



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS AGRARIAS**

*Tesis para acceder al grado académico de Doctor en Ciencias Agrarias*

**CAMBIOS FISIOLÓGICOS Y METABÓLICOS EN RESPUESTA A  
PRÁCTICAS AGRONÓMICAS APLICADAS PARA LA MEJORA DEL  
CUAJADO DE FRUTOS DE NARANJOS ‘NAVELATE’**

***Alumna:*** Mgter. Ing. Agr. Norma Guadalupe Micheloud

***Director:*** Dr. Norberto Francisco Gariglio (FCA-UNL)

***Co-Director:*** M.Sc. Ing. Agr. Álvaro Otero (INIA, Uruguay)

- Esperanza, 17 de junio del 2021 -

## ***AGRADECIMIENTOS***

En estas líneas quiero agradecer a todas las personas e instituciones que hicieron posible que este trabajo de tesis pudiera llevarse a cabo, especialmente:

- A mis directores, Norberto y Álvaro, por su enorme esfuerzo e incondicional dedicación en mi formación.
- A Luciano, mi familia y amigos por comprenderme y cederme de su tiempo; por su inagotable paciencia y cariño.
- A la Universidad Nacional del Litoral y la Facultad de Ciencias Agrarias, por alentar y apoyar con recursos la formación de los docentes investigadores y permitirme realizar el Doctorado en Ciencias Agrarias.
- Al Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA, Salto Grande, Uruguay), por brindarme el espacio para realizar esta tesis y las disponibilidades necesarias, tanto de campo como de laboratorio, la movilidad, el apoyo técnico, entre otros.
- A mis compañeros de trabajo, tanto de la FCA, quienes me han apoyado y alentado en esta etapa, como a los de INIA, quienes han intercambiado consejos, experiencias y sugerencias conmigo en todo momento.
- Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) que me otorgaron becas de postgrado que me permitieron dedicarme a mi formación doctoral y a la investigación durante estos años.
- A los Evaluadores Carlos Mesejo, Mercedes Arias y Fernando Acevedo Alvez, por los aportes.

## ÍNDICE GENERAL

<b>Resumen</b> .....	1
<b>Abstract</b> .....	3
<b>1- INTRODUCCIÓN</b> .....	5
<b>1.1. Planteamiento del Problema</b> .....	5
<b>1.2. Antecedentes</b> .....	6
1.2.1. <i>Importancia mundial del cultivo de los cítricos</i> .....	6
1.2.2. <i>El cultivo de los cítricos en Argentina</i> .....	7
1.2.3. <i>El cultivo de los cítricos en la provincia de Santa Fe</i> .....	8
<b>2- MARCO TEÓRICO</b> .....	10
<b>2.1. Origen, taxonomía y principales características botánicas de los Citrus</b> .....	10
<b>2.2. Aspectos fisiológicos</b> .....	11
2.2.1. <i>Requerimientos del cultivo</i> .....	11
2.2.2. <i>Brotación y floración</i> .....	11
2.2.2.1. <i>Brotación</i> .....	11
2.2.2.2. <i>Inducción floral</i> .....	12
2.2.2.3. <i>Floración</i> .....	13
2.2.3. <i>Cuajado y crecimiento inicial de frutos</i> .....	13
2.2.3.1. <i>Fecundación y partenocarpia</i> .....	13
2.2.3.2. <i>Factores endógenos</i> .....	15
2.2.3.2. <i>Factores ambientales y de manejo</i> .....	16
2.2.4. <i>Relaciones fuente-destino</i> .....	16
2.2.4.1. <i>Actividad fotosintética</i> .....	17
2.2.4.1.1. <i>Factores que afectan la actividad fotosintética</i> .....	19
2.2.4.2. <i>El rol de los carbohidratos en las plantas de Citrus</i> .....	20
2.2.4.3. <i>Relación entre el metabolismo del nitrógeno y de los carbohidratos</i> .....	22
2.2.4.4. <i>Técnicas para la manipulación de la relación fuente-destino</i> .....	23
2.2.4.4.1. <i>Rayado de ramas</i> .....	23

2.2.4.4.2. Aplicación de giberelina a la caída de pétalos.....	25
2.3. El cultivar Navelate.....	26
<b>3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>28</b>
3.1. Hipótesis general.....	28
3.2. Hipótesis relacionada al nivel de fertilización nitrogenada.....	28
3.3. Hipótesis relacionada a las técnicas de aplicación de giberelina y rayado de ramas.....	29
3.4. Objetivos.....	29
<b>4. METODOLOGÍA.....</b>	<b>31</b>
4.1. Ubicación y características del experimento .....	31
4.2. Diseño experimental y tratamientos.....	34
4.3. Parámetros evaluados.....	36
4.3.1. Intensidad de floración, brotación, tasa relativa de caída de frutos y rendimiento.....	36
4.3.2. Determinación del estado nutricional utilizando SPAD.....	37
4.3.3. Medidas fluorescencia de la clorofila y del intercambio gaseoso del metabolismo fotosintético.....	38
4.4. Análisis de tejidos vegetales.....	39
4.4.1. Obtención y acondicionamiento de las muestras.....	39
4.4.2. Análisis de carbohidratos (glucosa, fructosa, sacarosa y almidón).....	40
4.4.3. Determinación de prolina y malondialdehído (MDA).....	42
4.5. Análisis estadístico.....	43
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>46</b>
5.1. Cuantificación del porcentaje de frutos cuajados y la productividad por planta, ante la aplicación de las prácticas culturales.....	46
5.1.1. Composición de la brotación primaveral del cultivar 'Navelate' .....	46
5.1.2. Evolución de la tasa relativa de abscisión de estructuras reproductivas.....	46
5.1.2.1. Efectos de los factores evaluados sobre la evolución de la tasa relativa de abscisión de frutos.....	48
5.1.3. Efectos de los factores evaluados sobre el porcentaje de cuajado final de frutos por planta.....	51
5.1.4. Efectos de los factores evaluados sobre la productividad por planta.....	53
5.2. Evaluación del efecto del nivel de nitrógeno de la fertilización inicial, el rayado de ramas y la aplicación de giberelina sobre variables	55

<b>relacionadas con la economía de carbono en la planta, durante el período de establecimiento y crecimiento inicial de frutos .....</b>	
5.2.1. Evolución del índice de verdor (SPAD) en las hojas de la brotación de primavera y hojas maduras.....	55
5.2.1.1. Efectos de los factores evaluados sobre la evolución del índice de verdor (SPAD).....	56
5.2.2. Efecto de los factores evaluados sobre el contenido de nitrógeno foliar.....	58
5.2.3. Evolución de los parámetros de fluorescencia de la clorofila, en hojas maduras y hojas de la brotación de primavera.....	61
5.2.3.1. Efectos de los factores evaluados sobre los principales parámetros de fluorescencia de la clorofila.....	62
5.2.4. Evolución de las variables del intercambio gaseoso del metabolismo fotosintético entre hojas maduras y hojas de la brotación de primavera.....	66
5.2.4.1. Efectos de los factores evaluados sobre las variables del intercambio gaseoso del metabolismo fotosintético.....	69
5.2.5. Evolución del contenido de carbohidratos no estructurales en hojas maduras, hojas de la brotación de primavera y frutos en fase I.....	73
5.2.5.1. Efectos de los factores evaluados sobre el contenido de carbohidratos no estructurales .....	75
5.2.5.1. Hojas maduras.....	75
5.2.5.2. Hojas jóvenes.....	78
5.2.5.3. Frutos en fase I.....	81
<b>5.3. Evaluación del contenido de prolina y malondialdehído, ante la aplicación de prácticas culturales como fertilización nitrogenada, aplicación de giberelina y rayado de ramas.....</b>	<b>83</b>
5.3.1. Evolución del contenido de prolina en hojas de la brotación de primavera, hojas maduras y frutos en desarrollo.....	83
5.3.1.1. Efectos de los factores evaluados sobre el contenido de prolina.....	84
5.3.2. Evolución del contenido de malondialdehído en hojas de la brotación de primavera y hojas maduras.....	87
5.3.2.1. Efectos de los factores evaluados sobre el contenido foliar de MDA...	87
<b>5.4. Relación entre las variables que intervienen directamente en el balance de carbono en la planta, el estado nutricional y los indicadores de estrés con el cuajado de frutos y la productividad.....</b>	<b>89</b>
5.4.1. Relación entre las variables cuajado de frutos, número de frutos y kg por planta del cultivar 'Navelate' .....	89
5.4.2. Relación entre la 'tasa relativa de cuajado de frutos', y los parámetros del metabolismo fotosintético.....	91
5.4.3. Relación entre el índice de verdor (SPAD) y fluorescencia de la clorofila ( $\Phi$ FSII y Fv/Fm) con las variables de producción.....	92

5.4.4. <i>Relación entre los parámetros del intercambio gaseoso del metabolismo fotosintético con las variables de producción</i> .....	94
5.4.5. <i>Análisis de los componentes principales entre las variables productivas, índice SPAD, fluorescencia de la clorofila, y parámetros del intercambio gaseoso del metabolismo fotosintético</i> .....	96
5.4.6. <i>Relación entre el contenido de carbohidratos no estructurales con las variables de producción del cv. Navelate</i> .....	97
5.4.7. <i>Relación entre los indicadores de estrés (prolina y MDA) con las variables de producción del cv. Navelate</i> .....	99
5.4.8. <i>Análisis de los componentes principales entre las variables productivas, con el contenido de carbohidratos no estructurales, porcentaje de nitrógeno foliar, e indicadores de estrés</i> .....	100
<b>6. DISCUSIÓN</b> .....	101
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	127
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	129
<b>9. ANEXOS</b> .....	144

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Ubicación geográfica del lugar donde se realizó la experiencia (a) y fotografía aérea donde se observa el cuadro con la plantación del cultivar Navelate (b).....	31
Figura 2: Plantas de naranjos ‘Navelate’ seleccionadas para la realización de los tratamientos.....	33
Figura 3. Realización de la aplicación de giberelina (a) y confección de la técnica de rayado (b).....	36
Figura 4. Medición de la actividad del fotosistema II usando un fluorómetro de pulso modulado (a) operando en el modo ‘Yield’ (b) y Fv/Fm (c) con hojas aclimatadas a la oscuridad previamente utilizando pinzas especiales.....	38
Figura 5. Medición del intercambio gaseoso del metabolismo fotosintético en las hojas correspondientes al naranjo ‘Navelate’, utilizando un sistema portable de analizador infrarrojo de gases (CIRAS-1).....	39
Figura 6. Medición de carbohidratos por HPLC, las muestras fueron purificadas utilizándose (a) resinas catiónicas y aniónicas, (b) columnas que se ajustaron a pH, con el lavado con agua purificada y (c) el secado se realizó al vacío con un equipo speed-vac.....	41
Figura 7. Proporción (%) de los diferentes brotes generativos de la floración primaveral del cultivar ‘Navelate’.....	46
Figura 8. Evolución de la tasa relativa de abscisión de frutos [TRCF= $\text{Ln}(F1) - \text{Ln}(F2) / (T2 - T1)$ ], durante el período 29/09 al 17/12: a) valores medios y b) según el tipo de brote del cv. Navelate.....	47
Figura 9. Efecto de la dosis de nitrógeno de la fertilización inicial sobre la tasa relativa de abscisión de frutos ( $\text{frutos.día}^{-1}$ ), durante la primavera, en: (a) brotes de flor solitaria (FS), (b) ramilletes florales (RF) y (c) brotes mixtos (BM), del naranjo ‘Navelate’...	50
Figura 10. Efecto de la aplicación de giberelina a la caída de pétalos (50 ppm AG <sub>3</sub> , 01/10) sobre la evolución de la tasa relativa de abscisión de frutos durante la primavera, de: (a) Total y (b) brotes mixtos (BM).	50
Figura 11. Efecto del rayado de ramas a los 15 días posteriores a la caída de pétalos, sobre la evolución de la tasa relativa de abscisión de frutos ( $\text{frutos.día}^{-1}$ ) en: (a) Total, (b) brotes de flor solitaria (FS), (c) brotes mixtos (BM) y (d) brotes campaneros (BC).....	51
Figura 12. Evolución del índice SPAD en hojas jóvenes de la brotación nueva y en hojas maduras del cv. Navelate.....	55
Figura 13. Evolución de los parámetros de fluorescencia de la clorofila: rendimiento cuántico del fotosistema II (FSII) y eficiencia máxima del FSII (Fv/Fm).....	61
Figura 14. Efecto de la dosis de nitrógeno de la fertilización inicial sobre la evolución de: (a) el rendimiento cuántico del fotosistema II (FSII),	64

en hojas desarrolladas, y (b) efecto de la aplicación de aplicación de giberelina sobre la eficiencia máxima del FSII (Fv/Fm), de las hojas jóvenes de la nueva brotación, del cv. Navelate.....	
Figura 15. Evolución de: (a) asimilación neta del CO <sub>2</sub> (A <sub>CO<sub>2</sub></sub> , μmol.m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup> ), (b) conductancia estomática (G <sub>s</sub> , mmol.m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup> ), (c) relación CO <sub>2</sub> interno/CO <sub>2</sub> del aire (C <sub>i</sub> /C <sub>a</sub> ), (d) tasa de transpiración (E: mol.m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup> ), (e) eficiencia del uso del agua (EUA, μmol CO <sub>2</sub> /mol H <sub>2</sub> O) y (f) déficit de presión de vapor (DPV, mb), de hojas maduras y hojas de la brotación de primavera de ‘Navelate’.....	68
Figura 16. Evolución del contenido de: a) glucosa (mg.g <sup>-1</sup> MS), b) fructosa (mg.g <sup>-1</sup> MS), c) sacarosa (mg.g <sup>-1</sup> MS) y d) almidón (mg glucosa.g <sup>-1</sup> MS), en hojas maduras, hojas jóvenes y frutos en etapa I de desarrollo, del cv. Navelate... ..	75
Figura 17. Efecto de la aplicación de giberelina sobre el contenido de almidón (mg glucosa.g MS <sup>-1</sup> ) en hojas maduras del cv. Navelate..	77
Figura 18. Efecto del rayado de ramas (aplicación 15/10) sobre el contenido de: (a) glucosa (mg.g MS <sup>-1</sup> ); (b) fructosa (mg.g MS <sup>-1</sup> ) y (c) sacarosa (mg.g MS <sup>-1</sup> ) en hojas maduras del cv. Navelate.....	77
Figura 19. Evolución contenido de prolina en hojas de la brotación nueva, hojas maduras y frutos del cv. Navelate.....	84
Figura 20. Evolución contenido de MDA en hojas maduras y hojas de la brotación de primavera del cv. Navelate.....	87
Figura 21. Efecto del factor nivel de giberelina a la caída de pétalos sobre el contenido de MDA en las hojas jóvenes .....	89
Figura 22. Modelo de regresión lineal simple que representa la relación entre la producción (y= Kg.pl <sup>-1</sup> ) y el número de frutos (x= frutos.pl <sup>-1</sup> )....	90
Figura 23: Gráfico Biplot del análisis de los componentes principales entre las variables productivas, índice SPAD, fluorescencia de la clorofila, y parámetros del intercambio gaseoso del metabolismo fotosintético obtenidos de ambos tipos de hojas del cv. Navelate..	97
Figura 24: Gráfico Biplot del análisis de los componentes principales utilizando las variables productivas, con el contenido de carbohidratos no estructurales, porcentaje de nitrógeno foliar, e indicadores de estrés, del cv. Navelate.....	100



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores mensuales de los principales parámetros meteorológicos obtenidos durante el periodo septiembre-diciembre en la zona de Salto (Uruguay).....	32
Tabla 2. Datos del análisis de suelo, correspondiente al cuadro de ‘Navelate’ donde se realizó la experiencia, provistos por la empresa ‘Citrícola Salteña S.A.’ .....	33
Tabla 3. Datos del análisis foliar del cv. ‘Navelate’ correspondiente al ciclo productivo anterior a la realización de la experiencia, provistos por la empresa ‘Citrícola Salteña S.A.’ .....	34
Tabla 4. Efecto de los factores dosis de nitrógeno en la fertilización inicial, aplicación de giberelina a la caída de pétalos, y rayado de ramas sobre la ‘Tasa relativa de abscisión de frutos (futos.día-1)’, total y según el tipo de brote, del cv. ‘Navelate’, y valor ‘p’ del ANAVA.	48
Tabla 5. Efecto de los factores dosis de nitrógeno en la fertilización inicial, aplicación de ácido giberelina a la caída de pétalos, y tratamiento de rayado de ramas, sobre el cuajado de frutos total y por tipo de brote.	52
Tabla 6. Número de frutos por planta, en función de la interacción entre los factores nivel de nitrógeno en la fertilización inicial, aplicación de giberelina a la caída de pétalos y rayado de ramas, en ‘Navelate’.	53
Tabla 7. Efectos del nivel de nitrógeno en la fertilización, aplicación de ácido giberélico y el rayado de ramas, sobre la productividad (Kg.pl <sup>-1</sup> ) de ‘Navelate’ .....	54
Tabla 8. Efectos del nivel inicial de nitrógeno, la aplicación giberelina a la caída de pétalos y el rayado de ramas, sobre el índice SPAD .....	56
Tabla 9: Interacción de los factores nivel de nitrógeno en la fertilización inicial y aplicación de rayado de ramas, sobre el Índice SPAD, de las hojas maduras.....	57
Tabla 10: Índice SPAD en función de la interacción de los factores: la dosis de nitrógeno en la fertilización inicial, aplicación de giberelina a la caída de pétalos y rayado, en las hojas jóvenes .....	58
Tabla 11: Efectos del nivel inicial de nitrógeno, la aplicación de giberelina a la caída de pétalos y el rayado de ramas, sobre el Contenido de nitrógeno foliar (%MS), y valor ‘p’ del ANAVA.....	59
Tabla 12: Efecto de la interacción de la aplicación de giberelina a la caída de pétalos y el rayado sobre el contenido de nitrógeno foliar (%MS) de las hojas maduras.....	60
Tabla 13: Contenido de nitrógeno foliar (%MS) en función de la interacción de los factores: dosis de nitrógeno en la fertilización inicial, aplicación de giberelina y rayado, en las hojas jóvenes.....	60
Tabla 14. Efectos del nivel inicial de nitrógeno, la aplicación de giberelina a la caída de pétalos y el rayado de ramas, sobre el rendimiento	63

cuántico del fotosistema II (FSII) y la eficiencia máxima del FSII (Fv/Fm).....	
Tabla 15: Tabla 15: Interacciones entre los efectos de la dosis de nitrógeno en la fertilización inicial, aplicación de giberelina y rayado, sobre la eficiencia máxima del fotosistema II de las hojas maduras.....	65
Tabla 16: Interacciones entre los efectos de la dosis de nitrógeno en la fertilización inicial, aplicación de giberelina y rayado, sobre el rendimiento cuántico del fotosistema II de las hojas jóvenes.....	66
Tabla 17. Efectos del nivel inicial de nitrógeno, la aplicación de giberelina y el rayado de ramas, sobre los parámetros del intercambio gaseoso del metabolismo fotosintético de hojas maduras.....	70
Tabla 18. Efectos del nivel inicial de nitrógeno, la aplicación de giberelina y el rayado, sobre los parámetros del intercambio gaseoso del metabolismo fotosintético de hojas de la brotación de primavera..	71
Tabla 19: Interacciones entre los efectos de la dosis de nitrógeno en la fertilización inicial, la aplicación de giberelina y de rayado, sobre la asimilación neta del CO <sub>2</sub> (ACO <sub>2</sub> , μmol.m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup> ).....	72
Tabla 20: Interacciones entre los efectos de la dosis de nitrógeno en la fertilización inicial, la aplicación de giberelina y de rayado, sobre el Déficit de presión de vapor (DPV, mb).....	73
Tabla 21. Efectos del nivel inicial de nitrógeno, la aplicación giberelina a la caída de pétalos y el rayado de ramas, sobre el contenido de carbohidratos en hojas maduras.....	76
Tabla 22. Efectos del nivel inicial de nitrógeno, la aplicación de giberelina a la caída de pétalos y el rayado de ramas, sobre el contenido de carbohidratos en hojas jóvenes.....	78
Tabla 23: Interacciones entre los efectos de la dosis de nitrógeno en la fertilización inicial, la aplicación de giberelina y de rayado, sobre el contenido de fructosa (mg.g <sup>-1</sup> MS) de las hojas jóvenes.....	79
Tabla 24: Contenido de sacarosa (mg.g <sup>-1</sup> MS) de las hojas jóvenes, en función de la combinación del efecto de la dosis de nitrógeno en la fertilización inicial y la aplicación de rayado.....	80
Tabla 25: Interacciones entre los efectos de la dosis de nitrógeno en la fertilización inicial, la aplicación de giberelina y de rayado, sobre el contenido de almidón (mg glucosa.g <sup>-1</sup> MS) de las hojas jóvenes...	80
Tabla 26. Efectos del nivel inicial de nitrógeno, la aplicación de giberelina a la caída de pétalos y el rayado de ramas, sobre el contenido carbohidratos en frutos en desarrollo.....	81
Tabla 27: Variación del contenido de glucosa (mg g <sup>-1</sup> MS) de los frutos en etapa I de desarrollo, en función de la combinación del efecto de la dosis de giberelina y rayado.....	82
Tabla 28: Interacciones entre los efectos de la dosis de nitrógeno en la fertilización inicial, la aplicación de giberelina y de rayado, sobre el contenido de sacarosa (mg.g <sup>-1</sup> MS) de los frutos en etapa I.....	82
Tabla 29: Contenido de almidón (mg glucosa.g <sup>-1</sup> MS) de frutos en etapa I de desarrollo, en función de la combinación del efecto de la dosis de	83

nitrógeno en la fertilización inicial y la aplicación de giberelina...	
Tabla 30. Resultados del ANAVA del efecto de los tratamientos nivel inicial de nitrógeno, aplicación de giberelina a la caída de pétalos y rayado de ramas, sobre la concentración prolina.....	85
Tabla 31: Interacciones entre los efectos de la dosis de nitrógeno en la fertilización inicial, la aplicación de giberelina y de rayado, sobre el contenido de prolina ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ MS) de las hojas jóvenes.....	86
Tabla 32: Contenido de prolina ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ MS) de los frutos en etapa I, en función de la combinación del efecto de la dosis de nitrógeno en la fertilización inicial y la aplicación de rayado.....	86
Tabla 33. Efecto de los tratamientos nivel inicial de nitrógeno, aplicación de giberelina a la caída de pétalos y rayado de ramas, sobre el contenido foliar de MDA ( $\text{nmol.g}^{-1}$ MS), y resultados de la significancia estadística (valor 'p') del ANAVA.....	88
Tabla 34. Coeficiente de correlación de Pearson para las variables de producción del cv Navelate.....	90
Tabla 35. Coeficientes de Pearson, resultantes de la relación entre las variables: tasa relativa de cuajado de frutos (TRC), y las del metabolismo fotosintético, en ambos tipos de hojas .....	91
Tabla 36. Coeficientes de Pearson significativos, resultantes de la relación entre las variables: índice de verdor (SPAD), fluorescencia de la clorofila a y las de producción (% cuajado de frutos, $\text{N}^{\circ}$ frutos. $\text{pl}^{-1}$ y $\text{Kg.pl}^{-1}$ ), en ambos tipos de hojas del cv. Navelate.. .....	93
Tabla 37. Coeficiente de correlación de Pearson y valor 'p', resultantes de la relación entre los parámetros del intercambio gaseoso del metabolismo fotosintético con las variables productivas.....	95
Tabla 38. Coeficiente de correlación de Pearson y valor 'p', resultantes de la relación entre el contenido de carbohidratos con los parámetros de producción.....	98
Tabla 39. Coeficiente de correlación de Pearson y valor 'p', resultantes de la relación entre el contenido de prolina ( $\mu\text{M Pro. gMS}^{-1}$ ) de las hojas jóvenes, observado en la fecha 15/10, y las variables productivas....	99

