

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



Efecto del rayado de ramas y la aplicación de auxinas de síntesis sobre el desarrollo del fruto y la maduración del níspero japonés (*Eriobotrya japonica* Lindl.)

TRABAJO FIN DE GRADO

ALUMNO/A: Alejandro Cutanda Trigo

TUTOR/A: Carmina Reig Valor

CO-TUTOR/A: Manuel Agustí Fonfría

Curso Académico: 2014/2015

VALENCIA, 7 de julio 2015

TÍTULO: Efecto del rayado de ramas y la aplicación de auxinas de síntesis sobre el desarrollo del fruto y la maduración del níspero japonés (*Eriobotrya japonica* Lindl.).

RESUMEN:

En el níspero japonés (*Eriobotrya japonica* Lindl.) con el fin de aumentar el tamaño final del fruto se utilizan técnicas de cultivo ampliamente conocidas, como el aclareo de frutos, manual o químico con ácido naftalenacético (ANA), o el rayado de ramas. Sin embargo, poco se conoce de la aplicación exógena de auxinas de síntesis con este fin en esta especie.

En este trabajo se estudia el efecto que la aplicación de dos auxinas de síntesis, el éster etilhexil del ácido 2,4-diclorofenoxipropiónico (2-4 DP) y el ácido 3,5,6-tricloro-2-piridiloxiacético (3,5,6-TPA), tienen cuando se aplican al inicio de la fase lineal (estado fenológico 702 de la escala BBCH) sobre la cinética de crecimiento del fruto y su maduración en el níspero japonés. Estos tratamientos se combinaron con el rayado de ramas con el fin de comprobar si existe una acción sumatoria de sus efectos.

Para ello se realizó un seguimiento del diámetro del fruto desde el momento de los tratamientos hasta la recolección y se determinó, en el momento de la recolección, la concentración de sólidos solubles totales (SST), la acidez libre y el color, así como la clasificación de los frutos según los diámetros comerciales.

También se estudió el desarrollo del fruto bajo el punto de vista nutricional y hormonal, analizándose el contenido endógeno de carbohidratos de consumo y de transporte del fruto, así como el de ácido indolacético (AIA), ácido abscísico (ABA) y *trans*-zeatina (tZ).

Los resultados obtenidos sugieren que las auxinas de síntesis aceleran la cinética de crecimiento del fruto y mejoran sus calibres comerciales, al mismo tiempo que adelantan su recolección.

Palabras clave: ABA, AIA, Auxinas de síntesis, Carbohidratos, Citoquininas, Diámetro del fruto.

TITLE: Effect of branch scoring and synthetic auxins on fruit development and ripening of loquat fruit (*Eriobotrya japonica* Lindl.).

SUMMARY:

In loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.), fruit thinning, both manual and chemical thinning with naphthaleneacetic acid (NAA), and branch scoring increase fruit size and advances fruit colour change. However, little is known about the effect of the synthetic auxins in this respect.

In this work we study the effect of the ethylhexyl ester of the 2,4-dichlorophenoxy propionic acid (2,4-DP) and 3,5,6-trichloro-2-pyridyl-oxyacetic acid (3,5,6-TPA), applied at the onset of fruit growth (growth stage 702 on the BBCH-scale), on loquat fruit development and fruit ripening. Treatments were combined with branch scoring in order to check any additive effect.

From treatment date until harvest fruit diameter was recorded periodically. Total soluble solids concentration (SST), free acidity, and peel colouration were also measured at harvest. Harvested fruit was classified according to commercial calibers.

Translocating and reducing sugars concentration in the fruit were analyzed as fruit grew, and also indoleacetic acid (IAA), abscisic acid (ABA) and *trans*-zeatin (t-Z) concentration.

Results suggest that the synthetic auxins accelerate fruit growth, improve commercial fruit size, and advance harvest date.

Key words: ABA, IAA, Synthetic auxins, Carbohydrates, Cytokinins, Fruit diameter.

A Carmina y Manolo, por su dedicación, propia de alguien que disfruta lo que hace. No sólo por su gran labor como docentes, sino por inculcarme una asignatura que no se paga en la carrera: Razonar.

A Ampa, por su saber hacer y su imborrable sonrisa.

A Carlos, por su sentido del humor.

A Vicent, por su empeño y tesón.

A Sebastià Balasch, por su inestimable ayuda.

A mis compañeros del IAM, que han sufrido como yo, y nos hemos divertido a la par.

A Majo y Sara, grandes compañeras.

A mi compañero “Diegui”, mi mano derecha, y yo, su izquierda.

A los ‘Celiacos’, sin vosotros no ha sido igual.

A Rocío, por llevarme de la mano hasta el final.

Y a mis padres: por darme la vida y la oportunidad de estudiar.

Índice

Índice.....	VII
Índice de tablas	IX
Índice de figuras	X

I. Introducción.....	1
1. Importancia económica de la especie	1
2. Clasificación botánica y ciclo vegetativo de la especie	2
3. Crecimiento del fruto y su control.....	4
3.1. Control ambiental	5
3.2. Control nutricional	5
3.3. Control hormonal	6
4. Técnicas agronómicas para aumentar el desarrollo del fruto	7
4.1. Técnicas indirectas de mejora del tamaño del fruto	7
4.1.1. Aclareo	7
4.2. Técnicas directas de mejora del tamaño del fruto	8
4.2.1. Rayado.....	8
4.2.2. Aplicación exógena de auxinas de síntesis	9
5. Hipótesis de trabajo.....	11
II. Material y métodos	12
1. Material vegetal	12
2. Diseño experimental	12
3. Determinaciones analíticas	13
3.1. Parámetros de maduración	13
3.2. Análisis de azúcares	13
3.3. Análisis hormonal	14
3.4. Análisis estadístico	15
III. Resultados y discusión	16
1. Influencia de los tratamientos sobre el crecimiento del fruto y su maduración	16
2. Evolución del contenido de azúcares en el fruto y su crecimiento	24
3. Evolución del contenido hormonal del fruto durante su crecimiento	29

IV. Conclusiones	32
-------------------------------	-----------

Bibliografía	33
---------------------------	-----------

Anejos

Anejo A

Anejo B

Índice de tablas

Tabla 1. Efecto de las auxinas sobre la coloración del fruto 13 días antes de la recolección. Los datos son las medias \pm ES de las coordenadas a y b de Hunter de 20 frutos repartidos en 4 árboles completamente al azar. Distintas letras para cada columna indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$) **19**

Tabla 2. Influencia de los tratamientos en los parámetros de maduración externa (color) e interna (acidez y SST) del fruto en el momento de la recolección. Los valores son la media de 24 frutos \pm ES. * El color está representado como el cociente de las coordenadas a y b de Hunter.....**23**

Índice de figuras

Figura 1. Principales países productores de níspero japonés (Caballero y Fernández, 2002) 1

Figura 2. Evolución de la superficie (ha) y de su producción (t) de níspero japonés en España.
(Fuente: Magrama, 2012)..... 2

Figura 3. Representación esquemática del ciclo vegetativo del níspero japonés..... 3

Figura 4. Modelo de crecimiento exponencial del níspero japonés según Blumenfeld (1980) 4

Figura 5. Rayado de ramas. Anillado (izda.) y rayado fino (dcha). *Fuente: Gariglio et al., (2002)*..... 9

Figura 6. Influencia del rayado de ramas con o sin la aplicación de 3,5,6-TPA (A) y de la aplicación de 2,4-DP, 3,5,6-TPA, y de su mezcla (B) en el tamaño del fruto. Cada valor es la media de 80 frutos repartidos en 4 árboles. Las barras verticales indican el error estándar. El eje superior representa los estados fenológicos según la escala BBCH. Letras distintas para una misma fecha indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$). 16

Figura 7. Distribución del porcentaje de cosechas para los distintos tratamientos. Los errores estándar aparecen como barras verticales. Cada valor representa los kg recolectados para cada fecha, en porcentaje, respecto de la cosecha total obtenida para los árboles de cada tratamiento.
..... 20

Figura 8. Distribución del calibre de los frutos recolectados según los diámetros comerciales de los frutos (M.A.P.A., 1995) para el rayado con y sin la aplicación de 3,5,6-TPA (A), y para el 2,4-DP, el 3,5,6-TPA y su mezcla (B). Cada valor representa el porcentaje de 70 frutos por tratamiento, muestreados en el momento de la recolección 21

Figura 9. Influencia del rayado de ramas y de la aplicación de auxinas de síntesis sobre la evolución de la concentración de azúcares reductores y de transporte en los frutos de níspero japonés. Cada valor es la media de 4 repeticiones. El eje superior representa los estados fenológicos según la escala BBCH..... 25

Figura 10. Influencia del rayado de ramas y de la aplicación de auxinas de síntesis sobre la evolución de la concentración de sacarosa (A) y sorbitol (B) en frutos de níspero japonés cv. Algerie. Cada valor es la media de 4 repeticiones. El eje superior representa los estados fenológicos según la escala BBCH..... 27

Figura 11. Influencia del rayado de ramas y de la aplicación de auxinas de síntesis sobre la evolución de la concentración de glucosa (A) y fructosa (B) en frutos de níspero japonés cv. Algerie. Cada valor es la media de 4 repeticiones. El eje superior representa los estados fenológicos según la escala BBCH **27**

Figura 12. Evolución del contenido hormonal de ABA (ng g^{-1}) durante la fase lineal del crecimiento del fruto del níspero japonés. Las barras verticales indican el error estándar. El eje superior representa los estados fenológicos según la escala BBCH **29**

Figura 13. Diferencias en el contenido hormonal de *trans*-zeatina (A) y ácido indolacético (B) para el estado 801 de la escala BBCH. * ND (no determinado) **30**

I. INTRODUCCIÓN

1. IMPORTANCIA ECONÓMICA DE LA ESPECIE

El níspero japonés, es una especie cultivada principalmente en China, Japón, Pakistán, India, los países Mediterráneos (España, Turquía, Grecia, Italia e Israel), Estados Unidos (en gran parte California y Florida) y Brasil (Badenes *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2007).

El área cultivada de níspero en el mundo es de 131.260 hectáreas, y una producción de 549.220 toneladas, siendo los principales productores China (460.000 t) y España (43.300 t), seguidos de India, Pakistan y Japón (Lin *et al.*, 2007).

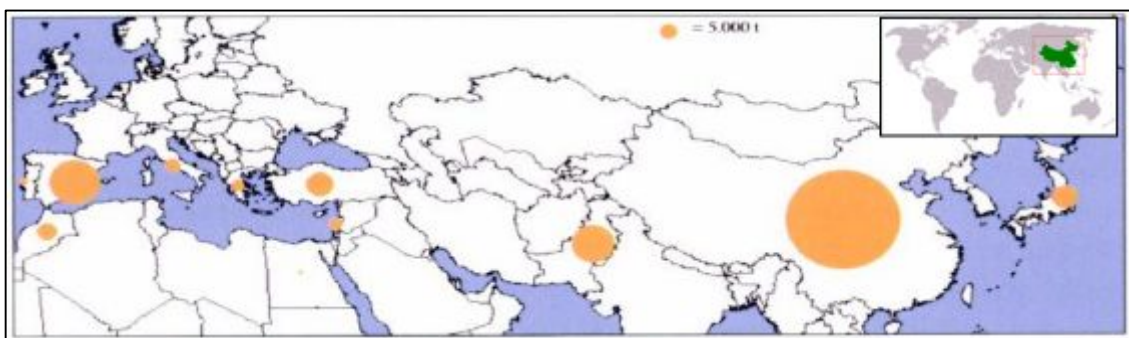


Figura 1. Principales países productores de níspero japonés (Caballero y Fernández, 2002).

España además, es el primer país exportador a nivel mundial, lo cual destaca su importancia económica en esta especie. Su cuota de exportación es el 84% de entre todos los países productores, siendo los principales destinos los países de la Unión Europea, sobretudo Italia, Francia y Portugal (Caballero y Fernández, 2003). Estas exportaciones representan entre el 36 y el 47% de su producción (entre 16.000 y 19.000 toneladas), lo cual es destacable debido a la dificultad añadida que representa el transporte del fruto y su breve vida comercial.

La tendencia seguida por el cultivo de esta especie en España, ha sido creciente durante el último medio siglo. De hecho, la producción ha aumentado considerablemente en los últimos 20 años, de 18.000 toneladas en 1985 a 45.000 toneladas en 2004 (MAPA,

2004). Por otra parte, es cierto que en la última década el cultivo ha sufrido una recesión. La superficie destinada a este cultivo se ha reducido progresivamente, y por ende, la producción (Fig. 2), pese a ello, ningún país mediterráneo sigue los pasos de España en la rentabilidad y en la extensión del cultivo del níspero, debido a las avanzadas técnicas culturales empleadas.

