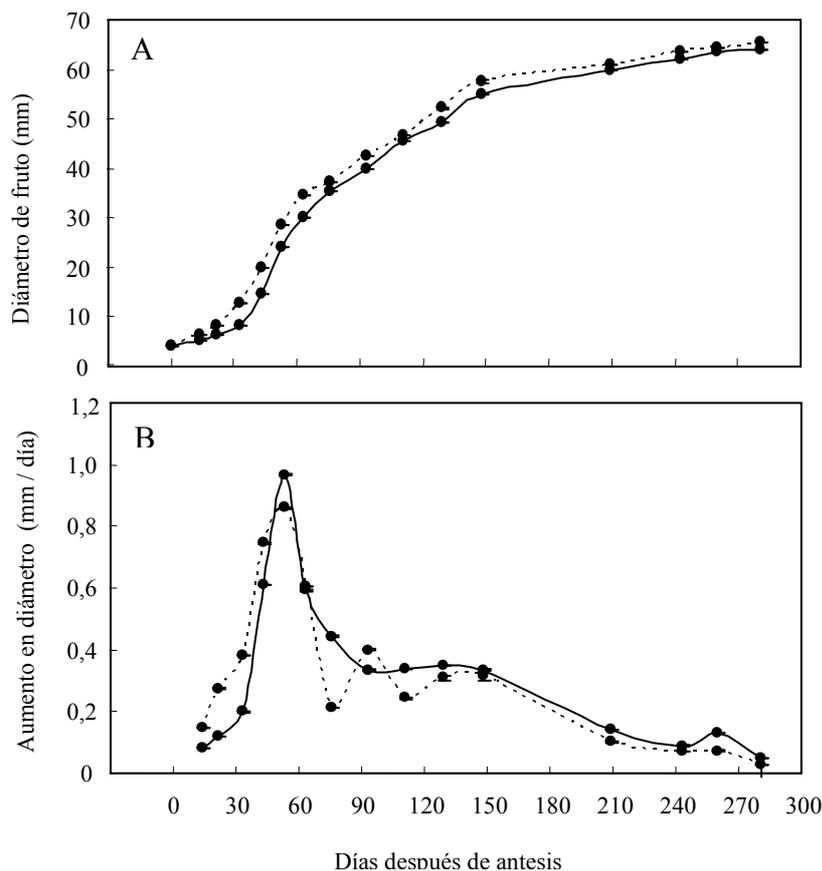


Figura 9. Diámetro (A) y aumento diario en diámetro (B) de frutos de inflorescencias uniflorales (---●---) y multiflorales (—●—).

La curva de variación en peso fresco sigue las misma tendencia del diámetro (Figura 10 A). El peso fresco de fruto presenta un aumento lento desde antesis hasta el día 33. A partir de esta fecha se incrementa hasta alcanzar su máximo entre los días 53 y 63, con una ganancia de 0,66 g / día para frutos de inflorescencias multiflorales y 0,78 g / día para uniflorales. Entre los días 63 y 93, el aumento en peso fresco es prácticamente constante, pero aumenta a continuación hasta alcanzar un segundo máximo el día 150, con una ganancia de peso de 1,15 g / día para frutos de inflorescencias uniflorales y 1,18 g / día para multiflorales. En adelante, la tasa de crecimiento disminuye rápidamente hasta alcanzar valores cercanos a 0,3 g/día al final del estudio (Figura 10 B).

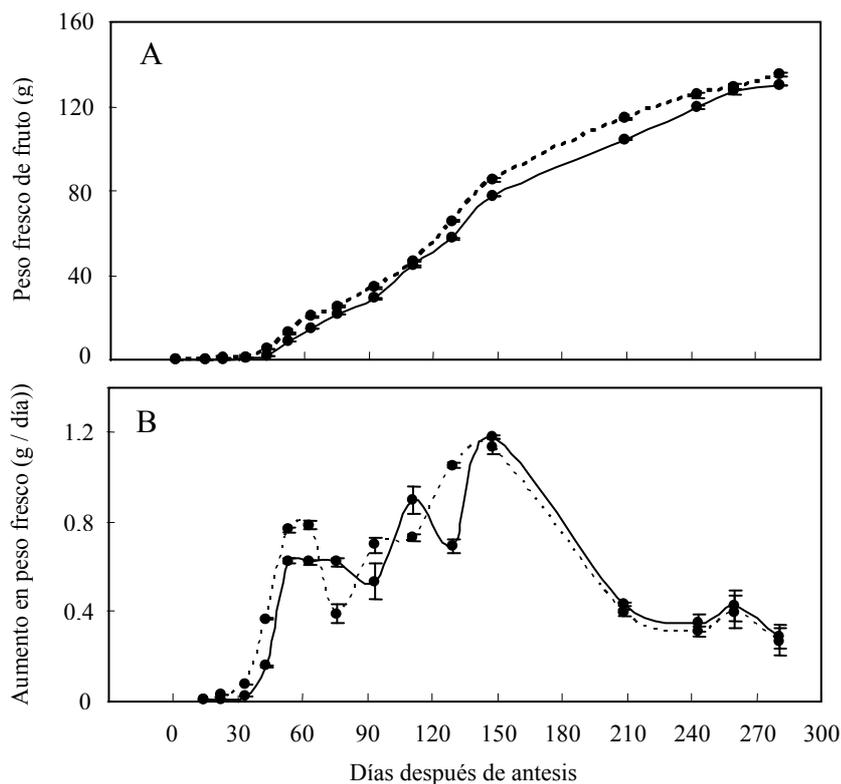


Figura 10. Peso fresco (A) y aumento diario en peso fresco (B) de frutos de inflorescencias uniflorales (---●---) y multiflorales (—●—).

La acumulación de materia seca inicialmente es lenta hasta el día 33 y posteriormente se incrementa hasta alcanzar a los 150 días, 12,9 g en frutos de inflorescencias multiflorales y 13,8 g en uniflorales. Al momento de la cosecha, la acumulación de materia seca presentó valores de 20 g en frutos de inflorescencias multiflorales y 21,2 g en uniflorales (Figura 11 A).

El aumento diario en peso seco difiere entre los dos tipos de inflorescencias (Figura 11 B). En términos absolutos se distinguen tres máximos de acumulación de materia seca. Para frutos de inflorescencias uniflorales, el primer máximo se presenta el día 53, con una tasa de acumulación diaria de 0,2 g. Un segundo máximo el día 93 con igual tasa de acumulación diaria que el anterior y el tercero el día 150. A partir de esta fecha la tasa de acumulación diaria de materia seca disminuye hasta alcanzar valores cercanos a cero al final del estudio.

Hasta el día 93, la acumulación de materia seca es mayor en frutos de inflorescencias uniflorales. El primer máximo de acumulación diaria de materia seca en frutos de inflorescencias multiflorales se presenta al mismo tiempo que en uniflorales (53 días). El segundo máximo se presenta a los 111 días, coincidiendo con el descenso en la tasa de acumulación diaria en frutos de inflorescencias uniflorales y el tercero a los 150 días mayor en frutos de inflorescencias multiflorales (Figura 11 B).

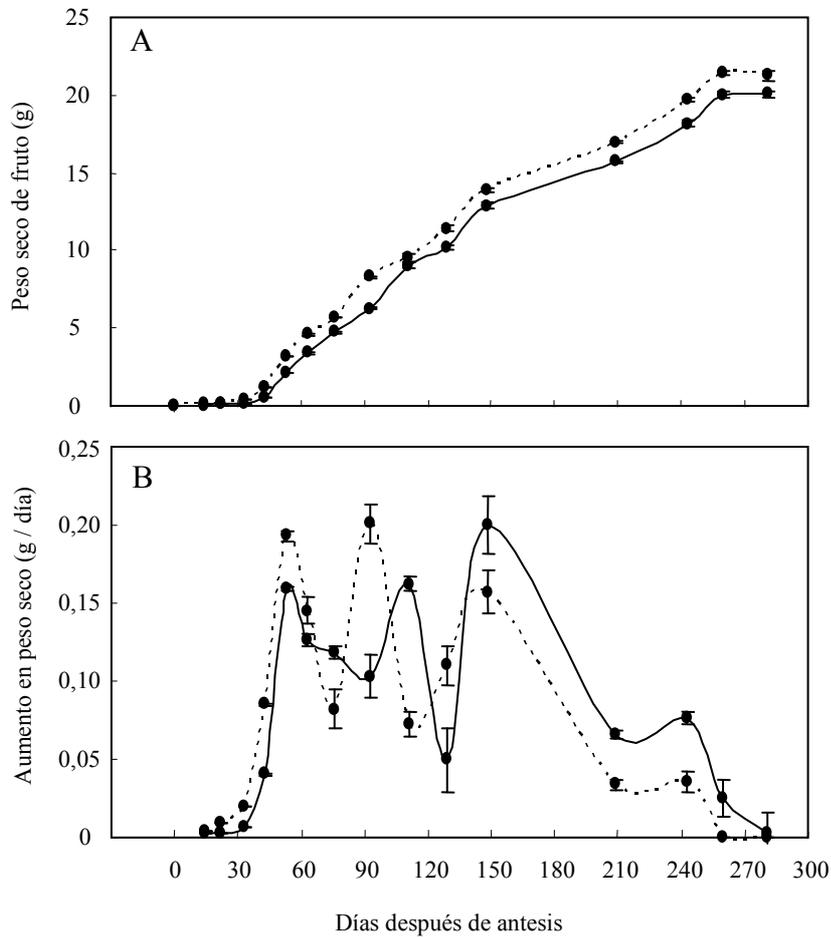


Figura 11. Peso seco (A) y aumento diario en peso seco (B) de frutos de inflorescencias uniflorales (---●---) y multiflorales (—●—).

1.2.1. Características del crecimiento de los tejidos del fruto

Durante el desarrollo inicial del fruto, el aumento en sección transversal fue lento hasta el día 35, determinado por un mayor aporte del crecimiento de la corteza (Figura 12). El aporte de los lóculos al crecimiento del fruto durante este periodo es mínimo.

La contribución de la corteza a la sección transversal del fruto aumenta marcadamente entre el día 35 y 68 (Figura 12). En este periodo, la corteza manifiesta un crecimiento progresivo y al final del mismo tiende a estabilizarse. Los lóculos, presentan un crecimiento lento hasta el día 45 y posteriormente incrementa su contribución a la sección transversal del fruto (día 65 a 98).

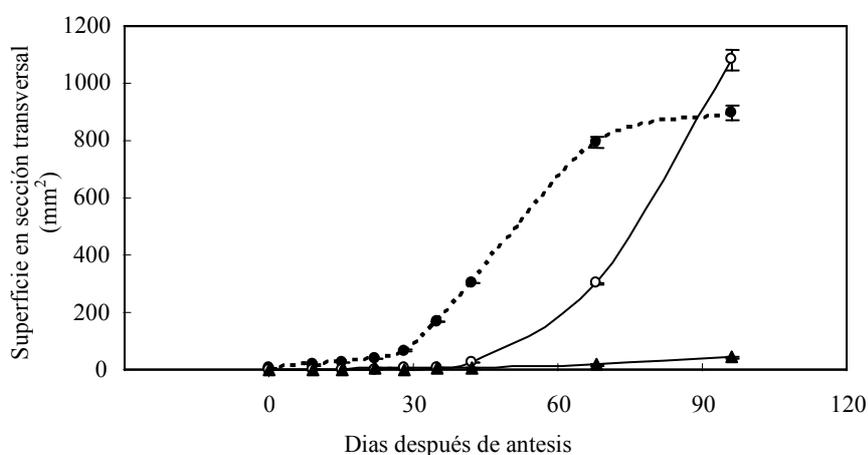


Figura 12. Variación de la superficie en sección transversal de los tejidos del fruto: Corteza (·-·-·), lóculos (—○—) y eje (—▲—).

1.2.2. Descripción anatómica de los tejidos del fruto

En frutos de 5 días, el exocarpo presenta una epidermis uniestrata con células rectangulares, dos filas de células con igual apariencia dispuestas debajo de la epidermis y glándulas de aceite en distintos estados de desarrollo. El mesocarpo ocupa la mayor parte del pericarpo, con células parenquimáticas en división (Figura 13 A).

En la zona adaxial de los lóculos se forman primordios de vesículas a partir de divisiones anticlinales y periclinales de la primera y segunda capa de células epidérmicas y subepidérmicas del endocarpo. Algunas células de la capa más externa de los septos se dividen para formar emergencias carpelares y sus zonas terminales delimitan el cilindro central, que está formado por células parenquimáticas y contiene los haces vasculares marginales. Los haces vasculares dorsales se encuentran junto a la superficie adaxial de los lóculos y al igual que los septales y marginales se presentan poco desarrollados (Figura 13 B).

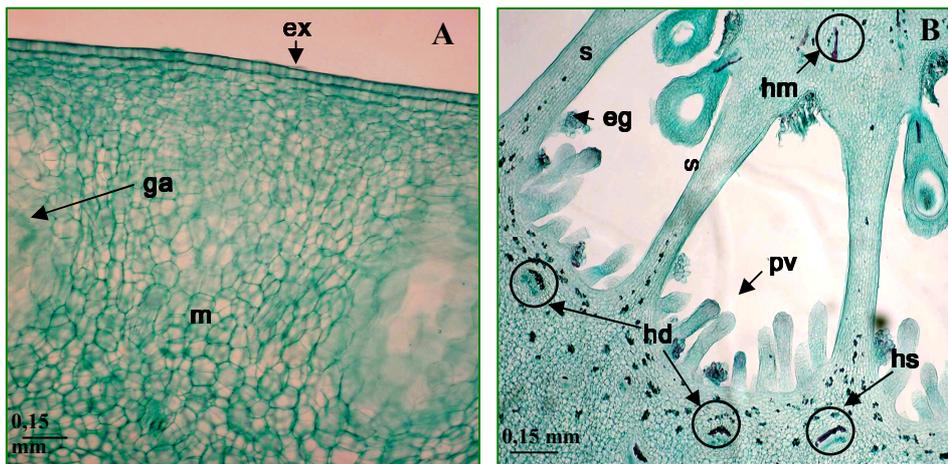


Figura 13. Características anatómicas de frutos de 6 días después de anthesis. **ex**: exocarpo **ga**: glándulas de aceite, **m**: mesocarpo, **hd**: haz vascular dorsal, **hs**: haz vascular septal, **hm**: haz vascular marginal, **eg**: emergencias glandulares, **s**: septos.

Los cambios más notorios a partir del día 35 se presentan a nivel del mesocarpo y endocarpo. En el mesocarpo se diferencian dos zonas, el mesocarpo externo con 4 a 6 filas de células pequeñas que aún se encuentran en división y el mesocarpo interno formado por células grandes, vacuoladas, poligonales y con amplios espacios intercelulares (Figura 14 A). En el endocarpo las vesículas se observan más desarrolladas, producto de su actividad meristemática y forman el filamento (Figura 14 B), alcanzando un tamaño de $0,65 \pm 0,01$ mm.

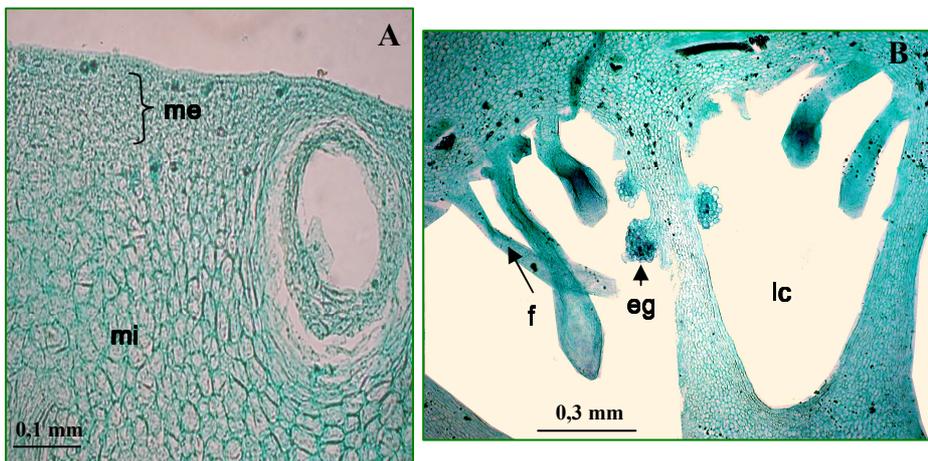


Figura 14. Características anatómicas de frutos de 35 días después de antesis. **me**: mesocarpo externo, **mi**: mesocarpo interno, **f**: filamento, **lc**: lóculo, **eg**: emergencias glandulares.

En frutos de 45 días, en el mesocarpo externo se presentan pocas filas de células que aún se mantienen en división (Figura 15 A). En el endocarpo, la actividad meristemática de la vesícula se detiene, dando paso a su ensanchamiento y a la vacuolización de algunas de sus células (Figura 15 B).

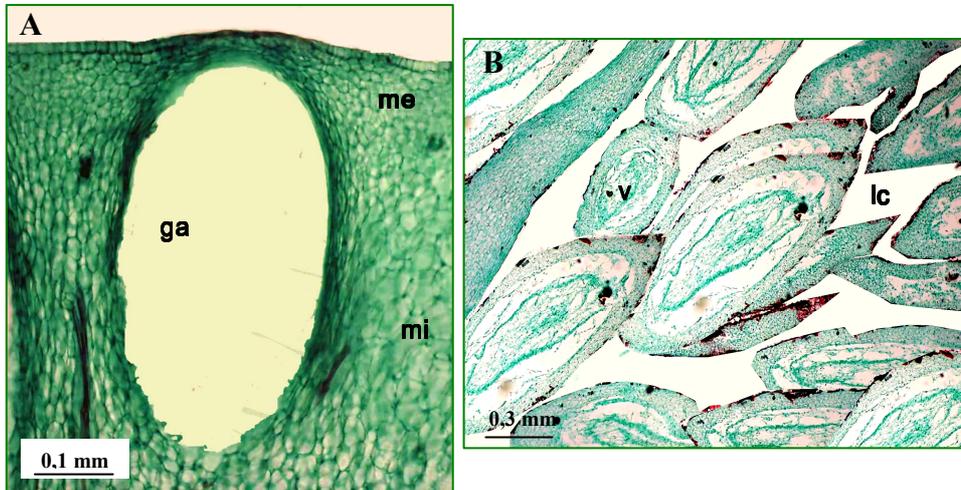


Figura 15. Características anatómicas de frutos de 45 días después de antesis. **me**: mesocarpo externo, **mi**: mesocarpo interno, **v**: vesícula, **lc**: lóculo.

2. EFECTO DE LAS APLICACIONES DE 2,4-D EN EL DESARROLLO DEL FRUTO Y LA ABSCISIÓN

En los dos años de estudio señalados (2003 y 2004), se evaluó el efecto del 2,4-D sobre los procesos de abscisión y sobre el crecimiento del fruto.

En el año 2003, una vez se presentó más del 50% de flores en antesis (2 de mayo), el 2,4-D (Viriman, solución del 10 % (p/v) de 2,4-D como éster isopropílico), se asperjó a una concentración de 15 ppm, al cual se adicionó un mojante no iónico a una concentración de 20 % p/v. La aplicación se realizó con bomba y con aspersor de boquilla fina de 1,8 mm, con una presión de 30 atmósferas. Se asperjó la totalidad de la superficie foliar sin que llegara a escurrir el líquido y la cantidad de solución aplicada por árbol fue de 7.7 litros.

En el año 2004, con un 50% de flores en antesis (22 de abril), se aplicó el mismo tipo de auxina a una concentración de 20 ppm. La aplicación se realizó con mochila en una cantidad promedio por árbol de 3,6 litros.

En el experimento realizado el año 2003, la aplicación de 2,4-D produjo un incremento en la cosecha final debido a un mayor cuajado de frutos sin alterar su peso medio. En el experimento realizado en el 2004, la aplicación de 2,4-D aceleró el crecimiento del fruto y provocó un aumento en su peso medio ($P \leq 0,03$), pero se redujo el número de frutos y no se alteró la cosecha (Tabla 6). A causa de esta diferencia de comportamiento los resultados de los dos años se presentan por separado.

Tabla 6. Datos de cosecha de los dos años de estudio

Año	Peso fruto (g)		Cosecha (kg)		N° frutos/árbol	
	Testigo	2,4-D	Testigo	2,4-D	Testigo	2,4-D
2003	136 ± 5	131 ± 7	87,5 ± 14	142 ± 10*	634 ± 93	1109 ± 83*
2004	115 ± 7	133 ± 5*	180 ± 11	192 ± 14	2088 ± 232	1551 ± 159*

El * indica diferencias significativas respecto al testigo ($P \leq 0,05$)

2.2. Experimento del año 2003

2.2.1. Abscisión en inflorescencias multiflorales con hojas

La abscisión en inflorescencias multiflorales fue mayor en árboles tratados con 2,4-D desde su inicio hasta el final del periodo de estudio (Figura 33).

Hasta el día 22 se presenta un periodo de abscisión lenta con una tasa de caída en términos relativos y absolutos que no supera el 1 % (Testigo 0,4 % y tratados con 2,4-D 0,7 %; Figura 33) En adelante la abscisión aumenta considerablemente, completándose a los 69 días en los dos tratamientos con un 90 % de abscisión en árboles testigos y 93 % en el tratamiento de 2,4-D (Figura 33).

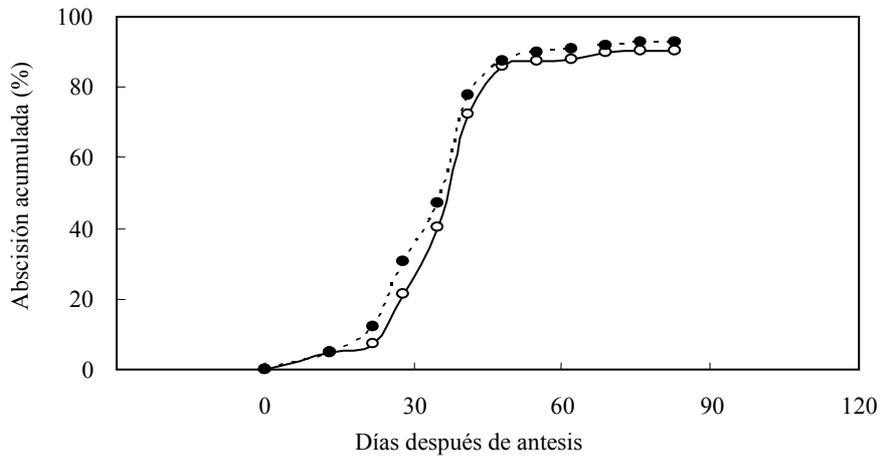


Figura 33. Abscisión acumulada en inflorescencias multiflorales de árboles testigo (—○—) y tratados con 2,4-D (··●··). Experimento realizado el año 2004.

A los 41 días se presenta un máximo en la tasa de abscisión relativa y absoluta y enseguida se reduce rápidamente, manteniendo niveles muy bajos de caída hasta el día 76, en que se detiene (Figura 34 A). La reducción del número de frutos por inflorescencia se estabiliza en el mismo momento en que se alcanza los máximos en la tasa de abscisión (41 días; Figura 35).

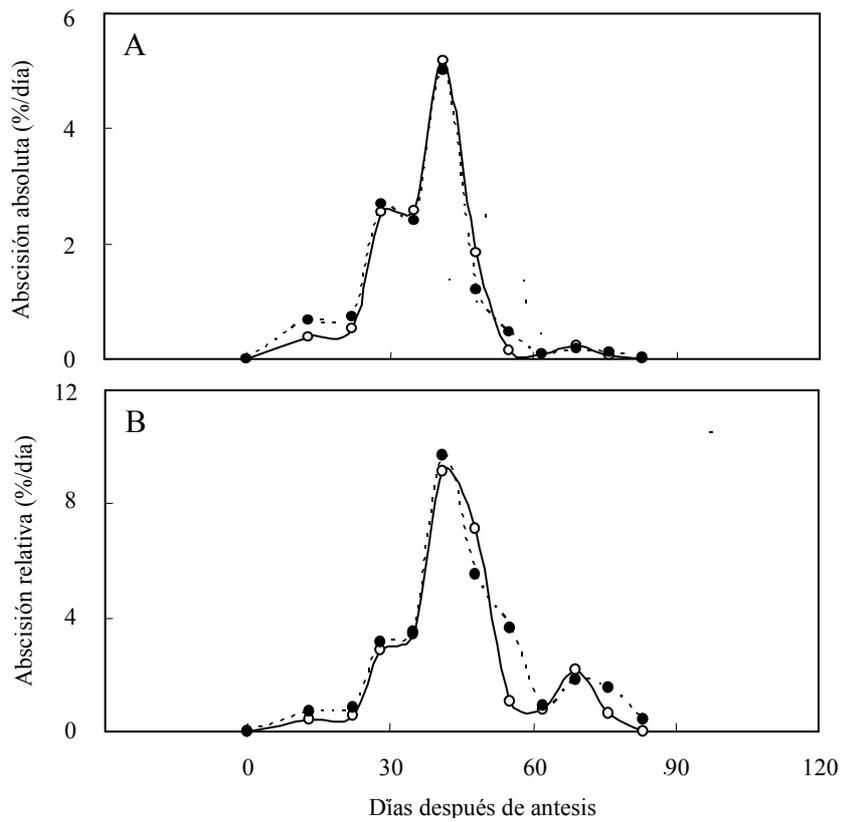


Figura 34. Abscisión absoluta (A) y relativa (B) en inflorescencias multiflorales, de árboles tratados con 2,4-D (·-·-·) y sin tratar (—○—).

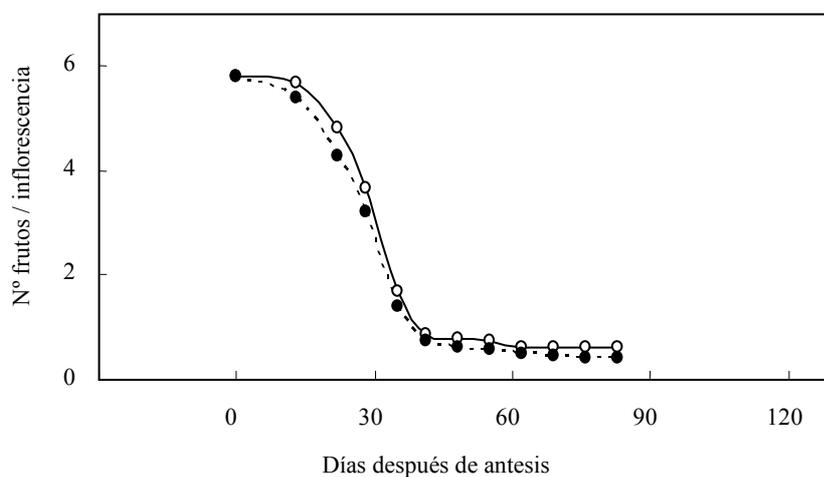


Figura 35. Reducción del número de frutos por inflorescencia, en inflorescencias multiflorales de árboles testigo (—○—) y tratados con 2,4-D (···●···). Los valores son la media de los frutos presentes en cada fecha en inflorescencias que finalmente cuajarán algún fruto. El error estándar (oscila entre 0,06 y 0,18), es menor que el tamaño del símbolo.

La reducción en el número de inflorescencias que retienen algún fruto (mayor en árboles tratados con 2,4-D), se inició a partir del día 22 y es elevada entre los días 35 y 42 (Figura 36). En este momento el porcentaje de inflorescencia con fruto fue de 52 en árboles testigo y 37 en el tratamiento de 2,4-D, con un máximo en la tasa de reducción relativa de 4,3 % en el tratamiento testigo y 5,2 % en el tratamiento de 2,4-D (Figura 37 B). A partir de esta fecha la reducción se hizo más lenta, presentando un segundo máximo mucho menor el día 63 y deteniéndose a los 69 días (Figura 36). El 52 % de inflorescencias multiflorales conservan al menos un fruto en el tratamiento testigo frente al 37 % del tratamiento de 2,4-D (Figura 36).

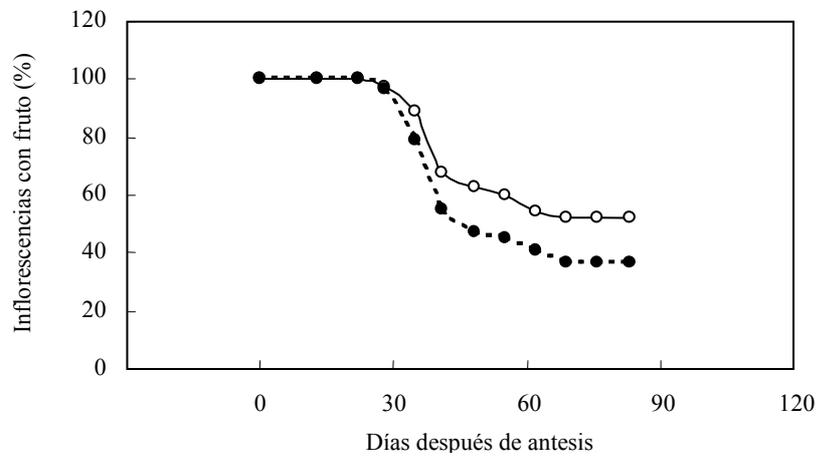


Figura 36. Porcentaje de inflorescencias con un fruto al menos en brotes multiflorales durante la post-antesis, en árboles testigo (—○—) y tratados con 2,4-D (··●··).

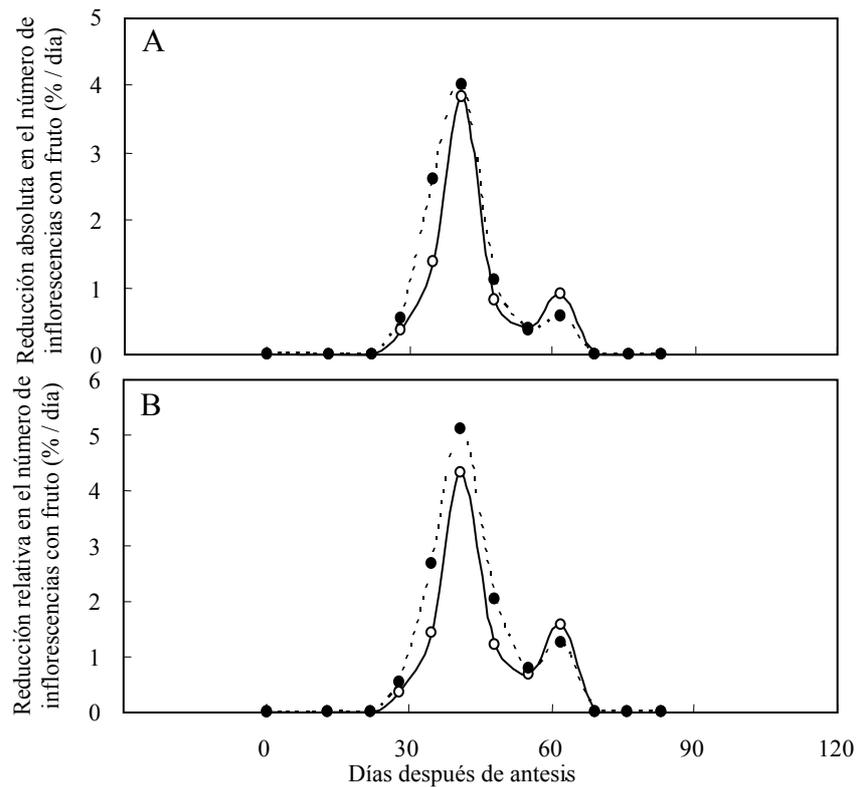


Figura 37. Reducción en términos absolutos (A) y relativos (B) del numero de inflorescencias multiflorales que conservan al menos un fruto en árboles tratados con 2,4-D (··●··) y sin tratar (—○—).

2.2.2. Crecimiento del fruto

La respuesta de las variables de crecimiento a la aplicación de 2,4-D durante el desarrollo inicial del fruto fue débil. Tras la antesis y hasta el día 62, las diferencias en diámetro se mantuvieron casi constantes con valores de 0,6 mm (Figura 38).