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Condiciones ambientales y balance hídrico del suelo durante el periodo comprendido en la experiencia.....	144
Anexo 2. Resultados estadísticos de intensidad de floración (IF) de las plantas de ‘Navelate’ seleccionadas para el ensayo.....	145
Anexo 3. Evolución de la tasa relativa de abscisión de estructuras reproductivas, según tipos de brotes.....	145
Anexo 4. Evolución del porcentaje de retención de frutos, según tipos de brotes.....	146
Anexo 5. Interacción de los factores ‘aplicación de ácido giberélico’ y ‘rayado, sobre el cuajado de frutos de los brotes mixtos .....	147
Anexo 6. Efecto de los factores aplicados sobre la evolución del índice SPAD de las hojas maduras y hojas jóvenes del cv. Navelate....	148
Anexo 7. Efecto de los factores aplicados sobre la evolución del contenido de nitrógeno foliar del cv. Navelate.....	150
Anexo 8. Efecto de los factores principales aplicados sobre la evolución de los parámetros del intercambio gaseoso del metabolismo fotosintético de las hojas maduras y hojas jóvenes .....	152
Anexo 9. Efecto de la dosis de nitrógeno de la fertilización inicial sobre la evolución de los parámetros del intercambio gaseoso del metabolismo fotosintético.....	153
Anexo 10. Efecto de la aplicación de giberelina a la caída de pétalos sobre la evolución de los parámetros del intercambio gaseoso del metabolismo fotosintético.....	157
Anexo 11. Efecto del rayado de ramas sobre la evolución de los parámetros del intercambio gaseoso del metabolismo fotosintético.....	159
Anexo 12. Efecto de las interacciones entre los factores aplicados sobre los parámetros del metabolismo fotosintético .....	162
Anexo 13. Efecto de los factores aplicados sobre la evolución de los carbohidratos no estructurales de las hojas jóvenes y frutos en fase I.....	163
Anexo 14. Efecto de los factores aplicados sobre la evolución del contenido de prolina de las hojas maduras, hojas jóvenes y frutos en fase I...	167
Anexo 15. Relación entre el porcentaje de nitrógeno foliar, índice SPAD y la fluorescencia de la clorofila con las variables productivas.....	169
Anexo 16. Coeficientes de correlación de Pearson y valor ‘p’, resultantes de la relación entre los parámetros Índice SPAD, porcentaje de nitrógeno foliar (%MS), y fluorescencia de la clorofila.....	170
Anexo 17. Relación entre los parámetros del intercambio gaseoso del metabolismo fotosintético y las variables productivas.....	171
Anexo 18. Coeficientes de correlación de Pearson entre los parámetros del intercambio gaseoso del metabolismo fotosintético.....	172

Anexo 19. Coeficiente de correlación de Pearson entre los parámetros del intercambio gaseoso del metabolismo fotosintético, SPAD y fluorescencia de la clorofila.....	174
Anexo 20. Relación entre el contenido de carbohidratos no estructurales y las variables productivas.....	176
Anexo 21. Coeficiente de correlación de Pearson (valor ' $p$ '), resultantes de la relación entre los diferentes carbohidratos no estructurales	177
Anexo 22. Relación entre el contenido de carbohidratos no estructurales de los diferentes órganos.....	178
Anexo 23. Coeficiente de correlación de Pearson (valor ' $p$ '), resultantes de la relación entre el contenido de carbohidratos con las variables SPAD, fluorescencia de la clorofila, e indicadores de estrés.....	179
Anexo 24. Relación entre el contenido de carbohidratos no estructurales con parámetros fisiológicos.....	181
Anexo 25. Coeficiente de correlación de Pearson entre el contenido de prolina, malondialdehído, índice SPAD y nitrógeno foliar.....	182
Anexo 26. Modelo de regresión lineal de la relación entre el contenido de prolina y el índice SPAD de las hojas jóvenes.....	183

## RESUMEN

En los sistemas de producción de cítricos con destino a mercado en fresco, la plantación de cultivares de naranjos y mandarinos sin semillas es creciente. Entre los naranjos del grupo 'Navel' se destaca el cv. Navelate, por la excelente calidad de sus frutos, aunque la superficie de su cultivo en varias regiones citrícolas se encuentra en disminución, debido a que presenta problemas en el desarrollo reproductivo. El objetivo de este trabajo fue investigar los cambios en los mecanismos fisiológicos y metabólicos del cv. Navelate, en respuesta a prácticas culturales que favorecen el cuajado de frutos, de modo de comprender mejor este último proceso. La experiencia se realizó en una finca comercial ubicada en la costa del río Uruguay (Salto, Uruguay), sobre una plantación de 5 años, donde se seleccionaron plantas por uniformidad de tamaño e intensidad de floración (~70 flores.100 nudos<sup>-1</sup>). Se utilizó un diseño experimental en bloques completos al azar generalizados con 3 repeticiones. Los tratamientos conformaron un arreglo factorial 2x2x2, siendo los factores aplicados: a) fertilización inicial con urea, dosis: 800g (N1) y 1300g (N2), b) ácido giberélico (AG<sub>3</sub>) a la caída de pétalos: 0 y 50 ppm, c) rayado de ramas a los 15 días posteriores a la aplicación de 'AG<sub>3</sub>': con rayado (+R) y sin rayado (-R). Durante el periodo septiembre-diciembre se evaluaron los efectos de los tratamientos aplicados sobre el metabolismo fotosintético, la dinámica de carbohidratos y del nitrógeno, la expresión de metabolitos relacionados al estrés celular, el cuajado de frutos de los diferentes tipos de brotes florales, y los niveles productivos alcanzados en número de frutos por planta (fr.pl<sup>-1</sup>) y en rendimiento (kg.pl<sup>-1</sup>). El análisis inicial del efecto de los factores sobre las variables se realizó con el procedimiento ANAVA; posteriormente las variables metabólicas y fisiológicas se relacionaron con los parámetros productivos a través de análisis multivariados de componentes principales, regresiones lineales y correlación de Pearson. La mayor dosis de nitrógeno resultó en un cuajado de frutos superior (N2: 1,66% vs. N1: 0,92%) y un rendimiento más elevado (N2: 24,7 kg.pl<sup>-1</sup> vs. N1: 18,8 kg.pl<sup>-1</sup>). La mayor retención de frutos de N2 se expresó tanto en los brotes florales múltiples con hojas (brotes mixtos) como en los brotes multiflorales sin hojas (ramillete floral). El rayado de ramas también incrementó el cuajado de frutos (+R: 1,57% vs -R: 1,02%), y el rendimiento (+R:

24,7 kg.pl<sup>-1</sup> vs. -R: 18,8 kg.pl<sup>-1</sup>). La aplicación de 50 ppm de AG<sub>3</sub> a la caída de pétalos, si bien provocó un retraso en la abscisión de estructuras reproductivas, no logró mejorar los niveles productivos, salvo bajo condiciones de mayor disponibilidad de nitrógeno o bien combinada con rayado. Con dosis de nitrógeno más altas (N2) se observó un incremento del rendimiento cuántico del fotosistema II ( $\Phi$ FSII), como también de la asimilación neta de CO<sub>2</sub> (ACO<sub>2</sub>), la conductancia estomática (Gs) y la eficiencia del uso del agua (EUA) de las hojas maduras, cuando fue combinada con AG<sub>3</sub> o con rayado, con respecto al nivel N1. Además, las hojas maduras tuvieron niveles superiores de sacarosa y almidón en las plantas con N2. El rayado mejoró el  $\Phi$ FSII de las hojas jóvenes cuando fue combinado con N2, pero no incrementó la ACO<sub>2</sub>; Además, aumentó el contenido de sacarosa foliar y no hubo evidencias de daños o estrés celular por fotooxidación. Los parámetros  $\Phi$ FSII, ACO<sub>2</sub>, Gs y EUA medidos en la primera quincena del mes de octubre en ambos tipos de hojas presentaron correlaciones positivas con las variables N° de frutos.pl<sup>-1</sup> y Kg.pl<sup>-1</sup>. Por el contrario, el DPV se relacionó de forma negativa con las variables productivas. Estas relaciones demostraron que la mejora del metabolismo fotosintético y la acumulación de sacarosa en la copa de los árboles, durante la primera quincena de octubre, disminuyeron la abscisión de los frutos en este período; mientras que el estímulo del crecimiento inicial de los frutos a través de la aplicación de AG<sub>3</sub> resultó ser una técnica dependiente de la disponibilidad nutricional (N) para la mejora del cuajado. La fertilización nitrogenada inicial y la aplicación del rayado de ramas posterior a la caída de pétalos, produjeron cambios favorables en los mecanismos metabólicos y fisiológicos en el momento crítico del cultivo, lo cual resultó en una menor abscisión de frutos y un aumento de la producción del cv. Navelate, en las condiciones agroclimáticas de la citricultura del Río Uruguay.

**Palabras clave:** *Citrus*, fotosíntesis, carbohidratos, metabolismo del nitrógeno, rayado de ramas.

## PHYSIOLOGICAL AND METABOLIC CHANGES IN RESPONSE TO AGRONOMIC PRACTICES APPLIED FOR IMPROVEMENT FRUIT SET OF 'NAVELATE' ORANGE

### ABSTRACT

In the Citrus production systems oriented to fresh market, the plantation of seedless orange and mandarin cultivars is increasing. Among the oranges of the 'Navel' group, the 'Navelate' variety stands out, due to the excellent fruit quality, although its cultivation is declining in several *Citrus* production regions, because of problems in the reproductive development. The aim of this work was to investigate physiological and metabolic changes of cv. Navelate, in response to agronomical practices to improve fruit set, and to better understand the fruit set process. The experiment was conducted on a commercial orchard located on the Uruguay River coast (Salto, Uruguay), with 5-year-old *Citrus* trees of 'Navelate'. The trees were selected for its uniform size and its flowering intensity (~70 flowers.100 buds<sup>-1</sup>). A generalized randomized complete block experimental design with 3 replications was used. The treatments formed a 2x2x2 factorial arrangement, the applied factors were: a) initial fertilization with urea: 800g (N1) and 1300g.plant<sup>-1</sup> (N2), b) gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) spray application during petal drop: 0 and 50 ppm, c) branch girdling at 15 days after GA<sub>3</sub> spray application: with girdling (+R) and without girdling (-R). During the September-December period the effect of the applied treatments on the photosynthetic metabolism, carbohydrate and nitrogen levels, on the expression of metabolites of cellular stress, on the fruit set of different types of flowers, and the fruit per plant (fruits.pl<sup>-1</sup>) and yield (kg.pl<sup>-1</sup>) were recorded. The ANOVA was applied to analyze the effect of the tree factors on the variables studied. Afterward, the metabolic and physiological variables were associated to the productive parameters through multivariate principal components analysis (PCA), linear regressions and Pearson's correlation. The highest dose of N resulted in a higher fruit set (N2: 1.66% vs. N1: 0.92%) and higher fruit yield (N2: 24.7 kg.pl<sup>-1</sup> vs. N1: 18.8 kg.pl<sup>-1</sup>). The highest fruit retention for N2 treatments was expressed in multiple flower sprouts with leaves and without leaves. The girdling also increased fruit set (+R: 1.57% vs -R: 1.02%) and fruit yield (+R: 24.7 kg.pl<sup>-1</sup> vs. -R: 18.8 kg.pl<sup>-1</sup>). The spray



application of GA<sub>3</sub> during petal fall, although it caused a delay in the abscission of reproductive structures, it did not improve the number of fruit per plant and fruit yield, except under greater nitrogen or combined with girdling. N<sub>2</sub> improved the quantum yield of photosystem II ( $\Phi$ FSI), as well as the net assimilation of CO<sub>2</sub> (ACO<sub>2</sub>), stomatal conductance (Gs) and the water use efficiency (WUE) from mature leaves when it was combined with GA<sub>3</sub> or girdling with respect to N<sub>1</sub>. Furthermore, N<sub>2</sub> plants reached higher levels of sucrose and starch in the developed leaves. Branch girdling improved the FSII of the young leaves when it was combined with N<sub>2</sub> but without increasing its carbon assimilation rate; furthermore branch girdling increased leaves sucrose content without evidence of fotooxidation damage or cellular stress. The parameters  $\Phi$ FSII, ACO<sub>2</sub>, Gs and WUE in both types of leaves at the first half of October showed positive correlations with fruit yield whereas VPD was negatively related with fruit yield. The initial nitrogen fertilization and branch girdling after petal fall produced favorable changes in the metabolic and physiological mechanisms during the first half of October which resulted in less fruit abscission and higher fruit production of the cv. 'Navelate' under the agro-ecological conditions of the Uruguay River region.

**Key words:** *Citrus*, photosynthesis, carbohydrates, nitrogen metabolism, girdling.

## 1. INTRODUCCIÓN

### *1.1. Planteamiento del Problema*

La superficie implantada con cultivares de naranjas y mandarinas sin semillas es creciente en sistemas de producción de cítricos con destino al mercado en fresco, ya que éstas son de preferencia del consumidor (FUNDANEA, 2016). Las naranjas del grupo ‘Navel’, llamadas comúnmente ‘de ombligo’, entre las cuales se encuentra el cultivar Navelate, tienen un lugar de relevancia por la calidad de sus frutos (Agustí *et al.*, 2003a).

Los cultivares de naranjos del grupo ‘Navel’ presentan un nivel productivo relativamente bajo en comparación con los cultivares de naranjas del grupo ‘Blancas’, lo cual fue documentado en diferentes regiones de importancia citrícola para el consumo en fresco, como España (Agustí *et al.*, 2003b; Iglesias *et al.*, 2007), la costa del Río Uruguay (Gravina *et al.*, 2004; Otero *et al.*, 2015), o en zonas de producción incipientes como en la región central de Santa Fe (Pilatti *et al.*, 2009; Micheloud *et al.*, 2018). Una de las principales causas a la que se atribuye tal comportamiento es el desarrollo de una floración primaveral abundante seguida de una abscisión masiva de las estructuras reproductivas, lo cual hace que el cuajado de frutos llegue a valores muy bajos e incluso nulos (Guardiola *et al.*, 1984; Agustí *et al.*, 2003a).

Existen investigaciones que confirman que es posible lograr producciones rentables mediante la aplicación de técnicas específicas basadas en el conocimiento de este cultivar y de su comportamiento agronómico. Los principales estudios sobre el manejo del cultivo abordaron aspectos fisiológicos, nutricionales (Tadeo *et al.*, 2003), hormonales, y la aplicación de técnicas culturales para la mejora del cuajado de sus frutos (Agustí *et al.*, 2003a). La aplicación de giberelinas (AG<sub>3</sub>) a la caída de pétalos (Agustí *et al.*, 1982a; Mesejo *et al.*, 2013, 2016), el rayado de ramas (Rivas *et al.*, 2007, 2010), y la combinación de ambas técnicas (Koller *et al.*, 2006) son actualmente las prácticas culturales más eficientes para mejorar el cuajado de los frutos de diferentes cultivares cítricos con bajo índice de partenocarpia natural (El-Otmani *et al.*, 2000).

A través de este proyecto doctoral se busca comprender, con un mayor nivel de aproximación, los mecanismos fisiológicos y metabólicos involucrados durante el proceso

de establecimiento y crecimiento inicial de los frutos, y los cambios en los mismos como consecuencia de la aplicación de técnicas agronómicas para la mejora del comportamiento reproductivo, especialmente en el cultivar Navelate. En la región citrícola de la costa del río Uruguay, se abordaron experimentos en los que se estudió el proceso de cuajado y crecimiento inicial de frutos del cultivar Navelate, a través de tratamientos de aplicación de AG<sub>3</sub> a la caída de pétalos, rayado de ramas a los 15 días posteriores, y la combinación de ambas técnicas. A su vez, cada uno de los tratamientos estuvo sometido a dos niveles de fertilización nitrogenada. Las respuestas de las plantas fueron evaluadas en el metabolismo fotosintético, la dinámica de carbohidratos y del nitrógeno, la expresión de metabolitos relacionados al estrés celular, el cuajado de frutos, y los niveles productivos.

En Uruguay, el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) desarrolla el programa nacional de investigación en producción citrícola, con sede en la Estación experimental Salto Grande, desde un perfil proactivo de producción integrada de cítricos orientado a la exportación. El INIA Salto Grande presenta una amplia trayectoria en investigaciones relacionadas a lograr la máxima eficiencia de los sistemas productivos, a través de un sólido conocimiento de base en la ecofisiología del cultivo (Syvertsen *et al.*, 2003; Otero *et al.*, 2015). El vínculo entre la UNL y el INIA, propiciado por este proyecto de tesis doctoral, se consideró de importancia para el avance científico en la problemática abordada.

## ***1.2. Antecedentes***

### ***1.2.1. Importancia mundial del cultivo de los cítricos***

A nivel mundial, los cítricos son los frutales de mayor producción y comercialización, con cerca de 124 millones de toneladas de fruta anuales. Las naranjas representan el 54% de la producción, luego las mandarinas con el 27%, en tercer y cuarto lugar limones (13%) y pomelos (6%), respectivamente (FAO, 2016). La producción de frutos cítricos es liderada por China y le siguen en orden de importancia Brasil, Estados Unidos, España, Méjico, Italia, Egipto, Turquía, Sudáfrica y Argentina (FEDERCITRUS, 2016).

Con respecto al mercado de exportación de frutos frescos, Argentina y Uruguay presentan la ventaja de producir en contra-estación del hemisferio norte, donde se encuentran los países de mayor demanda, pero a su vez de mayor exigencia en calidad e inocuidad alimentaria. Otros países productores y exportadores del hemisferio sur son Sudáfrica, Australia, Chile y Perú (FEDERCITRUS, 2016).

La principal zona productiva de naranjas y mandarinas para consumo en fresco de Argentina y Uruguay comprende la región litoral del río Uruguay (INTA, 2012), abarcando las localidades de Concordia, Federación y Monte Caseros, en Argentina; y Salto y Paysandú en Uruguay (FUNDANEA, 2016). La producción citrícola uruguaya alcanza anualmente 300 mil t y se distribuye entre naranjas (51%), mandarinas (35%), limón (13%) y pomelos (1%). El 84% de esta producción se obtiene en la ‘zona litoral norte’, donde se realizó la experiencia de este trabajo, y comprende los departamentos Salto, Paysandú y Artigas. En la ‘zona sur’, que abarca San José, Canelones, Montevideo, Colonia, y Maldonado, se cultiva especialmente el limón (MGAP-DIEA, 2014). El 40% de la producción uruguaya de cítricos se exporta hacia los Países Bajos, Reino Unido, Rusia, Brasil, España y Estados Unidos, el resto se destina al mercado interno y a la industria, empleando 10.000 personas en todo el proceso productivo (FUNDANEA, 2016).

### *1.2.2. El cultivo de los cítricos en Argentina*

La producción de cítricos en el país es de 2,8 millones de tn (FAO, 2016) y representan el 56% de la fruta fresca producida en el país y su cultivo ocupa una superficie aproximada de 130.000 ha, cuya localización está distribuida en un 60% en la región Noroeste y un 38% en la Noreste (INTA, 2012). La especie de mayor producción es el limón (1.500.000 t) localizado en su mayoría en la provincia de Tucumán. El segundo cultivo en el país es el de naranjas (934.000 t) y el tercero el de mandarinas (374.000 t); ambas especies son de importancia en Entre Ríos, ocupando cada uno de ellos una superficie cercana a las 20.000 ha. Por último, el pomelo (132.000 t) es significativo en Salta y Formosa. Otras provincias en que se encuentra representado el cultivo son Jujuy, Misiones, Corrientes, Buenos Aires, Formosa, Chaco y Catamarca (FEDERCITRUS, 2016).