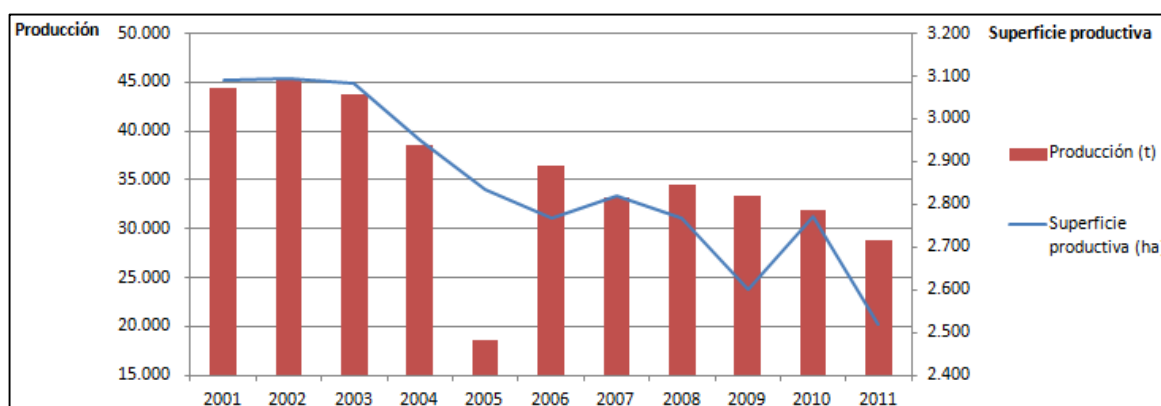


Figura 2. Evolución de la superficie (ha) y de su producción (t) de níspero japonés en España. (Fuente: Magrama, 2012).

2. CLASIFICACIÓN BOTÁNICA Y CICLO VEGETATIVO DE LA ESPECIE

El níspero japonés (*Eriobotrya japonica* Lindl), pertenece a la familia Rosaceae, subfamilia Maloideae y género *Eriobotrya* (Lin *et al.*, 1999).

Es un árbol vigoroso, productivo, con tendencia a la verticalidad, de buen porte (5-6m de altura) y de rápida entrada en producción (2-3 años). Sus hojas son perennes, grandes, duras y de bordes aserrados. Sus flores son pequeñas, con pétalos blancos y cáliz marrón pubescente, y se distribuyen en panículas terminales. El fruto es en pomo, de forma oval o piriforme, tamaño mediano y color amarillo-anaranjado dependiendo de la variedad.

El níspero japonés, a diferencia de otras Rosáceas, florece en otoño, cuaja en invierno y el desarrollo de sus frutos se alarga hasta la primavera, momento en el cual maduran.

En climas templados esta especie presenta 3 brotaciones a lo largo del año, a partir de yemas terminales de brotes vegetativos o de yemas laterales de ramos fructíferos, en

ambos casos del año anterior. La de primavera, que se inicia después de la recolección, es la más importante ya que produce brotes largos y consistentes, cuyo meristemo terminal diferencia las panículas del año siguiente. La brotación de verano se produce a partir de las yemas laterales de los brotes de primavera. Estos brotes crecen muy rápidamente y se conocen como anticipados. Finalmente está la brotación de otoño, de escasa importancia.

Los meristemos de la brotación de primavera y algunos de la de verano sufren una parada estival temporal, tras la cual se produce la diferenciación floral. Aunque ésta es posterior en los brotes de verano, la antesis se produce al mismo tiempo. Es por ello que las panículas de los brotes de verano son de menor tamaño y dan frutos de menor calidad. La floración se extiende a lo largo de dos meses, excepcionalmente incluso tres, y la época de floración depende de otros factores exógenos como la climatología o el estrés hídrico entre otros.

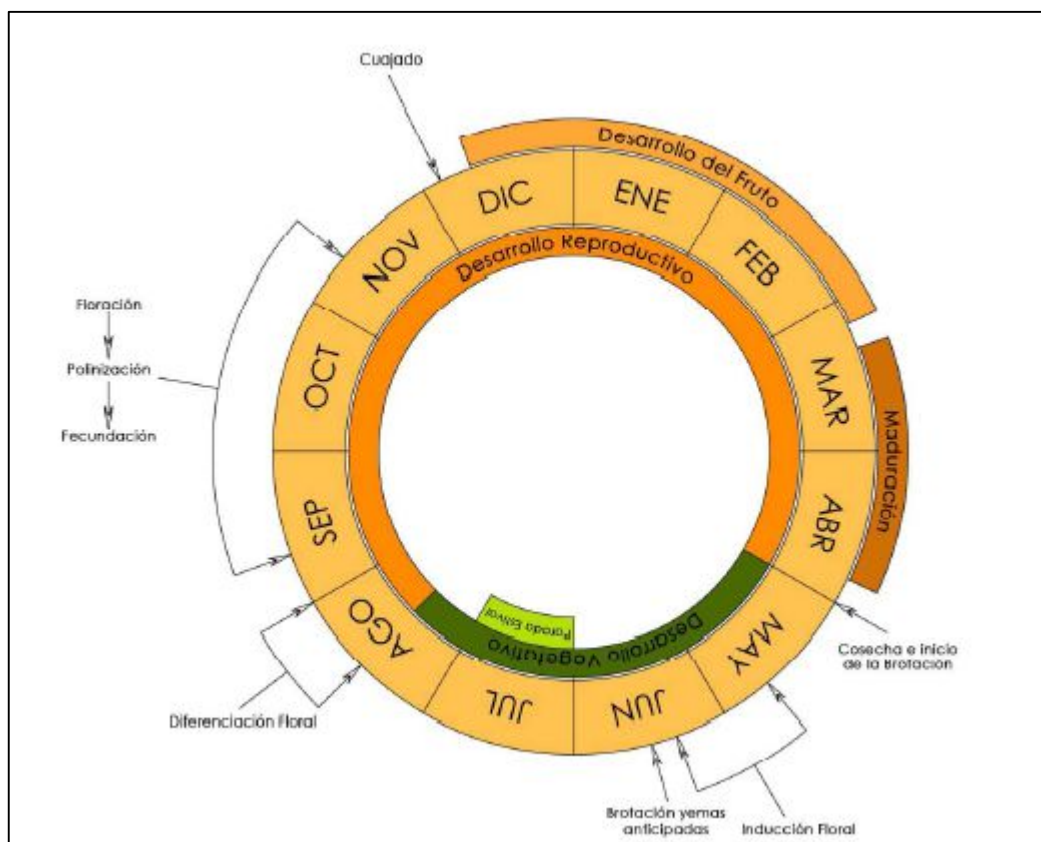


Figura 3. Representación esquemática del ciclo vegetativo del níspero japonés.

3. CRECIMIENTO DEL FRUTO Y SU CONTROL

El crecimiento acumulado del fruto se divide en tres fases: un primer periodo de división celular (Fase I), seguido de un segundo periodo de engrosamiento celular (Fase II), y un tercer periodo en el cual el fruto deja de crecer y madura (Fase III). Estas fases se relacionan con la tasa de crecimiento del fruto que generalmente es sigmoide para la mayoría de las especies frutales, y doble sigmoide para las *Prunoideae* en las que el fruto detiene su crecimiento simultáneamente al endurecimiento del endocarpo.

Sin embargo, el níspero japonés presenta una tasa de crecimiento muy lenta durante la fase I, al menos 6 semanas después del cuajado (Ateyyeh y Qrunfleh, 1998), seguida de una fase de división celular (fase II) que se prolonga durante 4 semanas. Finalmente, en la fase III, el fruto aumenta espectacularmente su tasa de crecimiento hasta alcanzar su máximo tamaño (Fig. 4). De acuerdo con esto, la curva de crecimiento de este fruto no es sigmoideal como los frutales de pepita, sino prácticamente exponencial (Blumenfeld, 1980). Sin embargo, otros autores engloban esta cinética de crecimiento como un modelo sigmoideal simple característico de los pomos (Rodríguez, 1983; Cuevas et al., 2003b).

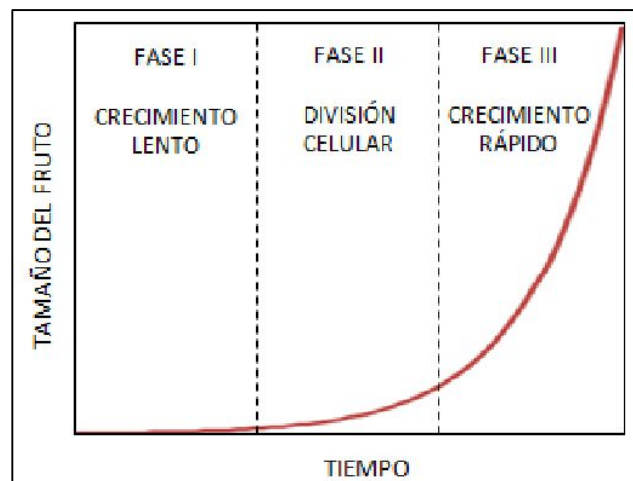


Figura 4. Modelo de crecimiento exponencial del níspero japonés según Blumenfeld (1980).

El crecimiento del fruto está regulado exógenamente por factores ambientales como la radiación y la temperatura, y endógenamente por factores nutricionales, hormonales y genéticos.

3.1. Control ambiental

Entre los factores ambientales más importantes destacan la radiación y la temperatura, ya que cuando la fotosíntesis está limitada por las bajas temperaturas, el metabolismo de los carbohidratos es inferior cuanto menor es la radiación incidente (Zeng *et al.*, 2004).

Sin embargo, en Callosa d'En Sarrià el cultivo se realiza bajo malla y pese a ser la radiación incidente notablemente menor, (en torno al 8,7%), el tamaño y la calidad externa de los frutos mejora, sin afectar a los parámetros de maduración interna (Soler y Juan, 2003). A pesar de ello, el cultivo bajo malla retrasa la recolección y aumenta considerablemente la incidencia de la alteración fisiológica conocida como 'mancha púrpura'.

3.2. Control nutricional

Los factores nutricionales vienen determinados por las relaciones de competencia establecidas dentro de la planta por los órganos vegetativos y reproductivos. Según el modelo de Landsberg (1980), cuando coexisten en el tiempo el desarrollo de cualquier órgano vegetativo con los frutos, son éstos los que obtienen más carbohidratos por su mayor capacidad para reclamarlos, aunque se establezcan al mismo tiempo relaciones de competencia entre ellos. La acumulación de metabolitos en los frutos y las relaciones hídricas establecidas entre ellos son determinantes en la mejora de su tamaño final.

En este sentido, el fundamento del aclareo es aumentar la relación hoja/fruto, o lo que es lo mismo, la relación fuente/sumidero, obteniendo estos últimos una mayor disponibilidad de carbohidratos procedentes de las hojas maduras, si bien el crecimiento de los frutos no es directamente proporcional al incremento del número de hojas (Westwood, 1982). Dicho de otra forma, los fenómenos de competencia son responsables de la relación inversa encontrada entre el número de frutos por árbol y el tamaño final de éstos (Agustí, 2004).

3.3 Control hormonal

Los factores hormonales regulan el crecimiento del fruto en todas las fases de su desarrollo influyendo notablemente en la capacidad sumidero del fruto.

En las fases I y II (Fig.4), las giberelinas sintetizadas en la semilla regulan el cuajado y el crecimiento del fruto. Éstas confieren al fruto capacidad sumidero, atrayendo carbohidratos y, por tanto, agua. El mecanismo de atracción de carbohidratos se produce a partir de la semilla, la cual acumula almidón en el endospermo, e indirectamente el fruto se nutre de estos carbohidratos y crece. En la fase I metabolizándolos y extrayendo la energía acumulada en los enlaces C-C para permitir la división celular, en la fase II acumulándolos y reclamando, con ello, agua,. Es por ello que existe una relación positiva entre el número de semillas y el tamaño del fruto.

En la fase III (fig.4), las auxinas aumentan su concentración entre los estados 706 y 709 de la escala BBCH (Reig *et al.*, 2015), coincidiendo con la fase de crecimiento exponencial descrita por Blumenfeld (1980). El crecimiento exponencial del fruto está relacionado con la expansión celular, y es atribuida al efecto de las auxinas. Más precisamente es el ácido 3-indolacético (IAA) el principal regulador del crecimiento del fruto y su acción en la expansión se apoya en la Hipótesis Ácida del Crecimiento (Rayle y Cleland, 1970).

En la maduración, al declinar la concentración de auxinas, la concentración de etileno (C₂H₄) aumenta, aunque carece (en parte) de relevancia al considerarse el níspero un fruto no climatérico. Durante este proceso la síntesis de carotenoides está asociada al cambio de color del fruto y el producto final de síntesis de esta ruta es el ácido abscísico (ABA), el cual aumenta de forma exponencial en la fase de maduración del fruto. Por tanto, la producción de ABA aumenta paralelamente a la de etileno (Ding y Zhang, 1988; Ye, 1988).

4. TÉCNICAS AGRONÓMICAS PARA AUMENTAR EL DESARROLLO DEL FRUTO

Como la mayoría de los frutos que se destinan a su consumo en fresco, uno de los parámetros de calidad más apreciado es su tamaño final.

