

Efecto hormonal y nutricional del anillado en frutos de diferentes tipos de brotes de cítricos

Rivas, Fernando¹; Martínez-Fuentes, Amparo²; Mesejo, Carlos²; Reig, Carmina² y Agustí, Manuel²

¹Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA). Ruta 3 Camino al Terrible. Salto, Uruguay.

²Instituto Agroforestal Mediterráneo (IAM). Universidad Politécnica de Valencia (UPV). Camino de Vera s/n. Valencia, España. Correo electrónico: cfrivas@inia.org.uy

Recibido: 24/10/09 Aceptado: 17/3/10

Resumen

En el presente trabajo se estudió el efecto del anillado de ramas sobre la abscisión de frutos en diferentes tipos de brotes y su relación con el contenido de ácido abscísico (ABA) y carbohidratos durante la fase de cuajado en árboles adultos de mandarina 'Clemenules' (*Citrus reticulata* Blanco). Además, se cuantificó la cosecha luego de la aplicación de inhibidores de la Fase I (Cycocel, CCC) y II (Paclobutrazol, PBZ) de la síntesis de Giberelinas (GAs). Se observó que ambos inhibidores de la síntesis de GAs, redujeron hasta un 40 % la cosecha total, mientras que en combinación con el anillado los niveles fueron similares al testigo sin tratar. Asimismo el PBZ redujo los niveles de azúcares totales mientras que en combinación con el anillado, a los 30 días del tratamiento, se logró restablecer los niveles del control. En frutitos de brotes con y sin hojas el anillado redujo en más de 60 % el nivel de ABA a los siete días luego del tratamiento, siguiendo además una tendencia similar en ambos tipos de brote. Este descenso en los niveles de ABA fue precedido de una reducción de la tasa de abscisión, la cual se mantuvo en niveles significativamente inferiores para los tipos de brotes estudiados hasta los 60 días después del anillado. Para el caso de los brotes sin hojas la abscisión al final del período de evaluación fue similar al control, mientras que en el caso de brotes con hojas se redujo. Se evidencia por tanto el efecto directo del anillado sobre los niveles de ABA, pudiendo explicar así la reducción de la abscisión y la posible implicancia del anillado en la modificación de la relación GAs/ABA durante la fase de cuajado, independientemente del tipo de brote.

Palabras clave: citrus, giberelinas, ácido abscísico, carbohidratos, cuajado

Summary

Girdling effect on fruitlets hormonal and nutritional content in different Citrus shoot types

In this paper we studied the effect of branch girdling on fruitlets abscission arising from different shoot types, and its relationship with abscisic acid (ABA) and carbohydrates content in adult trees of 'Clemenules' mandarin (*Citrus reticulata* Blanco). Besides, girdling combined with two gibberellin inhibitors of phases I and II (Cycocel and Paclobutrazol), was evaluated by recording total crop at harvest. Both growth inhibitors reduced crop by 40% whereas in combination with girdling reached the level of control trees. Paralleling this effect, PBZ reduced total carbohydrates content in young fruitlets, whereas combined with girdling, within 30 days of treatment, carbohydrates level were restored to that of control trees. Concomitantly, girdling reduced by more than 60 % ABA content in fruitlets at seven days after treatment, following a similar trend in both types of shoots. This decrease in ABA level was followed by a reduction in the rate of fruitlets abscission, which remained at levels significantly lower for the type of shoots studied until 60 days after treatment. Final fruit set of leafless inflorescences was not affected by girdling, whereas leafy inflorescence reduced abscission at the end of physiological fruit drop. Thus, the present work reveals that girdling can improve fruit set by early modifications of carbohydrates and GAs/ABA relationship regardless of shoot type.

Key words: citrus, gibberellins, abscisic acid, carbohydrates, fruit set.

Introducción

La partenocarpia en los frutales se halla regulada hormonalmente. Los experimentos de Luckwill en los años 40 demostraron la existencia de auxinas en las semillas de manzana y más tarde Abbott, en los años 50, demostró que las flores de manzano emasculadas no conseguían cuajar y caían. La adición de una pasta de lanolina que contenía una auxina (ácido naftalenacético) consiguió sustituir la acción de las semillas y el fruto cuajaba. Actualmente no hay dudas de que las auxinas y las giberelinas (GAs) controlan el cuajado y desarrollo partenocárpico de los frutos. Existen al menos tres razones que demuestran esta dependencia hormonal: 1) la aplicación de un inhibidor de la biosíntesis de GAs como el paclobutrazol (PBZ) inhibe la partenocarpia (Zacarías *et al.*, 1995); 2) el número de frutos partenocárpicos es prácticamente nulo en mutantes de *Arabidopsis* y tomate incapaces de sintetizar GAs y en ellos la aplicación de GAs exógenas antes de la polinización provoca la partenocarpia; 3) la aplicación exógena de ácido giberélico (GA_3) a variedades autoincompatibles de mandarina o en plantaciones de manzanos o perales con dificultades de polinización, aumenta notablemente la cosecha, siendo sus frutos mayoritariamente aspermos (Agustí, 2004).