El sector citrícola nacional genera un valor económico de aproximadamente 1400 millones de dólares anuales, de los cuales el 50% corresponden a las exportaciones de frutas

frescas, derivados y jugos concentrados. La estructura básica de la actividad cítrica está conformada por 5.300 productores primarios, 20 plantas industriales para jugos concentrados y 440 plantas de selección y empaque. Esta estructura genera, una ocupación de mano de obra directa de aproximadamente 100.000 puestos de empleo (MECON, 2011).

Los destinos de la producción cítrica nacional son la industria (47%), el mercado interno (32%) y la exportación en fresco (21%). Luego de las peras, el limón es la principal fruta de exportación; por otro lado, luego de las manzanas se encuentran las mandarinas y las naranjas. Los cítricos producidos en Argentina se comercializan en más de 80 mercados, siendo la Unión Europea el más importante, seguido por Rusia (SENASA, 2012; FEDERCITRUS, 2016).

En cuanto a la región central del país, la producción se localiza en el sector limítrofe entre las provincias de Buenos Aires y Santa Fe (San Pedro, San Nicolás, Ramallo y Baradero). Si bien su importancia nacional es poco significativa, presenta ventajas comparativas como la cercanía a los grandes mercados consumidores (Buenos Aires, Rosario, Santa Fe y Córdoba) y posee muy buena infraestructura comercial (rutas, autopistas, galpones de empaque). Como desventaja, constituye un área de riesgo por heladas que pueden comprometer la calidad de la fruta y la vida de la planta. En esta zona, los naranjos ‘navel’ son los cítricos predominantes (Palacios, 2005) donde la enfermedad conocida como ‘cancrosis de los cítricos’ está presente de manera endémica y es un impedimento para la producción de algunos cultivares (Favaro *et al.*, 2014).

### *1.2.3. El cultivo de los cítricos en la provincia de Santa Fe*

La superficie de cítricos en la provincia de Santa Fe es menor al 1% del área cultivada a nivel nacional, con 504 ha correspondientes a naranjos (78%) y mandarinos (19%). Se distribuyen en los departamentos de Rosario (121 ha), San Jerónimo (69 ha) y General Obligado (252 ha), con epicentro en el distrito Malabrigo (INDEC, 2008).

Entre los naranjos ‘Navel’ los cultivares de mayor difusión son ‘Newhall’ y ‘Lanelate’, aunque el 60% de las plantas son materiales genéticos no identificados. El 70% de las naranjas ‘Blancas’ son del cultivar ‘Valencia’, también se registraron ‘Criollas’. Entre las mandarinas predominan ‘Criolla’, ‘Ellendale’, ‘Nova’, ‘Murcott’ y ‘Satsuma-Okitsu’ (INDEC, 2008).

Entre los años 2001 y 2007 hubo una reducción de la cantidad de plantas frutales en la provincia. En el caso de los cítricos, pasaron de 89.000 plantas de naranjos y mandarinos, a 15.000 plantas (IPEC, 2007). Esto se pudo deber, a la baja rentabilidad que caracterizó a la producción durante los últimos años (Bouzo *et al.*, 2005; Gobierno de Santa Fe, 2008), agravado por los bajos rendimientos consecuencia de la falta de información local sobre el comportamiento fenológico y reproductivo de los cultivares introducidos, sobre las prácticas de manejo más adecuadas y su momento óptimo de aplicación.

Para poder difundir el cultivo de los cítricos en Santa Fe se debe tener en cuenta que el cultivo de frutales posee un período improductivo inicial prolongado (Agustí, 2004), por lo que resulta de importancia la selección del cultivar a implantar (Gariglio *et al.*, 2012; 2014). La expresión de cada proceso fisiológico depende de la constitución genética de la planta en integración con el ambiente (Agustí, 2004; Syvertsen & Lloyd, 1994; Goldschmidt & Koch, 1996). Lo mismo sucede con la respuesta a las prácticas culturales que se realizan con la finalidad de mejorar el comportamiento reproductivo (Gravina, 1999; Agustí *et al.*, 2003b). De esta manera, sólo con sólidos fundamentos fisiológicos se podrán interpretar situaciones de baja eficiencia productiva y/o alternancia de cosechas, para poder recomendar un correcto manejo agrícola a fin de lograr un adecuado nivel productivo con estabilidad en el tiempo (Ribeiro & Machado, 2007; Martínez-Fuentes *et al.*, 2013; Travadelo *et al.*, 2017).

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Origen, taxonomía y principales características botánicas de los *Citrus*

Las especies del género *Citrus* son originarias de las regiones tropicales y subtropicales del sudeste de Asia y del archipiélago Malayo, extendiéndose desde la India, norte de China y Nueva Guinea hasta Australia (Goldschmidt & Koch, 1996). Su cultivo comercial se ubica en las áreas tropicales y subtropicales del mundo, dentro de la banda delimitada por la línea de 40° de latitud norte y sur. Las mayores limitaciones para su distribución geográfica incluyen las heladas invernales, el agua salina para el uso de riego y los suelos con pobre drenaje (Syvertsen & Lloyd, 1994).

Las especies de cítricos de mayor interés comercial pertenecen al Orden Rutales, familia Rutaceae, subfamilia Aurantioideas. Dentro de esta subfamilia los géneros de interés agronómico son *Fortunella*, *Poncirus* y *Citrus*. Este último es el más importante, y posee 16 especies, de las cuales las de mayor difusión son: lima mejicana [*C. aurantifolia* (Christm) Swingle], lima tahití (*C. latifolia* Tanaka), naranjo amargo (*C. aurantium* L.), pummelo [*C. grandis* (L.) Osbeck], limón [*C. limon* (L.) Burm. F.], pomelo (*C. paradisi* Macf.), mandarino común (*C. reticulata* Blanco), mandarino ‘Satsuma’ (*Citrus unshiu* M.) y naranjo dulce [*C. sinensis* (L.) Osbeck] (Agustí, 2003).

Todas las especies de la subfamilia Aurantioideas son árboles o arbustos latifoliados de hojas simples y perennes, excepto el género *Poncirus*, comúnmente usado como portainjerto, que presenta hojas trifoliadas y caducas. El limón y la lima ácida retienen la naturaleza tropical y son más sensibles al frío que los naranjos y mandarinos (Goldschmidt & Koch, 1996).

Los *Citrus* son plantas longevas adaptadas a ambientes mesófitos, compatible con su abundante follaje y su sistema radicular relativamente superficial. Las hojas maduras son gruesas, de textura firme, coriáceas, de color verde oscuro, con cera epicuticular, lo cual indica una adaptación xeromórfica (Syvertsen & Lloyd, 1994).

El fruto es de forma esférica a oval, rodeado por una corteza de color amarillo-verdoso (limones, pomelos y limas) o naranja (naranjas y mandarinas) (Agustí, 2003). Se clasifican como hesperidios, caracterizados por poseer dos regiones: el pericarpio que a su

vez está dividido en exocarpo (flavedo), es la parte externa con coloración, y en mesocarpo (albedo) que es la capa intermedia de color blanco y esponjoso; y el endocarpio que contiene vesículas de jugo dentro de segmentos (lóculos de los ovarios) (Iglesias *et al.*, 2007).

## **2.2. Aspectos fisiológicos**

### *2.2.1. Requerimientos del cultivo*

El rango de temperaturas óptimas para el desarrollo del cultivo de los cítricos está entre 23 y 34°C, el máximo valor es 39°C y el mínimo de 13°C (Goldschmidt & Koch, 1996; Pimentel *et al.*, 2007). Los requerimientos hídricos de estos frutales, estimados según sus pérdidas por evapotranspiración, rondan entre 750 y 1200 mm anuales (Agustí, 2003).

### *2.2.2. Brotación y floración*

#### *2.2.2.1. Brotación*

En regiones tropicales y subtropicales, los *Citrus* presentan varios ciclos de brotación y floración durante el año (Ribeiro & Machado, 2007). En climas templados, el descenso térmico invernal induce a las plantas a un período de reposo vegetativo (Goldschmidt & Koch, 1996). En estas condiciones, aunque normalmente presentan tres brotaciones al año, sólo la primaveral es la que desarrolla la floración (a excepción del limón), y determina la producción anual (Agustí, 2003).

Las yemas de los *Citrus* no requieren acumulación de frío invernal para salir del estado de dormición, sino que brotan cuando la temperatura del suelo supera los 12°C (Davenport, 1990). Las condiciones de día largo acortan el período entre brotaciones (Scholberg *et al.*, 2002). La brotación se origina principalmente sobre ramas desarrolladas el año anterior. La madera de otoño brota de manera precoz, en mayor intensidad y longitud, le sigue la madera de verano y por último la de primavera, además cada yema es múltiple, por lo que tiene la capacidad para producir más de un brote (Agustí, 1980). Las yemas son mixtas, pudiendo desarrollar brotes vegetativos, flores solitarias, brotes campaneros (vegetativos con una flor terminal), ramillete floral (inflorescencias sin hojas), y brotes mixtos, donde las flores se encuentran en las axilas de las nuevas hojas (Agustí *et al.*, 2003b).



La proporción de los tipos de brotes determina la intensidad de floración y las posibilidades de cuajado (Lovatt & Krueger, 2015), y es afectada por la genética, el ambiente y las prácticas de manejo (Gravina *et al.*, 2004; Martínez-Fuentes *et al.*, 2013). Este aspecto, está siendo estudiado a través su expresión génica (Muñoz-Fambuena *et al.*, 2011; 2012).

#### 2.2.2.2. *Inducción floral*

Los factores exógenos que afectan la inducción a floración corresponden a las bajas temperaturas y el estrés hídrico (Nishikawa *et al.*, 2007; Chica & Albrigo, 2013), mientras que el factor endógeno más significativo que influye en el proceso es el nivel de giberelinas (Muñoz-Fambuena *et al.*, 2011; 2012).

Las giberelinas presentes en la copa del árbol son inhibidores de la inducción floral (Davenport, 1990; De Souza Prado *et al.*, 2007). Esta hipótesis fue corroborada a través del efecto de la carga de frutos sobre este proceso, debido al elevado contenido de giberelinas de los frutos, principalmente en aquellos con semillas (García-Luís *et al.*, 1986; Gravina *et al.*, 2004; Martínez-Fuentes *et al.*, 2013). Además, las aplicaciones exógenas de ácido giberélico (AG<sub>3</sub>) provocan un efecto inhibitorio sobre la floración (Muñoz-Fambuena *et al.*, 2012).

En climas subtropicales y templados, la actividad radicular de los árboles cítricos disminuye durante el reposo invernal, y consecuentemente se reduce la síntesis y el transporte hacia la copa de sustancias absorbidas o producidas por las raíces (Davenport, 1990; Agustí, 2004), como las hormonas y los componentes nitrogenados, explicando el efecto de las bajas temperaturas como factor primario de la inducción a la floración (Southwick & Davenport, 1986; Nishikawa *et al.*, 2007). Un proceso similar sucede en un período de estrés hídrico (Vasconcelos-Ribeiro *et al.*, 2006; Chica & Albrigo, 2013). La respuesta en la intensidad de floración es proporcional a la severidad del déficit hídrico (Ribeiro & Machado, 2007; Orduz-Rodriguez *et al.*, 2010). Además, la concentración del contenido foliar de amonio aumenta durante condiciones de estrés (Lovatt *et al.*, 1988) y tendría una intervención en la síntesis de poliaminas involucradas en la diferenciación de la yema floral (Arias *et al.*, 2005).

El rol de los carbohidratos en el proceso de inducción floral aparentemente es sólo cuantitativo, debido a la energía aportada para la diferenciación de yemas florales

(Goldschmidt & Golomb, 1982). Esto se ha demostrado con pruebas de anillado del tronco en la época inductiva (Yamanishi *et al.*, 1993).

### 2.2.2.3. Floración

Desde el punto de vista histológico las flores de los cítricos están diseñadas para facilitar la reproducción sexual ya que son hermafroditas, por tanto poseen gineceo, compuesto por estigma, estilo y ovario, y androceo, compuesto por 20-40 estambres unidos (Agustí *et al.*, 2003b; Tadeo *et al.*, 2003). El ovario es súpero (hipógino) formado por 3 a 6 carpelos soldados en el género *Fortunella* y de 8 a 10 carpelos si se trata del género *Citrus* (Davenport, 1990). Poseen 5 sépalos verdes, 5 pétalos blancos que protegen el aparato sexual hasta el momento en que debe producirse la fecundación (Tadeo *et al.*, 2003).

Luego del período inductivo, al elevarse la temperatura en primavera y/o reiniciarse las lluvias tras un período de sequía, tiene lugar la floración (Agustí, 2003; Orduz-Rodriguez *et al.*, 2010). La duración del período de floración es dependiente del cultivar (Talón *et al.*, 1990; Gravina, 1999) y de la temperatura. Las altas temperaturas aceleran la antesis y acortan el período de floración, pudiendo afectar indirectamente las posibilidades de polinización y cuajado. Por otro lado, el desarrollo del tubo polínico tiene un umbral térmico de 13°C. También este factor influye en la actividad de las abejas y otros insectos polinizadores de los cítricos (Davenport, 1990).

### 2.2.3. Cuajado y crecimiento inicial de frutos

#### 2.2.3.1. Fecundación y partenocarpia

El proceso de fecundación del ovario de las flores implica el transporte del grano de polen, su recepción y germinación en el estigma, el desarrollo y conducción del tubo polínico a través del estilo, hasta el ovario. Estos aspectos, como así también el control que ejerce el ovario y el óvulo sobre el desarrollo del tubo polínico han sido recientemente estudiados (Distéfano *et al.*, 2011; Mesejo *et al.*, 2013; 2016), e indican la importancia del estado nutricional, hídrico y hormonal de la flor para su éxito (Tadeo *et al.*, 2003; Otero *et al.*, 2015).

Una vez producida la fecundación, el ovario se convierte en fruto. El cuajado o establecimiento de frutos implica un crecimiento rápido de los tejidos del ovario debido a la

multiplicación celular (Agustí *et al.*, 2003b; Talón *et al.*, 1999). Mediante la síntesis hormonal, el fruto en crecimiento puede demandar energía en forma de carbohidratos. Si el crecimiento no se inicia, o es interrumpido, se produce la abscisión (Iglesias *et al.*, 2007).

En cítricos es frecuente el desarrollo de los ovarios sin previa fecundación (partenocarpia) (Distéfano *et al.*, 2011). La partenocarpia se puede desencadenar por factores ambientales o por la esterilidad de origen genético, gamético, homogenético o citológico (Kimball, 1999). La esterilidad gamética es la incapacidad de producir óvulos o polen fértil, como muchos cultivares de naranjos ‘Navel’, que presentan esterilidad gamética, por ejemplo el cv. Navelate que es androestéril (Talón, 1997; Kimball, 1999).

El desarrollo de los frutos sin semillas es regulado hormonalmente, y la polinización, la germinación del grano de polen, y la elongación inicial del tubo polínico son fuentes de hormonas que actúan como estímulos para que se inicie el desarrollo del ovario. Este proceso ha sido sugerido para genotipos autoincompatibles de varias especies, como el manzano (*Malus pumila* Mill.) (Saito *et al.*, 2007), vid (*Vitis vinifera* L.) (Bonanda, 2011), y para líneas transgénicas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (Schijlen *et al.*, 2007). Si no hay polinización cruzada, es la síntesis hormonal autónoma del ovario la que produce la partenocarpia, como en muchos cultivares de naranjos ‘Navel’ y mandarinos Clementinos (*Citrus clementina* Hort. ex Tan.) (Mesejo *et al.*, 2013; 2016).

El aumento en la concentración de ácido giberélico (AG) como AG<sub>1</sub> en el ovario durante la antesis es el estímulo responsable de la partenocarpia en *Citrus*, independientemente de la especie. Ello se debe a que el AG desencadena y mantiene la división celular en las paredes del ovario, por lo tanto, la tasa de crecimiento del ovario necesaria para el establecimiento de los frutos. Además, se ha observado una relación entre la acumulación de AG<sub>1</sub> y la mejora actividad mitótica, debido a que el gen CYCA1 que controla la fase G2/M del ciclo celular, está bajo la regulación de AG. Por otro lado, el crecimiento partenocárpico en el ovario se incrementa por la inactivación de las enzimas AG<sub>2ox</sub>, que catabolizan AG<sub>1</sub> y AG<sub>4</sub> (Mesejo *et al.*, 2016).

Los cultivares partenocárpico presentan respuesta en el aumento del cuajado de frutos con aplicaciones exógenas de giberelinas, que es la hormona de mayor influencia sobre el cuajado y crecimiento inicial de los frutos cítricos (Talón *et al.*, 1999; El-Otmani *et al.*, 2000). Así, el desarrollo del ovario puede manipularse mediante la aplicación exógena

de AG<sub>3</sub>. El tratamiento con AG<sub>3</sub> (una práctica hortícola mundialmente utilizada) aumenta el cuajado de frutos en especies partenocárpicas y aumenta la expresión del gen CYCA1, junto con el contenido de AG<sub>1</sub>. En particular, las aplicaciones de AG<sub>3</sub> modifican la vía de 13-hidroxilación, aumentando AG<sub>20</sub> y la concentración de AG<sub>1</sub>, la principal giberelina activa en cítricos, y disminuyendo los precursores AG<sub>53</sub> y AG<sub>19</sub>, mientras que no se encontraron cambios significativos en la vía de no hidroxilación (Mesejo *et al.*, 2016).

#### 2.2.3.2. Factores endógenos

En los cítricos, el número de flores formadas excede ampliamente al de frutos que alcanzan la madurez, a excepción de los años ‘off’ de los cultivares que presentan alternancia de producción. Esta proporción puede alcanzar valores de 0,1% del total de flores formadas (García-Luís *et al.*, 1986). Se considera que intensidades de floración de 700 a 3000 flores por árbol no comprometen el cuajado de frutos (Davenport, 1990). Asimismo, bajas intensidades de floración permiten un porcentaje de cuajado elevado, pero cosechas bajas por el déficit de flores (Agustí *et al.*, 2003b). La caída de frutos comienza en la primera etapa de su desarrollo y el final coincide con la transición de la fase de división celular a elongación celular, que ocurre en diciembre en nuestro hemisferio y en junio en el hemisferio norte (de allí la denominación de ‘june drop’).

La abscisión de frutos es un fenómeno complejo que depende de factores genéticos, metabólicos, ambientales y de manejo (El-Otmani *et al.*, 2000; Iglesias *et al.*, 2007; Rivas *et al.*, 2010). En condiciones de elevadas intensidades de floración, se establece una competencia por recursos entre los diferentes órganos en desarrollo (Goldschmidt & Golomb, 1982; Guardiola *et al.*, 1984; Guardiola & García-Luís, 2000). Además, el tamaño de las flores en el momento de la antesis es menor y la abscisión de estructuras reproductivas comienza en estados más tempranos (de botones florales, flores y frutos pequeños) (Guardiola *et al.*, 1993; Gravina, 1999; De Souza Prado *et al.*, 2007).

Los brotes mixtos y campaneros están relacionados con un alto cuajado de frutos, y por el contrario, los brotes sin hojas, como los de flor solitaria y de ramillete floral, poseen muy baja probabilidad de establecimiento de los frutos (Muñoz-Fambuena *et al.*, 2012; Lovatt & Krueger, 2015). Durante un mes aproximadamente después de la antesis, las hojas se comportan como órganos competidores de los frutos, ya que mientras crecen actúan como

demandantes de fotoasimilados, y solo en su transición a hojas maduras alcanzan paralelamente su rol de fuente de carbohidratos (Mehouachi *et al.*, 1995). La influencia de las hojas sobre el cuajado está asociada con un incremento de la tasa de asimilación neta de CO<sub>2</sub>, y por lo tanto un mayor suministro de fotoasimilados a los frutos en crecimiento (Syvertsen & Lloyd, 1994). Además, se ha comprobado que los brotes con hojas tienen mayor nivel hormonal (Iglesias *et al.*, 2007).

#### 2.2.3.3. Factores ambientales y de manejo

La distribución e intensidad de la abscisión de estructuras reproductivas también está relacionada con factores externos, principalmente la temperatura (Champlin & Westwood, 1980), la disponibilidad de agua y nutrientes (Calabretta *et al.*, 2004; Otero *et al.*, 2015), además del manejo (Talón *et al.*, 1999; Agustí *et al.*, 2003b). Descensos bruscos de la humedad relativa ambiente, el bajo contenido hídrico del suelo y las heladas tardías durante la primera fase del desarrollo del fruto, promueven su abscisión (Gariglio *et al.*, 2007; Iglesias *et al.*, 2007). Se ha reportado que los cultivares ‘Navel’ son menos eficientes en la conductividad hidráulica, y por lo tanto en la eficiencia de la utilización del agua (Romero *et al.*, 2012). Además, las temperaturas superiores a 35°C provocan un aumento de la fotorrespiración y en la respiración celular, que disminuyen las ganancias fotosintéticas y el cuajado de los frutos (Pimentel *et al.*, 2007). En experiencias en la región Litoral del Río Uruguay con naranjas ‘Navel’ se encontró que la disponibilidad de nitrógeno fue más importante que el suministro de agua, mediante el riego, para el cuajado de los frutos (Otero *et al.*, 2015).

#### 2.2.4. Relaciones fuente-destino

La brotación primaveral de los frutales caducifolios se realiza a expensas de las reservas presentes en las partes leñosas del árbol, mientras que en los frutales de hojas perennes la presencia de follaje fotosintéticamente activo, y las propias reservas de energía en el tejido foliar, podrían aliviar la dependencia de los carbohidratos de reserva (Goldschmidt & Koch, 1996). Por otro lado, el desarrollo del fruto, que en frutales caducos es completado en pocos meses, en ciertos cultivares de cítricos es considerablemente largo,

como en el naranjo ‘Valencia late’, que necesita más de un año para completar la maduración de sus frutos bajo condiciones subtropicales (De Souza Prado *et al.*, 2007).