Aunque el porcentaje de cuajado en esta especie es relativamente bajo, en torno al 10% (Goubran y El Zeftawi, 1986; Ateyyeh y Qrunfleh, 1998), el tamaño final alcanzado en la madurez no es comercialmente aceptable de acuerdo con la demanda del mercado. La razón de ello es la competencia por carbohidratos que se establece entre los frutos en crecimiento.

Por este motivo, se emplean técnicas agronómicas capaces de mejorar el tamaño final del fruto de níspero japonés. Estas técnicas pueden ser indirectas, a través de una reducción del número de frutos mediante el aclareo, o directas, mejorando la disponibilidad de carbohidratos con el rayado de ramas o aumentando la capacidad sumidero de los frutos mediante la aplicación de auxinas de síntesis.

4.1 Técnicas indirectas de mejora del tamaño del fruto

4.1.1 Aclareo

El aclareo consiste en la eliminación de un número determinado de frutos para que los frutos que permanecen en el árbol alcancen un tamaño mayor. Ello conlleva una menor competencia por carbohidratos entre los frutos que han iniciado su desarrollo incidiendo indirectamente sobre el tamaño final del fruto. De esta forma se obtienen menos frutos, pero de una calidad mayor y más homogéneos. Además, el aclareo se practica para anticipar la coloración del fruto.

Con esta técnica, el tamaño obtenido depende significativamente del número de frutos que se dejen por panícula, siendo lo común dejar entre 2 y 4 frutos. De hecho, en el momento del cambio de color del fruto, el fruto de las panículas aclaradas a 3 frutos por panícula crece 2 veces más rápido que el de panículas no aclaradas (9 frutos por panícula, por término medio) (Gariglio *et al.*, 2003). El cambio en la concentración de azúcares en la pulpa del fruto se considera el factor responsable del aumento del tamaño.

El aclareo, en el caso del níspero, es posible realizarlo manual o químicamente. El aclareo manual se suele iniciar con la panícula en flor, eliminando, aproximadamente, la mitad de sus flores, o, lo que es más correcto, se pospone hasta que sea posible eliminar los frutos recién cuajados cuando éstos alcanzan 1 cm de diámetro, aunque ello supone una mayor inversión en mano de obra. En este tipo de aclareo, los frutos que se mantienen en el árbol suelen ser los mejores y los mejor situados dentro de la panícula.

Para el aclareo químico se utiliza el ácido naftalenácetico (ANA). El momento de aplicación, la concentración y la formulación de la sustancia activa, son factores determinantes en la respuesta. Por lo general, aplicaciones de 20 mg l⁻¹ de ácido libre o de sal potásica de ANA cuando son visibles dos frutos por panícula (10-15 días después de la plena floración) producen buenos resultados, con lo que se reduce un 30% el número de frutos por panícula y su diámetro aumenta un 10% respecto de los no aclarados (Agustí *et al.*, 2000). La auxina impide la germinación del grano de polen o detiene (y hasta destruye) el crecimiento del tubo polínico impidiendo la fecundación de las flores que todavía no lo han sido y, por tanto, su cuajado (Reig *et al.*, 2014). Este tipo de aclareo es no selectivo, esto es, no puede sustituir la selección del fruto a eliminar que el aclareo manual garantiza.

4.2 Técnicas directas de mejora del tamaño del fruto

4.2.1 Rayado

La técnica del rayado consiste en la interrupción del transporte floemático desde las hojas hacia las raíces, consiguiendo con ello una mejora de la disponibilidad de los carbohidratos en los órganos de la parte superior del rayado, en este caso, los frutos. Con ello se consigue aumentar hasta en un 10% el diámetro de los frutos cuando se realiza al final de la fase I del desarrollo, es decir, cuando el fruto ha alcanzado el 20% de su tamaño final (Agustí *et al.*, 2005). Esta técnica es ampliamente conocida para muchos frutales, y se puede realizar hasta varias veces por año, para mejorar la floración e incluso para mejorar el cuajado, aunque no es el caso de este frutal. Si en lugar de hacer un corte fino de la corteza de la rama en toda su circunferencia se elimina un anillo completo de corteza, la técnica se conoce como anillado. A pesar de la diferencia

en la agresividad de ambos procedimientos, el anillado no mejora los resultados obtenidos con el rayado (Gariglio *et al.*, 2002).



Figura 5. Rayado de ramas. Anillado (izda.) y rayado fino (dcha). *Fuente:* Gariglio *et al.*, (2002)

El mecanismo por el que actúa el rayado, aunque es desconocido, se atribuye a la acumulación de carbohidratos en las ramas en la parte superior del corte efectuado (Wallerstein *et al.*, 1974), del contenido hormonal (Goren *et al.*, 1971) y en la expresión génica (Li *et al.*, 2003). Rivas *et al.* (2007) demostraron, para los cítricos, un estímulo de la actividad del PSII que provoca el incremento de la síntesis de carbohidratos en hojas de brotes con frutos.

Con ello se consigue un aumento en el tamaño final del fruto (Agustí *et al.*, 2005) y, por consiguiente, el aumento de la cosecha, no por el número de frutos, el cual queda estipulado durante el aclareo, sino por el incremento de su tamaño individual.

El rayado debe efectuarse entre los estados fenológicos 702 y 704 de la escala BBCH. Realizado de forma anticipada, aumenta el cuajado de los frutos, repercutiendo negativamente en la competencia por carbohidratos establecida entre los frutos, mientras que si la fase de engrosamiento celular está muy avanzada, se pierde eficacia.

4.2.2. Aplicación exógena de auxinas de síntesis

En la mayoría de los frutales, son las auxinas las hormonas que estimulan el desarrollo del fruto en su fase lineal del crecimiento. El mecanismo de acción de las auxinas es

diferente al descrito para el aclareo (reducción de la competencia) y para el rayado (acumulación de metabolitos).

La aplicación de auxinas exógenas induce el crecimiento del fruto confiriéndole la capacidad de atraer los asimilados (De Jong y Walton, 1989).

De otra parte, mediante la aplicación de auxinas, se produce una mayor expansión de las células una vez se ha completado la fase de división celular. Rayle y Cleland (1970) ya indicaron en su Hipótesis Ácida del Crecimiento que la auxina acidifica la pared celular promoviendo la expulsión de protones hacia el apoplasto. La reducción del pH por debajo de 5,5 que ello conlleva altera la actividad de las enzimas y la estabilidad de los enlaces de las paredes celulares, lo que facilita su relajación y extensión.

Esto es, la aplicación de auxinas al inicio del crecimiento rápido, no modifican el número de células sino su tamaño, aumentando su plasticidad al reducir la presión parietal y permitiendo una mayor acumulación de agua y solutos en las células. De hecho, el incremento de solutos en la vacuola celular crea un flujo osmótico que dirige la incorporación de agua a la vacuola, necesaria para la elongación de la célula vegetal (Taíz y Zeiger, 2002).

En el níspero, la mejor época de tratamiento se establece cuando el fruto ha alcanzado 12-15 mm de diámetro, esto es, en los estados 703 a 705 de la escala fenológica BBCH. Los tratamientos no afectan al número de frutos recolectados una vez superada la fase de aclareo, pero sí que inciden de manera directamente proporcional sobre la cosecha, al aumentar el peso unitario de cada uno de los frutos. Así mismo, la frecuencia en la distribución de los frutos, de acuerdo con su calibre comercial, se desplaza hacia rangos mayores (Agustí *et al.*, 2003).

En este trabajo, se estudia el mecanismo de acción del rayado de ramas y de las auxinas de síntesis sobre el desarrollo del fruto del níspero japonés, de acuerdo con la siguiente hipótesis de trabajo.

5. Hipótesis de trabajo

El rayado de ramas y las auxinas de síntesis aceleran el desarrollo del fruto y anticipan su entrada en color estando regulado el proceso por cambios en la concentración de ácido abscísico y *trans*-zeatina.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIAL VEGETAL

Los experimentos se han realizado durante la campaña 2014-2015, en una plantación comercial de níspero japonés (*Eriobotrya japonica* Lindl.), cv. Algerie, localizada en Callosa d'En Sarrià (Alicante, España, 38° 39' N, 0° 7' W), bajo condiciones normales de cultivo, con un marco de plantación de 4 x 5 m y en óptimo estado fitosanitario.

Los árboles adultos, de 20-25 años de edad, estaban injertados sobre patrón franco, podados en vaso, y aclarados químicamente en el momento del cuajado (609 BBCH) y repasados manualmente después (701 BBCH) hasta tres frutos por panícula.

2. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se seleccionaron 24 árboles de volumen de copa similar, a los que se les aplicaron 6 tratamientos distintos, cada uno de ellos en 4 árboles diferentes, cuando los frutos tenían entre el 20 y el 30% de su tamaño final, es decir, entre los estados 702 y 703 de la escala BBCH.

Los tratamientos realizados fueron:

- 1) Control.
- 2) Rayado de ramas.
- 3) 3,5,6-TPA (ácido 3,5,6-tricloro-2-piridiloxiacético) a una concentración de 15 ppm.
- 4) 2,4-DP (éster etilhexil del ácido 2,4-diclorofenoxipropiónico) a una concentración de 37,5 ppm.
- 5) 3,5,6-TPA a 15 ppm + Rayado de ramas.
- 6) Mezcla de ambas auxinas (3,5,6-TPA a 15 ppm y 2,4-DP a 37,5 ppm).

El rayado de ramas se realizó en ramas secundarias con ayuda de unas tijeras de rayar, mientras que las auxinas se aplicaron foliarmente con tanque a presión de 25 atmósferas, al que se le añadió un tensoactivo.

Periódicamente, se les midió el diámetro a 20 frutos de cada árbol a lo largo de su crecimiento, seleccionados cada vez completamente al azar. Para ello se empleó un pie de rey digital de precisión 0,01 mm (Mitutoyo, Tokyo). Paralelamente en las mismas fechas, se muestrearon frutos en diferentes estados fenológicos con un diámetro coincidente con el de la media de cada tratamiento, para su posterior análisis hormonal y de carbohidratos. En el laboratorio se separó la piel y la pulpa de las semillas y se congeló para su posterior análisis.

3. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

3.1 Parámetros de maduración.

Se tomaron 70 frutos en el momento de la recolección, a los que se les midieron tanto los parámetros de maduración interna (sólidos solubles totales (SST) y acidez libre (A)), como los de maduración externa (color).

Para el análisis de SST se utilizó un refractómetro digital (Atago, Tokyo). La acidez se determinó mediante una valoración con NaOH 0,1 N, utilizando fenolftaleína 0,1% como indicador, y el color se determinó mediante un colorímetro digital Minolta Chroma Meter (Minolta, Tokyo), para determinar las coordenadas Hunter (a, b y L).

También se midió el calibre de los frutos recolectados utilizando un pie de rey y se clasificaron por categorías comerciales, de acuerdo con las Normas de calidad para frutas y hortalizas (MAPA, 1995) en cuatro categorías: GGG (>53 mm), GG (46-52 mm), G (39-45 mm) y M (32-38 mm).

3.2 Análisis de azúcares.

El análisis de azúcares solubles se realizó según el protocolo de Eshghi *et al.* (2007) con ciertas modificaciones. A partir de las muestras liofilizadas y trituradas de frutos, se tomaron alícuotas por duplicado de cada una (100 mg) y se introdujeron en tubos de

centrífuga debidamente etiquetados a los que se añadió 5 ml de Petroleum ether (40-60°). Los tubos fueron centrifugados (4000 rpm. 4°C, 7 min) y el extracto de Petroleum, conteniendo los lípidos, clorofilas y otros contaminantes, fue eliminado mediante pipeteo cuidadoso; a la muestra restante se añadió 100 µl de manitol, un azúcar no existente en los tejidos vegetales y que se usa como estándar para cuantificar las pérdidas del resto de azúcares durante el proceso de extracción y purificación de los mismos, y posteriormente se realizaron dos extracciones sucesivas con etanol 80% (v/v): las muestras con el etanol se mantuvieron en baño a 65°C durante 20 min y se centrifugaron (4000 rpm. 4°C, 7 min) retirando el sobrenadante; en la fase sólida restante se realizó una re-extracción y posteriormente se juntaron ambos sobrenadantes que se llevaron a sequedad en Speed Vac Concentrator (Savant®).

Se añadieron 4 ml de agua Milli-Q al residuo seco para la dilución de los azúcares. Para homogeneizarlo, la dilución se mantuvo en el baño 20 minutos con sucesivas pasadas de vórtex. Se añadió 20-30 mg de Activated Charcoal a las muestras y posteriormente se centrifugaron (4000 rpm. 4°C, 10 min). El sobrenadante se recogió y se filtró a través de filtros de nylon 0,45 µm. Las muestras se llevaron a sequedad en Speed Vac.

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

3.3. Análisis hormonal.

Las muestras recogidas en el campo se conservaron congeladas y posteriormente se liofilizaron. Una vez liofilizadas, las muestras fueron trituradas hasta polvo fino.