En los cítricos, los trabajos de Talón *et al.* (1990, 1992) y Ben Cheikh *et al.* (1995) demuestran que son las GAs las responsables del cuajado, tanto en variedades partenocárpicas como en variedades con semillas.

El papel de las GAs en el proceso se ha relacionado con la capacidad sumidero que confieren al ovario para que éste reclame metabolitos y sobre todo carbohidratos. Goldschmidt (1999) y Bustan y Goldschmidt (1998) demuestran la dependencia energética del proceso de floración y cuajado respecto del contenido en carbohidratos. Existen claras evidencias de esta dependencia: 1) la defoliación total o parcial de árboles de mandarina 'Satsuma' reduce total o parcialmente el número de frutos desarrollados, respectivamente (Mehouachi *et al.*, 1995, Gómez-Cadenas *et al.*, 2000); 2) las inflorescencias con hojas presentan mayor cuajado que las inflorescencia áfilas (Moss *et al.*, 1972; Goldschmidt y Monselise, 1977; Ruiz y Guardiola, 1994; Rivas *et al.*, 2004); 3) existe una relación inversa entre la intensidad de floración y el porcentaje de flores que cuajan en el naranjo dulce 'Navelate' y el híbrido 'Nova' (Agustí *et al.*, 1982; Rivas *et al.*, 2004).

De acuerdo con lo expuesto, el aumento del cuajado en variedades de cítricos con una reducida capacidad partenocárpica, como es el caso de la mandarina

'Clemenules' (Talón *et al.* 1990, 1992), se consigue aplicando GAs (Del Rivero *et al.*, 1969), que aumenta la capacidad sumidero de los ovarios y así su crecimiento (Zacarías *et al.*, 1995), o mediante el anillado de ramas, que aumenta directamente la disponibilidad de carbohidratos (Wallerstein *et al.*, 1974; Cohen, 1981; Rivas *et al.*, 2006, 2007). Por lo tanto existen fuertes evidencias que soportan el hecho de que las GAs juegan un papel clave en el proceso de transición de flor a fruto (Talón *et al.*, 1992; Ben-Cheikh *et al.*, 1997) a través de su estímulo como activadores de la división y crecimiento celular.

Las GAs encontradas en los frutos cítricos participan en la ruta de la 13-hidroxilación integrada por GA_{53} , GA_{44} , GA_{19} , GA_{20} , GA_1 , GA_{29} , GA_8 (Talón *et al.*, 1990; 1992), siendo estas dos últimas las formas inactivas derivadas del proceso de hidroxilación de la posición 2 β del diterpeno. Existen diferentes compuestos sintéticos utilizados para inhibir la síntesis de GAs. El Cycocel (2-Chloroethyl-trimethylammonium chloride; CCC) actúa a nivel de la etapa I de la ruta de síntesis, inhibiendo la formación de *ent*-Kaureno (Talón *et al.*, 2000). El Paclobutrazol (PBZ) actúa en la etapa II del proceso, interrumpiendo la formación de GA_{12} -aldehído (Talón *et al.*, 2000). La aplicación de ambos compuestos en cítricos ayudaría a dilucidar la importancia de cada una de las etapas sobre la formación de GAs activas y su efecto sobre el cuajado.

Se ha sugerido que el anillado, además de incrementar el contenido en carbohidratos de la parte aérea, posee un efecto hormonal (Goren *et al.*, 1971; Wallerstein *et al.*, 1973; Talón *et al.*, 2000; Mehouachi *et al.*, 2009) y, por tanto, se ha propuesto que el incremento del cuajado que provoca, sería también consecuencia de un incremento en los niveles de GAs (Mehouachi *et al.*, 2009). A ello debe añadirse el incremento de la actividad fotosintética que induce en las hojas jóvenes próximas al fruto y que, posiblemente, responda a algún estímulo hormonal (Rivas *et al.*, 2007).

Por otra parte, el ácido abscísico (ABA) ha sido propuesto como compuesto promotor de la abscisión de frutos, participando como mediador en respuesta a déficit nutricionales (Gómez-Cadenas *et al.*, 2000), mientras que, de modo contrario, el anillado retarda y reduce la abscisión durante la primera fase del crecimiento de los mismos (Rivas *et al.*, 2006; 2007). Además, se ha demostrado que la aplicación de inhibidores de la síntesis de GAs provoca una disminución del crecimiento, acompañado de un incremento del contenido de ABA que desencadena la abscisión, mientras que la aplicación de GA_3 produce el efecto contrario (Zacarías *et al.*, 1995).

Por tanto, es posible que el estímulo del cuajado que provoca el anillado se acompañe también de modificaciones en los niveles de ABA de los frutitos en crecimiento tanto en brotes florales con o sin hojas.