#### 2.2.4.1. Actividad fotosintética

El metabolismo fotosintético de los *Citrus* es del tipo C<sub>3</sub>, y presentan una baja tasa fotosintética (4-8  $\mu\text{mol CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) y un bajo punto de saturación de luz, incluso en las mejores condiciones de cultivo. Entre las características de las hojas que limitan la actividad fotosintética se encuentran su espesor, la escasa proporción de espacios intercelulares en el mesófilo y la presencia de estomas en una sola de las caras, con ubicación abaxial. Estas características hacen que la resistencia al ingreso y traslado del dióxido de carbono sea muy elevada (Syvertsen & Lloyd, 1994). La alta resistencia estomática y del mesófilo hace que la tasa de transpiración también sea notablemente baja, razón por la cual los árboles pueden sobrevivir ante condiciones hídricas desfavorables (Oliveira *et al.*, 2017). Además, como consecuencia de su baja tasa transpiratoria, la temperatura de la hoja normalmente está entre 8 a 10°C superior a la temperatura del aire. Por otro lado, los cítricos presentan un cierre rítmico de los estomas en condiciones de baja humedad relativa ambiente, que hace que la tasa fotosintética sea una de las más bajas entre los frutales en estas condiciones, incluso cuando se le suministra suficiente agua por riego (Agustí, 2004).

Las hojas de los *Citrus* son adaptadas a ambientes de sombra, por su alto contenido de clorofila y condiciones anatómicas adicionales, lo que posiblemente se deba al elevado índice de área foliar (IAF) de la mayoría de los cultivares (Goldschmidt & Koch, 1996). Así, en ‘Valencia’ se cuantificaron valores de IAF entre 8 y 15, mientras que para otros cultivares, este valor fluctúa entre 4,5 y 11,8; que representan valores muy superiores en comparación con los árboles frutales deciduos y/o los cultivos herbáceos más tradicionales (Agustí, 2004; Ribeiro *et al.*, 2009).

La fotosíntesis es un proceso fisiológico clave relacionado con el crecimiento y el desarrollo de la planta (Bondada & Syvertsen, 2005). Por ello, su comprensión en condiciones de campo es esencial para la mejora de las prácticas de manejo del cultivo de los cítricos. Para estudiar los procesos básicos de la fotosíntesis, como el rendimiento fotosintético, o describir los cambios en la fotosíntesis, son muy utilizadas las mediciones de

la fluorescencia de la clorofila, la asimilación de CO<sub>2</sub> (ACO<sub>2</sub>), la tasa de transpiración y la conductancia estomática (Maxwell & Johnson, 2000).

La capacidad fotosintética durante el desarrollo inicial de los frutos ha sido previamente evaluada a través del análisis de la fluorescencia de la clorofila a (Syvertsen *et al.*, 2003). La fluorescencia de la clorofila puede ser fácilmente estudiada en condiciones de cultivo a campo, utilizando dispositivos llamados fluorómetros. Electrónicamente, el equipo puede discriminar la señal de fluorescencia modulada, distinguiéndola por su frecuencia de la luz incidente a la cual está sometida la hoja. Por otra parte, la disipación fotoquímica y no-fotoquímica puede ser discriminada mediante la técnica del pulso de luz saturante (Fernandez & Gyenge, 2010). Esta técnica permite una estimación rápida de la eficiencia cuántica del transporte de electrones a través del fotosistema II (PSII) en hojas, que luego pueden estar relacionadas con la ACO<sub>2</sub>. En condiciones de campo, las plantas pueden recibir mayor cantidad de luz solar de lo que realmente logran utilizar para la fotosíntesis. En consecuencia, la fotosíntesis produce más NADPH y ATP de lo necesario. Esta acumulación de energía conduce a la inactivación del PSII, llamada foto-inhibición (Jifon & Syvertsen, 2003). La severidad de la fotoinhibición no solo está determinada por la intensidad de la luz sino también por otro tipo de estrés ambiental, como altas temperaturas, disponibilidad de agua (Oliveira *et al.*, 2017). La fluorescencia de la clorofila se puede utilizar como una herramienta de diagnóstico del PSII, por tanto, como un indicador de estrés que puede influir sobre el rendimiento de la planta. Entre los indicadores más utilizados para evaluar el daño del PSII se encuentran el rendimiento cuántico (test Yield) y la eficiencia cuántica máxima (relación Fv/Fm) (Maxwell & Johnson, 2000).

La técnica de medición más generalizada de intercambio de gases en plantas es a través de los sistemas IRGA (Infra Red Gas Analyzer). Estos analizadores permiten medir simultáneamente con alta precisión los flujos de CO<sub>2</sub> y de vapor de H<sub>2</sub>O; por lo tanto, en hojas permiten cuantificar la asimilación neta de CO<sub>2</sub>, esto es, el balance entre el CO<sub>2</sub> fijado y el emitido. Si una hoja fotosintéticamente activa y sin limitaciones hídricas se dispone en una cámara cerrada bajo condiciones de irradiancia, la concentración de CO<sub>2</sub> en la cámara se reducirá, mientras que el contenido de vapor de H<sub>2</sub>O en el aire se incrementará. La tasa de agotamiento del CO<sub>2</sub> se corresponde a la actividad fotosintética, mientras que la adición de vapor de H<sub>2</sub>O en la cámara, a la tasa de transpiración. Los analizadores de gases portátiles

permiten así realizar mediciones de intercambio gaseoso en hojas de plantas en su ambiente natural o en laboratorio. De esta forma se puede estudiar el comportamiento fotosintético en estudios agronómicos, y los parámetros obtenidos pueden ser utilizados para relacionarlos con la productividad (Fernandez & Gyenge, 2010).

#### 2.2.4.1.1. Factores que afectan la actividad fotosintética

La actividad fotosintética de *Citrus* es óptima a temperaturas entre 25 y 30°C, mientras que las superiores a 35°C la reducen (Pimentel *et al.*, 2007; Ribeiro & Machado, 2007). En condiciones de clima tropical la actividad fotosintética es ininterrumpida durante el año, pero en climas subtropicales y templados las ganancias fotosintéticas durante el invierno pueden ser insignificantes (Goldschmidt & Koch, 1996; Santos *et al.*, 2011).

La actividad fotosintética se satura a bajas intensidades de luz ( $400 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) alrededor del 30% de la luz solar máxima (Syvertsen & Lloyd, 1994). En condiciones de cultivo, esta situación sólo ocurre durante pocas horas y en la parte externa de la canopia. En cambio, en el interior de la misma, es común que la intensidad de luz sea menor al 1% en relación a la luz solar incidente, debido al elevado IAF. Estas características hacen que, a pesar de que las hojas sean tolerantes al sombreado, las cosechas más elevadas se producen en condiciones de alta intensidad lumínica. A medida que aumenta el sombreado de las hojas, éstas presentan mayor contenido de clorofilas y de superficie foliar, con lo que compensan en parte el déficit lumínico (Calabretta *et al.*, 2004).

La disponibilidad hídrica, junto con la humedad relativa (déficit de presión de vapor, DPV), determinan la apertura estomática que influye en el intercambio de CO<sub>2</sub> (Syvertsen & Lloyd, 1994; Syvertsen *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2017). Una importante depresión de la transpiración y de la fotosíntesis ocurre al mediodía durante los días cálidos de verano, aunque la disponibilidad de agua en el suelo sea adecuada. Esto podría estar asociado con un aumento en el DPV (Pimentel *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2009). Bajo condiciones de prolongado estrés hídrico los estomas se abren en la mañana por un corto tiempo y después se cierran por el resto del día (Agustí, 2004; Ribeiro & Machado, 2007).



La fotosíntesis se incrementa como resultado de la demanda del desarrollo temprano del fruto (Mehouachi *et al.*, 1995), por el contrario, se reduce considerablemente después de la remoción de los frutos (Syvertsen *et al.*, 2003) o del rayado de ramas (Rivas *et al.*, 2008).

#### 2.2.4.2. El rol de los carbohidratos en las plantas de *Citrus*

A diferencia de los cultivos herbáceos, que acumulan fotosintatos en las hojas durante el período diurno y transportan el remanente durante la noche, en los cítricos el almidón y los azúcares solubles muestran alguna variación diaria, quedando un resto de carbohidratos en la hoja (Ribeiro *et al.*, 2009). De este modo, las hojas de los cítricos actúan como órgano de almacenamiento (Ribeiro & Machado, 2007), lo cual puede interferir con la capacidad fotosintética como ‘producto inhibición’, o efecto *feed-back* (Agustí, 2004).

El almidón es el mayor carbohidrato de reserva en todos los órganos de los cítricos. Los gránulos de almidón se observaron en los pedicelos de los frutos, en la médula y la corteza de las ramas, aunque la más alta concentración se encontró en las raíces (Syvertsen & Lloyd, 1994). Las cantidades totales de reservas fueron evaluadas en la mandarina ‘Wilking’ durante un año ‘off’ (Goldschmidt & Golomb, 1982), donde se cuantificó un total de 13,26 kg de almidón y 10,66 kg de azúcares solubles por planta. El almacenamiento fue mayor en raíces, menor en el tronco e intermedio en hojas y ramas. Fueron determinadas concentraciones de almidón de 180 y 123 mg.g<sup>-1</sup> de materia seca en raíces menores y hojas, respectivamente. A su vez, se estimó que la mayoría de estas reservas se movilizarían durante el comienzo del año ‘on’. Por otro lado, se observó que el pool de azúcares solubles fue menos dependiente de la carga frutal y no se agotó durante la floración, en la misma medida que lo observado para el almidón.

Las hojas en sus etapas iniciales del desarrollo se comportan como destinos de asimilados, ya que carecen de capacidad fotosintética que les permita su autoabastecimiento (Iglesias *et al.*, 2007). Esto es consecuencia de la inmadurez de sus estomas y de su bajo contenido en nitrógeno (Agustí, 2004; Ribeiro *et al.*, 2009). Esta situación es superada con el avance de las fases fenológicas, transformándose en fuentes de fotoasimilados (Mehouachi *et al.*, 1995; Rivas *et al.*, 2007), cuando están completamente expandidas, lo cual sucede alrededor de dos meses desde el inicio de su desarrollo (Syvertsen & Lloyd,

1994). Otros procesos asociados con el desarrollo de la hoja son la acumulación de sacarosa, materia seca, proteínas y minerales (Goldschmidt & Koch, 1996).

Los cambios anuales en los niveles de carbohidratos varían según la demanda ejercida por el desarrollo vegetativo y reproductivo (Goldschmidt & Golomb, 1982; Syvertsen *et al.*, 2003; Dovic *et al.*, 2014). Los carbohidratos ejercen control de la expresión génica relacionada con los mecanismos involucrados en su producción y distribución en tejidos y órganos (Goldschmidt & Koch, 1996; Li *et al.*, 2003; 2007). La disminución del nivel de carbohidratos activa genes que favorecen el aumento de la fotosíntesis, la movilización y la exportación de azúcares, mientras que decrecen los mRNAs relacionados con el almacenamiento y la utilización de los mismos. A la inversa, la abundancia de carbohidratos ejerce un efecto opuesto por medio de la expresión de genes de represión e inducción (Li *et al.*, 2003; 2007). La dependencia de carbohidratos es considerable en las fases de brotación primaveral, floración y crecimiento inicial del fruto (Mehouachi *et al.*, 1995), debido a los órganos en activo crecimiento y a las altas tasas respiratorias. Durante esta etapa, la persistencia del follaje del año previo es importante en la provisión de fotosintatos y de carbohidratos de reserva (Agustí *et al.*, 2003b).

La disponibilidad de reservas carbonadas en el período de floración y cuajado de frutos está influenciada por la intensidad de floración (Syvertsen *et al.*, 2003; Ribeiro *et al.*, 2009). La competencia por fotosintatos ocurre entre diferentes órganos (brotes-flores-frutos) como también entre unidades individuales del mismo tipo de órgano. La elongación del brote y su expansión sucede antes de la antesis y el cuajado de frutos, por lo que la competencia directa entre el crecimiento vegetativo y el reproductivo es prevenida o evitada. Las inflorescencias con hojas revelan tasas de cuajado de frutos más altas en relación a aquellas sin hojas (Rivas *et al.*, 2010), indicando que las hojas soportan los órganos reproductivos no solo por la provisión de fotosintatos, sino también por la de hormonas, o por algún otro mecanismo (Mehouachi *et al.*, 1995).

En hojas expandidas, el almidón y los azúcares solubles disminuyen durante el verano y otoño como consecuencia de la demanda que implica el desarrollo de los frutos (Dovic *et al.*, 2014). La progresiva reducción en el número de frutos durante el desarrollo temprano tiene relación con el nivel de carbohidratos (Mehouachi *et al.*, 1995). La competencia entre frutos en *Citrus* es como en los otros árboles frutales, existiendo una

relación inversa entre el número de frutos y el tamaño. Durante la fase de maduración, las reservas de carbohidratos son movilizadas desde todos los órganos. Por ello, en situaciones de altas cargas de frutos las reservas se pueden agotar. Por otro lado, en esta condición, la brotación vegetativa de verano es pobre o ausente (Syvertsen *et al.*, 2003).

El retardo en el inicio del crecimiento de las raíces durante el período de brotación fue interpretado como consecuencia de la competencia entre órganos en desarrollo y la menor fuerza de destino de las raíces con relación a las flores y/o frutos. El almidón se acumula en las raíces durante el otoño e invierno y es altamente dependiente de la demanda de los frutos en desarrollo, tal como fue observado en otras especies (Agustí, 2004). Durante el invierno, parte del almidón almacenado en las hojas es utilizado y convertido en azúcares, lo cual aparentemente se debe a un proceso activo de ajuste osmótico en respuesta a un proceso fisiológico de aclimatación al frío (García-Luís *et al.*, 1995).

#### 2.2.4.3. *Relación entre el metabolismo del nitrógeno y el de los carbohidratos*

El metabolismo de los azúcares está relacionado con el del nitrógeno (Syvertsen *et al.*, 2003), ya que la asimilación del nitrógeno en aminoácidos solamente ocurre ante la disponibilidad de esqueletos carbonados, como los cetoácidos originados por la respiración de los azúcares (Peer *et al.*, 2015). De esta forma, la disminución de la actividad fotosintética lleva a una significativa disminución del metabolismo del nitrógeno (Calabretta *et al.*, 2004), y consecuentemente de sustancias del metabolismo secundario (Matt *et al.*, 2002). A la inversa, cantidades adecuadas de nitrógeno (N) son necesarias para lograr tasas máximas de fotosíntesis, y rendimientos aceptables de fruta (Davies & Albrigo, 1994).

En los cítricos, la mejora del rendimiento por la fertilización nitrogenada se debe principalmente a un aumento en el número de frutos, en lugar del tamaño de la fruta, y se lleva a cabo por el aumento de la producción de hidratos de carbono desde la fotosíntesis (Davies & Albrigo, 1994). Por otro lado, una severa reducción en la ACO<sub>2</sub> y del contenido de clorofila se observa con frecuencia en las hojas con bajos niveles de N. Sin embargo, los mecanismos por los cuales tal fenómeno se produce en los cítricos no están esclarecidos (Bondada & Syvertsen, 2005; Raveh, 2013).

Es posible estimar a campo el estado nutricional de las plantas respecto a la concentración de N foliar, a través de un método colorimétrico digital, no destructivo. Para

ello se suelen utilizar colorímetros portables. La lectura del colorímetro, que se traduce en un índice de verdor, presenta una alta correlación con el contenido de N y el nivel de clorofila (Chl) foliar, como fue verificado en varias especies (Le Bail *et al.*, 2005), y siendo también demostrado en cítricos (Calabretta *et al.*, 2004; Jifon *et al.*, 2005). Las relaciones son generalmente más lineales y fuertes a bajas concentraciones de Chl (Jifon *et al.*, 2005). Las Chl son los principales pigmentos involucrados en la captura de luz para la fotosíntesis y otras reacciones fotoquímicas y no fotoquímicas; por lo tanto, la cantidad de luz absorbida por una hoja está relacionada con el contenido de Chl (Marenco *et al.*, 2009). El colorímetro SPAD-502 mide la absorbancia de una hoja en regiones rojo e infrarrojo cercano, y ambas variables son afectadas por el espesor de la hoja. Esto se debe a que la longitud de trayectoria del haz de luz a través de la hoja aumenta con el grosor de la misma, dando como resultado un mayor valor SPAD. Además, el contenido de agua de la hoja puede interferir con la precisión del índice de verdor. Por lo tanto, el indicador puede diferir según el ambiente de crecimiento y entre cultivares dentro de la misma especie, como se observó en *Citrus sp.* (Jifon *et al.*, 2005).

El nitrógeno es el principal elemento nutritivo que con mayor frecuencia limita el crecimiento y la productividad de las plantas no leguminosas. La concentración de N en la hoja puede variar entre el 2% y el 6% del peso seco y suele estar correlacionada con la capacidad y el rendimiento fotosintético (Jifon *et al.*, 2005; Raveh, 2013). El nitrógeno es un elemento esencial para las plantas, ya que forman parte de compuestos orgánicos, como aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, clorofila (Peer *et al.*, 2015). Las plantas con un suministro de N adecuado presentan hojas de color verde oscuro, alta actividad fotosintética y crecimiento vegetativo vigoroso. Por el contrario, el suministro inadecuado de N puede provocar clorosis y retraso en el crecimiento (Bondada & Syvertsen, 2005). El manejo eficiente del fertilizante N para lograr una productividad óptima y al mismo tiempo preservar la calidad del medio ambiente es un objetivo importante en los sistemas agrícolas.

#### 2.2.4.4. Técnicas para la manipulación de la relación fuente-destino

##### 2.2.4.4.1. Rayado de ramas

La manipulación de la relación fuente-destino tiene por objetivo mejorar procesos fisiológicos específicos que tiendan a incrementar la producción agronómica y/o la calidad

de la misma. Por ejemplo, en los cítricos el rayado de ramas en otoño mejora la floración, mientras que si se efectúa en plena floración aumenta el cuajado de frutos, y realizado durante el verano incrementa el tamaño de los frutos (Goren *et al.*, 2003).

El rayado interrumpe el flujo de savia del floema en sentido descendente, y por lo tanto causa acumulación de carbohidratos, particularmente de almidón, en los órganos por encima del rayado. Esto favorece el proceso fisiológico que está ocurriendo en ese momento en la copa, por lo que realizado luego de la floración demora la abscisión de estructuras reproductivas (Wallerstein *et al.*, 1974; Rivas *et al.*, 2010) hasta los 65 días post-antesis, sin excluir la posible influencia de esta técnica sobre el contenido hormonal y nutricional (Goren *et al.*, 2003; Rivas *et al.*, 2010). Se ha demostrado que la mejora del cuajado de los frutos se produce en respuesta al estímulo fotosintético de las hojas jóvenes en los brotes fructíferos con hojas mientras que el efecto es nulo en los brotes florales sin hojas (Rivas *et al.*, 2007).

Sin embargo, la aplicación inadecuada de esta técnica puede disminuir el crecimiento de los árboles (Wallerstein *et al.*, 1974; Rivas *et al.*, 2008). Esto se debe a que en ausencia de fruta (u otro destino activo) las hojas de los árboles rayados desarrollan síntomas de clorosis atribuidos a que los cloroplastos se colman de gránulos de almidón. Algunos trabajos de investigación (Li *et al.*, 2003; 2007; Rivas *et al.*, 2008) demostraron que los genes que codifican las enzimas involucradas en la síntesis de almidón se expresaron en árboles de cítricos rayados sólo cuando las frutas estaban ausentes. En consecuencia, el sistema de tilacoides es dañado, la clorofila es degradada, y la tasa fotosintética disminuye (Goren & Monselise, 1971; Iglesias *et al.*, 2007; Rivas *et al.*, 2011).

El deterioro del aparato fotoquímico y la foto-inhibición induciría el daño foto-oxidativo (Rivas *et al.*, 2008) debido a que una fracción significativa de la energía de la luz absorbida no puede ser desviada a la cadena de transporte de electrones, por lo que éstos son captados por otras sustancias que originan especies reactivas del oxígeno (ROS). Para evitar el colapso del sistema fotosintético por foto-oxidación, los compuestos de tipo ROS deben ser rápidamente metabolizados (Foyer & Noctor, 2005). Un indicador utilizado para analizar la foto-peroxidación lipídica de la membrana de los cloroplastos en material biológico es la concentración de malondialdehído (MDA), la cual aumentaría en condiciones de estrés (Heath & Packer, 1968). Por otro lado, se ha demostrado que el aminoácido prolina también

contribuye en la protección de las estructuras celulares contra el daño oxidativo por radicales libres (Correa-Molinari *et al.*, 2004). Sin embargo, la prolina cumple otras funciones importantes, ya que como soluto orgánico de bajo peso molecular ejerce funciones osmóticas, y sirve como reserva de carbono y nitrógeno para el crecimiento después de la exposición a tensiones ambientales (Abebe *et al.*, 2003), tales como déficit de agua, salinidad, altas temperaturas, daños por congelación, radiación UV, y metales pesados (Shinde *et al.*, 2016). En las plantas, la prolina se sintetiza a partir del glutamato y ornitina (Adams & Frank, 1980). La vía de glutamato es predominante en las plantas bajo estrés osmótico y/o con falta de nitrógeno (Shinde *et al.*, 2016).