Para la extracción hormonal, alícuotas duplicadas de cada muestra (50 mg) fueron extraídas con metanol 80%: ácido acético 1% (v/v) en presencia de diferentes estándares internos (hormonas marcadas con deuterio para cuantificar las pérdidas de cada hormona inherentes al proceso de extracción [OIChemim Ltd - Olomouc, o Cambridge Isotope Lab - Andover]: [²H₅]-IAA y [²H₆]-ABA). Estos estándares fueron añadidos

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

Para recuperar la fracción ácida donde se localizan los IAA y ABA, los extractos pasaron consecutivamente a través de columnas HLB en fase reversa, MCX (intercambio catiónico) y WAX (intercambio iónico) (Oasis 30 mg. Waters) como se describe en Seo *et al.* (2011). Para la recuperación de la fracción básica, donde se localizan las citoquininas, las muestras pasaron en primer lugar a través de un cartucho HLB (elución CH₃CN80: Ácido acético 1%) y a continuación a través de una columna MCX. Las muestras se llevaron a sequedad en rotovapor.

El residuo seco fue disuelto en acetonitrilo al 5% y ácido acético al 1% y las hormonas fueron separadas usando ultra-cromatografía en fase reversa (UPHL) mediante una columna RP-MS Accucore 2,6 μm (50 mm x 2,1 i.d.: Thermo Fisher Scientific) con un gradiente de acetonitrilo del 5 al 50%, tras lo cual fueron detectadas y analizadas en un espectrómetro masas/masas (Q-exactive Orbitrap detector, Thermo Fisher Scientific). Las concentraciones hormonales finales de los extractos fueron determinadas usando las curvas de calibración realizadas previamente. La interpretación de los resultados se realizó mediante los programas Xcalibur 2.2 SP1 y TraceFinder.

3.4 Análisis estadístico.

El análisis estadístico, fue llevado a cabo aplicando el análisis de la varianza multifactorial, con un nivel de confianza $P \leq 0,05$, usando el test de múltiples rangos LSD para la comparación de medias. También se realizaron contrastes de homogeneidad mediante la prueba Chi-cuadrado, con un nivel de confianza $P \leq 0,05$.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. INFLUENCIA DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE EL CRECIMIENTO DEL FRUTO Y SU MADURACIÓN.

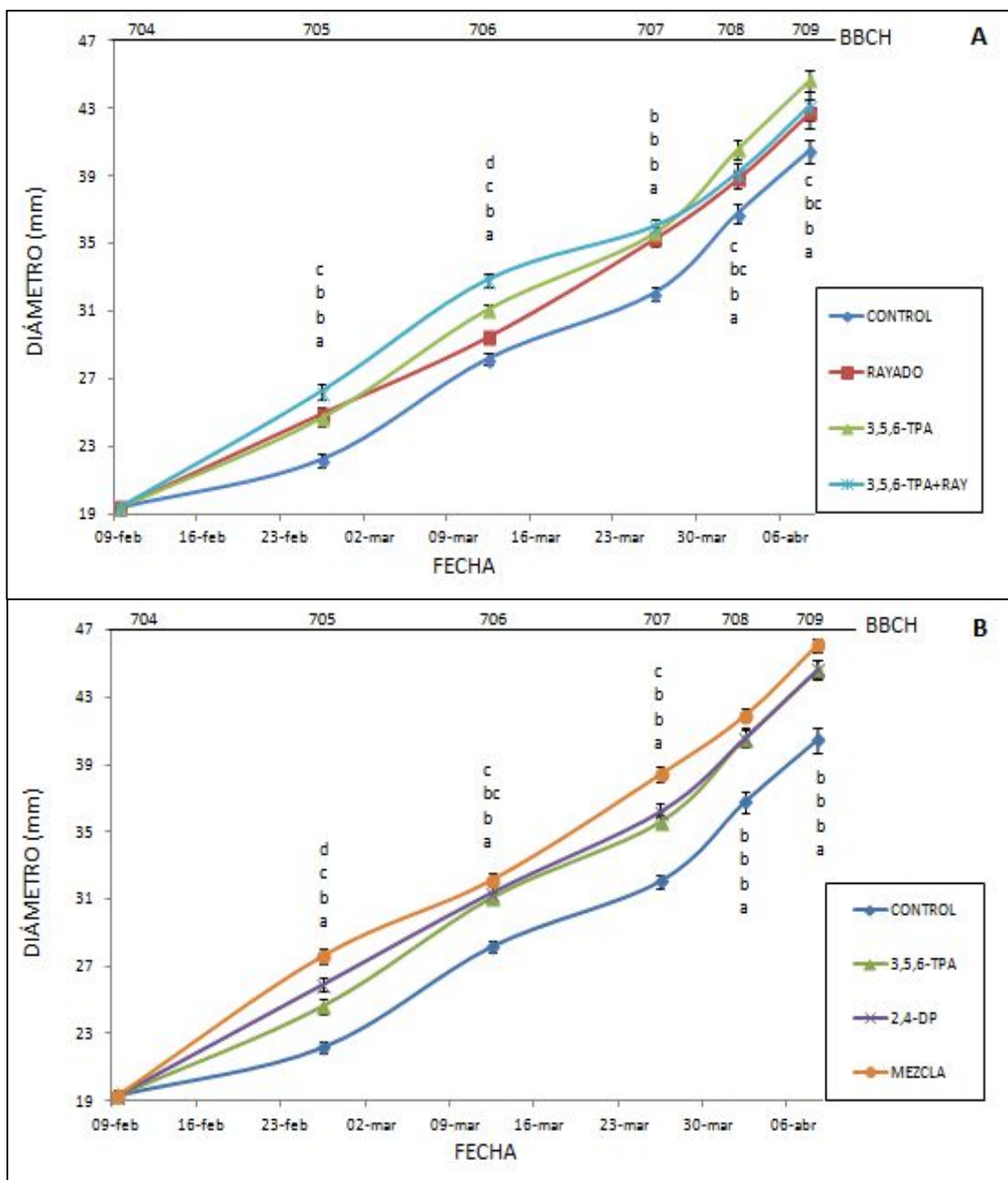


Figura 6. Influencia del rayado de ramas con o sin la aplicación de 3,5,6-TPA (A) y de la aplicación de 2,4-DP, 3,5,6-TPA, y de su mezcla (B) en el tamaño del fruto. Cada valor es la media de 80 frutos repartidos en 4 árboles. Las barras verticales indican el error estándar. El eje superior representa los estados fenológicos según la escala BBCH. Letras distintas para una misma fecha indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$).

El rayado de ramas y la aplicación de 3,5,6-TPA cuando el fruto tenía el 40% de su tamaño final (704 BBCH), esto es, 19 mm de diámetro, consiguió aumentar significativamente su tamaño final respecto del control. Así, mientras los primeros alcanzaron un diámetro final de 42,7 mm respecto de los 40,4 mm que tenía el control, los segundos llegaron a alcanzar un diámetro significativamente mayor (44,6 mm). Sin embargo, la suma de ambos tratamientos no consiguió mejorar la respuesta ya que los frutos alcanzaron un tamaño final intermedio ($\varnothing = 43,1$ mm) que no difirió de los tratamientos individuales a pesar de hacerlo en las primeras fases del desarrollo (Fig. 6A).

La respuesta fue inmediata y a los 15 días después del tratamiento (705 BBCH) ya se encontraron diferencias significativas respecto del control. Así, mientras el rayado y el 3,5,6-TPA aumentaron un 12 y un 11 % el diámetro del fruto respectivamente, la mezcla de ambos tratamientos lo hizo en un 18 %.

Esta tendencia se mantuvo prácticamente hasta los 45 días después del tratamiento (707 BBCH) en los que la respuesta fue idéntica para los 3 tratamientos que consiguieron incrementar en 3,21 mm (rayado), 3,55 mm (3,5,6-TPA) y 3,98 mm (mezcla) el diámetro del fruto respecto del control. Sin embargo, 7 días después y hasta el final del experimento, sólo la auxina consiguió mantener la cinética de crecimiento y los frutos fueron significativamente más grandes (44,6 mm) que los de la mezcla y del rayado que no difirieron entre sí (43,1 y 42,7 mm respectivamente), pero que fueron a su vez más grandes que los del control (40,4 mm) (Fig. 6A).

Estos resultados coinciden con los de otros autores en otras especies, así por ejemplo el rayado de ramas también consiguió aumentar el tamaño de los frutos en cítricos (Furr *et al.*, 1945), cerezos y ciruelos (Agustí *et al.*, 1997), y melocotoneros y nectarina (Agustí *et al.*, 1998). También en el níspero esta técnica aumenta el diámetro medio de los frutos en 3 mm cuando son rayados entre los estados 702-704 de la escala BBCH, esto es, al inicio de la expansión celular (Agustí *et al.*, 2005).

Algo parecido se observó al comparar el efecto de las distintas auxinas de síntesis. En este caso, la respuesta también fue inmediata y a los 15 días después del tratamiento,

todas consiguieron aumentar significativamente el diámetro del fruto respecto del control, difiriendo a su vez entre sí. Así, mientras el control tenía un diámetro de 22,18 mm, los tratados con 3,5,6-TPA, 2,4-DP y la mezcla de ambas lo tenían de 24,65 mm, 25,94 mm y 27,63 mm respectivamente (Fig. 6B). También en este caso, al igual que con el rayado (Fig.6A), el tratamiento más efectivo a los 15 días fue la mezcla de los 2 tratamientos, sin embargo, en ambos casos esta eficacia se igualó con la del resto de los tratamientos al final del estudio (709 BBCH) (Fig. 6). De hecho, a los 31 días del tratamiento (706 BBCH), la mezcla de las dos auxinas no mejoró la respuesta respecto de la aplicación del 2,4-DP y ambos consiguieron aumentar en un 14% y 11% el diámetro del fruto respecto del control (Fig. 6B).

Esta tendencia se mantuvo prácticamente estable hasta el final del periodo de estudio, cambiando ligeramente en el estado 707 BBCH en el que los frutos tratados con ambas auxinas consiguieron mantener la cinética de crecimiento y aumentar en más de 2 mm el diámetro respecto de los tratados con 3,5,6-TPA y 2,4-DP, que 7 días después éstos consiguieron retomar igualándose al primero y manteniéndose hasta el final (Fig. 6B).

Estos resultados coinciden con los observados por otros autores en los que la aplicación de 2,4-DP consiguió mejorar el diámetro de los frutos en cítricos (El-Otmani *et al.*, 1993; Agustí *et al.*, 1994), albaricoquero (Agustí *et al.*, 1997), incluso en níspero japonés (Agustí *et al.*, 2003).

Del mismo modo, la aplicación de 3,5,6-TPA también se muestra efectiva para mejorar el diámetro en cítricos (Agustí *et al.*, 2001), e incluso en lichi (Stern *et al.*, 2000), en todos ellos en la segunda fase del desarrollo del fruto.

Es de destacar que aunque tanto el rayado como las auxinas de síntesis consiguieron aumentar el diámetro final del fruto respecto del control, las últimas se mostraron más eficaces, independientemente de la auxina, ya que consiguieron un diámetro medio de 45,1 mm frente a los 42,7 mm del rayado (Fig.6). El mayor diámetro alcanzado por el 3,5,6-TPA (44,64 mm) frente al rayado (42,7 mm) así lo ratifica (Fig.6A). Esto indica que el mecanismo de acción de ambos tratamientos, rayado de ramas y auxinas de síntesis, es diferente. Estos resultados también coinciden con los aportados por otros autores que atribuyen a las auxinas un efecto directo sobre la extensibilidad de la pared celular a través de su acidificación y excreción de protones al apoplasto que le permite captar más agua y solutos (El-Otmani *et al.*, 1993) y al rayado un efecto directo

nutricional, a través de la acumulación de carbohidratos (Goldschmidt *et al.*, 1985; Wallerstein *et al.*, 1974), hormonal (Goren *et al.*, 1971; Wallerstein *et al.*, 1973) e incluso genético (Li *et al.*, 2003). Es más, también en el níspero japonés Molina *et al.* (2014) observaron algo similar.

El efecto de las auxinas en la cinética de crecimiento de los frutos tuvo un efecto directo en la maduración anticipando el cambio de color del fruto. En coherencia con lo observado en la Fig. 6, los frutos que alcanzaron antes el máximo tamaño, es decir, completaron antes su desarrollo, iniciaron antes el cambio de color. Así, mientras la relación a/b del control fue -0,5, la de los tratados fue significativamente menor (-0,3 de media) independientemente de la auxina utilizada (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto de las auxinas sobre la coloración del fruto 13 días antes de la recolección. Los datos son las medias \pm ES de las coordenadas a y b de Hunter de 20 frutos repartidos en 4 árboles completamente al azar. Distintas letras para cada columna indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$).

	COLOR		
	a	b	a/b
CONTROL	-15,3 \pm 0,2a	29,3 \pm 1 a	-0,5 a
3,5,6-TPA	-14,2 \pm 0,5 ab	38,1 \pm 1,1 b	-0,4 b
2,4-DP	-11,8 \pm 1,2 b	39,7 \pm 1,3 bc	-0,3 b
MEZCLA AUXINAS	-8,7 \pm 1,7 c	42,3 \pm 1,3 c	-0,2 c

También en este caso la mezcla de auxinas consiguió mejores resultados en la coloración (a: -8,7 y b: 42,3) al igual que lo hizo el diámetro (46,1 mm, ver Fig.6B) respecto del control (a: -15,3 y b: 29,3) y del resto de auxinas: 3,5,6-TPA (a: -14,2 y b: 38,1) y 2,4-DP (a: -11,8 y b: 39,7).

