



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

ESCUELA DE POSTGRADO

**EFFECTO DE LA APLICACIÓN DE ÁCIDO GIBERÉLICO SOBRE
LA PARTIDURA DE CEREZA Y LA EXPRESIÓN DE GENES
ASOCIADOS**

Tesis para optar al Título Profesional de Ingeniero Agrónomo y al Grado de
Magíster en Ciencias Agropecuarias, Mención Producción Frutícola

JORGE EDUARDO MORAGA QUEZADA

Director de tesis
HERMAN SILVA ASCENCIO

Profesores consejeros
THOMAS FICHET LAGOS
GABINO REGINATO MEZA

SANTIAGO-CHILE
2016

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE POSTGRADO

**EFEECTO DE LA APLICACIÓN DE ÁCIDO GIBERÉLICO SOBRE LA PARTIDURA
DE CEREZA Y LA EXPRESIÓN DE GENES ASOCIADOS**

Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al Título Profesional de
Ingeniero Agrónomo y al Grado de Magíster en Ciencias Agropecuarias, Mención
Producción Frutícola.

JORGE EDUARDO MORAGA QUEZADA

	Calificaciones*	Calificaciones*	Firma
	(Memoria de Título)	(Tesis de Grado)	
DIRECTOR DE TESIS			
Herman Silva A. Bioquímico, Ph.D.	7,0	6,3	
PROFESORES CONSEJEROS			
Thomas Fichet L. Ingeniero Agrónomo, Dr.	7,0	6,7	
Gabino Reginato M. Ingeniero Agrónomo, Mg. Sc.	6,5	6,0	
PROFESOR COLABORADOR			
Karen Sagredo U. Ingeniero Agrónomo, Ph.D.			

Santiago, Chile
2016

* Escala 1 a 7; válido para alumnos de Educación Continua de la Facultad de Ciencias Agronómicas, de la Universidad de Chile.

A mi familia...

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a los impulsores de mis sueños mi padre Jorge Moraga, mi madre María Quezada, mi abuelita Raquel Franco y mi querida hermana Paula Moraga, porque todo lo que he logrado en mi vida se lo debo a ellos. Gracias por todo el cariño, las enseñanzas que me han brindado, el apoyo y confianza incondicional en todo momento.

Por otra parte, a todas las personas que me ayudaron a la realización de mi querida tesis, particularmente a mis directores de tesis, Profesor Herman Silva A. y Karen Sagredo, los cuales me han entregado diversas herramientas para poder desarrollarme como un profesional, pero principalmente me han hecho crecer como persona. También a mis Profesores consejeros, Gabino Reginato y Thomas Fichet, por su compromiso, buena disposición y acertados comentarios durante el desarrollo de la tesis.

Al apoyo incondicional y colaboración de mis amigos del laboratorio de genómica funcional y bioinformática en especial a Gisselle Poblete, Carla González, Natalia Molina, Bárbara Valenzuela, Rocío León y Rocío Bustos. También a mis amigos del laboratorio de frutales de hoja caduca particularmente a Juan Cares, Ronald Pérez, Marjorie Millanao y Sergio Correa.

A mis amigos que han sido importantes desde que inicie mis estudios, particularmente a Diego Zavala, Alan Pinto, Carlos Gatica, Cristián Valenzuela, Sebastián Pavez, Guido Vergara, Rodrigo Romero, Jazmín Muñoz, Nicole Garrido y Fernanda González. En mis recuerdos quedarán los momentos llenos de alegría, pero rescato por sobre todo nuestra amistad.

Mis respetos al cuerpo docente de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile, quienes me han entregado el conocimiento necesario para completar mi formación. Sin duda, son el aporte más valioso para concretar este estudio.

Al proyecto Fondecyt n° 1120261 “Functional genomics approach to understand cracking susceptibility in sweet cherry: an integrative view for *Prunus* species” y al proyecto Fondef D07I1003 “Tecnología sustentable para la producción de cerezas de exportación en la zona centro-sur de Chile (Los Ángeles a Osorno), gracias a su financiamiento logré llevar a cabo esta investigación.

ÍNDICE

Índice de Contenido

CAPÍTULO I. EFECTO DE LAS APLICACIONES DE ÁCIDO GIBERÉLICO (GA ₃) SOBRE LA CALIDAD DE FRUTA CON ÉNFASIS EN LA PARTIDURA.....	1
Introducción.....	1
Efecto de las aplicaciones de GA ₃ sobre la partidura.....	2
Factores predisponentes.....	3
Expresión de genes asociados a la partidura.....	4
Genes relacionados con la cutícula.....	5
Genes relacionados con la modificación de la pared celular.....	6
Uso de GA ₃ en cerezos.....	7
Modo de acción.....	7
Efecto de las aplicaciones de GA ₃ sobre la calidad del fruto.....	8
Efecto de las aplicaciones de GA ₃ sobre la diferenciación floral.....	9
Conclusiones.....	10
LITERATURA CITADA.....	11
CAPÍTULO II. EFECTO DE LA APLICACIÓN DE ÁCIDO GIBERÉLICO SOBRE LA PARTIDURA DE CEREZA Y LA EXPRESIÓN DE GENES ASOCIADOS.....	16
RESUMEN.....	16
CHAPTER II. EFFECT OF THE APPLICATION OF GIBBERELIC ACID ON SWEET CHERRY CRACKING AND IN THE EXPRESSION OF RELATED GENES.....	17
ABSTRACT.....	17
INTRODUCCIÓN.....	18
Hipótesis.....	19
Objetivos.....	19

MATERIALES Y MÉTODO.....	20
Ubicación del estudio.....	20
Material biológico.....	20
Tratamientos y diseño experimental.....	20
Evaluaciones.....	20
Análisis estadístico.....	24
RESULTADOS.....	25
Ensayo ‘Lapins’.....	25
Ensayo ‘Regina’.....	32
Ensayo ‘Kordia’.....	39
Expresión génica.....	45
Análisis de variables de calidad versus partidura de frutas.....	51
DISCUSIÓN.....	53
CONCLUSIONES.....	60
LITERATURA CITADA.....	59
APÉNDICE.....	64

ÍNDICE DE CUADROS

1. Concentración y épocas de aplicación de ácido giberélico en las distintas variedades...	20
2. Descripción de genes de interés y secuencia de partidores utilizados para el RT-PCR.....	23

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Efecto de las aplicaciones de ácido giberélico (GA_3) sobre la firmeza (A); concentración de sólidos solubles (B) y la masa (C) en los frutos de ‘Lapins’.....	26
2. Efecto de distintas concentraciones de ácido giberélico (GA_3) sobre la acidez titulable (% de ácido málico) de los frutos, en ‘Lapins’.....	27
3. Efecto de distintas concentraciones de ácido giberélico (GA_3) sobre la distribución porcentual de frutos por calibre, en ‘Lapins’.....	28
4. Efecto de distintas concentraciones de ácido giberélico (GA_3) en los frutos de ‘Lapins’. (A) Índice de partidura y (B) porcentaje de fruta partida.....	29
5. Porcentaje de fruta partida luego de 2; 4 y 6 h, en ‘Lapins’.....	30
6. Efecto de distintas concentraciones de ácido giberélico (GA_3) sobre la zona de partidura en los frutos de ‘Lapins’.....	30
7. Efecto de distintas concentraciones de ácido giberélico (GA_3) sobre el índice de diferenciación de primordios florales, en ‘Lapins’.....	31
8. Efecto de la aplicación de ácido giberélico (GA_3) sobre la firmeza (A); concentración de sólidos solubles (B) y masa (C) en los frutos de ‘Regina’.....	33
9. Efecto de distintas concentraciones de ácido giberélico (GA_3) sobre la distribución porcentual de frutos por calibre, en ‘Regina’.....	34
10. Efecto de distintas concentraciones de ácido giberélico (GA_3) en los frutos de ‘Regina’. (A) Índice de partidura y (B) porcentaje de fruta partida.....	35
11. Porcentaje de fruta partida luego de 2; 4 y 6 h, en ‘Regina’.....	36
12. Efecto de distintas concentraciones de ácido giberélico (GA_3) sobre la zona de partidura en los frutos de ‘Regina’.....	37
13. Efecto de distintas concentraciones de ácido giberélico (GA_3) sobre el índice de diferenciación de primordios florales, en ‘Regina’.....	38
14. Efecto de las aplicaciones de ácido giberélico (GA_3) sobre la firmeza (A) y la concentración de sólidos solubles (B) en los frutos de ‘Kordia’.....	39
15. Efecto de distintas concentraciones de ácido giberélico (GA_3) sobre la distribución porcentual de frutos por calibre, en ‘Kordia’.....	41

16. Efecto de distintas concentraciones de ácido giberélico (GA_3) en los frutos de 'Kordia'. (A) Índice de partidura y (B) porcentaje de fruta partida.....	42
17. Porcentaje de fruta partida luego de 2; 4 y 6 h, en 'Kordia'	43
18. Efecto de distintas concentraciones de ácido giberélico (GA_3) sobre la zona de partidura en los frutos de 'Kordia'	43
19. Efecto de distintas concentraciones de ácido giberélico (GA_3) sobre el índice de diferenciación de primordios florales, en 'Kordia'	44
20. Nivel de expresión de <i>PaKC6</i> en frutos de 'Lapins' y 'Kordia', a 15 (A) y 30 (B) días después de aplicación de GA_3 en concentraciones de 0; 10 y 30 mg L ⁻¹ de GA_3	45
21. Nivel de expresión de <i>CER4</i> en frutos de 'Lapins' y 'Kordia', a 15 (A) y 30 (B) días después de aplicación de GA_3 en concentraciones de 0; 10 y 30 mg L ⁻¹ de GA_3	46
22. Nivel de expresión de <i>ABC-2</i> en frutos de 'Lapins' y 'Kordia', a 15 (A) y 30 (B) días después de aplicación de GA_3 en concentraciones de 0; 10 y 30 mg L ⁻¹ de GA_3	47
23. Nivel de expresión de <i>XET-6</i> en frutos de 'Lapins' y 'Kordia', a 15 (A) y 30(A) días después de aplicación de GA_3 en concentraciones de 0; 10 y 30 mg L ⁻¹ de GA_3	48
24. Nivel de expresión de <i>EXP-A3</i> en frutos de 'Lapins' y 'Kordia', a 15 (A) y 30 (B) días después de aplicación de GA_3 en concentraciones de 0; 10 y 30 mg L ⁻¹ de GA_3	49
25. Expresión sin aplicación de GA_3 de <i>PaKCS6</i> en estado pajizo (A) y maduro (B) en variedades de la VII y IX Región.....	49
26. Expresión sin aplicación de GA_3 de <i>CER4</i> en estado pajizo (A) y maduro (B) en variedades de la VII y IX Región.....	50
27. Biplot (ACP) de variables de calidad e índice de partidura evaluada en 'Lapins'	51
28. Biplot (ACP) de variables de calidad e índice de partidura evaluada en 'Kordia'	52
29. Biplot (ACP) de variables de calidad e índice de partidura evaluada en 'Regina'	52

APÉNDICES

I, Cuadro 1. Efecto de distintas concentraciones y épocas de aplicación de ácido giberélico (GA ₃) sobre la partidura en campo en ‘Kordia’ y ‘Regina’.....	64
I, Figura 1. Expresión basal (sin aplicación de GA ₃) de <i>ABC-2</i> (A), <i>CER4</i> (B) y <i>PaKCS6</i> (C) en estado pajizo y maduro.....	64
II, Figura 2. Expresión basal (sin aplicación de GA ₃) de <i>XET</i> (A) y <i>EXP</i> (B) en estado pajizo y maduro.....	65
II, Cuadro 2. Efecto de distintas concentraciones y épocas de aplicación de ácido giberélico (GA ₃) sobre la carga frutal relativa.....	65
III, Cuadro 3. Efecto de distintas concentraciones y épocas de aplicación de ácido giberélico (GA ₃) sobre la proporción de frutos con distinto color del fruto, en ‘Lapins’....	66
III, Cuadro 4. Efecto de distintas concentraciones y épocas de aplicación de ácido giberélico (GA ₃) sobre la proporción de frutos con distinto color del fruto, en ‘Regina’...	66
IV, Cuadro 5. Efecto de distintas concentraciones y épocas de aplicación de ácido giberélico (GA ₃) sobre la proporción de frutos con distinto color del fruto, en ‘Kordia’....	67
IV, Cuadro 6. Efecto de distinta concentración y época de aplicación de ácido giberélico (GA ₃) sobre el diámetro ecuatorial en ‘Lapins’, la acidez titulable en ‘Regina’ y la masa junto con la acidez titulable en ‘Kordia’	67

CAPÍTULO I. EFECTO DE LAS APLICACIONES DE ÁCIDO GIBERÉLICO (GA₃) SOBRE LA CALIDAD DE FRUTA CON ÉNFASIS EN LA PARTIDURA

Introducción

Chile es uno de los principales productores de cerezas a nivel mundial, encontrándose en una posición privilegiada como abastecedor de cerezas para los mercados del Hemisferio Norte, cuando estos se encuentran sin producción, lo que permite a los productores alcanzar mayores precios (Muñoz, 2015). Se estima que la industria exportadora factura por sobre USD 400 millones, lo que podría ubicar a las exportaciones de cerezas como el tercer mayor generador de valor exportado frutícola (Bravo, 2013); esto conlleva una mayor generación de empleos en el sector, en especial en los momentos de cosecha del producto, aumentando el ingreso a las personas, socialmente, más vulnerables.

A pesar de ello, la producción de cerezas presenta varios inconvenientes, en donde una de las principales limitantes corresponde a la partidura de los frutos, que corresponde a un agrietamiento en la epidermis, producido principalmente por las precipitaciones en precosecha (Christensen, 1996). Existen diversos métodos para mitigar esta problemática; siendo los principales: el uso de cobertores de plástico, variedades tolerantes, fórmulaciones de calcio, sales minerales y el uso de helicópteros. No obstante, muchos de estos métodos involucran altos costos y presentan algunas desventajas para el desarrollo de los frutos (Balbontín et al., 2013; Rehman et al., 2015). Sin embargo, se ha visto que el ácido giberélico (GA₃), que se utiliza principalmente en los huertos comerciales de cerezos para retrasar la maduración, aumentar el tamaño y la firmeza del fruto (Horvitz et al., 2003; Cline y Trought, 2007), reduce la incidencia a la partidura (Usenik et al., 2005; Yildirim y Koyuncu, 2010), aunque otro ensayo muestra resultados contradictorios con el uso de este fitorregulador (Cline y Trought, 2007). Adicionalmente, se han visto efectos sobre la inhibición de la floración en especies de *Prunus*, en donde aplicaciones de este regulador de crecimiento, realizadas durante la inducción de yemas florales, inhiben la formación de dichas yemas y reducen el retorno floral (Lenahan y Whiting, 2006). Por otra parte, se han establecido diversos programas de mejoramiento genético para el desarrollo de variedades de cereza más tolerantes a la partidura y para la identificación de genes involucrados en la resistencia a este fenómeno, lo que permite integrar otras herramientas para encontrar una solución a esta problemática (Balbontín et al., 2013).

Por lo tanto, el presente capítulo analiza la literatura respecto a los efectos del GA₃ sobre el fruto, los factores predisponentes a la partidura, las causales de este fenómeno y las externalidades del uso del GA₃.

Efecto de las aplicaciones de GA₃ sobre la partidura

Existen diversas investigaciones que abarcan los efectos de este regulador de crecimiento sobre la partidura de los frutos en cerezos. Por un lado, hay estudios que señalan que las aplicaciones de ácido giberélico disminuyen la susceptibilidad a la partidura de cerezas (Looney, 1996; Podestá et al., 2001; Usenik et al., 2005; Yildirim y Koyuncu, 2010). En cambio, en otra investigación, los efectos son totalmente adversos con tratamientos de GA₃, aumentando la partidura de frutos en la variedad Bing de un 17 a 27% y en la variedad Sam de un 9 a 17% comparado con el control (Cline y Trought, 2007), en un evento de lluvias en precosecha de 91 mm. Por otra parte, Aburto (2012), al evaluar la susceptibilidad a la partidura inducida según el método de Christensen (1996), en frutos de similar estado de madurez y tamaño, determinó que las aplicaciones de GA₃ en el estado de amarillo pajizo reducen la partidura de los frutos, particularmente en ‘Lapins’, a diferencia de la variedad Sweetheart donde no se ven efectos. Además, Araya (2014) indica que en ‘Kordia’ las aplicaciones de GA₃ disminuyen la susceptibilidad a la partidura, lo que reafirma los efectos de GA₃ sobre este fenómeno.

El mecanismo de cómo GA₃ reduce la partidura no se conoce. Sin embargo, Usenik et al. (2005) indican que frutos tratados con GA₃, en las variedades Van y Sunburst, producen un aumento en la elasticidad de la pared celular junto con una mayor tasa de absorción de agua, lo que podría reducir la incidencia a la partidura. En cambio, Barys et al. (1988) encontraron que aplicaciones de GA₃ aumentaron el grosor de la membrana cuticular y la pared radial de las células epidérmicas, concluyendo que esos cambios en las características anatómicas fueron responsables de la reducción de la partidura.

Por otra parte, estudios realizados para determinar las causas de este problema han llegado a diferentes conclusiones. Christensen (1996), señala que la partidura se produce por la presencia de agua en la epidermis, la cual penetra por osmosis en el fruto, produciendo un mayor volumen, causando las características lesiones en la cara externa del fruto. En cambio, Sekse (1995) indica que los flujos hídricos internos del árbol interactúan con el medio externo; esto se produce cuando existen intervalos grandes de riego, que generan cambios bruscos en la presión interna del fruto, ocasionando la partidura de la epidermis. Este aumento del volumen al interior del fruto produciría la destrucción de las estructuras epidérmicas más externas, generando las fisuras características (Sekse, 1998). Asimismo, se ha propuesto una nueva hipótesis, que atribuye la partidura a la contracción de la epidermis, causado principalmente por una disminución abrupta de la temperatura ambiente. Sin embargo, se requieren investigaciones para poder comprobar esta aseveración (Koumanov, 2015).

Factores predisponentes

Variedad

Diversas investigaciones indican que existen diferencias en la tolerancia a la partidura entre las variedades de cereza (Christensen, 1996 y 2000; Cline y Trought, 2007). Al respecto, Cline y Trought (2007), indican que la tolerancia a la partidura de los frutos puede cambiar de acuerdo a las características genéticas de las variedades. Entre estas, 'Bing' y 'Van' son altamente susceptibles al daño, a diferencia de 'Lapins', que tiene una tolerancia intermedia, mientras que otras, como 'Kordia' y 'Regina', presentan una baja susceptibilidad a la partidura (Balbontín et al., 2013). Por otra parte, los mecanismos fisiológicos ligados a dichas diferencias no han sido del todo dilucidados, aunque se atribuye la menor susceptibilidad en 'Kordia', a la tasa de crecimiento de los frutos más lenta al inicio de la fase III, a diferencia de las variedades susceptibles, lo cual evitaría la expansión abrupta del fruto y así la formación grietas en la epidermis (Bastías et al., 2010).

Condiciones medioambientales

Las lluvias caídas durante el período de precosecha pueden causar grandes pérdidas en la producción (Simon, 2006; Bastías et al., 2010). El agua proveniente de las precipitaciones es absorbida por osmosis a través de la cutícula, debido a que en el interior del fruto existe un alto potencial osmótico; luego de esto, la cereza se expande hasta el punto de partirse (Simon, 2006). Asimismo, este fenómeno también se produce durante períodos de alta humedad atmosférica, particularmente cercanos a cosecha (Simon, 2006).

En relación a los requerimientos hídricos, Measham et al. (2012), en la variedad Sylvia, señalan que bajos volúmenes de agua durante el crecimiento del fruto inducen la partidura. En cambio, cuando a la planta se le suministra un mayor volumen de agua, los frutos tienen mayor capacidad para resistir los flujos de agua producida por las precipitaciones, debido a una mayor elasticidad, lo que permite evitar la formación de fisuras en la epidermis.

Otro factor corresponde a la temperatura, la cual presenta una correlación positiva con la incidencia a esta eventualidad, ya que un aumento en la temperatura afecta directamente la permeabilidad de la pared celular, lo que podría estar incidiendo en un mayor agrietamiento del fruto (Christensen, 1996).

Características del fruto

Los frutos presentan un patrón de crecimiento de tipo doble sigmoideo, dividiendo el período de desarrollo del fruto en tres fases: en la fase I se produce una rápida división de células del mesocarpio; la fase II se caracteriza por el desarrollo del embrión y el endurecimiento del endocarpio y, por último, la fase III se destaca por la expansión de células del mesocarpio (Christensen 1996; Balbontín et al., 2014). La opinión generalmente aceptada es que la mayoría de las variedades muestran una mayor susceptibilidad a la

partidura en la fase III, vinculada a la rápida expansión del mesocarpio, lo que incide en un aumento de las fisuras en el fruto (Christensen, 1996; Khadivi-Khub, 2015). Otro factor corresponde al tamaño, en donde los frutos grandes son más susceptibles a la partidura que los frutos pequeños (Cline y Trought, 2007; Khadivi-Khub, 2015). Al respecto, Way (1967), indicó que los frutos de árboles con mayor carga se parten menos, a diferencia de los que poseen menor carga, por el aumento del tamaño de los frutos, lo que asoció a una mayor partidura. En cambio, Christensen (1972), al comparar diversas variedades, no encontró relación entre la susceptibilidad a la partidura y el tamaño de la fruta. El potencial osmótico en frutos es considerado también como un factor crítico, ya que se estima como uno de los posibles mecanismos que inciden en la partidura (Sekse, 1995, 1998; Usenik et al., 2005). Éste es un componente del potencial hídrico de la fruta (Khadivi-Khub, 2015) y es muy variable en frutos de cerezo (-900 a -2.500 kPa), ya que depende de la variedad y del estado de desarrollo del fruto (Tvergyak y Richardson, 1979). Así, un alto potencial osmótico al interior del fruto produce una mayor absorción de agua, lo que causa una abrupta expansión del fruto y fisuras en la epidermis. Por otra parte, se ha relacionado con esta anomalía la firmeza del fruto, indicándose que variedades con mayor firmeza tienen mayor tendencia a partirse que aquellos frutos más blandos (Simon, 2006). Esta mayor susceptibilidad se debe a que la epidermis del fruto se encuentra más tensa, y el aumento de el volumen de éste origina las grietas en las cerezas (Christensen, 1996). Las propiedades de la cutícula también se han asociado a este fenómeno. Se ha visto que variedades como '0900 Ziraat', tolerante a la partidura, presenta cutículas más gruesas, que permiten reducir la susceptibilidad a la partidura, (Demirsoy y Bilgener, 1998). Al respecto, estudios realizados por Rios et al. (2015) indican que las variedades más tolerantes presentan una mayor concentración de alcanos, los cuales son componente de las ceras cuticulares y le otorgan la capacidad de semipermeabilidad a las ceras, lo que podría inducir una menor susceptibilidad a la partidura, al evitar un flujo excesivo de agua desde el exterior al interior del fruto. Asimismo, la modificación de la pared celular se ha correlacionado con esta anomalía, ya que una mayor elongación de esta estructura evita la formación de partiduras en el fruto, al momento de aumentar el volumen al interior de éste (Yamaguchi et al., 2004).

Expresión de genes asociados a la partidura

Las razones génicas que explican el porqué de estas diferencias, en la tolerancia o susceptibilidad a la partidura, aún no han sido reveladas, pero existen genes involucrados en la modificación de la pared celular y la composición de la membrana cuticular, que han sido relacionados con este problema (Balbontín et al., 2013 y 2014).

Genes relacionados con la cutícula

Investigaciones recientes atribuyen las diferencias en la susceptibilidad a la partidura, a las propiedades de la cutícula del fruto durante su desarrollo. Todas las partes aéreas de la planta se encuentran cubiertas por la cutícula, que es una membrana semipermeable y que funciona como barrera protectora contra las pérdidas de agua, lixiviación de nutrientes,

invasión de patógenos y daños mecánicos (Vogg et al., 2004; Alkio et al., 2012). La membrana cuticular está compuesta principalmente por dos tipos de lípidos: cutinas y ceras cuticulares. Con respecto a la cutina, ésta corresponde a un polímero formado por muchos ácidos grasos de cadena larga, que hace la cutícula química y mecánicamente estable. Por otro lado, las ceras son de gran importancia, pues le confieren a la cutícula la propiedad de ser impermeable (Alkio et al., 2012). Análisis de la composición de ceras durante el desarrollo de fruto, realizado en distintas variedades de cerezos ('Hedelfinger', 'Kordia', 'Sam' y 'Van), indican que se encuentran formados principalmente por triterpenos, alcanos y alcoholes, que representa un 75,6, 19,1 y 1,2%, respectivamente (Peschel et al. 2007), siendo los alcanos, insolubles en disolventes polares, los que confieren la propiedad de la semipermeabilidad a la membrana cuticular (Balbontín et al., 2013). Por ende, la proporción y el tipo de alcanos podrían ser de gran relevancia para explicar en parte la tolerancia a la partidura. Estudios en cerezas han encontrado diferencias en las concentraciones de alcanos, en donde se observan cambios dependiendo de la variedad evaluada. Por ejemplo, 'Kordia' y 'Regina', de menor susceptibilidad a la partidura, presentaron concentraciones significativamente más altas de alcanos en comparación con otras variedades de mayor susceptibilidad a la partidura (Rios et al., 2015), por lo que una mayor concentración de alcanos produciría un menor movimiento de agua entre el exterior e interior del fruto (Vogg et al., 2004), evitando una abrupta expansión del fruto y, así, la formación de lesiones en la cara externa de la epidermis.

A partir de este descubrimiento, se han investigado los genes involucrados en la ruta de producción de ceras cuticulares y su efecto en el fruto; uno de ellos corresponde a la enzima β -cetoacil-Coa sintasa (*CER6*), la cual es crucial para la biosíntesis de ceras, ya que se encuentra implicada en la elongación temprana de ácidos grasos de cadena larga, que son los precursores para la formación de alcanos (Vogg et al., 2004). Al respecto, Vogg et al. (2004), demostraron en tomates que una mutación del gen que codifica para esta enzima (*CER6*), conduce a una alteración química de la composición de ceras cuticulares, lo cual produce un aumento en la permeabilidad al agua. Al respecto, Balbontín et al. (2014) analizaron la expresión de *PaKCS6* (homólogo de *CER6*), comparando variedades con alto grado de contraste a la tolerancia de la partidura, encontrando una mayor expresión de este gen en las variedades más tolerantes a la formación de grietas en la epidermis.

Otro gen involucrado en esta ruta metabólica corresponde a *CER4*, el cual codifica para la enzima Acil-CoA graso reductasa. Para ver su efecto, en *Arabidopsis*, se realizó una mutación de *CER4*, lo que produjo una disminución en la producción de alcoholes primarios, por lo que se le adjudicó la acción de catalizar la reducción de los VLCFA a alcoholes primarios. Estos últimos son utilizados para la biosíntesis de ésteres de cera, componentes de las ceras cuticulares (Rowland et al., 2006; Kunst y Samuels, 2009).

Luego de la síntesis de los componentes cuticulares, éstos deben ser transportados desde el retículo endoplasmático a la membrana plasmática, para después moverse a través de esa estructura hasta la pared exterior de las células periclinales de la cutícula (Kunst y Samuels, 2009). Este movimiento es llevado a cabo por los transportadores de membrana dependientes de ATP (transportadores ABC) como *CER5/ABCG12* y *ABCG11*, que son los encargados de exportar los precursores de cera y cutina (Kunst y Samuels, 2009; McFarlane et al., 2010).

Genes relacionados con la modificación de la pared celular

La modificación de la pared celular durante la maduración del fruto también se ha correlacionado con la tolerancia a la partidura en la fruta (Knoche et al., 2001; Wang et al., 2006; Kasai et al., 2008; Balbontín et al., 2014). Dentro de las enzimas que modifican la pared celular, se ha observado que las expansinas podrían proporcionar una mayor capacidad de extensión al fruto y, así, evitar el desarrollo de fisuras en la superficie de éste (Wang et al., 2006; Kasai et al., 2008; Balbontín et al., 2014). Estas inducen la relajación y extensión de la pared celular de una manera dependiente del pH, mediante la ruptura de los enlaces de las microfibrillas de celulosa (Cosgrove, 2000).