#### 2.2.4.4.2. Aplicación de gibberelina (AG<sub>3</sub>) a la caída de pétalos

El bajo cuajado de frutos en cultivares partenocárpicos es un problema agronómico que se traduce en una baja productividad y está asociado, entre otras causas, a un menor contenido hormonal de estos frutos debido a la ausencia de semillas, lo cual los transforma en destinos más débiles. La aplicación exógena de ácido giberélico (AG<sub>3</sub>) a la caída de pétalos constituye una práctica que permite aumentar el cuajado de frutos a causa de incrementar su capacidad de sumidero (Talón, 1997; Mesejo *et al.*, 2016) a través de un estímulo en el transporte de elementos minerales y fotoasimilados hacia ellos (García-Luís *et al.*, 1995; El-Otmani *et al.*, 2000). Se ha demostrado que su aplicación es beneficiosa hasta los 30 días posteriores a la caída de pétalos (Iglesias *et al.*, 2007).

Las dosis utilizadas de este regulador de crecimiento es variable; así, en las condiciones de cultivo de España se reportaron entre 5 y 20 ppm para el estímulo del cuajado de cultivares como el naranja dulce ‘Navelate’ (Agustí *et al.*, 1982b) o en el mandarino Clementino (Talón *et al.*, 1999). Por otro lado, en regiones productivas como las del sur de Brasil (Rio Grande do Sul), se utilizaron dosis de entre 5 y 50 ppm de AG<sub>3</sub> en el naranja Navel ‘Monte Parnaso’. Este cultivar es el más difundido en esa región por el tamaño y calidad de frutos, los cuales son muy valorados en el mercado, aunque sus niveles productivos son bajos (Koller *et al.*, 2006). Del mismo modo, para la mejora de la productividad del mandarino ‘Afourer’ (*Citrus reticulata* Bl.) en Uruguay se aplicaron dosis de 50 ppm de AG<sub>3</sub>, aunque en este caso el tratamiento se realizó en plena floración (Gravina *et al.*, 2016).

La respuesta a la aplicación de AG<sub>3</sub> no es independiente de la disponibilidad de carbohidratos (Agustí *et al.*, 1982a). Es por ello que el rayado constituye una técnica alternativa o complementaria para estimular el cuajado de los frutos (Agustí *et al.*, 2003b). Sin embargo, la eficacia de estas técnicas es muy baja cuando las intensidades de floración son muy elevadas, por lo que en esta situación se requiere del control previo de la floración, para lo cual la técnica más ampliamente utilizada es la aplicación de AG<sub>3</sub> previa a la brotación, momento en que ocurre la inducción floral de los cítricos bajo condiciones de clima templado. De este modo, además de reducir la floración se modifica el patrón de brotación, aumentando los brotes con hojas que poseen una mayor posibilidad de cuajado de sus frutos (Guardiola *et al.*, 1993; Muñoz-Fambuena *et al.*, 2012).

### **2.3. El cultivar Navelate**

El cultivar de naranjo dulce ‘Navelate’ [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] surgió en 1948 por una mutación espontánea de un árbol del cultivar ‘Washington’ (Gil Fibla & Veyrat, 1971). El interés agronómico radica en la excelente calidad de su fruto, que posee coloración rojiza, corteza fina, forma alargada o redondeada, pulpa fina, jugo de sabor muy agradable, con óptimo contenido en ácidos. Es de maduración tardía y puede mantenerse en el árbol durante tres meses sin pérdida de calidad (Agustí *et al.*, 2003a).

Sin embargo, la superficie actual de su cultivo en distintas zonas citrícolas se encuentra en disminución, debido a problemas productivos relacionados a su tendencia a florecer abundantemente y además posee un bajo índice de partenocarpia natural (Talón, 1997). Cuando por alguna causa se produce un año improductivo, el siguiente ciclo resulta en una muy elevada intensidad de floración, con mayor proporción de brotes florales sin hojas que poseen escasa capacidad de cuajado, lo que se traduce en el comienzo de ciclos improductivos consecutivos. Esta situación debe ser superada con un correcto manejo agronómico, pero su escasa difusión y las dificultades receptoras de los agricultores han condicionado su conocimiento (Agustí *et al.*, 2003a).

Por otro lado, existen numerosas investigaciones que confirman que es posible lograr producciones rentables mediante la aplicación de técnicas específicas basadas en el conocimiento de este cultivar y de su comportamiento agronómico. Los principales estudios sobre este cultivar abordaron aspectos fisiológicos nutricionales (Guardiola & García-Luís,

2000; Scholberg *et al.*, 2002), hormonales (Agustí *et al.*, 2003a) y de la aplicación de técnicas culturales para la mejora del cuajado de sus frutos (El-Otmani *et al.*, 2000; Iglesias *et al.*, 2007).

En las condiciones de cultivo de España se ha logrado mejorar el nivel de cuajado de frutos con aplicaciones foliares de 5 ppm de AG<sub>3</sub>. Resultados similares se han logrado con otras sustancias de origen hormonal como las citoquininas, pero dado su mayor costo su uso agrícola se ha prescindido. En todos los casos la mayor respuesta en la mejora del cuajado de frutos se obtuvo cuando la aplicación se realizó en el momento de caída de pétalos (Agustí *et al.*, 2003a). Otra técnica utilizada donde se observó el mismo comportamiento fue a través del rayado de ramas y la combinación de esta técnica con la de aplicación de AG<sub>3</sub> (Gravina, 1999). Por otro lado, la respuesta encontrada en todos los casos estuvo condicionada a un nivel inicial de floración bajo o medio, mientras que cuando las intensidades de floración fueron altas se debió recurrir a técnicas para su disminución (Agustí *et al.*, 1982a; 1982b; El-Otmani *et al.*, 2000).

En cuanto a la nutrición mineral, comparativamente con el cultivar ‘Washington’ de la que precede, se ha observado que el cultivar Navelate tiene una menor reutilización de las reservas acumuladas en las hojas adultas. Por lo tanto, la disponibilidad de nutrientes para cubrir las necesidades de floración, cuajado y desarrollo inicial de los frutos son menores, incrementándose los problemas de la competencia entre órganos en desarrollo (Agustí *et al.*, 2003a).

Los cultivares de cítricos que crecen en diferentes climas y/o sistemas productivos presentan ciclos estacionales de crecimiento vegetativo y reproductivo distintos, por lo que sus estudios tienen valores prácticos y científicos mayores si son efectuados localmente (Goñi & Otero, 2011; Otero *et al.*, 2015; Micheloud *et al.*, 2017; 2018).

Es así, que con las investigaciones propuestas en esta tesis se pretende comprender, con un mayor nivel de aproximación, los mecanismos fisiológicos y metabólicos involucrados durante el proceso de establecimiento y crecimiento inicial de los frutos en el naranjo dulce ‘Navelate’ cultivado en la región citrícola del Río Uruguay, a través del estudio del metabolismo en plantas con y sin tratamientos para la mejora del comportamiento reproductivo.



### 3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

#### *3.1. Hipótesis general*

La fertilización con nitrógeno, la aplicación de AG<sub>3</sub> y el rayado de ramas, mejoran el cuajado de los frutos, y en consecuencia la producción del naranjo cv. Navelate. Esto se atribuye a sus efectos favorables en el metabolismo fotosintético, nutricional y la disminución del estrés abiótico durante el período de crecimiento inicial de los frutos.

Predicción: el cuajado de frutos, el rendimiento por planta, la actividad fotosintética y el estado nutricional, serán mayores en las plantas en las que se apliquen los tratamientos de AG<sub>3</sub>, rayado de ramas y fertilización nitrogenada con dosis elevada. Lo contrario será observado en las variables que definen estrés en las plantas.

#### *3.2. Hipótesis relacionada al nivel de fertilización nitrogenada*

Un mayor nivel de fertilización con nitrógeno al inicio de la brotación primaveral, afecta favorablemente a las variables relacionadas con la economía del Carbono en la planta. Este efecto subyace en mejoras del porcentaje de frutos cuajados, y por lo tanto, de la producción por planta del naranjo 'Navelate'.

Predicciones:

- La mayor dosis de fertilización nitrogenada al inicio de la brotación primaveral tendrá como consecuencia un alto porcentaje de frutos cuajados, y por lo tanto, alta producción por planta.
- La fertilización nitrogenada al inicio de la brotación primaveral resultará en mayores índices de clorofila o de verdor (SPAD) y del contenido foliar de nitrógeno, tanto en las hojas jóvenes de la brotación primaveral como en las hojas adultas de la brotaciones anteriores.
- Además, aumentará la eficiencia del proceso fotosintético, siendo mayor la asimilación neta de CO<sub>2</sub> (ACO<sub>2</sub>), la conductancia estomática (G<sub>s</sub>) y la eficiencia del fotosistema II (PSII).
- A su vez, las hojas tendrán mayores niveles de carbohidratos solubles y almidón.

- Por otro lado, serán menores los niveles de los indicadores de estrés en plantas, tales como prolina y malondialdehído (MDA).
- Altos niveles de fertilización nitrogenada al inicio de la brotación primaveral favorecerán también el crecimiento inicial de los frutos en desarrollo.

### ***3.3. Hipótesis relacionada a las técnicas de aplicación de AG<sub>3</sub> y rayado de ramas***

La aplicación foliar de ácido giberélico (AG<sub>3</sub>) y el rayado de ramas, en forma independiente o combinados, favorecen la retención de frutos y el rendimiento por planta en 'Navelate', debido a que la aplicación de AG<sub>3</sub> favorece la división celular de los órganos en desarrollo, y el rayado de ramas la mayor disponibilidad de carbohidratos para el crecimiento inicial de los mismos. La aplicación de ambas en forma combinada tendría un efecto aditivo en la mejora del cuajado de frutos.

Predicciones:

- La aplicación foliar de AG<sub>3</sub> a la caída de pétalos estimulará el crecimiento exponencial de los órganos en desarrollo y la demanda en la asimilación de CO<sub>2</sub>, y por lo tanto habrá una mayor eficiencia fotosintética y del uso del carbono.
- Además, serán menores los niveles de los indicadores de estrés en plantas, tales como la fluorescencia de la clorofila, los niveles de prolina y MDA.
- El rayado de ramas genera niveles más elevados de carbohidratos, expresados como concentración de almidón en hojas adultas y de azúcares solubles en hojas nuevas y frutos, estimulando de esta manera un mayor cuajado de frutos.
- El efecto del rayado de ramas resultará en menores niveles de ACO<sub>2</sub> y mayores valores en los indicadores de estrés celular (prolina y MDA) y daño del PSII.

### **3.4. Objetivos**

#### **Objetivo general**

Investigar los cambios en los mecanismos fisiológicos y metabólicos del naranjo 'Navelate', en respuesta a las aplicaciones de prácticas culturales que mejoran el cuajado de

los frutos, tales como el nivel de nitrógeno inicial, la aplicación de AG<sub>3</sub> a la caída de pétalos y el rayado de ramas.

### **Objetivos específicos**

- Cuantificar el efecto de la aplicación de prácticas de mejora del cuajado de frutos sobre los componentes del rendimiento.
- Evaluar el efecto del nivel de nitrógeno inicial, la aplicación de AG<sub>3</sub> y el rayado de ramas sobre variables fisiológicas asociadas al metabolismo de fijación de CO<sub>2</sub>, durante la fase de cuajado de frutos.
- Evaluar el efecto de la aplicación de prácticas culturales como la fertilización nitrogenada, la aplicación de AG<sub>3</sub> y el rayado de ramas, sobre indicadores de estrés.
- Estudiar las relaciones entre las variables productivas y las fisiológicas.

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1. Ubicación y características del experimento

El experimento fue abordado en la zona citrícola litoral Oeste de Uruguay, en la localidad de Salto (Fig. 1 a). El lugar de realización corresponde a la quinta 29 (Fig. 1 b) perteneciente a la firma ‘Citrícola Salteña S.A.’ (31°24’35.74” S; 57°55’05.56° O; 65 m.s.n.m.), cuya producción es destinada principalmente a la exportación de fruta fresca, al mercado interno y a la industrialización de jugos, jugos concentrados y aceites esenciales (www.caputto.com.uy).

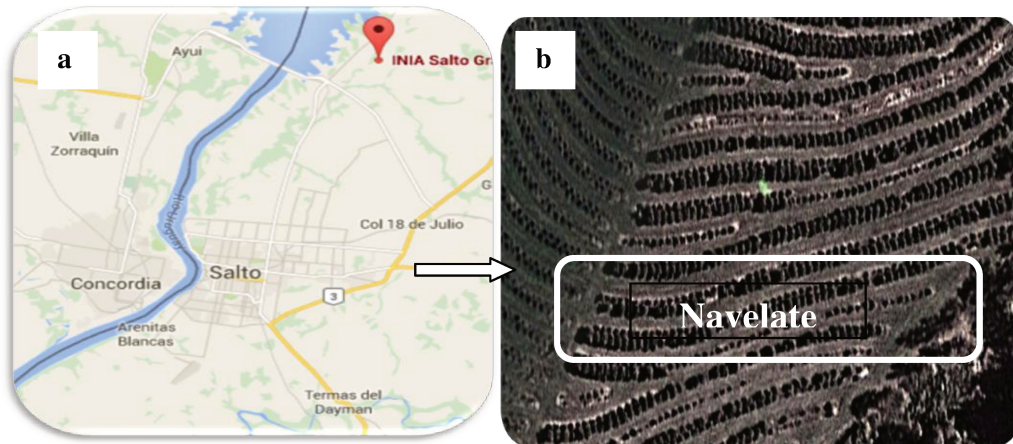


Figura 1: a): ubicación geográfica del lugar de realización de la experiencia; b): fotografía aérea donde se observa el cuadro con la plantación del cv. Navelate (fuente: Google maps).

El clima en la zona corresponde al tipo *Cfa* (templado húmedo sin estación seca con veranos muy calurosos), según la clasificación de Köppen (1948). Las condiciones ambientales durante el periodo comprendido en la experiencia se presentan en la Tabla 1. Además, la evolución semanal de la temperatura media, máxima y mínima, de la precipitación acumulada y el balance hídrico durante la estación primaveral, se encuentran en el Anexo 1.

Las condiciones ambientales se desarrollaron normalmente en relación al clima templado de la región, con un aumento progresivo de los registros térmicos desde septiembre a diciembre, las heladas tardías estuvieron ausentes. Como evento a destacar, se observó un fuerte aumento de la temperatura durante la última semana del mes de octubre,

que alcanzó los 36,4°C el día 28/10, lo cual estuvo acompañado por un aumento en el DPV (Tabla 1). Las precipitaciones se distribuyeron durante todas las semanas del período comprendido en la experiencia lo que, junto al aporte del riego, permitió que el balance hídrico del suelo se mantenga en valores relativamente cercanos a capacidad de campo, sin evidenciarse problemas de déficit hídrico (Tabla 1, Anexo 1).

Tabla 1. Valores mensuales de los principales parámetros meteorológicos obtenidos durante el periodo septiembre-diciembre en la zona de Salto (Uruguay).

	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre
RS acum (Mj.m <sup>-2</sup> )	297	364	388	501
T MED (°C)	16,8	20,9	22,1	23,4
T MAX abs (°C)	29,8	36,4	35,0	33,8
T MIN abs (°C)	5,0	10,0	9,7	10,3
Días con T < a 0 °C	0	0	0	0
Días con T < a 13 °C	24	8	4	2
Días con T > a 35 °C	0	1	1	0
°C días acum	117	252	271	321
PP acum (mm)	78	173	179	228
HR (%)	78,7	75,8	71,4	75,3
DPV	4,08	6,32	7,89	7,24

RS acum: radiación solar acumulada; PP acum: precipitaciones acumuladas; HR: humedad relativa media mensual; T MED: temperatura media mensual; T MAX abs y T MIN abs: temperaturas máximas y mínimas absolutas mensuales; °C días acum: grados días acumulados mensuales ( $\sum T$  MED diaria - 13°C).

El suelo donde se realizó la experiencia corresponde a la clasificación Argisol subéutrico típico (MGAP, 1979). Los Argisoles son suelos saturados lixiviados que cuentan con un horizonte superficial argilúvico muy bien expresado (primeros 20 cm), además se caracterizan por presentar un horizonte álbico discontinuo y textura franco arenosa.

Los datos resultantes del análisis de suelo correspondiente a la finca 29, donde se dispuso el ensayo del cultivo de ‘Navelate’ se presenta a en la Tabla 2. El nivel de pH se encontró dentro del rango adecuado para cítricos (entre 5,5 y 6,5), el valor de MO se ubicó dentro de los niveles medios según las características de la región, el contenido de P fue alto,

mientras que los valores de K, Ca, Mg y Na fueron bajos. Las relaciones Ca/Mg y Mg/K se encontraron en los niveles normales (Morón *et al.*, 1999; Anderson *et al.*, 2012).

Tabla 2. Datos del análisis de suelo, correspondiente al cuadro de ‘Navelate’ donde se realizó la experiencia, provistos por la empresa ‘Citrícola Salteña S.A.’.

<b>pH</b> (H <sub>2</sub> O)	<b>MO</b> (%)	<b>P</b> (ppm)	<b>K</b> (meq/100)	<b>Ca</b> (meq/100)	<b>Mg</b> (meq/100)	<b>Na</b> (meq/100)	<b>Ca/Mg</b>	<b>Mg/K</b>
5,8	2,3	39,8	0,15	2,8	0,8	0,11	3,50	6,67

Para la realización de los tratamientos se seleccionaron 72 plantas de 5 años desde la plantación del cv. Navelate [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck], injertadas sobre portainjerto trifolío [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.], dispuestas en un marco de plantación de 7 x 3,5 m, las cuales fueron expuestas al manejo del productor en cuanto a los controles fitosanitarios y el riego por goteo (Fig. 2).

La unidad observacional la constituyó cada planta, las cuales fueron preseleccionadas por su uniformidad de tamaño de copa e intensidad de floración. Para ello, se utilizaron cartillas de clasificación de las categorías de floración, desarrolladas por INIA para productores de naranja y mandarina (Otero, 2003), seleccionando plantas correspondientes al nivel III o medio (entre 50 y 100 flores.100 nudos<sup>-1</sup>).



Figura 2: Plantas de naranjo ‘Navelate’ seleccionadas para la realización de los tratamientos.

Los niveles nutricionales foliares con los que contaron las plantas de ‘Navelate’ durante el ciclo productivo anterior a la realización de la experiencia fueron provistos por la empresa ‘Citrícola Salteña S.A.’ (Tabla 3). Para el análisis foliar, la empresa realiza el muestreo de hojas de 4 a 10 meses de edad ubicadas en brotes fructíferos, siguiendo el criterio propuesto por Chapman (1976). Los niveles de N, P, Ca y Mn se ubicaron dentro del rango óptimo, Mg entre óptimo y alto, el valor de K es bajo y el de Zn fue deficiente (Chapman, 1976), por lo que se realizaron correcciones en base a fertilización foliar con este último elemento (Tabla 3).

Tabla 3. Datos del análisis foliar del cv. ‘Navelate’ correspondiente al ciclo productivo anterior a la realización de la experiencia, provistos por la empresa ‘Citrícola Salteña S.A.’.

<b>N (%)</b>	<b>P (%)</b>	<b>K (%)</b>	<b>Mg (%)</b>	<b>Ca (%)</b>	<b>Zn (ppm)</b>	<b>Mn (ppm)</b>
2,32	0,13	0,44	0,65	6,01	11,1	31,8

#### **4.2. Diseño experimental y tratamientos**

Se utilizó un diseño experimental en bloques completos al azar generalizados, teniendo como factor de bloqueo las curvas de nivel.

Los factores aplicados fueron:

- Dosis de nitrógeno: 800g (N1) y 1300g (N2) de urea (fecha de aplicación: 29/09).
- Ácido giberélico (AG<sub>3</sub>) a la caída de pétalos: 0 y 50 ppm (fecha de aplicación: 01/10).
- Rayado de ramas a los 15 días posteriores a la caída de pétalos: con rayado (+R) y sin rayado (control), (fecha de aplicación: 15/10).

Los tratamientos conformaron un arreglo factorial 2x2x2 (dos niveles de dosis de nitrógeno, con y sin aplicación de AG<sub>3</sub>; y con, o sin, aplicación de rayado de ramas). Los tratamientos, resultantes de la combinación de factores, a los cuales estuvieron sometidas las plantas fueron:

- ✓ N1
- ✓ N2

- ✓ N1 + AG<sub>3</sub>
- ✓ N2 + AG<sub>3</sub>
- ✓ N1 + R
- ✓ N2 + R
- ✓ N1 + AG<sub>3</sub> + R
- ✓ N2 + AG<sub>3</sub> + R

El ensayo contó con 3 plantas de cada tratamiento dentro del bloque, siendo 8 tratamientos por bloque; que teniendo en cuenta los 3 bloques, se utilizó una cantidad final de 72 plantas o unidades experimentales (n= 72).

Para el desarrollo de los tratamientos, las plantas se fertilizaron al inicio de la brotación. El fertilizante se aplicó en cobertura bajo la copa de los árboles con 800 (N1) o 1300 (N2) gramos de urea (46-0-0) granulada por planta. La aplicación del fertilizante se realizó el día 29/9 bajo condiciones favorables de temperatura media (19,8 °C) y una precipitación efectiva registrada el día anterior de 3,2 mm, por lo que el suelo contaba con buena disponibilidad hídrica, teniendo en cuenta además el balance hídrico del mismo (Anexo 1).

La aplicación de AG<sub>3</sub> se realizó en el estado fenológico de caída de pétalos y se utilizaron aproximadamente 3 litros de solución por planta, o hasta punto de goteo, a una dosis de AG<sub>3</sub> de 50 ppm, usando un producto comercial de formulación líquida ‘Giberelan 36’ (24,6% de i.a.). Previamente, se ajustó el pH de la solución a 5, adicionando el coadyuvante ‘CLE’ (Fig. 3 a).