Es importante destacar que en esta fecha los frutos tratados independientemente de la auxina ya habían alcanzado el diámetro que 6 días más tarde alcanzaría el control (Fig.

6B) y consecuentemente habían iniciado antes el cambio de color como se demuestra en la Tabla 1.

Este efecto también modificó significativamente la cosecha en cuanto a su distribución. Así, mientras en el control sólo se recolectaron el 36,2% de los frutos entre el primer y segundo pase, en los tratados se recolectaron el 57,5%, 64,7% y 69,6%, para el 3,5,6-TPA, 2,4-DP, y la mezcla respectivamente (Fig.7). También el rayado y su mezcla con el 3,5,6-TPA consiguieron aumentar este porcentaje (64% y 64,4% respectivamente) respecto del control, pero sin diferir de las auxinas. Por el contrario, en las recolecciones siguientes (3ª y 4ª), el porcentaje de frutos recolectados fue superior en el control (63,8%) que en los tratados que fue de media 36,1% (Fig. 7). Estos resultados indican la precocidad conseguida por efecto de las auxinas que claramente modificaron la distribución temporal de la cosecha y concuerdan perfectamente con los observados en cuanto al aumento del tamaño final del fruto, cinética de crecimiento y anticipación del cambio de color.

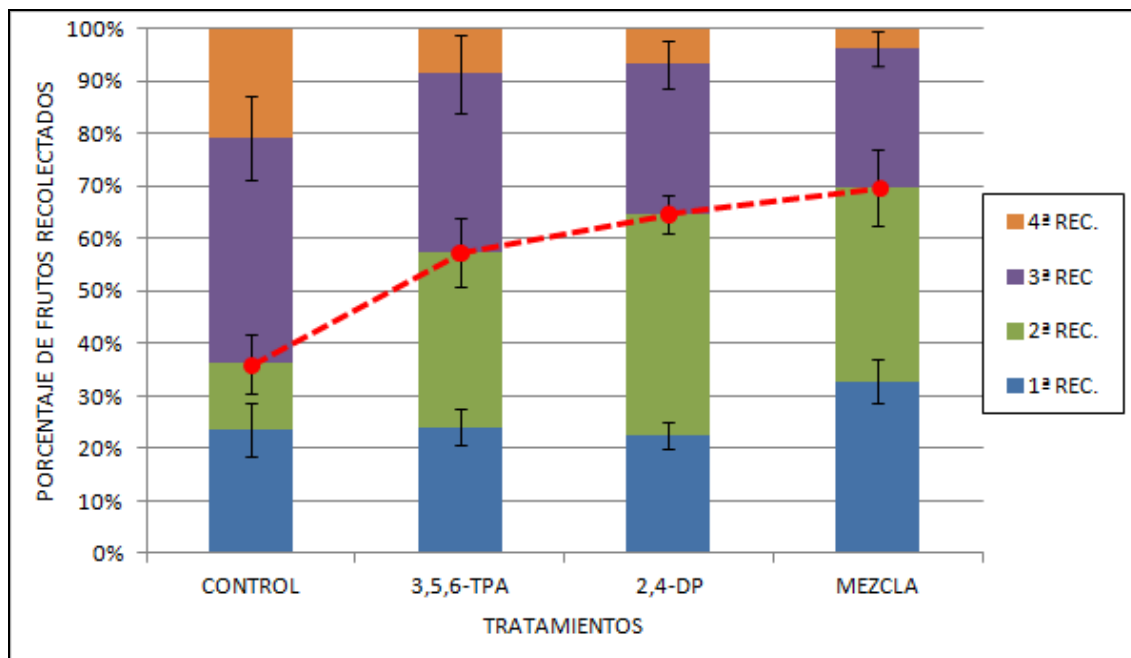


Figura 7. Distribución del porcentaje de cosechas para los distintos tratamientos. Los errores estándar aparecen como barras verticales. Cada valor representa los kg recolectados para cada fecha, en porcentaje, respecto de la cosecha total obtenida para los árboles de cada tratamiento.

También Agustí *et al.* (2003) consiguieron anticipar la recolección del níspero japonés mediante la aplicación de 2,4-DP al igual que Amorós *et al.* (2004) en esta misma especie mediante ANA y Fenotiol. Respecto al 3,5,6-TPA también consiguió aumentar el porcentaje de frutos recolectados en la primera cosecha para cultivares tempranos de melocotonero (Agustí *et al.*, 1999) perdiéndose su efecto, sin embargo, para cultivares tardíos de esta misma especie. Algo más confusos son los resultados obtenidos en cereza (Stern *et al.*, 2007).

Los resultados obtenidos anteriormente (Fig. 6) también se reflejaron en la distribución de los calibres comerciales ya que los tratamientos consiguieron modificarla significativamente. Así, el porcentaje de frutos de menor tamaño (M) fue significativamente superior en los controles, independientemente del tratamiento utilizado (ver Anejo B), paralelamente a un menor porcentaje de frutos de mayor tamaño (GG) (Fig. 8). De esta manera, mientras en el control sólo un 46% de los frutos alcanzaron un calibre (GG), en los rayados y en los tratados con 3,5,6-TPA lo hicieron un 60% y 49% respectivamente (Fig. 8A). Sin embargo, coherentemente con lo observado en la Fig.6, este efecto fue mayor al compararlo con las otras auxinas. En este caso, el porcentaje de frutos que alcanzaron el calibre (GG) fue un 69% para el 2,4-DP y un 73% para la mezcla de ambas auxinas, si bien, en todos los casos se encontraron frutos con el mayor calibre (GGG) (Fig. 8B). En este sentido fue el 2,4-DP el que mayor porcentaje de frutos (GGG) obtuvo con cerca del 8% respecto del resto de auxinas y del control que fue del 5% y 6% respectivamente.

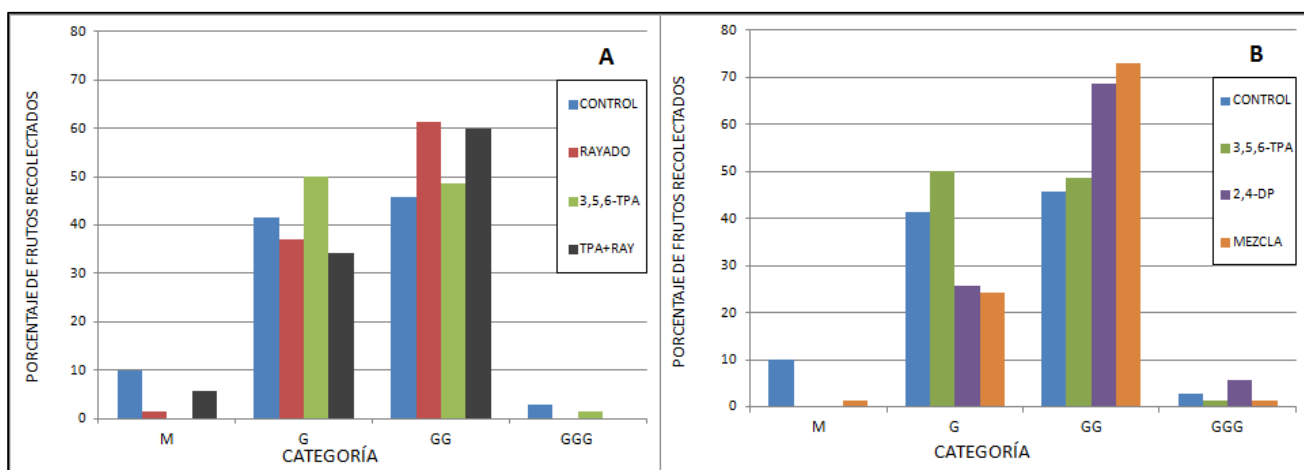


Figura 8. Distribución del calibre de los frutos recolectados según los diámetros comerciales de los frutos (M.A.P.A., 1995) para el rayado con y sin la aplicación de 3,5,6-TPA (A), y para el 2,4-DP, el 3,5,6-TPA y su mezcla (B). Cada valor representa el porcentaje de 70 frutos por tratamiento, muestreados en el momento de la recolección.

Teniendo en cuenta que los frutos destinados a la exportación deben tener un calibre GG o superior (≥ 46 mm), el efecto de los tratamientos aumentando el porcentaje de los frutos con estos calibres resalta su importancia. De este modo, se recolectaron un 74% para los tratados con 2,4-DP o con la mezcla de auxinas, un 60% para los sólo rayados o junto con el 3,5,6-TPA y un 48,5% para los controles.

A la vista de esto parece que es el 2,4-DP el tratamiento más eficaz en la mejora de los calibres, obteniendo hasta un 5,7% de frutos de mayor calibre (GGG) (Anejo B). Estos resultados coinciden con los de Agustí *et al.* (2003), que con aplicación de 2,4-DP en el estado 703 de la escala BBCH consiguieron aumentar en un 26% el porcentaje de frutos con mayor calibre (GGG) respecto del control en esta misma especie. Por otra parte se deduce que la acción de la mezcla de auxinas, se atribuye al 2,4-DP en el aumento del calibre, al no observarse diferencias significativas con éste y sí con el 3,5,6-TPA. El efecto de esta última se ha estudiado en mandarina ‘Clausellina’ obteniéndose un aumento en el tamaño del fruto, que podría ser consecuencia indirecta de la reducción de la competencia entre frutos por el aclareo (Agustí *et al.*, 1994; Aranguren *et al.*, 2011), lo cual no sucede en esta especie. También se ha visto una mejora del tamaño del fruto en el pomelo ‘Marsh’ y naranjo ‘Valencia’ (Aranguren *et al.*, 2011).

Nuestros resultados también coinciden con los de Agustí *et al.* (2005), que mediante el rayado de ramas en el estado 703 de la escala BBCH aumentaron el diámetro final de los frutos en la cosecha y modificaron la frecuencia de los diámetros comerciales.

Estas diferencias apenas se reflejaron en las características de maduración de los frutos, ya que, independientemente del tratamiento, todos alcanzaron en el momento de la recolección valores similares de SST (12 grados Brix por término medio), de coloración ($a/b=0,3$) y de acidez (1,2% por término medio) (Tabla 2).

Tabla 2. Influencia de los tratamientos en los parámetros de maduración externa (color) e interna (acidez y SST) del fruto en el momento de la recolección. Los valores son la media de 24 frutos \pm ES. * El color está representado como el cociente de las coordenadas a y b de Hunter.

	Acidez (%)	SST (° Brix)	Hunter-color (a/b)
CONTROL	1,1 \pm 0,95	12 \pm 0,3	0,3 \pm 0,05
RAYADO	1,2 \pm 0,72	11,8 \pm 0,4	0,3 \pm 0,05
3,5,6 TPA	1,2 \pm 0,65	12,3 \pm 0,6	0,3 \pm 0,05
2,4-DP	1,2 \pm 1,01	11,7 \pm 0,5	0,3 \pm 0,04
TPA+RAYADO	1,4 \pm 0,94	12,2 \pm 0,3	0,3 \pm 0,05
MEZCLA	1,3 \pm 0,55	12 \pm 0,6	0,3 \pm 0,05

Esto se debe a que estos parámetros se midieron en frutos maduros y, por tanto, recolectados bajo las mismas condiciones y el mismo criterio establecido fundamentalmente por el cambio de color del fruto, que subjetivamente determina el momento óptimo.

Así, y en consonancia con lo que apuntan Amorós *et al.* (2004), los parámetros de maduración del fruto en el momento de la recolección apenas varían, mientras que el peso final del fruto sí.

2. EVOLUCIÓN DEL CONTENIDO DE AZÚCARES EN EL FRUTO Y SU CRECIMIENTO

El contenido en azúcares reductores del fruto aumentó de 17 a 151 mg g⁻¹ PS durante buena parte del periodo de crecimiento activo del fruto, desde el estado 704 al 708 de la escala BBCH, aumentando posteriormente 2.4 veces hasta el momento en que completó su tamaño (estado 709 BBCH) (Fig. 9A). Las auxinas 2,4-DP y 3,5,6-TPA apenas modificaron su concentración final, pero sí la velocidad de su absorción. Así, un mes después de su aplicación ambas habían aumentado 2 veces la concentración de azúcares reductores en el fruto (100 mg g⁻¹ PS, aproximadamente) respecto de los controles sin tratar, y en el estado 708 de la escala BBCH 1.3 veces (casi 200 mg g⁻¹ PS) (Fig. 9C y D).