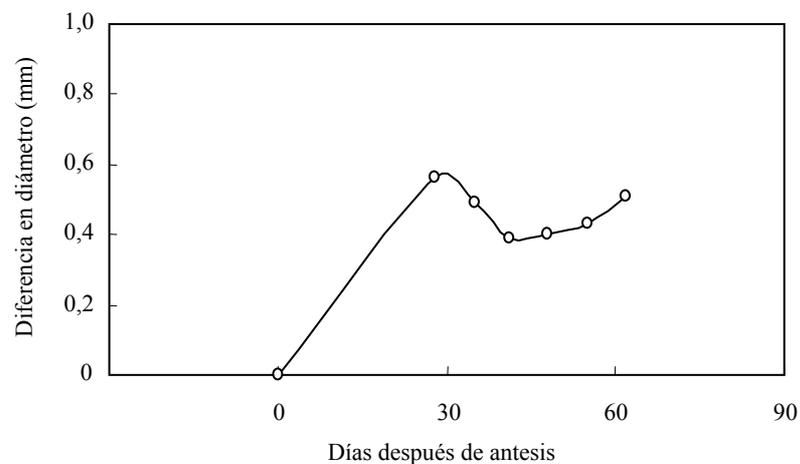


Figura 38. Diferencia en diámetro en frutos de inflorescencias multiflorales, tratados con 2,4-D y sin tratar. Experimento realizado en el año de 2003.

Durante el desarrollo inicial del fruto, la ganancia en peso fresco y la acumulación de materia seca de frutos testigo y tratados con 2,4-D es lenta. Hasta el día 55 no hay diferencias en los valores de peso fresco y peso seco entre tratamientos (Figuras 39 y 40). Entre los días 55 y 62, el peso fresco y seco de los frutos tratados con 2,4-D fue mayor que en el tratamiento testigo, con una tasa de aumento diaria de 1,2 g / día en peso fresco (Figura 39 B) y de 0,26 g / día en peso seco (Figura 40 B). Desde este momento hasta la cosecha, los frutos del tratamiento testigo alcanzaron el mismo tamaño que los tratados con 2,4-D (Tabla 3).

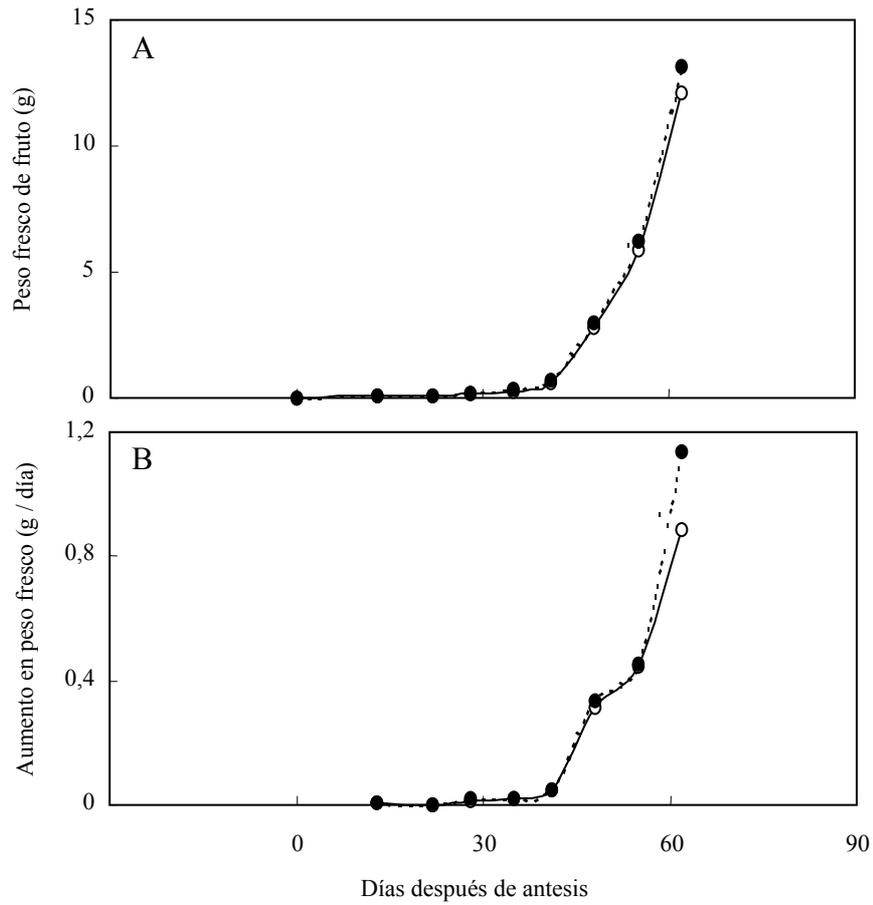


Figura 39. Peso fresco (A) y aumento diario en peso fresco (B) en frutos de inflorescencias multiflorales. Tratamiento de 2,4-D (·-·-·) y testigo (—●—).

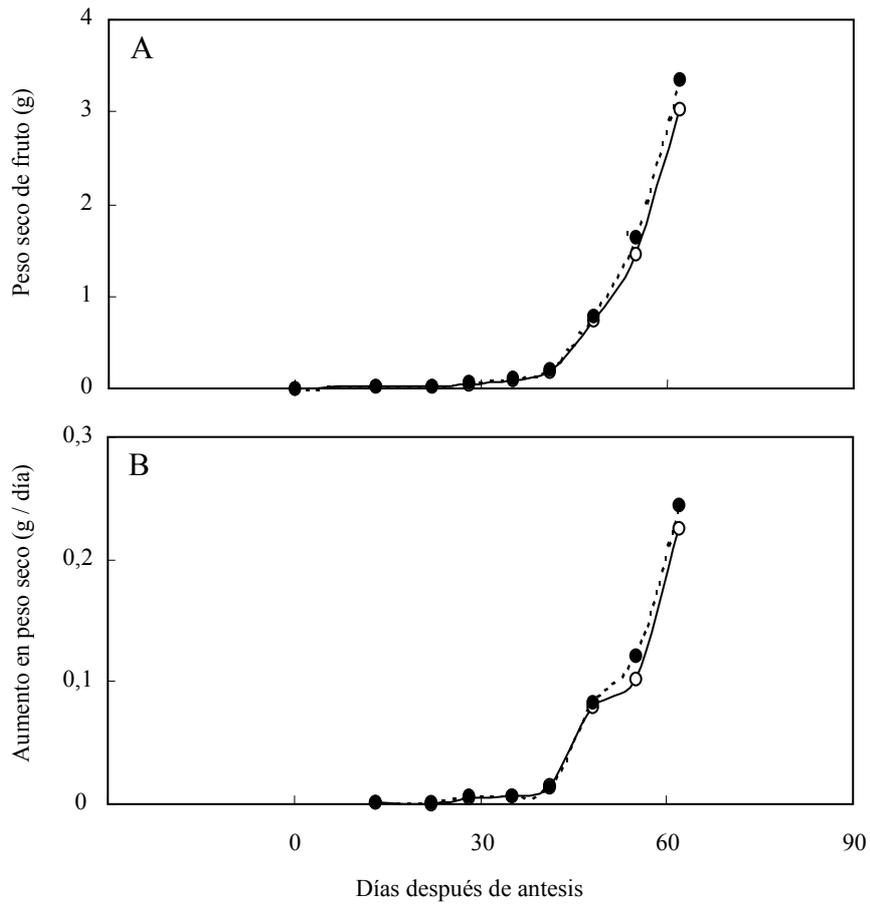


Figura 40. Peso seco (A) y aumento diario en peso seco (B) en frutos de inflorescencias multiflorales. Tratamiento de 2,4-D (·-·-) y testigo (—○—).

2.1. Experimento del año 2004

2.1.1. Abscisión total

La abscisión acumulada, medida a partir de las flores y frutos que se desprenden, recogidas mediante una malla colocada bajo los árboles, se presenta en la figura 16.

Hasta el día 42 se presentó una menor abscisión acumulada en los árboles tratados con 2,4-D. A partir de esta fecha fue ligeramente superior en los árboles tratados que en los testigo (Figura 16). Los árboles testigo presentaron un 3,7 % de frutos finalmente cuajados frente a un 3,1 % en árboles tratados con 2,4-D.

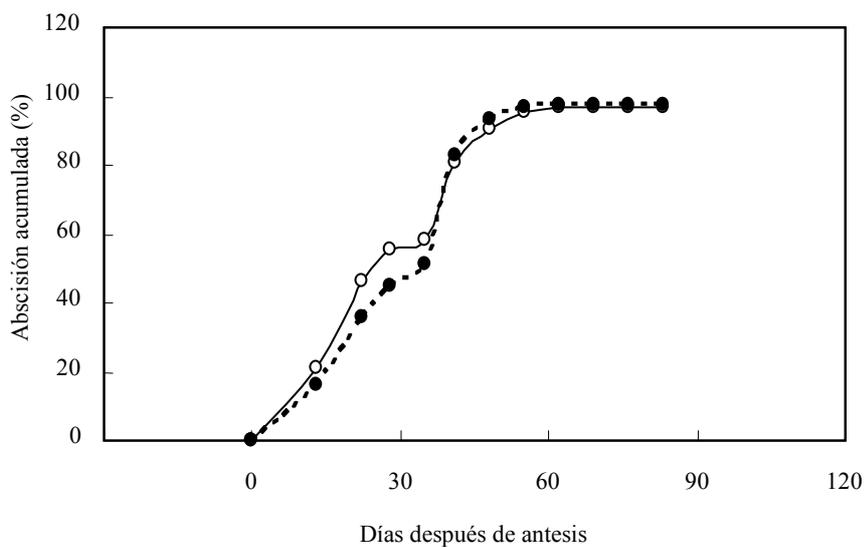


Figura 16. Abscisión acumulada en árboles testigo (—○—) y tratados con 2,4-D (··●··). Experimento realizado el año 2004.

El cambio en la pauta de abscisión provocado por la aplicación de 2,4-D refleja un efecto diferencial en la abscisión por el pedicelo y por la base del cáliz. Hasta el día 42 después de antesis, la abscisión se presentó en su totalidad por el pedicelo, con un mayor porcentaje de caída en árboles testigo. La caída de frutos por la base del cáliz se inició a partir del día 42 y se extendió hasta el 67 después de antesis, con un mayor porcentaje de abscisión en árboles tratados con 2,4-D. Entre el día 42 y 52 se presentó un periodo de transición en el que hubo caída de frutos por las dos zonas de abscisión (Figura 17).

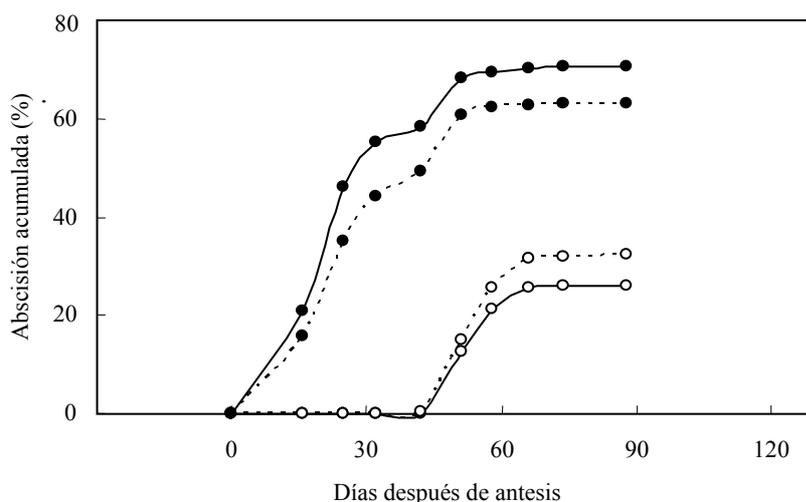


Figura 17. Abscisión acumulada de flores y frutos en árboles testigo (—) y tratados con 2,4-D (....), dependiendo de la zona de abscisión por la cual caen: Zona de abscisión del pedicelo (●), zona de abscisión del cáliz (○). Experimento realizado el año 2004.

Hasta el día 28 la abscisión fue mayor en árboles testigo, con 2,8 % de caída diaria frente a 2,1 % en árboles tratados con 2,4-D. En adelante la tasa de abscisión fue mayor en el tratamiento de 2,4-D, presentándose un segundo máximo de caída a los 41 días, con 3,8 % en el tratamiento testigo frente a un 4,7 del tratamiento de 2,4-D (Figura 18).

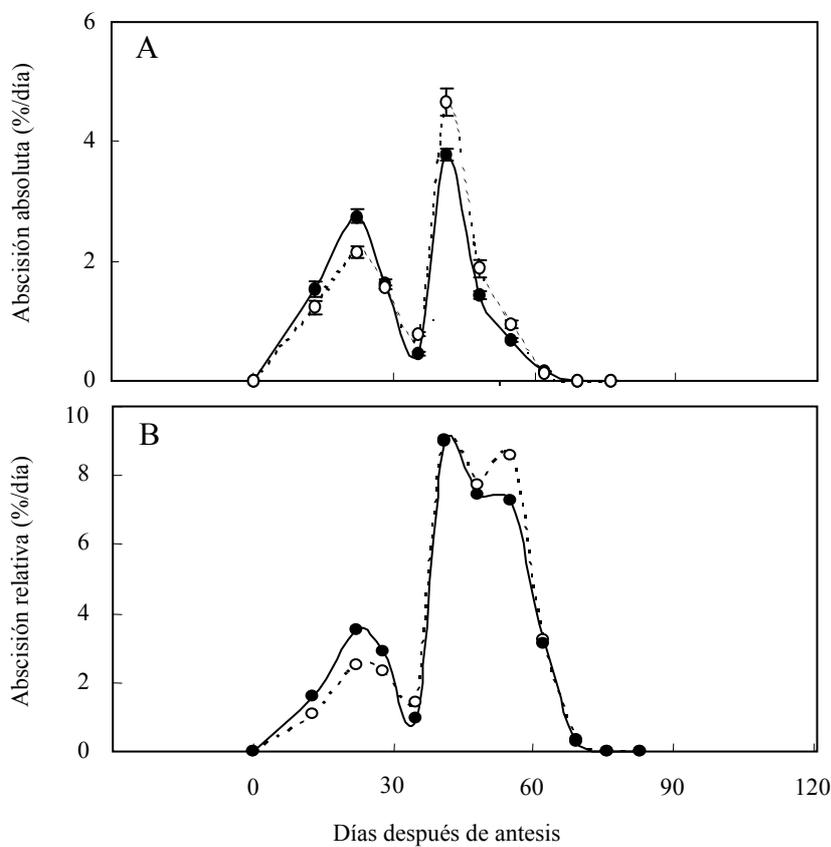


Figura 18. Abscisión en terminos absolutos (A) y relativos (B), en árboles testigo (—●—) y tratados con 2,4-D (··○··). Experimento realizado el año 2004.

2.1.2. Abscisión en inflorescencias multiflorales con hojas

Hasta el día 22 la abscisión en inflorescencias multiflorales fue lenta y a partir de este momento aumentó considerablemente (Figura 19). Se presenta una variación en el momento en que se completó la abscisión. En árboles testigo tuvo lugar a los 63 días mientras que en tratados con 2,4-D a los 53 días.

La aplicación de 2,4-D produjo un retraso inicial de la abscisión, siendo mayor en árboles testigo hasta el día 22 (Figura 19). En este periodo se distingue un primer máximo en la tasa de abscisión en términos absolutos y relativos que se extiende desde el día 5 hasta el 14, manteniendo una tasa de caída baja en los dos tratamientos (Figura 20).

A partir del día 35 y hasta el final del periodo de estudio el porcentaje de abscisión fue mayor en árboles tratados. La abscisión total en los árboles tratados con 2,4-D fue de 92 % frente al 89 % en árboles testigos (Figura 19). Al inicio de este periodo se presentó el segundo máximo en la tasa de abscisión absoluta. (Figura 20 A) con una tasa de caída diaria de 3,5 % en árboles testigo frente a 4,2 % del tratamiento de 2,4-D. En términos relativos, el segundo máximo se extiende desde el día 33 hasta el 53 (Figura 20 B). A partir de esta fecha la tasa de abscisión disminuyó hasta el día 76, en que se detuvo.

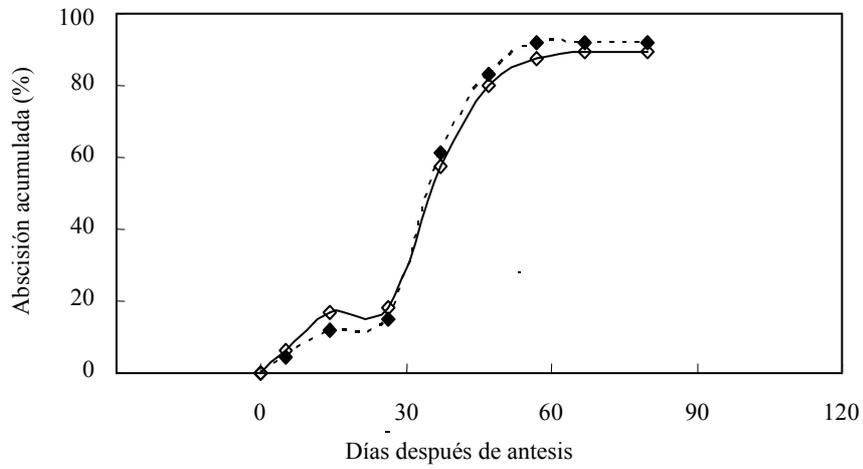


Figura 19. Abscisión acumulada en inflorescencias multiflorales de árboles testigo (—○—) y tratados con 2,4-D (---◆---). Experimento realizado el año 2004.

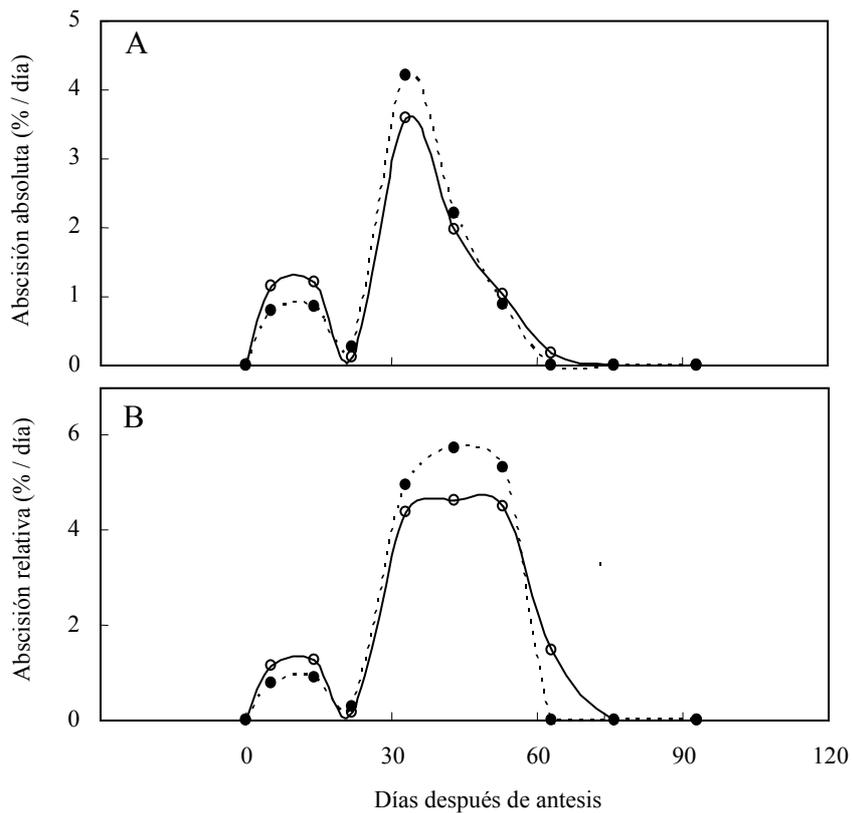


Figura 20. Abscisión absoluta (A) y relativa (B) en inflorescencias multiflorales, de árboles tratados con 2,4-D (---●---) y sin tratar (—○—). Experimento realizado el año 2004

La pauta de abscisión esta asociada con la reducción del número de frutos por inflorescencia. Hasta el día 33, la reducción en el número de frutos es lenta, pasando de 5,5 frutos por inflorescencia a 4,4 en árboles testigo y 4,7 en tratados con 2,4-D. A continuación, aumenta la velocidad de reducción hasta estabilizarse a los 63 días, con un promedio de 1,2 frutos por inflorescencia en testigos y 1 en el tratamiento de 2,4-D (Figura 21).

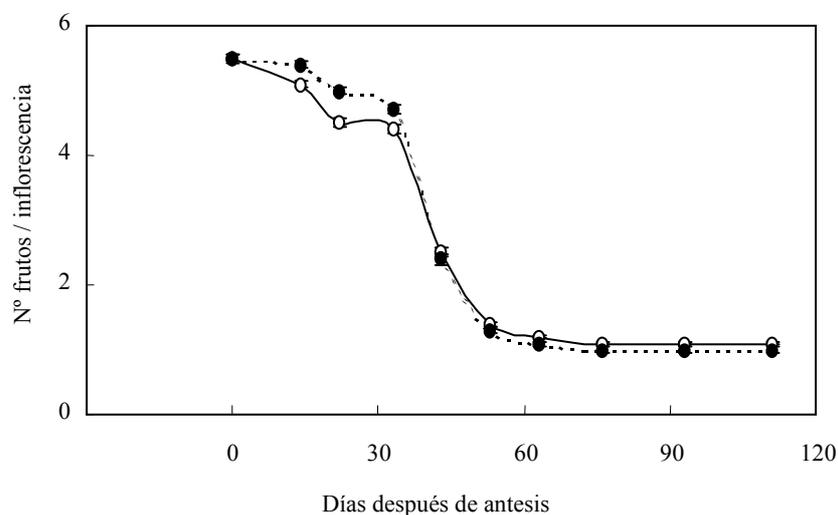


Figura 21. Reducción del número de frutos por inflorescencia, en inflorescencias multiflorales de árboles testigo (—○—) y tratados con 2,4-D (··●··). Los valores son la media de los frutos presentes en cada fecha en inflorescencias que finalmente cuajarán algún fruto. El error estándar (oscila entre 0,06 y 0,18), es menor que el tamaño del símbolo.

La reducción en el número de inflorescencias que retienen algún fruto se inició a partir del día 26. Entre los días 33 y 53 la reducción se incrementó, momento en que el porcentaje de inflorescencias con fruto fue de 55 % en árboles testigo y 36 % en el tratamiento de 2,4-D. Al final de este periodo se presenta un máximo en la reducción de inflorescencias con fruto en términos absolutos y relativos (Figura 23) y enseguida disminuye hasta detenerse el día 63 en frutos tratados y 13 días después en testigo. El 55 % de inflorescencias multiflorales retienen algún fruto en el tratamiento testigo frente al 36 % del tratamiento de 2,4-D (figura 22).

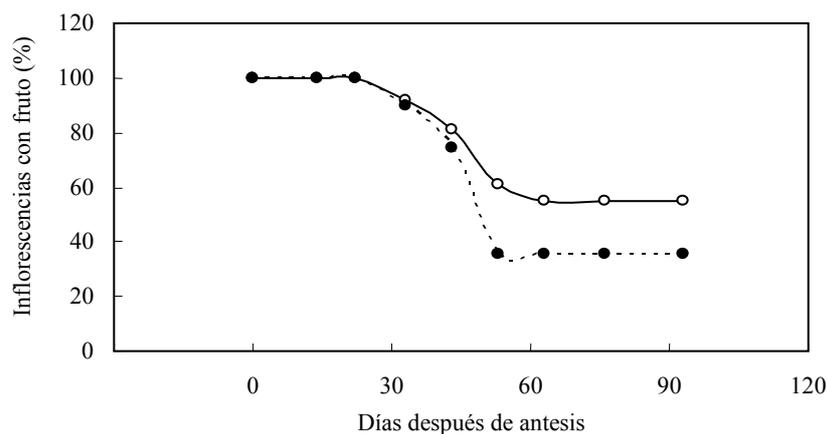


Figura 22. Porcentaje de inflorescencias con un fruto al menos en brotes multiflorales durante la post-antesis, en árboles testigo (—○—) y tratados con 2,4-D (-●-). Experimento realizado el año 2004.

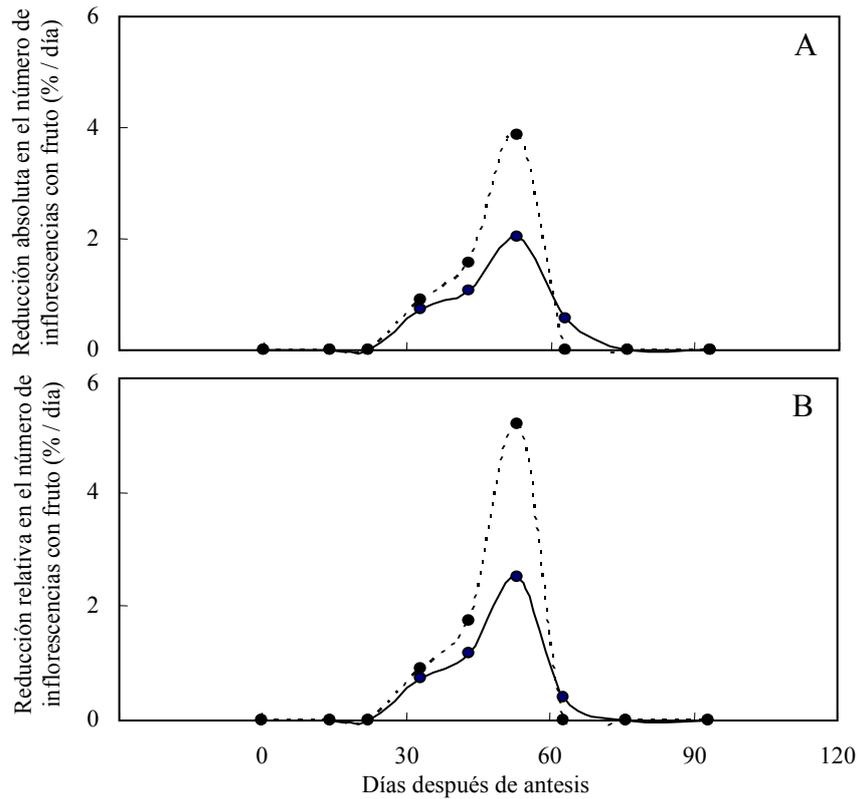


Figura 23. Reducción en términos absolutos (A) y relativos (B) del número de inflorescencias que conservan al menos un fruto en inflorescencias multiflorales de árboles tratados con 2,4-D ($\cdots\bullet\cdots$) y sin tratar ($\text{---}\circ\text{---}$). Experimento realizado el año 2004

2.1.3. Abscisión en inflorescencias uniflorales con hojas

La aplicación de 2,4-D produjo un retraso en la abscisión de inflorescencias uniflorales hasta el día 33 (Figura 24). En este periodo se presenta un primer máximo en la tasa de abscisión en términos absolutos y relativos a los 14 días con una tasa de caída relativa diaria de 2 % en árboles testigo frente al 1,1 % del tratamiento de 2,4-D (Figura 25). A partir del día 33 se incrementa la abscisión en frutos tratados y se presenta una variación en el momento en que se detiene. En el tratamiento testigo la caída de frutos se detuvo el día 63 con un 61 % de abscisión, mientras que en el tratamiento de 2,4-D se detuvo el día 76 con un 70 % (Figura 24). El segundo máximo en la tasa de abscisión absoluta y relativa se presenta el día 53 en el tratamiento testigo, con una tasa de caída diaria relativa de 2,7 % y el día 43 en el tratamiento de 2,4-D con un 3,4 % (Figura 25 B).

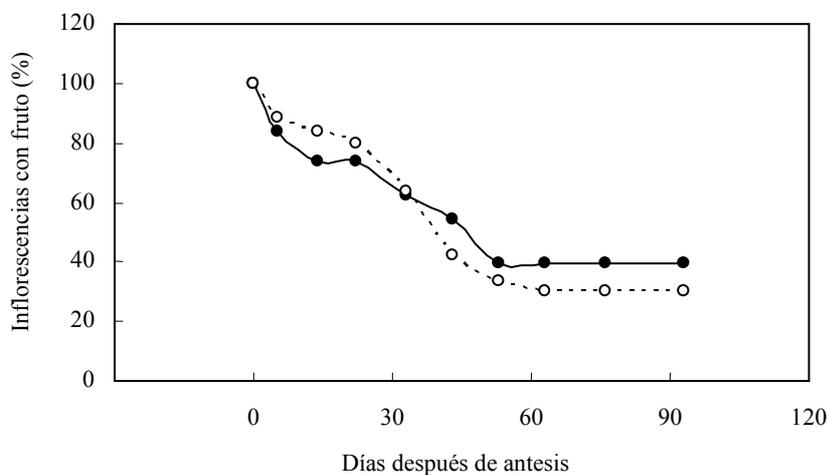


Figura 24. Porcentaje de inflorescencias uniflorales con fruto durante la post-antesis, en árboles testigo (—○—) y tratados con 2,4-D (··●···). Antesis: 22 de abril de 2004.

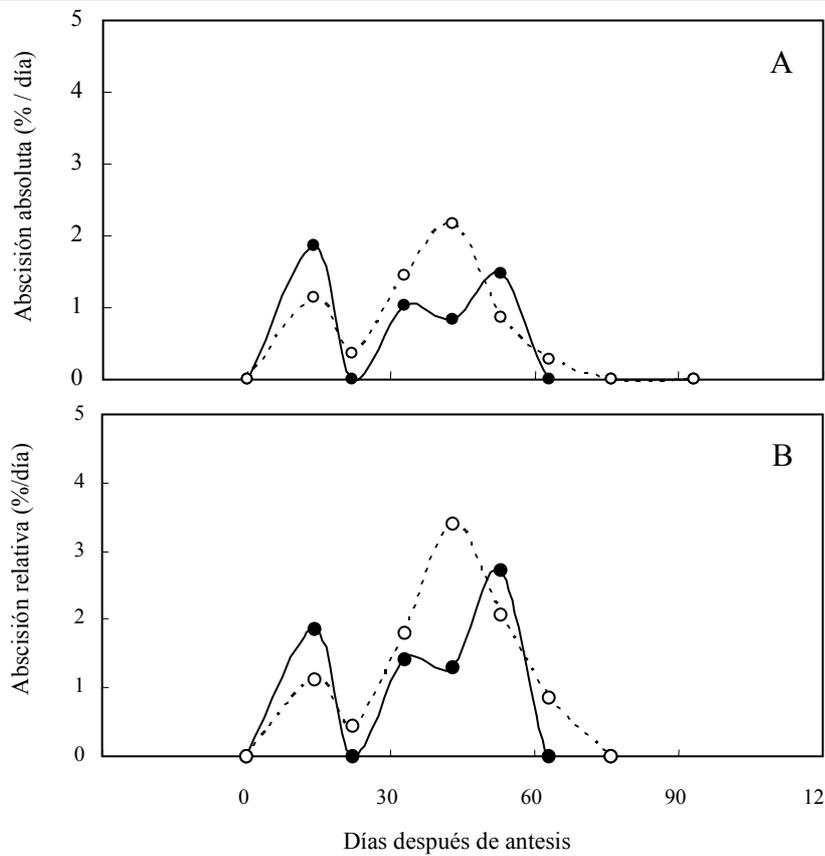


Figura 25. Abscisión absoluta (A) y relativa (B) de flores y frutitos en inflorescencias uniiflorales, de árboles testigo (—○—) y tratados con 2,4-D (—●—).

2.1.4. Crecimiento del fruto

La aplicación de 2,4-D incrementó el tamaño del fruto. El efecto sobre las variables de crecimiento se evidenció tras la antesis y las diferencias entre tratamientos se incrementaron con el avance del estado de desarrollo del fruto, presentando al momento de la cosecha frutos con una diferencia en diámetro de 5 mm en inflorescencias uniflorales y de 4 mm en multiflorales (Figura 26).

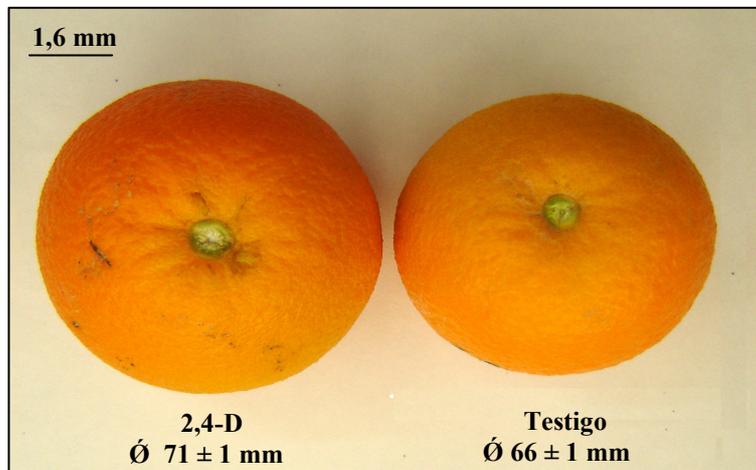


Figura 26. Tamaño medio de frutos de inflorescencias uniflorales de árboles testigo y tratados con 2,4-D, al momento de la cosecha. Experimento realizado el año 2004.