El anillado del tronco, se realizó en a los 15 días posteriores de la aplicación del AG<sub>3</sub>, a una altura de 30 cm por encima del injerto, utilizando tijeras especialmente adaptadas para esta técnica (Fig. 3 b).





Figura 3. Realización de la aplicación de ácido giberélico (a) y confección de la técnica de rayado (b) en las plantas del naranjo ‘Navelate’.

### **4.3. Parámetros evaluados**

#### **4.3.1. Intensidad de floración, brotación, tasa relativa de caída de frutos y rendimiento**

En cada una de las plantas en evaluación, se seleccionaron cuatro ramas, las cuales fueron marcadas y numeradas, tuvieron una longitud aproximada de 50 cm y en conjunto representaron entre 600 a 800 nudos observados por planta. La medición inicial de intensidad de floración se realizó sobre los árboles preseleccionados por su uniformidad de tamaño de copa y sirvió para definir las 72 plantas que formaron parte del ensayo. Además, se comprobó por ANAVA que los árboles seleccionados no presentaran diferencias en este parámetro, para la posterior aplicación de los tratamientos y medición de las variables en evaluación. Los resultados estadísticos se encuentran en el Anexo 2.

Para la obtención de los registros se utilizaron planillas diseñadas específicamente, se cuantificó el total de nudos por rama marcada, se registró el tipo y la cantidad de brotes, y la cantidad de flores según los brotes reproductivos sin hojas (flores solitarias y ramilletes florales), y brotes reproductivos con hojas (brotes campaneros y mixtos). De esta manera la intensidad de floración se expresó como flores cada 100 nudos, y también se calculó la proporción de los diferentes tipos de brotes emitidos durante la brotación de primavera (Lovatt & Krueger, 2015).

Semanalmente, se siguió la evolución del número de flores y/o frutos por cada tipo de brote desarrollado en las ramas, según la metodología de Agustí *et al.* (1992). Las mediciones se iniciaron en plena floración (última semana de septiembre) y continuaron

hasta el final de la caída fisiológica de frutos (última semana de diciembre). Posteriormente, para cada periodo comprendido entre fechas de observaciones, se calculó la tasa relativa de caída de frutos (TRCF) según Hunt (1990),  $TRCF = \frac{\ln(F1) - \ln(F2)}{\text{Tiempo 2} - \text{Tiempo 1}}$ , siendo F1 y F2 el N° de frutos por rama observados en el tiempo 1 y 2, respectivamente.

Una vez finalizada la abscisión natural de frutos, se cuantificó la carga de fruta presente en cada una de las ramas identificadas por árbol, en todos los tratamientos. El porcentaje de cuajado de frutos se expresó como la relación existente entre el n° de frutos finales y el n° máximo de flores que presentó la rama en cuestión. A la cosecha, se determinó el n° de frutos por planta, y utilizando una balanza se obtuvo el peso del total de frutos, y el peso medio de los frutos, obtenidos en cada planta, con el fin de conocer el rendimiento, en  $\text{kg planta}^{-1}$ , de cada tratamiento en evaluación.

#### **4.3.2. Determinación del índice de verdor o SPAD**

La estimación a campo del índice de verdor de las plantas, se realizó a través de un equipo colorimétrico digital portable, no destructivo tipo Minolta® SPAD-502 (Calabretta *et al.*, 2004), cuya lectura se traduce en un índice de color verde, que tiene una alta correlación con la concentración de nitrógeno en la hoja y con la clorofila foliar, como fue verificado en varias especies (Le Bail *et al.*, 2005) y en los cítricos (Calabretta *et al.*, 2004; Jifon *et al.*, 2005). Los valores SPAD se basan en el principio de que parte de la luz que llega a la hoja es absorbida por la clorofila y el resto que se refleja entra en contacto con la celda detectora del SPAD-502, donde es convertida en una señal eléctrica. La absorbancia cuantificada se expresa en valores adimensionales que van desde 0 a 199, por lo que las unidades SPAD serán siempre las mismas de acuerdo con el tono verde de las hojas (Calabretta *et al.*, 2004). Las lecturas se realizaron durante el desarrollo de la floración y el cuajado de los frutos, con una frecuencia quincenal, y en todas las plantas correspondientes a los distintos tratamientos. Se midieron, en cada una de las plantas, tres hojas jóvenes correspondientes a brotes campaneros y mixtos, de la brotación de primavera, y tres hojas maduras de años anteriores, que actúan como fuente de los frutos desarrollados a partir de brotes sin hojas.

Adicionalmente, se determinó el contenido de nitrógeno foliar a través del método Kjeldahl (Bradstreet, 1965), en ambos tipos de hojas correspondientes a todos los

tratamientos y fechas, en el laboratorio de Química analítica de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Litoral.

#### ***4.3.3. Medidas de fluorescencia de la clorofila y del intercambio gaseoso del metabolismo fotosintético***

La actividad del fotosistema II se evaluó mediante la emisión de fluorescencia de la clorofila, usando un fluorómetro de pulso modulado (modelo OS5-FL, OptiScience, USA) (Fig. 5 a), operando con los modos 'Yield' y 'Fv/Fm' (Fig. 4 b, c) (Van Kooten & Snell, 1990). El resultado del test 'Yield' indica el rendimiento cuántico del FSII ( $\Phi_{FSII}$ ) y el parámetro 'Fv/Fm' corresponde a la eficiencia máxima del FSII. Para la obtención de este último indicador, previamente a la medición las hojas fueron aclimatadas a la oscuridad por un tiempo mínimo de 20 minutos, cubriéndose durante ese período con pinzas especiales para tal fin (FLDC, Opti-Ciencias; Fig. 4 c) (Jifon & Syvertsen 2003, Maxwell & Johnson 2000).

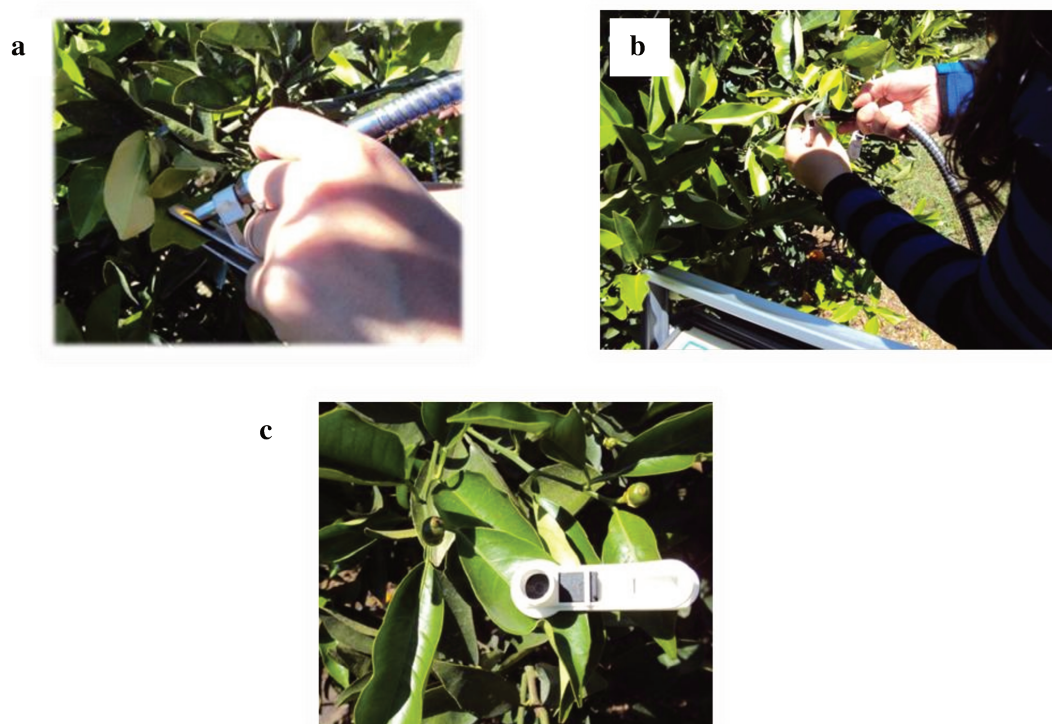


Figura 4. Medición de la actividad del fotosistema II: (a) utilización de fluorómetro de pulso modulado operando en el modo 'Yield', (b) medición en modo Fv/Fm, (c) para éste último, previamente las hojas se aclimataron a la oscuridad utilizando pinzas especiales.

Los parámetros resultantes del intercambio gaseoso del metabolismo fotosintético, tales como la asimilación neta de  $\text{CO}_2$  ( $\text{ACO}_2$ ) (fotosíntesis neta), la conductancia estomática ( $G_s$ ), la concentración interna de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ) y la transpiración ( $E$ ) fueron obtenidos por medio de un equipo portable de analizador infrarrojo de gases (CIRAS-1, PP Systems, Haverhill, EE.UU.) (Fig. 5). Las mediciones se realizaron por la mañana, para evitar las altas temperaturas del mediodía y la baja humedad de la tarde, durante el período de floración, cuajado y crecimiento inicial de frutos (septiembre-diciembre).



Figura 5. Medición del intercambio gaseoso del metabolismo fotosintético en las hojas correspondientes al naranjo 'Navelate', utilizando un sistema portable de analizador infrarrojo de gases (CIRAS-1).

Ambos tipos de mediciones fueron obtenidas a partir de hojas correspondientes a la nueva brotación de primavera y en las hojas adultas, midiendo tres hojas de cada tipo, por planta.

#### ***4.4. Análisis de tejidos vegetales***

##### ***4.4.1. Obtención y acondicionamiento de las muestras***

Las muestras de tejidos vegetales se tomaron durante el período de cuajado y crecimiento inicial de frutos o etapa I de su desarrollo (octubre - diciembre). En cada fecha, se recolectaron tres muestras por tratamiento, de diferentes plantas.

Las hojas a muestrear correspondieron a los brotes campaneros y mixtos de la brotación nueva, y a las hojas maduras de brotaciones anteriores que actúan como fuente de los frutos desarrollados a partir de brotes sin hojas; para lo cual se extrajeron 15 brotes/hojas

de cada tipo por planta, según lo propuesto por Mehouachi *et al.* (1995). Luego, se colocaron por separado en sobres de papel aluminio rotulados y se almacenaron, durante el momento del muestreo en el campo, en una conservadora con hielo, a la que se le agregó N líquido. Las muestras se llevaron inmediatamente al laboratorio para almacenarlas en freezer a  $-40^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, se secaron utilizando un liofilizador TAITEC VD-400F. Cada muestra de hojas permaneció en el mismo durante una semana aproximadamente, hasta obtener un secado completo. Luego se procedió a su trituración con molinillo.

#### 4.4.2. Análisis de carbohidratos (glucosa, fructosa, sacarosa y almidón)

Los carbohidratos se determinaron por el método adaptado a tejidos de cítricos por Mehouachi *et al.* (1995), por cromatografía líquida de alta eficiencia o sistema HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Para la extracción de los azúcares se pesaron 100 mg de muestra de hojas secas y se le añadieron 100  $\mu\text{l}$  de solución de fucosa ( $30 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) como estándar interno. Se le agregó además 3 ml de etanol al 80% y se homogeneizó. Se llevó a baño maría a  $85^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos. Luego se centrifugaron durante 15 min a 3000 rpm y se utilizó el extracto sobrenadante.

Para la purificación se utilizaron columnas de intercambio catiónico y aniónico para cada muestra (Fig. 6 a), consistiendo en lo siguiente:

I. Catiónico: Dowex 50x8-100 equilibrado con HCl 2M, con 1 ml aproximadamente, y luego se las lavó con agua purificada, hasta que el agua del lavado estuvo a pH 4,5-5,0.

I. Aniónico: Dowex 1x4-400 y  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1M, de la misma forma que las anteriores, pero se lavaron hasta que el pH sea de 7,5-8,0.

Para obtener la muestra purificada se realizó la aplicación de la muestra en la resina catiónica, luego se la hizo pasar en la columna aniónica, enjuagando en cada caso con agua purificada MilliQ para recoger la totalidad de la muestra (Fig. 6 b). Seguidamente se le acopló a la muestra un filtro de nylon de 0,45 micras y un filtro  $\text{C}_{18}$  (sep-pack). Luego se evaporó el líquido al vacío con un equipo speed-vac a sequedad (Fig. 6 c), y posteriormente se prepararon los viales. Preparación de viales: se disolvió el azúcar obtenido en una solución de acetonitrilo-agua 100 ml (60:40) y se pasó por un filtro de 0,22 micras para llenar el insertor.

Medición en HPLC: se utilizó un flujo del HPLC a  $1,7 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  con una proporción de 17% agua y 83% acetonitrilo.

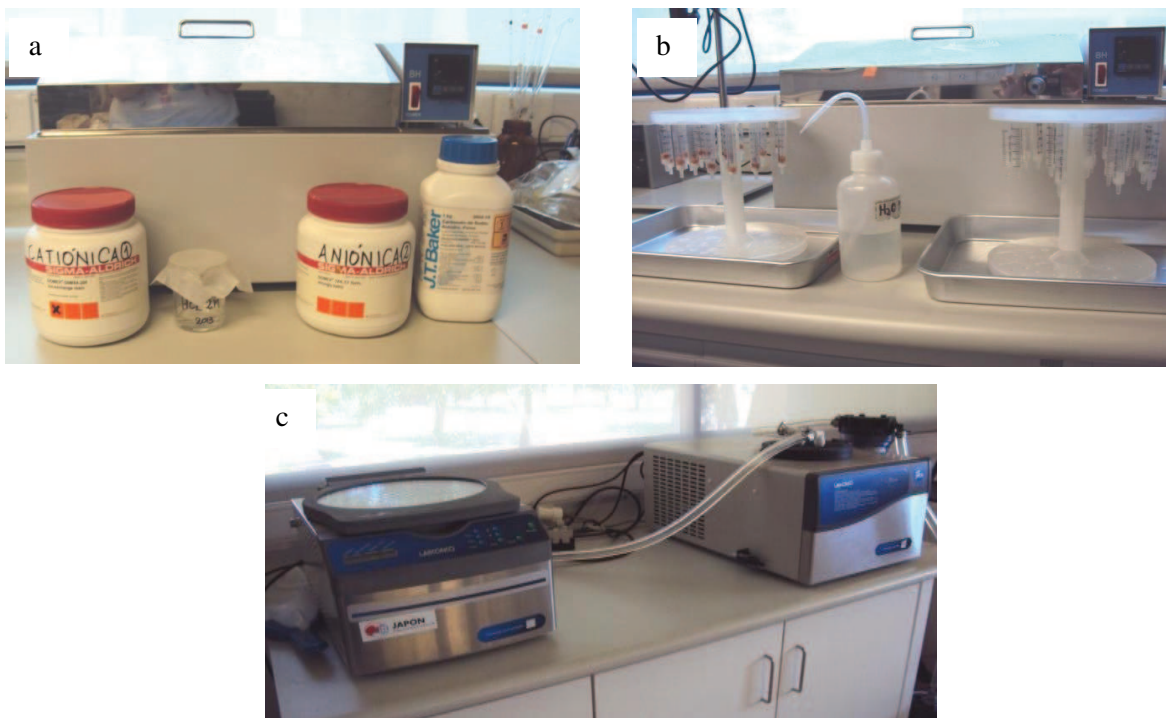


Figura 6. Procedimiento para la medición de carbohidratos por sistema HPLC: (a) las muestras fueron purificadas utilizándose resinas catiónicas y aniónicas, (b) luego se prepararon columnas a las que se le ajustó el pH con el lavado con agua purificada, (c) finalmente el secado se realizó al vacío con un equipo speed-vac.

Los azúcares, fructosa, glucosa y sacarosa, se identificaron por su tiempo de retención, y se cuantificaron por las áreas de sus picos en relación a una curva de calibración elaborada con concentraciones conocidas de cada azúcar. Se utilizó un factor de corrección, dependiente de la recuperación de fucosa, y los resultados se expresaron en mg de azúcar por g de materia seca. La fucosa es un compuesto hidrocarbonado que no existe en los tejidos vegetales, por tanto sirve como estándar interno para corregir las posibles pérdidas de azúcares durante el proceso de extracción y purificación.

Determinación de almidón: se tomó el precipitado del remanente de las muestras a las que se les realizó la extracción de azúcares y se disolvió con agua purificada. Luego se llevaron a autoclave a  $135^{\circ}\text{C}$  por 1 hora.

Para este procedimiento, se aforó a 2 ml con agua purificada y luego se añadieron 0,5 ml de tampón acetato 2 M a pH 4,5. Se agregaron 1 ml de la enzima glucoamilasa a concentración  $120 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  de agua y se incubó por 3 horas a  $55^{\circ}\text{C}$  en baño agitando de vez en cuando el fondo del tubo, poniendo el agitador del baño. Se llevó a la centrifuga por 10-15 minutos a 3000 rpm. Luego se recogió el sobrenadante y se le añadió fucosa (Sigma Química) antes de filtrarlo a una concentración de  $30 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , se disolvió con 4 ml de agua. Posteriormente, se filtró con filtro de  $0,4 \mu\text{m}$  y un  $\text{C}_{18}$ . Luego se evaporó a sequedad y se prepararon viales con 80 ml de acetonitrilo:agua (40:60). Para ser determinado por HPLC se sometió a flujo  $1,7 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  con acetonitrilo:agua (80:20) y 30 ml del vial.

#### 4.4.3. Determinación de prolina y Malondialdehído (MDA)

El contenido de prolina en las hojas se determinó por el método de Bates *et al.* (1973). Se tomó una muestra de tejido de hoja liofilizado (0,05 g), se extrajo en 5 ml de ácido sulfosalicílico al 3% (Biopack, Argentina) utilizando un homogeneizador (Cat x 120, Alemania) a velocidad máxima. Después de una centrifugación a  $4000 \times g$  durante 35 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , se añadió 1 ml del sobrenadante a 2 ml de una mezcla de ácido acético glacial y reactivo de ninhidrina (Sigma-Aldrich, EE.UU.) en una relación 1:1 (v:v). La mezcla de reacción se incubó en un baño de agua a  $100^{\circ}\text{C}$  durante 1 h y después se repartió con 2 ml de tolueno. Se registró, con espectrofotómetro, la absorbancia en la fase orgánica a 520 nm. Una curva estándar se realizó con prolina (Sigma-Aldrich, EE.UU.).

El malondialdehído (MDA) se midió en el tejido foliar siguiendo el procedimiento descrito por Heath & Packer (1968). Se tomó una muestra de tejido de hoja liofilizado y molido de 0,15 g, se homogeneizó en una solución mezcla de 1,5 ml de ácido tiobarbitúrico (TBA) 20% y 0,5 ml de ácido tricloroacético al 0,1% (TCA). Los extractos se incubaron a  $95^{\circ}\text{C}$  durante 45 min y después se centrifugaron a  $4000 \times g$  durante 35 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante se diluyó en una relación 1:1 (v:v) relación con el agua, y la absorbancia se midió en espectrofotómetro en longitudes de onda a 532 y 600 nm. Para el cálculo del contenido de MDA, el valor de la absorbancia a 600 nm se restó a partir de la absorbancia a 532 nm. La concentración de MDA se calculó mediante el uso de su coeficiente de extinción molar a 532 nm ( $155 \text{ mM cm}^{-1}$ ).

#### 4.5. Análisis estadístico

Para el procesamiento estadístico de los datos se utilizó el software InfoStat, con el vínculo activado al programa 'R' (Di Rienzo *et al.*, 2017). Para observar el efecto de los tratamientos aplicados sobre las diferentes variables se realizó el Análisis de la Varianza (ANAVA) y previamente se verificaron los supuestos del mismo, en el caso de corresponder se efectuó el ajuste del modelo.

Para responder al objetivo 1, en cuanto a la observación del efecto de los factores aplicados sobre el porcentaje de cuajado de frutos, el análisis ANAVA se realizó utilizando Modelos Lineales Generalizados y Mixtos. La variable se analizó como función Binomial con el vínculo *logit*. Para la realización del ANAVA, se definieron como efectos fijos los diferentes factores evaluados (nivel de nitrógeno, aplicación de AG<sub>3</sub> y tratamiento de rayado), con sus interacciones. Por otro lado, los efectos aleatorios que se utilizaron fueron el bloque, la planta y rama observada (Balzarini *et al.*, 2017). El modelo analizado fue el siguiente:

$$\% \text{ Cuajado fr.pl}^{-1} = \mu + N + AG_3 + R + N* AG_3 + N*R + AG_3*R + N* AG_3*R + B + P + P>R + E$$

- Siendo:
- $\mu$ , la media poblacional
  - N: efecto fijo de la aplicación de N
  - AG<sub>3</sub>: efecto fijo de la aplicación de AG<sub>3</sub>
  - R: efecto fijo de la aplicación del rayado
  - N\* AG<sub>3</sub>: efecto fijo de la interacción de los factores N y AG<sub>3</sub>
  - N\*R: efecto fijo de la interacción de los factores N y R
  - AG<sub>3</sub>\*R: efecto fijo de la interacción de los factores AG<sub>3</sub> y R
  - N\* AG<sub>3</sub>\*R: efecto fijo de la interacción de los factores N, AG<sub>3</sub> y R
  - B: efecto aleatorio debido al bloque
  - P: efecto aleatorio debido a la planta observada
  - P>R: efecto aleatorio debido a la rama observada, anidada a P
  - E: efecto del error



Para evaluar el efecto de los factores aplicados sobre el N° de frutos por planta, el ANAVA se realizó utilizando Modelos Lineales Generalizados y Mixtos. La variable se analizó como función *Poisson* con el enlace *log*. El modelo analizado fue el siguiente:

$$\text{N}^\circ \text{ frutos.pl}^{-1} = \mu + N + \text{AG}_3 + R + N * \text{AG}_3 + N * R + \text{AG}_3 * R + N * \text{AG}_3 * R + B + P + E$$

Para evaluar el efecto de los factores sobre los Kg de frutos por planta, el ANAVA se realizó utilizando Modelos Lineales Mixtos. Se comprobaron los supuestos del ANAVA y la estructura de varianzas se ajustó con el modelo varExp, fórmula *fitted* (parámetro estimado: exp 0,02). El modelo analizado fue el siguiente:

$$\text{Kg fr.pl}^{-1} = \mu + N + \text{AG}_3 + R + N * \text{AG}_3 + N * R + \text{AG}_3 * R + N * \text{AG}_3 * R + B + P + E$$

En todos los análisis estadísticos, cuando el valor *p* resultante del ANAVA fue  $\leq 0,05$ , las medias de los tratamientos fueron separadas por el test LSD, pero cuando la comparación superó los 3 valores medios se utilizó el test DGC.