La concentración de azúcares de transporte en el fruto, después de un descenso importante durante las primeras fases de su desarrollo, esto es, los estados 704-705 de la escala BBCH), descendió ligeramente hasta el estado fenológico 708 BBCH desde 63 a 56 mg g⁻¹ PS en los frutos control (Fig. 9A). En los frutos tratados con 3,5,6-TPA el descenso en el intervalo 704-705 de la escala BBCH del crecimiento también se dio, pero hasta el estado 708 BBCH aumentó 1.2 veces y luego se estabilizó (Fig. 9C). La evolución de estos azúcares en el caso de la aplicación de 2,4-DP fue marcadamente distinta, descendiendo su concentración hasta el estado fenológico 706 BBCH y aumentando posteriormente, siendo el mayor aumento entre los estados fenológicos 708 y 709 BBCH (Fig. 9D), no difiriendo estadísticamente la concentración entre ambas auxinas al final de periodo estudiado.

El rayado de ramas tampoco alteró la evolución de la concentración de los azúcares reductores en el fruto, pero sí la de los de transporte que descendió hasta valores próximos a 45 mg g⁻¹ PS en el estado fenológico 707 BBCH, incrementándose a continuación hasta más de 70 mg g⁻¹ PS en el estado 708 BBCH y descendiendo finalmente hasta 55 mg g⁻¹ PS al final del periodo de estudio (estado 709 BBCH) (Fig. 9B).

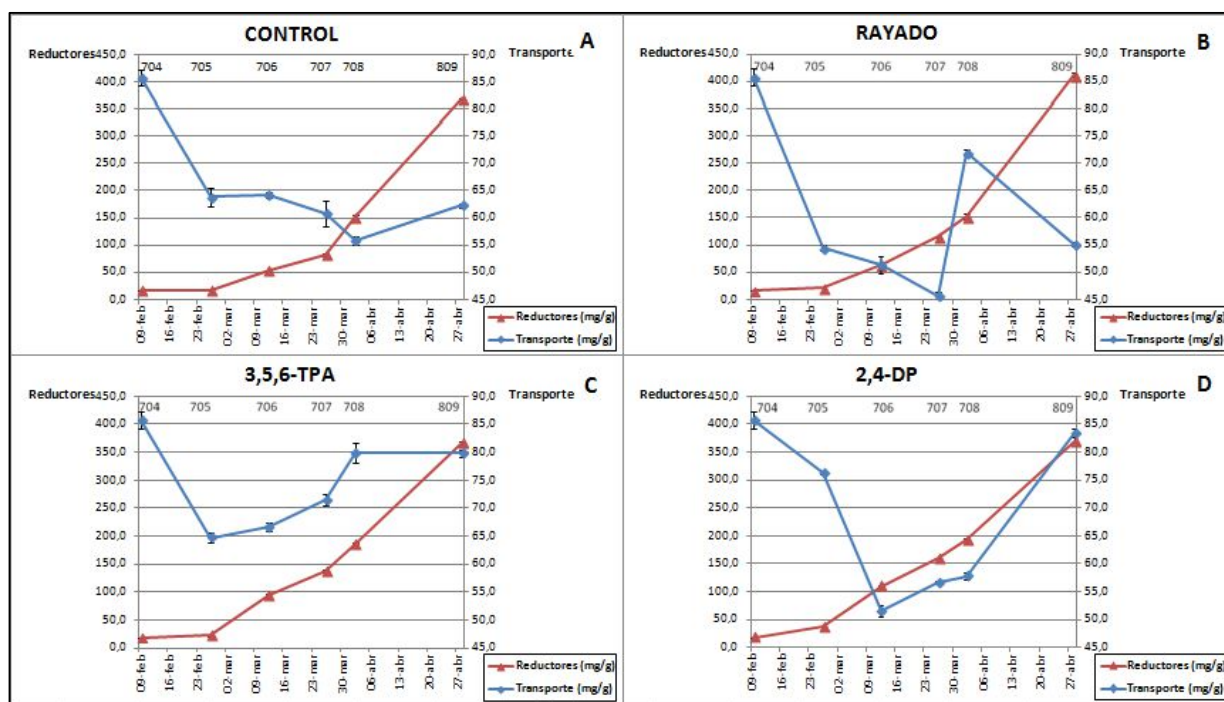


Figura 9. Influencia del rayado de ramas y de la aplicación de auxinas de síntesis sobre la evolución de la concentración de azúcares reductores y de transporte en los frutos de níspero japonés. Cada valor es la media de 4 repeticiones. El eje superior representa los estados fenológicos según la escala BBCH.

La evolución que se observa en los controles en los azúcares de transporte entre los estados fenológicos 704 y 708 BBCH ya fue observada por Reig *et al.* (2015) y es consecuencia de la competencia entre el desarrollo del fruto y el de la raíz (Atkinson, 1980). Es más, utilizando ^{13}C Reig *et al.* (2015) demostraron que ambos órganos compiten por carbohidratos y que solo cuando el fruto deja de crecer los carbohidratos se dirigen a la raíz. Un efecto semejante se ha demostrado para el melocotonero (Williamson y Coston, 1989). El ligero descenso de los carbohidratos de transporte en los frutos control es coherente con ello, pero el aumento en la concentración de los frutos tratados con 3,5,6-TPA pone en evidencia un incremento de su capacidad de crecimiento por acción de la auxina. Dado que el aumento de carbohidratos reductores es paralelo al aumento del tamaño del fruto (Gariglio *et al.*, 2003), la razón de que al fruto sigan llegando más azúcares de transporte podría ser el descenso de la presión parietal que las auxinas provocan como mecanismo de su acción sobre la capacidad de crecimiento de los órganos (Cleland, 2010). Este efecto ya fue demostrado para el 3,5,6-TPA en el níspero japonés por Molina (2014), si bien en etapas más avanzadas del

crecimiento. La acción del 2-4-DP es, en general, coincidente con ello. La diferencia en concentración de azúcares de transporte podría indicar una mayor actividad metabólica de reducción de éstos y consumo de azúcares reductores que redundaría en un tamaño final de los frutos, como así ocurre. La ausencia de diferencias significativas en la concentración de azúcares reductores a lo largo del periodo de crecimiento del fruto refuerza esta idea.

En el rayado de ramas solo la evolución de la concentración de azúcares reductores explica su efecto. También en este caso, ésta se incrementa a lo largo del periodo de crecimiento del fruto y alcanza un valor superior al de los frutos control. Con ello, en los frutales el color del fruto se anticipa (Goren *et al.*, 2003), como ya había sido demostrado para el níspero japonés (Agustí *et al.*, 2005).

El análisis individual de los azúcares de transporte revela que hasta el estado 706 de la escala BBCH la concentración de sorbitol fue significativamente mayor que la de sacarosa, con independencia del tratamiento (Fig. 10). Pero entre ellos también hubo diferencias significativas. Así, transcurridos 45 días desde el tratamiento, la concentración de este azúcar en los frutos control, sin tratar, fue significativamente la más elevada (52.9 mg g⁻¹ PS), y la de los frutos tratados con 2,4-DP (40.8 mg g⁻¹ PS) o de árboles rayados (36.8 mg g⁻¹ PS) la más baja (Fig. 10). Cuando el fruto tenía el 80% de su tamaño (estado 708 BBCH) los contenidos en ambos azúcares fueron muy similares para todos los tratamientos (27.1 - 33.6 mg g⁻¹ PS), excepto para los frutos control en los que la concentración de sorbitol seguía siendo significativamente superior (41.7 mg g⁻¹ PS). En el momento de la maduración plena (estado 809 BBCH) la concentración de sacarosa era significativamente superior a la de sorbitol con independencia del tratamiento (Fig. 10). En ese momento la concentración de sacarosa en los frutos tratados con 2,4-DP (70.0 mg g⁻¹ PS) era significativamente superior a la de los tratados con 3,5,6-TPA (62.4 mg g⁻¹ PS), y esta, a su vez, significativamente superior a la de los frutos control (48.0 mg g⁻¹ PS), lo que coincide con la separación de las medias de su tamaño final. Ello indica que en los últimos estados de desarrollo del fruto (desde el estado 708 en adelante), las concentraciones de ambos azúcares se invirtieron, siendo más elevada la de sacarosa que la de sorbitol, y también con independencia del tratamiento (Fig. 10). La tendencia de la concentración de sacarosa a incrementarse con el crecimiento del fruto ya se había demostrado en el níspero japonés (Gariglio *et al.*, 2008). Y la tendencia opuesta en la evolución de la concentración de

sacarosa y sorbitol ya fue demostrada en el fluido floemático del melocotonero (Reig *et al.*, 2006).

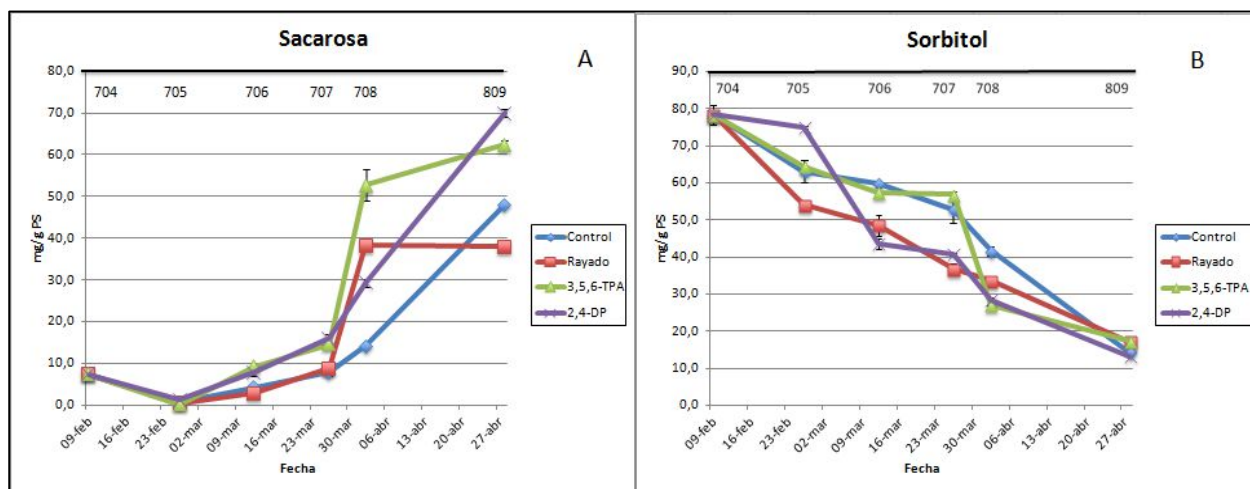


Figura 10. Influencia del rayado de ramas y de la aplicación de auxinas de síntesis sobre la evolución de la concentración de sacarosa (A) y sorbitol (B) en frutos de níspero japonés cv. Algerie. Cada valor es la media de 4 repeticiones. El eje superior representa los estados fenológicos según la escala BBCH.

Esta evolución inversa de las concentraciones de sacarosa y sorbitol indica un metabolismo más rápido de éste último que, a su vez, explica la mayor concentración de fructosa que de glucosa en el fruto (Fig. 11)

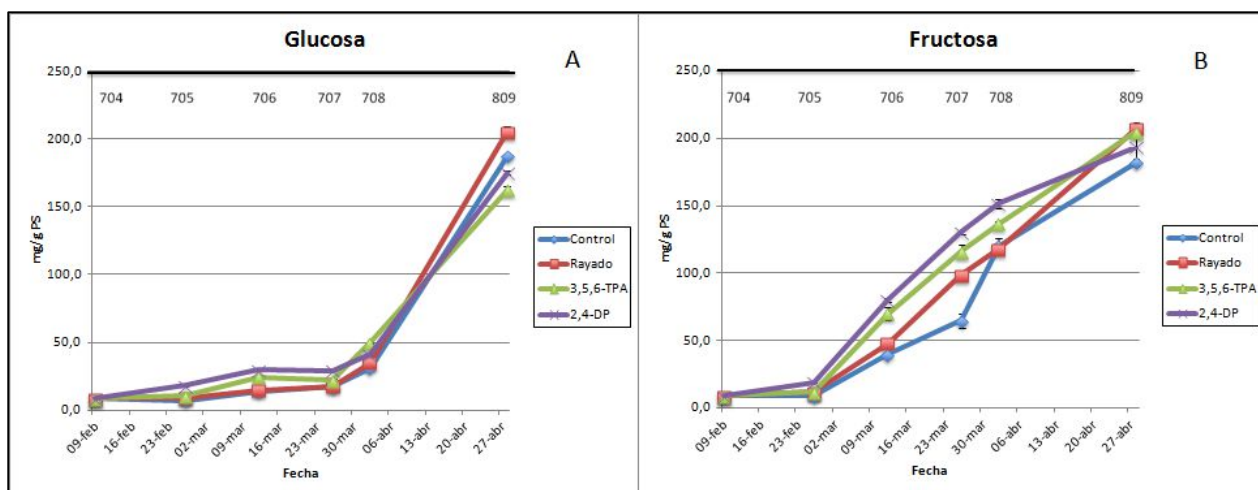


Figura 11. Influencia del rayado de ramas y de la aplicación de auxinas de síntesis sobre la evolución de la concentración de glucosa (A) y fructosa (B) en frutos de níspero japonés cv. Algerie. Cada valor es la media de 4 repeticiones. El eje superior representa los estados fenológicos según la escala BBCH.