Las diferencias en diámetro entre frutos testigos y tratados con 2,4-D de inflorescencias uniflorales y multiflorales se establecen desde los estados iniciales de desarrollo y aumentan linealmente con el tiempo, alcanzando su máximo el día 240. (Figura 27). Se presentó un mayor efecto del 2,4-D sobre frutos de inflorescencias uniflorales. A partir del día 42 las diferencias se hacen evidentes y 10 días después son mayores que las obtenidas en frutos de inflorescencias multiflorales (Figura 27)

La tasa de aumento diaria en diámetro presenta su máximo a los 53 días en los dos tipos de inflorescencias (Figuras 28 A y 28 B) y en adelante se ralentiza hasta mantener valores cercanos a cero al final del periodo de estudio (285 días). En inflorescencias multiflorales las diferencias entre tratamientos se presentan a partir del día 76, hasta alcanzar al final del periodo de estudio 0,1 mm (Figura 27 A). En frutos de inflorescencias uniflorales, se presenta un mayor efecto del 2,4-D sobre la velocidad de aumento diario en diámetro, desde el día 53 hasta el final del periodo de estudio (Figura 28 B).

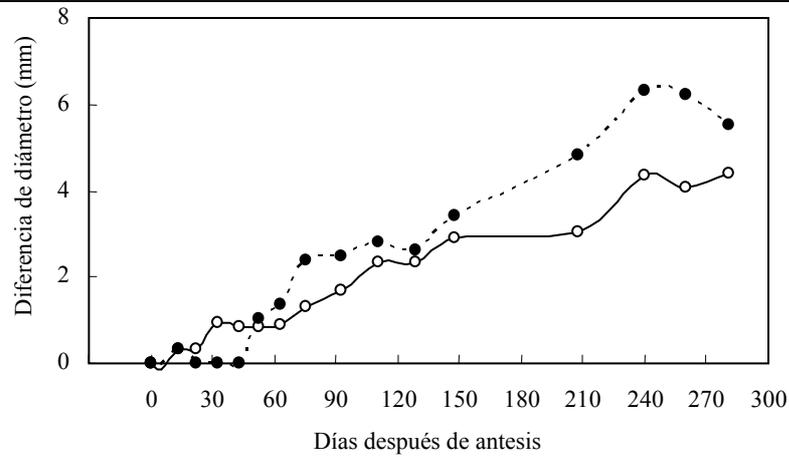


Figura 27. Diferencia en diámetro entre frutos tratados con 2,4-D y sin tratar en inflorescencias multiflorales (—○—) y uniflorales (···●···). Experimento realizado el año 2004.

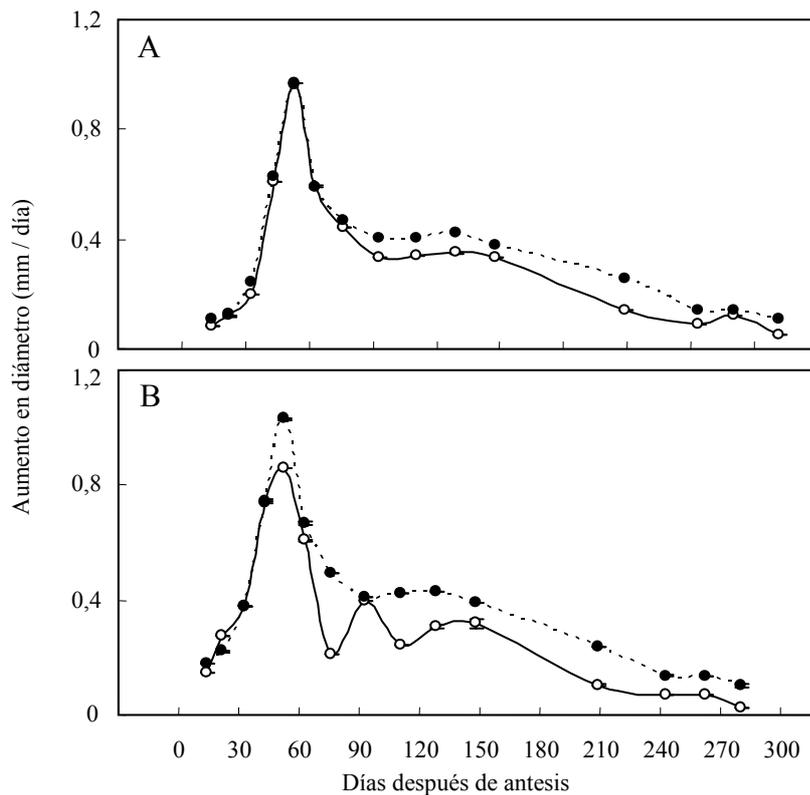


Figura 28. Aumento diario en diámetro de frutos de inflorescencias multiflorales (A) y uniflorales (B), en árboles testigo (—○—) y tratados con 2,4-D (···●···). Experimento realizado el año 2004.

En los dos tipos de inflorescencias, el aumento en peso fresco es bajo durante el crecimiento inicial del fruto (hasta 43 días). Al final de este periodo, el fruto alcanza un peso de 2,6 g y las diferencias entre tratamientos se mantienen con valores cercanos a cero (Figura 29). Al igual que el diámetro, en frutos de los dos tipos de inflorescencias el aumento en peso fresco es aproximadamente lineal hasta los 240 días y a partir de este momento se mantiene constante hasta el final del periodo de estudio. En este momento, se obtuvo una diferencia de 24 g en inflorescencias multiflorales y 35,5 g en inflorescencias uniflorales, siendo mayor el peso en frutos del tratamiento de 2,4-D (Figura 29).

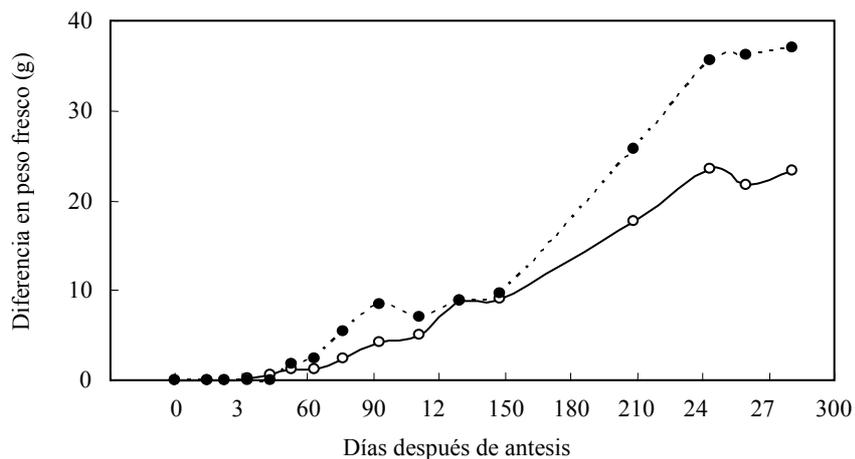


Figura 29. Diferencia en peso fresco entre frutos tratados con 2,4-D y sin tratar en inflorescencias multiflorales (—○—) y uniflorales (-.-●.-). Experimento realizado el año 2004.

La evolución de las curvas de aumento diario en peso fresco presentan una tendencia similar en los dos tratamientos y en los dos tipos de inflorescencias estudiadas (Figuras 30 A y 30 B), pero hay variación en los valores de las tasas de aumento diario, en frutos de cada tipo de

inflorescencia. Después de alcanzar un primer máximo a los 53 días, la tasa se mantiene constante hasta los 110 dda, mayor en el tratamiento de 2,4-D. Posteriormente se incrementa hasta alcanzar un segundo máximo a los 148 días y enseguida se reduce hasta el final del periodo de estudio, manteniendo una tasa de 0,4 g/día (Figuras 30 A y 30 B).

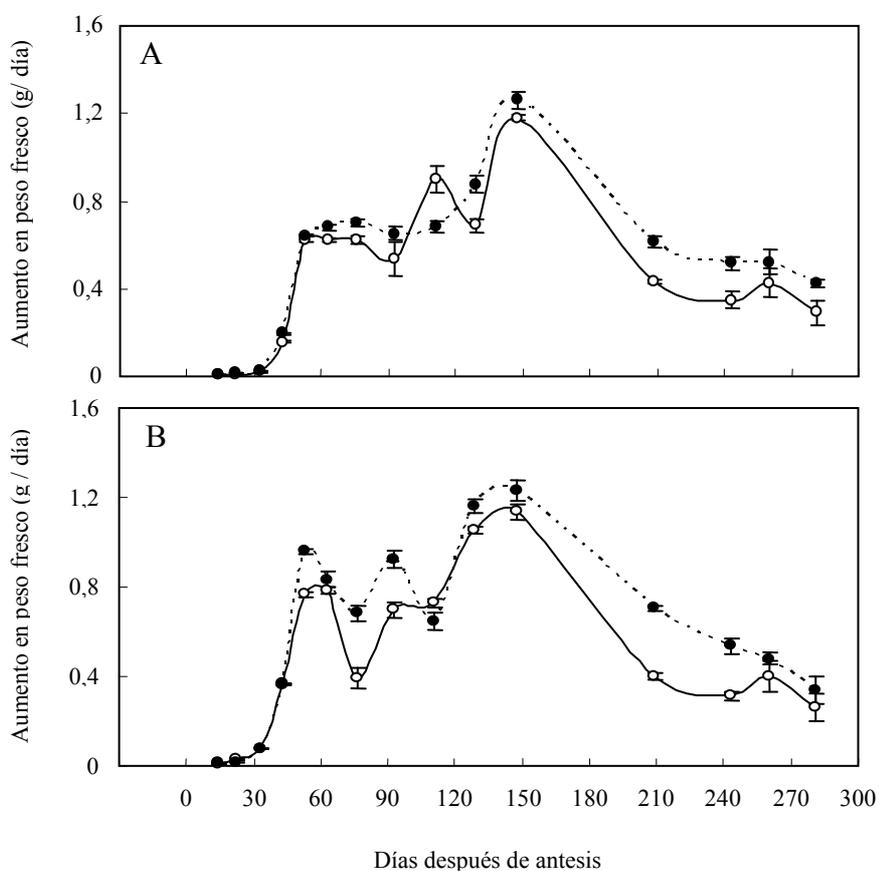


Figura 30. Aumento diario en peso fresco de frutos de inflorescencias multiflorales (A) y uniflorales (B), en árboles testigo (—○—) y tratados con 2,4-D (-●-). Experimento realizado el año 2004.

La baja acumulación de materia seca durante el crecimiento inicial del fruto (hasta 43 días) hace que las diferencias entre tratamientos se mantengan con valores cercanos a cero (Figura 31). En ambos tipos de inflorescencias se presenta un primer periodo con una lenta acumulación de materia seca, entre 53 y 133 días en inflorescencias uniflorales y hasta 148 días en inflorescencias multiflorales (Figura 31). En adelante, las diferencias se incrementan y tienden a estabilizarse, primero en frutos de inflorescencias uniflorales a los 198 días y 40 días después en inflorescencias multiflorales. Al final del periodo de estudio las diferencias en peso seco son mayores en inflorescencias multiflorales (Figura 31).

El aumento diario en peso seco presenta tres máximos en los dos tipos de inflorescencias, pero hay una variación en los valores máximos de acumulación diaria de materia seca, dependiendo del tipo de inflorescencia (Figura 32). En todos los casos, a excepción del segundo máximo obtenido en frutos de inflorescencias uniflorales (93 días; figura 32 B) la tasa de acumulación de materia seca es mayor en el tratamiento de 2,4-D.

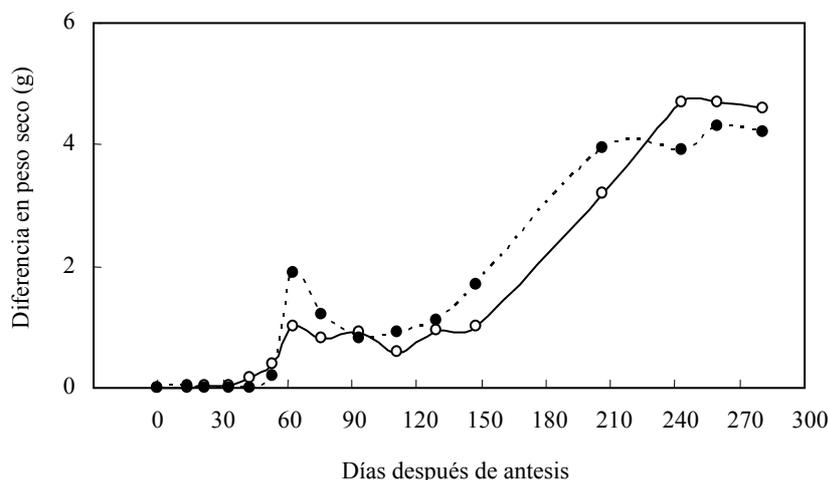


Figura 31. Diferencia en peso seco entre frutos tratados con 2,4-D y sin tratar en inflorescencias multiflorales (—○—) y uniflorales (···●···). Experimento realizado el año 2004.

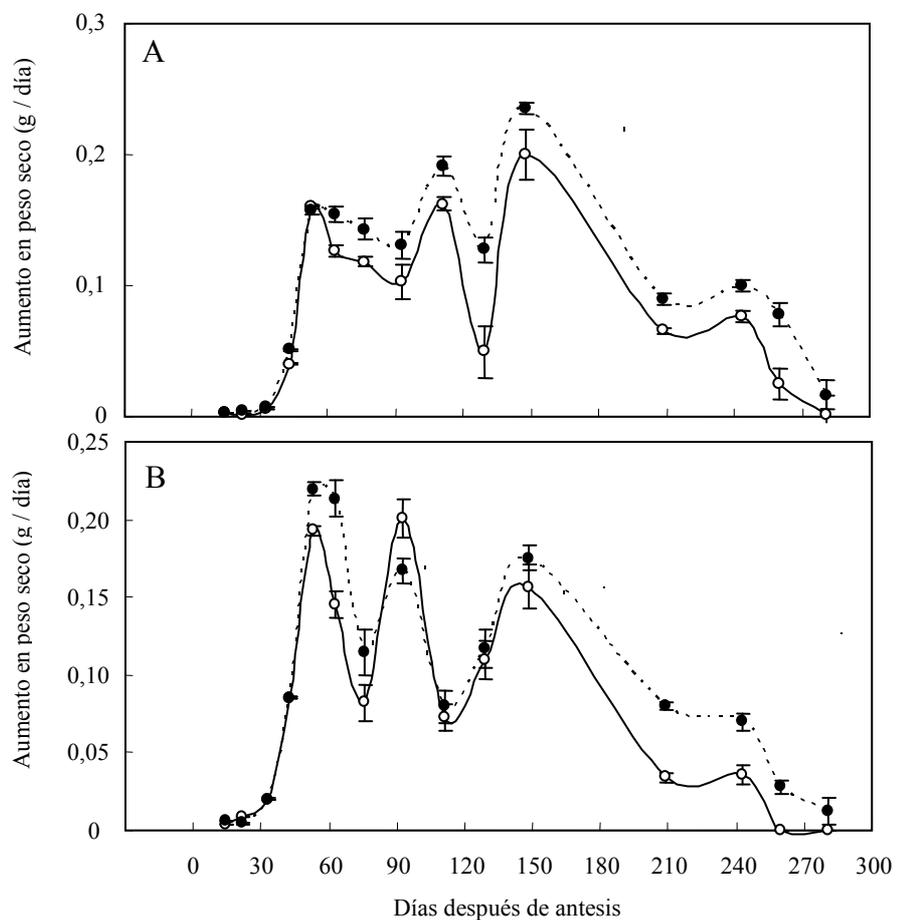


Figura 32. Aumento diario en peso seco de frutos de inflorescencias multiflorales (A) y uniflorales (B), en árboles testigo (—○—) y tratados con 2,4-D (··●··). Experimento realizado el año 2004.

3. CONTENIDO EN AZÚCARES Y ACTIVIDAD INVERTASICA

En los dos años de experimentación (2003 y 2004), de los árboles testigos y de los tratados con 2,4-D, se muestrearon periódicamente frutos de inflorescencias multiflorales con hojas, para determinar el contenido en azúcares y la actividad invertásica. Este estudio se inició el 2 de mayo, momento de la apertura floral en el año 2003, y el 4 de junio en el 2004; se prolongó hasta 28 días después (30 de mayo) el año 2003, y hasta el 9 de septiembre el año 2004.

En el año 2003 y hasta el día 43 el año 2004, se analizó la variación en el contenido en azúcares y la evolución de la actividad invertásica en frutitos enteros sin separarlos en sus partes anatómicas. En estos estados iniciales del desarrollo, la corteza representa la mayor parte del peso del fruto; se considera, por tanto, que los resultados analíticos corresponden a este tejido. En el año 2004, a partir del día 43 (4 de junio), en que las vesículas crecen a mayor velocidad que la corteza y tienen un tamaño suficiente para separarlas de aquella, se analizaron corteza y vesículas por separado. Se cuantificó el contenido en azúcares y la forma en que se presentan en cada tejido, en relación con la actividad de las distintas isoformas de invertasas que pueden estar involucradas en su utilización.

En los gráficos se combinan los resultados de los dos años a fin de mostrar la variación de estos frutitos durante todo el desarrollo.

3.1. Cambios en el contenido en azúcares durante el desarrollo del fruto

3.1.1. Corteza

El contenido en azúcares se redujo tras la antesis de 0,3 % a 0,1 % de materia fresca, manteniéndose casi constante hasta el día 43. A partir del día 55, el contenido en azúcares aumentó lentamente hasta el día 150, en que representó el 0,8 % del peso fresco (Figura 41).

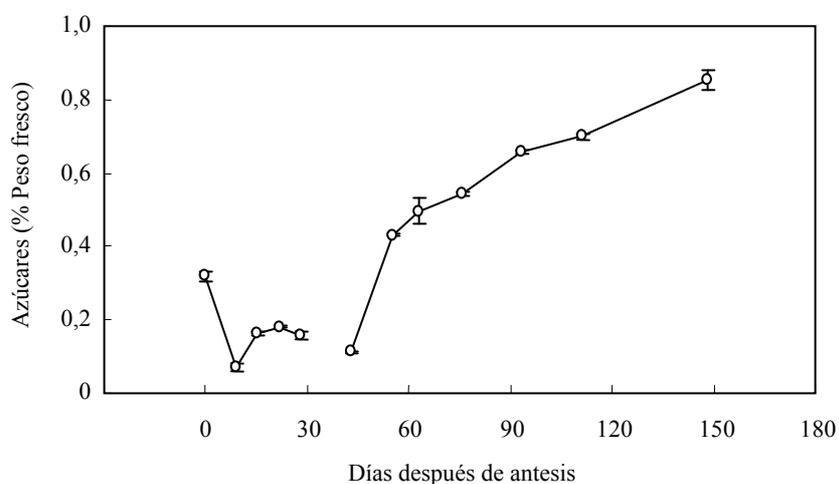


Figura 41. Cambios en la concentración de azúcares en corteza de frutos de inflorescencias multiflorales. Las barras representan el error estándar de dos muestras independientes.

La variación en el contenido en sacarosa fue inicialmente similar al descrito para los azúcares totales. Tras la antesis, el contenido en sacarosa presentó una reducción de 0,3 % a 0,1 % del peso fresco. Hasta el día 43 los niveles de sacarosa se mantuvieron bajos y en adelante aumentaron lentamente hasta el día 93, momento en que se produjo un descenso en su concentración (Figura 42).

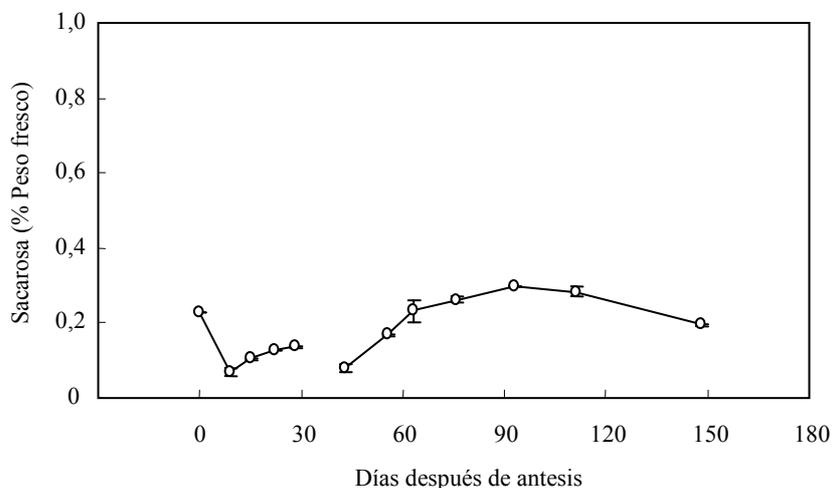


Figura 42. Cambios en la concentración de sacarosa en corteza de frutos de inflorescencias multiflorales. Las barras representan el error estándar de dos muestras independientes.

Hasta el día 43 los azúcares reductores presentaron niveles menores de 0,1 %. En este momento en que el fruto manifiesta un crecimiento lento, la ganancia en peso fresco fue solo de 2 g. Posteriormente la concentración de azúcares reductores se incrementó gradualmente hasta alcanzar al final del periodo de estudio un valor de 0,6 %. (Figura 43)

Los azúcares reductores están representados en igual proporción por glucosa y fructosa hasta el día 110, con un aporte de 0,2 %. A partir de este momento la glucosa exhibió un aumento considerable, hasta alcanzar un valor de 0,5 % el día 150, mientras que la fructosa se mantuvo constante (Figura 44).

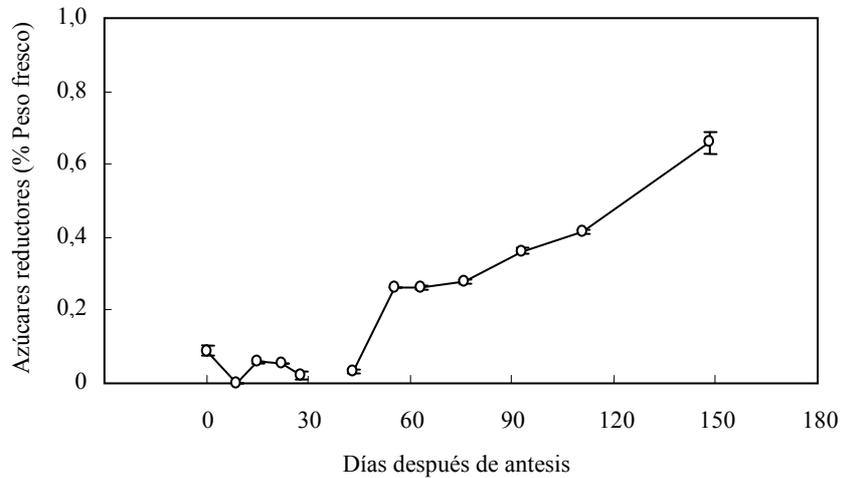


Figura 43. Cambios en la concentración de azúcares reductores en corteza de frutos de inflorescencias multiflorales. Las barras representan el error estándar de dos muestras independientes.

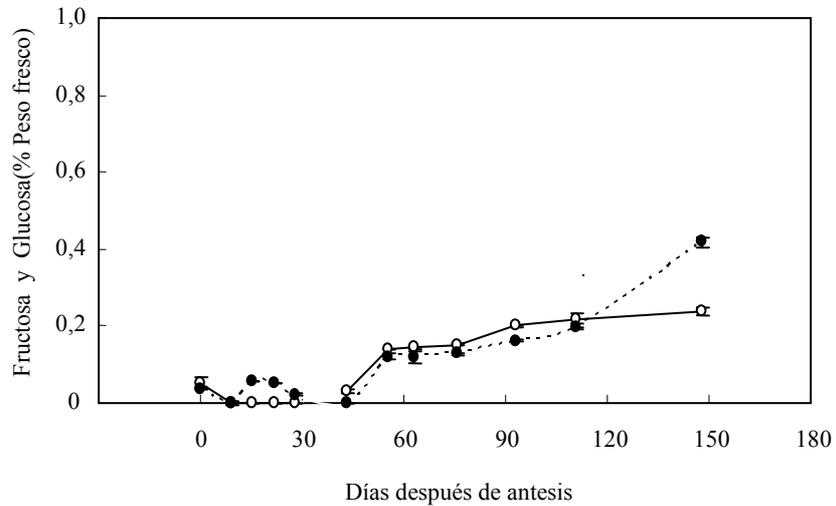


Figura 44. Cambios en la concentración de fructosa (—○—) y glucosa (·-·-·) en corteza de frutos de inflorescencias multiflorales. Las barras representan el error estándar de dos muestras independientes.

3.1.2. Vesículas

El contenido en azúcares de las vesículas aumentó continuamente durante todo el periodo de estudio. Entre los días 55 y 76 su contenido fue menor que el observado en la corteza. A partir del día 93 hubo una mayor concentración de azúcar en las vesículas, alcanzando el día 150 el 1,4 % de materia fresca (Figura 45 A)). La concentración de sacarosa en las vesículas fue superior que en corteza, pero la variación en su contenido fue poco importante, representando el día 55 el 0,3 % del peso fresco y alcanzando el día 150 un valor de 0,4 % (Figura 45 B).

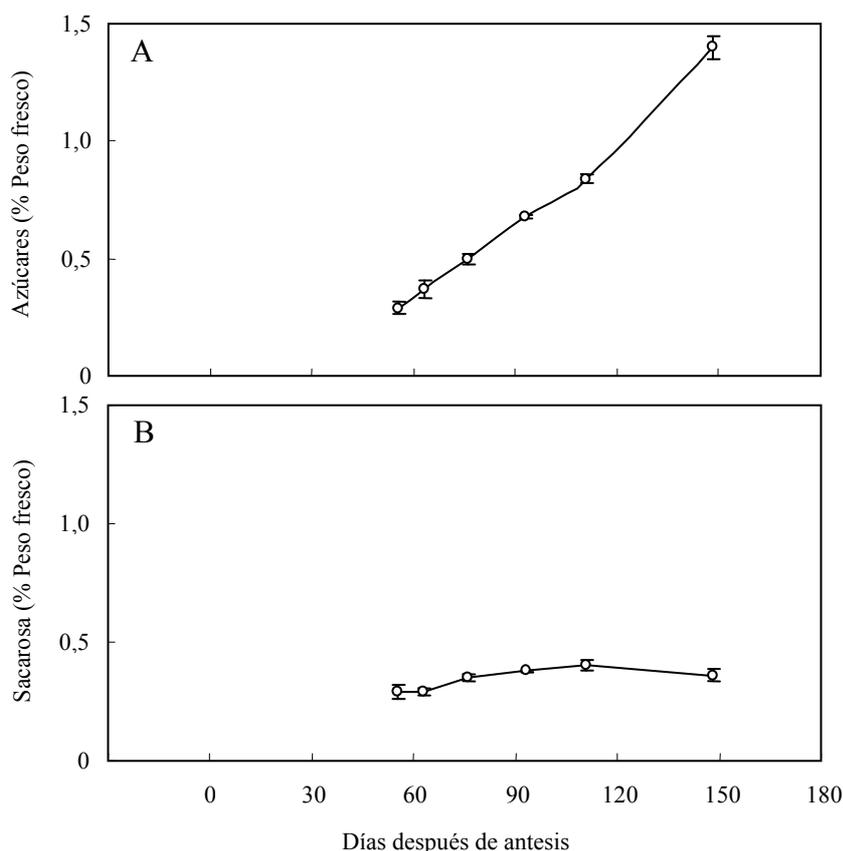


Figura 45. Cambios en la concentración de azúcares (A) y sacarosa (B), en vesículas de frutos de inflorescencias multiflorales. Las barras representan el error estándar de dos muestras independientes.

El contenido en azúcares reductores en las vesículas fue indetectable el día 55, aumentando a continuación de modo aproximadamente lineal en el tiempo, hasta alcanzar un valor de 1 % el día 150. (Figura 46 A). El nivel de glucosa fue indetectable hasta el día 76, mientras que la fructosa manifestó un aumento constante desde el día 55 hasta el final del periodo de estudio. El contenido en fructosa fue mayor que el de glucosa hasta el día 110 y 40 días después el contenido en glucosa duplicó al de fructosa (Figura 46 B).

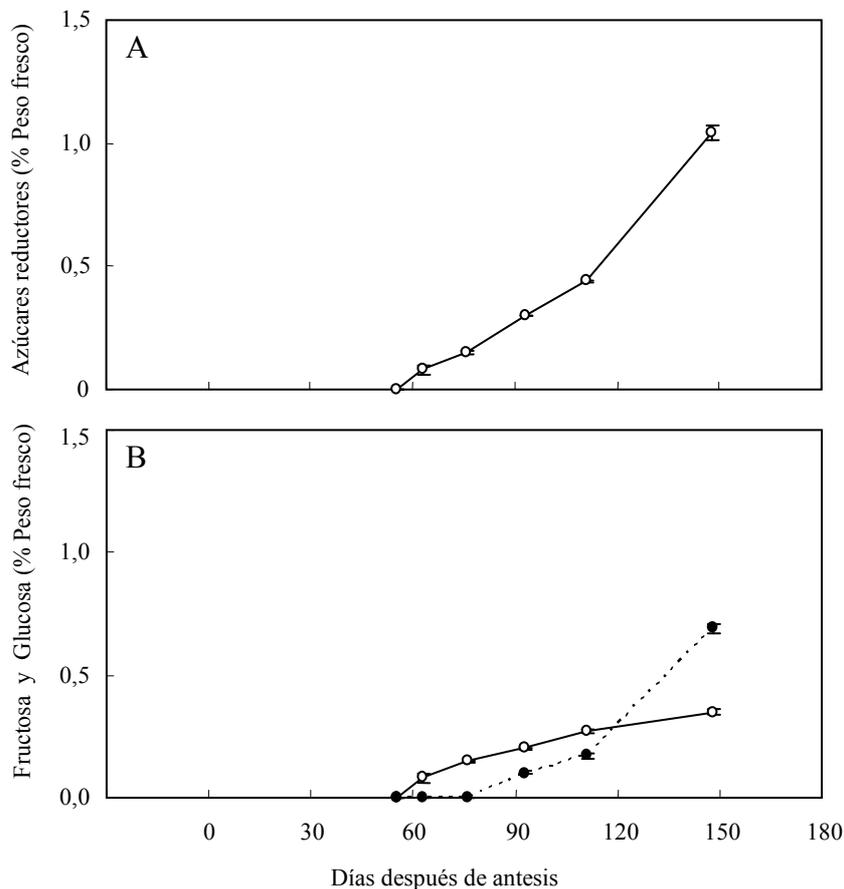


Figura 46. Cambios en la concentración de azúcares reductores (A) fructosa (—○—) y glucosa (··●··) (B), en vesículas de frutos de inflorescencias multiflorales. Las barras representan el error estándar de dos muestras independientes.

3.2. Influencia del 2,4-D sobre el contenido en azúcares del fruto

3.2.1. Corteza

La aplicación de 2,4-D incrementó los niveles de azúcares en la corteza frente a los controles sin tratar. En los árboles tratados, el contenido en azúcares de la corteza se mantuvo casi constante desde antesis hasta el día 28, con un valor de 0,3 % del peso fresco. A partir del día 43, el contenido en azúcares exhibió un aumento lento en su concentración; su evolución siguió la misma tendencia que en los testigos sin tratar, pero los valores fueron mayores en los árboles tratados en todas las fechas. El día 150 presentaron un valor de 1,3 % del peso fresco, frente al 0,8 % de los testigos (Figura 47).