En el presente trabajo se propone generar evidencias sobre la capacidad del anillado de estimular el cuajado en condiciones de inhibición inducida de dos etapas tempranas de la síntesis de GAs y su relación con la evolución del contenido de ABA y carbohidratos durante la fase inicial de cuajado en cítricos.

Materiales y métodos

Material vegetal y tratamientos

El trabajo se realizó en un huerto comercial en el término municipal de Liria (Valencia), utilizando plantas adultas de mandarina 'Clemenules' (*Citrus clementina* Hort. ex Tan.) injertadas sobre Citrange Carrizo [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck × *Poncirus trifoliata* Raf.]. Las plantas se encontraban en buenas condiciones fitosanitarias y bajo fertirrigación.

Al momento de la antesis (60 % de flores abiertas) se seleccionaron árboles de tamaño similar (9,6 m³ de copa) y floración homogénea (60-80 flores/100 nudos) y se aplicaron los siguientes tratamientos: 1) Control, sin tratar; 2) Cycocel (CCC; 500 mg L⁻¹); 3) Cycocel (500 mg L⁻¹) + anillado de ramas; 4) Paclobutrazol (PBZ; 500 mg L⁻¹); 5) Paclobutrazol (500 mg L⁻¹) + anillado de ramas; 6) Anillado de ramas. Las aplicaciones foliares de inhibidores de la síntesis de GAs se realizaron hasta punto de goteo, con pulverizador de presión manual a razón de 5 L planta⁻¹. El anillado de ramas (1-2 mm de ancho) se efectuó mediante tijeras de filo circular y evitando dañar el xilema.

Muestreos

Al momento del anillado y a los 7, 15 y 30 días después del mismo, se colectaron frutos al azar de brotes mixtos (brotes de tres a siete flores con hojas jóvenes de la presente brotación) e inflorescencias (brotes áfilos con tres a siete flores creciendo en la axila de hojas del otoño o primavera anterior) de los tratamientos control y anillado. Se seleccionaron dichos brotes a modo de contrastar los resultados debido a que estos han demostrado diferencias en cuajado natural y comportamiento frente al anillado (ver Rivas *et al.*, 2007). El material se congeló inmediatamente con N₂ líquido y se liofilizó para el análisis de ABA. Paralelamente se tomaron muestras al azar de flores y/o frutitos de los tratamientos Control, Anillado, PBZ y PBZ + Anillado a los 0, 7, 15 y 30

días después de los tratamientos. El material se congeló y liofilizó para el análisis de carbohidratos totales.

En el momento de la maduración se recolectaron y contabilizaron todos los frutos por árbol de todos los tratamientos.

Análisis de carbohidratos

La extracción, purificación y análisis de carbohidratos solubles y almidón se realizó siguiendo el mismo procedimiento descrito en Rivas *et al.* (2006). Brevemente, se colectaron estructuras reproductivas, se congelaron inmediatamente a -25 °C, se liofilizaron durante cuatro días y se molieron hasta dejar un polvo fino. El polvo (100 mg PS de frutitos) se extrajo tres veces con etanol 80 % (v/v) a 85 °C, se centrifugó a 15.000 g y luego se filtró a través de columnas aniónica y catiónicas de intercambio. Posteriormente la muestra se filtró con cartuchos C₁₈ Sep-Pak y se secó mediante speed-vacuum. El extracto se enrasó a 100 µl con una solución de acetonitrilo-agua (60:40). Posteriormente se realizó el análisis de azúcares mediante HPLC acoplado con un refractómetro con una fase móvil acetonitrilo-agua (80:20) a un flujo de 1 ml min⁻¹. La sacarosa, glucosa y fructosa fueron identificadas mediante los tiempos de retención. El almidón se extrajo a partir del residuo de la extracción de azúcares solubles. La muestra se disolvió en 6 ml de agua mQ y gelatinizó en autoclave durante 2 h a 135 °C, se centrifugó por 10 min a 27.000 g y se realizó la digestión durante 2 h a 55 °C con amiloglicosidasa (1.218 Unidades). Se centrifugó nuevamente y el sobrenadante se secó en speed vacuum y se redisolvió en 1 ml de agua mQ. Se inyectaron 50 µl en HPLC y se cuantificó el contenido de almidón a través de la glucosa liberada.

Análisis de ácido abscísico

La cuantificación de ABA se realizó mediante el test de ELISA siguiendo el protocolo de Zacarías *et al.* (1995) y Lafuente *et al.* (1997). Todo el procedimiento se realizó en oscuridad.