El mayor contenido en fructosa, respecto de glucosa, durante la mayor parte del desarrollo del fruto se debe, por un lado, a la propia hidrólisis de la sacarosa, y, por otro, al metabolismo del sorbitol. La sacarosa, en el citoplasma, puede hidrolizarse mediante dos enzimas citosólicas, la invertasa y la sacarosa sintasa. La reacción catalizada por el primero rinde una molécula de glucosa y una de fructosa por cada una de sacarosa, mientras que la catalizada por el segundo rinde una molécula de UDP-glucosa y una de fructosa. La UDP-glucosa es un nucleótido precursor, entre otros, en la síntesis de polisacáridos estructurales, entre ellos la celulosa, y se utiliza para formar la pared celular. Por tanto, la hidrólisis de sacarosa en el citoplasma rinde mayor concentración de fructosa que de glucosa. El sorbitol, un azúcar alcohol de 6C, es oxidado a fructosa en el citoplasma mediante la acción del enzima sorbitol deshidrogenasa. El contenido en fructosa de las células en los frutos de las Rosáceas es, por tanto, mayor que el de glucosa.

De acuerdo con ello, el contenido en fructosa del fruto es un indicador de su estado de desarrollo y maduración. Así, la comparación de la concentración de fructosa entre tratamientos (Fig. 11) sigue un orden idéntico al del tamaño medio final del fruto como respuesta a los mismos. Y éste, a su vez, es idéntico al de maduración, medido tanto por su coloración como por el porcentaje de frutos recolectados en la primera recolección (ver Tabla 1 o Fig. 7). Cuanto mayor es la concentración de fructosa en el fruto mayor es su tamaño. Así, en pleno crecimiento del fruto, la concentración de fructosa de los frutos tratados con 2,4-DP ($130.5 \text{ mg g}^{-1} \text{ PS}$) es significativamente superior a la de los frutos tratados con 3,5,6-TPA ($116.1 \text{ mg g}^{-1} \text{ PS}$), y ésta, a su vez, significativamente superior a la de los frutos sin tratar ($64.9 \text{ mg g}^{-1} \text{ PS}$), y este orden se mantiene en el tamaño medio final de los frutos (ver Fig. 6). La concentración de los frutos de árboles rayados ocupa una posición intermedia, como lo hace el tamaño medio final de sus frutos.

Agustí *et al.* (2005) desarrollaron el rayado de ramas para anticipar la recolección del níspero japonés. La acción de las auxinas de síntesis anticipando la maduración del fruto ha sido demostrada para el 2,4-DP (Agustí *et al.*, 2003), pero no para el 3,5,6-TPA.

3. EVOLUCIÓN DEL CONTENIDO HORMONAL DEL FRUTO DURANTE SU CRECIMIENTO

Los tratamientos también alteraron el balance hormonal. El 2,4-DP anticipó el incremento de la concentración de ABA en aproximadamente 14 días respecto el resto de tratamientos (Fig. 12). El 3,5,6-TPA si bien anticipó el incremento de la síntesis de ABA respecto del control, el pico máximo no difirió de éste en fecha, pero sí en concentración. El rayado sin embargo, no lo anticipó pero al igual que el TPA lo incrementó en un 17 % (Fig. 12).

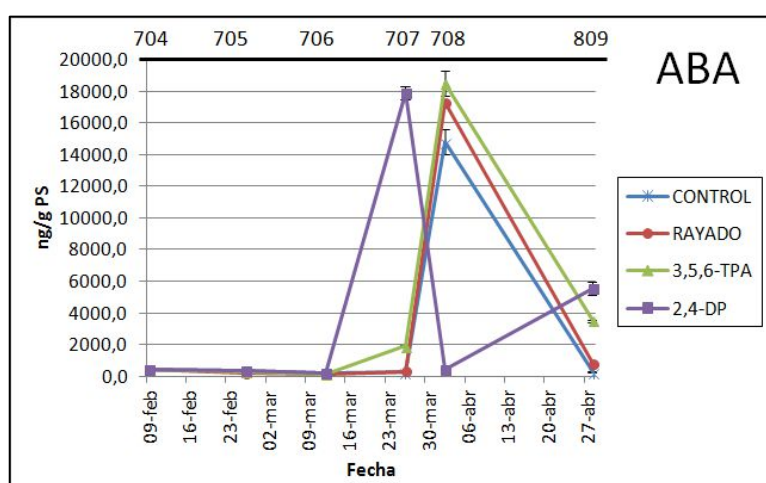


Figura 12. Evolución del contenido hormonal de ABA (ng g^{-1}) durante la fase lineal del crecimiento del fruto del níspero japonés. Las barras verticales indican el error estándar. El eje superior representa los estados fenológicos según la escala BBCH.

El efecto del 2,4-DP aumentando el tamaño final del fruto indica, implícitamente, una aceleración del crecimiento de modo que alcanzó antes su máximo tamaño y anticipó su entrada en color. Esto es coherente con el adelanto en la síntesis de ABA encontrada y coherente a su vez con el mayor porcentaje de frutos recolectados durante el primer y segundo pase (Fig. 7). El mayor contenido de ABA en los rayados y tratados con 3,5,6-TPA indica una coloración más intensa de los frutos, que justifica el mayor porcentaje de frutos recolectados primer y segundo pase.

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

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

La concentración de *trans*zeatina (Tz) también se vio modificada por los tratamientos. Así, mientras el control en el momento del cambio de color tenía 6,3 ng g⁻¹ PS, los rayados y tratados con 3,5,6-TPA tenían 3 y 1,9 ng g⁻¹ PS respectivamente (Fig. 13 A), alcanzando las diferencias con el control la significación estadística. En el níspero japonés la evolución de la Tz desciende con el desarrollo del fruto hasta valores próximos a cero en el momento del cambio de color del fruto, sugiriendo que puede estar implicada en el proceso (Reig *et al.*, 2015). De hecho, la aplicación de kinetina antes del cambio de color del fruto, retrasa significativamente su entrada en color (Lou *et al.*, 2012).

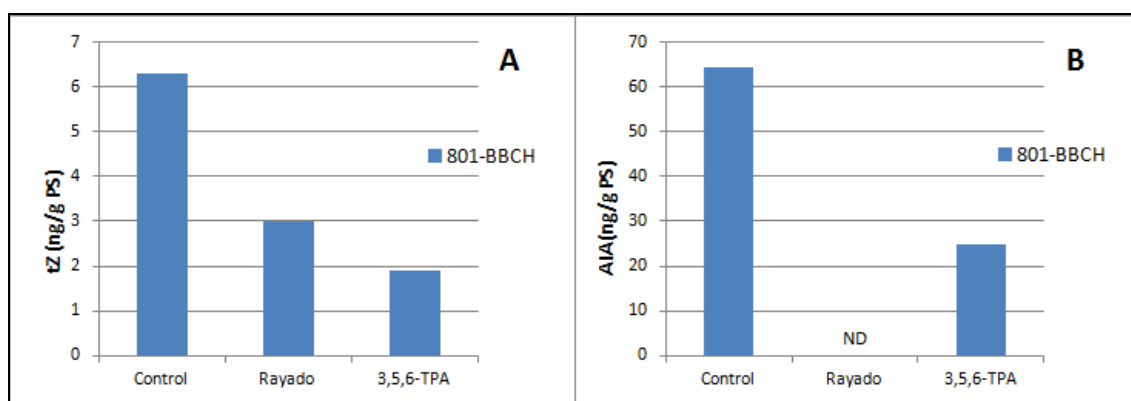


Figura 13. Diferencias en el contenido hormonal de *trans*-zeatina (A) y ácido indolacético (B) para el estado 801 de la escala BBCH. * ND (no determinado).

El papel de las citoquininas en la maduración del fruto se ha relacionado con su papel antisenescente (Richmond y Lang, 1957). Por lo tanto, un descenso en la concentración de citoquininas en el fruto hasta valores muy bajos, antes de que se inicie el proceso de la coloración, se ha sugerido como necesario para que el fruto cambie de color (Reig *et al.*, 2015).

La concentración de AIA en el momento del cambio de color de los frutos tratados con 3,5,6-TPA fue significativamente menor ($25 \text{ ng g}^{-1} \text{ PS}$) que el control, que fue de $64,5 \text{ ng g}^{-1} \text{ PS}$ (Fig. 13 B). En el níspero japonés, la concentración de AIA en el fruto, aumenta con el desarrollo de éste hasta que completa su crecimiento, descendiendo a continuación bruscamente con el cambio de color (Reig *et al.*, 2015). Nuestros resultados son coherentes con ello, y a su vez, con el mayor porcentaje de frutos recolectados.

El descenso antes del cambio de color es coherente con la baja concentración de auxina requerida para la coloración del fruto (Manning, 1993), lo cual es consistente con el efecto de la auxina, inhibiendo la expresión de los genes relacionados con la coloración del fruto (Manning, 1994). Se ha sugerido que el proceso de la coloración podría estar modulado por cambios en la síntesis y actividad de la auxina.

Por tanto, el descenso en la concentración de citoquininas y AIA podrían ser necesarios para permitir que el proceso de la coloración del fruto tenga lugar.

IV. CONCLUSIONES

A la vista de los resultados, el rayado de ramas y la aplicación de auxinas de síntesis en las primeras fases del desarrollo del níspero japonés:

- Aumentan el tamaño final del fruto modificando la distribución de los calibres comerciales.
- Aceleran el crecimiento del fruto anticipando su cambio de color, y por tanto, aumentando el porcentaje de frutos recolectados durante los primeros pases. Esto está relacionado directamente con un descenso de la *trans*-zeatina, y un aumento del ABA y de los carbohidratos.

BIBLIOGRAFÍA

AGUSTÍ, M. (2003) *Citricultura*. Ed. Mundi-Prensa, Madrid. Pp 422.

AGUSTÍ, M. (2004). *Fruticultura*. Ed. Mundi-Prensa, Madrid. Pp 493.

AGUSTÍ, M., ALMELA, V., AZNAR, M., EL-OTMANI, M. Y PONS, J. (1994). Satsuma Mandarin Fruit Size Increase by 2,4-DP. *HortScience*, 4: 279-281.

AGUSTÍ, M., ANDREU, I., JUAN, M., ALMELA, V., Y ZACARÍAS, L. (1998). Effects of ringing branches on fruit size and maturity of peach and nectarine cultivars. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 73: 537-540.

AGUSTÍ, M., GARIGLIO, N., CASTILLO, A., JUAN, M., ALMELA, V., MARTÍNEZ-FUENTES, A. Y MESEJO, C. (2003). Effect of the synthetic auxin 2,4-DP on fruit development of loquat. *Plant Growth Regulation*, 41: 129-132.

AGUSTÍ, M., GARIGLIO, N., JUAN, M., ALMELA, V., MESEJO, C. Y MARTÍNEZ-FUENTES, A. (2005). Effect of branch scoring on fruit development in loquat. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 80: 370-374.

AGUSTÍ, M., JUAN, M., ALMELA, V., ANDREU, I. Y SPERONI, C. (1997). *Estímulo del desarrollo de los frutos de hueso*. Consellería de Agricultura, Pesca y Alimentación. Valencia, España.

AGUSTÍ, M., JUAN, M., ALMELA, V., ANDREU, I. Y ZACARIAS, L. (1999). Synthetic auxin 3,5,6-TPA promotes fruit development and climacteric in *Prunus persica* L. Batsch. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 74: 556-560.

AGUSTÍ, M., JUAN, M., ALMELA, V. Y GARIGLIO, N. (2000). Loquat fruit size is increased through the thinning effect of Naphthaleneacetic acid. *Plant Growth Regulation*, 31: 167-171.

AGUSTÍ, M., JUAN, M., ALMELA, V., PRIMO-MILLO, E., TRENOR, I. Y ZARAGOZA, S. (1994). Effect of 3,5,6-trichloro-2-pyridyl-oxyacetic acid on fruit size and yield of 'Clausellina' mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 69, 219-223.

AGUSTÍ, M., ZARAGOZA, S., IGLESIAS, D., ALMELA, V., PRIMO-MILLO, E. Y TALÓN, M. (2001). The synthetic auxin 3,5,6-TPA stimulates carbohydrate accumulation and growth in citrus fruit. *Plant Growth Regulation*, 00: 1-7.

AMORÓS, A., ZAPATA, P., PRETEL, M.T., BOTELLA, M.A., ALMANSA, M.S. Y SERRANO, M. (2004). Role of Naphthaleneacetic acid and Phenothiol treatments on increasing fruit size and advancing fruit maturity in loquat. *Scientia Horticulturae*, 101: 387-398.

ARANGUREN, M., SOSA, G., MARTÍNEZ, I., RODRÍGUEZ, J. Y ALONSO, E. (2011). Effects of 3,5,6-TPA on size composition and fruit quality in Valencia orange and Marsh grapefruit in Jagüey Grande conditions. *Centro Agrícola*, 38: 85-90.