Diversos estudios han asociado la partidura de cerezas con la expresión de expansinas en los frutos, debido a la capacidad de estas enzimas de inducir la elongación celular y, así, prevenir la formación de microfisuras en el fruto. Al respecto, Wang et al. (2006), identificaron en litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) dos genes de expansina (*LcExp1* y *LcExp2*) y examinaron su expresión durante el desarrollo del fruto; éstas mostraron diferentes niveles de transcripción en los tejidos del pericarpio, en donde la variedad más tolerante presentó una mayor expresión al final del crecimiento del fruto, en oposición a la variedad más susceptible, que presentó una mayor expresión al inicio del crecimiento del fruto. Esta mayor expresión al final se asoció a una mayor tolerancia a la partidura, debido a la capacidad de resistir los cambios abruptos ocurridos en esta etapa, al presentar una pared celular más flexible. Asimismo, ensayos realizados en manzanos, por Kasai et al. (2008), donde se evaluó la expresión de un gen de expansina (*MdEXPA3*) en el pericarpio y mesocarpio durante el desarrollo del fruto, detectando una expresión diferencial de este gen en los tejidos evaluados, que mostraba una mayor expresión de éste en el mesocarpio, lo que se asoció con una reducción del nivel de partidura, debido a que *MdEXPA3* controla la extensión de la pared celular. En cerezas, Balbontín et al. (2014) compararon los niveles de transcripción de expansinas (*PaEXPI*) en dos variedades con distinto grado de susceptibilidad a la partidura, ‘Kordia’ (tolerante) y ‘Bing’ (susceptible), desde cuaja a madurez; los resultados mostraron altos niveles de expresión de expansinas en ‘Bing’, en un estado de desarrollo más temprano (cambio de color de la fruta), en contraste con lo sucedido en ‘Kordia’, ya que la mayor expresión ocurrió en una etapa más tardía, coincidiendo con la maduración de los frutos; lo anterior evitaría la expansión abrupta, al momento de aumentar el volumen al interior del fruto.

Otra enzima relacionada con este proceso corresponde a la xiloglucano endotransglicosilasa (*XET*), encargada de controlar la extensibilidad de la célula, al producir el entrecruzamiento de las moléculas de celulosa y xiloglucanos, lo que permite la división de las cadenas de este último y, de esta manera, otorgar plasticidad a la pared celular; dicho debilitamiento genera una mayor flexibilidad y elasticidad de la epidermis, lo que podría estar asociado a la tolerancia de la partidura (Lu et al., 2006; Takizawa et al., 2014). Al respecto, Lu et al. (2006), estudiaron esta enzima en litchi, centrándose en el comportamiento de tres genes de xiloglucano endotransglicosilasa (*LcXET1*, *LcXET2* y *LcXET3*) durante el desarrollo del fruto, encontrando mayor expresión del gen *LcXET1*, 66 días después de floración (DDF) en ‘Huaizhi’ (variedad tolerante), a diferencia de ‘Nuomici’ (variedad susceptible), que se expresó 77 DDF, asociándose estrechamente con la menor partidura de frutos, al permitir una elongación más temprana de los frutos en la variedad más resistente. Estos resultados

contrastan con la expresión de las expansinas.

En resumen, no se han encontrado resultados concluyentes con respecto a la identificación de los mecanismos relacionados con la partidura, por lo que el uso de herramientas moleculares para identificar los posibles factores involucrados se ha vuelto fundamental. Entre los mecanismos investigados se encuentran los relacionados con la elongación de la pared celular, en donde las expansinas y las xiloglucano endotransglucosilasa (*XET*) controlan la extensibilidad de la célula y la plasticidad de la pared celular (Wang et al., 2006; Kasai et al., 2008; Balbontín et al., 2014); por otro lado, la composición de la cutícula es otro mecanismo relacionado con este fenómeno, en donde β -cetoacil-Coa sintasa (*CER6*), Acil-CoA graso reductasa (*CER4*) y los transportadores ABC se encuentran involucradas en esta ruta metabólica.

Uso de GA₃ en cerezos

Respecto a la época de aplicación de GA₃, para mejorar la calidad de la fruta, se mencionan como las más efectivas aquellas cuando los frutos se encuentran entre el estado de desarrollo verde traslúcido al amarillo pajizo, debido a que las giberelinas son más activas en estadios más tempranos de desarrollo (Looney, 1996; Christensen, 1996; Horvitz et al., 2003; Yildirim y Koyuncu, 2010). Además, se ha determinado que una sola aplicación de este fitoregulador tiene mayor efecto, que el uso sucesivo con menores cantidades de GA₃ (Kappel y MacDonald, 2002; Cline y Trought, 2007). En cuanto a la concentración, Yildirim y Koyuncu (2010) y Aburto (2012), señalan que tratamientos de 20 y 30 mg L⁻¹ de GA₃, aplicados en el estado de desarrollo amarillo pajizo, en ‘0900 Ziraat’ y ‘Lapins’, indujeron los mejores resultados sobre la calidad de los frutos y la reducción de la incidencia a la partidura.

Modo de acción

Las giberelinas son una familia de diterpenos tetracíclicos ácidos, cuyo esqueleto está constituido por un anillo de *ent*-giberelano. Sin embargo, a nivel fisiológico sólo un grupo tiene una capacidad intrínseca para influir en el crecimiento y desarrollo vegetal, que corresponden a las giberelinas activas GA₁, GA₃, GA₄ y GA₇, que exhiben la actividad biológica más elevada (Looney, 1996; Contreras et al., 2001; Iglesias y Talón, 2008). Al igual que el resto de las fitohormonas, producen efectos pleiotrópicos, desarrollando un papel importante en diversos procesos de crecimiento, entre los que se encuentra el desarrollo de las semillas, estimulación de crecimiento del tallo, desarrollo del fruto, disminución de la actividad de enzimas hidrolíticas, modificación de la extensibilidad de la pared celular, retraso en inicio de actividad del ácido abscísico (ABA) y control del tiempo de floración (Iglesias y Talón, 2008; Santner y Estelle 2009). Esta variedad de respuestas también tiene su reflejo a nivel celular, activando la división celular, al acortar la interfase del ciclo celular e inducir a las células en fase G1 a sintetizar ADN (Iglesias y Talón, 2008). Estos y otros procesos pueden verse afectados, al menos parcialmente, por cambios en la expresión génica (Iglesias y Talón, 2008; Santner y Estelle 2009).

Por otra parte, las aplicaciones de GA₃ actúan de forma sistémica local, penetrando por los órganos y desplazándose ligeramente en el interior de ellos; debido a esto tiende a acumularse cerca del sitio de penetración. Sin embargo, las respuestas metabólicas inducidas pueden afectar órganos lejanos de la planta (Iglesias y Talón, 2008). Adicionalmente, los efectos derivados de su aplicación pueden durar de 1 a 3 semanas, lo que va a depender del estado metabólico de la planta, de los órganos específicos y las condiciones medioambientales al momento de la aplicación del producto (Santner y Estelle 2009).

Efecto de las aplicaciones de GA₃ sobre la calidad del fruto

Como efecto principal de las aplicaciones de GA₃ se menciona un retraso en la maduración de los frutos, alrededor de 3 a 4 días, debido a que produce un retardo en la coloración de la epidermis de los frutos (Proebsting et al., 1973; Usenik et al., 2005; Yildirim y Koyuncu, 2010; Aburto, 2012), producido por la disminución en la concentración de antocianos (Proebsting et al., 1973 y Usenik et al., 2005), los cuales son los responsables del cambio de color del fruto (Remon et al., 2006). Por otro lado, en cítricos, se indica que el GA₃ produce un retraso en la degradación de clorofilas y una disminución en la concentración de carotenoides, lo que retardaría la coloración de los frutos (Alós et al., 2006)

También se ha visto que el uso de GA₃ aumenta la concentración de sólidos solubles en el fruto (Podestá et al., 2001; Horvitz et al., 2003; Cline y Trought, 2007; Kappel y MacDonald, 2007). Al respecto, para 'Bing', Podestá et al. (2001) señalan que la fruta tratada con GA₃ permaneció más tiempo en el árbol, lo que sería la causa de una mayor concentración de sólidos solubles. Además, indican que las aplicaciones de ácido giberélico podrían aumentar la tasa de acumulación de azúcares hacia los frutos, activando alguna ruta enzimática. En cambio, Demirsoy y Bilgener (1998) no encontraron efectos significativos sobre la concentración de sólidos solubles al evaluar las variedades Ziraat, Lambert y Van. Al respecto, Canli y Orhan (2009) señalan que los efectos de las aplicaciones de GA₃ sobre la concentración de sólidos solubles son muy complejos, dependiendo de la interacción de los tratamientos de GA₃ y las condiciones medioambientales de la zona donde se realice el ensayo.

Junto con ello, hay estudios que señalan que las aplicaciones de GA₃ incrementan la división y elongación celular, favoreciendo el tamaño y masa del fruto (Horvitz et al., 2003; Cline y Trought, 2007; Canli y Orhan, 2009; Yildirim y Koyuncu, 2010). Al respecto, Horvitz et al. (2003), para 'Sweetheart', señalan que el retraso en la maduración sería el responsable del aumento del tamaño y masa obtenidos con las aplicaciones de GA₃, debido a que se considera que un 25% de la masa final se obtiene durante las últimas semanas antes de la cosecha (Yildirim y Koyuncu, 2010). Además, manifiestan que el incremento en el tamaño se debe a una mayor división celular y elongación inducida por las aplicaciones de GA₃.

Otro efecto que se produce con la aplicación de GA₃ es el aumento en la firmeza del fruto (Demirsoy y Bilgener 1998; Choi et al., 2002; Horvitz et al., 2003; Canli y Orhan, 2009; Yildirim y Koyuncu, 2010). En relación a este punto, Demirsoy y Bilgener (1998)

mostraron que el GA₃ disminuye la actividad de las enzimas poligalacturonasa (PG) y pectinmetilesterasa (PME), enzimas hidrolíticas de la pared celular, que son las encargadas de la degradación de pectinas, siendo estas últimas los principales componentes de la lamela media en la pared celular de los frutos. Al respecto, Horvitz et al. (2003), señalan que el incremento en la firmeza de los frutos tratados con GA₃ podría estar relacionado con cambios en el tipo y la estructura de las pectinas de la pared celular.

Por lo tanto, las aplicaciones de GA₃ aparecen como una alternativa interesante para mejorar la calidad de los frutos, específicamente en variables como firmeza, concentración de sólidos solubles, diámetro ecuatorial y masa del fruto. Además, permiten retrasar la cosecha de cerezas, que en el caso de la zona sur de Chile posibilita obtener producciones más tardías, lo que genera mayores retornos económicos a los productores. A pesar de ello, los resultados que producen la aplicación de este fitorregulador no son consistentes, ya que los efectos del ácido giberélico dependen de factores ambientales, tales como las condiciones de luz y temperatura en que se desarrollan las plantas (Facteau et al., 1992; Iglesias y Talón, 2008), los que varían entre temporadas de producción, explicando el efecto poco consistente de las aplicaciones de GA₃. Igualmente, Canli y Orhan (2009) indican que la respuesta de las cerezas a las aplicaciones de GA₃ depende de la sensibilidad a la acción de las giberelinas, que difiere según la variedad usada.

Efecto de las aplicaciones de GA₃ sobre la inducción floral

Diversas investigaciones muestran que aplicaciones de GA₃ reducen la diferenciación floral, disminuyendo el retorno floral y la carga frutal para la temporada siguiente (Facteau et al., 1989; Usenik et al., 2005; Lenahan et al., 2008), lo que genera retención en los productores de cerezos, sobre todo en variedades con baja cuaja.

Analizando los efectos del GA₃ sobre el desarrollo reproductivo, Lenahan et al. (2008) indican que tratamientos con 30 mg L⁻¹ de GA₃ aplicados al final de la etapa II de crecimiento del fruto, mostraron una menor diferenciación floral en las yemas. Al respecto, se han investigado los efectos sobre la inducción floral según el momento de aplicación, en donde las aplicaciones de GA₃ en la etapa II de crecimiento del fruto tienen un efecto mínimo en la disminución de la inducción floral, en comparación a las aplicaciones al inicio de la fase III, que posee un efecto más severo, causando una disminución en el retorno floral para la siguiente temporada entre un 21% a 54% (Facteau et al., 1989; Lenahan et al., 2008). Al respecto, Faust (1989) especuló que las giberelinas actúan alargando el plastocrono, conocido como el intervalo de tiempo entre la formación de los primordios de hojas en la yema y, de este modo, inhibirían indirectamente la inducción floral, dado que el meristemo necesitaría un mínimo de primordios formados para ser inducido.

Sin embargo, estudios en cerezos en la zona de Angol muestran que no hay incidencia con las aplicaciones de GA₃ en la diferenciación floral y el retorno floral (Aburto, 2012; Araya, 2014). Por otra parte, Cares (2012) indica que la aplicación de prohexadione-calcio, inhibidor de síntesis de giberelinas, en 'Lapins' y 'Sweetheart', adelanta el desarrollo de las

estructuras florales dentro de la yema, especialmente cuando se repite la aplicación luego de 15 días, aunque no tiene efectos adicionales sobre el crecimiento vegetativo y reproductivo, reafirmando que el efecto de las giberelinas sobre la diferenciación floral aún está en discusión.

Conclusiones

Las aplicaciones de GA₃ tienen efectos sobre la calidad del fruto y la partidura. Sin embargo, los efectos varían según la temporada y las condiciones medioambientales donde se realicen los ensayos, ya que las precipitaciones caídas juegan un papel fundamental sobre la incidencia a la partidura, mientras que la temperatura y la luz modifican la interacción del fitorregulador con la planta durante el crecimiento del fruto.

Las aplicaciones de GA₃ disminuyen la inducción floral, no obstante, estudios en la zona de Angol muestran que tratamientos con GA₃ no tienen efecto sobre el retraso en la inducción floral y en el retorno floral para la siguiente temporada.

Con respecto a la concentración de GA₃, se establece que entre 10 y 30 mg L⁻¹ tienen resultados más significativos sobre la calidad del fruto y la disminución en la partidura. En cuanto a la época de aplicación, la ideal corresponde a la realizada entre los estados de desarrollo verde traslúcido a amarillo pajizo.

No están claros los mecanismos involucrados en la partidura, no obstante, se ha estudiado que la modificación de la pared celular y la composición de la membrana cuticular podrían estar relacionados en la partidura; los genes investigados y relacionados con dichos procesos son: β -cetoacil-Coa sintasa (*CER6*), Acil-CoA graso reductasa (*CER4*), Transportador ABC (*ABC-2*), expansinas (*EXP-A3*) y xiloglucano endotransglucosilasa (*XET-6*).

LITERATURA CITADA

Aburto, J. 2012. Aplicación de ácido giberélico para retrasar la maduración en cerezo (*Prunus avium* L.) en el sur de Chile. Tesis Ingeniería Agronómica y Magíster en Ciencias Agropecuarias, Mención Producción Frutícola. Santiago, Chile: Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. 74h.

Alkio, M.; U. Jonas; T. Sprink; S. Van Nocker and M. Knoche. 2012, Mar. Identification of putative candidate genes involved in cuticle formation in *Prunus avium* (sweet cherry) fruit. *Annals of Botany*, 110(1): 101-112.

Alós, E.; M. Cercós; M. Rodrigo; L. Zacarías and M. Talón. 2006, Jun. Regulation of color break in citrus fruits. Changes in pigment profiling and gene expression induced by gibberellins and nitrate, two ripening retardants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(13): 4888-4895.

Araya, R. 2014. Efecto de las aplicaciones de ácido giberélico sobre la época de cosecha y calidad de frutos de cerezo (*Prunus avium* L.) en las variedades Regina y Kordia. Memoria Ingeniería Agronómica. Santiago, Chile: Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. 38h.

Balbontín, C.; H. Ayala; R. Bastías; G. Tapia; M. Ellena; C. Torres; J. Yuri; J. Quero-García; J. C. Rios and H. Silva. 2013, Jan. Cracking in sweet cherries: A comprehensive review from a physiological, molecular, and genomic perspective. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 73(1): 66-72.

Balbontín, C; H. Ayala; J. Rubilar; J. Cote and C. Figueroa. 2014, Feb. Transcriptional analysis of cell wall and cuticle related genes during fruit development of two sweet cherry cultivars with contrasting levels of cracking tolerance. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 74(2): 162-169.

Barsy, T.; R. Bronchart; K. Belmans and J. Keulemans. 1988, Mar. Effect of GA₃ on the level of splitting in cherries cv. Brabanders and on the morphology of their epidermis. *Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie*, 96(6): 6-12.

Bastías, R.; R. Wilckens; A. Venegas y A. Muñoz. 2010, jul. Dinámica de crecimiento de fruto en cultivares de cerezo (*Prunus avium* L.) con alta, moderada y baja susceptibilidad a partidura. *Agro-Ciencia*, 26(2): 81-89.

Bravo, J. 2013. Cerezas: actualización de un mercado, abril 2013. (Informe), Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA). Santiago, Chile: ODEPA. 10p.

Canli, F. and H. Orhan. 2009, Jan. Effects of preharvest gibberellic acid applications on fruit quality of '0900 Ziraat' sweet cherry. *HortTechnology*, 19(1): 127-129.

Cares, J. 2012. Efecto del prohexadione-calcio en el crecimiento vegetativo y reproductivo de cerezos 'Lapins' y 'Sweetheart'. Tesis Ingeniería Agronómica y Magíster en Ciencias Agropecuarias, Mención Producción Frutícola. Santiago, Chile: Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. 63h.

Choi, C.; P. Wiersma; P. Toivonen and F. Kappel. 2002, Nov. Fruit growth, firmness and cell wall hydrolytic enzyme activity during development of sweet cherry fruit treated with gibberellic acid (GA₃). *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 77(5): 615-621.

Christensen, J. V. 1972, Sept. Cracking in cherries iv. Physiological studies of the mechanisms of cracking. *Acta Agriculturae Scandinavica*, 22(3): 153-162.

Christensen, J. V. 1996. Rain-induced cracking of sweet cherries: its causes and prevention. (ch. 12, pp. 297-330). In: A. Webster and N. Looney. Cherries: crop physiology, production and uses. Wallingford, UK: CAB International. 513p.

Christensen, J. V. 2000, Feb. Performance in Denmark of 16 European varieties of sweet cherry. *Journal of American Pomological Society*, 54(4): 172-176.

Cline, J.A. and M. Trought. 2007, Mar. Effect of gibberellic acid on fruit cracking and quality of Bing and Sam sweet cherries. *Canadian Journal of Plant Science*, 87(3): 545-550.

Contreras, P.; F. Francesca y M. C. Rojas. 2001, abr. Obtención y separación de giberelinas lactónicas producidas por el hongo *Gibberella fujikuroi* para usarlas como estándares cromatográficos. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química*, 46(2): 197-202.

Cosgrove, D. 2000, Sept. Loosing of plant cell walls by expansins. *Nature*, 407(6802): 321-326.

Demirsoy, L. and S. Bilgener. 1998, Jul. The effects of preharvest chemical applications on cracking and fruit quality in 0900 'Ziraat', 'Lambert' and 'Van' sweet cherry varieties. *Acta Horticulturae*, 468: 663-670.

Facteau, T.; K. Rowe and N. Chestnut. 1989, Jul. Flowering in sweet cherry in response to application of gibberellic acid. *Scientia Horticulturae*. 38(4): 239-245.

Facteau, T.; K. Chesnut; K. Rowe and C. Payne. 1992, Feb. Brine quality of gibberellic acid-treated 'Napoleon' sweet cherries. *HortScience*, 27(2): 118-122.

Faust, M. 1989. Fruiting. pp. 169-234. In: Faust, M. Physiology of temperate zone fruit trees. New York, U.S.A: John Wiley and Sons. 338p.

Horvitz, S.; C. Godoy; A. López and A. Yommi. 2003, Aug. Application of gibberellic acid to 'Sweetheart' sweet cherries: effects on fruit quality at harvest and during cold storage. *Acta Horticulturae*, 628: 311-316.

Iglesias, D. y M. Talón. 2008. Giberelinas. (cap. 20, pp. 399-420). En: Azcón-Bieto, J. y M. Talón (eds.). *Fundamentos de fisiología vegetal*. España: McGraw-Hill Interamericana. 651p.

Kappel F. and R. A. MacDonald. 2002, Oct. Gibberellic acid increases fruit firmness, fruit size and delays maturity of ‘Sweetheart’ sweet cherry. *Journal of the American Pomological Society*, 56(4): 219-222.

Kappel, F. and R. MacDonald. 2007, Jan. Early gibberellic acid sprays increase firmness and fruit size of ‘Sweetheart’ sweet cherry. *Journal of the American Pomological Society*, 61(1): 38-43.

Kasai, S.; H. Hayama; Y. Kashimura; S. Kudo and Y. Osanai. 2008, Apr. Relationship between fruit cracking and expression of the expansin gene *MdEXPA3* in ‘Fuji’ apples (*Malus domestica* Borkh.). *Scientia Horticulturae*, 116(2): 194-198.

Khadivi-Khub, A. 2015, Jan. Physiological and genetic factors influencing fruit cracking. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37(1): 1-14.

Knoche, M.; S. Peschel; M. Hinz and M. Bukovac. 2001, Feb. Studies on water transport through the sweet cherry fruit surface: conductance of the cuticle in relation to fruit development. *Planta*, 213(6): 927-936.

Koumanov, K.S. 2015, Mar. On the mechanisms of the sweet cherry (*Prunus avium* L.) fruit cracking: swelling or shrinking? *Scientia Horticulturae*, 184(5): 169-170.

Kunst L. and L. Samuels. 2009, Dec. Plant cuticles shine: advances in wax biosynthesis and export. *Current opinion in plant biology*, 12(6): 721-727.

Lenahan, O. and M. Whiting. 2006, Jun. Gibberellic acid inhibits floral bud induction and improves Bing sweet cherry fruit quality. *HortScience*, 41(3): 654-659.

Lenahan, O.; M. Whiting and D. Elfving. 2008, Jun. Gibberellic acid is a potential sweet cherry crop load management tool. *Acta Horticulturae*, 795: 513-516.

Looney, N. 1996. Principles and practice of plant bioregulator usage in cherry production. (ch. 11, pp. 279-298). In: A. Webster and N. Looney. *Cherries: crop physiology, production and uses*. Wallingford, UK: CAB International. 513p.

Lu, W.; Y. Wang; Y. Jiang; J. Li; H. Liu; X. Duan and L. Song. 2006, Dec. Differential expression of litchi XET genes in relation to fruit growth. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44(11): 707-713.

McFarlane, H. E.; J. Shin; D. Bird and A. Samuels. 2010, Sept. Arabidopsis ABCG transporters, which are required for export of diverse cuticular lipids, dimerize in different combinations. *The Plant Cell*, 22(9): 3066-3075.

- Measham, P.; A. Gracie; S. Wilson and S. Bound. 2012, May. Nutrition and irrigation: towards a practical solution for cherry cracking. *Acta Horticulturae*, 984: 409-414.
- Muñoz, M. 2015. Cerezas: frutas en expansión, Agosto 2015. (Informe), Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA). Santiago, Chile: ODEPA. 6p.
- Peschel, S.; R. Franke; L. Schreiber and M. Knoche. 2007, Apr. Composition of the cuticle of developing sweet cherry fruit. *Phytochemistry*, 68(4): 1017-1025.
- Podestá, L.; M. Rodríguez; F. Gil y C. Arjona. 2001, nov. Efecto del ácido giberélico y del calcio sobre el tamaño, agrietamiento y otros parámetros de calidad en frutos de cerezo (*Prunus avium* L.) cv. Bing. *Investigación Agraria: Producción y Protección Vegetal*, 16(1): 37-48.
- Proebsting, E.; G. Carter and H. Mills. 1973, Jan. Quality improvement in canned 'Rainier' cherries (*Prunus avium* L.) with gibberellic acid. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 98(4): 334-336.
- Rehman, M.; G. Rather; N. Dar; M. Mir; U. Iqbal; M. Mir and K. R. Hakeem. 2015. Causes and prevention of cherry cracking: a review. (ch. 19, pp. 543-552). In: crop production and global environmental issues. Switzerland: Springer International Publishing. 604p.
- Remon, S.; A. Ferrer; M. E. Venturini and R. Oria. 2006, Mar. On the evolution of key physiological and physicochemical parameters throughout the maturation of 'Burlat' cherry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(4): 657-665.
- Rios, J. C.; F. Robledo; L. Schreiber; V. Zeisler; E. Lang; B. Carrasco and H. Silva. 2015, Dec. Association between the concentration of n-alkanes and tolerance to cracking in commercial; varieties of sweet cherry fruits. *Scientia Horticulturae*, 197: 57-65.
- Rowland O.; H. Zheng; S. R. Hepworth; P. Lam; R. Jetter and L. Kunst. 2006, Nov. *CER4* encodes an alcohol-forming fatty acyl-coenzyme A reductase involved in cuticular wax production in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 142(3): 866-877.
- Santner, A. and M. Estelle. 2009, Jun. Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling. *Nature*, 459(7250): 1071-1078.
- Sekse, L. 1995, Jan. Cuticular fracturing in fruits of sweet cherry (*Prunus avium* L.) resulting from changing soil water contents. *Journal of Horticultural Science*, 70(4): 631-635.
- Sekse, L. 1998, Jul. Fruit cracking mechanisms in sweet cherries (*Prunus avium* L.), a review. *Acta Horticulturae*, 468: 637-648.
- Simon, G. 2006, Mar. Review on rain induced fruit cracking of sweet cherries (*Prunus avium* L.), its causes and the possibilities of prevention. *International Journal of Horticultural Science*, 12(3): 27-35.

- Takizawa, A.; H. Hyodo; K. Wada; T. Ishii; S. Satoh and H. Iwai. 2014, Feb. Regulatory specialization of xyloglucan (XG) and glucuronoarabinoxylan (GAX) in pericarp cell walls during fruit ripening in tomato (*Solanum lycopersicum*). *PloS one*, 9(2): e89871.
- Tvergyak, P. J. and D. G. Richardson. 1979, Apr. Diurnal changes of leaf and fruit water potentials of sweet cherries during the harvest period. *HortScience*. 14(4): 520-521.
- Usenik, V.; D. Kastelec and F. Stampar. 2005, Apr. Physicochemical changes of sweet cherry fruits related to application of giberellic acid. *Food Chemistry*, 90(4): 663-671.
- Vogg, G.; S. Fischer; J. Leide; E. Eyal; R. Jetter; A. Levy and M. Riederer. 2004, Jun. Tomato fruit cuticular waxes and their effects on transpiration barrier properties: functional characterization of a mutant deficient in a very-long-chain fatty acid beta-ketoacyl-CoA synthase. *Journal of Experimental Botany*, 55(401): 1401-1410.
- Wang, Y.; W. Lu; J. Li and Y. Jiang. 2006, Jan. Differential expression of two expansin genes in developing fruit of cracking-susceptible and resistant litchi cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 131(1): 118-121.
- Way, R. D. 1967. Cherry varieties for New York State. (Bulletin n° 1197). New York state college of agriculture and life sciences. New York, U.S.A.: New York State Agricultural Experiment Station. 6p.
- Yamaguchi, M.; T. Haji and H. Yaegaki. 2004, Sept. Differences in mesocarp cell number, cell length, and occurrence of gumming in fruit of Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) cultivars during their development. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 73(3): 200-207.
- Yildirim, A. and F. Koyuncu. 2010, Sept. The effect of gibberellic acid applications on the cracking rate and fruit quality in the '0900 Ziraat' sweet cherry cultivar. *African Journal of Biotechnology*, 9(38): 6307-6311.