El ABA se extrajo de 200 mg PS de frutitos, con 5 ml de acetona al 80 % con ácido cítrico (0,5 g L⁻¹) e hidroxitolueno butirato (BHT; 100 mg L⁻¹) dejando en maceración toda la noche a 4 °C. Las muestras se centrifugaron durante tres minutos a 10.600 g a 4 °C y se tomaron 5 µl del sobrenadante para el test de ELISA, siguiendo el protocolo de Walker-Simmons (1987). Brevemente las muestras se incubaron a 4 °C toda la noche con 500 µl de anticuerpos monoclonales (MAb) y 480 µl de un buffer salino Tris (TBS, pH 7,8; una tableta y 0,2 g de Cl₂Mg.6H₂O disueltos en 15 ml de agua

mQ). Los pocillos de la placa ELISA se incubaron a 4 °C toda la noche con 200 µl de un conjugado de albúmina bovina con ABA-4', preparado como lo describe Weiler (1979). Luego lavar los pocillos con 200 µl de TBS-tween (1 L TBS con 0,5 ml de Tween-20 y 0,2 g de BSA) se adicionaron en cada uno, alícuotas de 200 µl de muestra incubada con MAb y las placas se incubaron 2 h a temperatura ambiente. Luego de un nuevo lavado con 200 µl de TBS-tween, se agregó 200 µl de una solución alcalina de conjugado de ratón (20 ml de TBS conteniendo 20 µl de IgG) a cada pocillo. La placa se incubó 2 h a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron nuevamente con TBS-tween y se agregó 200 µl de una solución de nitrofenil fosfato (20 ml 0,05 M de NaHCO₃ con 20 mg de sal disódica hexahidratada de 4-nitrofenil fosfato) a cada pocillo. La placa se incubó en estufa de aire forzado a 35 °C hasta que la absorbancia de la muestra control (sin ABA) medida a 405 nm alcanzara aproximadamente 1,0. En cada placa, además de las muestras, se incubaron estándares de concentraciones conocidas de ABA (en un rango de 15 a 250 pg 100 µl⁻¹ TBS) para realizar las curvas de concentración y calcular las ecuaciones de regresión. La cantidad de ABA en cada muestra se determinó según la ecuación de regresión calculada para cada placa. Los resultados se expresan como mmoles ABA g⁻¹ PS.

Estudio de la dinámica de abscisión

Para los tratamientos control y anillado, se seleccionaron 50 brotes mixtos y 50 brotes tipo inflorescencias. Se contabilizó el número de flores por brote al momento de anthesis y se estudió la abscisión de flores y/o frutitos a los 0, 7, 15, 30, 60 y 90 días posteriores a la anthesis. La última determinación coincidió con el fin de la caída natural de frutitos. Para cada fecha se contabilizó el número de frutos remanentes y con estos valores se calculó la abscisión acumulada por tipo de brote.

Diseño experimental

El diseño experimental fue de bloques al azar con cinco bloques por tratamiento y cuatro repeticiones (árboles) por bloque.

Los datos se sometieron al análisis de la varianza (ANOVA) y para la comparación de medias se utilizó el test de Duncan. Los porcentajes se analizaron luego de la transformación arco-seno de los datos.

Resultados y discusión

Los dos inhibidores de la síntesis de GAs ensayados, CCC y PBZ, mostraron reducir significativamente

($P \leq 0,01$) la cantidad de frutos recolectados en más de un 40 % respecto de los árboles control (Figura 1), lo que demuestra la dependencia hormonal del proceso de cuajado y que ha sido largamente evidenciada (Talón *et al.* 1990, 1992; Zacarías *et al.*, 1995; Ben-Cheikh *et al.*, 1997). El anillado no mostró un efecto significativo sobre el número de frutos con respecto a los controles, pero cuando se aplicó conjuntamente con los inhibidores de la síntesis de GAs, logró incrementar el número de frutos hasta valores similares a los árboles control. Ambos inhibidores de la síntesis de GAs, tanto de la fase I (CCC) como de la fase II (PBZ), lograron reducciones similares y en ambos casos el anillado fue igualmente efectivo. Por consiguiente, puede razonarse que el anillado, además de incrementar la disponibilidad de carbohidratos para los frutos en crecimiento (Rivas *et al.*, 2006), puede ejercer un efecto complementario relacionado con la actividad o síntesis hormonal que facilita el cuajado y que se evidencia en los casos de déficit de síntesis de compuestos hormonales. Si bien en nuestro experimento el anillado logró mejorar el cuajado de los tratamientos en donde se aplicaron inhibidores de la síntesis de GAs, por sí solo no incrementó el cuajado con respecto al control, en una variedad como 'Clemenules' donde la aplicación exógena de GA₃ es utilizada de modo regular para mejorar el cuajado. Por tan-