Las variables obtenidas para responder a los objetivos 2 y 3 fueron: índice SPAD, contenido foliar de N, fluorescencia de la clorofila ( $\Phi$ FSII y Fv/Fm), parámetros del intercambio gaseoso del metabolismo fotosintético (asimilación neta de CO<sub>2</sub>, conductancia estomática, la concentración interna de CO<sub>2</sub>, tasa de transpiración, déficit de presión de vapor, eficiencia del uso del agua), carbohidratos no estructurales (glucosa, fructosa, sacarosa y almidón), prolina y MDA. Estas variables, cuya evolución se midió a través del tiempo (medidas repetidas en el tiempo), se analizaron como datos longitudinales, utilizando Modelos Lineales Mixtos. Para elegir el modelo del ANAVA se seleccionó la función de correlación de los errores (errores independientes/autorregresivo), con el criterio del menor valor de los indicadores AIC y BIC (Balzarini *et al.*, 2017). El modelo estadístico se realizó de manera particionada para cada órgano observado (hojas desarrolladas, hojas jóvenes y/o frutos en crecimiento), y fue definido de la siguiente manera:

$$Y = \mu + N + AG_3 + R + N*AG_3 + N*R + AG_3*R + N*AG_3*R + F + F*N + F*AG_3 + F*R + B + P + E$$

- Siendo:
- Y: variable respuesta
  - $\mu$ , la media poblacional
  - N: efecto fijo de la dosis de N
  - AG<sub>3</sub>: efecto fijo de la aplicación de AG<sub>3</sub>
  - R: efecto fijo de la aplicación del rayado
  - N\*AG<sub>3</sub>: efecto fijo de la interacción de los factores N y AG<sub>3</sub>
  - N\*R: efecto fijo de la interacción de los factores N y R
  - AG<sub>3</sub>\*R: efecto fijo de la interacción de los factores AG<sub>3</sub> y R
  - N\*AG<sub>3</sub>\*R: efecto fijo de la interacción de los factores N, AG<sub>3</sub> y R
  - F: efecto fijo de la fecha
  - F\*N: efecto fijo de la interacción fecha \* N
  - F\*AG<sub>3</sub>: efecto fijo de la interacción fecha \* AG<sub>3</sub>
  - F\*R: efecto fijo de la interacción fecha \* R
  - B: efecto aleatorio debido al bloque
  - P: efecto aleatorio debido a la planta observada
  - E: efecto del error

Por último, las pruebas '*a posteriori*', para las comparaciones múltiples de medias se utilizaron la prueba LSD Fisher, y en el caso de superar la comparación entre 3 medias se utilizó el test DGC, ambos con un nivel de significancia  $p \leq 0,05$  (Balzarini *et al.*, 2017).

Para responder al objetivo 4, en cuanto a las relaciones entre las diferentes variables observadas con el cuajado de frutos y la productividad, se realizaron los análisis estadísticos clásicos de Correlación (Coeficientes de Pearson) y de Regresión lineal. Estos análisis se utilizaron para conocer las relaciones entre dos variables. Además, para una mejor visualización de las relaciones entre el conjunto de variables fisiológicas medidas con las de producción, se realizaron Análisis Multivariados con el Biplot de Componentes Principales (Balzarini *et al.*, 2017).

## 5. RESULTADOS

### *5.1. Cuantificación del porcentaje de frutos cuajados y la productividad por planta, ante la aplicación de las prácticas culturales*

#### **5.1.1. Composición de la brotación primaveral del cv. 'Navelate'**

La intensidad de floración media del cv. 'Navelate' desarrollada durante la brotación primaveral fue de 72,4 flores.100 nudos<sup>-1</sup> (Anexo 2). La misma estuvo conformada por 49% de flores en brotes con hojas (4% brotes campaneros y 45% brotes mixtos) y un 51% de flores en brotes sin hojas (7% flores solitarias y 44% ramilletes florales) (Fig. 7). La intensidad de brotación fue de 80,6%, observándose un 8,2% de brotes vegetativos.

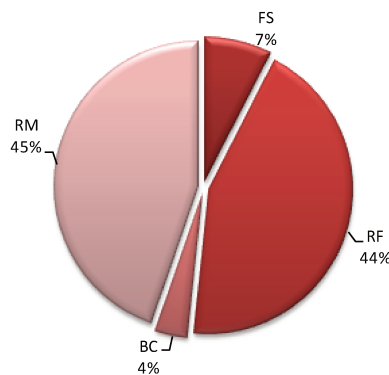


Figura 7. Proporción (%) de los diferentes brotes generativos de la floración primaveral de 'Navelate' (11/09). FS: flor solitaria, RF: ramillete floral, BC: brote campanero, BM: brote mixto.

Las plantas seleccionadas para la posterior aplicación de los tratamientos no presentaron diferencias significativas en cuanto a la intensidad de floración inicial, como tampoco entre las ramas seleccionadas (Anexo 2).

#### **5.1.2. Evolución de la tasa relativa de abscisión de estructuras reproductivas**

Durante el período de establecimiento y crecimiento exponencial de frutos, comprendido entre fines de septiembre y diciembre, la tasa relativa promedio de abscisión o caída de estructuras reproductivas (TRCF: frutos caídos.día<sup>-1</sup>) tuvo una influencia significativa de la fecha de evaluación (Tabla 4). La variable presentó dos momentos de

máximo valor, el primero de ellos se observó a mediados del mes de octubre (30 días posteriores a plena floración), y el siguiente fue a los 60 días siguientes a la plena floración (13/11) (Fig. 8 a).

Esta variable tuvo diferencias significativas según el tipo de brote ( $p < 0,0001$ ) (Fig. 8 b, Anexo 3), y por lo tanto su análisis estadístico se realizó de forma particionada por cada uno de ellos (Tabla 4). Durante el inicio del período de registros (29/09) las mayores tasas de abscisión de frutos las presentaron los brotes tipo ramillete floral (RF) y les siguieron en importancia las flores solitarias (FS), ambos sin hojas. En la segunda fecha de observación (13/10), las FS tuvieron una tasa de abscisión muy elevada en comparación a los otros tipos de brotes y el segundo lugar lo tuvieron los frutos de los RF. En la cuarta fecha de evaluación (10/11), los RF fueron los brotes con mayor caída de frutos, y los brotes mixtos (BM) tuvieron sus máximos valores de abscisión de frutos en comparación con las demás fechas de observación. En la fecha siguiente (24/11) no se observaron diferencias entre los RF, BM y brotes campaneros (BC). Estos últimos tuvieron su mayor tasa de abscisión en esta fecha. Finalmente, el 17/12 se observaron las menores tasas sin diferenciarse las medias de los distintos tipos de brotes (Fig. 8 b). Además, la evolución del porcentaje de retención de frutos según tipos de brotes, durante la primavera, en el naranjo ‘Navelate’ se presenta en el Anexo 4.

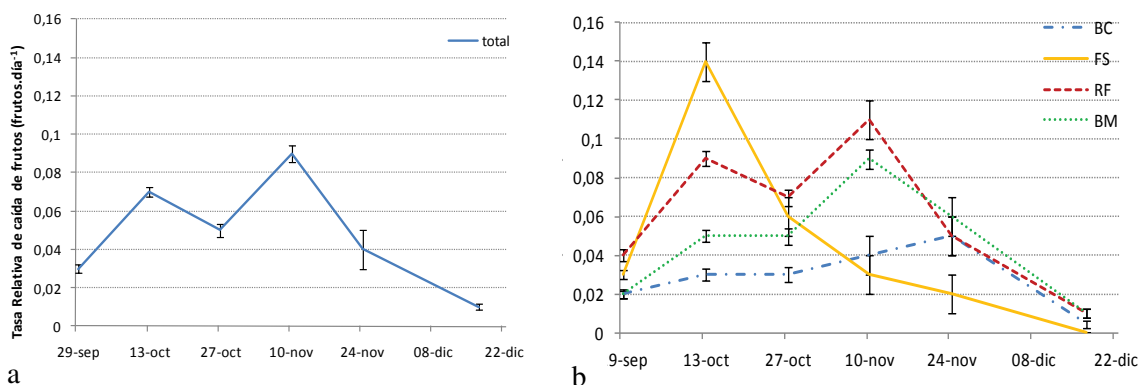


Figura 8. Evolución de la tasa relativa de abscisión de frutos [ $TRCF = \ln(F1) - \ln(F2) / (T2 - T1)$ ], durante el período 29/09 al 17/12: (a) valores medios y (b) según el tipo de brote del cv. ‘Navelate’. BC: brote campanero, FS: flor solitaria, RF: ramillete floral, BM: brote mixto. Las líneas verticales representan el error estándar. F1 y F2: N° de frutos en el tiempo 1 (T1) y en el tiempo 2 (T2), respectivamente.

### 5.1.2.1. Efectos de los factores evaluados sobre la evolución de la tasa relativa de abscisión de frutos

La ‘Tasa Relativa de Caída de Frutos (TRCF)’ total por planta del cv. Navelate fue afectada por los factores ‘nivel de nitrógeno de la fertilización inicial’ y ‘aplicación de giberelina’, mientras que el rayado no tuvo influencia significativa (Tabla 4). La fecha de observación fue significativa y presentó interacción con el tratamiento de aplicación de AG<sub>3</sub> y con el rayado de ramas (Tabla 4). Los factores aplicados no resultaron en interacciones significativas entre ellos (Tabla 4).

Tabla 4. Efecto de los factores dosis de nitrógeno en la fertilización inicial, aplicación de giberelina a la caída de pétalos, y rayado de ramas sobre la ‘Tasa relativa de abscisión de frutos (futos.día<sup>-1</sup>)’, total y según el tipo de brote, del cv. ‘Navelate’, y valor ‘*p*’ del ANAVA.

		Tasa relativa de abscisión de frutos (futos.día <sup>-1</sup> ), total y según el tipo de brote				
		Total	Flor Solitaria	Brote campanero	Ramillete floral	Brote Mixto
Nitrógeno	N1	0,04 a	0,04 a	0,03 ns	0,06 ns	0,05 ns
	N2	0,03 b	0,03 b	0,03	0,05	0,05
AG <sub>3</sub>	0 ppm	0,04 a	0,03 ns	0,03 ns	0,05 ns	0,05 ns
	50 ppm	0,03 b	0,03	0,03	0,05	0,05
Rayado	-R	0,04 ns	0,04 ns	0,03 ns	0,05 ns	0,05 a
	+R	0,04	0,03	0,03	0,05	0,04 b
		<b>Valor ‘<i>p</i>’</b>				
Nitrógeno		<b>0,0043</b>	<b>0,0352</b>	0,3380	0,3221	0,4914
AG <sub>3</sub>		<b>0,0300</b>	0,8200	0,7407	0,6592	0,2299
Rayado		0,8767	0,0785	0,8251	0,6702	<b>0,0356</b>
Fecha		<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Nitrógeno x fecha		0,1678	<b>0,0004</b>	0,2276	<b>0,0463</b>	<b>0,0210</b>
AG <sub>3</sub> x fecha		<b>0,0023</b>	0,1219	0,3408	0,8503	<b>0,0022</b>
Rayado x fecha		<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0194</b>	<b>0,0089</b>	0,8275	0,2861
Nitrógeno x AG <sub>3</sub>		0,8811	0,3884	0,4105	0,7902	0,0558
Nitrógeno x Rayado		0,5425	0,1736	0,3417	0,6539	0,4070
AG <sub>3</sub> x Rayado		0,5404	0,9973	0,9934	0,1936	0,6499
N x AG <sub>3</sub> x R		0,3228	0,6248	0,5273	0,4757	0,9417

Fertilización nitrogenada: 11/09, aplicación de 50 ppm de AG<sub>3</sub>: 01/10. –Rayado= control; +Rayado: árboles con rayado de ramas (15/10). Sin diferencias significativas (ns) y con diferencias significativas (a, b) entre medias de cada columna en función del factor aplicado, LSD, *p* ≤ 0,05.

La fertilización inicial con la mayor dosis (N2) disminuyó la tasa media total de abscisión de frutos (TRCF) y la correspondiente a los brotes de Flor solitaria (Tabla 4). Además, se observó un efecto de la fecha de muestreo sobre la TRCF total y para los tipos de brotes FS, RF y BM (Tabla 4). Su evolución se muestra en la figura 9.

La aplicación de AG<sub>3</sub> redujo la TRCF total, sin diferencias entre tipo de brote. También se observó una interacción significativa con las fechas de muestreo (Tabla 4). Las plantas que no tuvieron aplicación de AG<sub>3</sub> en la fecha 10/11 presentaron una tasa media de abscisión de frutos casi un 30% superior respecto a los árboles a los que se les aplicaron 50 ppm de AG<sub>3</sub> (Tabla 4, Fig. 10 a). Esto se debió a la tasa de caída de frutos de los BM (Tabla 4, Fig. 10 b), mientras que el 24/11 se observó el efecto contrario (Fig. 10 a y b) a causa de la abscisión de los frutos de los mismos tipos de brotes (BM) (Fig. 10 b).

El Rayado no afectó la TRCF total, solamente disminuyó la TRCF en BM. Al igual que en los factores anteriores, existió una interacción significativa con la fecha (Tabla 4). En cuanto al efecto del rayado y la interacción con la fecha, las plantas que no lo tuvieron presentaron mayores tasas de abscisión total de frutos en comparación a las plantas con rayado, a los trece días después de la aplicación de la técnica, el 28/10 (Fig. 11 a). Al mismo tiempo fue observado un nivel superior de abscisión de frutos en los tipos de brotes de FS y los BM, principalmente (Fig. 11 b y c). Posteriormente, las plantas con rayado presentaron una mayor caída de frutos de los BC en la fecha 24/11 (Fig. 11 d).

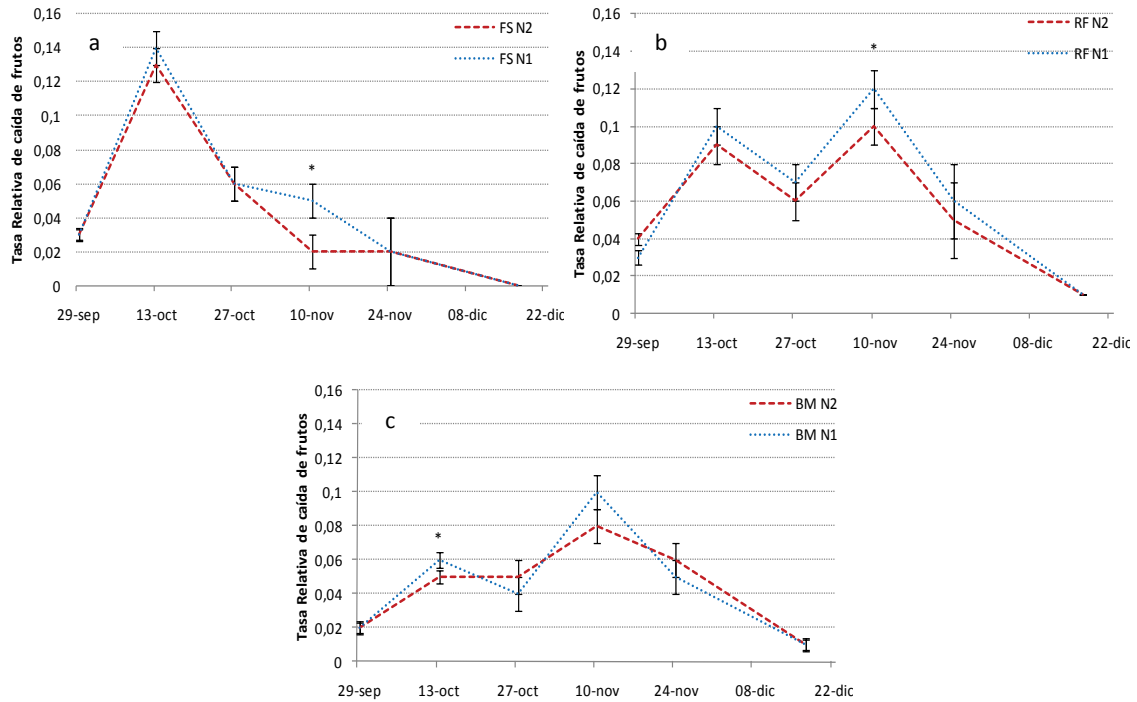


Figura 9. Efecto de la dosis de nitrógeno de la fertilización inicial sobre la tasa relativa de abscisión de frutos (frutos.día<sup>-1</sup>), durante la primavera, en: (a) brotes de flor solitaria (FS), (b) ramilletes florales (RF) y (c) brotes mixtos (BM), del naranjo ‘Navelate’. El asterisco (\*) indica diferencias significativas entre medias, según test LSD,  $p \leq 0,05$  y las barras el error estándar.

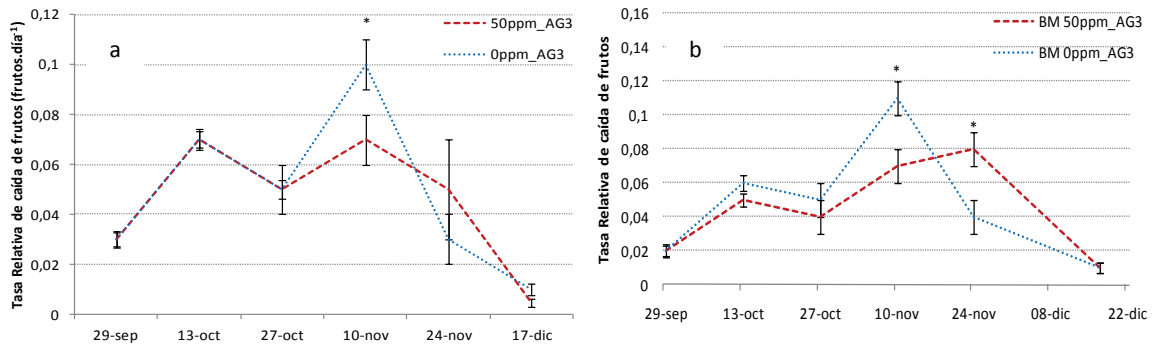


Figura 10. Efecto de la aplicación de giberelina a la caída de pétalos (50 ppm AG<sub>3</sub>, 01/10) sobre la evolución de la tasa relativa de abscisión de frutos durante la primavera, de: (a) Total y (b) brotes mixtos (BM), en ‘Navelate’. Las líneas verticales representan el error estándar y los asteriscos (\*) indican diferencias significativas entre medias, test LSD,  $p \leq 0,05$ .

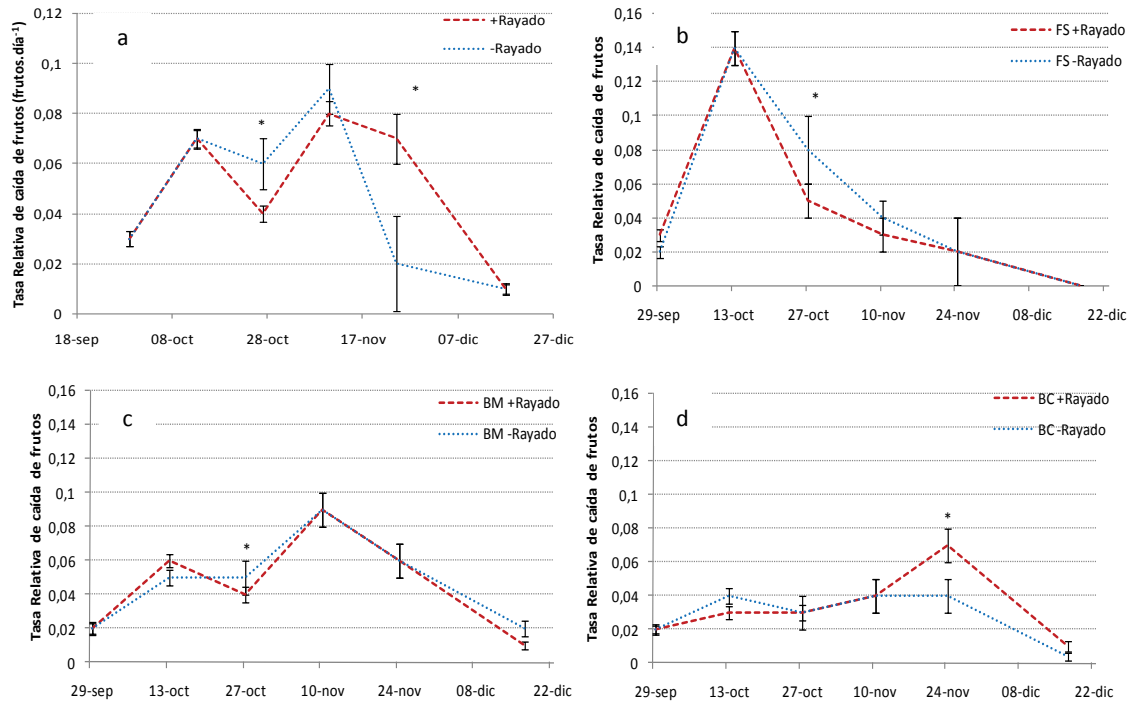


Figura 11. Efecto del rayado de ramas a los 15 días posteriores a la caída de pétalos, sobre la evolución de la tasa relativa de abscisión de frutos ( $\text{frutos}\cdot\text{día}^{-1}$ ) en: (a) Total, (b) brotes de flor solitaria (FS), (c) brotes mixtos (BM) y (d) brotes campaneros (BC), del cv. Navelate, durante la estación primaveral. –Rayado: control; +Rayado: árboles con rayado de ramas (aplicación 15/10). Las líneas verticales representan el error estándar y el asterisco (\*) indica diferencias significativas entre medias, test LSD,  $p \leq 0,05$ .