CAPÍTULO II. EFECTO DE LA APLICACIÓN DE ÁCIDO GIBERÉLICO SOBRE LA PARTIDURA DE CEREZA Y LA EXPRESIÓN DE GENES ASOCIADOS

RESUMEN

Chile es uno de los mayores productores y exportadores de cerezas del Hemisferio Sur, presentando una superficie plantada de 20.591 ha, las que durante la temporada 2014-2015 generaron un valor de USD 450 millones en exportaciones, ubicando este rubro como el tercer mayor generador de valor en las exportaciones frutícolas del país. Sin embargo, uno de los principales problemas que han debido enfrentar los productores de cereza corresponde a la partidura de los frutos, provocada principalmente por las lluvias durante precosecha, aunque también está determinada por componentes genéticos y de desarrollo del fruto. Se ha visto que aplicaciones de ácido giberélico (GA_3), las cuales son empleadas comúnmente en los huertos de cerezos para retrasar la cosecha y aumentar la firmeza, también han logrado reducir este problema. Se han estudiado diversos mecanismos que podrían estar involucrados en la menor incidencia del problema, como la composición de la membrana cuticular, particularmente una mayor concentración de alcanos, y la modificación de la pared celular, debido a que cambios abruptos en su estructura influyen en una mayor susceptibilidad a este problema. Se trabajó sobre la hipótesis de que tratamientos con GA_3 , aplicados en dos estados de desarrollo reducen la incidencia a la partidura, alterando la expresión de genes involucrados con síntesis de la cutícula y modificación de la pared celular. Se usaron variedades con distinta susceptibilidad a la partidura ('Kordia', 'Regina' y 'Lapins') y se evaluaron variables de calidad, partidura en campo e inducida y la expresión de genes relacionados con la síntesis de cutícula (*PaKCS6*, *CER4* y *ABC-2*) y con la modificación de la pared celular (*EXP-A3* y *XET-6*), 15 y 30 días después de aplicación (DDA) en 'Kordia' y 'Lapins'. Para ello se aplicaron cuatro concentraciones de GA_3 (0; 10; 20 y 30 mg L⁻¹) en dos estados de desarrollo del fruto (verde translúcido y amarillo pajizo). Se observó que los tratamientos con GA_3 reducen la susceptibilidad a la partidura en un 6% en 'Lapins', 7% en 'Regina' y 15% en 'Kordia'. Además, se determinó que el uso de GA_3 aumentó la expresión de los genes *CER4*, *EXP-A3* y *XET-6* en 'Lapins', contrario a lo sucedido en 'Kordia'. En cambio, no se observaron grandes cambios en *PaKCS6* y *ABC-2* en ninguna de las variedades evaluadas. En base a los resultados se puede concluir que las aplicaciones de GA_3 disminuyen la incidencia en la partidura y modifican la expresión de genes relacionados con biosíntesis de cutícula y la estructura de la pared celular.

Palabras clave: *Prunus avium* L., regulador de crecimiento, expansinas, xiloglucano endotransglicosilasa, β -cetoacil-Coa sintasa, ácido graso-CoA reductasa, transportador ABC.

CHAPTER II. EFFECT OF THE APPLICATION OF GIBBERELIC ACID ON SWEET CHERRY CRACKING AND THE EXPRESSION OF RELATED GENES

ABSTRACT

Chile is one of the largest producers and exporters of cherries in the southern hemisphere, presenting a planted area of 20.591 ha, with a value of USD 450 million in exports during the 2014-2015 season, placing exportation of cherries as the third largest generator of value in fruit exports. One of the major problems associated with the production corresponds to fruit cracking which is mainly caused by rain fall during preharvest, but also it is determined by a genetic component as well as the development of fruit. In this regard, there are several practices used to reduce it, including the application of gibberellic acid (GA₃), which is commonly used in the cherry orchards to delay harvest time and increase firmness, showing also effects on the decrease of cracking. Several mechanisms have been studied that could be related to cracking, like the composition of the cuticular membrane, particularly a higher concentration of alkanes, and the modification of the cell wall, due to the fact that changes in the structure increased susceptibility to this problem. We worked on the hypothesis that treatment with GA₃, applied in two stages of development, reduces the incidence of cracking, altering the expression of genes involved in the wax/cuticle biosynthetic pathway and cell wall modification. Varieties with different susceptibility ('Kordia', 'Regina' y 'Lapins') were evaluated for quality parameters, cracking *in vitro* as well as in the field, and the expression of genes involved in the wax/cuticle biosynthetic pathway (*CER6*, *CER4* and *ABC transporter*) and in cell wall modification (*Expansin* and *XET6*). Analyzed were performed after 15 and 30 days after application of GA₃. Three sweet cherry varieties with different tolerance to cracking were used: Kordia, Regina and Lapins. Four doses of GA₃ (0; 10; 20 and 30 mg L⁻¹) were applied at two developmental stages (translucent green and straw-yellow). GA₃ applications reduced cracking by 6% in 'Lapins', 7% in 'Regina' and 15% in 'Kordia'. Additionally, GA₃ applications increased the expression of *CER4*, *EXP-A2* and *XET-6* in 'Lapins' contrary to what happened in 'Kordia'. However, no major transcriptional changes were observed for *PaKCS6* and *ABC-2* in any of the used varieties. Based in our analysis we can conclude that GA₃ applications reduced the incidence of cracking and also trigger a change in the expression of genes related with cell wall modification and wax/cuticle biosynthetic pathway.

Key words: *Prunus avium* L., growth regulator, expansin, xyloglucan endotransglucosylase, β -ketoacyl-CoA synthase, fatty acyl-coenzyme A, ABC transporter.

INTRODUCCIÓN

Existe un problema mayor en el proceso productivo de las cerezas, que corresponde a la partidura, generada principalmente por las precipitaciones durante el periodo de precosecha, siendo uno de los inconvenientes más relevante en la producción de cerezas tardías en el sur de Chile (Christensen, 1996; Looney, 1996; Sekse, 1998; Simon, 2006). Otros factores, como la variedad, portainjerto, tamaño y forma del fruto, potencial osmótico de la misma, características de la cutícula y el manejo de riego también inciden en este fenómeno. (Simon, 2006; Balbontín et al., 2013; Khadivi-Khub, 2015).

El daño que produce la partidura afecta directamente la calidad de la fruta, los cuales pueden llegar incluso al 90% de la producción en variedades más susceptibles (Christensen, 1996; Yildirim y Koyuncu, 2010). Por otro lado, el fruto se transforma en un hospedero en donde se desarrollan diversos patógenos, entre los que destacan hongos como *Botrytis* (Christensen, 1996; Borge et al., 1998), acentuando el deterioro de la fruta.

Para disminuir la incidencia de partidura, se utilizan diversas prácticas, que se clasifican de acuerdo al modo de acción, y que, según Balbontín et al. (2013), se dividen en tres grupos: las que se enfocan en la reducción de la humectación de la fruta en la etapa final de la madurez; las que reducen el potencial osmótico de la fruta durante la ocurrencia de lluvia; y las que previenen mediante la utilización de cubiertas de plástico o polietileno. Actualmente, la mejor alternativa para disminuir la partidura es el uso de cubiertas plásticas o de polietileno junto con el uso de variedades tolerantes. Sin embargo, la implementación de este método de control implica altos costos para los productores (Podestá et al., 2001; Yildirim y Koyuncu, 2010; Wang y Long, 2015; Kafkaletou et al., 2015).

Por otra parte, una práctica común, realizada en diversos huertos de cerezos del mundo, corresponde al uso de ácido giberélico (GA_3), el cual se utiliza principalmente para retrasar la producción, permitiendo cosechas tardías (Christensen, 1996; Podestá et al., 2001; Horvitz et al., 2003; Yildirim y Koyuncu, 2010). También mejoran la calidad del fruto, al aumentar la firmeza y la concentración de sólidos solubles (Choi et al., 2002; Cline y Trought, 2007; Canli y Orhan, 2009; Yildirim y Koyuncu, 2010), así como el peso y el diámetro ecuatorial del fruto (Horvitz et al., 2003; Cline y Trought, 2007; Canli y Orhan, 2009; Yildirim y Koyuncu, 2010), señalando, además, efectos sobre la disminución de la partidura (Looney, 1996; Yildirim y Koyuncu, 2010).

La partidura es un fenómeno complejo, donde intervienen diversos factores (Christensen, 1996). Si bien todavía no se ha descubierto la causa principal de este problema, se han incorporado a su estudio el uso de herramientas moleculares, las cuales se han enfocado en analizar principalmente los mecanismos relacionados con la composición de la membrana cuticular y la modificación de la pared celular (Balbontín et al., 2013).

En relación a la membrana cuticular, la composición de esta estructura ha sido propuesta como uno de los factores que puede influenciar en el desarrollo de la partidura en los frutos (Balbontín et al., 2013). En especies como manzanas y tomates, que poseen una síntesis

continua de componentes de la membrana cuticular, se observó baja incidencia de partidura. En cambio, en cerezas, cuando los frutos se encuentran en activo crecimiento, se produce una disminución en la deposición de componentes de la membrana cuticular, aumentando así la susceptibilidad a la partidura (Peschel y Knoche, 2005), por lo que la composición de la cutícula estaría influyendo directamente sobre esta problemática. Otro factor que se ha relacionado con la partidura corresponde a la modificación de la pared celular durante el desarrollo del fruto, en donde enzimas relacionadas con este proceso contribuyen a la degradación y extensión de la pared celular, jugando un papel sobre la susceptibilidad a la partidura entre distintas variedades (Brummell y Harpster, 2001).

Por esta razón, en el presente estudio, se realizaron investigaciones en la zona de Angol para determinar el efecto del GA₃, en distintas concentraciones y épocas de aplicación, sobre la partidura y expresión de genes relacionado con este fenómeno, utilizando las variedades Regina, Kordia (baja susceptibilidad a la partidura) y Lapins (susceptibilidad intermedia).

Hipótesis

La aplicación de ácido giberélico (GA₃), durante el desarrollo de cerezas en las variedades Kordia, Regina y Lapins, reduce la susceptibilidad a la partidura del fruto, aumentando la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de la membrana cuticular y la modificación de la pared celular.

Objetivos

Objetivo General

Determinar los efectos en la susceptibilidad a la partidura y expresión diferencial de genes en frutos de cerezo, que produce la aplicación de ácido giberélico (GA₃) en distintas concentraciones y en dos estados de desarrollo del fruto.

Objetivos específicos

- 1) Determinar los efectos del GA₃, en distintas concentraciones y épocas de aplicación, sobre la reducción en la partidura, en variedades con distintos niveles de susceptibilidad al daño.
- 2) Determinar y cuantificar la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de la membrana cuticular y la modificación de la pared celular, inducidos por la aplicación de GA₃ en distintas concentraciones.

MATERIALES Y MÉTODO

Ubicación de estudio

El ensayo se realizó en el huerto comercial de cerezos Maurelia Oriente de Inversiones Agrícola Buenos Aires S.A. (37°48'12,01''S; 72°39'07.87''O), en Angol, Región de la Araucanía, Chile.

Material biológico

Se utilizaron árboles de cerezos de las variedades Kordia, Regina y Lapins, injertados sobre el portainjerto F/12-1, plantados entre los años 2001-2002, con un marco de plantación de 3 x 5 m, conducidos en eje central. En el huerto se empleó una malla blanca reflectora en la entrehilera (ExtendayTM, Estados Unidos), con el objetivo de mejorar la iluminación y por ende el color de la fruta.

Tratamientos y diseño experimental

Se implementaron ensayos independientes para cada variedad, estableciéndose 8 tratamientos en cada uno (Cuadro 1). Estos consistieron en la combinación de dos épocas de aplicación según el estado de desarrollo verde traslúcido (13; 15 y 20 de noviembre del 2013, para 'Lapins', 'Kordia' y 'Regina', respectivamente) y amarillo pajizo (20; 21 y 27 de noviembre del 2013, para 'Lapins', 'Kordia' y 'Regina', respectivamente), con cuatro concentraciones de ácido giberélico (0; 10; 20 y 30 mg L⁻¹). El producto utilizado como fuente de GA₃ fue ProGibb[®] (40% SG, Valent BioSciences Chile S.A., Estados Unidos).

Cuadro 1. Concentración y épocas de aplicación de ácido giberélico

Tratamientos	Concentración de GA ₃ (mg L ⁻¹)	Estado de desarrollo
Control _(0-vt) ¹	0	Verde traslúcido
Control _(0-ap)	0	Amarillo pajizo
GA _(10-vt)	10	Verde traslúcido
GA _(10-ap)	10	Amarillo pajizo
GA _(20-vt)	20	Verde traslúcido
GA _(20-ap)	20	Amarillo pajizo
GA _(30-vt)	30	Verde traslúcido
GA _(30-ap)	30	Amarillo pajizo

¹ Entre paréntesis se indica la concentración y la época de aplicación de GA₃; vt=verde traslúcido, ap=amarillo pajizo.

La aplicación se realizó mediante una pulverizadora de espalda (modelo Port 423, Solo, Alemania) con capacidad de 12 L. El volumen de mojamiento aproximado fue el equivalente a 1500 L/ha (2,25 L/árbol).

Para ello se estableció un diseño en bloques completamente aleatorizados, con estructura factorial de tratamientos 2 x 4, siendo el primer factor las dos épocas de aplicación y el segundo, las cuatro concentraciones de GA₃. Cada tratamiento contó con 5 repeticiones, en donde la unidad experimental fue un árbol. El criterio de bloqueo fue la hilera de plantación y los árboles fueron seleccionados por tamaño y vigor similar, junto con un buen estado fitosanitario.

Evaluaciones

A partir de 92 días después de plena flor, y cada 18 días, se colectaron cinco yemas basales por árbol de los brotes de la temporada, hasta observar la diferenciación de los órganos florales. A su vez, se colectaron muestras de 5 frutos de forma aleatoria por unidad experimental, 15 y 30 días después de aplicación, para evaluar la expresión génica.

En cada variedad se realizaron 2 cosechas parciales, considerando como el índice de cosecha al color del fruto, siendo la tonalidad caoba para ‘Lapins’ y caoba oscuro para ‘Kordia’ y ‘Regina’, según tabla de color y calibre de cerezas (Pontificia Universidad Católica de Chile, Chile). En la primera cosecha (14; 16 y 21 de diciembre del 2013, para ‘Lapins’, ‘Kordia’ y ‘Regina’, respectivamente) se colectó una muestra de 120 frutos por unidad experimental, para evaluar la calidad de la fruta a cosecha, partidura y diámetro ecuatorial. En la segunda cosecha (22 y 26 de diciembre del 2013, para ‘Lapins’-‘Kordia’ y ‘Regina’, respectivamente) se colectaron 50 frutos por unidad experimental, en donde sólo se evaluó la calidad de la fruta a cosecha.

Calidad de la fruta a cosecha

En madurez del total de los frutos extraídos, se seleccionaron muestras de 25 frutos, sin defectos, de calibre medio 26 a 30 mm, mediante la utilización de un calibrador de alveolos.

Se evaluó la calidad de acuerdo a las siguientes variables; firmeza, se determinó mediante la resistencia a la deformación, con un equipo Durofel (modelo DFT 100, Agro-Technologie, Francia), en donde los resultados se expresaron en escala 0 a 100, donde 0 indica ausencia de resistencia y 100, sin deformación; masa de los frutos con pedúnculo, se evaluó con una balanza digital (modelo TX2202L, Shimadzu, Japón) y los valores se expresaron en gramos; concentración de sólidos solubles, se evaluó mediante un refractómetro digital termocompensado (modelo PAL, Atago, Japón), expresando los resultados en grados Brix; acidez titulable se determinó con un pH-metro (modelo HI 2221, HANNA[®], Italia), mediante la titulación de 5 mL de jugo con NaOH 0,1 N hasta la

neutralización de los ácidos, a pH 8,2-8,3, y los resultados se expresaron como porcentaje de ácido málico, según la metodología de Podestá et al. (2001).

Partidura

Se evaluó la partidura en campo, recolectando una muestra de 50 frutos por unidad experimental, en madurez de cosecha, escogidos aleatoriamente de la parte media y periférica de la copa, contabilizando los frutos con fisuras en la epidermis. Además, a cada fruto se le midió el diámetro con un calibrador de alvéolos.

Adicionalmente, se determinó la partidura inducida, en una muestra 30 frutos por árbol, sin defectos, de calibre medio y con coloración correspondiente a la madurez del fruto. Para determinar la partidura se utilizó el método de Christensen (1996) modificado para 30 frutos, sumergiendo los frutos en 2 L de agua desmineralizada a una temperatura constante, 14-16 °C y determinando el número de frutos con partidura luego de 2; 4 y 6 h. Los valores fueron expresados como porcentaje de frutos con partidura (FP) e índice de partidura inducida.

Desarrollo reproductivo

Se realizó un seguimiento del estado reproductivo de las yemas, para lo cual se colectaron 5 yemas basales de brotes de la temporada por árbol, para determinar su condición. La extracción se llevó a cabo en cuatro oportunidades durante la temporada 2014 (9 de enero, 27 de enero, 14 de febrero y 11 de marzo).

Una vez extraídas, las yemas se almacenaron en frascos en una solución de alcohol al 70%. Posteriormente, éstas fueron disectadas y se observaron con una lupa estereoscópica (Q-106Z2T, Quimis, Estados Unidos). Su evolución morfoanatómica se determinó según la escala de estados de desarrollos utilizada por Engin y Ünal (2007): ED 1, meristemo redondeado y formación primaria de las brácteas; ED 2, se distinguen los primordios foliares de forma redondeada y alargada y se observan las brácteas; ED 3, se distinguen los primordios foliares y los primordios de sépalos ordenados en espiral; ED 4, diferenciación de los primordios de los pétalos y ED 5, todos los órganos florales diferenciados, incluyendo sépalos, pétalos, estambres y pistilo. En este caso, los pétalos no pueden ser vistos y los estambres y el pistilo están completamente cubiertos por los sépalos.

Para el análisis estadístico se creó un índice de diferenciación de primordios florales (IDPF), correspondiente a la media aritmética del estado de las yemas evaluadas (Aburto, 2012).

Expresión génica

Para el análisis de expresión génica se utilizaron dos variedades con grados contrastantes de susceptibilidad a la partidura, 'Kordia', de baja susceptibilidad, y 'Lapins', de

susceptibilidad intermedia y las concentraciones utilizadas fueron 0; 10 y 30 mg L⁻¹. Por cada unidad experimental, 15 días después de las aplicaciones de GA₃ y luego a cosecha, se colectaron muestras de 5 frutos. Cada muestra fue congelada con nitrógeno líquido y almacenada a -80 °C, para conservar y mantener la integridad del ARN. Luego, las muestras congeladas se molieron para realizar la extracción de ARN, según el protocolo de extracción de ARN de frutos de Meisel et al. (2005). Éstas posteriormente fueron cuantificadas en el espectrofotómetro (EPOCH, Biotec, Estados Unidos) y, para ello, se usó el programa GEN5. Después, el ADNc fue sintetizado a partir de 1 µg de ARN utilizando el procedimiento de ADNc, según el protocolo RevertAid First Strand ADNc Synthesis Kit (Thermo Scientific, Estados Unidos). Por último, se realizó la cuantificación de los genes de interés mediante la utilización de una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR). Se seleccionaron genes relacionados con la biosíntesis de cera y aquellos que modifican la estructura de la pared celular. Para ello se efectuó un análisis del transcriptoma y se observó si estos presentaban expresión diferencial entre las variedades utilizadas. Los genes relacionados con la biosíntesis de cutícula escogidos para este estudio fueron: β- cetoacil- Coa sintasa (*PaKCS6*); Acil-CoA graso reductasa (*CER4*) y transportador ABC tipo-2 (*ABC-2*). Los genes escogidos para la modificación de la pared celular son: expansina-A3 (*EXP-A3*) y xiloglucano endotransglicosilasa 6 (*XET-6*), como se observa en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Descripción de genes de interés y secuencia de partidores utilizados para el RT-qPCR.

Gen	Descripción	Partidores 5'----->3'	Ta ¹ (°C)	Tamaño Amplicon (pares de bases)
<i>PaKCS6</i>	β-cetoacil-Coa sintasa	F AGGAAGAGCAACTGCTCCGA R TCTGATGGCGATCGCAGGAG	58,6	90
<i>CER4</i>	Acil-CoA graso reductasa	F TCTTCCCAAGGACCATTACG R GTGTCTGGCAGATTGCCTTT	60	101
<i>ABC-2</i>	Transportador ABC tipo 2	F GGT TTGAGAAGTTGGAGGGA R CTTC CGTGCTCTTTCATCGC	56,6	119
<i>XET-6</i>	Xiloglucano endotransglicosilasa 6	F TCTGCATCAACTAGCAACGC R TCGCTTAGTGTCAGTGCAGT	56,3	121
<i>EXP-A3</i>	Expansinas-like-A3	F TCACCAAGAACCGGA ACTGT R GATGTTGCTCAGGTCGGTTC	56,4	96

¹ Ta= temperatura de amplificación.

Las reacciones de amplificación se realizaron utilizando el protocolo Fast EvaGreen® qPCR Master Mix (Biotium, Estados Unidos), que amplifica y cuantifica los genes simultáneamente. Para ello se empleó una mezcla con un 'Master Mix', los partidores del gen y agua DEPC. Luego, en una placa (Eco, Illumina; Estados Unidos), se depositó la mezcla con 9 µl y se agregó 1 µl de ADNc. Cada reacción se hizo por triplicado y un control negativo de agua se incluyó en cada ejecución. La amplificación se llevó a cabo mediante un termociclador (Eco, Illumina; Estados Unidos).

Las condiciones de RT-qPCR fueron las siguientes: primer ciclo 95 °C durante 2 min; luego 40 ciclos de 95 °C por 10s; después una curva de fusión de 95 °C durante 15 s; a continuación un ciclo de 55 °C por 15 s y, por último, uno de 95 °C durante 15 s. El programa utilizado para el análisis del RT-qPCR fue el Eco Real-Time PCR System versión 3.0.16.0 (Illumina, 2015).

De acuerdo a análisis bioinformáticos realizados en el laboratorio de genómica funcional y bioinformática, se encontró como gen de referencia a Homeobox protein 54, que permite normalizar la expresión de los transcritos, ya que bajo las condiciones utilizadas mostraba poca variación en su expresión.

Además, se realizó una comparación de la expresión de *PaKCS6* y *CER4* entre variedades de distintas zonas geográficas. Por un lado, 'Kordia', 'Lapins' y 'Bing' de la VII región (Curicó) y por otro, 'Kordia' y 'Lapins' de la IX región (Angol). Para ello, se evaluó la expresión génica en dos estados de desarrollo del fruto (amarillo pajizo y madurez de cosecha).

Análisis estadístico

Se realizaron análisis mediante modelos lineales mixtos, que incluyó efectos aleatorios, utilizando el programa R de Infostat ($p < 0,05$). La época, la concentración y la interacción entre estos factores se consideraron como efectos fijos, mientras que el bloque se trató como efecto aleatorio. Cuando se detectó interacción, se analizaron las diferencias entre los niveles de cada factor para cada uno de los niveles del otro factor. Para separar promedios, se utilizó la prueba de LSD de Fisher ($\alpha < 0,05$).

Para el estudio de las variables de calidad, como firmeza, sólidos solubles y masa, se utilizó el bloque y la fecha de cosecha de los frutos como efecto aleatorio. Mientras que, para el análisis de la partidura en campo, se empleó como covariable el tamaño de los frutos. Para la evaluación del tiempo de inmersión en la partidura inducida, se realizó un análisis de medidas repetidas en el tiempo, mediante el uso de modelos lineales generalizados mixtos, en donde la concentración y el tiempo se consideraron como efectos fijos, mientras que, el bloque se utilizó como efecto aleatorio.

Con el propósito de realizar un análisis exploratorio entre las variables a madurez, se realizó un análisis de componentes principales (ACP). Las variables fueron la masa del fruto, firmeza, diámetro ecuatorial, sólidos solubles, acidez del fruto y partidura inducida y el criterio de observación fue el tratamiento aplicado.

Para todos ellos, se utilizó el programa estadístico Infostat versión 2013 (Di Rienzo et al., 2013). Como complemento del análisis de comparaciones múltiples, se empleó el software estadístico DSAASTAT de excel versión 1.0192 (Onofri, 2007).

RESULTADOS

‘Lapins’

Calidad de la fruta a cosecha

Las aplicaciones de GA₃ produjeron aumentos notorios de la firmeza y la concentración de sólidos solubles. Con respecto a la época, ésta no mostró un efecto claro y, en relación a la concentración, se observaron cambios más significativos con 30 mg L⁻¹ de GA₃.

En la evaluación de la firmeza se observó interacción (Figura 1A), en donde se vio que el ácido giberélico (GA₃), en todas sus concentraciones y aplicados en los dos estados de desarrollo, aumenta la firmeza. Destacando todos los tratamientos con GA₃ realizados en el estado verde traslúcido y 30 mg L⁻¹ de GA₃ en amarillo pajizo, los cuales producen un aumento en 5 unidades durofel (UD) aproximadamente en comparación al control

Con respecto a la concentración de sólidos solubles (Figura 1B), no se observó interacción ni diferencias debido a la época de aplicación. Sin embargo, se observó que todas las concentraciones de GA₃ produjeron un incremento de esta variable, destacándose 30 mg L⁻¹ de GA₃, el cual aumentó en 1,59 °Brix por sobre el control.

En relación a la masa de los frutos (Figura 1C), no hubo un efecto claro sobre la masa, ya que mostró una respuesta variable, en donde, la aplicación en el estado verde traslúcido con 20 mg L⁻¹ de GA₃ presentó una disminución de 1 g. En cambio, los demás tratamientos con GA₃ no mostraron diferencias estadísticamente significativas con los testigos, lo que indica que no se observó un efecto del GA₃ sobre la masa.

Al analizar la acidez de los frutos (Figura 2), se detectaron diferencias significativas debido a la concentración de GA₃, en la cual todos los tratamientos, independiente de la época de aplicación, indujeron en promedio un incremento de 0,138% de acidez por sobre el testigo.

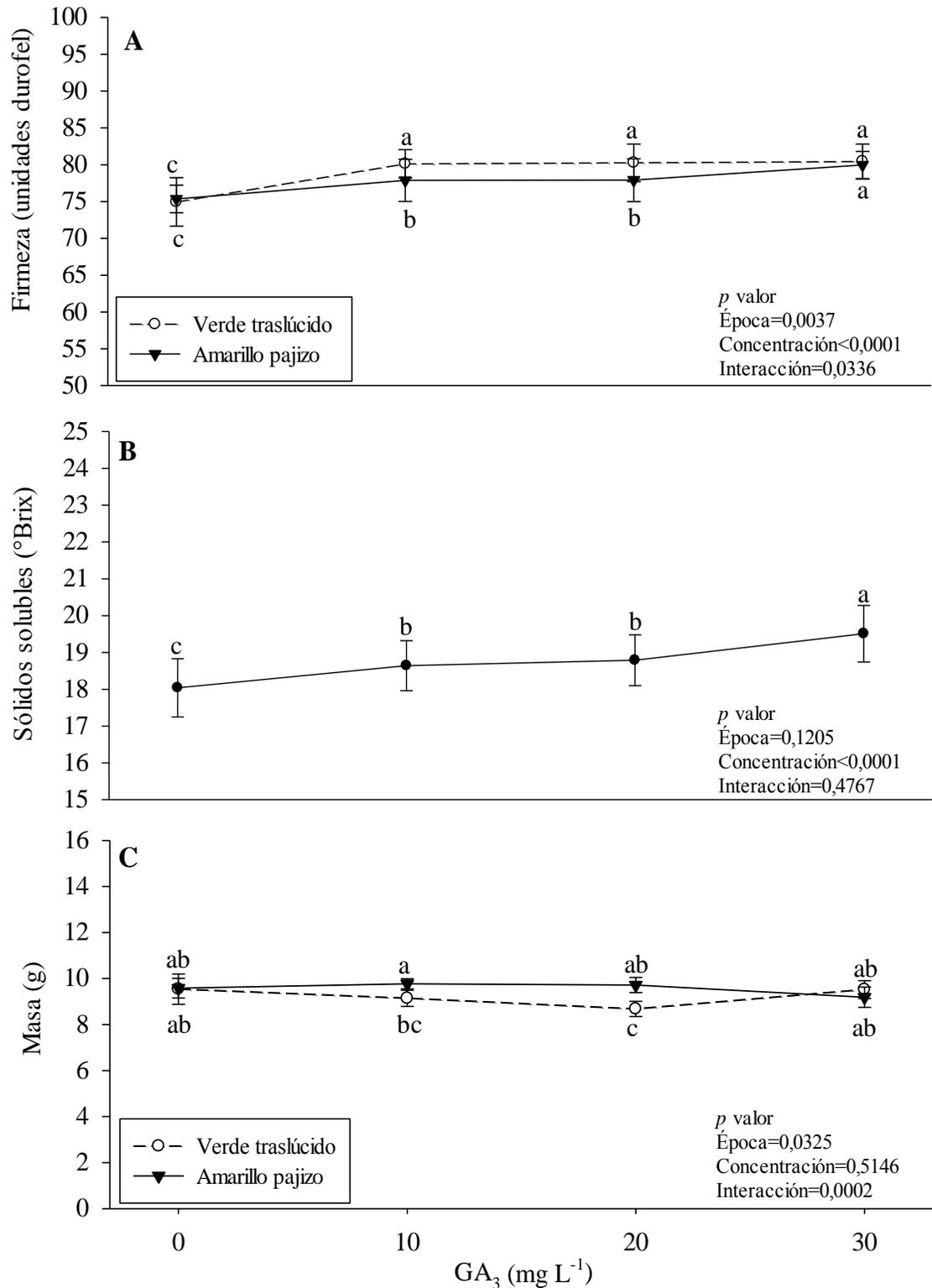


Figura 1. Efecto de las aplicaciones de ácido giberélico (GA₃) sobre la firmeza (A); concentración de sólidos solubles (B) y la masa (C) en los frutos de 'Lapins'. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (LSD Fisher, $p=0,05$).