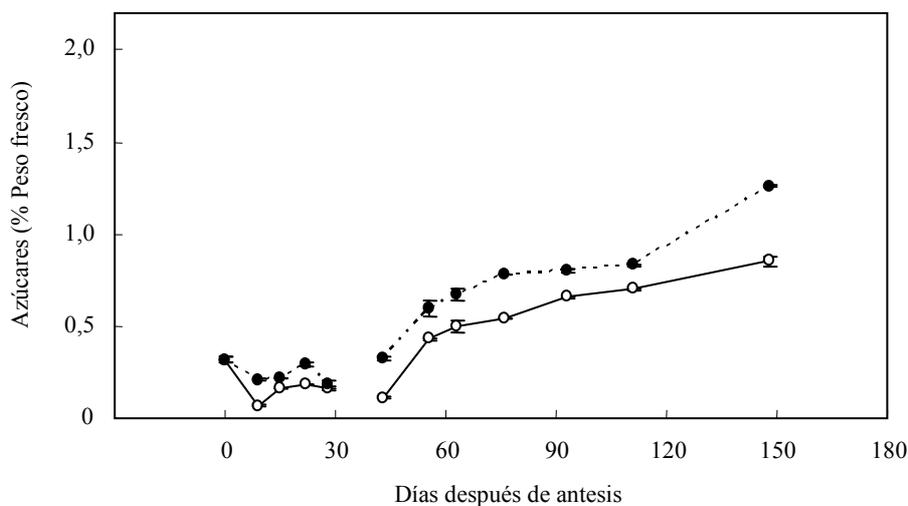


Figura 47. Cambios en la concentración de azúcares en corteza, en frutos de inflorescencias multiflorales tratados con 2,4-D (··●··) y sin tratar (—○—). Las barras representan el error estándar de dos muestras independientes.

El contenido en sacarosa presentó una pauta de variación similar en los árboles tratados con 2,4-D y en los testigos. Tras la antesis se presentó un descenso en su concentración; posteriormente se produjo un aumento lento hasta el día 76 en que representó el 0,4 % del peso fresco. A partir de este momento la concentración de sacarosa se redujo hasta 0,2 % (Figura 48). Entre los días 43 y 93 el contenido en sacarosa en la corteza de frutos tratados superó aproximadamente en un 0,13 %, en términos absolutos, al presente en corteza de frutos testigo.

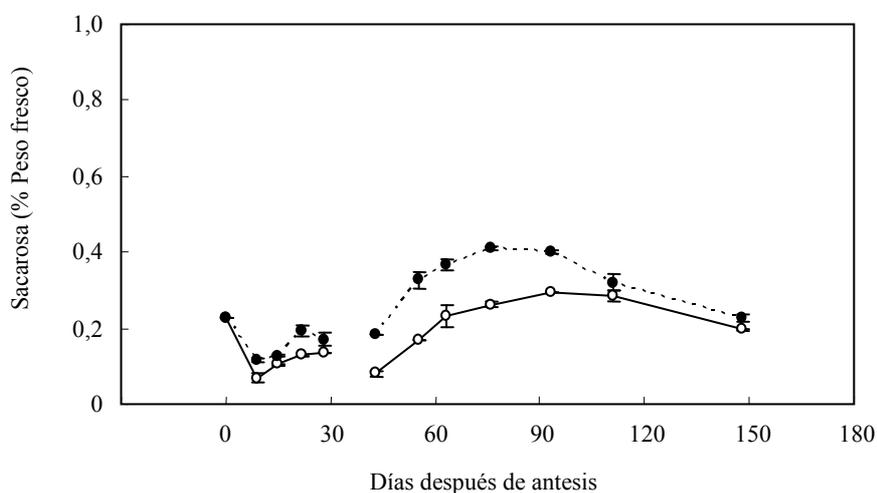


Figura 48. Cambios en la concentración de sacarosa en corteza, en frutos de inflorescencias multiflorales tratados con 2,4-D (·-·-·) y sin tratar (—○—). Las barras representan el error estándar de dos muestras independientes.

La aplicación de 2,4-D aumentó el contenido en azúcares reductores de la corteza pero no modificó la pauta de variación respecto a los testigos. Entre los días 43 y 110 las diferencias en el contenido en azúcares reductores entre frutos tratados y testigos, fueron menores de 0,1 % en términos absolutos. El día 150 aumentaron a un valor de 0,4 % (Figura 49).

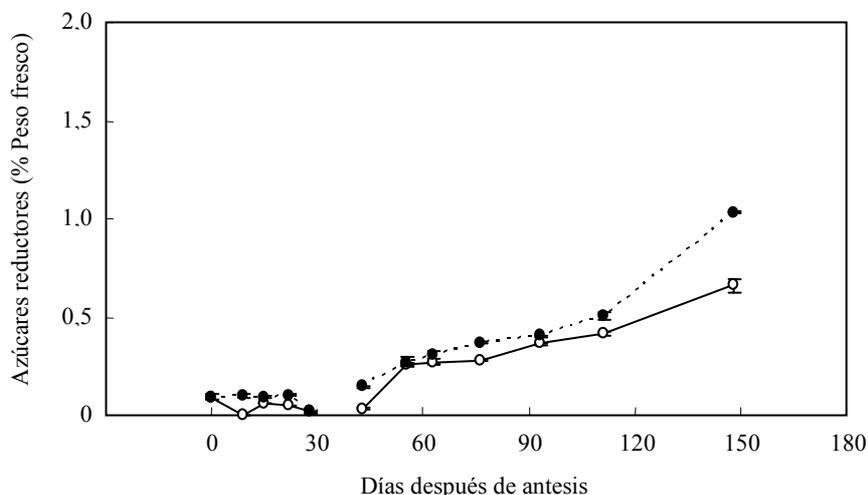


Figura 49. Cambios en la concentración de azúcares reductores en corteza, en frutos de inflorescencias multiflorales tratados con 2,4-D (··●··) y sin tratar (—○—). Las barras representan el error estándar de dos muestras independientes.

El contenido en fructosa en la corteza de frutos tratados fue mayor que en los árboles testigo, pero presentó una pauta de variación similar. El valor de las diferencias en su contenido aumentó en el tiempo, siendo de 0,2 %, en términos absolutos, el día 150. En este momento el contenido en fructosa de la corteza de los frutos tratados representó el 0,4 % del peso fresco (Figura 50 A).

Hasta el día 43 el contenido en glucosa de la corteza en frutos tratados y en los testigos fue muy bajo, y del mismo modo, a partir de este momento la acumulación de glucosa fue mayor en los árboles tratados, alcanzando el día 150, el 0,6 % de su peso fresco frente al 0,4 % del tratamiento testigo (Figura 50 B).

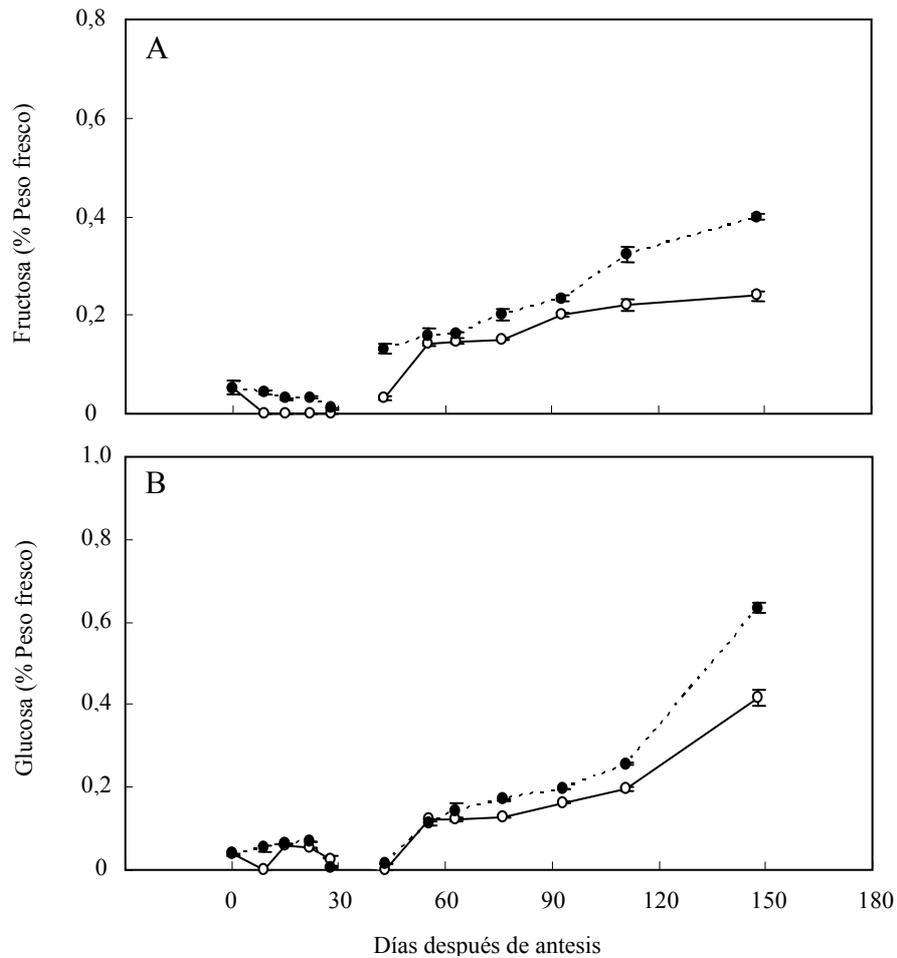


Figura 50. Cambios en la concentración de fructosa (A) y Glucosa (B) en corteza, de frutos de inflorescencias multiflorales tratados con 2,4-D (··●··) y sin tratar (—○—). Las barras representan el error estándar de dos muestras independientes.

3.2.2. Vesículas

Desde el día 55 hasta el final del periodo de estudio, el contenido en azúcares de las vesículas fue mayor en frutos tratados con 2,4-D. Inicialmente se presentó una diferencia de 0,3 % en términos absolutos, siendo el contenido en vesículas de frutos tratados el 0,6 % de su peso fresco. Con el avance del estado de desarrollo del fruto la diferencia entre tratamientos aumento en términos absolutos, alcanzando el día 150 un valor de 0,5 %. En este momento las vesículas de frutos tratados presentaron una concentración del 2 % de su peso fresco, frente a un valor de 1,4 % en los testigos (Figura 51).

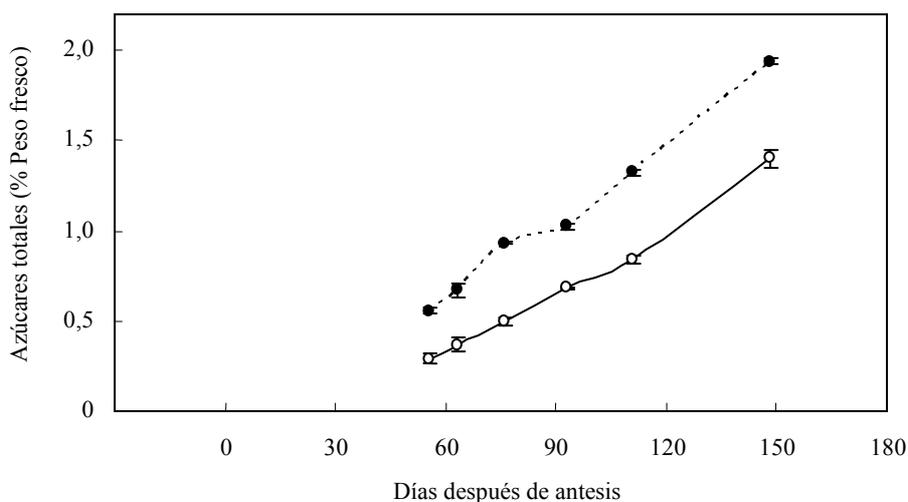


Figura 51. Cambios en la concentración de azúcares en vesículas, en frutos de inflorescencias multiflorales tratados con 2,4-D (-.-●-.) y sin tratar (—○—). Las barras representan el error estándar de dos muestras independientes.

El nivel de sacarosa en las vesículas de árboles tratados fue mayor que en los árboles testigo. Las diferencias se hicieron mayores con el avance del estado de desarrollo del fruto. El día 55, el contenido en sacarosa en vesículas de frutos tratados superó en un 0,15 % al tratamiento testigo, mientras que el día 110 la diferencia alcanzó un valor de 0,35 %, manteniéndose invariable hasta el final del periodo de estudio (Figura 52).

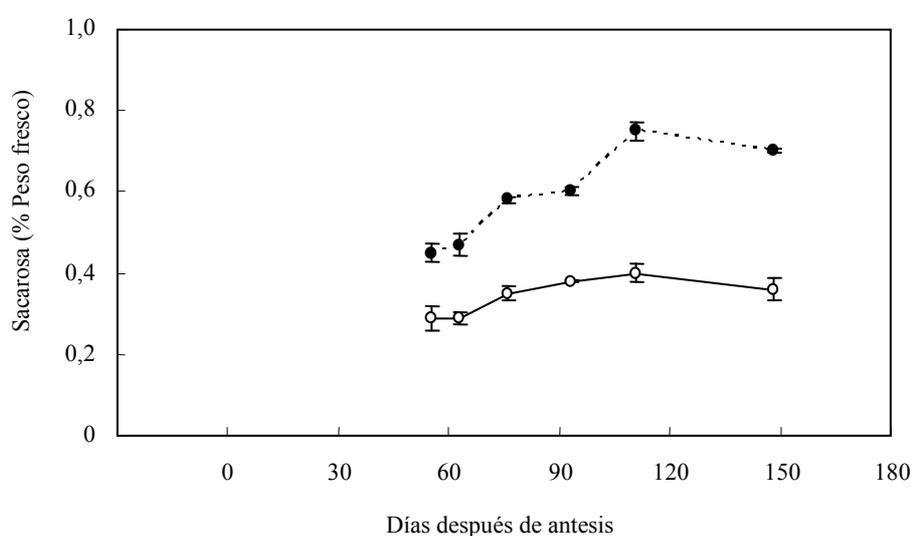


Figura 52. Cambios en la concentración de sacarosa en vesículas, en frutos de inflorescencias multiflorales tratados con 2,4-D (·-·-·) y sin tratar (—○—). Las barras representan el error estándar de dos muestras independientes.

El aumento en el contenido de azúcares reductores en las vesículas de frutos tratados fue mayor que en frutos testigo, representando al final del periodo de estudio el 1,5 % de su peso fresco, con una diferencia de 0,5 % frente al testigo (Figura 53).

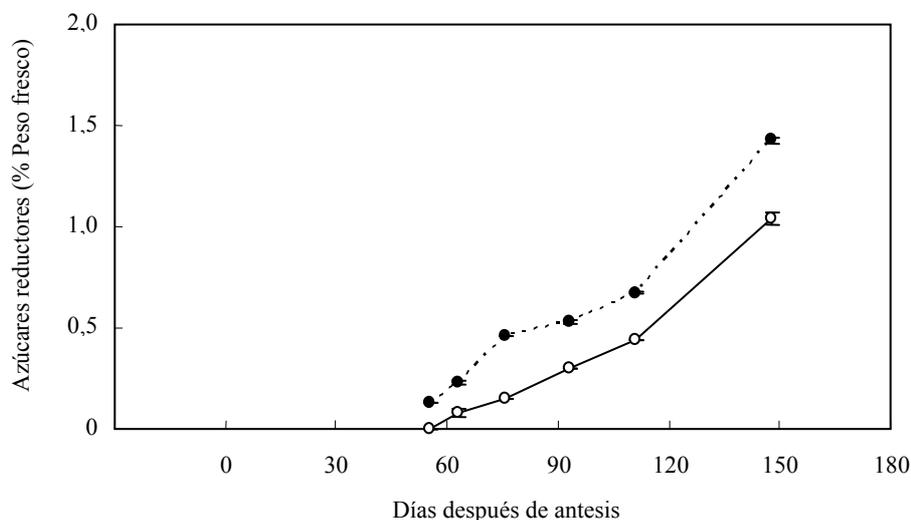


Figura 53. Cambios en la concentración de azúcares reductores en vesículas, en frutos de inflorescencias multiflorales tratados con 2,4-D (··●··) y sin tratar (—○—). Las barras representan el error estándar de dos muestras independientes.

En frutos tratados, el contenido en fructosa y glucosa de las vesículas fue similar hasta el día 110 (Figuras 54 A y 54 B). Mientras que al inicio de este periodo (día 55), el contenido en fructosa en vesículas de frutos testigo fue indetectable, en frutos tratados representó el 0,1 % de su peso fresco (Figura 54 A). El día 150 el contenido en fructosa de frutos tratados superó en 0,2 % al tratamiento testigo, en que representa el 0,6 % de su peso fresco.

A diferencia del tratamiento testigo en que no se detectó glucosa hasta el día 93, en vesículas de frutos tratados el contenido de este azúcar fue detectable desde el inicio del periodo de estudio (día 55) y aumentó con rapidez hasta el día 150, en que representó el 0,9 % del peso fresco (Figura 54 B).

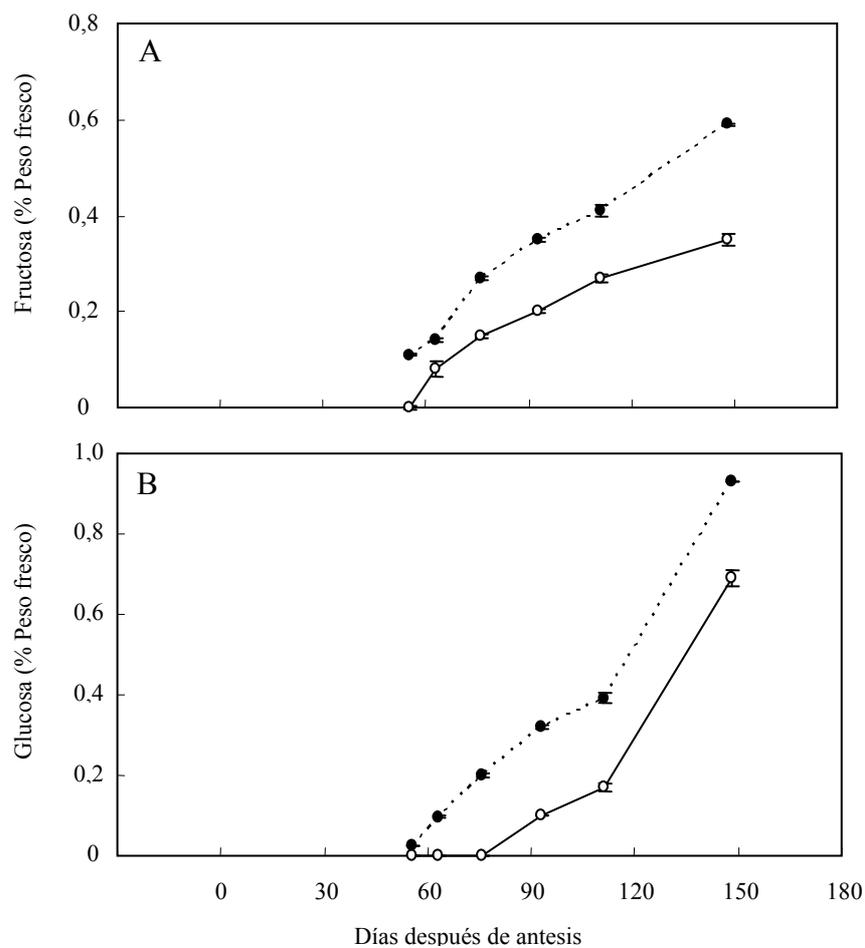


Figura 54. Cambios en la concentración de fructosa (A) y Glucosa (B) en vesículas, de frutos de inflorescencias multiflorales tratados con 2,4-D (●-●-) y sin tratar (○-○-). Las barras representan el error estándar de dos muestras independientes.

3.3 Evolución de la actividad invertásica del fruto

3.3.1. Invertasas ácidas

La máxima actividad de las invertasas ácidas en la corteza se presentó en antesis, reduciéndose considerablemente con el avance del estado de desarrollo del fruto (Figura 55). Inicialmente la isoforma ácida soluble presentó una actividad mucho más elevada (44,6 nkat/g) que la ligada (7,4 nkat/g) y su reducción en el tiempo en términos relativos fue mas lenta. Hasta el día 43 la invertasa ácida ligada perdió el 86 % de su actividad inicial (en antesis), mientras que la isoforma ácida soluble perdió un 60 %. La actividad de la invertasa ácida soluble se mantuvo en 4,6 nkat/g el día 150. La isoforma ácida ligada fue indetectable el día 120 (Figura 55 A).

El día 55 la invertasa ácida soluble presentó una menor actividad en las vesículas (6,2 nkat/g) que en la corteza y se mantuvo con niveles bajos en su actividad en este tejido hasta el final del periodo de estudio (0,6 nkat/g). La isoforma ácida ligada, al igual que en la corteza, exhibió una actividad muy baja con valores cercanos a cero (Figura 55 B)

3.3.2. Invertasas alcalinas

La mayor actividad de la invertasa alcalina soluble en la corteza se presentó en antesis, reduciéndose rápidamente hasta alcanzar valores cercanos a cero el día 14. Desde este momento y hasta el final del periodo de estudio, la actividad de esta invertasa no superó los 0,4 nkat/g. La isoforma alcalina ligada mantuvo una actividad baja desde antesis (1,6 nkat/g) hasta el día 63, en que fue indetectable (Figura 56 A).

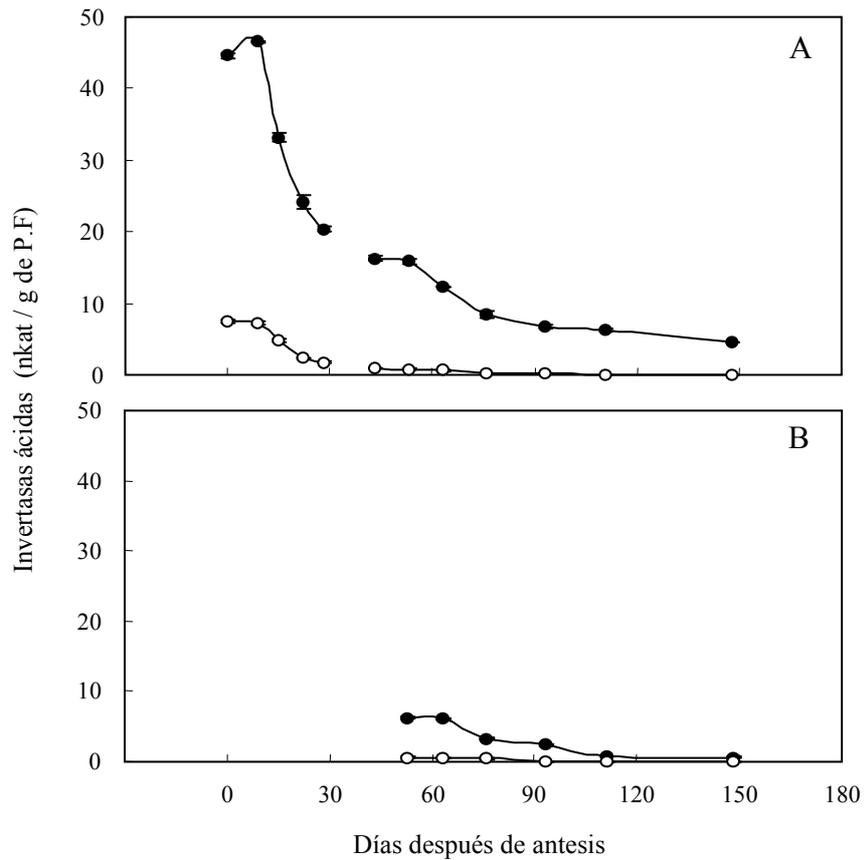


Figura 55. Evolución de la actividad invertásica ácida soluble (—●—) y ácida ligada (—○—) en corteza (A) y vesículas (B), de frutos de inflorescencias multiflorales. Las barras representan el error estándar de dos muestras independientes.

El día 55 la actividad invertásica alcalina fue mayor en las vesículas que en la corteza, reduciéndose rápidamente con el avance del estado de desarrollo del fruto. La invertasa alcalina soluble presentó a los 55 días 1,8 nkat/g y fue indetectable el día 110, mientras que la ácida ligada inició con 0,7 nkat/g y fue indetectable 10 días después (Figura 56 B)

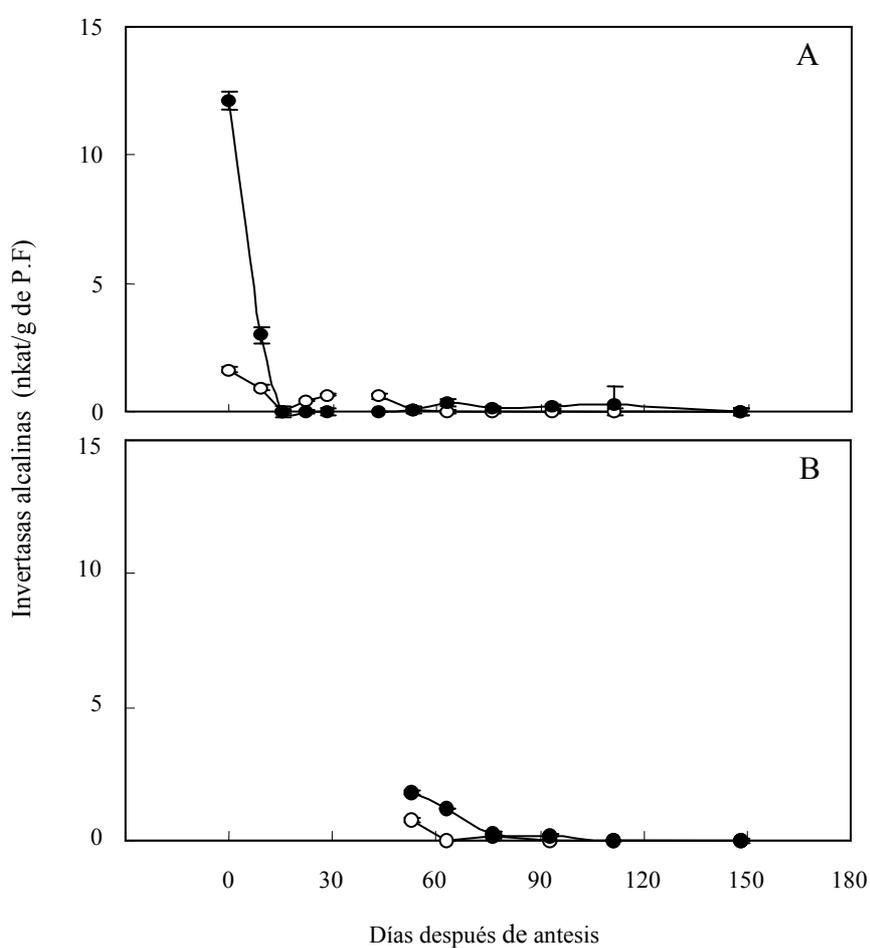


Figura 56. Evolución de la actividad invertásica alcalina soluble (—●—) y alcalina ligada (—○—) en corteza (A) y vesículas (B), de frutos de inflorescencias multiflorales. Las barras representan el error estándar de dos muestras independientes.

3.4. Influencia del 2,4-D sobre la actividad invertásica.

3.4.1. Invertasa ácida

En frutos tratados con 2,4-D la invertasa ácida soluble se redujo inmediatamente tras la antesis, pero manteniendo a continuación su actividad (37,7 nkat/g) constante desde el día 9 hasta el día 28. Entre los días 14 y 120 la actividad fue mayor en frutos tratados que en testigo, pero en ambos tratamientos, se presentó una reducción acelerada en su actividad hasta el día 76. El día 150, los valores en los frutos tratados fueron similares a los obtenidos en frutos sin tratar (Figura 57 A).

También en las vesículas, la actividad de la invertasa ácida soluble fue mayor en frutos tratados con 2,4-D en todo el periodo de estudio. A partir del día 63 su actividad fue muy baja, de 2,2 nkat/g en frutos tratados, pero aún superior al valor de 0,6 nkat/g en los testigos (Figura 57 B).

El efecto del 2,4-D en la actividad de la invertasa ácida ligada presentó la misma tendencia que la soluble, pero su actividad en antesis fue mucho menor (7 nkat/g). En frutos tratados con 2,4-D hubo una reducción inicial inmediatamente tras la antesis, que se mantuvo invariable hasta 28 días después con 4,8 nkat/g. Seguidamente se presentó un segundo periodo de máxima reducción hasta el día 53 y en adelante disminuyó su velocidad de reducción hasta estabilizarse el día 110, en que fue indetectable en el tratamiento testigo y con valores de 0,3 nkat/g en el tratamiento de 2,4-D (Figura 58 A).

En las vesículas se presentó una actividad más baja de invertasas ácidas ligadas. A los 53 días en frutos del tratamiento de 2,4-D solo alcanza 1,2 nkat/g. La actividad se redujo lentamente hasta el día 150, en que fue indetectable (Figura 55 B).

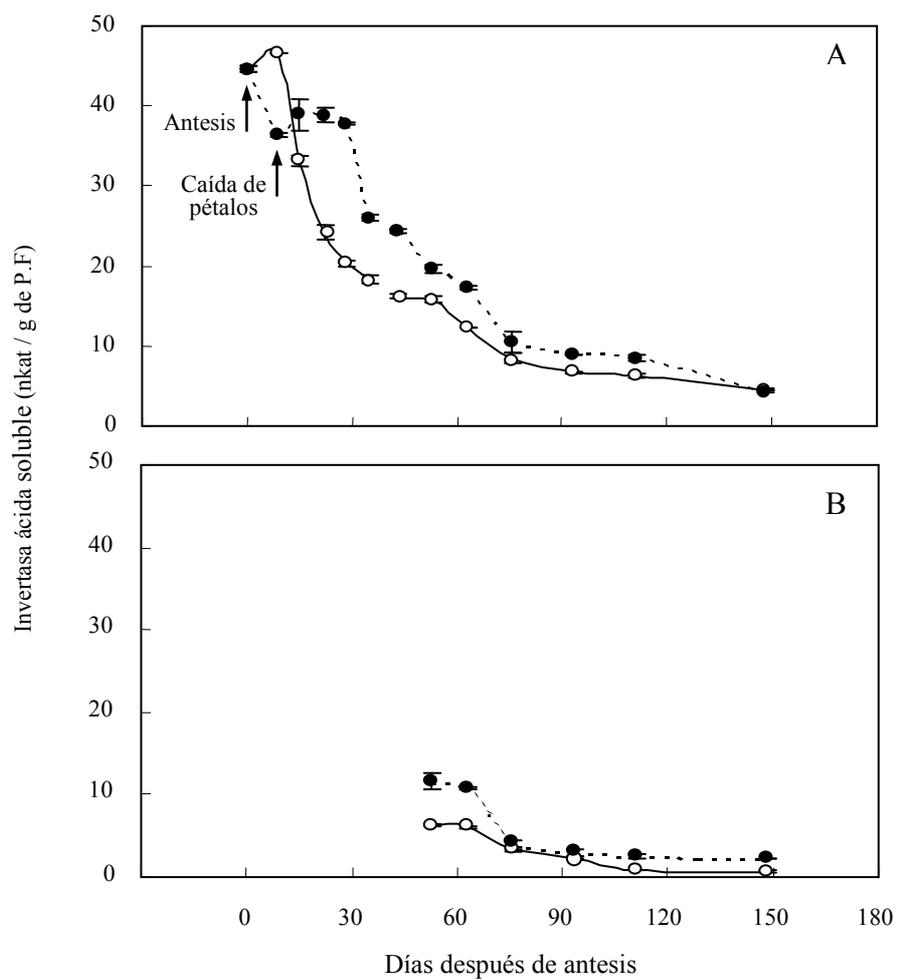


Figura 57. Evolución de la actividad invertásica ácida soluble en corteza (A) y vesículas (B), en frutos de inflorescencias multiflorales, tratados con 2,4-D (·····) y sin tratar (—o—). Las barras representan el error estándar de dos muestras independientes.