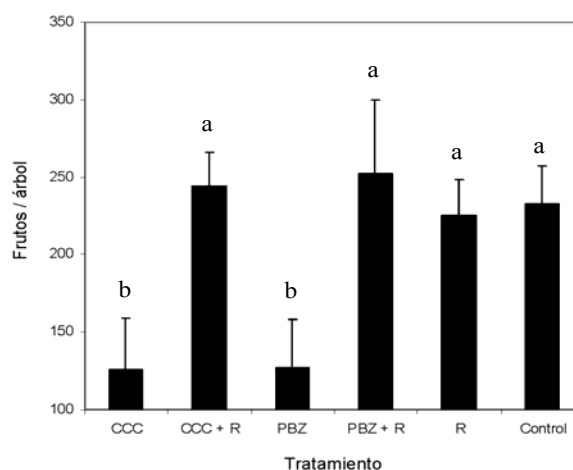


Figura 1. Efecto del anillado de ramas e inhibidores de la síntesis de GAs aplicados en anthesis sobre el cuajado de árboles adultos de mandarina 'Clemenules'. Los datos son la media ±ES de 20 árboles distribuidos en cinco bloques. Diferentes letras sobre cada barra indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,01$) entre tratamientos. La separación de medias se realizó mediante el test de Duncan. Abreviaturas: CCC, Cycocel (500 ppm); PBZ, Paclobutrazol (500 ppm); R, Anillado.

to, si el anillado actuara de modo directo sobre la producción de GAs en fruto, sería esperable un incremento en el tratamiento aplicado de modo individual. Por tanto, es probable que el efecto del anillado en condiciones de inhibición de las GAs promueva el cuajado mediante otra vía metabólica distinta a la de las GAs, afectando de modo directo al desarrollo del fruto y su éxito en el cuajado.

Este efecto del anillado en condiciones deficitarias de GAs puede estar relacionado con el estímulo sobre la actividad fotosintética y su efecto sobre el crecimiento del fruto (Rivas *et al.*, 2007) ya que se ha demostrado que el incremento en los niveles de GAs incrementa la actividad fotosintética a través del estímulo en la fijación de CO₂ por la Rubisco (Yuan y Xu, 2001). Como se ha mencionado, para el caso de los tratamientos con sólo anillado, si este estimulara la síntesis o el contenido de GAs en los frutos (Mehouachi *et al.*, 2009), sería esperable el incremento en el número de frutos de los árboles anillados respecto a los controles, hecho que no ocurrió. Es razonable entonces hipotetizar que la inhibición de la síntesis de GAs con el CCC y el PBZ redujera la actividad fotosintética y por tanto el contenido de carbohidratos. De hecho nuestros resultados confirmaron que la aplicación de PBZ redujo significativamente ($P \leq 0,05$) el contenido en carbohidratos de los frutitos en desarrollo a los 15 y 30 días después del tratamiento, siendo las diferencias con respecto al control del 27,9 y 33,3 %, para cada período respectivamente (Figura 2). En tal escenario es factible que se vea afectada negativamente la tasa de crecimiento de los frutitos, promoviendo su abscisión (Zucconi *et al.*, 1978; Ruiz y Guardiola, 1994; Rivas *et al.*, 2006) y explicando así la reducción de la cosecha. En combinación con el anillado el PBZ mostró una tendencia similar al control hasta los 15 días después del tratamiento, recuperándose el contenido de azúcares totales a los 30 días (Figura 2). Aplicado en forma individual el anillado logró incrementar significativamente ($P \leq 0,05$) el nivel de carbohidratos a los 7, 15 y 30 días posteriores al tratamiento (Figura 2). En base a estos resultados es esperable que el anillado pueda revertir el efecto de los inhibidores de las GAs sobre el cuajado a través de su carácter estimulador de la nutrición orgánica y no como estimulador de la síntesis de GAs en el fruto. Por lo tanto, si bien el efecto hormonal del anillado ha sido demostrado (Wallerstein *et al.*, 1973, Mehouachi *et al.*, 2009), el estímulo a través del aporte de carbohidratos sigue siendo un factor de peso en el momento de la definición del cuajado.

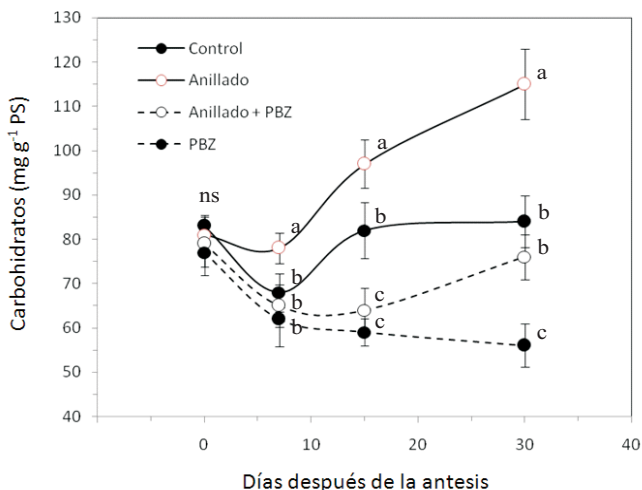


Figura 2. Efecto del anillado, Paclobutrazol (PBZ) y su aplicación combinada sobre el contenido en carbohidratos totales (glucosa + fructosa + sacarosa + almidón) en frutos del mandarino 'Clemenules'. Cada valor es el promedio \pm ES de 5 repeticiones. Letras distintas para cada tratamiento en cada una de las fechas representan diferencias significativas a $P \leq 0,05$. La separación de medias se realizó mediante el test de Duncan. ns: no se encontraron diferencias estadísticas.