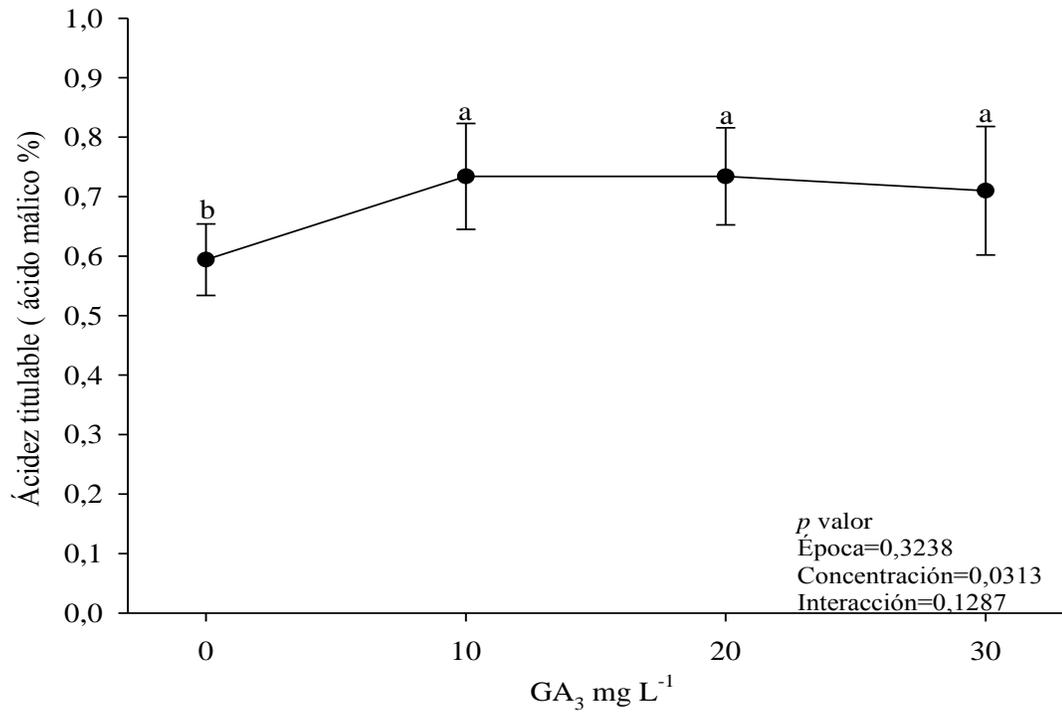


Figura 2. Efecto de las distintas concentraciones de ácido giberélico (GA₃) sobre la acidez titulable (% de ácido málico) de los frutos, en 'Lapins'. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (LSD Fisher, $p=0,05$).

Diámetro de frutos

En cuanto al porcentaje de distribución de los frutos (Figura 3), no hubo interacción en ninguna de las evaluaciones realizadas. Al examinar los frutos menores a 22 mm de diámetro, se observaron diferencias estadísticamente significativas debido a la concentración ($p<0,0001$), pues los tratamientos con GA₃ no presentaron frutos con este diámetro, a diferencia del testigo que muestra un 2,8% de frutos. En cuanto a la categoría 22-24; 24-26; 26-28 y >28 mm de diámetro, no se observaron diferencias estadísticas por la concentración ni por la época de aplicación (Figura 3).

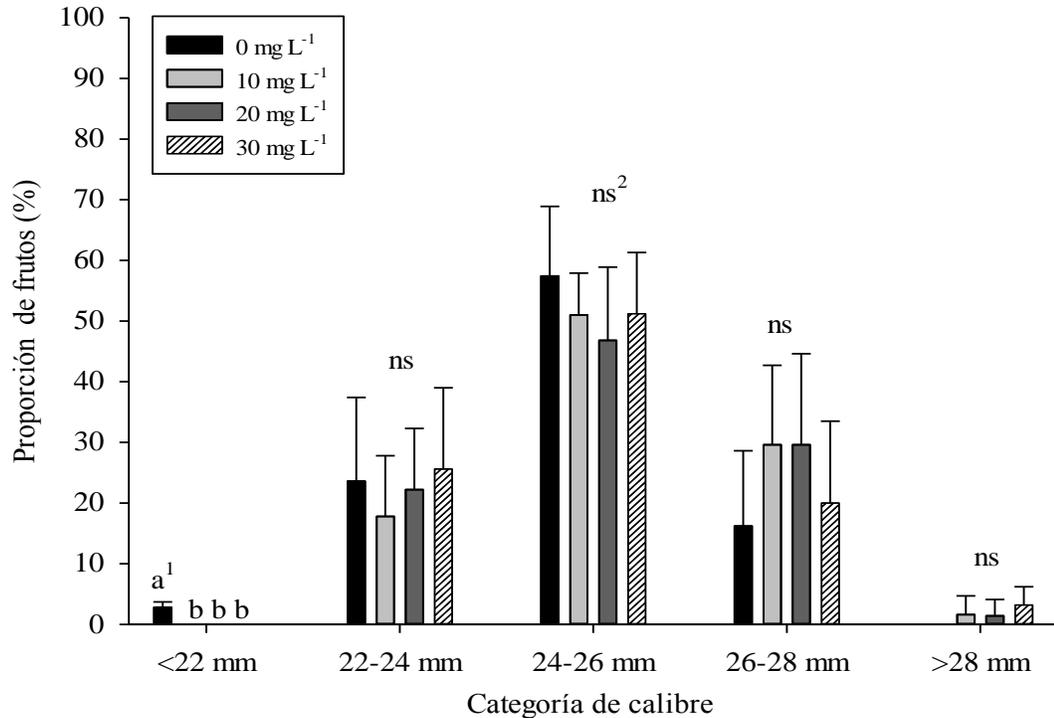


Figura 3. Efecto de distintas concentraciones de ácido giberélico (GA₃) sobre la distribución porcentual de frutos por calibre, en ‘Lapins’. ¹ Letras distintas para un calibre indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, según prueba de LSD Fisher ($p=0,05$). ² ns: Diferencias no significativas ($p>0,05$).

Cabe destacar que, en general, los tratamientos con GA₃ mostraron un aumento en el porcentaje de frutos de mayor diámetro (>26 mm), a diferencia del control que presentó un mayor porcentaje con diámetros <22 mm, lo que sugiere que hubo un desplazamiento hacia mayores tamaños con los tratamientos de GA₃, llegando a cosecha con un incremento de frutos de mayor calibre (Figura 3).

Partidura de frutos

En relación al índice de partidura (Figura 4A), no hubo interacción entre los distintos factores, pero sí por efecto de la concentración se observaron diferencias significativas, en el cual los tratamientos con GA₃ presentaron alrededor de un 32% menos de fruta partida con respecto al control (IP=19,13). Al examinar la época de aplicación, no se detectaron diferencias estadísticas entre los niveles de ese factor.

Cuando se analizó la partidura en campo, ésta no presentó interacción ($p=0,2242$), ni diferencias estadísticas por ninguno de los factores estudiados.

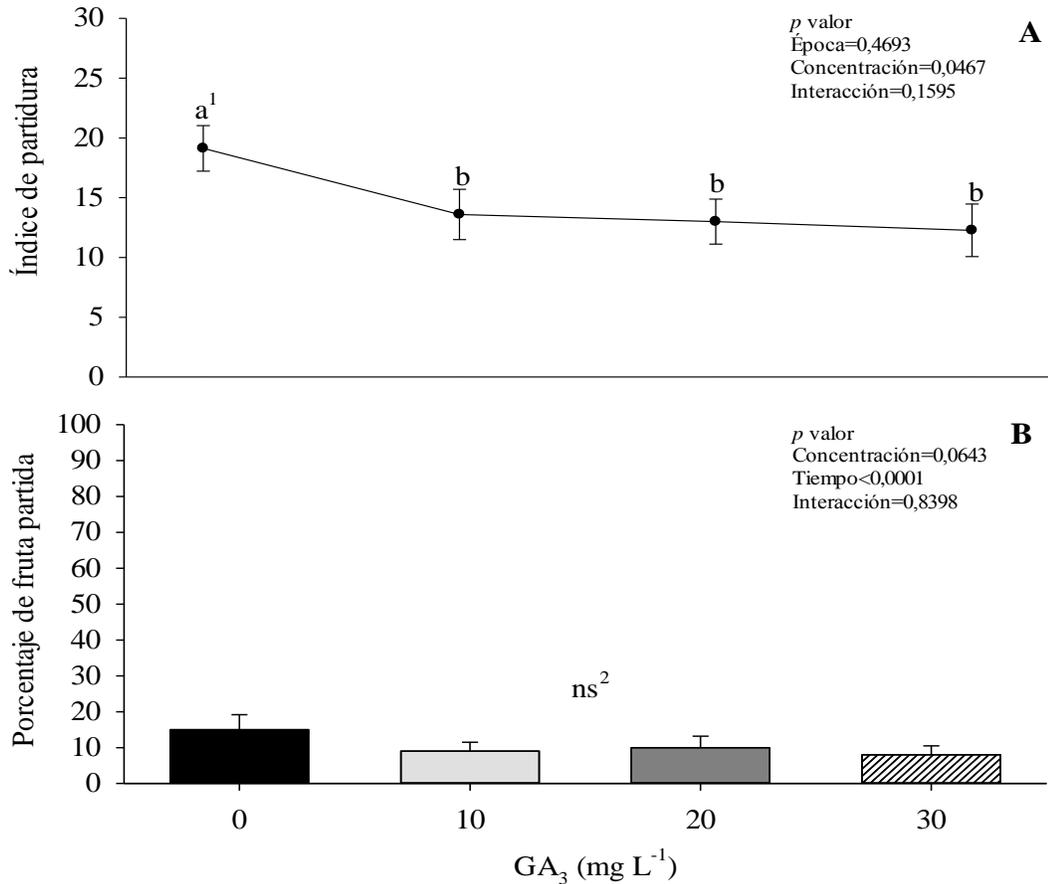


Figura 4. Efecto de distintas concentraciones de ácido giberélico (GA₃) en los frutos de 'Lapins'. (A) Índice de partidura y (B) porcentaje de fruta partida. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, según prueba de LSD Fisher ($p=0,05$).

Al analizar el tiempo de inmersión, no hubo interacción (tiempo * concentración) ni diferencias por la concentración, aunque los tratamientos con GA₃ exhibieron una disminución en la fruta partida de un 6% respecto del control (Figura 4B). Por otra parte, cuando se evaluó el porcentaje de partidura en el tiempo, sí se vieron diferencias significativas, mostrando un incremento del porcentaje de frutos partidos a medida que aumentaba el tiempo de inmersión, ya que se produjo un alza de un 35% después de 6 horas de sumergir la fruta en agua (Figura 5).

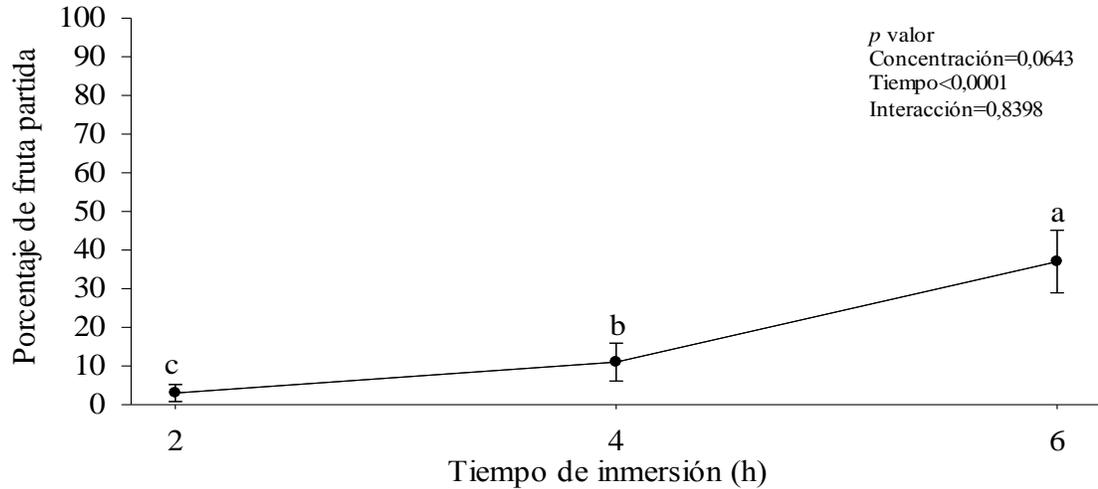


Figura 5. Porcentaje de fruta partida luego de 2; 4 y 6 h, en 'Lapins'. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, según prueba de LSD Fisher ($p=0,05$).

Con respecto al lugar de partidura, no se distinguió interacción entre los factores ni diferencias debido a la época de aplicación, en ninguna de las zonas observadas. Sin embargo, sí se detectaron diferencias significativas debido a la concentración en la zona peduncular, donde 0 y 10 mg L⁻¹ de GA₃ presentaron un 13% más de frutos partidos que 30 mg L⁻¹ de GA₃. Además, se observó una disminución en la incidencia de este problema a medida que aumentó la concentración de GA₃ (Figura 6). En cuanto a la partidura estilar y en las mejillas, no hubo diferencias debido a ninguno de los factores evaluados (Figura 6).

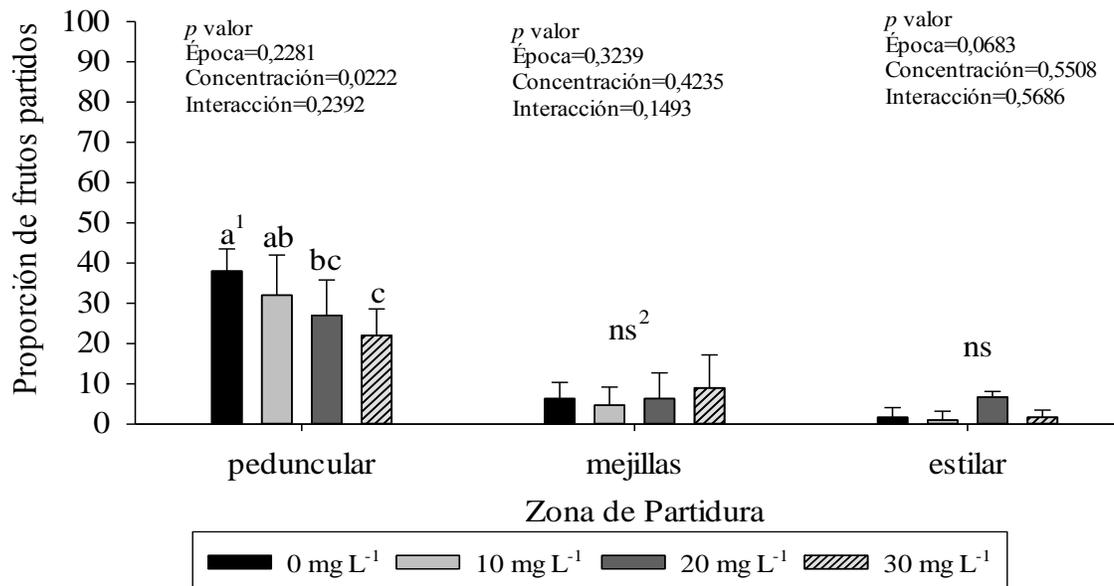


Figura 6. Efecto de distintas concentraciones de ácido giberélico (GA₃) sobre la zona de partidura en los frutos de 'Lapins'. ¹ Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, según prueba de LSD Fisher ($p=0,05$). ² ns: Diferencias no significativas ($p>0,05$).

Desarrollo reproductivo

El índice de diferenciación de primordios foliares (IDPF) en la variedad Lapins no presentó interacción entre los factores en ninguna de las fechas evaluadas. Sin embargo, en la primera fecha (09 de enero del 2014) exhibió diferencias significativas debido a la concentración ($p=0,0081$), presentando valores entre 1,18 y 1,40 (Figura 7). Los valores indican, por una parte, que la yema se encontraba en transición del meristemo redondeado y la formación primaria de las brácteas (ED 1) y, por otra, en la distinción de primordios foliares de forma redondeada y alargada (ED 2). Además, los resultados indicaron que los tratamientos de GA₃ tienen una menor diferenciación que el control.

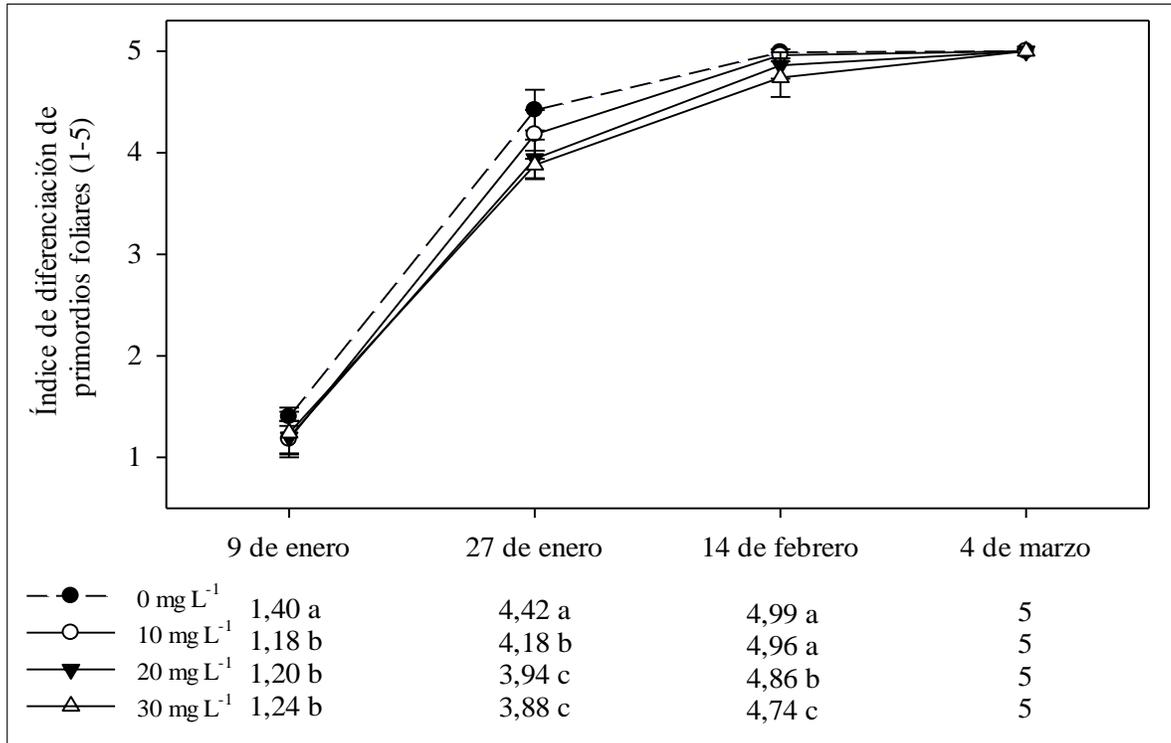


Figura 7. Efecto de distintas concentraciones de ácido giberélico (GA₃) sobre el índice de diferenciación de primordios florales, en 'Lapins'. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, según prueba de LSD Fisher ($p=0,05$).

Para la segunda fecha (27 de enero del 2014), al igual que en la evaluación anterior, se observaron diferencias significativas por la concentración de GA₃ ($p<0,0001$), manifestando un retraso en el IDPF con la aplicación de este regulador de crecimiento, en donde se acentuó el efecto con 30 mg L⁻¹ de GA₃ (Figura 7). Al observar las yemas, se vieron cambios morfológicos en la formación floral, en donde se comenzó a distinguir los primordios foliares y los primordios de los sépalos ordenados en espiral (ED 3). La evaluación realizada el 14 de febrero del 2014, siguió la misma tendencia anterior, mostrando diferencias significativas por la concentración de GA₃ ($p<0,0001$), en donde sólo 20 y 30 mg L⁻¹ de GA₃ se distinguieron del control, presentando un menor desarrollo de las yemas (Figura 7). Adicionalmente, en este análisis se detectó la diferenciación de los

primordios foliares (ED 4). En cambio, en la recolección del 4 de marzo del 2014, todas las yemas de los distintos tratamientos presentaron el último estado evaluado, en el cual los órganos florales se encontraban completamente diferenciados, incluyendo sépalos, pétalos, estambres y el pistilo (ED 5).

En ninguna de las fechas evaluadas, se observaron diferencias estadísticamente significativas debido a la época de aplicación.

‘Regina’

Calidad de la fruta a cosecha

Los tratamientos con GA₃ aumentaron de manera significativa la firmeza y concentración de sólidos solubles. Con respecto a la concentración, se observó que 20 mg L⁻¹ de GA₃ produjeron los cambios más significativos, mientras que la época de aplicación, no mostró un efecto consistente en las evaluaciones de calidad.

Al analizar la firmeza, se observó interacción entre los tratamientos con GA₃, en donde las aplicaciones efectuadas en el estado verde traslúcido, con todas las concentraciones aumentaron la firmeza del fruto en 8 UD, de manera más consistente que los resultados exhibidos en el estado amarillo pajizo, ya que sólo 10 y 30 mg L⁻¹ aumentan la firmeza, en cambio, con 20 mg L⁻¹ de GA₃ no se ven cambios con respecto al control (Figura 8A).

En relación a la concentración de sólidos solubles, no se presentó interacción significativa entre los factores ni diferencias significativas por la época de aplicación, pero sí por la concentración de GA₃, donde todos los tratamientos con este fitorregulador aumentaron la concentración de sólidos solubles. GA₃ a concentraciones de 10 y 30 mg L⁻¹ provocaron aumentos de 0,93 y 0,89 °Brix, respectivamente, en comparación al control. Sin embargo, 20 mg L⁻¹ de GA₃ mostró el mayor efecto, pues su incremento llegó a 1,49 °Brix (Figura 8B).

Ahora bien, al analizar la masa del fruto (Figura 8C), se vio que aplicaciones de GA₃ con 10 y 20 mg L⁻¹ de GA₃ realizadas en el estado verde traslúcido mostraron un incremento de 0,64 y 0,81 g por sobre el control, a diferencia de los tratamientos realizados en el estado amarillo pajizo, que no producen cambios en relación al control (Figura 8C). Cabe destacar que el GA₃, a pesar de modificar esta variable, no generó cambios considerables, ya que todas las variaciones fueron menores a 1 g.

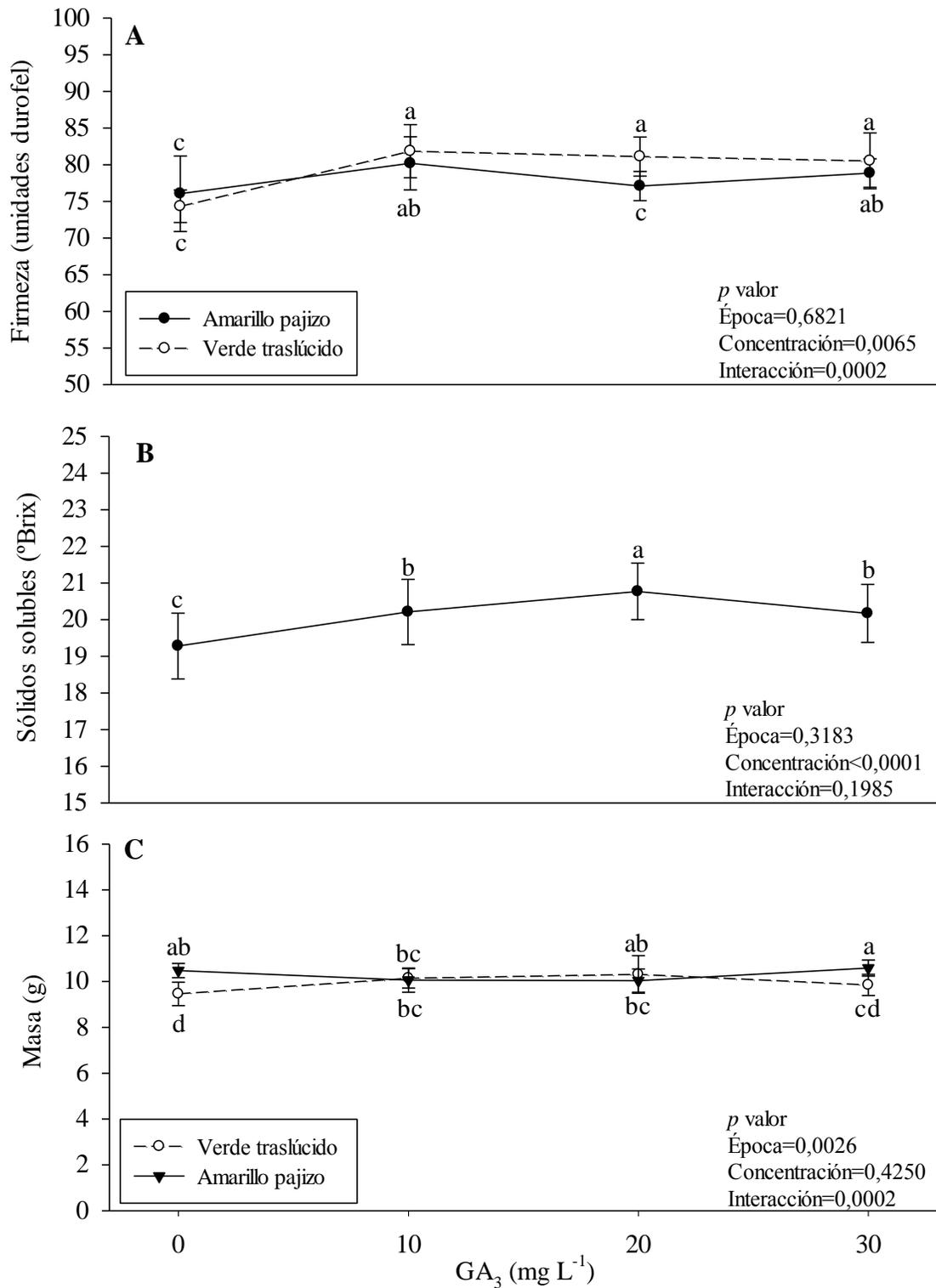


Figura 8. Efecto de la aplicación de ácido giberélico (GA₃) sobre la firmeza (A); concentración de sólidos solubles (B) y masa (C) en los frutos de 'Regina'. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (LSD Fisher, $p=0,05$).

Al analizar la acidez titulable (Cuadro 6, Apéndice IV), no hubo interacción ($p=0,9743$), ni diferencias estadísticamente significativas debido a ninguno los factores (concentración y época de aplicación).

Diámetro de frutos

En relación a la distribución de los calibres, con las aplicaciones de GA₃ no se detectó interacción significativa entre los factores (concentración y época de aplicación) en ninguna categoría. Sin embargo, entre 22-24 mm de diámetro (Figura 9), se observaron diferencias por la concentración ($p=0,0460$), en donde el control presentó la mayor cantidad de frutos, un 12,2% más que 10 mg L⁻¹ de GA₃ y 16,8% más que 20 y 30 mg L⁻¹ de GA₃; por la época de aplicación, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,4394$). Al evaluar 24-26 mm de diámetro, se detectaron diferencias estadísticamente significativas por la concentración ($p=0,0017$), mostrando mayor porcentaje de frutos con 0 y 10 mg L⁻¹ de GA₃ a diferencia de 20 y 30 mg L⁻¹ de GA₃ que presentaron un 9,9 y 16,6% menos de frutos que el control (Figura 9); no se observaron cambios significativos por la época de aplicación ($p=0,8598$).