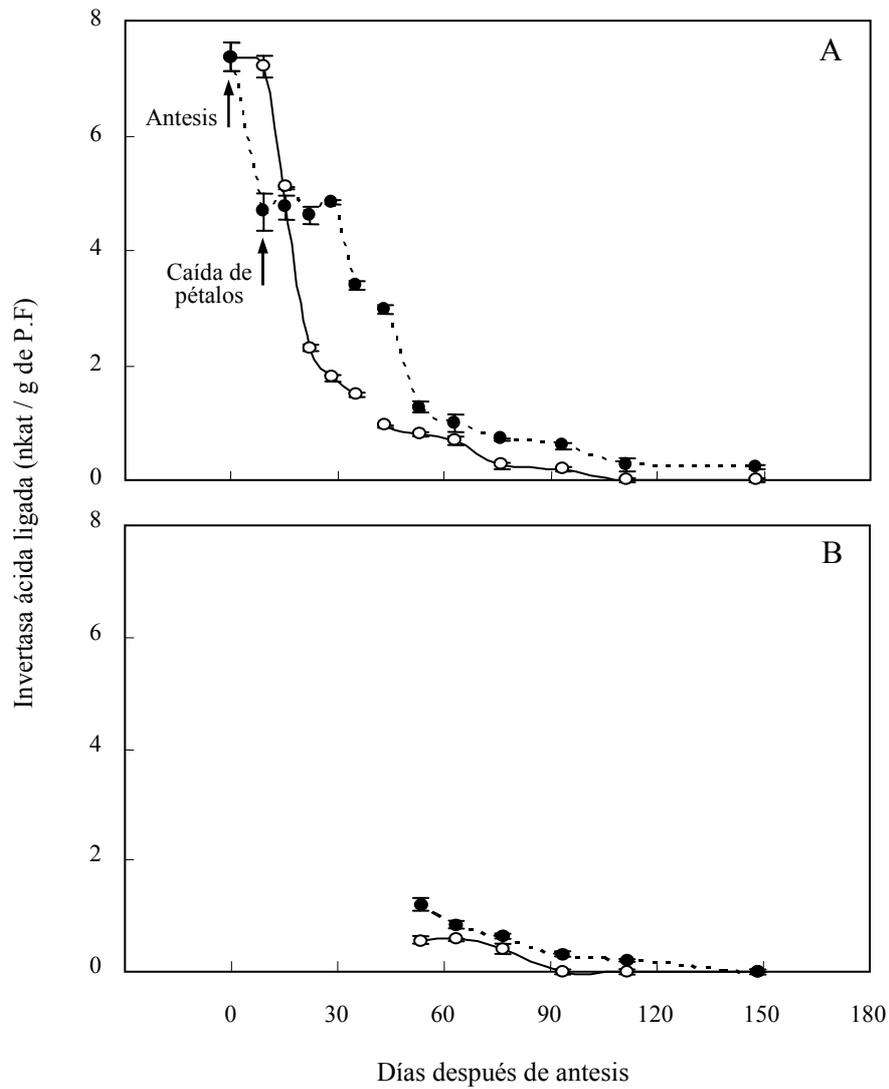


Figura 58. Evolución de la actividad invertásica ácida ligada en corteza (A) y vesículas (B), en frutos de inflorescencias multiflorales, tratados con 2,4-D (---●---) y sin tratar (—○—). Las barras representan el error estándar de dos muestras independientes.

3.4.2. Invertasas alcalinas

Inicialmente no se presentaron diferencias en la actividad de la invertasa alcalina soluble, entre frutos tratados con 2,4-D y sin tratar. En ambos casos, la actividad descendió bruscamente tras la antesis hasta hacerse indetectable el día 15. A partir del día 28 la actividad fue ligeramente superior en el tratamiento de 2,4-D, pero su valor fue menor que 1 nkat/g (Figura 59 A).

A diferencia de la corteza, en las vesículas se manifiesta una mayor actividad de esta invertasa con un máximo de 6,4 nkat/g en frutos tratados con 2,4-D. En los dos tratamientos, la actividad fue indetectable el día 110 (Figura 59 B).

La invertasa alcalina ligada mantuvo una actividad muy baja durante todo el periodo de estudio con valores inferiores a los 2 nkat/g. En la corteza de frutos tratados, inmediatamente tras la antesis la actividad se redujo de 1,5 nkat/g a 0,3 nkat/g, mientras que en el tratamiento testigo su descenso fue más lento, hasta alcanzar el día 14 valores de cero. Posteriormente su actividad se recuperó hasta el día 35, siendo mayor en frutos tratados que en testigo. A partir de este momento se presentó una reducción en su velocidad de actuación, hasta detenerse el día 110 (Figura 60 A).

La actividad invertásica alcalina ligada en las vesículas se mantuvo con valores inferiores a 1 nkat/g. Tras la aplicación de 2,4-D, su actividad fue mayor en frutos tratados hasta el día 93, y 30 días después se detuvo (Figura 60 B).

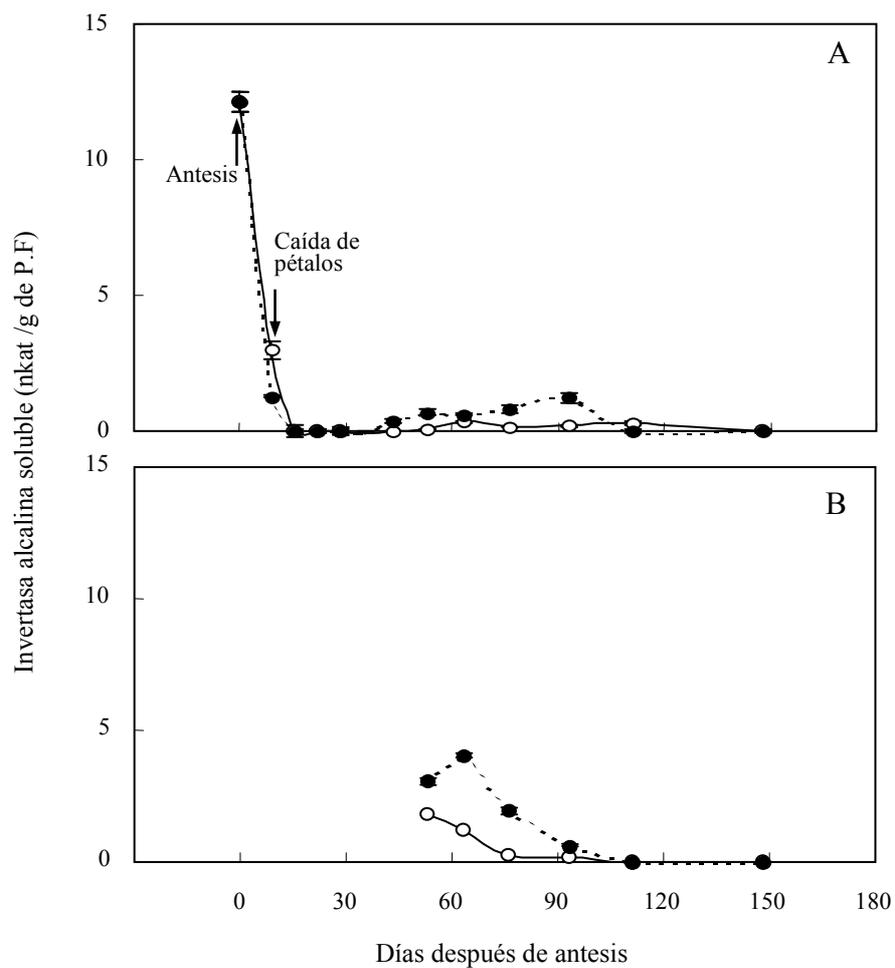


Figura 59. Evolución de la actividad invertásica alcalina soluble en corteza (A) y vesículas (B), en frutos de inflorescencias multiflorales, tratados con 2,4-D (·-·-) y sin tratar (-o-). Las barras representan el error estándar de dos muestras independientes.

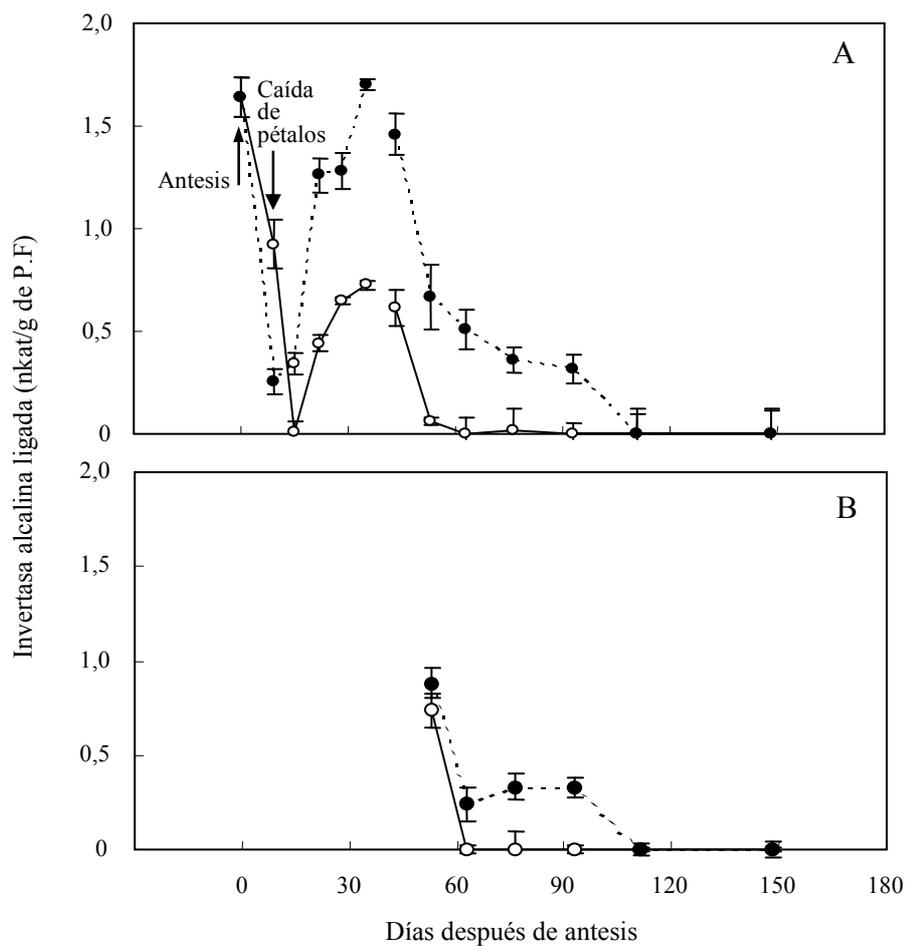


Figura 60. Evolución de la actividad invertásica alcalina ligada en corteza (A) y vesículas (B), en frutos de inflorescencias multiflorales, tratados con 2,4-D (●- -) y sin tratar (○- -). Las barras representan el error estándar de dos muestras independientes.

3.5. Relación entre la actividad invertásica del fruto y el contenido en azúcares

3.5.1. Corteza

El contenido en sacarosa y la actividad de la invertasa ácida soluble, en frutos testigo y tratados con 2,4-D, están inversamente relacionados ($P \leq 0,01$). La relación que mejor se ajusta es una regresión lineal, con un coeficiente de correlación de $-0,92$ en el tratamiento testigo y de $-0,93$ para el tratamiento de 2,4-D, llegando a explicar entre el 83 % y el 89 % de la variación observada, respectivamente (Figura 61). Los coeficientes de correlación de ambos tratamientos indican una relación estrecha entre los parámetros evaluados.

Existen diferencias significativas entre las pendientes de las rectas de ajuste del tratamiento testigo y de 2,4-D ($P \leq 0,05$), para los diferentes valores de las variables relacionadas (Tabla 7).

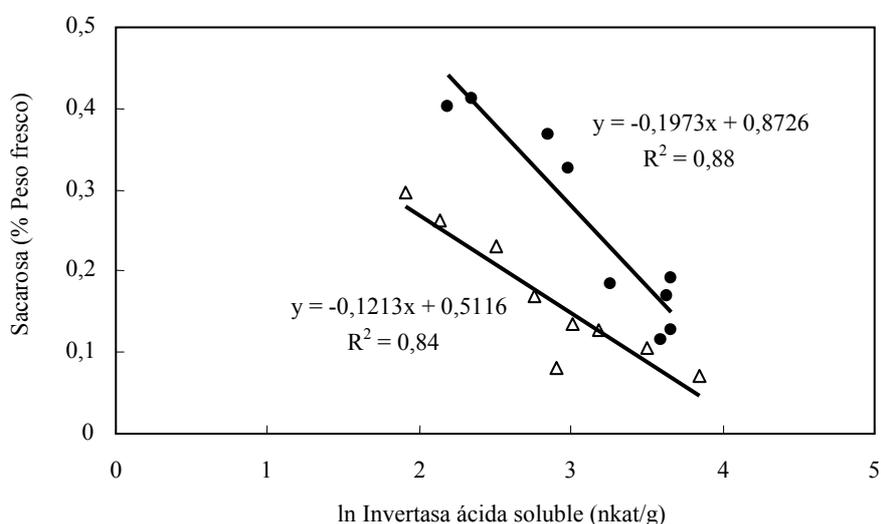


Figura 61. Relación entre la actividad invertásica ácida soluble y el contenido en sacarosa, en corteza de frutos de inflorescencias multiflorales, tratados con 2,4-D (●) y sin tratar (Δ).

Tabla 7. ANOVA para la comparación de las rectas de regresión de la actividad invertásica ácida soluble en función del contenido en sacarosa.

Comparación	Fuente	SC	GL	F
Testigo -2,4-D	Inv.Aci.Sol	0,101	1	61,25 **
	Punto de Corte	0,073	1	43,92 **
	Pendiente	0,008	1	5,08 *
	Modelo	0,183	3	

** Significativo para $P \leq 0,01$. * Significativo para $P \leq 0,05$.

También se encontró una relación inversa y significativa (Tabla 8) entre el contenido en azúcares reductores y la actividad de la invertasa ácida soluble. El modelo que mejor ajusta es una regresión logarítmica, que explica entre el 75 % y el 95 % de la variación observada. El coeficiente de correlación en el tratamiento testigo fue de -0,78 indicando una relación moderadamente fuerte entre los parámetros relacionadas, mientras que en el tratamiento de 2,4-D se obtuvo un coeficiente de correlación de -0,93, lo que indica una relación mas estrecha (Figura 62).

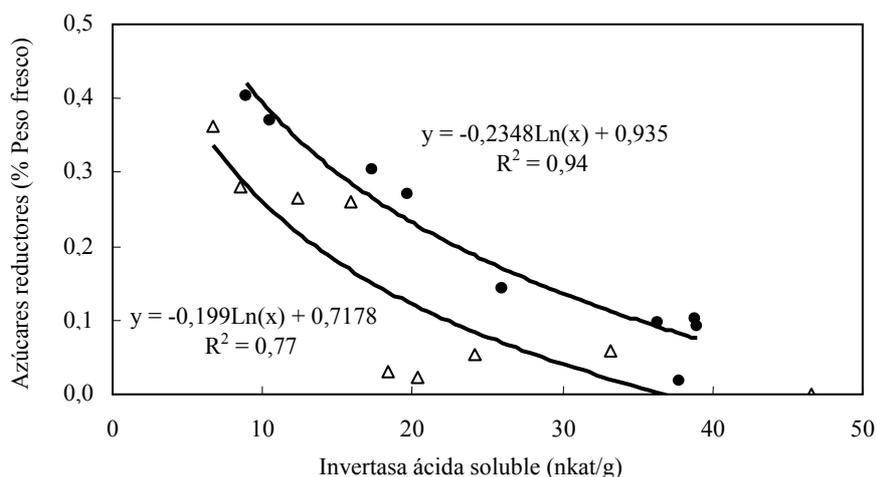


Figura 62. Relación entre la actividad invertásica ácida soluble y el contenido en azúcares reductores, en corteza de frutos de inflorescencias multiflorales, tratados con 2,4-D (●) y sin tratar (Δ).

Tabla 8. ANOVA para la regresión de la actividad invertásica ácida soluble en función del contenido en azúcares reductores.

Fuente	Testigo			2,4-D		
	SC	GL	F	SC	GL	F
Modelo	0,023	1	10,74*	0,14	1	43,34**
Residuo	0,015	7		0,022	7	
Total	0,038	8		0,157	8	

* Significativo para $P \leq 0,05$

** Significativo para $P \leq 0,01$

Se encontraron correlaciones negativas y significativas ($P \leq 0,01$; Tabla 9) entre la actividad de la invertasa ácida ligada y el contenido en sacarosa de un lado, y azúcares reductores de otro. Una regresión logarítmica ajusta mejor que una recta (Figura 63 y 64).

La correlación entre la isoforma ácida ligada y el contenido en sacarosa, explica entre el 76 % y el 95 % de la variación observada en el tratamiento testigo y con 2,4-D respectivamente, indicando una relación moderadamente fuerte en el tratamiento testigo, con un coeficiente de correlación de -0,87 y una relación más estrecha en el tratamiento de 2,4-D, con un coeficiente de correlación de -0,93 (Figura 63).

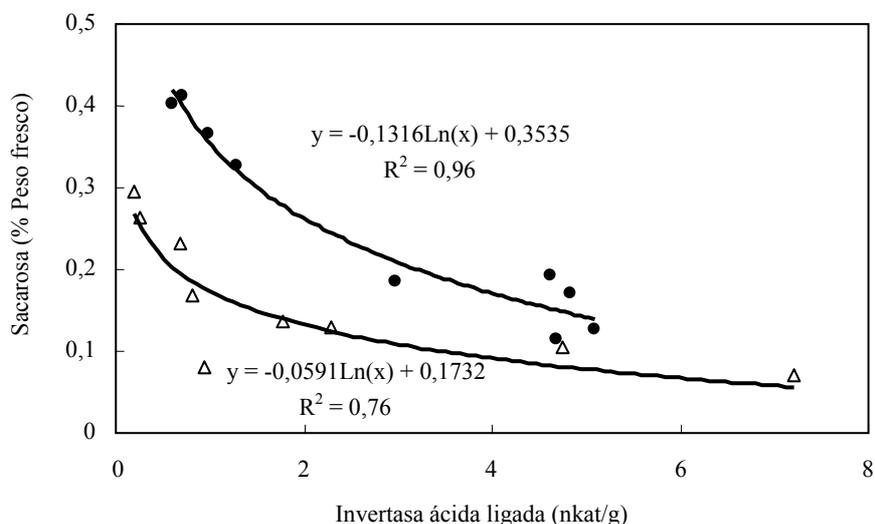


Figura 63. Relación entre la actividad invertásica ácida ligada y el contenido en sacarosa, en corteza de frutos de inflorescencias multiflorales, tratados con 2,4-D (●) y sin tratar (Δ).

Tabla 9. ANOVA para la regresión de la actividad invertásica ácida ligada en función del contenido en sacarosa.

Fuente	Testigo			2,4-D		
	SC	GL	F	SC	GL	F
Modelo	0,040	1	21,89**	0,112	1	146,80**
Residuo	0,013	7		0,005	7	
Total	0,052	8		0,117	8	

** Significativo para $P \leq 0,01$

El ajuste de la relación entre el contenido en azúcares reductores y la actividad de la invertasa ácida ligada, explica entre el 73 % y el 97 % de la variación observada, con un coeficiente de correlación de -0,86 para el tratamiento testigo que indica una relación moderadamente fuerte entre las variables en estudio y de -0,99 para el tratamiento de 2,4-D indicando una relación mas estrecha entre los parámetros en estudio (Figura 64; Tabla 10).

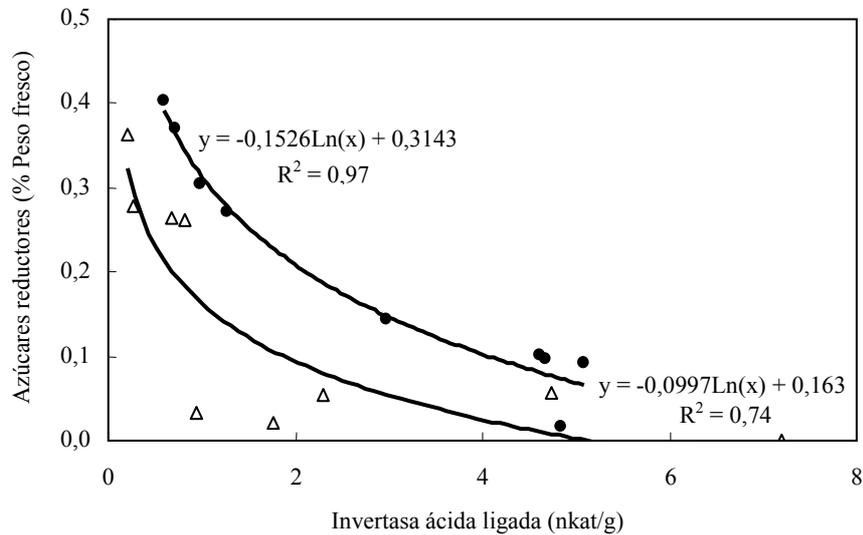


Figura 64. Relación entre la actividad invertásica ácida ligada y el contenido en azúcares reductores, en corteza de frutos de inflorescencias multiflorales, tratados con 2,4-D (●) y sin tratar (Δ).

Tabla 10. ANOVA para la regresión de la actividad invertásica ácida ligada en función del contenido en azúcares reductores.

Fuente	Testigo			2,4-D		
	SC	GL	F	SC	GL	F
Modelo	0,115	1	19,12**	0,147	1	213,77**
Residuo	0,042	7		0,005	7	
Total	0,157	8		0,152	8	

** Significativo para $P \leq 0,01$

No se encontró relación entre el contenido en sacarosa o azúcares reductores, y la actividad de las invertasas alcalinas en la corteza.

3.5.2. Vesículas

No se encontró relación entre el contenido en sacarosa, o en azúcares reductores y la actividad de la invertasa ácida soluble.

La correlación encontrada entre el contenido en sacarosa y la actividad de la isoforma ácida ligada es inversa y significativa y el modelo que mejor ajusta es una regresión lineal, que explica entre el 83 % y el 87 % de la variación observada en los dos tratamientos (Testigo y 2,4-D respectivamente). En el tratamiento testigo el coeficiente de correlación fue de -0,92 y en el tratamiento de 2,4-D de -0,93, indicando una relación estrecha entre los parámetros en estudio (Figura 65).

Las diferencias que se presentan entre las rectas de regresión del tratamiento testigo y de 2,4-D, son debidas a diferencias en la ordenada en el origen, siendo las pendientes similares (Tabla 11).

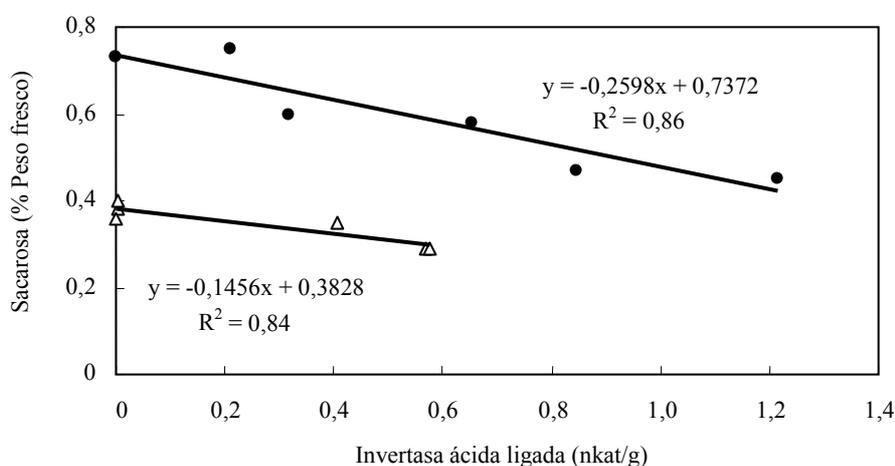


Figura 65. Relación entre la actividad invertásica ácida ligada y el contenido en sacarosa, en vesículas de frutos de inflorescencias multiflorales, tratados con 2,4-D (●) y sin tratar (△).

Tabla 11. ANOVA para la comparación de las rectas de regresión de la actividad invertásica ácida ligada en función del contenido en sacarosa.

Comparación	Fuente	SC	GL	F
Testigo -2,4-D	Inv.Aci.lig.	0,008	1	4,88 ns
	Punto de Corte	0,256	1	165,1 **
	Pendiente	0,004	1	2,54 ns
	Modelo	0,267	3	

** Significativo para $P \leq 0,01$. ns: no significativo.

La correlación entre el contenido en azúcares reductores y la actividad invertásica ácida ligada es inversa (Tabla 12), tanto en el tratamiento testigo ($P \leq 0,05$) como en el tratamiento de 2,4-D ($P \leq 0,01$). En todos los casos, el modelo que mejor ajusta es una regresión logarítmica, que explica entre el 67 % y el 95 % de la variación observada. En el tratamiento testigo el coeficiente de correlación fue de -0,81, indicando una relación moderadamente fuerte entre las variables y de -0,98 en el tratamiento de 2,4-D, que si indica una relación mas estrecha (Figura 66).

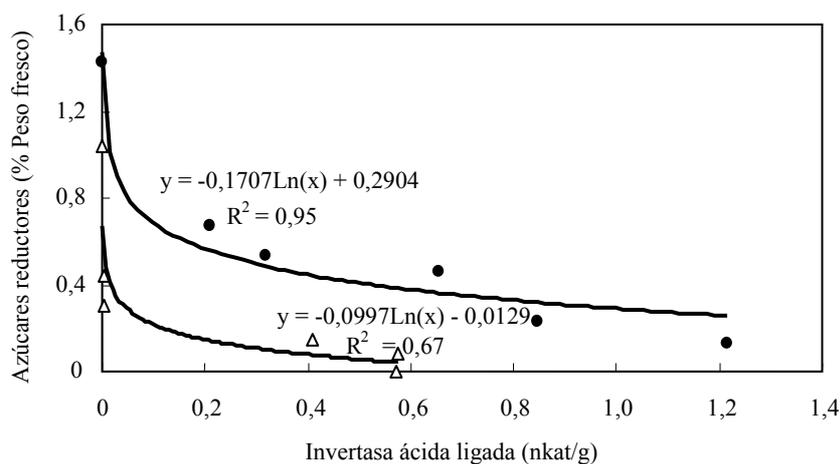


Figura 66. Relación entre la actividad invertásica ácida ligada y el contenido en azúcares reductores, en vesículas de frutos de inflorescencias multiflorales, tratados con 2,4-D (●) y sin tratar (Δ).

Tabla 12. ANOVA para la regresión de la actividad invertásica ácida ligada en función del contenido en azúcares reductores.

Fuente	Testigo			2,4-D		
	SC	GL	F	SC	GL	F
Modelo	0,48	1	8,00*	1,04	1	123,64**
Residuo	0,24	4		0,03	4	
Total	0,72	5		1,07	5	

* Significativo para $P \leq 0,05$

** Significativo para $P \leq 0,01$

No hay relación entre el contenido en azúcares de las vesículas y la actividad de la invertasa alcalina ligada.

La correlación entre el contenido en sacarosa y la invertasa alcalina soluble es altamente significativa, tanto para el tratamiento testigo como para el tratamiento de 2,4-D ($P \leq 0,01$). El ajuste que explica la correlación entre estos parámetros es una regresión lineal, que define entre el 84 % y el 87 % de la variación observada. Esto indica una relación estrecha entre las variables en estudio con un coeficiente de correlación de -0,92 en el tratamiento testigo y de -0,93 para el tratamiento de 2,4-D (Figura 67). Las diferencias que se presentan entre las rectas de regresión del tratamiento testigo y de 2,4-D, son debidas a diferencias en la ordenada en el origen, siendo las pendientes similares (Tabla 13).

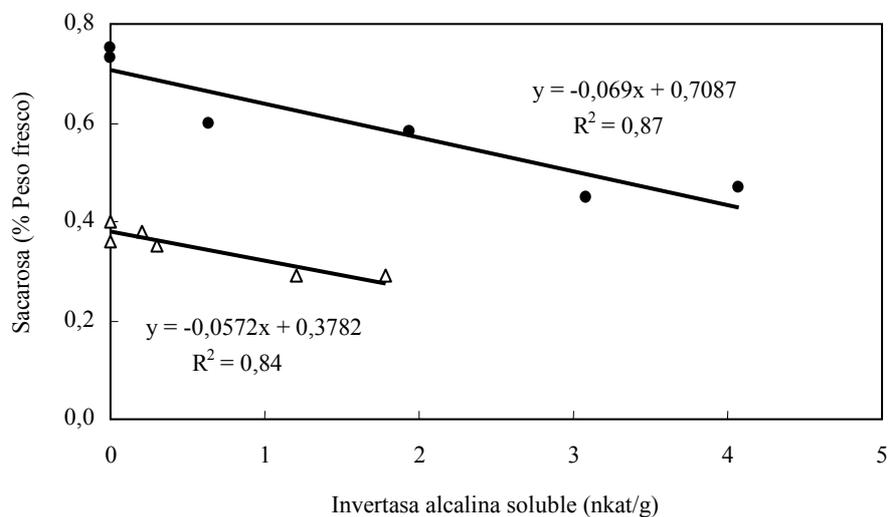


Figura 67. Relación entre la actividad invertásica alcalina soluble y el contenido en sacarosa, en vesículas de frutos de inflorescencias multiflorales, tratados con 2,4-D (●) y sin tratar (Δ).

Tabla 13. ANOVA para la comparación de las rectas de regresión de la actividad invertásica ácida soluble en función del contenido en sacarosa.

Comparación	Fuente	SC	GL	F
Testigo -2,4-D	Inv. Alc. Sol	0,007	1	4,36 ns
	Punto de Corte	0,261	1	174,41 **
	Pendiente	0,0003	1	0,21 ns
	Modelo	0,267	3	

** Significativo para $P \leq 0,01$. ns: no significativo.

También se encontró una correlación inversa entre el contenido en azúcares reductores y la actividad de la invertasa alcalina soluble. Tanto en el tratamiento testigo como en el de 2,4-D la correlación es significativa ($P \leq 0,01$; Tabla 14) y el modelo que mejor ajusta es una regresión logarítmica,

llegando a explicar entre el 70 % y el 80 % de la variación observada. Así mismo, el ajuste establecido indica una relación moderadamente fuerte entre las variables en estudio en ambos tratamientos, con un coeficiente de correlación de -0,89 para el tratamiento testigo y de -0,85 para el tratamiento de 2,4-D (Figura 68).

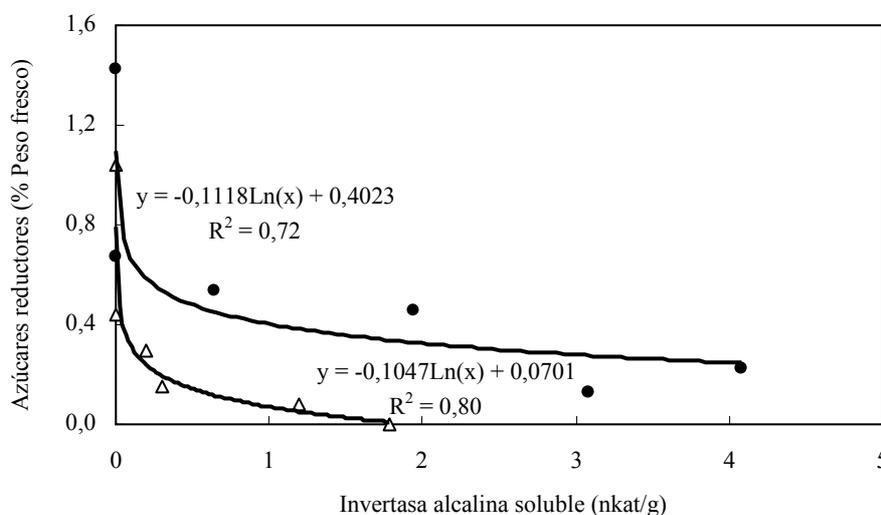


Figura 68. Relación entre actividad invertásica alcalina soluble y contenido en sacarosa, en vesículas de frutos de inflorescencias multiflorales, tratados con 2,4-D (●) y sin tratar (Δ).

Tabla 14. ANOVA para la regresión de la actividad invertásica ácida soluble en función del contenido en azúcares reductores.

Fuente	Testigo			2,4-D		
	SC	GL	F	SC	GL	F
Modelo	0,57	1	15,68*	0,77	1	10,22*
Residuo	0,15	4		0,30	4	
Total	0,72	5		1,07	5	

* Significativo para $P \leq 0,05$

4. EFECTO DEL AIA SOBRE EL COMPORTAMIENTO IN VITRO DE LOS TEJIDOS DEL FRUTO

En el año de 2002 se evaluó el efecto del ácido indolacético sobre la respuesta in vitro de los tejidos del fruto de inflorescencias uniflorales con hojas, de árboles con un nivel alto de floración. El estudio se inició el 3 de mayo y se prolongó hasta el 9 de julio.

Hasta el día 31 se utilizó como explanto una sección transversal de la región ecuatorial del fruto, y se comparó el comportamiento de frutos de 3 tamaños, caracterizados según su diámetro como grandes, medianos y pequeños. A partir del día 31 se inocularon por separado el exocarpo, mesocarpo y las vesículas. Se utilizaron frutos de un mismo tamaño, tomando como referente el diámetro medio de los presentes en el árbol.