El estudio del contenido de ABA en los ovarios de los brotes mixtos e inflorescencias demostró que el anillado logró disminuir el contenido de esta hormona a los siete días después de su ejecución (Figura 3). Este efecto desapareció hacia los 15 días después del anillado, momento en el que los valores fueron similares, manteniéndose entre 0,5-1,5 μ moles ABA g⁻¹ PS. Estos valores fueron similares a los encontrados por Zacarías *et al.* (1995) para la mandarina 'Clemenules'.

La tendencia mostrada en el cuajado (Figura 4) muestra que el anillado retrasa la abscisión en brotes con y sin hojas. Este retraso es evidente ya a los 15 días posteriores al tratamiento, de modo similar a lo verificado por Rivas *et al.* (2007). Para los brotes áfilos el efecto desaparece a los 60 días donde los anillados se comportaron de forma similar a los controles. Para los brotes con hojas la tendencia a sostener mayores niveles de cuajado se mantiene hasta el fin de la caída de frutos de modo coincidente con los resultados obtenidos previamente por Rivas *et al.* (2007).

En base a estos resultados el trabajo evidencia que el anillado podría ejercer su retraso en la abscisión, no solo por el incremento de los niveles de GAs (Mehouachi *et al.*, 2009), sino por la reducción de los niveles de ABA

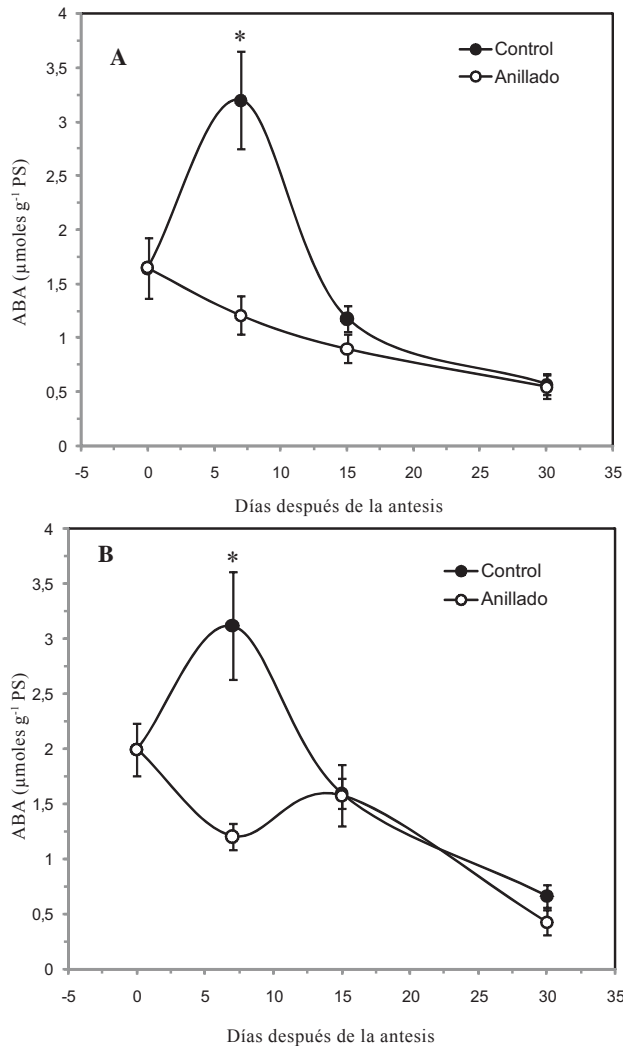


Figura 3. Efecto del anillado en antesis sobre el contenido de ácido abscísico en ovarios de brotes mixtos (A) e inflorescencias (B) del mandarino 'Clemenules'. Cada valor es la media \pm ES de 5 repeticiones. Las diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre tratamientos para cada fecha se señalan con un asterisco (*). La separación de medias se realizó mediante el test de Duncan.

tanto en brotes con hojas como sin hojas debido a un incremento de los niveles de carbohidratos y manteniendo así un mayor ritmo de crecimiento (Rivas *et al.*, 2007) y por el estímulo sobre la fotosíntesis de las hojas de los propios brotes mixtos (Rivas *et al.*, 2007). De hecho, la disminución de ABA se verificó siete días después del tratamiento (Figura 3) y su efecto sobre la abscisión se evidenció ya a los 15 días (Figura 4). Es esperable que modificaciones en los niveles de ABA puedan repercutir sobre los niveles de cuajado poste-