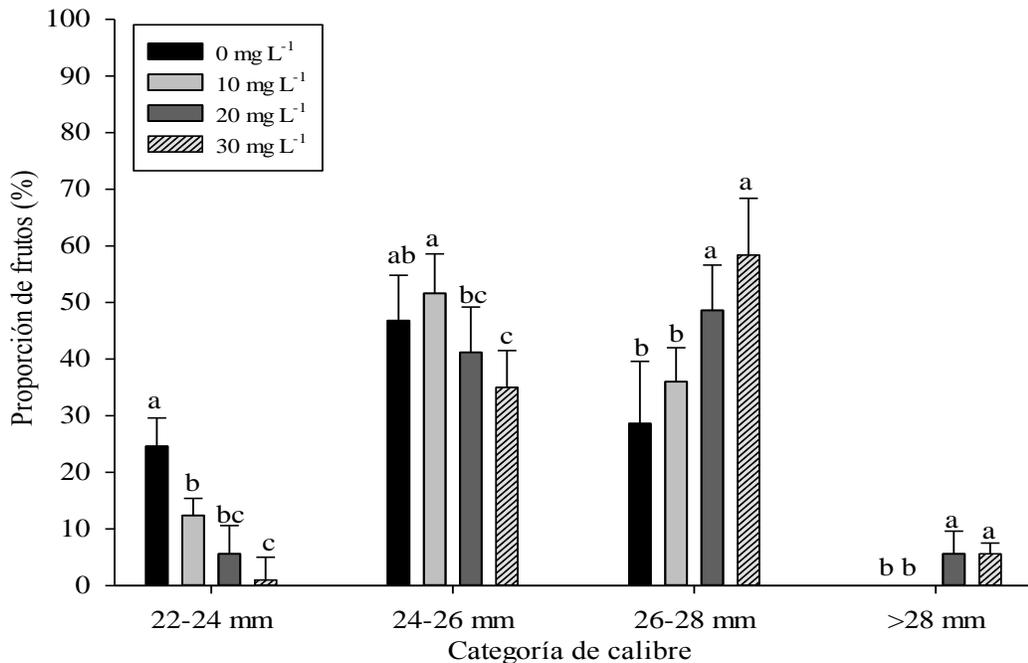


Figura 9. Efecto de distintas concentraciones de ácido giberélico (GA₃) sobre la distribución porcentual de frutos por calibre, en 'Regina'. Letras distintas para un calibre indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, según prueba de LSD Fisher ($p=0,05$). ² ns: Diferencias no significativas ($p>0,05$).

En lo que respecta a 26-28 mm de diámetro, de igual modo se vieron diferencias entre los distintos niveles de la concentración ($p<0,0001$), en donde 20 y 30 mg L⁻¹ de GA₃ se

diferenciaron estadísticamente del testigo y 10 mg L⁻¹ de GA₃, mostrando un 20 y 29,8% más frutos comparado con el control (Figura 9); en cuanto a la época de aplicación, ésta no presentó diferencias significativas ($p=0,3866$). Para frutos con un diámetro >28 mm, la concentración generó diferencias significativas ($p=0,0072$), en donde la aplicación de 20 y 30 mg L⁻¹ de GA₃ presentaron un 4,6 y 5,6% de frutos a diferencia de 0 y 10 mg L⁻¹ de GA₃ que no tenían frutos con ese diámetro (Figura 9); por la época de aplicación no hubo diferencias significativas ($p=0,5074$).

Por lo tanto, se puede señalar que 20 y 30 mg L⁻¹ de GA₃ aumentaron el porcentaje de frutos con un diámetro >26 mm, que correspondieron a mayores calibres. En cambio, 0 y 10 mg L⁻¹ de GA₃ presentaron una mayor cantidad de frutos con un diámetro <26 mm (Figura 9), por lo que el uso de este fitoregulator benefició el crecimiento del fruto y el efecto se hizo más patente a medida que se incrementó la concentración.

Partidura

Por otra parte, cuando se realizó el análisis para la partidura no se encontró interacción entre los factores en ninguna de las evaluaciones.

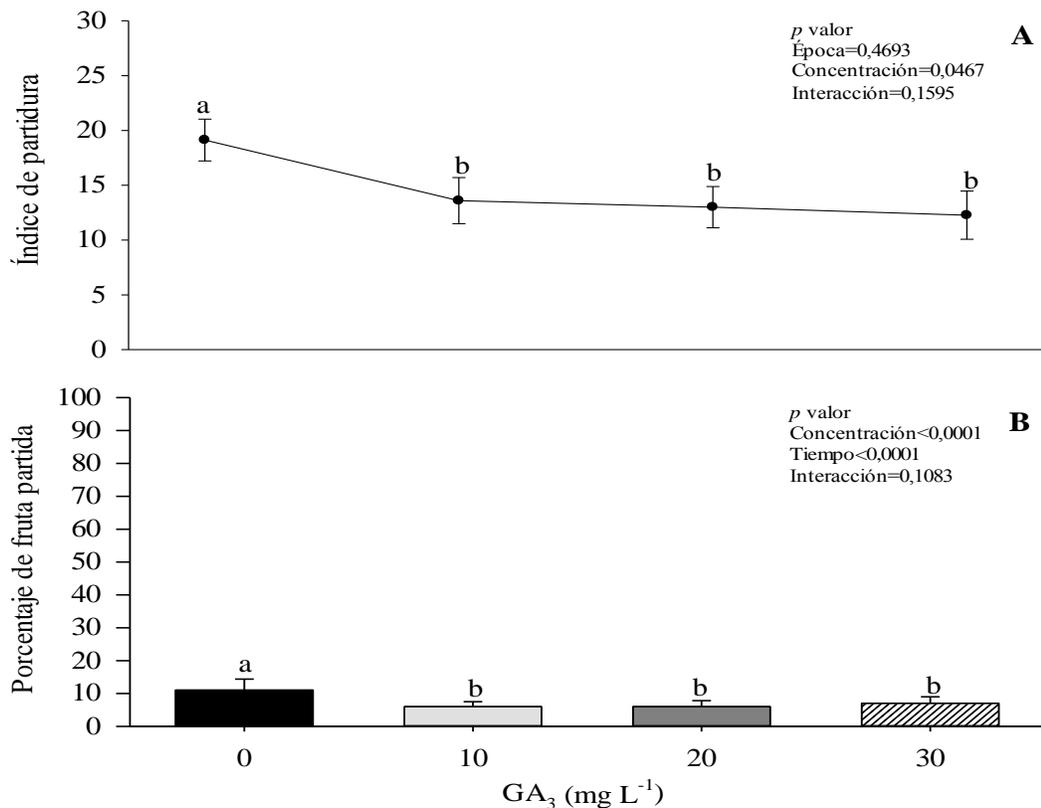


Figura 10. Efecto de distintas concentraciones de ácido giberélico (GA₃) en los frutos de 'Regina'. (A) Índice de partidura y (B) porcentaje de fruta partida. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, según prueba de LSD Fisher ($p=0,05$)

En cuanto al índice de partidura, se observó diferencias significativas debido a la concentración, en donde los tratamientos con GA₃ disminuyeron aproximadamente un 45,8% de fruta en relación al testigo (IP=14,67), demostrando un efecto consistente de este fitorregulador sobre la reducción en la incidencia de la partidura (Figura 10A); en relación a la época de aplicación no hubo variaciones significativas.

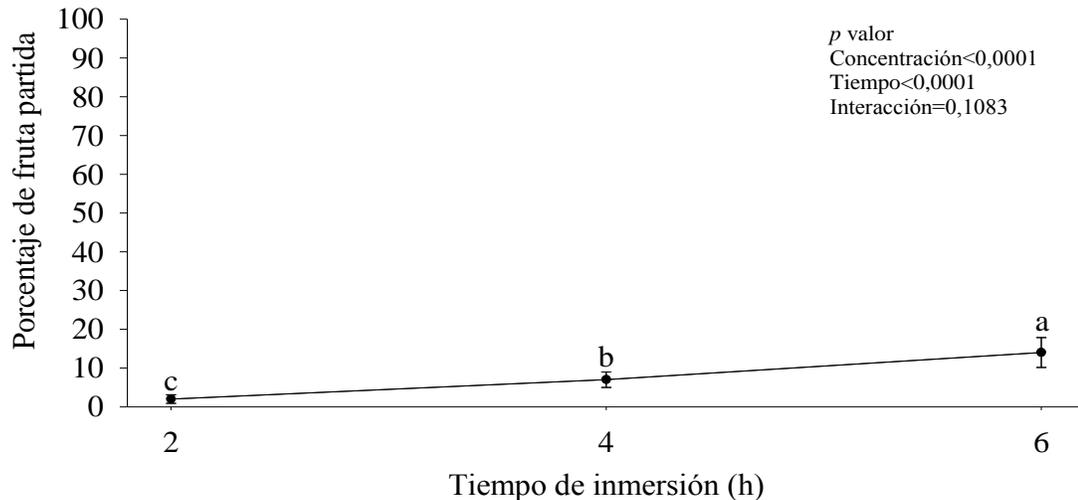


Figura 11. Porcentaje de fruta partida luego de 2; 4 y 6 h, en 'Regina'. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, según prueba de LSD Fisher ($p=0,05$).

Al examinar la partidura en campo, no hubo interacción ($p=0,7333$), ni diferencias debido a la concentración ($p=0,1380$). Sin embargo, se observaron variaciones significativas por la época de aplicación ($p<0,0112$), en donde los tratamientos realizados en el estado de desarrollo verde traslúcido indujeron un 2,4% más de frutos partidos que cuando se asperjaron en el estado amarillo pajizo (Cuadro 1, Apéndice I). Por otro lado, al evaluar el efecto de la covariable tamaño de los frutos, no se manifestó diferencias significativas ($p=0,0770$).

Cuando se analizó el porcentaje de frutos versus el tiempo de inmersión, no se vio interacción entre los factores, pero al evaluar la concentración, se observó una menor incidencia a la partidura al emplear GA₃, ya que se produjo un 6% menos que el control (Figura 10B). Con respecto al tiempo, también se observaron diferencias significativas, mostrando un mayor porcentaje de fruta partida a medida que aumentaba el tiempo de inmersión, ya que a las 2 horas se produjo un 2% de fruta con este problema, para luego de 4 horas incrementar un 18% (Figura 11).

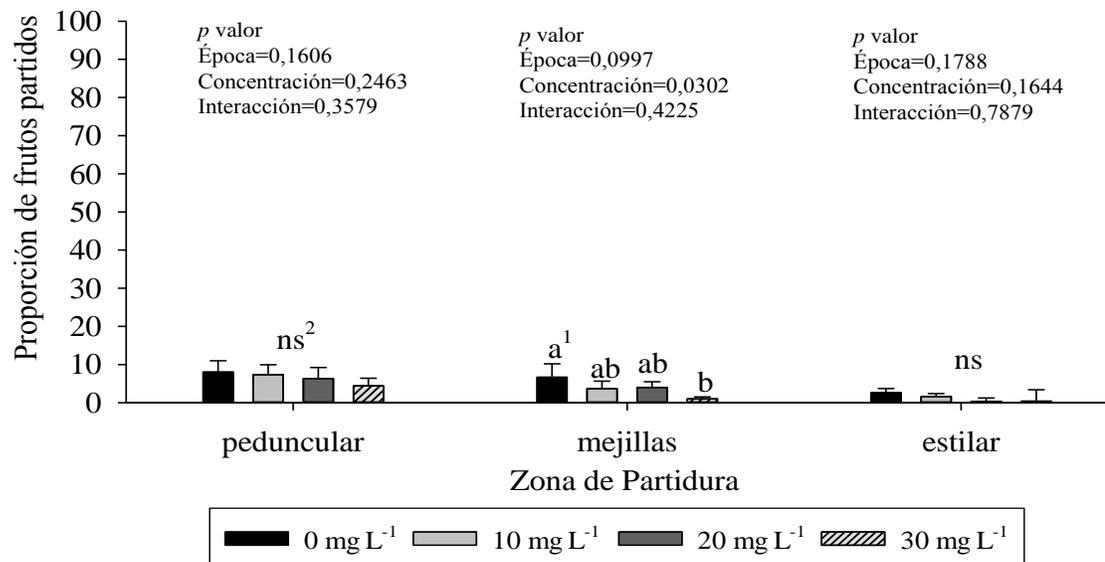


Figura 12. Efecto de distintas concentraciones de ácido giberélico (GA_3) sobre la zona de partidura en los frutos de ‘Regina’. ¹ Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, según prueba de LSD Fisher ($p=0,05$). ² ns: Diferencias no significativas ($p>0,05$).

En la partidura peduncular (Figura 12), no se vieron diferencias significativas debido a la concentración. La fisura en las zona de las mejillas (Figura 12) presentó cambios significativos por la concentración, en donde 30 mg L^{-1} de GA_3 presentó un 3,67% menos de frutos partidos en esa región con respecto al control. Por otra parte, en la zona estilar (Figura 12), no se observaron variaciones significativas por la concentración. En ninguna de las evaluaciones anteriores, se presentaron diferencias significativas debido a la interacción o la época de aplicación.

Desarrollo reproductivo

En ‘Regina’ no se presentó interacción entre factores para ninguna de las fechas evaluadas. Al estudiar los niveles de la concentración de GA_3 para la primera fecha (9 de enero del 2014) (Figura 13), no hubo diferencias significativas por los factores observados; Las yemas se encontraban en el estado donde comienzan a distinguirse los primordios foliares de forma redondeada y alargada. Además, se logró observar las brácteas (ED 2). Para la segunda evaluación, 27 de enero del 2014, se observaron diferencias significativas por la concentración de GA_3 ($p=0,0002$), en donde sólo 30 mg L^{-1} de GA_3 se diferenció del control, manifestando un menor desarrollo reproductivo que los demás tratamientos (Figura 13). Al observar las yemas se vieron cambios morfológicos, correspondientes al estado de desarrollo 3.

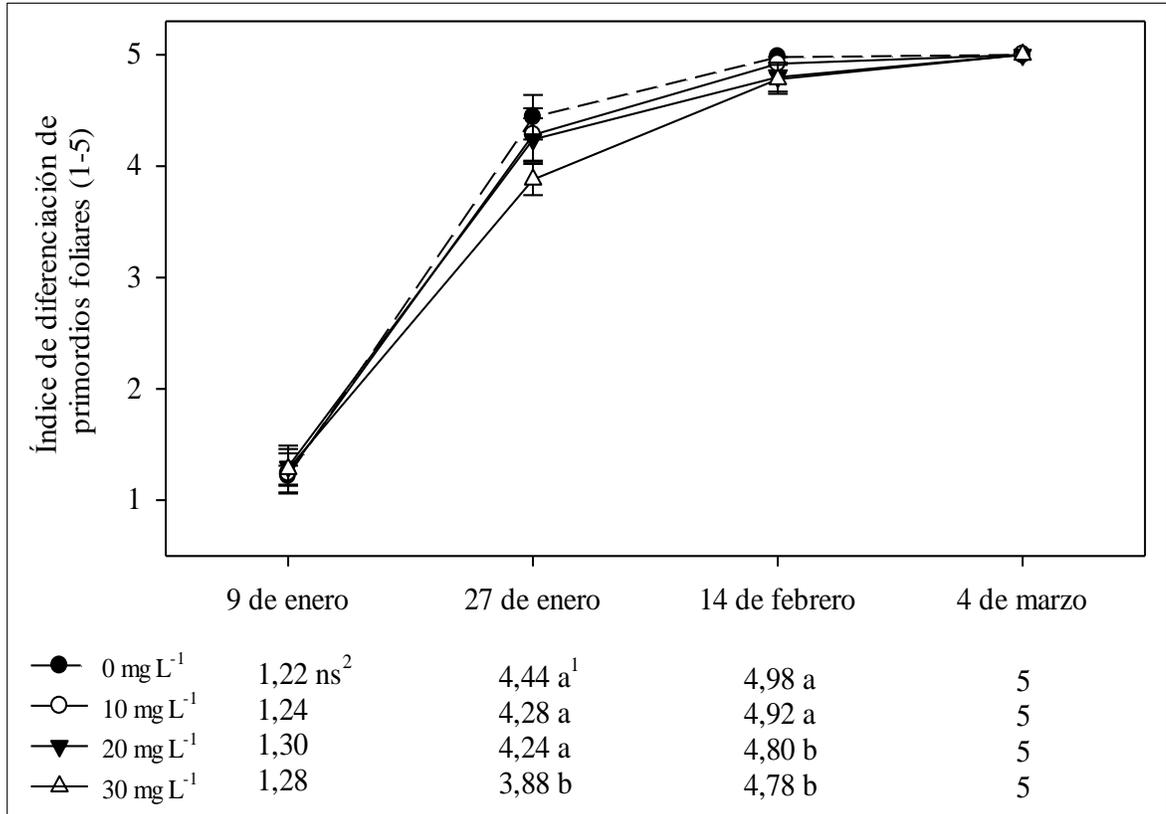


Figura 13. Efecto de distintas concentraciones de ácido giberélico (GA₃) sobre el índice de diferenciación de primordios florales, en 'Regina'. ¹ Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, según prueba de LSD Fisher ($p=0,05$). ² ns: Diferencias no significativas ($p>0,05$).

En la tercera evaluación de yemas (14 de febrero), se observaron diferencias por la concentración de GA₃ ($p<0,0001$), donde las aplicaciones con 20 y 30 mg L⁻¹ de GA₃ mostraron una menor diferenciación floral de las yemas que en el control. Por otro lado, se presentó un mayor efecto a medida que se elevó la concentración del regulador de crecimiento (Figura 13). Al examinar las yemas, se vio la diferenciación de los primordios foliares en general (ED 4). En la última extracción de yemas el 04 de marzo del 2014, se observó el estado más avanzado de diferenciación floral ED 5, en todos los tratamientos.

Por otra parte, no se presentaron diferencias significativas debido a la época de aplicación, en ninguna de las fechas analizadas.

'Kordia'

Calidad de la fruta a cosecha

El uso de GA₃ incrementó la firmeza y la concentración de sólidos solubles. Sin embargo, no hubo efectos consistentes de la época de aplicación y la concentración, al analizar las diferentes variables de calidad.

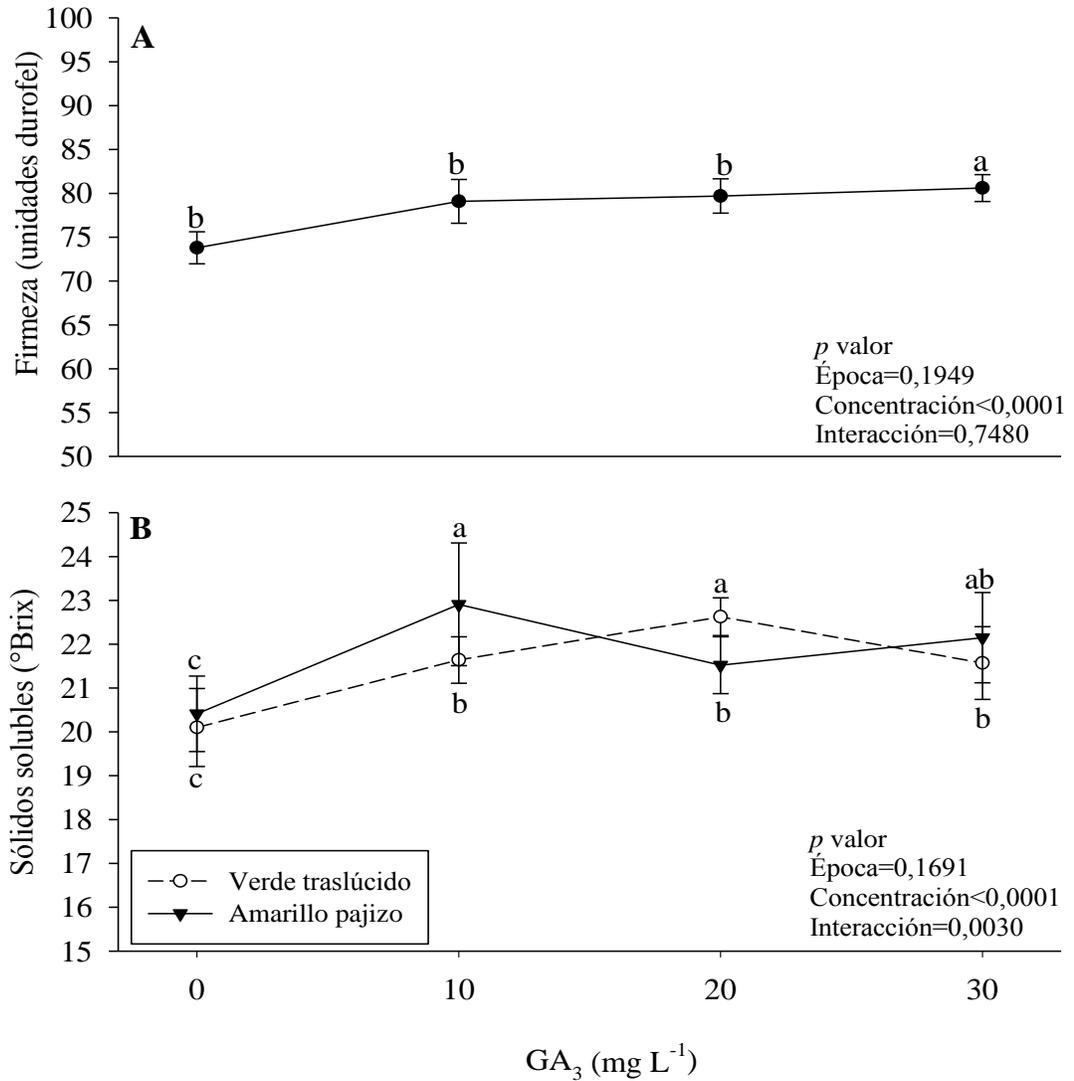


Figura 14. Efecto de las aplicaciones de ácido giberélico (GA₃) sobre la firmeza (A) y la concentración de sólidos solubles (B) en los frutos de 'Kordia'. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (LSD Fisher, $p=0,05$).

Con respecto a la firmeza, no se observó interacción significativa entre los factores en estudio, pero sí se encontraron diferencias estadísticamente significativas por la

concentración de GA₃, en donde 30 mg L⁻¹ de GA₃ se destacó, ya que produjo un incremento en 6 UD con respecto al testigo (Figura 14A); la época de aplicación no mostró diferencias significativas.

En relación a la concentración de sólidos solubles, se detectó interacción entre los factores, observando que todas las aplicaciones realizadas en el estado verde translúcido aumentaron la concentración de sólidos solubles, destacando 20 mg L⁻¹ de GA₃ que originó un incremento de aproximadamente 2,5 °Brix con respecto al control; en el estado amarillo pajizo, 10 y 30 mg L⁻¹ de GA₃ produjeron un incremento en la concentración de sólidos solubles en 2,21 y 1,9 °Brix en comparación con el control (Figura 14B); no se detectó un efecto de la época de aplicación.

En la masa de los frutos (Cuadro 6, Apéndice IV), no hubo interacción ni diferencias estadísticas significativas entre los factores (concentración y época de aplicación).

Al analizar la acidez titulable (Cuadro 6, Apéndice IV), no se vio interacción, ni diferencias estadísticas en la concentración ($p=0,4218$) y en la época de aplicación ($p=0,6333$).

Diámetro de frutos

En lo relativo a la distribución porcentual de los frutos por calibre, no se detectó interacción significativa entre los factores en ninguna categoría de frutos. Adicionalmente, cuando se analizó el efecto de la concentración de GA₃ y la época de aplicación en las categorías 24-26 y 26-28 mm de diámetro, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas (Figura 15). En cambio, cuando se evaluó la concentración en la categoría >28 mm de diámetro, se observaron diferencias significativas ($p=0,0485$), en donde los tratamientos con GA₃ presentaron aproximadamente 10% más de frutos que el control (Figura 15); en cuanto a la época de aplicación no hubo variación ($p=0,5074$).

En general, los tratamientos con GA₃ indujeron un mayor calibre y, en consecuencia, incrementaron el número de frutos para exportación (Figura 15). Por otra parte, se advirtió que ‘Kordia’ es la variedad que mostró la mayor cantidad de frutos con calibres grandes.

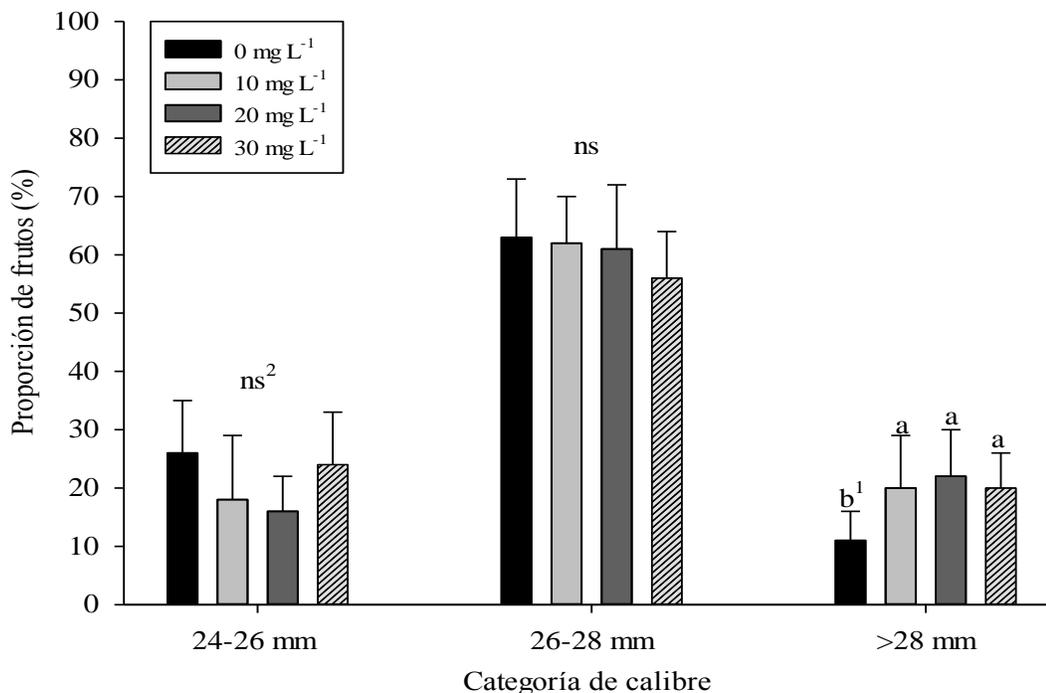


Figura 15. Efecto de distintas concentraciones de ácido giberélico (GA₃) sobre la distribución porcentual de frutos por calibre, en 'Kordia'. ¹ Letras distintas para un calibre indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, según prueba de LSD Fisher ($p=0,05$). ² ns: Diferencias no significativas ($p>0,05$).

Partidura

En relación a la partidura, no se observó interacción significativa por ninguna de las variables evaluadas.

Cuando se examinó el índice de partidura (Figura 16A), los distintos niveles de la concentración mostraron diferencias, pues con 20 mg L⁻¹ de GA₃ se produjo la menor cantidad de fruta partida, con un 75,5%, mientras que 10 y 30 mg L⁻¹ de GA₃ presentaron, en promedio, un 60,3% menos de partidura que el control (IP=23,40); por la época de aplicación no hubo variaciones significativas.

En relación a la partidura en campo, la concentración generó diferencias estadísticamente significativa ($p<0,0018$), en el cual 10; 20 y 30 mg L⁻¹ de GA₃ presentaron un 4,4; 4,6 y 6,4% menos frutos partidos que el control; al analizar la época de aplicación no se encontraron diferencias significativas ($p=0,2692$) (Cuadro 1, Apéndice I), así como tampoco debido a la covariable tamaño de fruto ($p=0,1683$).