4.1. Comportamiento de explantos de frutos de 6 días

Los explantos incubados sin AIA, tras 7 días de incubación, formaron callo en la superficie del corte que no estaba en contacto con el medio y en la superficie lateral recubierta por el exocarpo. El callo en la superficie apical se originó a partir del mesocarpo y del cilindro central; sus células fueron grandes y vacuoladas (Figura 69 B). El callo obtenido en la superficie lateral del explanto se originó por la proliferación de las células del mesocarpo externo situadas entre las glándulas de aceite, lo que desgarró el flavedo, abriendo paso hacia la superficie (Figura 69 A). La zona basal del explanto en contacto con el medio no formó callo. Con 35 días de incubación, los explantos mantuvieron el mismo patrón de desarrollo.

La presencia de AIA en el medio de incubación modificó el patrón de desarrollo. Con una concentración de AIA 10^{-6} M, se formó callo en la superficie apical (Figura 70 C), mientras que con una concentración más alta (10^{-5} M), se formó callo tanto en la superficie apical como en la basal del explanto (Figuras 71 A y 71 C). En todos los casos, el callo presentó células pequeñas.

En presencia de AIA (10^{-6} M y 10^{-5} M) no se observó la formación de callo a través del exocarpo; en su lugar, en el mesocarpo externo se formó una región con actividad cambial. Tras 35 días de incubación, esta región originó entre 8 a 10 células en fila (Figuras 70 B y 71 D).

Las vesículas mantuvieron un desarrollo organizado sin formación de callo, tanto en los inóculos cultivados en presencia de AIA como en los incubados sin esta hormona (Figuras 69, 70 y 71). Se observaron diferencias en su tamaño entre explantos incubados con AIA y en ausencia de la misma. No se presentó crecimiento en las vesículas en explantos del tratamiento testigo. Tras 7 días de incubación, presentaron igual tamaño que el día de la siembra ($0,15 \pm 0,004$ mm). En los tratamientos de AIA 10^{-6} y 10^{-5} M, se presentó un mayor tamaño de vesícula, alcanzando casi 3 ($0,43 \pm 0,01$ mm.) y 2 veces ($0,30 \pm 0,01$ mm.) el tamaño en explantos del tratamiento testigo sin AIA (Figura 72).

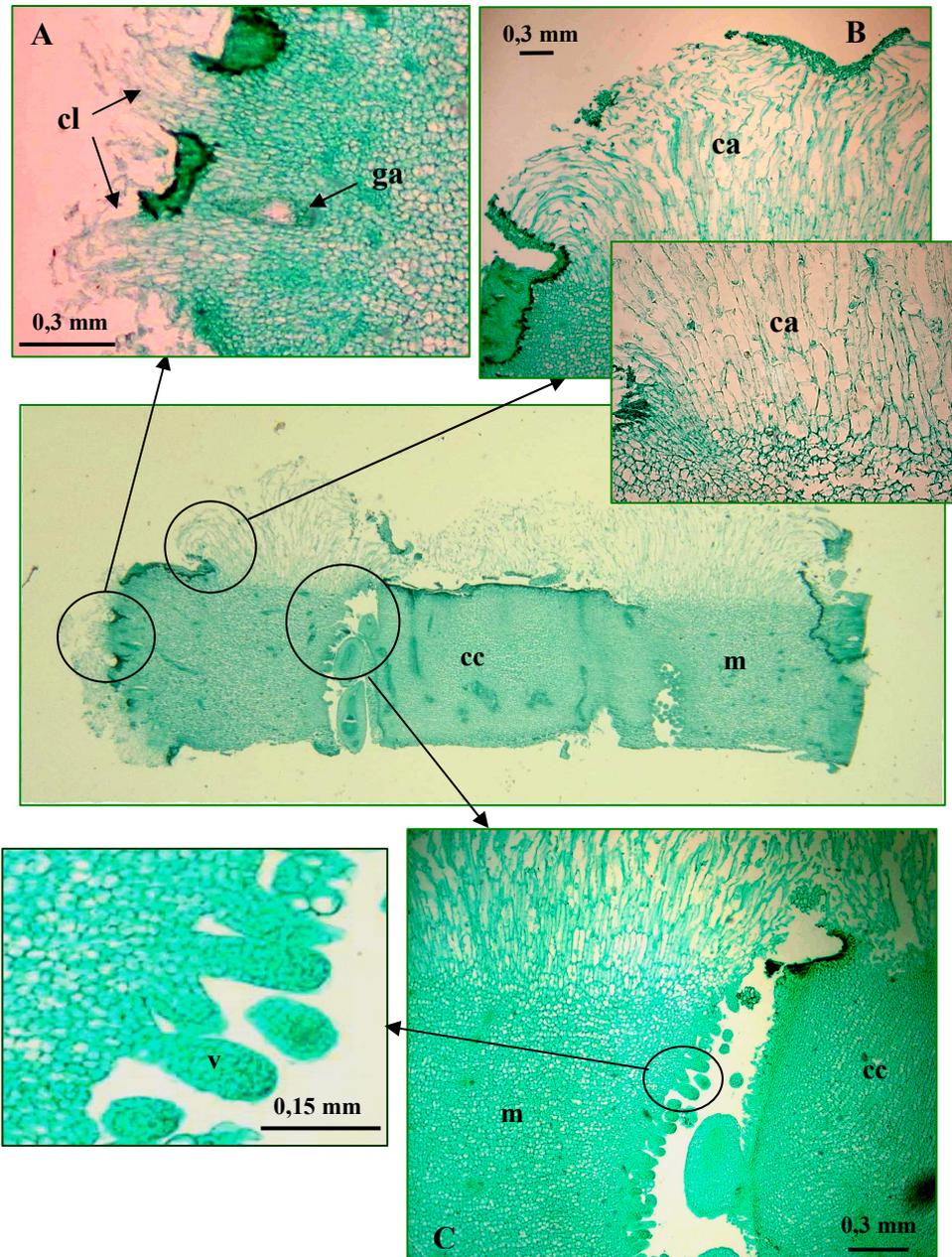


Figura 69. Explantos de frutos de 6 días, tras 7 días de incubación (sección longitudinal respecto al fruto). Tratamiento control (sin AIA). **ca**: callo en la superficie apical del explanto con células elongadas, **cl**: callo en la superficie lateral, **ga**: glándulas de aceite **v**: vesículas, **m**: mesocarpo y **cc**: cilindro central.

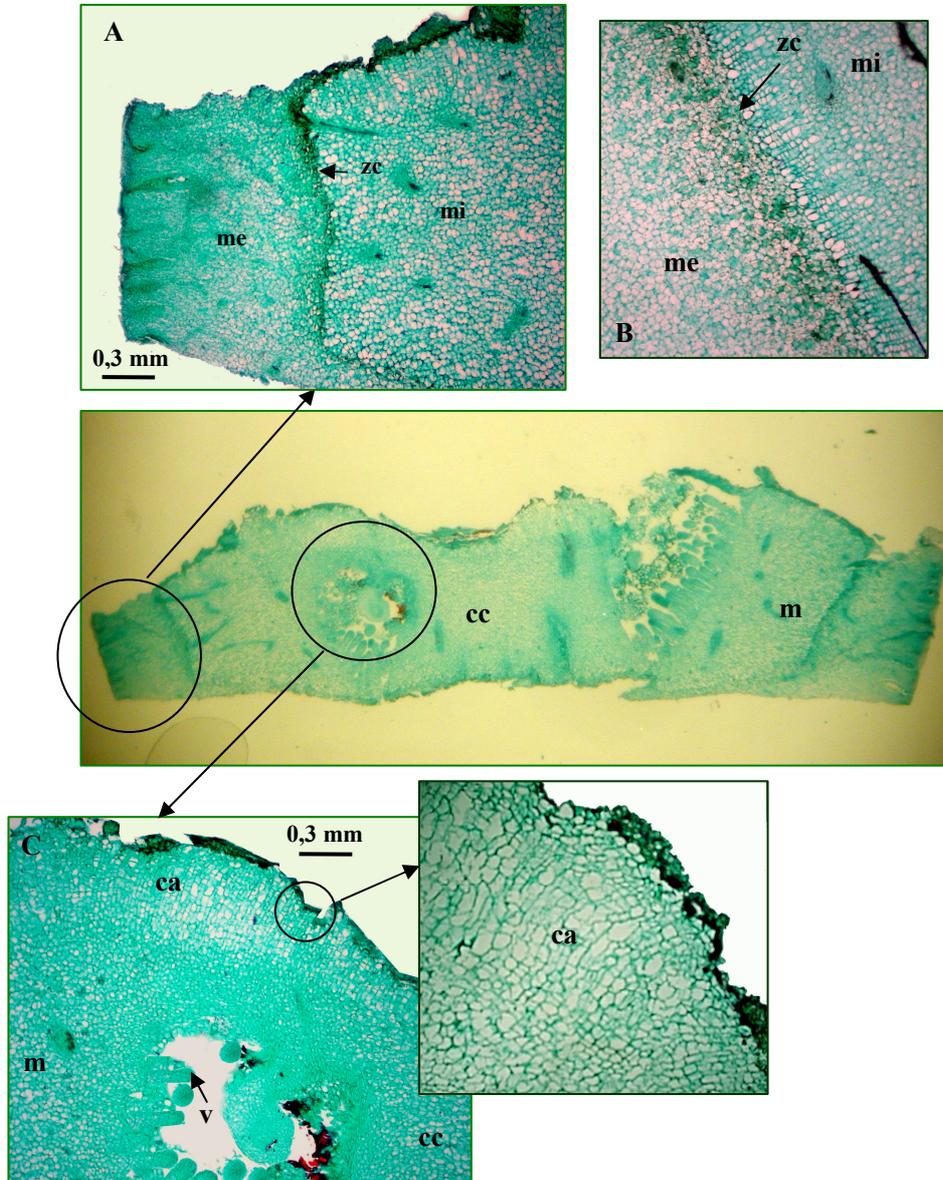


Figura 70. Explantos de frutos de 6 días, tras 7 días de incubación en presencia de AIA 10^{-6} M (sección longitudinal respecto al fruto). **A:** **me:** mesocarpo externo, **mi:** mesocarpo interno, **zc:** zona cambial. **B:** **zn:** zona cambial que origino 6 a 8 filas de células en división. **me:** mesocarpo externo, **mi:** mesocarpo interno. **C:** **ca:** callo apical con células pequeñas, **v:** vesículas, **cc:** cilindro central.

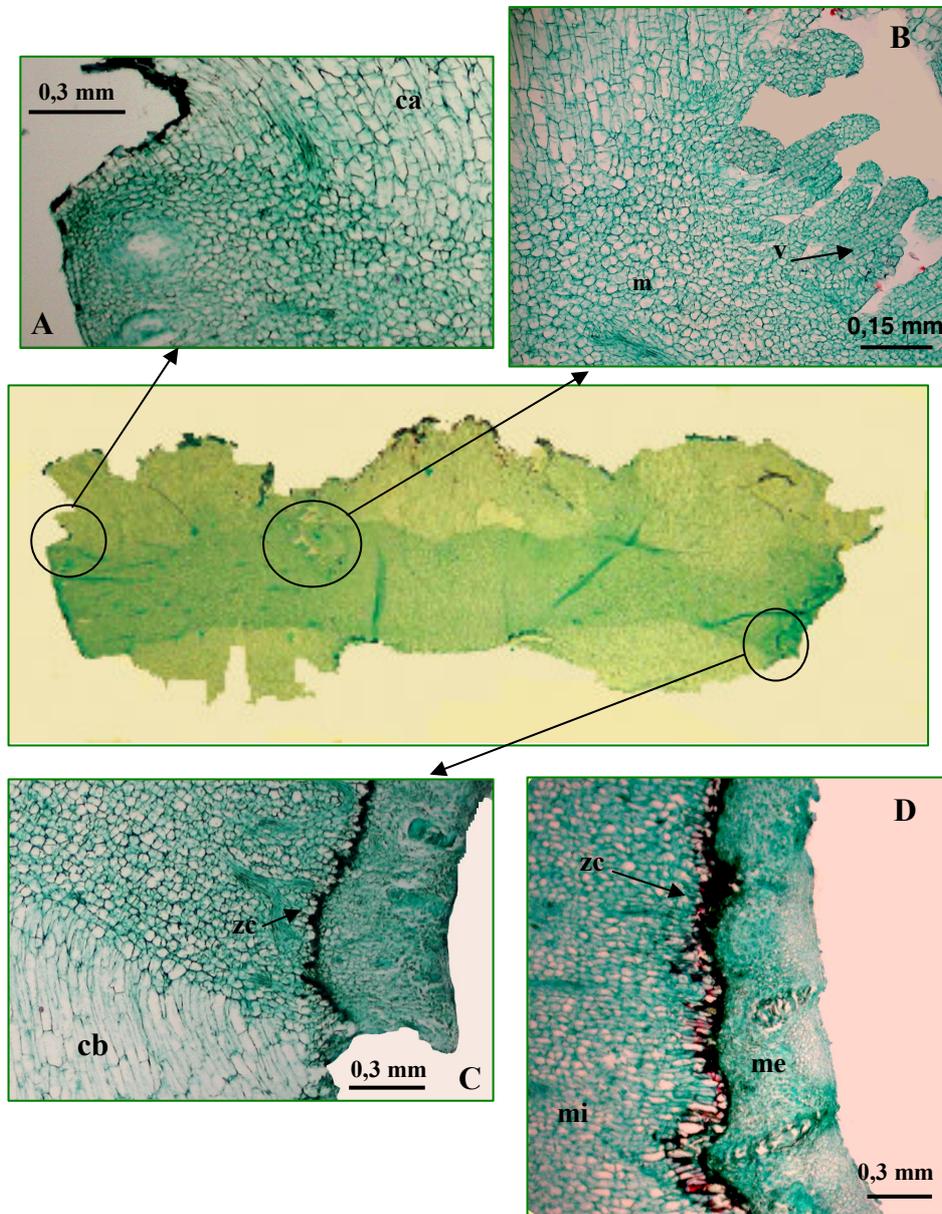


Figura 71. Explantos de frutos de 6 días, tras 7 días de incubación en presencia de AIA 10^{-5} M (sección longitudinal respecto al fruto). **A:** **ca:** callo apical con células pequeñas. **B:** **v:** vesículas, **m:** mesocarpo. **C:** **cb:** callo basal, **zn:** zona cambial, **me:** mesocarpo externo, **mi:** mesocarpo interno. **D:** **zn:** zona cambial que origina entre 8 a 10 filas de células en división. **me:** mesocarpo externo, **mi:** mesocarpo interno

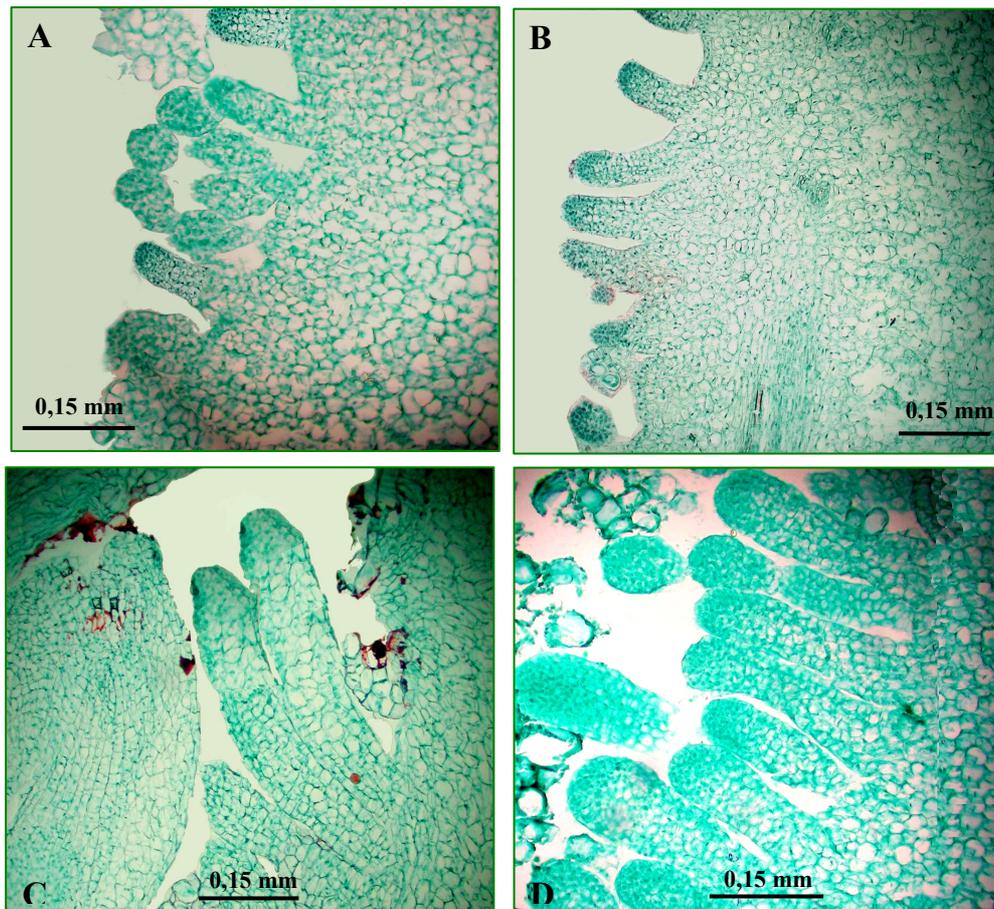


Figura 72. Tamaño de vesículas en explantos de frutos de diámetro medio, de 6 días de edad, tras 7 días de incubación: (A) Aspecto de los explantos en el momento de la siembra. (B) tratamiento testigo (sin AIA). (C) concentración de AIA 10^{-5} M. (D) concentración de AIA 10^{-6} M (D).

En esta fecha, el aumento en peso de los inóculos fue debido fundamentalmente al crecimiento del mesocarpo y al callo que se formó a partir de este tejido y del cilindro central. Los inóculos presentaron un peso inicial de 292 ± 20 mg en frutos grandes, 150 ± 13 mg en frutos medianos y 59 ± 4 mg en frutos pequeños. El aumento en peso de estos inóculos y la respuesta al AIA, fue afectada por el tamaño del fruto del que se tomaron, siendo mayor en los frutos grandes que en los medianos, y en estos que en los pequeños (Figura 73).

Los inóculos de los frutos grandes presentaron el máximo crecimiento con una concentración de AIA menor (10^{-6} M) que los inóculos de frutos pequeños, en que el crecimiento fue mayor a una concentración de AIA 10^{-5} M. A esta concentración se observó una reducción en el crecimiento de los inóculos de frutos grandes, respecto al obtenido con 10^{-6} M de AIA (Figura 73).

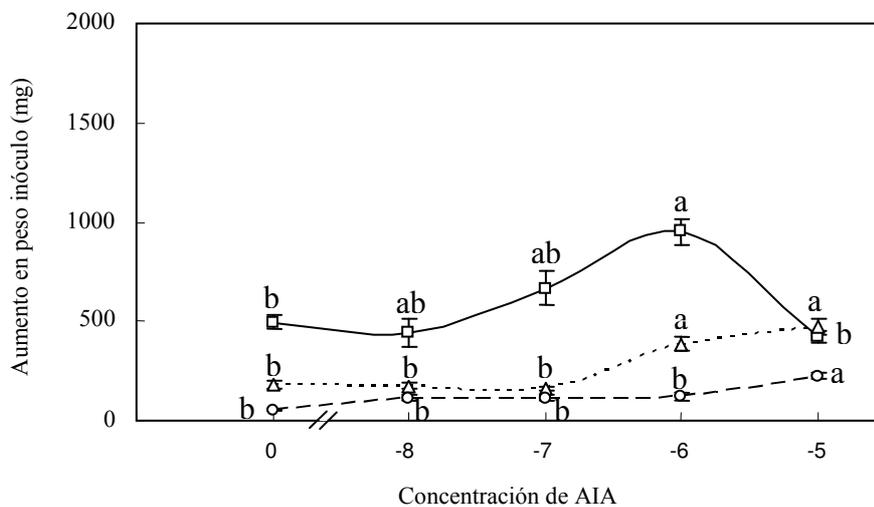


Figura 73. Curvas de respuesta del aumento en peso de explantos de frutos grandes (—■—), medianos (-.-Δ.-.) y pequeños (-○-), de 6 días de edad. Para cada explanto, valores en cada parámetro con letras distintas difieren significativamente ($P \leq 0,05$), según el test de Duncan, realizado para todas las concentraciones ensayadas.

4.2. Comportamiento de explantos de frutos de 31 días

Los explantos presentaron el mismo patrón de desarrollo descrito para los explantos de frutos de 6 días de edad. Tras 35 días de incubación, las vesículas habían duplicado su tamaño, desde un valor inicial de $0,6 \pm 0,01$ mm a $1,03 \pm 0,05$ mm en el tratamiento testigo, $1,09 \pm 0,03$ mm en el tratamiento de AIA 10^{-6} M y $1,07 \pm 0,03$ mm en el tratamiento de AIA 10^{-5} M.

En este momento del desarrollo (31 días), en que los inóculos presentaron un peso inicial de 823 ± 50 mg en frutos grandes, 509 ± 50 mg en frutos medianos y 300 ± 20 mg en frutos pequeños, su aumento en peso no fue afectado por las concentraciones de AIA ensayadas (Figura 74).

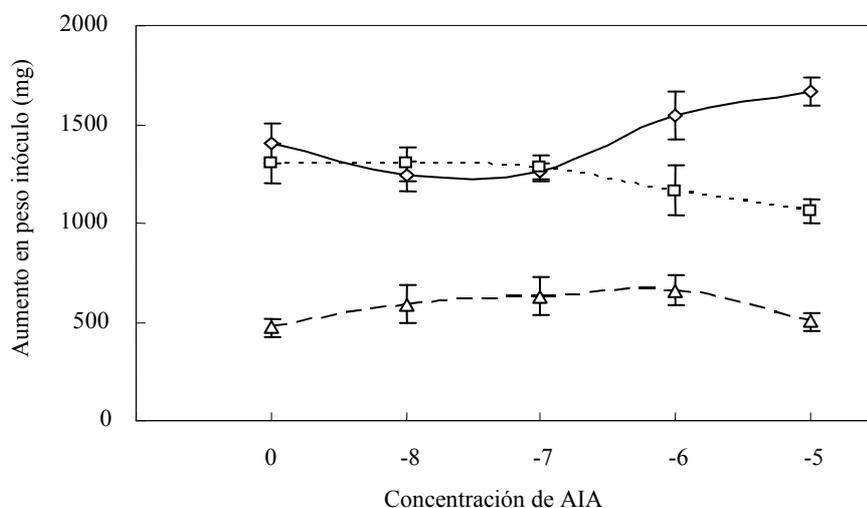


Figura 74. Curvas de respuesta del aumento en peso de explantos de frutos grandes (—◇—), medianos (---□---) y pequeños (—△—), de 31 días de edad. Para cada explanto, valores en cada parámetro con letras distintas difieren significativamente ($P \leq 0,05$), según el test de Duncan, realizado para todas las concentraciones ensayadas.

4.3. Comportamiento de explantos de frutos de más de 46 días

El comportamiento de los explantos y su respuesta al AIA fue similar a partir del día 46, por lo que se describe en conjunto con las fechas posteriores.

Tras 35 días de incubación los explantos de exocarpo y mesocarpo desarrollaron callo en la superficie apical. En el tratamiento testigos sin AIA, las células del callo se observaron grandes y vacuoladas (Figura 75 A), mientras que en el tratamiento de AIA 10^{-6} M, las células del callo eran pequeñas (Figura 76 A).

Los explantos de vesículas manifestaron un desarrollo organizado con células en expansión, sin formación de callo, tanto en el tratamiento testigo como en la concentración de AIA 10^{-6} M. Del mismo modo, en la superficie lateral y basal de los inóculos se observaron entre 2 a 3 filas de células modificadas con paredes engrosadas (Figuras 75 D y 76 D)

El día 46 los inóculos de mesocarpo presentaron una máxima respuesta con una concentración menor (10^{-6} M) que el día 61 en que solo hubo respuesta con la concentración más alta de AIA (10^{-5} M). El día 76 el aumento en peso de los inóculos de mesocarpo no fue afectado por los niveles de AIA ensayados. En este momento los inóculos de exocarpo aun manifestaron una respuesta positiva a las concentraciones más elevadas de AIA (10^{-6} M y 10^{-5} M; Figura 77).

Los inóculos de vesículas presentaron un peso inicial de 80 mg. el día 46. Tras 35 días de incubación, su aumento en peso solo fue afectado por la concentración de AIA 10^{-6} M. Con explantos de vesículas de frutos de 61 y 76 días, en que presentaron un peso inicial de 140 mg y 310 mg, respectivamente, su aumento en peso tras 35 días de incubación no fue afectado por las concentraciones de AIA ensayadas (Figura 78).

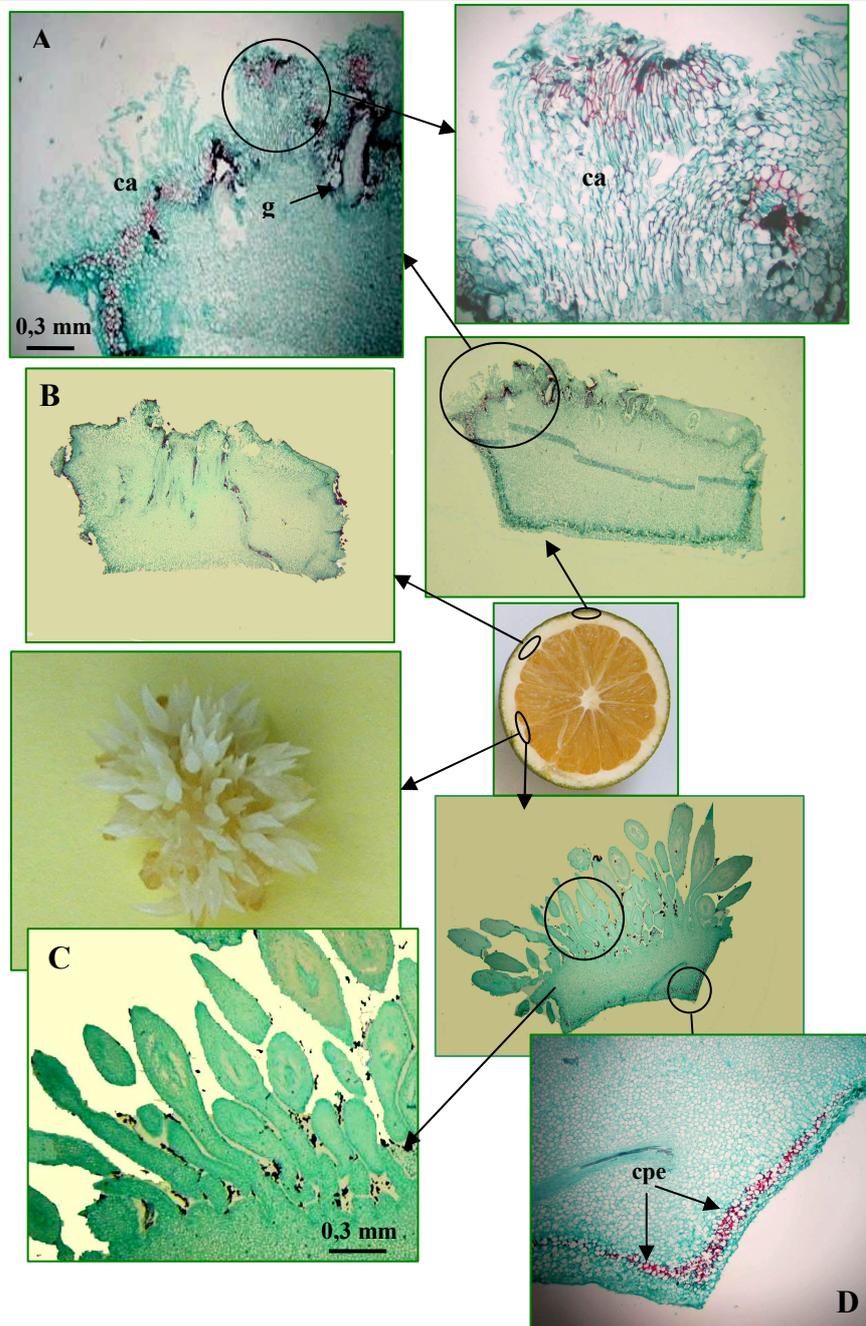


Figura 75. Explantos de frutos de mas de 46 días, tras 35 días de incubación. Tratamiento control (sin AIA). **A:** Sección longitudinal de explantos de exocarpo. **ca:** callo apical con células elongadas, **ga:** glándulas de aceite. **B:** Aspecto morfológico de explantos de mesocarpo **C:** Sección longitudinal de endocarpo con desarrollo organizado de vesículas. **D:** Zona basal y lateral de inóculos de endocarpo. **cpe:** células de paredes engrosadas.