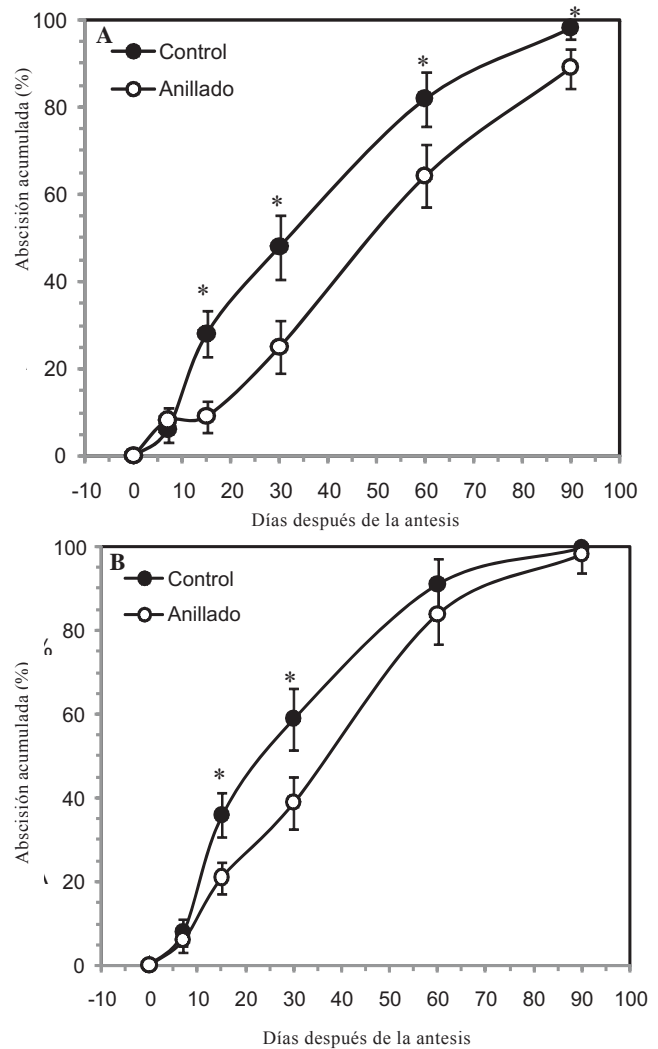


Figura 4. Efecto del anillado sobre la abscisión acumulada en brotes Mixtos (A) e Inflorescencias (B) de árboles adultos del mandarino 'Clemenules'. Cada valor es el promedio \pm ES de 50 brotes. Las diferencias estadísticas ($P \leq 0,05$) se indican con asteriscos (*). La separación de medias se realizó mediante el test de Duncan.

rior a la determinación debido a los cambios bioquímicos y fisiológicos que se deben establecer para que se produzca la abscisión.

Por tanto nuestro trabajo evidencia que el anillado, además de su papel en la nutrición de los frutos en desarrollo, altera sus relaciones hormonales tanto a nivel de promotores (GAs) como inhibidores (ABA) del crecimiento, afectando positivamente la relación GAs/ABA durante la fase inicial de desarrollo, favoreciendo así su cuajado.