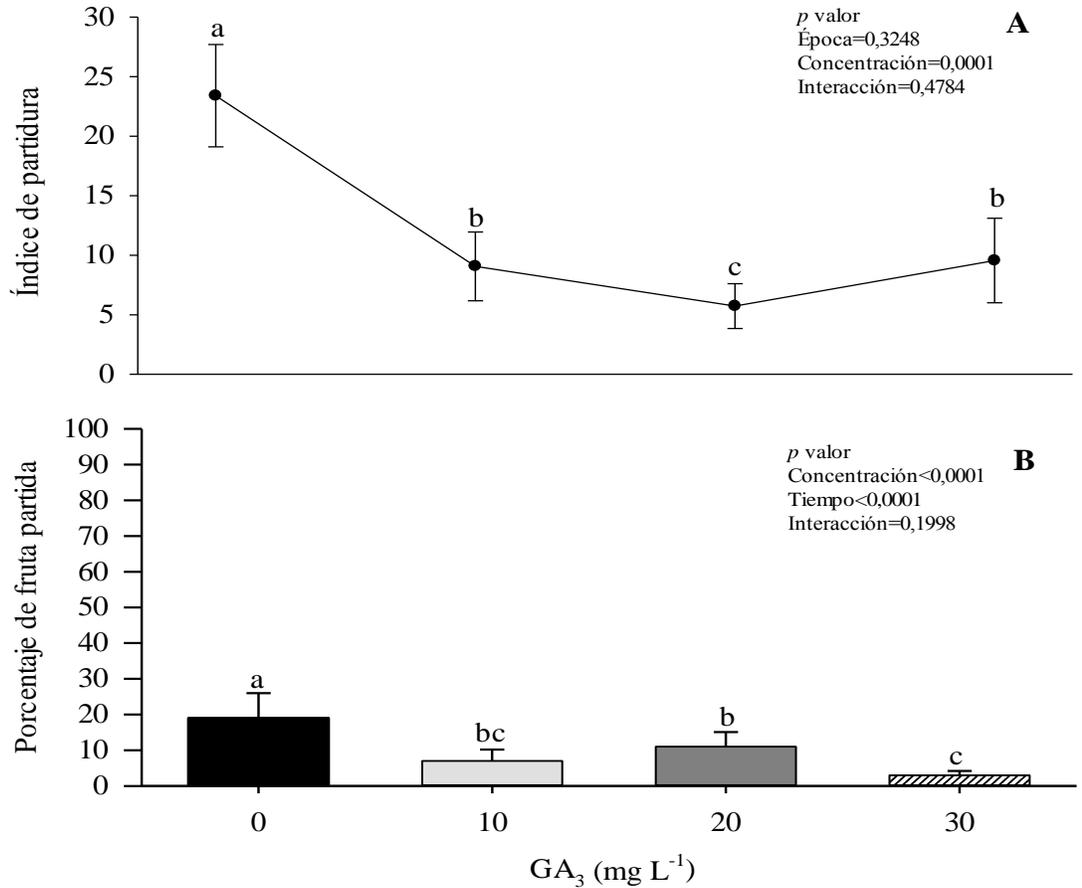


Figura 16. Efecto de distintas concentraciones de ácido giberélico (GA₃) en los frutos de 'Kordia'. (A) Índice de partidura y (B) porcentaje de fruta partida. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, según prueba de LSD Fisher ($p=0,05$).

Al analizar el porcentaje de fruta partida en el tiempo de inmersión, no se observó interacción entre los factores, pero sí por la concentración; se vio una menor incidencia a la partidura con 10 y 30 mg L⁻¹ de GA₃, que produjeron una disminución de un 12% y 16%, respectivamente, que el control (Figura 16B). Con el tiempo también se vieron diferencias estadísticamente significativas, mostrando un incremento del porcentaje de partidura a medida que aumentó el tiempo de inmersión, siendo un 2% a las 2 horas, para llegar a un 28% a las 4 horas (Figura 17).

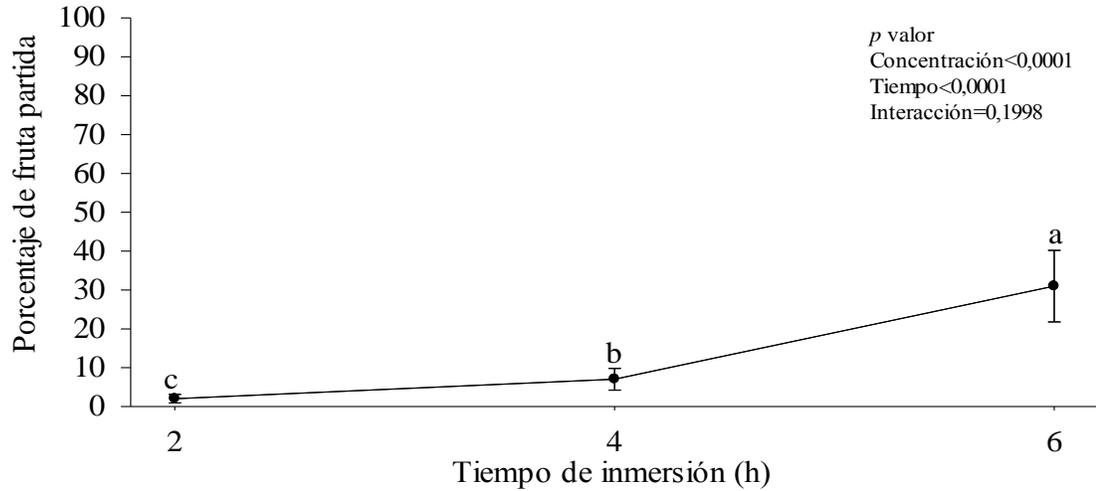


Figura 17. Porcentaje de fruta partida luego de 2; 4 y 6 h, en 'Kordia'. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, según prueba de LSD Fisher ($p=0,05$).

Con respecto al lugar de partidura, ningún análisis mostró interacción entre los factores. Cuando se estudió el efecto de la concentración en la zona peduncular, se vieron diferencias significativas, en donde el control presentó mayor incidencia en esa zona, en contraste con los tratamientos con GA_3 que mostraron aproximadamente un 22,3% de frutos menos que el testigo (Figura 18); la época de aplicación no mostró diferencias significativas.

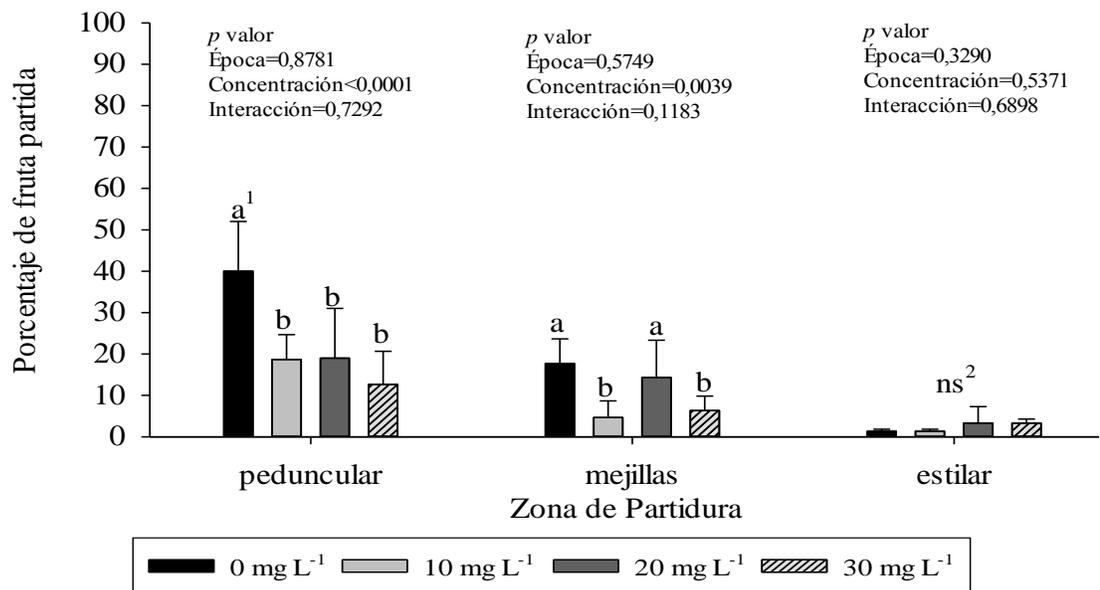


Figura 18. Efecto de distintas concentraciones de ácido giberélico (GA_3) sobre la zona de partidura en los frutos de 'Kordia'. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, según prueba de LSD Fisher ($p=0,05$).

Al evaluar la zona de las mejillas, se observó que 0 y 20 mg L⁻¹ de GA₃ fueron más susceptible a la partidura, en oposición a 10 y 30 mg L⁻¹ de GA₃ que presentaron un 13 y 11,34% menos de fruta partida que el control (Figura 18); la época de aplicación no generó diferencias significativas. Referente al análisis de la zona estilar, ésta fue la que presentó la menor cantidad de fruta partida y no se detectaron diferencias debido a ningún factor (Figura 18).

Desarrollo reproductivo

No se presentó interacción entre los factores ni efecto de la época de aplicación, en ninguna de las fechas evaluadas. Pero, al examinar la concentración de GA₃, se detectó diferencias significativas en las tres fechas de evaluación sobre el IDPF (Figura 19) [9 de enero ($p=0,0006$) ED 2, el 27 de enero ($p<0,0001$) ED 3 y 14 de febrero del 2014 ($p=0,0010$) ED 4]. Finalmente, el 4 de marzo, las yemas de los distintos tratamientos presentaron el estado ED 5.

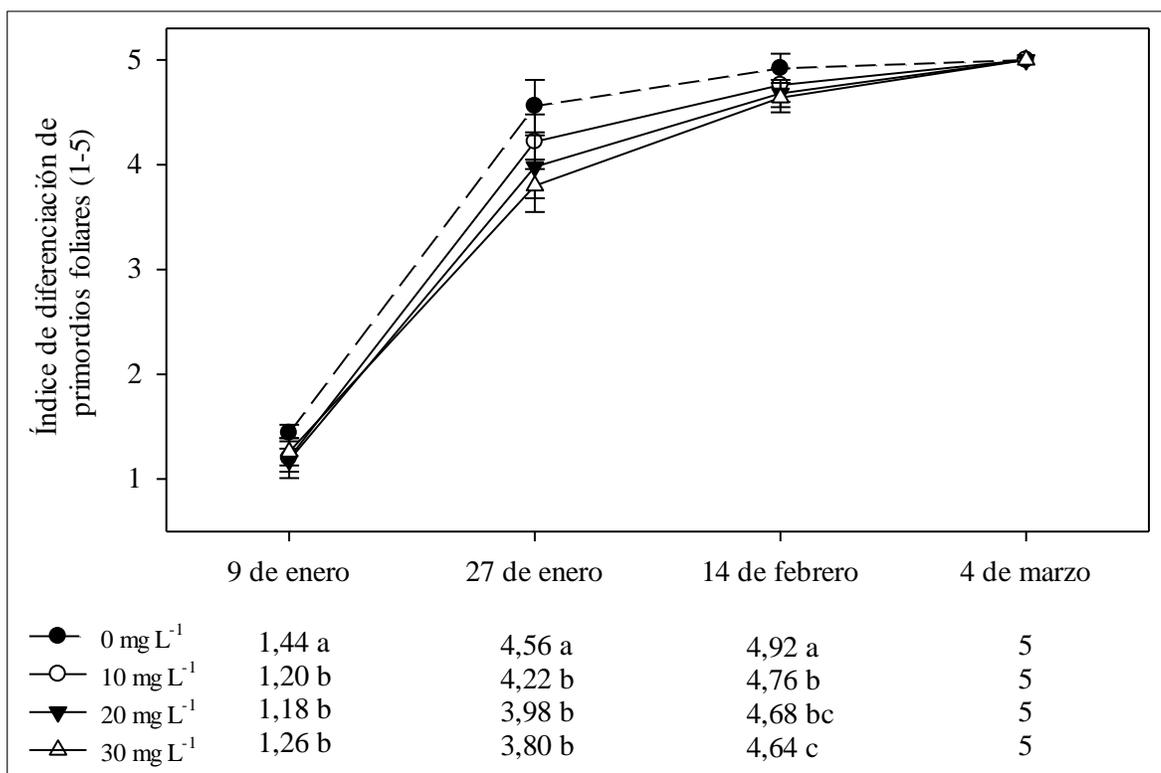


Figura 19. Efecto de distintas concentraciones de ácido giberélico (GA₃) sobre el índice de diferenciación de primordios florales, en 'Kordia'. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, según prueba de LSD Fisher ($p=0,05$).

Al analizar este proceso, se observó que el desarrollo floral fue menor con el uso de GA₃ (en todas sus concentraciones). Sin embargo, en la última fecha de evaluación, todas se encontraban en el mismo estado (Figuras 7; 13 y 19).

Expresión génica

Las diferencias de expresión génica se realizaron con el objetivo de conocer el efecto del GA₃ sobre los genes que podrían estar involucrados con la partidura y verificar la existencia de correlación entre el uso de GA₃ con el aumento en la tolerancia a este problema. Para ello, se evaluó los frutos tratados 15 y 30 días después de aplicación (DDA).

Al analizar la expresión de los genes, se consideró como un resultado significativo 2 o más veces de cambio, ya que estudios consideran que a partir de 1,5 veces de cambio en su expresión ($p \leq 0,005$), un gen es regulado diferencialmente (Plavcova et al., 2013).

Genes relacionados con la biosíntesis y transporte de componentes de la cutícula

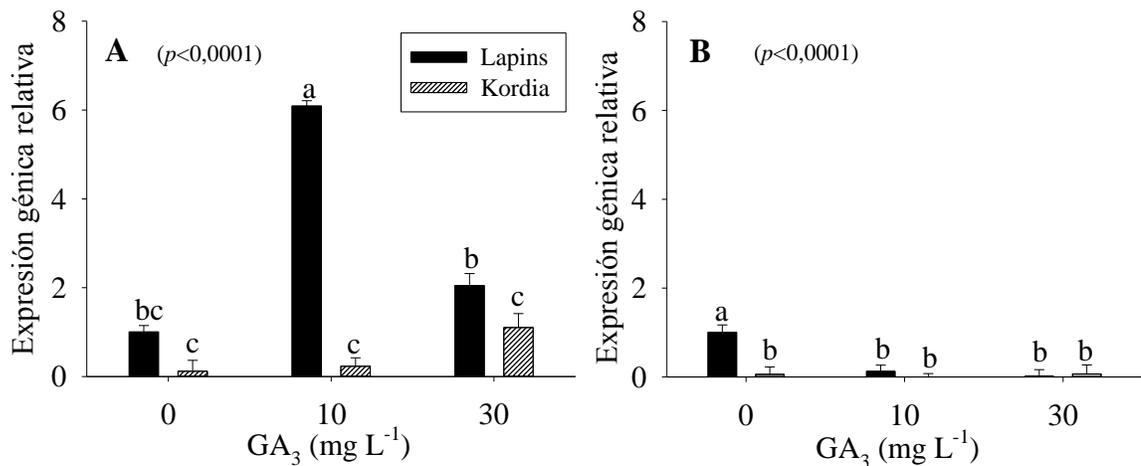


Figura 20. Nivel de expresión de *PaKCS6* en frutos de ‘Lapins’ y ‘Kordia’, a 15 (A) y 30 (B) días después de aplicación de GA₃ en concentraciones de 0; 10 y 30 mg L⁻¹. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, según prueba de LSD Fisher ($p=0,05$).

Al examinar la expresión del gen *PaKCS6*, asociado a la formación de las ceras cuticulares, 15 días después de aplicación (DDA) en los frutos de ‘Kordia’, se observó que no existió una variación en la expresión de éste, mostrando sólo un leve incremento de 0,9 veces con 30 mg L⁻¹ de GA₃ respecto al control, el cual no es significativo (Figura 20A). Mientras que, en los frutos de ‘Lapins’ con 10 mg L⁻¹ de GA₃ hubo una regulación diferencial, ya que aumentó 6 veces con respecto al testigo (Figura 20A). Por otra parte, en frutos de ‘Kordia’ a los 30 DDA, no se observaron diferencias estadísticamente significativas (Figura 20B), lo que coincide con la evaluación anterior (Figura 20A). En frutos de ‘Lapins’ se observó que con 10 y 30 mg L⁻¹ de GA₃ disminuyó 0,8 y 0,9 veces de cambio respecto al control, por lo que el uso de GA₃ produjo una represión o disminución de la expresión del gen (Figura 20B).

Por lo tanto, no se vio una variación en la expresión de *PaKCS6* en los frutos de ‘Kordia’ con los tratamientos de GA_3 en ninguna de las épocas evaluadas. Mientras que, en los frutos de ‘Lapins’ 10 mg L^{-1} de GA_3 aumentaron la expresión 15 DDA.

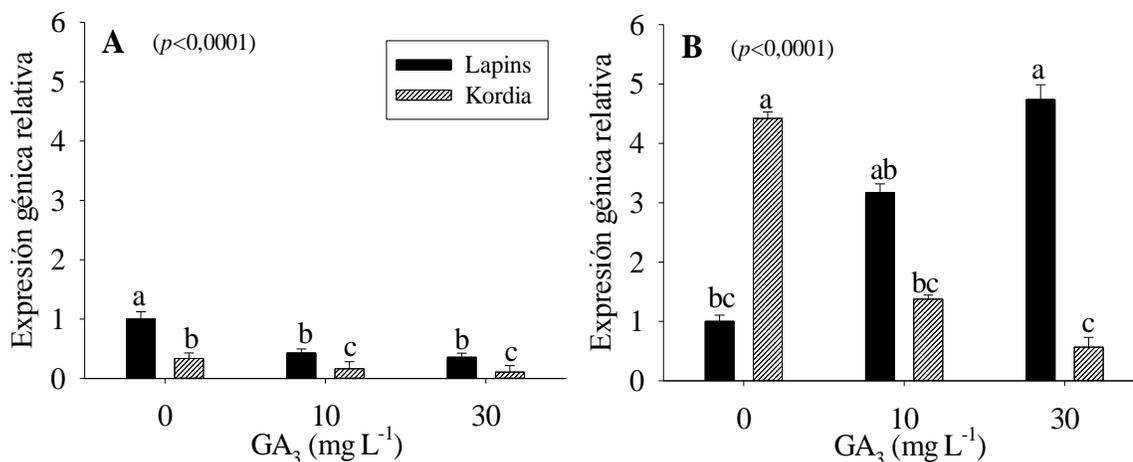


Figura 21. Nivel de expresión de *CER4* en frutos de ‘Lapins’ y ‘Kordia’, a 15 (A) y 30 (B) días después de aplicación de GA_3 en concentraciones de 0; 10 y 30 mg L^{-1} . Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, según prueba de LSD Fisher ($p=0,05$).

Otra enzima que participa en la biosíntesis de ceras corresponde a la acil-CoA reductasa (*CER4*), la cual es importante para la formación de la cutícula, debido a que cataliza la reducción de los VLCFAs a alcoholes primarios (Rowland et al., 2006). Respecto de ella (Figura 21A), los frutos de ‘Kordia’ con $10\text{ y }30\text{ mg L}^{-1}$ de GA_3 mostraron una represión en la expresión de *CER4* de 0,1 y 0,18 veces que el control. Algo similar se manifestó en los frutos de ‘Lapins’, ya que se observó una represión o disminución de 0,6 veces en la expresión de este gen con el uso de GA_3 , a pesar de ello no existe una regulación diferencial del gen. Cuando se evaluaron los niveles de expresión 30 días después de aplicación (Figura 21B), los resultados fueron totalmente opuestos. En frutos de ‘Kordia’ las aplicaciones de $10\text{ y }30\text{ mg L}^{-1}$ de GA_3 indujeron la disminución o represión del gen 3 y 4 veces en relación al control. En cambio, en frutos de ‘Lapins’ se observó que a medida que aumentó la concentración, se produjo una mayor expresión de *CER4*. En donde $10\text{ y }30\text{ mg L}^{-1}$ de GA_3 indujeron una expresión diferencial, presentando 2,1 y 3 veces de cambio más que el control (Figura 21B).

Por ende, los resultados 15 días después de haber aplicado los tratamientos, no indujeron cambios en la expresión de este gen. Sin embargo, luego de 30 días, se observó una variación en los patrones de expresión, mostrando un aumento en frutos de ‘Lapins’ y una disminución en frutos de ‘Kordia’.

Una vez que son producidos los compuestos que conforman la cutícula (cutinas y ceras), éstos son transportados desde la membrana plasmática a la cutícula por los transportadores de membrana dependientes de ATP (ABC), los cuales son de gran importancia para la exportación y secreción de cera (Yeats y Rose, 2013). Al evaluar *ABC-2* en frutos de

‘Kordia’ (Figura 22A), se observó una disminución en la expresión con 10 y 30 mg L⁻¹ de GA₃ de 9 y 7 veces en relación al control, mostrando una fuerte represión por el uso de GA₃. Por otro lado, en frutos de ‘Lapins’ sólo con 30 mg L⁻¹ de GA₃ se produjo una disminución de 0,9 veces respecto al control, aunque este resultado no mostró una regulación diferencial. Mientras que, en frutos de ‘Kordia’ los niveles de expresión 30 días después de la aplicación de GA₃ (Figura 22B), mostró un comportamiento distinto, en donde sólo 30 mg L⁻¹ de GA₃ ocasionó un aumento de 4 veces con respecto al testigo, produciendo una regulación diferencial. En cambio, en los frutos de ‘Lapins’ no hubo alteraciones en la expresión entre los distintos tratamientos.

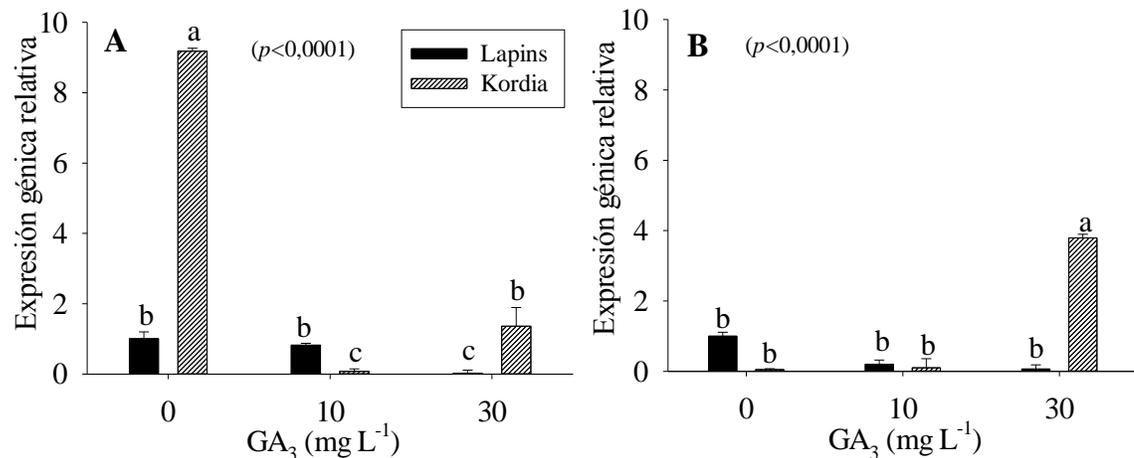


Figura 22. Nivel de expresión del transportador ABC-2 en frutos de ‘Lapins’ y ‘Kordia’, a 15 (A) y 30 (B) días después de aplicación de GA₃ en concentraciones de 0; 10 y 30 mg L⁻¹. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, según prueba de LSD Fisher ($p=0,05$).

Esto muestra que el efecto del GA₃ no es el mismo para cada variedad, respondiendo de manera diferente a las distintas concentraciones de GA₃.

Genes relacionados con la modificación de la pared celular

Por otra parte, hay enzimas que modifican la pared celular, permitiendo una mayor capacidad de extensión, para así evitar la formación de microfisuras en la epidermis del fruto (Wang et al., 2006; Kasai et al., 2008; Balbontín et al., 2014).

Dentro de las diversas enzimas que participan en la modificación de la pared celular del fruto, durante el crecimiento y desarrollo de este mismo, se encuentra la xiloglucano endotransglucosilasa (*XET*). Su función es controlar la extensibilidad de la célula, que se ha asociado al entrecruzamiento de las moléculas de celulosa y xiloglucanos, lo que permite la división de las cadenas de esta última y así otorgar plasticidad a la pared celular (Lu et al., 2006; Takizawa et al., 2014). Al analizar la expresión de *XET-6* 15 DDA en frutos de ‘Kordia’ (Figura 23A), se observó que sólo 30 mg L⁻¹ de GA₃, indujo un aumento de 8 veces más que el control. Mientras que, en frutos de ‘Lapins’ se vio una represión con 30

mg L⁻¹ GA₃ de 0,9 veces con respecto al testigo, aunque no produjo una regulación diferencial del gen. En cambio, a los 30 días después de aplicación, se observaron resultados opuestos entre las dos variedades (Figura 23B). En frutos de ‘Kordia’ 10 y 30 mg L⁻¹ de GA₃ provocaron una disminución de 20 y 37 veces en relación al control, por lo que el GA₃ reprimió la expresión del gen. No obstante, en frutos de ‘Lapins’ las aplicaciones con 10 y 30 mg L⁻¹ de GA₃ indujeron aumentos de 20 y 30 veces de expresión respecto al control.

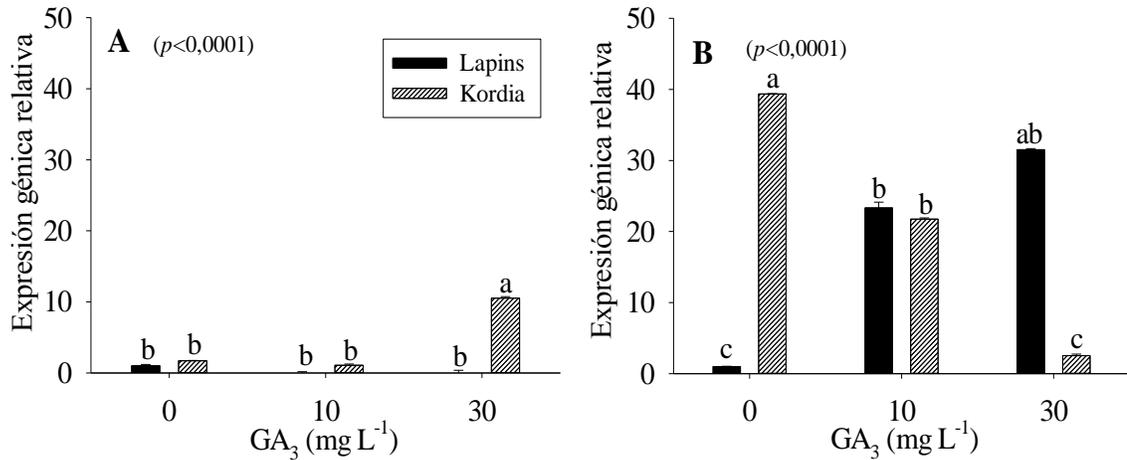


Figura 23. Nivel de expresión de *XET-6* en frutos de ‘Lapins’ y ‘Kordia’, a 15 (A) y 30(A) días después de aplicación de GA₃ en concentraciones de 0; 10 y 30 mg L⁻¹. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, según prueba de LSD Fisher ($p=0,05$).

En resumen, luego de 15 DDA el GA₃ sólo actúa sobre los frutos de ‘Kordia’. No obstante, a los 30 DDA, se ocasionaron cambios en la expresión sobre los frutos de ambas variedades, favoreciendo ‘Lapins’ un aumento y en ‘Kordia’ la disminución de *XET-6*.

Por otro lado, existe una enzima dependiente del pH, denominada expansina, que se encuentra implicada con la modificación de la pared celular, específicamente en lo concierne a su extensión. Éstas actúan rompiendo las microfibrillas de celulosa y las moléculas de xiloglucanos, que permiten la relajación y la expansión de la pared celular bajo tensión de tracción, luego de esto, permite la entrada de agua y produce la elongación celular (Balbontín et al., 2013). Al analizar la expresión de *EXP-A3* 15 DDA en frutos de ‘Kordia’ (Figura 24A), no se observaron diferencias significativas. Por otra parte, en los frutos de ‘Lapins’ con 10 y 30 mg L⁻¹ de GA₃ se produjo una represión en la expresión de 0,8 veces respecto al control. En relación a la expresión 30 DDA en los frutos de ‘Kordia’ (Figura 24B), con 10 y 30 mg L⁻¹ de GA₃ se observó una disminución o represión de la expresión 32 y 35 veces respecto al control. Mientras que, en frutos de ‘Lapins’ con 10 y 30 mg L⁻¹ de GA₃ se mostró un aumento de la expresión 54 y 22 veces que control.