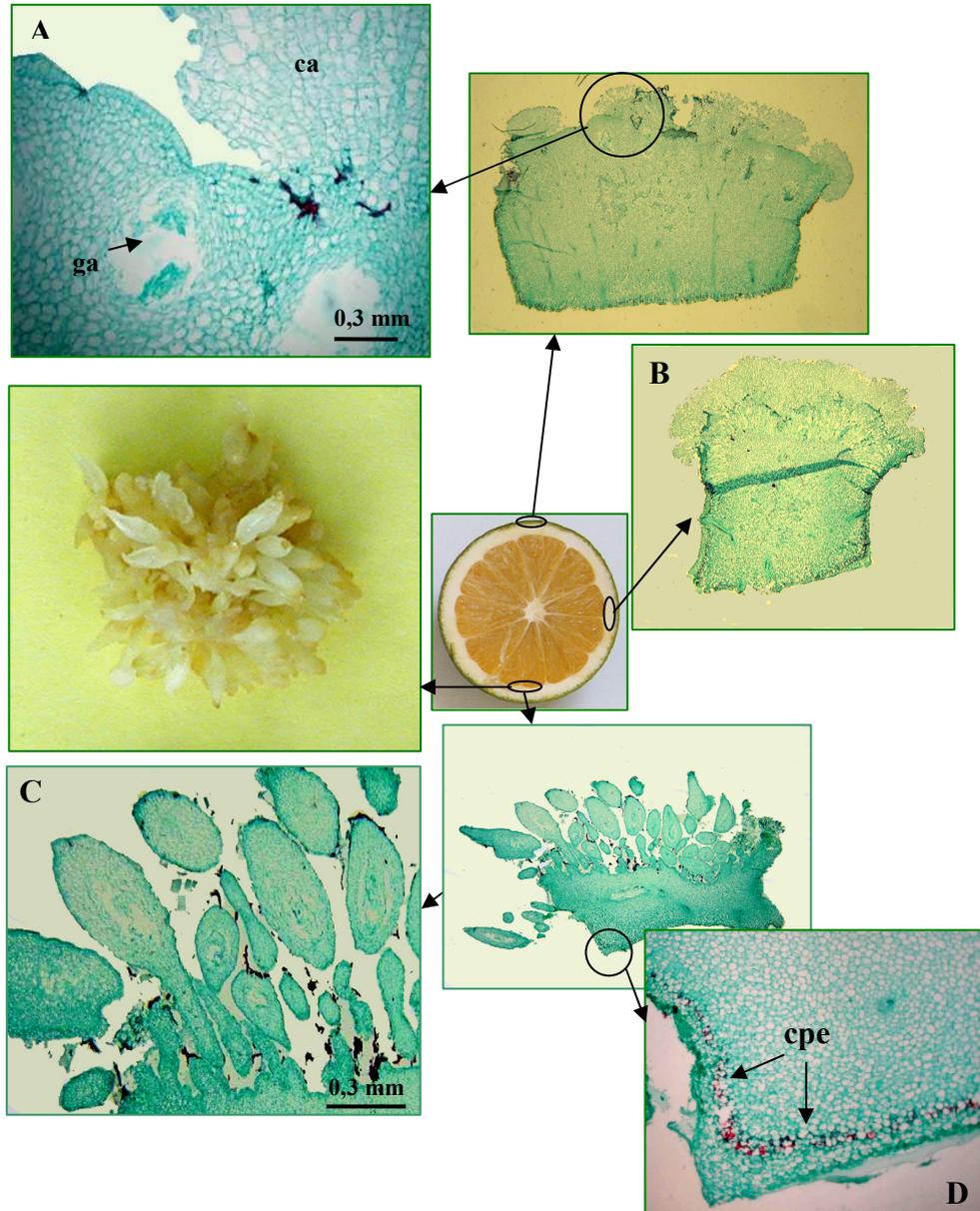


Figura 76. Explantos de frutos de más de 46 días, tras 35 días de incubación. Tratamiento de AIA 10^{-6} M. **A:** Sección longitudinal de explantos de exocarpo. **ca:** callo apical con células elongadas, **ga:** glándulas de aceite. **B:** Aspecto morfológico de explantos de mesocarpo. **C:** Sección longitudinal de endocarpo con desarrollo organizado de vesículas. **D:** Zona basal y lateral de inóculos de endocarpo. **cpe:** células de paredes engrosadas

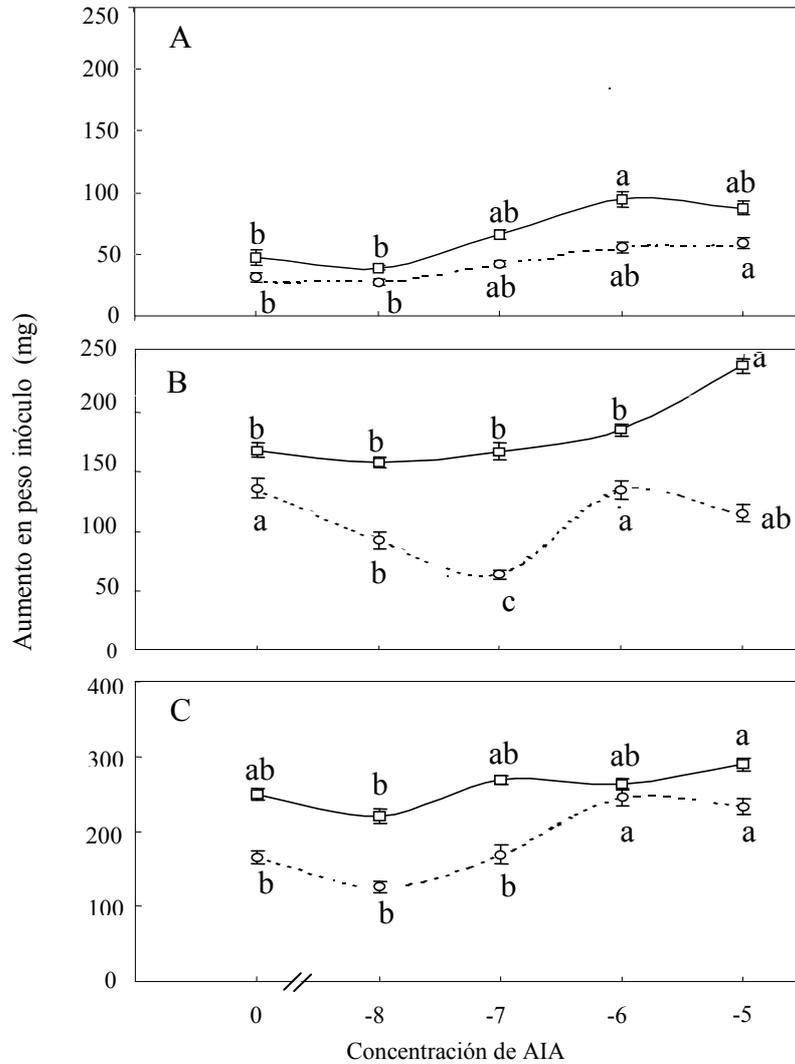


Figura 77. Aumento en peso de explantos de mesocarpo (—□—) y exocarpo (---○---) en frutos de 46 (A.), 61 (B) y 76 (C) días después de antesis. Para cada explanto, valores en cada parámetro con letras distintas difieren significativamente ($P \leq 0,05$), según el test de Duncan, realizado para todas las concentraciones ensayadas.

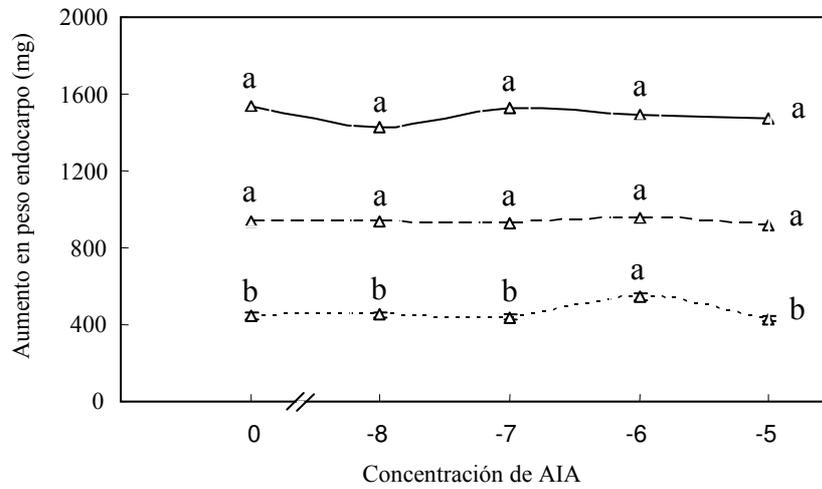


Figura 78. Aumento en peso de explantos de vesículas de frutos de 46 ($\cdots\Delta\cdots$), 61 ($--\Delta--$) y 76 ($-\Delta-$) días después de antesis. Para cada explanto, valores en cada parámetro con letras distintas difieren significativamente ($P \leq 0,05$), según el test de Duncan, realizado para todas las concentraciones ensayadas.

1. ABSCISIÓN Y CRECIMIENTO DEL FRUTO

1.1. Abscisión

Las especies y variedades del género *Citrus* forman un número muy elevado de flores, y buena parte de los frutitos se desprenden durante las post – anthesis, cuando ya han crecido significativamente (Goldschmidt y Monselise, 1977; Guardiola, 1988). El porcentaje de flores que finalmente cuaja está inversamente relacionado con el número inicial de flores. La correlación encontrada entre estos parámetros es similar a la descrita en la naranja Navelina y en mandarina Satsuma (Guardiola, 1992). En este estudio, el porcentaje de flores que cuaja representa el 3,4 % del número total.

Las flores caen en distintos estados de desarrollo. La pauta de abscisión encontrada en este estudio presenta dos máximos bien definidos, coincidiendo con la descripción realizada por varios autores en los cultivares de naranja Washington Navel (Guardiola., 1992), Navelina (Guardiola, 1997) y en las mandarinas clementina Fina (Guardiola., 1988; Van –Rensburg., et al, 1996), Fortune (Duarte y Guardiola, 1996) y clementina Marisol (García – Luis et al., 2002).

El primer máximo de abscisión (día 22) se debe a flores/frutos que se desprenden por la base del pedicelo y se refiere principalmente a aquellos frutitos que presentan una tasa de crecimiento baja (Zucconi., et al, 1978). El segundo máximo inicia con el periodo de abscisión de frutos por la base del cáliz, pero entre los días 42 y 52, considerado por Goren (1993) como

un periodo de transición, aún se presenta una caída importante de frutos por la zona de abscisión del pedicelo.

Inicialmente se presenta una reducción en el número de frutos por inflorescencia, seguido por una reducción en el número de inflorescencias que conservan al menos un fruto. Este comportamiento descrito en la variedad Salustiana, concuerda con la descripción realizada por Primo – Millo, et al (1977) en el naranjo Navelate, por Ruiz., et al (2001) en Washington Navel y confirma los resultados obtenidos por Almeida (2003) en el cultivar Salustiana.

El cuajado de fruto por inflorescencia es mayor en inflorescencias multiflorales que en uniflorales. Las diferencias se establecen desde el estado inicial de desarrollo (entre 3 y 4 semanas); la reducción en el número de inflorescencias uniflorales con fruto se inicia inmediatamente tras la antesis, mientras que en multiflorales se presenta entre 3 y 4 semanas desde el comienzo de la misma (Figura 6). Este comportamiento ha sido descrito en otras variedades de naranja (Jahn, 1973; Primo – Millo et al., 1977; Erner y Shomer, 1996), pero no se conoce el factor que determina el mayor cuajado en inflorescencias multiflorales.

1.2. Crecimiento del fruto, azúcares y actividad invertásica

A partir del día 33 hay un marcado incremento en la tasa de crecimiento del fruto. El segundo máximo en la tasa de abscisión coincide con un máximo en la tasa de crecimiento (día 53). Esta tasa de crecimiento es afectada por el tipo de inflorescencia; hasta el día 93 la acumulación de materia seca del fruto es mayor en inflorescencias uniflorales que en

multiflorales, y en adelante mayor en las últimas. En los dos tipos de inflorescencia, la mayor parte de acumulación de materia seca se presenta en la corteza durante el desarrollo inicial del fruto, comportamiento similar al obtenido por Ruiz et al. (2001), en la variedad Washington navel.

Los cambios en la sección transversal de los tejidos del fruto se relacionan con las distintas fases de crecimiento. El aumento lento en sección transversal que se presenta hasta el día 35, determinado por un mayor aporte del crecimiento de la corteza y en donde todos los tejidos se mostraron en proceso de división celular, concuerda con lo señalado por Schneider (1968), Roth y Lindorf (1972) y Tadeo y Primo-Millo (1988) en *C. sinensis*, Guardiola y Lazaro en *C. unshiu* (1987) y Burns et al. (1992 y 1994) en *C. paradisi*, en el estado I de desarrollo del fruto.

La contribución de la corteza a la sección transversal del fruto aumentó marcadamente entre los días 35 y 68 (Figura 11). Durante este periodo, en el mesocarpo se distinguen dos estratos celulares, el mesocarpo interno y el externo, caracterizado este último por Roth y Lindorf (1972) y Tadeo y Primo-Millo (1988), como un estrato celular con actividad meristemática, que origina células hacia el mesocarpo interno. El mayor aporte al aumento en sección transversal de la corteza esta representado por el mesocarpo interno, formado por células grandes, vacuoladas, poligonales y con amplios espacios intercelulares (Figura 14).

Los lóculos presentan un crecimiento lento hasta el día 45 y posteriormente incrementan su contribución a la sección transversal del fruto (día 65 a 98). El inicio de este periodo coincide con la cesación de la actividad meristemática de las vesículas, en que se da paso a la vacuolización de sus células. El inicio del estado II de desarrollo del fruto

ha sido caracterizado por Roth y Lindorf (1972) en *C. sinensis*, Guardiola y Lázaro (1987) en *C. unshiu* y El-Otmani et al. (1993) en *C. reticulata*, atribuyendo el incremento en tamaño de las vesículas a la expansión más que a la división celular.

Tanto la abscisión como la tasa de crecimiento de los frutos cítricos están relacionadas con la disponibilidad de carbohidratos (Ruiz et al., 2001). La competencia por carbohidratos entre frutos en desarrollo de inflorescencias con hojas, se establece varias semanas después de la floración, cuando la demanda por el fruto excede la capacidad fotosintética de las hojas de la inflorescencia (Moss et al., 1972). Así la población de frutos en desarrollo es ajustada continuamente por la abscisión de frutos (Guardiola, 1988), con un máximo después del incremento en la tasa de crecimiento del fruto (Ruiz y Guardiola, 1994).

Durante el desarrollo inicial del fruto, en que se presenta una actividad metabólica alta (día 43), los azúcares permanecen con valores bajos en la corteza, como consecuencia de su mayor consumo (Ricardo y Ap Rees, 1970; Lowell et al., 1989). Tras la antesis se presenta una reducción en la concentración de azúcares, que coincide con la reactivación de la actividad de crecimiento del ovario (Guardiola y García-Luis, 2000).

Inicialmente la mayor proporción de azúcares se concentra en la corteza y a partir del día 76 en que se ha iniciado la expansión de los lóculos, se presenta en mayor proporción en las vesículas. Esta redistribución de los azúcares observada a medida que el fruto de Salustiana crece concuerda con el comportamiento señalado en mandarino Satsuma (Mehouachi et al., 1995), en naranjo dulce Washington navel (Ruiz et al.,

2001) y confirma los resultados obtenidos por Lasbkowski et al. (2005) en la variedad Salustiana.

En frutos de Citrus, la descarga de sacarosa transportada en el floema se efectúa en el mesocarpo, y el transporte a las vesículas se realiza a través del filamento que las une al endocarpo, sin intervención de tejido vascular (Koch y Avigne, 1990; García-Luis et al., 1991; Burns et al., 1992).

El contenido en sacarosa de la corteza presenta niveles bajos durante todo el periodo de estudio. Durante el crecimiento inicial, este tejido manifiesta una actividad metabólica alta, con un resultante mayor consumo de carbono, que se evidencia por la actividad de las invertasas ácidas, siendo mayor en antesis y reduciéndose con el avance del estado de desarrollo del fruto (Kato y Kubota, 1978; Lowell et al., 1989; Kubo et al., 2001). Inicialmente la isoforma ácida soluble presenta una actividad mucho más elevada que la ligada y su reducción en el tiempo en términos relativos es más lenta.

Durante los primeros 43 días de desarrollo del fruto, en que está constituido en su mayor parte por corteza, el aumento en peso fresco es lento y el contenido en azúcares reductores bajo. Posteriormente, el contenido en azúcares reductores aumenta en el tiempo. El aumento en azúcares reductores de las vesículas aumenta linealmente en el tiempo, representando al final del periodo de estudio el 60 % del total de azúcares.

También en antesis se presenta la máxima actividad de la invertasa alcalina soluble en la corteza, mientras que la isoforma alcalina ligada mantiene una actividad baja desde antesis hasta el día 63, en que fue

indetectable. A partir del día 55 que ya ha iniciado la expansión celular y que la corteza presenta muy poca actividad meristemática, este tejido actúa como zona de descarga, desde donde la sacarosa es conducida a las vesículas. Desde este momento el contenido en sacarosa es mayor en vesículas que en corteza representando al final del periodo de estudio (día 150) el 40 % del total de azúcares. Esta concentración es inferior a la señalada en el mandarino Owari satsuma por García-Luis et al. (1991), Mehouchi et al. (1995) y Harada et al. (2001) quienes indican la presencia en las vesículas de un mayor porcentaje de sacarosa (68-70 %) frente a los azúcares reductores (glucosa 12-16 % y fructosa 17-18%).

Con el inicio de la expansión celular de las vesículas y en efecto, la acumulación de azúcares, se presenta la máxima actividad de las invertasas alcalinas, reduciéndose rápidamente con el avance del estado de desarrollo del fruto. Es de destacar que en la acumulación de azúcares, además de estar involucradas las invertasas, varios autores plantean una tarea conjunta con la sintetasa de sacarosa (Lowell et al., 1989; Quick y Schaffer, 1999).

2. AUXINAS, ABSCISIÓN Y CRECIMIENTO

La aplicación de 2,4-D indujo una respuesta diferencial en los dos años de experimento. En el año de 2003 en que el 2,4-D se asperjó en una concentración de 15 ppm, en cantidades de 7,7 litros por árbol, hay un incremento en la cosecha debido a un mayor cuajado de frutos sin alterar su peso medio. El efecto sobre el cuajado obtenido en el año de 2003, ha sido señalado en cítricos. Coggins et al. (1968), Gremberg et al. (1992) y Erner et al. (1993), indican que la aplicación de auxinas puede resultar

eventualmente en un aumento del cuajado. En el año de 2004 en que la concentración fue de 20 ppm en cantidades de 3,6 litros por árbol, el 2,4-D aceleró el crecimiento del fruto y provocó un aumento en su peso medio, reduciendo el número de frutos sin alterar la cosecha. Los resultados obtenidos en el año de 2004 coinciden con los obtenidos por Guardiola (1996) en mandarina Nova y Duarte et al. (1996), en clementina Esbal.

2.1. Auxinas y abscisión

Tras la floración, la caída de flores y ovarios se presenta por la zona de abscisión del pedicelo (ZA). Posteriormente esta zona se vuelve inactiva, mientras que la zona de abscisión del cáliz (ZC) es activada durante la caída de junio (Schneider, 1968; Spiegel-Roy y Goldschmidt, 1996; Guardiola y García-Luis, 2000; Iglesias et al., 2005). En ambos casos la abscisión es mediada por la síntesis de etileno (Goren, 1993; Ortolá et al., 1997; Burns et al., 1998; Iglesias et al., 2005). El balance hormonal endógeno del fruto, especialmente auxinas y etileno, controla el proceso de abscisión. Un aporte adicional de auxinas al fruto puede modificar este proceso, dependiendo del tipo y concentración de la auxina utilizada, del momento de la aplicación y del cultivar (Guardiola y García Luis, 2000).

En el experimento realizado el año de 2004, la aplicación de 2,4-D provocó inicialmente un retraso en la abscisión hasta el día 42, incrementandola a partir de este momento. Este retraso en la abscisión reduce la caída de flores-frutos por la zona de abscisión del pedicelo e incrementa la abscisión por la zona del caliz. El comportamiento observado este año coincide con el descrito en las variedades de mandarina Clementina

Esbal (Duarte et al., 1996) y Owari satsuma (Ortola et al., 1997). Tras la aplicación de auxinas, el retraso en la abscisión se presenta a causa de una inhibición en el aumento de las enzimas encargadas de degradar las paredes en las zonas de abscisión. (Goren, 1993, 2000). Ortola et al. (1997) encontraron que las auxinas fenoxiacéticas son las más efectivas en retrasar la abscisión.

Aunque la aplicación de 2,4-D redujo el porcentaje de cuajado en 0,6 %, el incremento en el peso medio del fruto compensó esta reducción, y no afectó la cosecha. Este comportamiento coincide con los resultados obtenidos por Duarte et al. (1996) en mandarina clementina Esbal, y por Guardiola (1996) en mandarina Nova. En los cultivares de naranja Valencia y Shamouti (Erner et al., 1993), la aplicación en floración de 2,4-D no resultó efectiva para incrementar el tamaño del fruto. Se encontró una mayor respuesta tanto en el cuajado como en el tamaño de fruto, cuando la aplicación se realizó 6-8 semanas después de floración

El año 2003, la aplicación de 2,4-D aumentó el porcentaje de cuajado. Este comportamiento coincide con los resultados obtenidos por Coggins et al. (1968) en naranja Navel, Gremberg et al. (1992) en pomelo rojo “Star Ruby” y Erner et al. (1993) en naranjas “Shamouti” y “Valencia”. Estos autores además obtuvieron un aumento en el tamaño del fruto, aunque en los trabajos de Gremberg et al (1992), el efecto sobre el tamaño de fruto fue inconsistente en tres experimentos llevados a cabo en distintos años. En este ensayo no se observó un aumento en el tamaño de fruto. Los resultados obtenidos sugieren que una pequeña variación en la concentración de la auxina aplicada y quizás más importante, la variación en la cantidad de

solución aplicada por árbol, pueden modificar los valores de cosecha por una alteración en el nivel de cuajado.

2.2. Auxinas y crecimiento del fruto

El aumento en la capacidad sumidero de fruto por la aplicación de auxinas resulta en un crecimiento acelerado de los frutos tratados hasta la maduración (Guardiola y Lázaro, 1987; Ortola et al., 1988; Agusti et al., 1994). La respuesta máxima de este efecto se presenta en muchos cultivares cuando la auxina es aplicada en o poco después de floración (Coggins et al., 1968; Duarte et al., 1996). La mayoría de trabajos realizados han caracterizado la respuesta a la aplicación de auxinas antes de la caída de junio en varios cultivares de mandarina (Guardiola y Lázaro, 1987; Ortola et al., 1988; Ortola et al., 1991; Agusti et al., 1991; Georgiu, 1998). En los cultivares de naranja Valencia y Shamouti, Erner et al. (1993), no encontraron efectiva la aplicación de auxinas en floración (Erner et al., 1993).

El año 2004, la aplicación de 2,4-D incrementó el tamaño del fruto. Su efecto se evidenció inmediatamente tras la antesis y el resultado final al momento de la cosecha, es una diferencia de aproximadamente 4,5 mm en el tamaño de fruto frente a los testigos sin tratar. En el experimento del año 2003, las diferencias encontradas durante el desarrollo inicial del fruto, desaparecieron con el avance del estado de desarrollo, obteniéndose al momento de la cosecha frutos de un mismo diámetro.

El comportamiento observado en el año de 2004 coincide con los resultados obtenidos por Duarte et al. (1996) en mandarina clementina

Esbal. con una máxima respuesta con concentraciones de 2,4-D entre 17 y 20 ppm, igual a la utilizada en este estudio. De igual manera, los resultados concuerdan con los trabajos realizados por Guardiola (1996) en mandarina Nova. Estos autores obtuvieron una menor (alrededor del 10%) aunque significativa, reducción en la cosecha.

En este mismo año (2004), la aplicación de 2,4-D incrementó la velocidad de crecimiento del fruto. La diferencia en diámetro entre frutos testigos y tratados con 2,4-D de inflorescencias uniflorales y multiflorales se establece desde el desarrollo inicial del fruto y aumenta linealmente en el tiempo. Durante el desarrollo inicial del fruto (día 43), el aumento en peso fresco y la acumulación de materia seca son bajas. A partir de este momento la tasa de crecimiento del fruto aumenta, pero la evolución de estas dos variables difiere. La diferencias en peso fresco aumentan aproximadamente de forma lineal en el tiempo, mientras que las diferencias en la acumulación de materia seca, después de experimentar un aumento lento hasta el día 63, se mantienen casi constante hasta el día 150 y posteriormente se incrementan hasta estabilizarse el día 240.

En todas las variables evaluadas la tasa de aumento diaria alcanza un máximo el día 53, en que se ha iniciado el crecimiento en expansión de las vesículas. En este momento la tasa de aumento diaria es mayor en frutos tratados con 2,4-D. En adelante el peso fresco y seco presenta otros máximos, pero en todos los casos, la tasa de aumento diaria es mayor en frutos tratados con 2,4-D.

2.3. Auxinas, azúcares y actividad invertásica del fruto

Las hormonas vegetales juegan un papel integral en el control del crecimiento, diferenciación y desarrollo de las plantas. Se ha sugerido que los reguladores de crecimiento de las plantas están involucrados particularmente, en la regulación de la capacidad sumidero (Guardiola y García Luís, 2002), la partición de carbohidratos (Brenner y Cheikh, 1995) y la descarga del floema (Tanner, 1980). Además existen evidencias que indican que la invertasa extracelular es regulada por varias fitohormonas y que a su vez está relacionada con el incremento en la demanda por carbohidratos (Roitsch et al., 2003).

En este estudio, la aplicación de 2,4-D incrementó los niveles de azúcares del fruto e influyo sobre la actividad de las isoformas de invertasa. Durante el desarrollo inicial del fruto, en que la concentración de sacarosa y azúcares reductores en la corteza se incrementaron tras la aplicación de 2,4-D, del mismo modo se presentó un aumento en la actividad de las invertasas ácidas. Durante este periodo, en que se establecen las diferencias en la capacidad sumidero del fruto, el aumento en la actividad de la isoforma ácida de las invertasas sugiere un efecto directo del 2,4-D sobre el aumento en la capacidad sumidero del fruto, actuando en este momento como sumidero de utilización. Al parecer las auxina juegan un papel clave en el mecanismo regulador de la actividad invertasa extracelular (Glasziou, 1969; Weil y Rauch, 1990). Roitsch et al (2003) plantean que la actividad de la invertasa extracelular es estimulada por auxinas.

La función de las invertasas ha sido deducida de una correlación entre su actividad, y procesos fisiológicos tales como crecimiento de tejidos o utilización y acumulación de azúcares en órganos sumidero (Lowell et al.,

1989). En tejidos que crecen rápidamente se encontró una alta actividad invertasica ácida (Ricardo y Ap Rees, 1970; Lowell et al., 1989), en que el contenido en sacarosa fue bajo o disminuyó rápidamente. Así, la función de la invertasa ácida en estos tejidos es hidrolizar sacarosa bajo condiciones en que haya una alta demanda por hexosas.

En este estudio, durante el desarrollo inicial del fruto tanto el contenido en sacarosa como en azúcares reductores es bajo en la corteza, pero mayor en frutos tratados con 2,4-D. La alta actividad de las isoformas ácidas observada en la corteza hasta el día 43, sugieren una participación importante de estas invertasas en la hidrólisis de sacarosa durante el desarrollo inicial del fruto. De las invertasas ácidas, la isoforma ácida soluble presenta una actividad mucho más elevada que la isoforma ácida ligada. La relación inversa encontrada entre el contenido en sacarosa y la actividad de la invertasa ácida soluble, explica entre el 83 % y 89 % de la variación observada (Figura 61). Los resultados obtenidos sugirieren que una condición que determina el incremento en los niveles de concentración de sacarosa, esta acompañada por una reducción en la actividad invertásica ácida soluble. Esta condición se hace evidente con el avance del estado de desarrollo del fruto. Al respecto Yele et al. (1988), Hubbard et al. (1989) y Ross y Davis, (1992), indican que la invertasa ácida parece regular la concentración de sacarosa en el fruto, a través del control del pH del apoplasto.

A partir del día 43, en que la corteza redujo su participación al aumento en sección transversal de los tejidos del fruto, la concentración de sacarosa exhibió en este tejido un aumento lento, mayor en frutos tratados con 2,4-D. Al mismo tiempo, a partir del día 43 las invertasa ácidas

manifestaron una reducción en su actividad, estabilizándose el día 110, en que la concentración de sacarosa se mantuvo constante.

La aplicación de 2,4-D aumentó el contenido en azúcares reductores de la corteza. Con el inicio del crecimiento en expansión (día 43), en que las células de la corteza han reducido su actividad de división, el aumento en el tiempo del contenido en azúcares reductores en este tejido se encuentra en estrecha relación con la evolución de los mismos en las vesículas. En este momento la actividad invertásica ácida ha reducido casi en un 50 % su actividad, y a partir de este momento se reduce lentamente, hasta mantener una actividad baja el día 110. La regresión logarítmica encontrada entre el contenido en azúcares reductores de la corteza y la actividad de la isoforma ácida soluble, explican entre el 75 % y 95 % de la variación observada (Figura 62).

Este comportamiento coincide con lo observado por Lowell et al. (1989) en pomelo Marsh y por Kato y Kubota (1978) y Kubo et al. (2001) en mandarina Satsuma. Estos autores plantean que la hidrólisis de sacarosa que se presenta en el fruto a lo largo del camino post-floemático por la acción de las invertasa ácidas, solo se presenta durante su desarrollo inicial, mientras que la enzima es inactivada con el avance del estado de desarrollo del fruto hasta maduración. Por otra parte, Echeverría et al. (1997), indican que el resultado de la actividad invertásica ácida soluble, con la producción de hexosas, es la formación de un gradiente de concentración de sacarosa que conduce al mantenimiento de un transporte constante de azúcares hacia el fruto.

La aplicación de 2,4-D incrementó la concentración de azúcares en vesículas. En los frutos tratados, la sacarosa representó el 45 % del total de

azúcares. En árboles de Citrus, los fotoasimilados se transportan en forma de sacarosa (Koch y Avigne, 1990), aunque la glucosa y fructosa también se encuentran en varias concentraciones en vesículas de frutos maduros. En algunas variedades de naranjo dulce, la sacarosa representa aproximadamente el 50 % del total de azúcares mientras que en algunas variedades de limas ácidas y dulces, el contenido en sacarosa no excede el 20% (Echeverría e Ismail, 1987).

A partir del día 43 en que se ha dado inicio a la vacuolización de las células de las vesículas, se presenta un aumento progresivo en el contenido en sacarosa y azúcares reductores. Con la aplicación de 2,4-D se observó un incremento en la actividad de la invertasa alcalina soluble, que se redujo rápidamente hasta hacerse indetectable el día 110. Este comportamiento observado sugiere una mayor participación de la isoforma alcalina soluble en los procesos de acumulación de azúcares al inicio del periodo de expansión celular de las vesículas. La regresión lineal establecida entre el contenido en sacarosa y la actividad de la isoforma alcalina soluble, explica entre el 84 % y el 87 % de la variación observada (Figura 67).

Este comportamiento encontrado en la variedad Salustiana, coincide con los resultados obtenidos por otros autores. Al respecto Lowell et al. (1989) indican una alta actividad de las invertasas alcalinas en los sacos de zumo, durante el segundo estado de desarrollo del fruto. Además plantean una actividad de degradación conjunta con la sacarosa sintetasa.

La aplicación de 2,4-D modificó la proporción en la que se encuentran glucosa y fructosa en las vesículas. Hasta el día 110 los niveles de concentración de los dos monosacáridos son iguales, coincidiendo con el momento en que la actividad de la invertasa alcalina soluble fue

indetectable. Este comportamiento sugiere la participación de la isoforma alcalina en los procesos de acumulación de hexosas en las vesículas, y coincide con los resultados obtenidos por Echeverría et al. (1997) en frutos de lima dulce.

4.1. COMPORTAMIENTO IN VITRO DE LOS TEJIDOS DEL FRUTO

La respuesta in vitro de los tejidos del fruto al AIA, esta relacionada con el estado de desarrollo del fruto y con la concentración presente en el medio de cultivo. Al considerar el aumento en peso del inóculo, la respuesta al AIA en frutos de 16 días dependió del tamaño de fruto del cual se obtuvo el inóculo; los inóculos de frutos grandes (diámetro $13,43 \pm 0,11$) no fueron afectados por las concentraciones de AIA ensayadas, mientras que en frutos medianos (diámetro $11,01 \pm 0,13$) y pequeños (diámetro $7,85 \pm 0,08$) se obtuvo una mayor respuesta con las concentraciones de AIA más elevadas (10^{-6} y 10^{-5} M). Con frutos de 31 días no se obtuvo respuesta a las concentraciones de AIA evaluadas. Este comportamiento observado en la variedad Salustiana, coincide con los resultados obtenidos por Guardiola et al (1993) y Harada et al (2001). Estos autores utilizaron como inóculo pequeñas piezas de endocarpo de mandarina satsuma de 5 a 50 días, y obtuvieron un crecimiento vigoroso de callo en explantos de frutos de 5 días que fue disminuyendo con el aumento en la edad del fruto (hasta 50 días).

Las características encontradas en el tipo de células que conforman el callo en los inóculos tratados con AIA y sin tratar se convierten en una característica clave del patrón de desarrollo in vitro de los tejidos del fruto. Mientras que en inóculos del tratamiento control las células del callo se

caracterizaron como grandes, elongadas y vacuoladas, con la adición de AIA al medio, el callo estuvo formado por células pequeñas. Este comportamiento coincide con la descripción hecha por Krikorian (1995), quien plantea que un indicador de la respuesta in vitro de explantos a la adición de auxinas al medio, es que a nivel de las zonas de corte del explanto las auxinas promueven una mayor división celular, mejorando la iniciación y mantenimiento del callo. Del mismo modo, Khan et al, (1996) trabajando con explantos de endocarpo de *Citrus limon* obtuvieron un incremento en el crecimiento de callo por un aumento en la tasa de división celular, después de incorporar AIA al medio en una concentración de 10^{-5} M.

Hasta el día 31 en que se utilizó como inóculo una sección transversal de la región ecuatorial del fruto, con la adición de concentraciones de AIA 10^{-6} y 10^{-5} M, se formó en el mesocarpo externo, una zona con actividad cambial. Tadeo et al, (1988) describen las características del mesocarpo externo con células poco vacuoladas, con paredes delgadas y abundante citoplasma, que evidencian a este estrato celular como un meristemo activo que origina células hacia el mesocarpo interno. Los resultados obtenidos en este estudio sugieren una posible contribución de las auxinas exógenas sobre la mayor actividad metabólica de este tejido y en efecto, un aporte al incremento del tamaño inicial del fruto.

También al utilizar como inóculo una sección transversal de la región ecuatorial del fruto, se presentó un desarrollo organizado de vesículas dentro de la cavidad locular. Tisserat et al., (1989) establecieron una relación inversa entre tamaño de inóculo y porcentaje de callo formado en frutos de

Citrus limon, determinando que al utilizar como explanto la mitad del fruto se obtiene un desarrollo organizado de vesículas, y que piezas pequeñas de endocarpo producen callo. Estos autores plantean que la capacidad potencial de las vesículas para producir callo, se ve fuertemente estimulada cuando se producen heridas en el tejido al momento de obtener el inóculo.