Bibliografía

- Abbott, D. L.** 1960. The bourse shoot as a factor in the growth of apple trees. *Annals Appl. Biol.* 48, 434-438.
- Agustí, M.** 2004. *Fruticultura*. Eds. Mundi-Prensa, Barcelona, España, 493 p.
- Agustí, M.; García-Marí, F. and Guardiola, J.L.** 1982. The influence of flowering intensity on the shedding of reproductive structures in sweet orange. *Scient. Hort.* 17, 343-352.
- Ben-Cheikh, W.; Perez-Botella, J.; Tadeo, F. R.; Talón, M. and Primo-Millo, E.** 1995. Pollination increases gibberellin levels in developing ovaries of seeded varieties of Citrus. *Plant Physiol.* 114, 557-564.
- Bustan, A. and Goldschmidt, E.E.** 1998. Estimating cost of flowering in a grapefruit tree. *Plant Cell Environ.* 21, 217-224.
- Cohen, A.** 1981. Recent developments in girdling of citrus trees. *Proc. Int. Soc. Citriculture* 1, 196-199.
- Del Rivero, J. MA.; Veyrat, P. and Gómez de Barreda.** 1969. Improving fruit set in Clementine mandarin with chemical treatments in Spain. *Proc. 1st Int. Citrus Symp.*, Riverside, California, EE.UU. 3, 1121-1124.
- Goldschmidt, E.E.** 1999. Carbohydrate supply as a critical factor for citrus fruit development and productivity. *HortSci.* 34, 1020-1024.
- Goldschmidt, E.E. and Monselise, S.P.** 1977. Physiological assumptions toward the development of a citrus fruiting model. *Proc. Int. Soc. Citriculture* 2, 668-672.
- Gómez-Cadenas, A.; Mehouchi, J.; Tadeo, F. R.; Primo-Millo, E. and Talón, M.** 2000. Hormonal regulation of fruitlet abscission induced by carbohydrate shortage in citrus. *Planta.* 210, 633-643.
- Goren, R.; Goldschmidt, E.E. and Monselise, S.P.** 1971. Hormonal balance in bark and leaves of 'Shamouti' orange trees [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] in relation to ringing. *J. Hort. Sci.* 46, 443-451.
- Lafuente, M.T.; Martínez, T.M. and Zacarías, L.** 1997. Abscisic acid in the response of 'Fortune' mandarins to chilling. Effect of maturity and high-temperature conditioning. *J. Sci. Food Agric.* 73, 494-502.
- Luckwill, L. C.** 1953. Studies of fruit development in relation to plant hormones. II. The effect of naphthalene acetic acid (NAA) on fruit set and development in apples. *J. Hort. Sci.* 28, 25-40.
- Mehouchi, J.; Iglesias, D.; Agustí, M. and Talón, M.** 2009. Delay of early fruitlet abscission by branch girdling in citrus coincides with previous increases in carbohydrate and gibberellin concentrations. *Plant Growth Reg.* 58, 15-23.
- Mehouchi, J.; Serna, D.; Zaragoza, S.; Agustí, M.; Talón, M. and 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.
- Moss, G.L.; Steer, B.T. and Kriedemann, P.E.** 1972. The Regulatory Role of Inflorescence Leaves in Fruit-setting by Sweet Orange (*Citrus sinensis*). *Physiol. Plant.* 27, 432-438.
- Rivas, F.; Erner, Y.; Alós, E.; Juan, M.; Almela, V. and Agustí, M.** 2006. Girdling increases carbohydrate availability and fruit-set in citrus cultivars irrespective of parthenocarpic ability. *J. Hort. Sci. Biotech.* 81, 289-295.
- Rivas, F.; Frascini, C.; Lanfranco, M.; Borges, A.; Espino, M. and Gravina, A.** 2004. Characterization and improvement of Potential Productivity of 'Nova' Mandarin in Uruguay. *Proc. Int. Soc. Citriculture* 385-391.
- Rivas, F.; Gravina, A. and Agustí, M.** 2007. Girdling effects on fruit set and quantum yield efficiency of PSII in two Citrus cultivar. *Tree Physiol.* 27, 527-535.
- Ruiz, R. and Guardiola, J.L.** 1994. Carbohydrate and mineral nutrition of orange fruitlets in relation to growth and abscission. *Physiol Plant.* 90, 27-36.
- Talón, M.; Iglesias, D.J.; Mehouchi, J. y Primo-Millo, E.** 2001. Manejo del cuajado en cítricos: Función y efectos de las Giberelinas. *Todo Citrus* 14, 7-17.
- Talón, M.; Mehouchi, J.; Iglesias, D.J.; Tadeo, F.R.; Lliso, I.; Moya, J.L.; Gómez-Cadenas, A. and Primo-Millo, E.** 2000. Citrus fruitlet abscission: physiological bases supporting the «competition hypothesis». *Proc. IX Cong. Int. Soc. Citriculture, Orlando-Florida, EE.UU.*, 602-604.
- Talón, M.; Zacarías L. and Primo-Millo, E.** 1992. Gibberellins and parthenocarpic ability in developing ovaries of seedless mandarins. *Plant Physiol.* 99, 1575-1581.
- Talón, M.; Zacarías, L. and Primo-Millo, E.** 1990. Hormonal changes associated with fruit set and development in mandarins differing in their parthenocarpic ability. *Physiol. Plant.* 79, 400-406.
- Walker-Simmons, M.** 1987. ABA levels and sensitivity in developing wheat embryos of sprouting resistant and susceptible cultivars. *Plant Physiol.* 84, 61-66.
- Wallerstein, I.; R. Goren, and S.P. Monselise.** 1973. Seasonal changes in gibberellin like substances of 'Shamouti' oranges [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] trees in relation to ringing. *J. Hort. Sci.* 48:75-82.
- Wallerstein, I.; Goren, R. and Monselise, S.P.** 1974. The effect of girdling on starch accumulation in sour orange seedlings. *Can. J. Bot.* 52, 935-937.
- Weiler, E.** 1979. An enzyme-immunoassay for cis-(+) abscisic acid. *Physiol. Plant.* 54, 510-514.
- Yuan, L. and Xu D.Q.** 2001. Stimulation effect of gibberellic acid short term treatment on leaf photosynthesis to increase in Rubisco content in broad bean and soybean. *Photosynth. Res.* 68, 39-47.
- Zacarías L.; Talón, M.; Ben-Cheikh W.; Lafuente M.T. and Primo-Millo, E.** 1995. Abscisic acid increases in nongrowing and paclobutrazol treated fruits of seedless mandarins. *Physiol. Plant.* 95, 613-619.
- Zucconi, F.; Monselise, S.P. and Goren, R.** 1978. Growth abscission relationships in developing orange fruit. *Scient. Hort.* 9, 137-146.