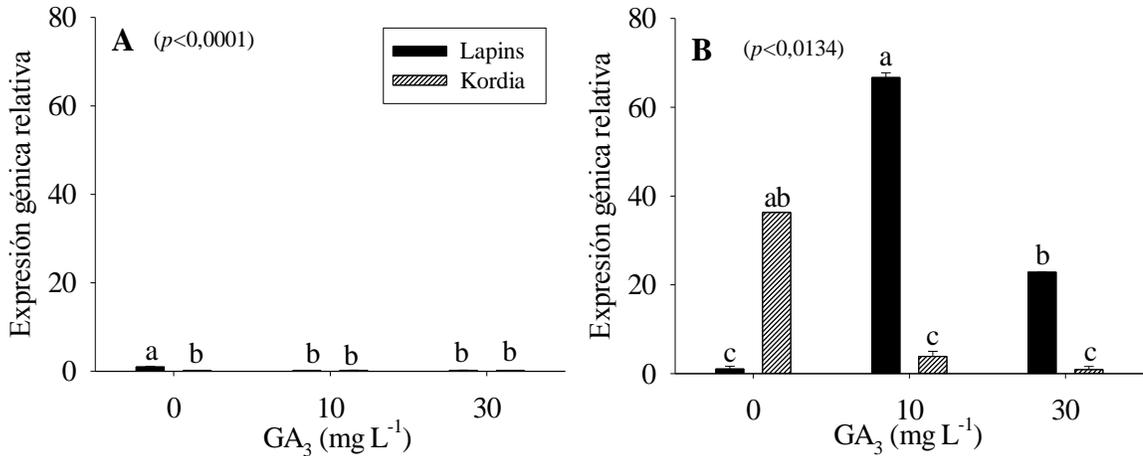


Figura 24. Nivel de expresión de *EXP-A3* en frutos de ‘Lapins’ y ‘Kordia’, a 15 (A) y 30 (B) días después de aplicación de GA₃ en concentraciones de 0; 10 y 30 mg L⁻¹. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, según prueba de LSD Fisher ($p=0,05$).

Por lo que, el efecto del GA₃ cambia según la variedad y el momento de la evaluación. En los frutos ‘Kordia’ y ‘Lapins’ a los 15 días después de aplicación, no ocasionaron efectos. En cambio, a los 30 días después de aplicación, en ‘Lapins’ aumentó la expresión de este gen y en ‘Kordia’ la disminuyó.

Expresión génica en distintas localidades

También se realizó una comparación de la expresión de *PaKCS6* y *CER4* entre frutos de variedades de distintas zonas en estado pajizo y a madurez del fruto. Se evaluaron frutos de ‘Kordia’, ‘Lapins’ y ‘Bing’ de la VII región (Curicó) y frutos de ‘Kordia’ y ‘Lapins’ de la IX región (Angol).

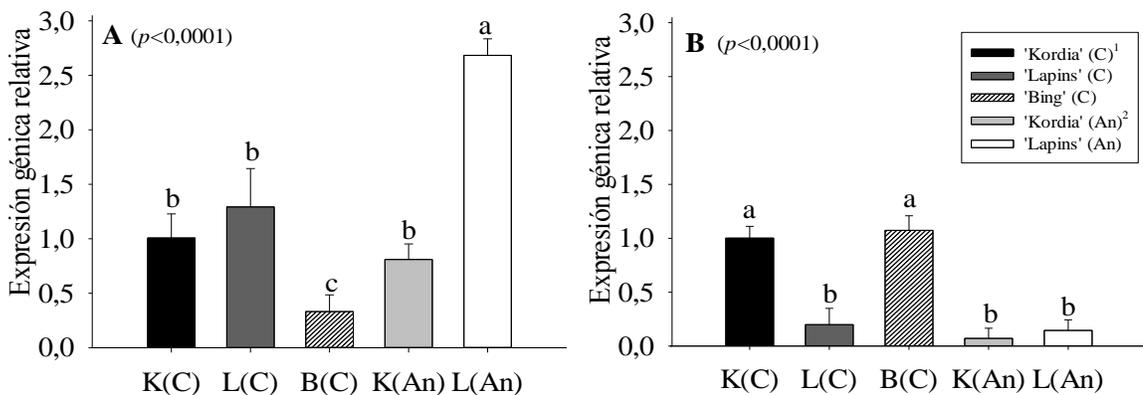


Figura 25. Expresión sin aplicación de GA₃ de *PaKCS6* en estado pajizo (A) y maduro (B) en variedades de la VII y IX Región. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, según prueba de LSD Fisher ($p=0,05$). ¹ C: Curicó. ² An: Angol.

Al examinar la expresión de *PaKCS6* en el estado de desarrollo amarillo pajizo (Figura 25A), se observó que los frutos de ‘Kordia’ no mostraron diferencias entre las localidades. Sin embargo, los frutos de ‘Lapins’ mostraron mayor expresión en Angol, 1,5 veces que la de Curicó. Al analizar ‘Bing’, una variedad de alta susceptibilidad a la partidura, se observó la menor expresión respecto de las demás variedades evaluadas. Con respecto a la evaluación en estado maduro (Figura 25B), ‘Kordia’ mostró una mayor expresión en Curicó, 1,1 veces que la de Angol. En cambio, en ‘Lapins’ se observó que no existe diferencia entre la expresión génica en las distintas localidades, similar a ‘Bing’ y las de ‘Kordia’ en Curicó.

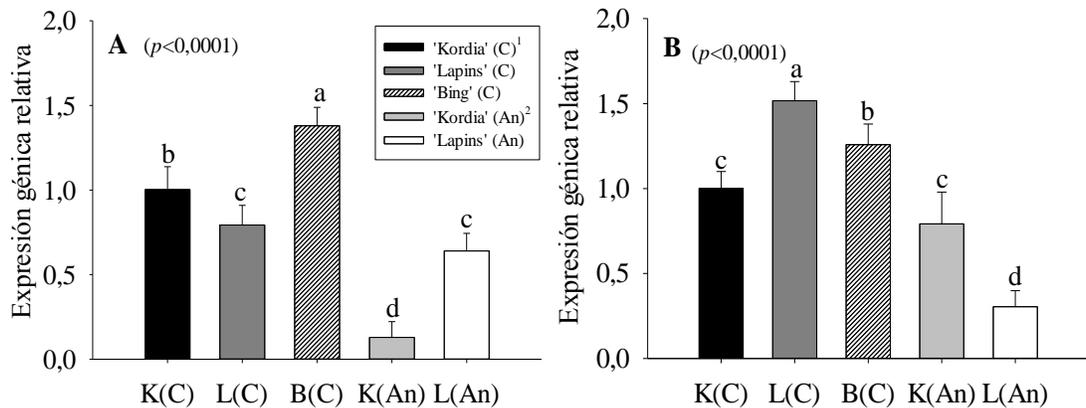


Figura 26. Expresión sin aplicación de GA_3 de *CER4* en estado pajizo (A) y maduro (B) en variedades de la VII y IX Región. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, según prueba de LSD Fisher ($p=0,05$). ¹ C: Curicó. ² An: Angol.

Cuando se analizó la expresión de *CER4* del estado amarillo pajizo (Figura 26A), en ‘Kordia’ se observó una menor expresión en las de Angol respecto de Curicó; ‘Lapins’ no mostró diferencias significativas al comparar las 2 regiones. Por otro lado, ‘Bing’ mostró la mayor expresión de *CER4*, superior a las demás variedades. Por otra parte, cuando se evaluó la expresión de *CER4* a madurez (Figura 26B), en ‘Kordia’ no hubo diferencias al comparar las distintas localidades; ‘Lapins’ mostró la mayor expresión de todas, en Curicó; ‘Bing’, por su parte, mostró una mayor expresión que las variedades de Angol.

En resumen, al estudiar los frutos de las variedades en las distintas localidades, no se observó el mismo patrón de expresión génica, reafirmando que algunos factores bióticos o abióticos podrían estar influyendo sobre la expresión de los genes, ya sea reprimiendo o estimulando su expresión.

Análisis de variables de calidad versus partidura de frutas

Al analizar las variables de calidad, la partidura de los frutos y los tratamientos en las tres variedades evaluadas (figuras 27; 28 y 29) mediante un análisis de componentes principales (ACP), se apreció que en ‘Lapins’ se explicó el 81,3% de la variabilidad, observándose que los tratamientos sin GA₃ [Control_(0-VT) y Control_(0-AP)] se encontraron más ligados a la partidura. Por el contrario, con el uso de GA₃ se vio una tendencia opuesta a los testigos, ya que se encontraban más vinculados a variables como la firmeza, acidez y concentración de sólidos solubles (Figura 27).

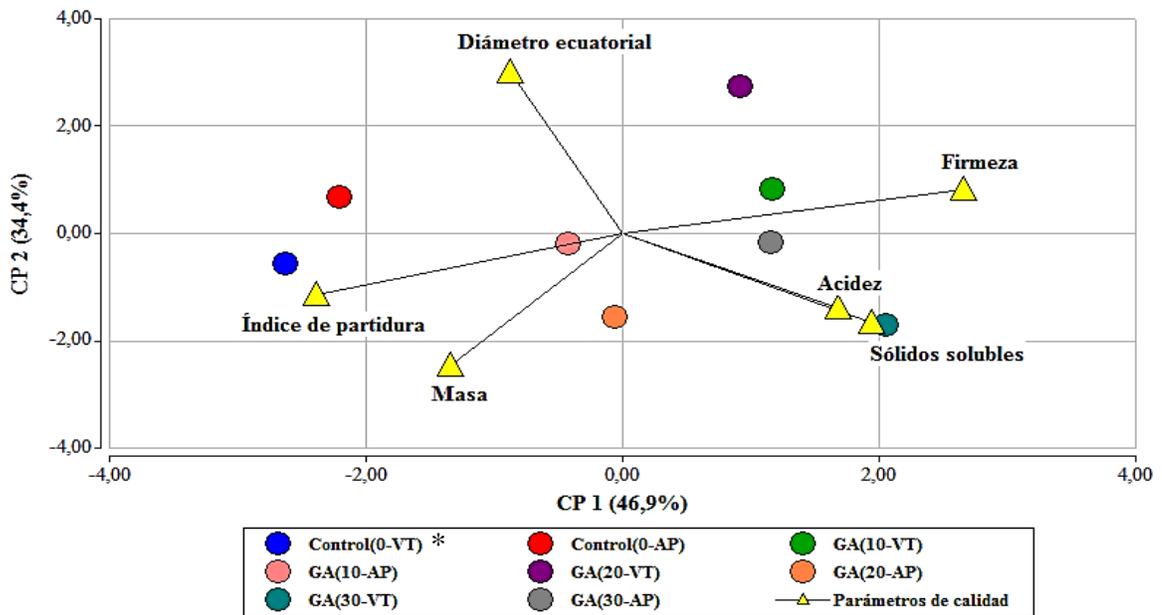


Figura 27. Biplot (ACP) de variables de calidad e índice de partidura evaluada en ‘Lapins’. *Entre paréntesis se indica la concentración y la época de aplicación

En ‘Kordia’ el ACP explicó un 86,4% de la variabilidad, observándose una vinculación del control al índice de la partidura y la acidez. En cambio, los tratamientos con GA₃ mostraron una mayor asociación a las variables de calidad, donde destaca la firmeza, sólidos solubles y masa (Figura 28)

En relación al ACP en ‘Regina’, se explicó un 77,8% de la variabilidad, siguiendo la misma tendencia exhibida por las otras variedades; los testigos se encontraron más vinculados a la partidura, mientras que los tratamientos de GA₃ estaban ligados positivamente con la concentración de sólidos solubles, diámetro ecuatorial y firmeza (Figura 29).

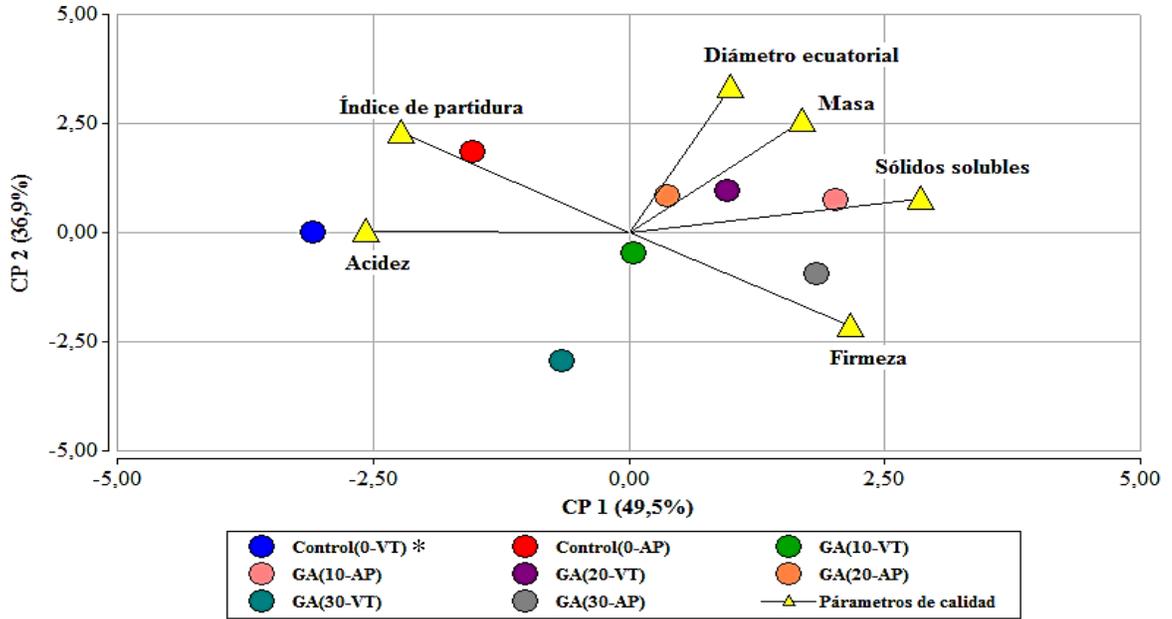


Figura 28. Biplot (ACP) de variables de calidad e índice de partidura evaluada en ‘Kordia’. *Entre paréntesis se indica la concentración y la época de aplicación

En resumen, en las tres variedades los ACP mostraron que el empleo de GA₃ produjo una tendencia opuesta a los testigos, ya que se encontraban más vinculados a variables como la firmeza y concentración de sólidos solubles, a diferencia del testigo que se encontraba más asociado al índice de partidura. Adicionalmente, se destaca la asociación negativa entre el índice de partidura versus firmeza y concentración de sólidos solubles.

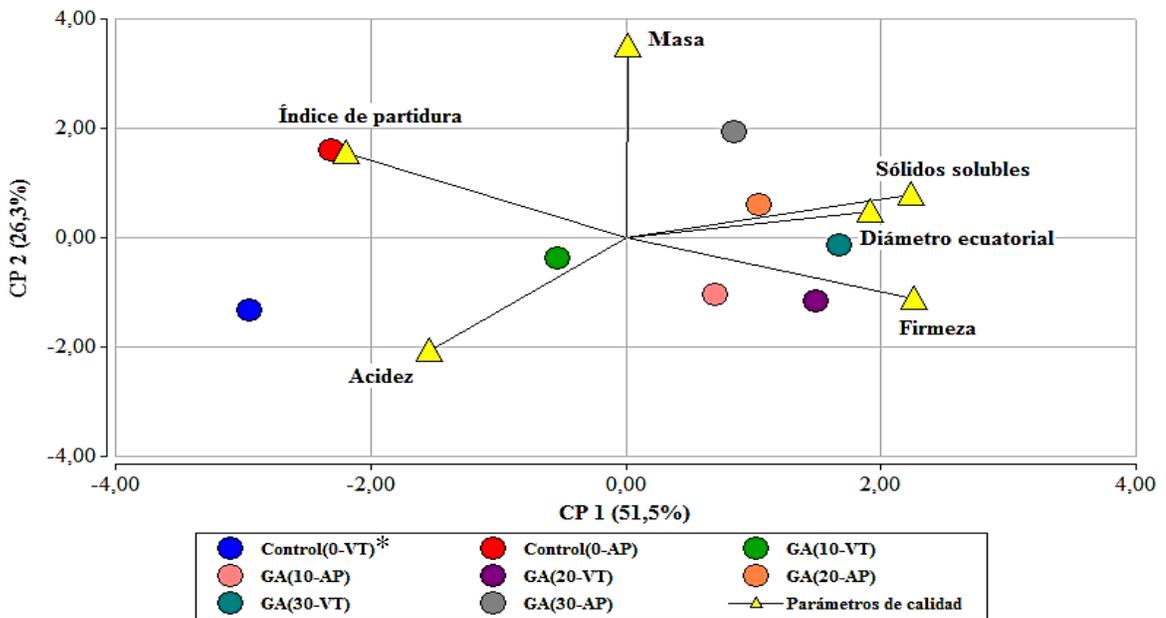


Figura 29. Biplot (ACP) de variables de calidad e índice de partidura evaluada en ‘Regina’. *Entre paréntesis se indica la concentración y la época de aplicación

DISCUSIÓN

En esta investigación se demostró que las aplicaciones de ácido giberélico, durante el desarrollo del fruto, modificaron la susceptibilidad a la partidura, reduciendo el índice de partidura (IP) obtenido en condiciones estandarizadas para los distintos tratamientos. Este método, aun cuando no representa la situación a la cual se exponen los frutos en condiciones de campo, permite comparar la expresión del problema frente a una presión de agua similar (Christensen, 1996). Es posible también apreciar diferencias entre las tres variedades, clasificadas en distintas categorías según su susceptibilidad a la partidura, siendo 'Regina' y 'Kordia' más tolerantes, a diferencia de 'Lapins' que presenta mayor susceptibilidad, aun cuando menor que 'Bing' (Stehr, 2005).

En 'Regina' y 'Lapins' se observó un efecto similar de GA₃; en ambas variedades no se observó interacción entre época y concentración, así como tampoco de la época de aplicación. Sí se vio un efecto sobre la reducción de la susceptibilidad a la partidura, cuando se analizó la concentración en las dos variedades, pero sin diferencia entre las concentraciones utilizadas. Es relevante mencionar que las aplicaciones de GA₃ redujeron el índice de partidura aproximadamente 6 puntos en 'Regina' y 'Lapins', lo cual se tradujo en una variación de un 33% en 'Lapins' (IP=19,13) y un 48% en 'Regina' (IP=14,67), en comparación al control. Con respecto a 'Kordia', tampoco se observó interacción entre los dos factores ni efecto de la época de aplicación, no obstante, al evaluar la concentración se advirtió una reducción progresiva de la susceptibilidad a medida que se aumentó la concentración de 10 a 20 mg L⁻¹ de GA₃, y aumentó levemente con 30 mg L⁻¹ de GA₃; en general, los tratamientos con el fitorregulador redujeron la partidura en un 66% aproximadamente respecto del control (IP=23,4). Por otro lado, es importante indicar que el control de esta variedad fue el que presentó un mayor índice de partidura, lo cual permite suponer que para las condiciones de este ensayo 'Kordia' poseía una susceptibilidad mayor a la partidura, lo que se puede atribuir a diversos factores, como la avanzada madurez de los frutos, la baja carga frutal y el alto vigor de los árboles, variables que en su conjunto podrían haber inducido un incremento de la susceptibilidad a la partidura (Simon, 2006; Khadivi-Khub, 2015).

Las distinta respuesta que se observó con las aplicaciones de GA₃, sobre la reducción de la partidura, se podrían atribuir a las diferencias entre variedades (Cline y Trought, 2007), lo que se ve reflejado, en parte, en los análisis moleculares, que exhibieron diferentes patrones de expresión génica con el uso de GA₃, lo que produjo un efecto dispar sobre la disminución en la partidura. No obstante, otros factores podrían estar influenciando este fenómeno; Si bien se ha encontrado una relación positiva entre la firmeza y la partidura, en investigaciones que señalan que variedades con mayor firmeza muestran una epidermis más tensa, por lo que son más proclives a desarrollar fisuras al momento de incrementar el volumen del fruto, por una alza en la hidratación de éste (Christensen, 1996; Yamaguchi et al., 2004; Khadivi-Khub, 2015), en este estudio, el análisis de componentes principales (ACP), mostró una correlación negativa entre la firmeza y el índice de partidura (figuras 27; 28 y 29). Al respecto Takizawa et al. (2014), en tomates 'Micro Tom', indicaron que una mayor firmeza proporciona una estructura de la pared celular más integra, lo que

permitiría retener la flexibilidad y la plasticidad de la célula, para resistir la partidura del fruto. Así pues, una mayor integridad de esta estructura evitaría cambios bruscos en el volumen del fruto, lo cual disminuiría la aparición de las fisuras en el fruto. Por otro lado, Yamaguchi et al. (2004), postulan que existe una correlación positiva entre la partidura y la firmeza en ciruelos japoneses, aunque también sostienen que variedades con frutos firmes, pero con células epidermales pequeñas, presentan una menor susceptibilidad a la partidura. Por ende, sería de gran importancia que en estudios posteriores se considerara el tamaño de las células epidérmicas de los frutos y su asociación con la partidura.

Otra variable que se asocia a este problema es la concentración de sólidos solubles; investigaciones destacan que un incremento de la concentración de sólidos solubles influye sobre la partidura, puesto que la absorción de agua es proporcional a la concentración osmótica del fruto (Christensen, 1996; Khadivi-Khub, 2015). En relación a esto, Christensen (1996), analizó frutos de 'Bing', con un contenido de azúcar de 14-16%, partiéndose un 5%, mientras que la misma variedad con un 20-22% de azúcar se agrietó un 21%. Ahora bien, en este estudio los ACP (figuras 27; 28 y 29) mostraron una correlación negativa entre el índice de partidura y la concentración de sólidos solubles. Al respecto, Moing et al. (2004) no observaron diferencias en el potencial osmótico de la fruta y la contribución de los principales azúcares o ácidos orgánicos sobre éste, cuando compararon variedades susceptibles y tolerantes. Esto confirma la complejidad de los mecanismos fisiológicos que se encuentran involucrados en este desorden, pudiendo afirmarse que, bajo las condiciones de esta investigación, no se observó una relación entre el potencial osmótico y la susceptibilidad a partidura. Así pues, esta inconsistencia podría estar ligada al hecho de que es un problema multifactorial, en donde otras variables incidirían más que la concentración de sólidos solubles, como el incremento de la firmeza, que disminuye la partidura de los frutos, ya que se presenta una pared celular más íntegra que evita la formación de fisuras en el fruto (Brüggenwirth y Knoche, 2016b).

Con respecto a la carga frutal, Way (1967) indicó que 'Van', con una mayor cantidad de frutos se parten menos, a diferencia de los que poseen una menor carga. Por otra parte, Christensen (1972), al comparar diversas variedades, no encontró relación entre la partidura y la carga frutal. Ahora bien, al evaluar la carga frutal relativa, no se detectó interacción ni diferencias estadísticas por efecto de la concentración y época de aplicación (Cuadro 2, Apéndice II), pero al analizar la partidura inducida, sí se observó efecto de la concentración, en donde 10, 20 y 30 mg L⁻¹ disminuyeron la incidencia de este problema (figuras 4A; 10A y 16A), por lo que la carga, en este estudio, parece no ser un factor que influye sobre este problema. Adicionalmente, cuando se analizó la partidura en campo, no se observó efecto del tamaño del fruto sobre dicha evaluación (Cuadro 1, Apéndice I); el mayor porcentaje de frutos se encontró entre 24 a 28 mm, por ende bajo las condiciones de este estudio, dichas categorías de calibre no incidirían en la formación de grietas en el fruto, lo cual reafirma que existen otros factores involucrados en la formación de grietas en el fruto. Si bien, como se indicó anteriormente, el tamaño celular podría ser un factor implicado con esta alteración, para demostrar esta aseveración, se requieren estudios que permitan vincular la partidura con el tamaño celular.

También, se ha visto que el calcio juega un papel importante sobre este problema, ya que se encuentra involucrado con la cohesión de la pared celular, mediante la formación de

puentes de calcio en la lamela media, que actúan como sustancias cementantes, uniendo paredes de las células contiguas (Poovaiah et al., 1993; Bonilla, 2013). Además, tiene la capacidad para disminuir la permeabilidad hidráulica de las membranas celulares y reducir la absorción de agua, lo que llevaría a una menor formación de grietas en el fruto (Proebsting et al., 1973).

El movimiento de calcio en el árbol ocurre principalmente por el flujo xilemático (Marschner, 1983) y debido a que, el huerto presentó un crecimiento vegetativo excesivo, la mayor parte de este macronutriente se podría haber dirigido hacia los brotes. Al respecto, Wiebe et al. (1977) señalaron que los órganos con amplia superficie, o los que están más directamente expuestos a la luz, reciben mayor cantidad de agua y calcio a través del xilema, el cual se encuentra influenciado por la presión osmótica de la solución del suelo, así como por las condiciones que favorecen una alta tasa de transpiración. Por ende, los frutos están recibiendo una menor cantidad de calcio, provocando una menor cohesión celular, que posteriormente va a desencadenar en una mayor susceptibilidad a la partidura (Podestá et al., 2001). Sin embargo, en este ensayo no se cuantificó el contenido de calcio, por lo que, futuras investigaciones deberían considerarlo, al analizar la ocurrencia de este problema.

Asimismo, el excesivo vigor que presentaron los árboles, produjo un mayor sombreado a los frutos, lo que también afectaría la ocurrencia de este fenómeno. Al respecto, Marini et al. (1991) indican que la calidad de la fruta se encuentra directamente relacionada con la densidad de flujo de fotones (PPFD), mostrando que, en cerezas el mayor PPFD incrementa de forma logarítmica la coloración del fruto y el contenido de sólidos solubles. También, Southwick et al. (1990) reportaron que el peso fresco, materia seca, firmeza y contenido de azúcar durante el desarrollo de especies *Prunus* está directamente asociado con la PPFD. Así el sombreado afecta la calidad y composición del fruto, produciendo menor firmeza que podría haber inducido una mayor susceptibilidad a la partidura. Pudiendo ser este el caso del testigo, o de la susceptibilidad a la partidura en una situación particular.

En lo que respecta a la malla reflectora (Extenday[®]), ésta se empleó principalmente para homogeneizar la tonalidad de los frutos, debido a que los frutos que más demoran en tomar color son los que se encuentran en la parte media y baja de la copa del árbol. De aquí que, la malla podría afectar la partidura; en manzanos ('Gala Mondial') se ha visto que el uso de esta malla permite una distribución más uniforme de la luz en el árbol, lo que ayuda a alzar el contenido de azúcar del fruto (Meinhold et al., 2011), lo que en cerezas se podría traducir en mayor partidura, al absorber una mayor cantidad de agua libre desde el exterior al interior del fruto por el efecto osmótico. No obstante, la malla estuvo presente en todas las hileras y la concentración de sólidos solubles no se asoció a una mayor susceptibilidad a la partidura, por lo que se descarta la influencia sobre esta problemática.

Los resultados comprobaron que las aplicaciones de GA₃ reducen la susceptibilidad de frutos maduros a la partidura, pero no fue posible asociar la aplicación de este fitoregulator con una mayor expresión de *PaKCS6* y *ABC-2*, 15 y 30 días después de la aplicación (DDA). En relación a *PaKCS6*, Balbontín et al. (2014) estudiaron los niveles de expresión de este gen durante el crecimiento del fruto en 'Kordia' y 'Bing', observando mayores niveles transcripcionales en la variedad más tolerante. Además, en esta misma,

notaron que la expresión génica era mayor en cuaje y que iba disminuyendo a medida que se desarrollaba el fruto. Esto podría indicar que la expresión de este gen se modificaría en un estadio de desarrollo no evaluado o simplemente que este regulador de crecimiento no actúa sobre *PaKCS6*. Con respecto a *ABC-2*, es importante mencionar que existen otros transportadores, *CER5/ABCG12* y *ABCG11*, que son necesarios para la exportación y secreción de cera (Kunst y Samuels, 2009). Así, los precursores de cutina podrían pasar a través de estos transportadores y no necesariamente por el analizado en esta investigación, lo que estaría influyendo en la baja expresión de este gen. No obstante, sí pareciera tener una acción sobre la composición de la cutícula, dado que modificó la expresión de *CER4*, aunque se comportó de manera diferencial dependiendo de las variedades analizadas, en la cual se advirtió que sólo en frutos de ‘Lapins’ se privilegió la formación de alcoholes primarios, que van a ser componentes de la cutícula (Yeats y Rose, 2013).