Al utilizar como inóculo pequeñas piezas de mesocarpo, se comprueba una disminución en su aumento en peso con el avance del estado de desarrollo del fruto. El día 46 los inóculos de mesocarpo presentaron una máxima respuesta con una concentración menor (10^{-6} M) que el día 61 en que solo hubo respuesta con la concentración más alta de AIA (10^{-5} M). El día 76 el aumento en peso de los inóculos de mesocarpo no fue afectado por los niveles de AIA ensayados. Al describir las características anatómicas de frutos de 46 días, se verifica la presencia de mesocarpo externo con células que aún se mantienen en división. Con el avance del estado de desarrollo del fruto, el mesocarpo llega a estar formado por células diferenciadas, vacuoladas, poligonales y con amplios espacios intercelulares. El aumento en peso de inóculos de 46 días posiblemente se presenta por un efecto promotor del AIA sobre el mesocarpo externo. Los resultados obtenidos coinciden con los estudios realizados por Amo – Marco et al (1994) con inóculos de mesocarpo de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, obteniendo un máximo crecimiento de callo en frutos de 33,5 a 43,4 mm de diámetro, que se encontraban entre los estados I y II de crecimiento del fruto.

A partir del día 46 se inoculó por separado las vesículas. En este momento se comprueba el inicio de la expansión celular por la vacuolización de las células centrales de las vesículas.. Los inóculos cultivados en esta fase de crecimiento presentaron un desarrollo organizado

en todos los tratamientos, coincidiendo con los trabajos realizados por Guardiola et al, (1993) y Harada et al, (2001), quienes relacionan el desarrollo organizado de vesículas con el inicio del segundo estado de desarrollo del fruto. La presencia de auxinas en el medio no incremento el tamaño de las vesículas

La presencia de AIA en el medio de cultivo tuvo un efecto evidente en el patrón de desarrollo in vitro de explantos de frutos de 6 a 76 días después de anthesis, manifestado en el tipo de células que conforman el callo, en el tamaño de vesícula de explantos de frutos de 6 días y en su efecto sobre la zona cambial formada en el mesocarpo externo. Los resultados anteriormente descritos sugieren que la respuesta del patrón de crecimiento in vitro del fruto, además de estar determinada por el tratamiento hormonal, también lo esta por el estado de desarrollo del fruto del cual se obtuvo el inóculo y por el tamaño del inóculo utilizado.

De los resultados obtenidos en esta tesis se puede concluir que:

- En el cultivar de naranjo dulce Salustiana, el porcentaje de cuajado está inversamente relacionado con el número de flores, hasta un nivel aproximado de 65.000 flores por árbol. Niveles de floración superiores no afectan el cuajado.
- La abscisión se extiende hasta mitad de junio (día 74 tras la antesis) y en términos relativos y absolutos presenta dos máximos de caída bien definidos; el primero de ellos (día 22 tras la antesis), se relaciona con aquellos frutitos que presentan una baja tasa de crecimiento y que caen por la base del pedicelo y el segundo (día 52 tras la antesis) presenta un mayor proporción de frutos que se desprenden por la base del cáliz.
- Tanto el patrón de abscisión como el porcentaje de cuajado es afectado por el tipo de inflorescencia. Inicialmente se presenta en las inflorescencias multiflorales una reducción en el número de frutos por inflorescencia, seguido por una reducción en el número de inflorescencias con fruto. El cuajado de fruto es mayor en inflorescencias multiflorales que en uniflorales.
- La evolución del aumento en sección transversal de los tejidos del fruto esta relacionada con las distintas fases de crecimiento. Durante el desarrollo inicial del fruto, el crecimiento lento está asociado con la división celular (Fase I), mientras que el incremento en la tasa de crecimiento se asocia con la expansión celular de las vesículas y una mayor contribución de los lóculos al aumento en sección transversal del fruto (Fase II).

- La tasa de crecimiento del fruto está relacionada con los niveles de carbohidratos Durante el desarrollo inicial del fruto, en que se presenta una actividad metabólica alta (día 43), los azúcares permanecen con valores bajos, consecuencia de su mayor consumo. Inicialmente la mayor proporción de azúcares se concentra en la corteza y a partir del día 76 en que se ha iniciado la expansión de los lóculos, se presentan en mayor proporción en las vesículas.
- La distribución de los azúcares en los tejidos del fruto esta relacionada con la actividad de las invertasas. Durante el crecimiento inicial, la mayor utilización de azúcares se verifica con la evolución de la actividad invertásica ácida, siendo mayor en antesis y reduciéndose con el avance del estado de desarrollo del fruto. Con el inicio de la expansión celular de las vesículas y en efecto, la acumulación de azúcares, se presenta una mayor actividad de las invertasas alcalinas, reduciéndose rápidamente con el avance del estado de desarrollo del fruto.
- La aplicación de 2,4-D modifica la cosecha en el cultivar Salustiana, dependiendo de la concentración de auxina y de la cantidad de solución aplicada por árbol. Con una concentración de 20 ppm. en una cantidad promedio de 3,6 litros por árbol, se incrementa el tamaño del fruto, reduciendo su número sin modificar la cosecha. Una concentración de 15 ppm. en cantidades de 7,7 litros por árbol, incrementa el cuajado de fruto sin aumentar su tamaño.
- El aumento en tamaño del fruto esta acompañado por, un retraso inicial en la abscisión (hasta el día 43), y un aumento a partir de este momento. Este retraso en la abscisión reduce la caída de flores-frutos

por la zona de abscisión del pedicelo y posteriormente incrementa la abscisión por la zona del caliz.

- En el año 2004, el efecto del 2,4-D sobre la abscisión en inflorescencias con hojas (multiflorales y uniflorales), refleja el comportamiento general del patrón de abscisión total del árbol, provocando un retraso inicial durante los estados iniciales de desarrollo del fruto (día 22), e incrementándola en adelante.
- El aumento en el tamaño del fruto del cultivar Salustiana se evidencia inmediatamente tras la antesis y el resultado final al momento de la cosecha, es una diferencia de aproximadamente 4,5 mm frente a los testigos sin tratar. Una pequeña variación en la concentración de la auxina aplicada y quizás más importante, la variación en la cantidad de solución aplicada por árbol pueden reducir la intensidad de la respuesta.
- La tasa de aumento diaria en diámetro, peso fresco y peso seco alcanza un máximo el día 53, en que se ha iniciado el crecimiento en expansión de las vesículas. Desde este momento y hasta el momento de la cosecha, la tasa de aumento diaria de las tres variables es mayor en frutos tratados con 2,4-D.
- En el año 2003, se observó un aumento inicial en la tasa de crecimiento del fruto. Las diferencias encontradas durante el desarrollo inicial del fruto, desaparecieron con el avance del estado de desarrollo, obteniéndose al momento de la cosecha frutos de un mismo diámetro.

- La aplicación de 2,4-D incrementa los niveles de azúcares del fruto e influye sobre la actividad de las distintas isoformas de invertasa. El aumento en la actividad de la isoforma ácida de las invertasas sugiere un efecto directo del 2,4-D sobre el aumento en la capacidad sumidero del fruto, y además esta relacionada con el mayor consumo de azúcares durante el desarrollo inicial del fruto.
- El aumento en el contenido en sacarosa y azúcares reductores de las vesículas que se presenta por la aplicación de 2,4-D, coincide con el inicio de la vacuolización de las células de las vesículas. Se verifica la participación de las invertasa alcalinas en los procesos de acumulación de azúcares en las vesículas
- Con el estudio *in vitro* de los tejidos del fruto se verifica la pérdida en la capacidad de respuesta al AIA, con el avance del estado de desarrollo del fruto.
- La respuesta del patrón de crecimiento *in vitro* del fruto, además de estar determinado por el tratamiento hormonal, también lo está por el estado de desarrollo del fruto del cual se obtuvo el inóculo y por el tamaño del inóculo utilizado.
- La presencia de AIA en el medio de cultivo tuvo un efecto evidente sobre el patrón de desarrollo *in vitro* de explantos de frutos de 6 a 76 días después de anthesis, manifestado en el tipo de células que conforman el callo, en el tamaño de vesícula de explantos de frutos de 6 días y en su efecto sobre la zona cambial formada en el mesocarpo externo.

- Agustí M, Almela V, Guardiola JL. 1981. The regulation of fruit cropping in mandarins through the use of growth regulators. *Proc Int Soc Citriculture* 1: 216–220.
- Agusti M., Almela V., Juan. M., Primo-Millo E, Trenor I, Zaragoza S. 1994. Effect of 3,5,6-trichloro-2-pyridyl-oxyacetic acid on fruit size and yield of Clasellina mandarin. *J. Hort. Sci.* 69(2): 219 –223
- Agustí M, Garcia-Mari F.,Guardiola JL. 1982. The influence of flowering intensity on the shedding of reproductive structures in sweet orange. *Scientia Hortic.* 17:343-352.
- Agusti M., Zaragoza S., Iglesias DJ, Almela V., Primo-Millo E, Talón M. 2002. The synthetic auxin 3,5,6-TPA stimulates carbohydrate accumulation and growth in citrus fruit. *Plant Growth Regul.* 36(2): 141-147.
- Almeida, AF. 2003. Acumulación y movilización de carbohidratos durante el cuajado del fruto en el naranjo dulce Salustiana (*Citrus Sinensis* (L.) Osbeck). Tesis Doctoral. Departamento de Biología Vegetal. Universidad Politécnica de Valencia.
- Altman A, Gulsen Y, Goren R. 1982. Growth and metabolic activity of lemon juice vesicle explant in vitro. *Plant physiology* 69: 1-6.
- Amo – Marco JB y Picazo I. 1994. In vitro culture of albedo tissue from fruits of *Citrus sinensis* cv. Washington Navel: Effect of fruit age and orange juice. *Journal of horticultural science* 69: 929 – 935.
- Aznar M, Almela V, Juan M, El-Otmani M, Agustí M. 1995. Effect of the synthetic auxin phenothiol on fruit development of Fortune mandarin. *J. Hort. Sc.* 70 (4): 617 – 621.
- Bain, JM. 1958. Morphology, anatomical and physiological changes in the developing fruit of the Valencia orange, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. *Austral. J. Bot.* 6: 1-28
- Bangerth F. 1997. Can regulatory mechanisms in fruit growth and development be elucidated through the study of endogenous hormone concentration? *Acta Hort.* 463: 77 - 87

- Becerra SR. y Guardiola JL. 1984. Inter-relationship between flowering and fruiting in sweet orange, cultivar Navelina. *Proc. Int. Soc. Citriculture*. 1: 190-194.
- Ben-Cheikh W, Perez-Botella J, Tadeo FR, Talon M, Primo-Millo E. 1997. Pollination increases gibberellin levels in developing ovaries of seeded varieties of citrus. *Plant Physiol* 114: 557–564.
- Böttger M. 1986. Proton translocation systems at the plasmalemma and its possible regulation by auxin. *Acta Horticulture* 179. 83 - 93
- Brenner ML y Cheikh N. 1995. The role of hormones in photosynthate partitioning and seed filling. *Plant hormones: Davies P J. Kluwer Academic Publishers*. 649 – 670.
- Burns J, Achor D, Echeverria E. 1992. Ultrastructural studies on the ontogeny of Grapefruit juice vesicles (*Citrus paradisi* Macf. Cv Star Ruby). *Int. J. Plant Sci.* 153 (1): 14 – 25.
- Burns J, Achor D, Echeverria E. 1994. Carpellary outgrowth development in the endocarp of Grapefruit, *Citrus paradisi* (Rutaceae). *Amer. J. Bot.* 81(6): 760-769.
- Burns JK, Lewandowski DJ, Nairn CJ, Brown GE. 1998. Endo-1,4-glucanase gene expression and cell wall hydrolase activities during abscission in Valencia orange. *Physiol.Plant.* 102
- Bustan A, Erner Y, Goldschmidt EE. 1995. Interactions between developing Citrus fruits and their supportive vascular system. *Ann. Bot.* 76:657-666.
- Cassin J, Bourdeaut A, Fougue V, Furon V, Gaillard JP, LeBourdelle J, Montagut G, Moreuil C. 1969. The influence of climate upon the blooming of *Citrus* in tropical areas. *Proc. Int. Soc. Citricult.* 1: 315-323.
- Coggins CW y Hield HZ. 1968. Plant growth regulators. In: Reuther W, Batchelor LD and Webber J (eds) *The Citrus Industry*, vol 2. Univ of California, pp 371–389

- Coggins CW y Henning GL. 1988. Grapefruit rind blemish caused by interaction of gibberellic acid and wetting agents. International Citrus Congress (6th : 1988 : Tel Aviv, Israel) : Margraf. 1: 333-338.
- Davenport TL. 1990. *Citrus* flowering. *Hort. Rev.* 12: 349-408.
- Duarte AM. y Guardiola JL. 1996. Flowering and fruit set on Fortune hybrid mandarin: Effect of girdling and growth regulators. *Proc. Int. Soc. Citriculture* 1: 1069-1071.
- Downton W, Grant W, Loveys B. 1987. Carbon dioxide enrichment increases yield of Valencia orange. *Aust. J. Plant Physiol.* 14: 493 – 501.
- Echeverria E.y Ismail M. 1987. Changes in sugars and acids of citrus fruits during storage. Proceedings of the Florida State Horticultural Society.100: 50-52
- Echeverria E, Gonzalez PC, Brune A. 1997. Characterization of proton and sugar transport at the tonoplast of sweet lime (*Citrus limmetioides*) juice cells. *Physiol. Plant.* 101:291-300.
- El-Otmani M., Agusti M., Aznar M. y Almela V. 1993. Improving the size of fortune mandarin fruits by 2,4-DP. *Scientia Hort.* 55: 283-290.
- El-Otmani M., Lovatt, C., Coggins, CW, Agusti M. 1995. Plant Growth regulators in citriculture: factors regulating endogenous levels in Citrus tissues. *Critical Reviews in Plant Science* 14(5): 367 – 412.
- Else MA, Stankiewicz-Davies AP, Crisp CM, Atkinson CJ. 2004. The role of polar auxin transport through pedicels of *Prunus avium* L. in relation to fruit development and retention. *Journal of Experimental Botany* 55, (405): 2099–2109.
- Erner Y. 1989. Citrus fruit set: carbohydrate, hormone and leaf mineral relationships. In: Wright CJ (ed) *Manipulation of Fruiting* Butterworth, pp 233–242
- Erner Y. y Bravdo E. 1983. The importance of inflorescence leaves in fruit setting of Shamouti orange. *Acta Hort.* 139:107-110.

- Erner Y, Kaplan Y, Artzi B, Hamou M. 1993. Increasing citrus fruit size using auxins and potassium. *Acta Horticulturae* 329: 112-119.
- Erner Y, Reuveni O, Goldschmidt EE. 1975. Partial purification of a growth factor from orange juice which affects citrus tissue culture and its replacement by citric acid. *Plant physiology* 56: 279-282.
- Erner Y. y Shomer I. 1996. Morphology and anatomy of stems and pedicels of spring flush shoots associated with Citrus fruit set. *Ann. Bot.* 77: 537-545.
- Eschrich W. 1980. Free space invertase, its possible role in phloem unloading. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 93: 363-378
- Farrar J. 1996. Regulation of shoot–root ratio is mediated by sucrose. *Plant and Soil* 185: 13–19.
- García-Luís A, Almela V, Monerri C, Agusti M, Guardiola JL. 1986. Inhibition of flowering in vivo by existing fruits and applied growth regulators in Citrus unshiu. *Physiol. Plant.* 66: 515-520.
- García-Luis A, Fornés F, Sanz A, Guardiola JL 1988. The regulation of flowering and fruit set in *Citrus*: Relationship with carbohydrate levels. *Israel J. Bot.* 37: 189-201.
- García-Luis, A., Didehvar, F., Guardiola, JL., Baker DA. 1991. The transport of sugars in developing fruits of Satsuma mandarin. *Ann. Bot.* 68: 349 – 357.
- García-Luis A., Oliveira MEM, Bordón Y, Siquiera DL, Tominaga S, Guardiola JL. 2002. Dry matter accumulation in Citrus fruit is not limited by transport capacity of the pedicel. *Ann. Bot.* 90: 755-764.
- Georgia A. 1998. The use of 3,5,6,-TPA to improve fruit size of Clementine mandarin. *Agr. Med.* 128: 307-312.
- George EF. 1993. *Plant Propagation by Tissue Culture Vol. 1.* Reading, Exegenetics Ltd

- Gibeaut DM, Karuppiah N, Chang S-R, Brock TG, Vadlamudi B, Kim D, Ghosheh NS, Rayle DL, Carpita NC, Kaufman PB. 1990. Cell wall and enzyme changes during graviresponse of the leaf-sheat pulvinus of oat (*Avena sativa*). *Plant. Physiol.* 94: 411-416
- Glasziou KT. 1969. Control of enzyme formation and inactivation in plants. *Annual Reviews Plant Physiology* 20: 63–88.
- Goldschmidt EE. 1999. Carbohydrate supply as a critical factor for Citrus fruit development and productivity. *HortScience* 34: 1020-1024.
- Goldschmidt EE. y Golomb A. 1982. The carbohydrate balance of alternative bearing *Citrus* trees and the significance of reserves for flowering and fruiting. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 107: 206 – 208.
- Goldschmidt EE. y Monselise SP. 1977. Physiological assumptions toward the development of a citrus fruiting model. *Proc. Int. Soc. Citriculture.* 2: 668-672.
- Goldschmidt EE. y Koch K. 1996. Citrus. En: Zamski, E., Schaffer, A.A. (Ed.). Photoassimilate distribution in plant and crops. New York: Marcel Dekker Inc. 797-823.
- Goldschmidt EE. y Monselise SP. 1977. Physiological assumptions toward the development of a citrus fruiting model. *Proc. Int. Soc. Citriculture.* 2: 668-672.
- Gómez-Cadenas A, Mehouchi J, Tadeo FR, Primo-Millo E, Talón M. 2000. Hormonal regulation of fruitlet abscission induced by carbohydrate shortage in Citrus. *Planta* 210: 636 - 643.
- Gonzalez-Sicilia E. 1968. El cultivo de los agrios. (3ª Ed.) Editorial Bello. Valencia.
- Goren R. 1993. Anatomical physiological and hormonal aspects of abscission in Citrus. *Hort. Rev.* 15: 145-232.
- Goren R. y Monselise SP. 1964. Survey of hesperidin and nitrogen in the developing flower of the Shamouti orange tree. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 85: 218–223.

- Goren R, Huberman M, Zhong GY. 2000. Basics aspects of hormonal control of abscission. *Proc Int Soc Citriculture* 9: 591–594.
- Greenberg J, Hertzano Y, Eshel G. 1992. Effects of 2,4-D, Etephon and NAA on fruit size and yield of Star Ruby red grapefruit. *Proc Int Soc Citriculture* 1: 520–523.
- Guardiola JL. 1981. Flower initiation and development in *Citrus*. *Proc. Int. Soc. Citricult.* 1: 242-246.
- Guardiola JL. 1981. Aumento del tamaño del fruto en Satsuma y Clementinas. Problemas y perspectivas. *Levante Agrícola-Vergel* 230: 67–68
- Guardiola JL. 1987. Factores internos que determinan el tamaño del fruto en los agrios. *Levante Agrícola* 247-250.
- Guardiola JL. 1988. Factors limiting productivity in Citrus. A physiological approach. *Proc. Int. Soc. Citriculture.* 2: 381-394.
- Guardiola, JL. 1996. Synthetic auxins and Citrus fruit size. Strategies for use and mechanism of action. *Proc. Int. Soc. Citriculture*, 953-960.
- Guardiola JL. 2000. Regulation of flowering and fruit development: Endogenous factors and exogenous manipulation. *Proc Int Soc Citriculture* 9: 342-346.
- Guardiola JL, Agustí M, García-Mari F. 1977. Gibberellic acid and flower bud development in sweet orange. *Proc. Int. Soc. Citricult.* 2: 696-699.
- Guardiola JL, Almela V, Barrés MT. 1988. Dual effects of auxins on fruit growth in Satsuma mandarin. *Sci Hortic.* 34:228–237
- Guardiola JL, Barres MT, Albert C, García-Luis A. 1993. Effects of exogenous growth regulators on fruit development in Citrus unshiu. *Ann. Bot.* 71: 169-176
- Guardiola JL.y García-Luis A. 1997. Thinning effects on Citrus yield and fruit size. *Acta Hortic.* 463: 463 – 473

- Guardiola JL y García-Luis A. 2000. Increasing fruit size in Citrus. Thinning and stimulation of fruit growth. *Plant Growth Regul.* 31: 121-132.
- Guardiola JL, García-Mari F, Agustí M. 1984. Competition and fruit set in the Washington navel orange. *Physiologia. Plantarum* 62:297-302
- Guardiola JL. y Lázaro E. 1987. The effect of synthetic auxins on fruit growth and anatomical development in Satsuma mandarin. *Scientia Hort.* 119-130.
- Gulsen Y, Altman A, Goren R. 1981. Growth and development of citrus pistils and fruit explants in vitro. *Physiol. plant.* 53: 295-300.
- Gillaspy G, Ben-David H, Gruissem W. 1993. Fruits: A developmental perspective. *The Plant Cell* 5: 1439-1451.
- Hall AE, Khairi MMA, Asbell CW. 1977. Air and soil temperature effects on flowering of Citrus. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 102: 261-263.
- Harada H, Hiroo M, Toshihiko T. 2001. Effects of explant age, growth regulators and carbohydrates on sugar accumulation in citrus juice vesicles cultured in vitro. *Scientia horticulturae* 90: 109-119.
- Hirose H. 1981. Development of chemical thinners of commercial use for Satsuma mandarin in Japan. *Proc Int Soc Citriculture* 1: 256-260
- Hubbard, NL, Huber SC, Parr DM. 1989. Sucrose phosphate synthase and acid invertase as determinants of sucrose concentration in developing muskmelon (*Cucumis melo* L) fruits. *Plant Physiol.* 91: 1527-1534.
- Idso SB, Kimball BA, Allen SG. 1991. Net photosynthesis of sour orange trees maintained in atmospheres of ambient and elevated CO₂ concentration. *Agric Forest Meteorol* 54:95-101
- Iglesias DJ, Lliso I, Tadeo FR, Talon M. 2002. Regulation of photosynthesis through source:sink imbalance in citrus is mediated by carbohydrate content in leaves. *Physiol Plant* 116:563-572.
- Iglesias DJ, Tadeo FR, Primo-Millo E, Talon M. 2003. Fruit set dependence on carbohydrate availability in citrus trees. *Tree Physiol.* 23:199-204.

- Iglesias DJ, Tadeo FR, Primo-Millo E, Talon M. 2005. Carbohydrate and ethylene levels related to fruitlet drop through abscission zone A in citrus. *Trees: Structure and Function* (en prensa).
- Jahn OL. 1973. Inflorescence types and fruiting patterns in Hamlin and Valencia oranges and Marsh grapefruit. *Amer. J. Bot.* 60: 663-670.
- Johansen DA. 1940. Plant microtechnique. McGraw-Hill Book Co., New York, N.Y.
- Kato, T. y Kubota S. 1978. Properties of invertases in sugar storage tissues of citrus fruit and changes in their activities during maturation. *Physiol. Plant.* 42:67-72.
- Khan A. 1996. Role of auxin, kinetin, gibberellic acid and l-methionine on cell division and tracheary element differentiation in *C. limon* juice vesicle culture. *Phytomorphology* 46 (4): 349-356.
- Kazokas WC. y Burns JK. 1998. Cellulase activity and gene expression in citrus fruit abscission zones during and after ethylene treatment. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* (submitted, in review).
- Koch K y Avigne W. 1990. Postphloem, nonvascular transfer in Citrus. *Plant Physiol.* 93: 1405 – 1416.
- Kordan HA. 1975. Vacuolar physiology as an intrinsic barrier against injury-induced mitosis in lemon fruit cells. *The nucleus* 18: 109-118.
- Kordan HA. 1977. Sucrose activation of mitosis in lemon fruit explants (Citrus limon L.). *Experimentia* 33: 924-925.
- Krikorian AD. 1995. Hormones in tissue culture and micropropagation. *Plant hormones: Davies P J. Kluwer Academic Publishers.* 774-796
- Kubo T, Hohjo I, Hiratsuka S. 2001 Sucrose accumulation and its enzyme activities in the juice sacs of Satsuma mandarin fruit from trees with different crop loads. *Scientia Horticulturae* 91: 215-225.

- Lasbkowski L. 2005. Desarrollo inicial y vascularización del fruto y el pedicelo de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv Salustiana. Relación con el contenido de auxinas. Tesis Doctoral. Departamento de Biología Vegetal. Universidad Politécnica de Valencia.
- Lenz F. 1966. Flower and fruit development in 'Valencia Late' orange as affected by type of inflorescence and nutritional status. *Hort. Res.* 6, 65-78.
- Leopold AC, Kriedman PE. 1975. Plant growth and development (2ª Ed). Mc-Graw Hill Book Company. New York.
- Lowell CA, Tomlinson PT, Koch KE. 1989. Sucrose-metabolizing enzymes in transport tissues and adjacent sink structures in developing citrus fruit. *Plant Physiol.* 90:1394-1402.
- Martínez-Cortina C y Sanz A. 1991. Comparison Between the Effect of the Fruit and of Exogenous GA₃-Applications on Source-Sink Relationships in *Citrus* Sprouts. *Ann Bot.* 68: 143-149
- Mehouachi J, Serna D, Zaragoza S, Agustí M, Talon M, Primo-Millo E. 1995. Defoliation Increases Fruit Abscission and Reduces Carbohydrate Levels In Developing Fruits and Woody Tissues Of *Citrus unshiu*. *Plant Sci.* 107:189-197.
- Monselise SP. 1979. The use of growth regulators in citriculture: A review. *Sci Hortic* 11: 151–162
- Monselise SP. 1985. *Citrus* and related genera. In: AH. Halevy (Ed.). CRC Handbook of flowering. Vol. 2. Press, Boca Raton, Florida pp: 257-294.
- Moss GI. 1969. Influence of temperature and photoperiod on flower induction and inflorescence development in sweet orange (*Citrus sinensis* L. (Osbeck)). *J. hort. Sci.* 44(4), 31 1-20.
- Moss GI, Steer BT, Kriedeman PE. 1972. The regulatory role of inflorescence leaves in fruit-setting by sweet orange (*Citrus sinensis*). *Physiol. Plant.* 27: 432-438.

- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiolo plant* 15: 473-497.
- Murashig T, Tucker DP. 1969. Growth factor requirement of citrus tissue culture. Proceedings first international citrus symposium 3: 1155-1161.
- Nelson N. 1944. A photometric adaptation of the Somogy method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 153: 375-378.
- Ozga J. y Reinecke D. 2003. Hormonal Interactions in fruit development. *J. Plant Growth Regul.* 22: 73 – 81
- Ortolá A, Monerri C, Guardiola JL. 1988. Direct stimulation of fruit size in Satsuma mandarin by the application of naphtalene acetic acid. *Actas Horticultura* 1: 22–27.
- Ortolá AG, Monerri C, Guardiola JL. 1991. The use of naphtalence acetic acid as a fruit growth enhancer in Satsuma mandarin; a comparison with the fruit thinning effect. *Sci Hortic* 47: 15–25
- Ortolá AG, Monerri C, Guardiola JL. 1997. Fruitlet age and inflorescence characteristics affect the thinning and the increase in fruitlet growth rate induced by auxin applications in Citrus. *Acta Hortic.* 463: 501-508.
- Primo-Millo E, Ibañez R, Legaz F. 1977. Productividad de la variedad de naranjo Navelate. I-Factores que afectan la fructificación. *Anal. Inst. Nac. Invest. Agr.* 7:163-182.
- Powell AA. y Krezdorn AH. 1977. Influence of Fruit-Setting Treatment on Translocation of Metabolites-C-14 in Citrus During Flowering and Fruiting. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 102 (6): 709-714.
- Quick WP y Schaffer AA. 1996. Sucrose metabolism in sinks and sources. In Phtoassimilate distribution in plants and crops. Source-Sink relationships. Marcel Dekker, Inc. pp 115-156.
- Ricardo CPP y Ap Rees T. 1970. Invertase activity during the development of carrot roots. *Phytochemistry* 9: 239-247.

- Roitsch T, Balibrea ME, Hofmann M, Proels R, Sinha AK. 2003. Extracellular invertase: key metabolic enzyme and PR protein. *J. Exp. Bot.* 54: 513-524.
- Ronca F, Arbiza H, Abella A, Arias M, Gravina A. 1997. Synthetic auxins evaluation on fruit size and yield in Lisbon type lemon. *Acta Horti* 463: 405–412
- Ross HA. y Davies HV. 1992. Purification and characterization of sucrose synthase from the cotyledons of *Vicia faba* L. *Plant Physiology*, 100, 1008±13.
- Roth I. 1977. Fruits of Angiospermas. *Encyclopedia of Plant Anatomy* X,1.
- Ruiz R, García-Luis A, Monerri C, Guardiola JL. 2001. Carbohydrate availability in relation to fruitlet abscission in citrus. *Ann. Bot.* 87: 805-812.
- Ruiz R.y Guardiola JL. 1994. Carbohydrate and mineral nutrition of orange fruitlets in relation to growth and abscission. *Physiologia Plantarum* 90:27-36.
- Sanz A, Monerri C, Gonzalez-Ferrer J,Guardiola JL. 1987. Changes in carbohydrates and mineral elements in citrus leaves during flowering and fruit set. *Physiologia Plantarum* 69: 93-98.
- Sauer MR. 1951..Growth of orange shoots. *Aust. J. agric. Res.* 2, 105-17.
- Schneider H. 1968. The Anatomy of Citrus. En: *The Citrus Industry*. Vol. 2, Reuther, W., Batchelor, L.D. and Webber, (Eds.). University of California, EE.UU.
- Spiegel-Roy P.y Goldschmidt E. 1996. *Biology of Citrus*. Cambridge, UK.
- Stewart WS, Klotz LJ, Hield HZ. 1951. Effects of 2,4-D and related substances on fruit drop, yield, size and quality of Washington navel oranges. *Hilgardia* 21: 161–193
- Stewart WS, Held HZ, Brannamann BL. 1952. Effects of 2,4-D and related substances on fruit drop, yield, size and quality of Valencia oranges. *Hilgardia* 21: 321–329

- Stewart WS y Parker ER. 1954. Effects of 2,4-D and related substances on fruit crop, yield, size and quality of grapefruit. *Hilgardia* 22: 623–641
- Sturn A. 1999. Invertases. Primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning. *Plant Physiology* 121: 1-7.
- Tadeo F y Primo-Millo E. 1988. Ultrastructural changes in the developing ovaries of Citrus. *Proc. Int. Soc. Citriculture* 2: 417 – 429
- Talón M, Zacarías L, Primo-Millo E. 1990. Hormonal changes associated with fruit set and development in mandarins differing in their parthenocarpic ability. *Physiologia Plantarum* 79: 400 – 406
- Talon M, Zacarias L, Primo-Millo E. 1992. Gibberellins and parthenocarpic ability in developing ovaries of seedless mandarins. *Plant Physiol* 99:1575–1581.
- Talón M, Tadeo FR, Ben-Cheikh W, Gómez-Cadenas A, Mehouchi J, Pérez-Botella J, Primo-Millo E. 1997. Hormonal regulation of fruit set and abscission in citrus: classical concepts and new evidence. *Acta Hort.* 463:209-217.
- Tanner W. 1980. On the possible role of ABA on phloem unloading. *Berichte der deutschen Botanischen Gesellschaft* 93: 349–351.
- Tisserat B, Jones D, Galleta PD. 1989. Growth responses from whole fruit and fruit halves of lemon cultured in vitro. *American journal of botany* 76 (2): 238 – 246.
- Tisserat B, Vandercook CE, Berhow M. 1989. Citrus juice vesicle culture: a potential research tool for improving juice yield and quality. *Food technology*. Chicago, III.: University of Chicago Press 151 (1): 64-72.
- Van Rensburg P, Peng SP, García-Luis A, Fornes F, Guardiola JL. 1996. Increasing crop value in fino clementine mandarin with plant growth regulators. *Proc. Int. Soc. Citriculture* 970-974.
- Vanniere H, Jacquemond C, Vullin G. 1987. Amélioration du calibre des clémentines: Techniques expérimentées in Corse. *Comp Rendu CLAM, Chania, Greece*

- Vanniere H y Arcuset P. 1989. Ameloration du calibre des Clementines en Corse par l'emploi du dichlorprop. *Fruits* 44: 393-400
- Well M y Rausch T. 1990. Cell wall invertasa in tobacco crown gall cells. *Plant physiology* 94: 1575-1581.
- Zuconi G, Monselise SP, Goren R. 1978. Growth-Abscission Relationships in developing orange fruit. *Scientia Hortic.* 9:137-146.