ATEYYEH, A.F., Y QRUNFLEH, M.M. (1998). Studies on the loquat *Eriobotrya japonica* Lindl cv. Tanaka. I. Vegetative and reproductive growth in the Jordan Valley. *Dirasat Agric. Sci.* 25 , 55-63.

ATKINSON, D. (1980). The distribution and effectiveness of the root of tree crops *Hortic Rev*, 2: 242-490.

BADENES, M.L., MARTÍNEZ-CALVO, J., LLÁCER, G. (2000). Analysis of a germoplasm collection of loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.). *Euphytica*, 114: 187-194.

BLUMENFELD, A. (1980). Fruit growth of loquat. *J. Amer. Soc. Hortic. Sci.*, 105: 747-750.

CABALLERO, P. Y FERNÁNDEZ, M.A. (2003). Loquat, production and market. En: Llácer, G. (ed.), Badenes, M.L. (ed.). *First international symposium on loquat*. Zaragoza: CIHEAM, 11-20.

CLELAND, R.E. (2010). Auxin and cell elongation. *Plant hormones*. pp 204-220.

CUEVAS, J., SALVADOR-SOLA, F., GAVILÁN, J., LORENTE, N., HUESO, J. Y GONZÁLEZ-PADIERNA, C. (2003). Loquat fruit sink strength and growth pattern. *Sci. Hortic.*, 98: 131-137.

DE JONG, T.M. Y WALTON, E.F. (1989). Carbohydrates requirement of peach fruit growth and respiration. *Tree physiology*, 5: 229-335.

DING, C.K. Y ZHANG H.Z. (1988) Effects of hormones on growth and development of loquat fruits. *Acta Hortic. Sinica*, 15: 148-153.

EL -OTMANI, M., AGUSTÍ, M., AZNAR, M. Y ALMELA, V. (1993). Improving the size of 'Fortune' mandarin fruits by the auxin 2,4-DP. *Scientia Horticulturae*, 55: 283-290.

ESHGHI, S., TAFAZOLI, E., DOKHANI, S., RAHEMI, M. Y EMAM, Y. (2007). Changes in carbohydrate contents in shoot tips, leaves and roots of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) during flower-bud differentiation. *Sci. Hortic.*, 113: 255–260.

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

GAMBETTA, G., MESEJO, C., MARTINEZ-FUENTES, A., REIG, C., GRAVINA, A., AGUSTÍ, M. (2014). Gibberellic acid and norflurazon affecting the time-course of flavedo pigment and abscisic acid content in 'Valencia' sweet orange. *Scientia Horticulturae*, 180: 94–101.

GARIGLIO, N., CASTILLO, A., JUAN, M., ALMELA, V. Y AGUSTÍ, M. (2002). *El níspero japonés. Técnicas para mejorar la calidad del fruto*. Generalitat Valenciana. Sèrie Divulgació Tècnica nº 52, Valencia, España, 61 pp.

GARIGLIO, N., CASTILLO, A., JUAN, M., ALMELA, V. Y AGUSTÍ, M. (2003). Effects of fruit thinning on fruit growth, sugars, and purple spot in loquat fruit (*Eriobotrya japonica* Lindl.). *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 78: 32-34.

GARIGLIO, N., REIG, C., MARTINEZ-FUENTES, A., MESEJO, C., AGUSTÍ, M. (2008). Purple spot in loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) is associated to changes in flesh-rind water relations during fruit development. *Scientia Horticulturae*, 119 (1): 55-58.

GOLDSCHMIDT, E.E., ASCHKENAZI, N., HERZANO, Y., SCHAFFER, A.A. AND MONSELISE, S.P. (1985). A role for carbohydrate levels in the control of flowering in citrus. *Sci. Hortic.*, 26: 159-166.

GOREN, R., GOLDSCHMIDT, E. Y MONSELISE, S.P. (1971). Hormonal balance in bark and leaves of 'Shamouti' orange trees (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) in relation to ringing. *Journal of Horticultural Science*, 46: 443-451.

GOREN, R., HUBERMAN, M., Y GOLDSCHMIDT, E.E. (2003). Girdling: Physiology and horticultural aspects. *Horticultural reviews*, 30: 1-36.

GOUBRAN, F.H. Y EL ZEFTAWI, B.M. (1986). Induction of seedless loquat. *Acta Horticulturae*, 179: 381-384.

LANDSBERG, J.J. (1980). Limits to apple yields imposed by weather. En: Opportunities for increasing crop yields. Hard R.G., Biscoe F.V. y Dennis C. (Eds.) Ed. Pittman, Londres, U.K., pp 161-180.

-
- LI, C.Y., WEISS, D. Y GOLDSCHMIDT, E.E. (2003). Girdling affects carbohydrates-related gene expression in leaves, bark and roots of alternate-bearing citrus trees. *Annals of Botany*, 92: 137-143.
- LIN, S., HUANG, X., CUEVAS, J. Y JANICK, J. (2007). Loquat: an ancient fruit crop with a promising future. *Chronica Horticulturae*, 47: 12-15.
- LIN, S., SHARPE, R.H. Y JANICK, J. (1999) Loquat: Botany and Horticulture. *Hort reviews* 23: 233-276.
- LOU, H., CHEN, P., ZHENG, H., XU, C., Y LU, H. (2012). Effect of kinetin on quality and harvest date of loquat fruit. *African Journal of Agricultural Research* Vol. 7(10), pp. 1577-1583
- Manning, K. (1993). Soft fruit. En: Seymour GB, Taylor JE, Tucker GA (eds) *Biochemistry of fruit ripening*. Chapman & Hall, London, pp 347-378.
- MANNING, K. (1994). Changes in gene expression during strawberry fruit ripening and their regulation by auxin. *Planta*, 194: 62-68.
- MINISTERIO DE AGRICULTURA, ALIMENTACIÓN Y MEDIO AMBIENTE. (2012) *Anuario de estadística*, Madrid.
- MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN (1995). *Normas de calidad para frutas y hortalizas*, Madrid.
- MOLINA, L. (2014). Control hormonal del desarrollo del fruto en el níspero japonés (*Eriobotrya japonica* Lindl.). (Tesis doctoral). Universitat Politècnica de València.
- RAYLE, D. Y CLELAND, L. (1970). Enhancement of wall loosening and elongation by acid solutions. *Plant Physiology.*, 46: 250-253.
- REIG, C., MESEJO, C., MARTÍNEZ-FUENTES, A., Y AGUSTÍ, M. (2014). Naphthaleneacetic acid impairs ovule fertilization and early embryo development in loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.). *Scientia Horticulturae* 165, 246-251.

REIG, C., MESEJO, C., MARTÍNEZ-FUENTES, A., MARTÍNEZ-ALCÁNTARA, B. Y AGUSTÍ, M. (2015). Loquat fruit ripening is associated with root depletion. Nutritional and hormonal control. *Journal of Plant Physiology*, 177: 51-59.

REIG, C., GONZÁLEZ-ROSSIA, D., JUAN, M. Y AGUSTÍ, M. (2006). Effects of fruit load on flower bud initiation and development in peach. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 81: 1079-1085.

RICHMOND, A.E. Y LANG, A. (1957). Effect of kinetin on protein content and survival of detached Xanthium leaves. *Science*, 125 (3249): 650-651.

RIVAS, F., GRAVINA, A. Y AGUSTÍ, M. (2007). Girdling effects on fruit set and quantum yield efficiency of PSII in two Citrus cultivars. *Tree physiology* 27, 527-535.

RODRIGO, M.J., MARCOS, J.F., ALFÉREZ, F., MALLENT, M.D. Y ZACARÍAS, L. (2003). Characterization of Pinalate, a novel Citrus sinensis mutant with a fruit specific alteration that results in yellow pigmentation and decreased ABA content. *Journal of Experimental Botany*, 54 (383): 727-738.

RODRIGUEZ, A. (1983). *El cultivo del níspero y el valle de Algar-Guadalest*. Sociedad Cooperativa de Crédito de Callosa De Ensarriá. 262p.

SEO, M., JIKUMARU, Y., KAMIYA, Y. (2011). Profiling of Hormones and Related Metabolites in Seed Dormancy and Germination Studies. *Methods in Molecular Biology*, 773: 99-111.

SOLER, E. Y JUAN, N. (2003). Comparison between loquat cultivars grown under screen and regular fields. *Options Méditerranéennes*, 58:135-141.

STERN, R., FLAISHMAN, M., APPLEBAUM, S. Y BEN-ARIE, R. (2007). Effect of synthetic auxins on fruit development of 'Bing' cherry (*Prunus avium* L.). *Scientia Horticulturae*, 114: 275-280.

STERN, R.A., STERN, D., HARPAZ M. Y GAZIT S. (2000). Applications of 2,4,5-TP 3,5,6-TPA and combinations thereof increases lychee fruit size and yield *HortScience*, 35: 661–664.

TAÍZ, L. Y ZEIGER, E. (2006). El balance hídrico en las plantas. En: Fisiología vegetal Vol.I. Editorial Publicacions de la Universitat Jaume I, Castelló de la Plana. pp. 79-111.

WALLERSTEIN, I., GOREN, R. Y MONSELISE, S. P. (1973). Seasonal changes in giberellin-like substances of ‘Shamouti’ orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) trees in relation to ringing. *J. Hortic. Sci.*, 48: 75-82.

WALLERSTEIN, I., GOREN, R. Y MONSELISE, S.P. (1974). The effect of girdling on starch accumulation in sour orange seedling. *Canadian Journal of Botany*, 52: 935-937.

WESTWOOD, M.N. (1982). Fruticultura de las zonas templadas. Ed. Mundi-Prensa, Madrid. Pp 461.

WILLIAMSON, J.G. Y COSTON, D.C. (1989). The relationship among root growth, shoot growth, and fruit growth peach. *J Am Soc Hortic Sci*, 114: 180–183.

YE, S.Q. (1988). Relationship between ethylene and growth and development of loquat fruits. *China Fruits*, 2: 15-18.

ZENG, G.H., GUO, Y.P., LIU, H., Y XU K. (2004). The operation of photosynthetic apparatus of loquat leaves in winter and spring. *Journal of Fruit Science*, 21: 233-236.

ANEJOS

Anejo A. Tabla de Frecuencias. En las columnas se representa las recolecciones. En las filas el porcentaje de cosecha, la desviación, y la Chi-cuadrado respectivamente. Valor de Chi-cuadrado= 46,099. Valor-P=0,0001. Gl=15.

	1ª REC	2ª REC	3ª REC	4ª REC	Total por Fila
CONTROL	24	12	43	21	100
	-3,67	-19,50	11,83	11,33	16,67%
	0,49	12,07	4,49	13,29	
RAYADO	29	35	28	8	100
	1,33	3,50	-3,17	-1,67	16,67%
	0,06	0,39	0,32	0,29	
3,5,6-TPA	24	33	34	9	100
	-3,67	1,50	2,83	-0,67	16,67%
	0,49	0,07	0,26	0,05	
2,4-DP	22	42	29	7	100
	-5,67	10,50	-2,17	-2,67	16,67%
	1,16	3,50	0,15	0,74	
TPA+RAYADO	34	30	27	9	100
	6,33	-1,50	-4,17	-0,67	16,67%
	1,45	0,07	0,56	0,05	
MEZCLA AUXINAS	33	37	26	4	100
	5,33	5,50	-5,17	-5,67	16,67%
	1,03	0,96	0,86	3,32	
Total por Columna	166	189	187	58	600
	27,67%	31,50%	31,17%	9,67%	100,00%

Anejo B. Tabla de Frecuencias. En las columnas se representa los calibres comerciales. En las filas el porcentaje de cada calibre, la desviación, y la Chi-cuadrado respectivamente. Valor de Chi-cuadrado= 42,47. Valor-P=0,0002. Gl=15.

	M	G	GG	GGG	Total por Fila
CONTROL	7	29	32	2	70
	10,00%	41,43%	45,71%	2,86%	16,67%
	4,83	4,17	-9,67	0,67	
	10,78	0,70	2,24	0,33	
RAYADO	1	26	43	0	70
	1,43%	37,14%	61,43%	0,00%	16,67%
	-1,17	1,17	1,33	-1,33	
	0,63	0,05	0,04	1,33	
3,5,6-TPA	0	35	34	1	70
	0,00%	50,00%	48,57%	1,43%	16,67%
	-2,17	10,17	-7,67	-0,33	
	2,17	4,16	1,41	0,08	
2,4-DP	0	18	48	4	70
	0,00%	25,71%	68,57%	5,71%	16,67%
	-2,17	-6,83	6,33	2,67	
	2,17	1,88	0,96	5,33	
TPA + RAYADO	4	24	42	0	70
	5,71%	34,29%	60,00%	0,00%	16,67%
	1,83	-0,83	0,33	-1,33	
	1,55	0,03	0,00	1,33	
MEZCLA AUXINAS	1	17	51	1	70
	1,43%	24,29%	72,86%	1,43%	16,67%
	-1,17	-7,83	9,33	-0,33	
	0,63	2,47	2,09	0,08	
Total por Columna	13	149	250	8	420
	3,10%	35,48%	59,52%	1,90%	100,00%