Respecto a los genes asociados a la modificación de la pared celular *XET-6* y *EXP-A3*, GA_3 , a 15 y 30 DDA, modificó la expresión de éstos, observando un aumento de la expresión en frutos de ‘Lapins’ y una disminución en frutos de ‘Kordia’, actuando de manera diferencial al igual que *CER4*. Al respecto, Takizawa et al. (2014) indican que los genes involucrados en la modificación de la pared celular permitirían remodelar en lugar de debilitar esta estructura, lo que retendría posiblemente la flexibilidad y la plasticidad de la célula, ayudando al fruto a resistir la formación de fisuras. Además, como la expresión de estos genes ocurrió en etapas más tardías, podría explicar la mayor tolerancia a la partidura, ya que proporciona al fruto mayor capacidad de extensión, evitando así la formación de grietas cuando se generan cambios en el volumen del fruto (Usenik et al., 2005; Balbontín et al., 2013 y 2014). Adicionalmente, Usenik et al. (2005) indicaron que frutos de ‘Van’ y ‘Sunburst’ tratados con GA_3 produjeron un aumento en la elasticidad de la pared celular, lo que podría reducir la partidura. Por otra parte, en litchi, Wang et al. (2006) encontraron que la expresión de enzimas involucradas en la elongación de la pared celular, prevendría la formación de microgrietas en el fruto.

Como se observó, los tratamientos con GA_3 generaron efectos variables sobre la expresión génica, en donde algunos de éstos fueron estimulados y otros reprimidos. Sin embargo, los resultados no muestran una correlación, por lo que no se puede atribuir a estos genes la reducción de la partidura. Además, queda en evidencia que la acción del ácido giberélico es multivariada e indirecta, ya que produjeron efectos sobre la reducción de la partidura, a pesar de que las variedades no presentaron variación en la expresión de los precursores para la formación de ceras e indujeron efectos dispares en los genes involucrados en la modificación de la pared celular. Por esto, la disminución en este problema podría deberse a la suma de las modificaciones producidas en el fruto, tales como el aumento del tamaño celular, diámetro de los frutos junto con los cambios producidos en la estructura de la pared celular y en las propiedades de la piel. Al respecto, Brüggewirth y Knoche (2016a), al evaluar las propiedades mecánicas de la piel (epidermis e hipodermis) en frutos de ‘Kordia’, ‘Sam’ y ‘Sweetheart’, encontraron que la tensión de esta estructura disminuye por la maduración, la pérdida de turgencia y aumentos de temperatura, que producen cambios enzimáticos que ablandan y relajan la pared celular junto con la disminución de las pectinas de la lámela media. Adicionalmente, en otro estudio, Brüggewirth y Knoche (2016b), compararon esta estructura en variedades con grados contrastantes de susceptibilidad a la partidura (‘Regina’ y ‘Burlat’), encontrando una mayor rigidez de la piel en frutos de

‘Regina’ a diferencia de ‘Burlat’, por ende, atribuyeron estas diferencias a la distinta susceptibilidad entre las variedades analizadas.

Por esta razón, todo aquello que modifique la cohesión y resistencia de esta estructura va a afectar la ocurrencia del problema. Así pues, una mayor firmeza, que proporciona una estructura de la pared celular más íntegra, sería la variable que estaría determinado finalmente en que un fruto tenga una menor incidencia a la partidura. Secundariamente participarían otras variables, como la concentración de sólidos solubles y los niveles de ceras, ya que influyen en la entrada y salida de agua en el fruto. Esto confirma el alto grado de complejidad que posee el fenómeno de la partidura. Al respecto, Quero-García et al. (2014) realizaron mapeos de loci de caracteres cuantitativos (QTL) para la tolerancia a la partidura y detectaron diferentes grupos de ligamientos en distintas regiones del genoma del cerezo, interviniendo diferentes grupos de genes en cada área.

Ahora bien, sería importante que en futuras investigaciones relacionadas con el tema, realicen un seguimiento continuo de genes involucrados con la partidura, ya que la expresión varía en los diferentes estadios de desarrollo del fruto. También se hace necesario buscar y analizar otras rutas metabólicas, que profundicen el efecto del GA₃ sobre este fenómeno.

Adicionalmente, se comprobó que el GA₃ ejerce efectos diferenciales en las variedades evaluadas, ya que en frutos de ‘Lapins’ aumenta la expresión y en frutos de ‘Kordia’ la disminuye. En relación a esto, Engin et al. (2016) y Araya (2014) indicaron que las respuestas de las plantas a las aplicaciones de reguladores de crecimiento dependen de la variedad, las condiciones medioambientales, el tipo de tejido y la concentración utilizada, lo que explicaría los efectos producidos en este estudio.

Por último, en relación al desarrollo reproductivo de las yemas con las aplicaciones de GA₃, se observó una menor diferenciación al principio de este proceso, lo que concuerda con lo señalado por Unesik et al. (2005), quienes indicaron que la aplicación de GA₃ retarda el desarrollo de la yema floral, particularmente al aplicarlo durante y/o cercano al inicio de la etapa III de crecimiento del fruto. Si bien el desarrollo se retrasa, en la última evaluación (3 meses después de cosecha), todos los órganos florales de las yemas se encontraban en el mismo estado (figuras 7, 13 y 19). Tal como lo observado por Aburto (2012).

CONCLUSIONES

En relación a la calidad del fruto, las aplicaciones de GA₃ aumentaron la firmeza de los frutos, la concentración de sólidos solubles y la proporción de frutos con mayor calibre (>26 mm).

Todas las concentraciones de GA₃ aplicadas durante el desarrollo del fruto, reducen la incidencia de partidura en 'Kordia', 'Regina' y 'Lapins', sin importar la época de aplicación.

En relación al desarrollo reproductivo, las aplicaciones de GA₃ producen un retraso en el proceso de diferenciación floral de las yemas, el que se normaliza antes del otoño.

Los tratamientos con GA₃ modifican la expresión de genes involucrados con la biosíntesis de la membrana cuticular y la modificación de la pared celular. La expresión de estos genes no se correlaciona con la partidura. La acción del ácido giberélico cambia la expresión génica dependiendo de la variedad utilizada.

Existe una relación negativa entre el índice de partidura y la firmeza.

LITERATURA CITADA

Aburto, J. 2012. Aplicación de ácido giberélico para retrasar la maduración en cerezo (*Prunus avium* L.) en el sur de Chile. Tesis Ingeniería Agronómica y Magíster en Ciencias Agropecuarias, Mención Producción Frutícola. Santiago, Chile: Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. 74h.

Araya, R. 2014. Efecto de las aplicaciones de ácido giberélico sobre la época de cosecha y calidad de frutos de cerezo (*Prunus avium* L.) en las variedades Regina y Kordia. Memoria Ingeniería Agronómica. Santiago, Chile: Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. 38h.

Balbontín, C.; H. Ayala; R. Bastías; G. Tapia; M. Ellena; C. Torres; J. Yuri; J. Quero-García; J. Rios and H. Silva. 2013, Jan. Cracking in sweet cherries: a comprehensive review from a physiological, molecular, and genomic perspective. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 73(1): 66-72.

Balbontín, C; H. Ayala; J. Rubilar; J. Cote and C. Figueroa. 2014, Feb. Transcriptional analysis of cell wall and cuticle related genes during fruit development of two sweet cherry cultivars with contrasting levels of cracking tolerance. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 74(2): 162-169.

Bonilla, I. 2013. Introducción a la nutrición mineral (cap. 6, pp. 81-102). En: Azcón-Bieto, J. y M. Talón (eds.). Fundamentos de fisiología vegetal. España: McGraw-Hill Interamericana. 651p.

Borve, J.; L. Sekse; A. Stensvand and J. Ystaas. 1998, Jul. Cuticular fractures as infection sites of *Botrytis cinerea* in sweet cherry fruits. *Acta Horticulturae*, 468: 737-740.

Brüggenwirth, M. and M. Knoche, 2016a, Jan. Factors affecting mechanical properties of the skin of sweet cherry fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 141(1): 45-53.

Brüggenwirth, M. and M. Knoche. 2016b, Mar. Mechanical properties of skins of sweet cherry fruit of differing susceptibilities to cracking. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 141(2): 162-168.

Brummell, D.A. and M.H. Harpster. 2001. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. (ch. 18, pp. 311-339). In: Plant cell walls. Netherlands: Springer. 430p.

Canli, F. and H. Orhan. 2009, Jan. Effects of preharvest gibberellic acid applications on fruit quality of '0900 Ziraat' sweet cherry. *HortTechnology*, 19(1): 127-129.

Choi, C.; P. Wiersma; P. Toivonen and F. Kappel. 2002, Nov. Fruit growth, firmness and cell wall hydrolytic enzyme activity during development of sweet cherry fruit treated with gibberellic acid (GA₃). *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 77(5): 615-621.

Christensen, J. V. 1996. Rain-induced cracking of sweet cherries: its causes and prevention. (ch. 12, pp. 297-330). In: A. Webster and N. Looney. *Cherries: crop physiology, production and uses*. Wallingford, UK: CAB International. 513p.

Christensen, J. V. 1972, Sept. Cracking in cherries iv. physiological studies of the mechanisms of cracking. *Acta Agriculturae Scandinavica*, 22(3): 153-162.

Christensen, J. V. 1996. Rain-induced cracking of sweet cherries: its causes and prevention. (ch. 12, pp. 297-330). In: A. Webster and N. Looney. *Cherries: crop physiology, production and uses*. Wallingford, UK: CAB International. 513p.

Cline, J. A. and M. Trought. 2007, Mar. Effect of gibberellic acid on fruit cracking and quality of 'Bing' and 'Sam' sweet cherries. *Canadian Journal of Plant Science*, 87(3): 545-550.

Di Rienzo J. A.; F. Casanoves; M. G. Balzarini; L. González; M. Tablada y C. W. Robledo. 2015. InfoStat. [en línea]. Versión 2015. Argentina: Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, Grupo InfoStat, FCA. Recuperado en <www.infostat.com.ar> Consultado el: 24 de Septiembre de 2015.

Engin, H. and A. Ünal. 2004, Oct. Examination of flower bud initiation and differentiation in 'Redhaven' peach by using scanning electron microscope. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 7(10): 1824-1826.

Engin, H.; Z. Gokbayrak and M. Sakaldas. 2016, Jun. Effects of 22S, 23S-homobrassinolide and gibberellic acid on occurrence of physiological disorders and fruit quality of 'Summit' and 'Regina' sweet Cherries. *Erwerbs-Obstbau*, 58(2): 1-8.

Horvitz, S.; C. Godoy; A. López and A. Yommi. 2003, Aug. Application of gibberellic acid to 'Sweetheart' sweet cherries: effects on fruit quality at harvest and during cold storage. *Acta Horticulturae*, 628: 311-316.

Illumina, 2015. Eco Real-Time PCR. [en línea] Versión 3.0.16.0. Estados Unidos: Illumina. Recuperado en <www.support.illumina.com/real_time_pcr/eco_qpcr.html> Consultado el: 24 de Septiembre de 2015.

Kafkaletou, M.; M. V. Christopoulos; M. E. Ktistaki; T. Sotiropoulos and E. Tsantili. 2015, Dec. Rain cover, respiration, quality attributes and storage in cherries (*Prunus avium* L.). *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 88(1): 87-96.

Kasai, S.; H. Hayama; Y. Kashimura; S. Kudo and Y. Osanai. 2008, Apr. Relationship between fruit cracking and expression of the expansin gene *MdEXPA3* in 'Fuji' apples (*Malus domestica* Borkh.). *Scientia Horticulturae*, 116(2): 194-198.

Khadivi-Khub, A. 2015, Jan. Physiological and genetic factors influencing fruit cracking. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37(1): 1-14.

Kunst L. and L. Samuels. 2009, Dec. Plant cuticles shine: advances in wax biosynthesis and export. *Current opinion in Plant Biology*, 12(6): 721-727.

Looney, N. 1996. Principles and practice of plant bioregulator usage in cherry production. (ch. 11, pp. 279-298). In: A. Webster and N. Looney. Cherries: crop physiology, production and uses. Wallingford, UK; CAB International. 513 p.

Lu, W.; Y. Wang; Y. Jiang; J. Li; H. Liu; X. Duan and L. Song. 2006, Dec. Differential expression of litchi XET genes in relation to fruit growth. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44(11): 707-713.

Marini, R.; P. Sowers and M. Marini. 1991, Apr. Peach fruit quality is affected by shade during final swell of fruit growth. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 116(3): 383-389.

Marschner H, 1983. General Introduction to the mineral nutrition (ch. 1, pp.5-60). In: Läuchli, A and RL, Bielecki (eds.). Inorganic plant nutrition. Berlin: Springer-Verlag. 449p.

Meinhold, T.; L. Damerow and M. Blanke. 2011, Jun. Reflective materials under hailnet improve orchard light utilisation, fruit quality and particularly fruit colouration. *Scientia Horticulturae*, 127(3): 447-451.

Meisel, L.; B. Fonseca; S. González; S. Baeza; R. Yates; V. Cambiazo; R. Campos; M. González; A. Orellana; J. Retamales and H. Silva. 2005, Feb. A rapid and efficient method for purifying high quality total RNA from peaches (*Prunus pérsica* L.) for functional genomics analyses. *Biological Research*, 38(1): 83-88.

Moing, A.; C. Renaud; H. Christmann; L. Fouilhaux; Y. Tauzin; A. Zanetto and J. Claverie. 2004, Sept. Is there a relation between changes in osmolarity of cherry fruit flesh or skin and fruit cracking susceptibility? *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 129(5): 635-641.

Onofri, A. 2007. Routine statistical analyses of field experiments by using an Excel extension (pp. 93-96). In: National Conference Italian Biometric Society: "La statistica nelle scienze della vita e dell'ambiente"(6^a, 2007, Pisa, Italy). Routine statistical analyses of field experiments by using an excel® extension. Pisa, Italy: University of Perugia. 4p.

Plavcova, L.; U. Hacke; A. Almeida-Rodriguez; E. Li and C. Douglas. 2013, Jul. Gene expression patterns underlying changes in xylem structure and function in response to increased nitrogen availability in hybrid poplar. *Plant, Cell and Environment*, 36(1): 186-199.

Peschel, S. and M. Knoche. 2005, Jul. Characterization of microcracks in the cuticle of developing sweet cherry fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 130(4): 487-495.

Podestá, L.; M. Rodríguez; F. Gil y C. Arjona. 2001, nov. Efecto del ácido giberélico y del calcio sobre el tamaño, agrietamiento y otros parámetros de calidad en frutos de cerezo (*Prunus avium* L.) cv. Bing. *Investigación Agraria: Producción y Protección Vegetal*, 16(1): 37-48.

Proebsting, E.; G. Carter and H. Mills. 1973, Jan. Quality improvement in canned 'Rainier' cherries (*Prunus avium* L.) with gibberellic acid. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 98(4): 334-336.

Poovaliah, B. W.; A. S. Reddy and L. Feldman. 1993, Mar. Calcium and signal transduction in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 12(3): 185-211.

Quero-Garcia, J.; A. Fodor; A. Reignier; G. Capdeville; J. Joly; Y. Tauzin and E. Dirlewanger. 2014, Nov. QTL detection of important agronomic traits for sweet cherry breeding. *Acta Horticulturae*, 1020: 57-64.

Rowland O.; H. Zheng; S. R. Hepworth; P. Lam; R. Jetter and L. Kunst. 2006, Nov. *CER4* encodes an alcohol-forming fatty acyl-coenzyme a reductase involved in cuticular wax production in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 142(3): 866-877.

Sekse, L. 1998, Jan. Fruit cracking mechanisms in sweet cherries (*Prunus avium* L.) a review. *Acta Horticulturae*, 468: 637-648.

Simon, G. 2006, Mar. Review on rain induced fruit cracking of sweet cherries (*Prunus avium* L.), its causes and the possibilities of prevention. *International Journal of Horticultural Science*, 12(3): 27-35.

Southwick, S. M.; S.A. Weinbaum; T.T. Muraoka; A.M Shackle and J.T. Yeager. 1990, Jul. Leaf attributes as indices of fruit quality in prune tree canopies. *HortScience*, 25(7): 751-754.

Stehr, R. 2001, Jun. Screening of sweet cherry cultivars in northern Germany. *Acta Horticulturae*, 667: 65-68.

Takizawa, A.; H. Hyodo; K. Wada; T. Ishii; S. Satoh and H. Iwai. 2014, Feb. Regulatory specialization of xyloglucan (XG) and glucuronoarabinoxylan (GAX) in pericarp cell walls during fruit ripening in tomato (*Solanum lycopersicum*). *PLoS one*, 9(2): e89871.

Usenik, V.; D. Kastelec and F. Stampar. 2005, Apr. Physicochemical changes of sweet cherry fruits related to application of giberellic acid. *Food Chemistry*, 90(4): 663-671.

Wang, Y.; W. Lu; J. Li and Y. Jiang. 2006, Jan. Differential expression of two expansin genes in developing fruit of cracking-susceptible and resistant litchi cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 131(1): 118-121.

Wang, Y. and L. E. Long. 2015, Aug. Physiological and biochemical changes relating to postharvest splitting of sweet cherries affected by calcium application in hydrocooling water. *Food Chemistry*, 181: 241-247.

Way, R. D. 1967. Cherry varieties for New York State. (Bulletin n° 1197). New York state college of agriculture and life sciences. New York, U.S.A.: New York State Agricultural Experiment Station. 6p.

Wiebe, H. J.; H.P, Schätzler and W. Kühn. 1977, Feb. On the movement and distribution of calcium in white cabbage in dependence of the water status. *Plant and Soil*, 48(2): 409-416.

Yamaguchi, M.; T. Haji and H. Yaegaki. 2004, Sept. Differences in mesocarp cell number, cell length, and occurrence of gumming in fruit of japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) cultivars during their development. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 73(3): 200-207.

Yeats, T. H. and J. K. Rose, J. K. 2013, Sept. The formation and function of plant cuticles. *Plant Physiology*, 163(1): 5-20.

Yildirim, A. and F. Koyuncu. 2010, Sept. The effect of gibberellic acid applications on the cracking rate and fruit quality in the '0900 Ziraat' sweet cherry cultivar. *African Journal of Biotechnology*, 9(38): 6307-6311.

APÉNDICE I

Cuadro 1. Efecto de distintas concentraciones y épocas de aplicación de ácido giberélico (GA₃) sobre la partidura en campo en 'Kordia' y 'Regina'.

Niveles del factor	Partidura en campo	
	Kordia	Regina
Concentración (mg L ⁻¹)	(%)	
0	9,80 a ¹	8,00 ns
10	5,45 b	5,61
20	5,22 b	2,82
30	3,43 b	2,57
Época de aplicación		
Verde translúcido	5,73 ns ²	5,95 a
Amarillo pajizo	6,28	3,52 b

¹ Medias en sentido vertical con distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los niveles del mismo factor, según la prueba de LSD Fisher ($p=0,05$). ² ns: Diferencias no significativas ($p>0,05$).

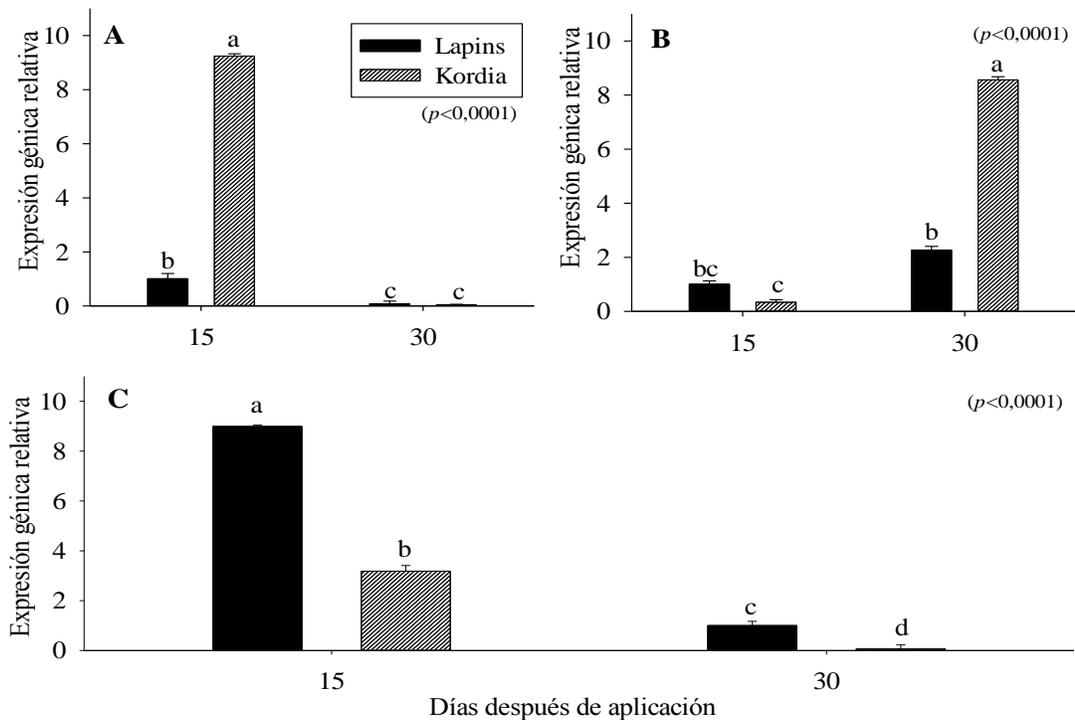


Figura 1. Expresión basal (sin aplicación de GA₃) de ABC-2 (A), CER4 (B) y PaKCS6 (C) en estado pajizo y maduro. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, según la prueba de LSD Fisher ($p=0,05$).

APÉNDICE II

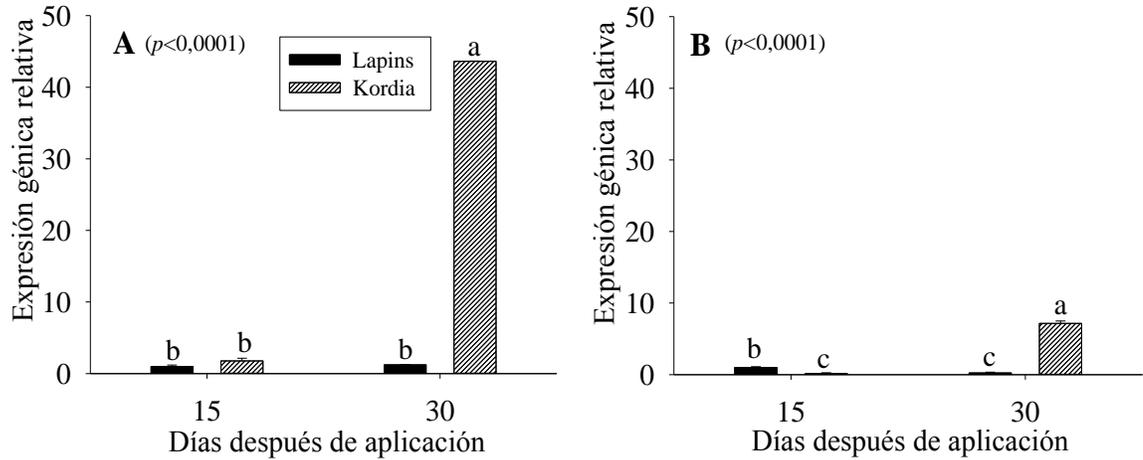


Figura 2. Expresión basal (sin aplicación de GA_3) de *XET* (A) y *EXP* (B) en estado pajizo y maduro. ¹ Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, según la prueba de LSD Fisher ($p=0,05$).

Cuadro 2. Efecto de distintas concentraciones y épocas de aplicación de ácido giberélico (GA_3) sobre la carga frutal relativa.

Niveles del factor	Carga frutal relativa		
	Lapins	Regina	Kordia
Concentración (mg L ⁻¹)	(1 a 5) ³		
0	3,02 ns ¹	3,18 ns ²	2,95 ns
10	3,12	3,07	3,13
20	3,07	3,06	3,09
30	3,24	3,02	3,01
Época de aplicación			
Verde Traslúcido	3,09 ns	3,09 ns	3,07 ns
Amarillo pajizo	3,08	3,08	3,02

¹ Medias en sentido horizontal con distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los niveles del mismo factor, según la prueba de LSD Fisher ($p=0,05$). ² ns: Diferencias no significativas ($p > 0,05$). ³ Los resultados se expresaron en escala de 1 a 5, en donde 1 indica ausencia de frutos y 5 carga excesiva.

APÉNDICE III

Cuadro 3. Efecto de distintas concentraciones y épocas de aplicación de ácido giberélico (GA₃) sobre la proporción de frutos con distinto color, en 'Lapins'.

Niveles del factor	Color		
	C ³	R ⁴	RP ⁵
Concentración (mg L ⁻¹)	%		
0	69,50 a ¹	28,50 c	2,00 b
10	35,00 b	39,00 b	24,00 a
20	19,00 b	52,50 a	28,00 a
30	23,50 b	40,50 b	35,00 a
Época de aplicación			
Verde Traslúcido	34,75 ns ²	40,25 ns	23,50 ns
Amarillo pajizo	38,75	40,00	21,25

¹ Medias en sentido vertical con distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los niveles del mismo factor, según la prueba de LSD Fisher (p=0,05). ² ns: Diferencias no significativas (p>0,05). ³ C: Caoba. ⁴ R: Rojo. ⁵ RP: Rojo pálido.

Cuadro 4. Efecto de distintas concentraciones y épocas de aplicación de ácido giberélico (GA₃) sobre la proporción de frutos con distinto color del fruto en 'Regina'.

Niveles del factor	Color		
	CO ³	C ⁴	R ⁵
Concentración (mg L ⁻¹)	(%)		
0	53,00 a ¹	32,00 b	16,00 c
10	25,00 b	43,50 a	31,50 b
20	27,50 b	38,50 ab	37,00 b
30	16,50 c	32,00 b	48,50 a
Época de aplicación			
Verde Traslúcido	31,00 ns ²	35,25 ns	34,25 ns
Amarillo pajizo	30,50	37,75	32,25

¹ Medias en sentido vertical con distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los niveles del mismo factor, según la prueba de LSD Fisher (p=0,05). ² ns: Diferencias no significativas (p>0,05). ³ CO: Caoba oscuro. ⁴ C: Caoba. ⁵ R: Rojo.

APÉNDICE IV

Cuadro 5. Efecto de distintas concentraciones y épocas de aplicación de ácido giberélico (GA₃) sobre la proporción de frutos con distinto color del fruto, en 'Kordia'.

Niveles del factor	Color			
	CO ³	C ⁴	R ⁵	RP ⁶
Concentración (mg L ⁻¹)	(%)			
0	18,00 a ¹	64,00 a	18,00 b	0,00 c
10	16,00 a	46,00 b	35,00 a	2,50 b
20	14,00 ab	43,00 b	35,00 a	8,50 b
30	10,00 b	36,00 b	34,50 a	19,50 a
Época de aplicación				
Verde Traslúcido	15,50 ns ²	49,25 ns	30,25 ns	8,75 ns
Amarillo pajizo	13,50	45,00	31,00	6,50

¹ Medias en sentido vertical con distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los niveles del mismo factor, según la prueba de LSD Fisher (p=0,05). ² ns: Diferencias no significativas (p>0,05). ³ CO: Caoba oscuro. ⁴ C: Caoba. ⁵ R: Rojo. ⁶ RP: Rojo pálido.

Cuadro 6. Efecto de distinta concentración y época de aplicación de ácido giberélico (GA₃) sobre el diámetro ecuatorial en 'Lapins', la acidez titulable en 'Regina' y la masa junto con la acidez titulable en 'Kordia'.

Tratamientos	Diámetro ecuatorial	Acidez titulable	Masa	Acidez titulable
	mm	(% ácido málico)	g	(% ácido málico)
Control(0-vt) ¹	26,03	0,89	11,43	0,88
Control(0-ap)	26,98	0,84	11,50	0,85
GA(10-vt)	26,61	0,87	11,22	0,86
GA(10-ap)	26,38	0,83	11,43	0,80
GA(20-vt)	27,36	0,84	11,62	0,85
GA(20-ap)	25,50	0,83	11,49	0,83
GA(30-vt)	24,82	0,85	10,91	0,85
GA(30-ap)	26,03	0,81	11,41	0,78
Significancia	0,3912	0,9743	0,3588	0,6651

¹ Entre paréntesis se indica la concentración y la época de aplicación de GA₃; vt=verde translúcido, ap=amarillo pajizo.