### 5.1.3. Efectos de los factores evaluados sobre el porcentaje de cuajado final de frutos por planta

El porcentaje de cuajado final de frutos por planta fue superior con la mayor dosis de nitrógeno (N2: 1,66% vs. N1: 0,92%), del mismo modo que con el tratamiento de rayado de ramas (+R: 1,57% vs. –R: 1,02%). Por otro lado, la aplicación de 50 ppm de AG<sub>3</sub>, aunque fue numéricamente mayor al control, no logró estadísticamente aumentar el resultado de esta variable (50 ppm: 1,40% vs. 0 ppm: 1,24%) (Tabla 5). Los factores analizados no tuvieron interacciones significativas entre ellos para esta variable (Tabla 5).



En cuanto al efecto de los factores evaluados sobre el cuajado final de los frutos en los diferentes tipos de brotes, se observó que ante la mayor dosis de nitrógeno (N2), los brotes florales múltiples sin hojas (RF) y con hojas (BM) aumentaron significativamente el cuajado final de los frutos (RF, N2: 0,67% vs. N1: 0,18%; BM, N2: 2,23% vs. N1: 1,56%) (Tabla 5). Además, estos últimos, desarrollaron un mayor cuajado de frutos por el efecto de la aplicación del rayado (BM: +R: 2,56% vs. -R: 1,17%) (Tabla 5), aunque esta última respuesta fue dependiente de la aplicación de AG<sub>3</sub> (Anexo 5).

Tabla 5. Efecto de los factores dosis de nitrógeno en la fertilización inicial, aplicación de giberelina a la caída de pétalos, y rayado de ramas, sobre el cuajado de frutos (%) total por planta, y discriminado por tipo de brote, y valor 'p' del ANAVA, del cv. 'Navelate'.

Factor	Nivel	Cuajado de frutos (%)	Cuajado final de frutos según tipo de brote (%)							
			Flor solitaria	Brote campanero	Ramillete floral	Brote mixto				
Nitrógeno	N1	0,92	B	0,20	ns	5,74	ns	0,18	b	1,56 b
	N2	<b>1,66</b>	A	0,17		8,10		<b>0,67</b>	<b>a</b>	<b>2,23 a</b>
AG <sub>3</sub>	0 ppm	1,24	ns	0,28	ns	5,85	ns	0,60	ns	1,81 ± 0,28
	50 ppm	1,40		0,07		8,32		0,26		2,03 ± 0,49
Rayado	- R	1,02	B	0,16	ns	6,31	ns	0,36	ns	1,17 ± 0,50
	+R	<b>1,57</b>	A	0,21		7,60		0,52		<b>2,56 ± 0,28</b>
			<b>Valor 'p'</b>							
Nitrógeno		<b>0,0007</b>		0,6935		0,0970		<b>0,0046</b>		<b>0,0028</b>
AG <sub>3</sub>		0,7512		0,6965		0,3338		0,0756		0,8686
Rayado		<b>0,0015</b>		0,6395		0,4615		0,2727		0,0001
Nitrógeno x AG <sub>3</sub>		0,4110		0,7778		0,7780		0,1141		0,2378
Nitrógeno x Rayado		0,1813		0,4812		0,5093		0,6621		0,1311
AG <sub>3</sub> x Rayado		0,0785		0,4816		0,5471		0,7809		<b>0,0382</b>
N x AG <sub>3</sub> x R		0,1316		0,9992		0,4403		0,9989		0,5407

Fertilización nitrogenada: 11/09, aplicación de 50 ppm de AG<sub>3</sub>: 01/10. -Rayado= control; +Rayado: árboles con rayado de ramas (aplicación 15/10). Sin diferencias significativas (ns) y con diferencias significativas (a, b) entre medias de cada columna (tipo de brote) y según el factor aplicado, test LSD,  $p \leq 0,05$ .

#### 5.1.4. Efectos de los factores evaluados sobre la productividad por planta

Con respecto a la variable N° de frutos por planta, el ANAVA arrojó una interacción significativa entre los tres factores evaluados (nitrógeno x giberelina x rayado), los resultados se detallan en la Tabla 6.

Cuando las plantas no tuvieron aplicación de AG<sub>3</sub> ni rayado de ramas, aumentaron la carga de frutos en un 37% al pasar del nivel N1 al N2 de fertilización. Del mismo modo, cuando no recibieron el tratamiento de AG<sub>3</sub> pero se les aplicó rayado, el aumento en el número de frutos.pl<sup>-1</sup> fue del 17% con el nivel N2 de fertilización. Cuando se añadió AG<sub>3</sub> al nivel N1, el número de frutos resultó ser inferior. Un incremento importante en la carga de frutos por planta (107%) se observó cuando se aumentó el nivel de nitrógeno en plantas sin rayado pero con aplicación de 50 ppm de AG<sub>3</sub>. Por último, no se observaron diferencias en esta variable entre los dos niveles de fertilización nitrogenada cuando se combinaron los tratamientos de 50 ppm de AG<sub>3</sub> y aplicación de rayado de ramas (Tabla 6).

Tabla 6. Número de frutos por planta, en función de la interacción entre los factores nivel de nitrógeno en la fertilización inicial, aplicación de giberelina a la caída de pétalos y rayado de ramas, en 'Navelate'.

Factores	N° Frutos.pl <sup>-1</sup>	
N1	60,78	d
N2	83,22	c
N1 + AG <sub>3</sub>	52,74	e
N2 + AG <sub>3</sub>	109,22	a
N1 + R	94,56	b
N2 + R	110,56	a
N1 + AG <sub>3</sub> + R	77,67	c
N2 + AG <sub>3</sub> + R	75,00	c
	<b>Valor 'p'</b>	
Nitrógeno	<0,0001	
AG <sub>3</sub>	0,2111	
Rayado	<0,0001	
Nitrógeno x AG <sub>3</sub>	0,3999	
Nitrógeno x Rayado	<0,0001	
AG <sub>3</sub> x Rayado	0,2541	
Nitrógeno x AG <sub>3</sub> x Rayado	<b>&lt;0,0001</b>	

N1: 800g y N2: 1300g de urea por planta, aplicación: 11/09. Con o Sin AG<sub>3</sub>, aplicación de 50 ppm a la caída de pétalos: 01/10. -R: sin rayado, +R: con rayado, aplicación: 15/10. Letras distintas indican diferencias significativas entre medias, test DGC,  $p \leq 0,05$ .

En cuanto a la producción obtenida en Kg.pl<sup>-1</sup>, el tratamiento de mayor dosis inicial de nitrógeno (N2) resultó superior con respecto a la menor dosis de nitrógeno (Tabla 7). El mismo resultado fue observado con la aplicación de la técnica de rayado, en relación al control sin rayado (Tabla 7). Por otro lado, la aplicación de 50 ppm de AG<sub>3</sub> no se diferenció estadísticamente del tratamiento control sin la aplicación hormonal (Tabla 7). Los factores aplicados no presentaron interacciones significativas, en esta variable (Tabla 7).

Tabla 7. Efectos del nivel de nitrógeno en la fertilización inicial, la aplicación de giberelina a la caída de pétalos y el rayado de ramas, sobre la productividad (Kg.pl<sup>-1</sup>) de 'Navelate'.

<b>Factor</b>	<b>Nivel</b>	<b>Rendimiento</b>	
		<b>Kg .pl<sup>-1</sup></b>	
<b>Nitrógeno</b>	<b>N1</b>	18,77	<b>b</b>
	<b>N2</b>	24,74	<b>a</b>
<b>AG<sub>3</sub></b>	<b>0 ppm</b>	24,49	ns
	<b>50 ppm</b>	19,02	
<b>Rayado</b>	<b>Sin rayado</b>	18,82	<b>b</b>
	<b>Con rayado</b>	24,70	<b>a</b>
		<b>Valor 'p'</b>	
Nitrógeno		<b>0,0394</b>	
AG <sub>3</sub>		0,0582	
Rayado		<b>0,0423</b>	
Nitrógeno x AG <sub>3</sub>		0,3754	
Nitrógeno x Rayado		0,0951	
AG <sub>3</sub> x Rayado		0,5953	
Nitrógeno x AG <sub>3</sub> x Rayado		0,3102	

Fertilización nitrogenada: 11/09, aplicación de 50 ppm de AG<sub>3</sub>: 01/10 y rayado de ramas: 15/10. Letras distintas indican diferencias significativas entre medias de cada columna, según niveles de cada factor, test LSD,  $p \leq 0,05$ .

## 5.2. Efecto del nivel de nitrógeno inicial, la aplicación de giberelina y el rayado de ramas sobre variables relacionadas con la economía de carbono en la planta, durante el período de establecimiento y crecimiento inicial de frutos

### 5.2.1. Evolución del índice de verdor (SPAD) en las hojas de la brotación de primavera y hojas maduras

Durante el desarrollo de la brotación primaveral, desde el mes de septiembre hasta diciembre, los valores del índice de verdor se incrementaron a través del tiempo, aunque de manera diferente según el grado de madurez de las hojas ( $p < 0,0001$ ) (Fig. 12). En valores medios, las hojas jóvenes de la brotación de la primavera tuvieron un menor índice SPAD que las hojas maduras (62,03 vs. 75,34). Las diferencias entre los dos tipos de hojas fueron observadas en la mayoría de las fechas, siendo muy amplias en el inicio de los registros (02/10), y luego fueron disminuyendo hasta la última fecha (17/12), donde los valores fueron semejantes en ambos tipos de hojas (Fig. 12). El índice de verdor de las hojas maduras osciló levemente, entre valores de 71,90 y 78,86 durante el período analizado. En cambio, en las hojas jóvenes de la nueva brotación los valores se duplicaron en el mismo período; a principios del mes de octubre mostraron índices SPAD de 35,64, alcanzando valores de 79,67 al final de su desarrollo (Fig. 12).

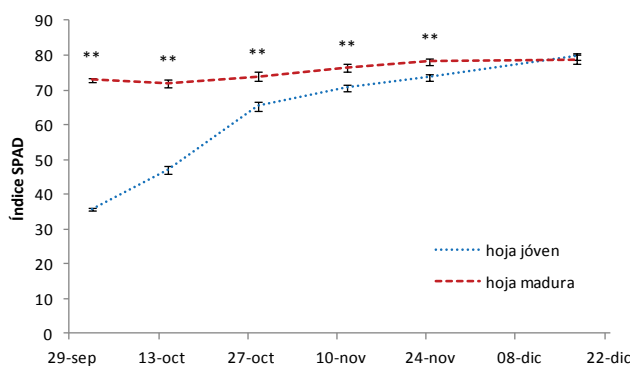


Figura 12. Evolución del índice SPAD en hojas jóvenes de la brotación de primavera y en hojas maduras de 'Navelate'. Las barras verticales representan el error estándar y el doble asterisco (\*\*) indica diferencias significativas ( $p \leq 0,01$ ) entre medias, test LSD.

### 5.2.1.1. Efectos de los factores evaluados sobre el índice de verdor (SPAD)

Según lo descrito en el punto 5.2.1., la evolución del índice de verdor estuvo influida por el grado de madurez de la hoja en que se realizó la medición (Fig. 12), por esta razón el efecto de los tratamientos se analizó de forma separada para cada tipo de hoja (Tabla 8). Por otro lado, se evidenció un efecto significativo de la fecha de medición sobre esta variable, en ambos tipos de hojas (Tabla 8). Por lo tanto, a los fines de simplificar el análisis del efecto de los factores estudiados (nitrógeno, giberelina, y rayado) sobre el índice SPAD, los resultados de la evolución en el tiempo de las medias de los factores principales se detallan en el Anexo 6.

Tabla 8. Efectos del nivel de nitrógeno, la aplicación de giberelina a la caída de pétalos y el rayado de ramas, sobre el índice SPAD, y valor ‘p’ del ANAVA, en hojas maduras y jóvenes de ‘Navelate’.

		<b>Índice SPAD</b>			
<b>Factor</b>	<b>Nivel</b>	<b>Hojas maduras</b>		<b>Hojas jóvenes</b>	
<b>Nitrógeno</b>	<b>N1</b>	75,45	± 5,81	62,69	± 5,54
	<b>N2</b>	75,22	± 5,97	61,37	± 5,57
<b>AG<sub>3</sub></b>	<b>0 ppm</b>	75,78	a	62,05	± 5,65
	<b>50 ppm</b>	74,89	b	62,01	± 5,68
<b>Rayado</b>	<b>Sin rayado</b>	75,85	± 5,66	62,85	± 5,70
	<b>Con rayado</b>	74,82	± 9,61	61,21	± 5,53
		<b>Valor ‘p’</b>			
Nitrógeno		0,5694		0,0002	
AG <sub>3</sub>		<b>0,0258</b>		0,8873	
Rayado		0,0122		<0,0001	
Fecha		<0,0001		<0,0001	
Fecha x Nitrógeno		0,2333		<0,0001	
Fecha x AG <sub>3</sub>		<b>0,0422</b>		0,0003	
Fecha x Rayado		0,0576		0,0316	
Nitrógeno x AG <sub>3</sub>		0,9511		0,6908	
Nitrógeno x Rayado		<b>0,0062</b>		0,0798	
AG <sub>3</sub> x Rayado		0,1068		0,0173	
Nitrógeno x AG <sub>3</sub> x Rayado		0,0681		<b>&lt;0,0001</b>	

Letras distintas indican diferencias significativas entre medias de cada columna y niveles de cada factor, ns: sin diferencias significativas, test LSD,  $p \leq 0,05$ .

La aplicación de AG<sub>3</sub> afectó el índice de verdor en las hojas maduras, las cuales disminuyeron el valor medio de índice SPAD con la aplicación de 50 ppm de AG<sub>3</sub> (Tabla 8). La interacción entre la fecha y la aplicación de AG<sub>3</sub> se debe a que sólo se observaron diferencias significativas en los registros obtenidos a los 7 días posteriores a la aplicación de este tratamiento, a favor de las plantas control para ambos tipos de hojas (Anexo 6).

En las hojas maduras, el efecto del nivel de nitrógeno fue dependiente del rayado aplicado a las plantas, por lo cual la interacción entre estos factores resultó significativa (Tabla 8). Este resultado se debe a que cuando las plantas tuvieron el aporte de la menor dosis de N (N1) y sin aplicación de rayado presentaron mayores valores de índice SPAD en comparación a las medias de las demás combinaciones entre estos factores (Tabla 9).

Tabla 9: Interacción de los factores nivel de nitrógeno en la fertilización inicial y aplicación de rayado de ramas, sobre el Índice SPAD, de las **hojas maduras** del cv. Navelate.

hojas maduras		Índice SPAD	
Nivel de N		N1	N2
Aplicación de rayado	- R	76,52 a	75,18 b
	+ R	74,39 b	75,27 b

Fertilización nitrogenada: 11/09, N1: 800g y N2: 1300g de urea por planta. -R sin rayado y +R con rayado de ramas a los 15 días posteriores a la caída de pétalos: 15/10. Medias con una letra común no son significativamente diferentes, según test LSD,  $p \leq 0,05$ .

En las hojas jóvenes, se observó interacción entre los tres factores evaluados (Tabla 8). El valor SPAD fue superior cuando se combinó la menor dosis de nitrógeno y sin las aplicaciones de AG<sub>3</sub> y de rayado de ramas, en comparación a las medias de las demás combinaciones de estos factores (Tabla 10).

Tabla 10: Índice SPAD en función de la interacción de los factores: la dosis de nitrógeno en la fertilización inicial, aplicación de giberelina (AG<sub>3</sub>) a la caída de pétalos y rayado de ramas a los 15 días posteriores, en las **hojas jóvenes** del cv. Navelate.

hojas jóvenes	Nivel de N	Índice SPAD			
		N1		N2	
		Dosis de AG <sub>3</sub>	0 ppm	50 ppm	0 ppm
Aplicación de	-R	65,15 a	62,47 b	61,43 c	62,35 b
rayado	+R	60,42 c	62,73 b	61,25 c	60,51 c

Fertilización nitrogenada: 11/09 N1: 800g y N2: 1300g de urea por planta. Aplicación de 50 ppm de AG<sub>3</sub> a la caída de pétalos: 01/10. -R sin rayado y +R con rayado de ramas a los 15 días posteriores a la caída de pétalos: 15/10. Medias con una letra común no son significativamente diferentes, según test DGC,  $p \leq 0,05$ .

### 5.2.2. Efecto de los factores evaluados sobre el contenido de nitrógeno foliar (%MS)

El contenido de nitrógeno foliar (%MS) estuvo influido por el tipo de hoja ( $p < 0,0001$ ), siendo los valores medios superiores en las hojas jóvenes en comparación a las maduras (2,51 vs. 2,27 %, respectivamente), y por ello esta variable se analizó de forma particionada según el estado de madurez de las hojas (Tabla 11). Además, los niveles foliares de nitrógeno (%MS) de ambos tipos de hojas fueron significativamente afectados según la fecha de análisis (Tabla 11). Por lo tanto, a los fines de simplificar el análisis del efecto de los factores estudiados (nitrógeno, giberelina, y rayado) sobre esta variable, los resultados de la evolución en el tiempo de las medias de los factores principales se detallan en el Anexo 7.

Tabla 11: Efectos del nivel inicial de nitrógeno, la aplicación de giberelina a la caída de pétalos y el rayado de ramas, sobre el contenido de nitrógeno foliar (%MS) del cv. Navelate, y valor 'p' del ANAVA.

Contenido de Nitrógeno (%MS)					
Factor	Nivel	Hojas maduras		Hojas jóvenes	
Nitrógeno	N1	2,28	ns	2,48	± 0,32
	N2	2,25		2,52	± 0,39
AG <sub>3</sub>	0 ppm	2,33	± 0,17	2,56	± 0,36
	50 ppm	2,20	± 0,17	2,45	± 0,34
Rayado	Sin rayado	2,25	± 0,20	2,50	± 0,31
	Con rayado	2,28	± 0,16	2,51	± 0,39
		<b>Valor 'p'</b>			
Nitrógeno		0,2010		0,4145	
AG <sub>3</sub>		<0,0001		0,0044	
Rayado		0,2039		0,6792	
Fecha		<0,0001		<0,0001	
Fecha x Nitrógeno		0,0123		0,0483	
Fecha x AG <sub>3</sub>		<0,0001		0,0191	
Fecha x Rayado		0,0001		0,0204	
Nitrógeno x AG <sub>3</sub>		0,1915		0,3758	
Nitrógeno x Rayado		0,1347		0,8810	
AG <sub>3</sub> x Rayado		<b>0,0004</b>		0,0002	
Nitrógeno x AG <sub>3</sub> x Rayado		0,5945		<b>0,0174</b>	

Fertilización nitrogenada: 11/09 N1: 800g y N2: 1300g de urea por planta, aplicación de AG<sub>3</sub>: 01/10 y rayado de ramas: 15/10. ns: sin diferencias significativas entre medias, test LSD,  $p \leq 0,05$ .

En las hojas maduras, el efecto de la aplicación de AG<sub>3</sub> a la caída de pétalos sobre el contenido de nitrógeno foliar (%MS) fue dependiente del rayado a los 15 días posteriores (Tabla 11) debido a que las plantas controles (sin AG<sub>3</sub> y sin rayado) presentaron los mayores valores de nitrógeno foliar, mientras que los menores niveles correspondieron al tratamiento 50 ppm de AG<sub>3</sub> y sin rayado. En los casos combinados con aplicación del rayado se observaron valores intermedios (Tabla 12).



Tabla 12: Efecto de la interacción de la aplicación de giberelina (AG<sub>3</sub>) a la caída de pétalos y el rayado de ramas sobre el contenido de nitrógeno foliar (%MS) de las **hojas maduras** de ‘Navelate’.

hojas maduras		Nitrógeno foliar (% MS)	
Dosis de AG <sub>3</sub>		0 ppm AG <sub>3</sub>	50 ppm AG <sub>3</sub>
Aplicación de rayado	- R	2,36 a	2,15 c
	+ R	2,30 b	2,26 b

Aplicación de 50 ppm de AG<sub>3</sub> a la caída de pétalos: 01/10. -R: sin rayado; +R: con rayado de ramas a los 15 días posteriores a la caída de pétalos: 15/10. Medias con una letra común no son significativamente diferentes, según test DGC,  $p \leq 0,05$ .

En las hojas jóvenes, fue significativa la interacción entre los tres factores evaluados (Tabla 11) sobre el contenido de nitrógeno foliar, el cual fue superior cuando se combinó la mayor dosis de fertilización inicial (N2), sin las aplicaciones de AG<sub>3</sub>, y sin rayado de ramas. Por otro lado, cuando las plantas contaron con el nivel N2, con la aplicación de AG<sub>3</sub>, y sin rayado presentaron los menores contenidos de N foliar (Tabla 13).

Tabla 13: Contenido de nitrógeno foliar (%MS) en función de la interacción de los factores: dosis de nitrógeno en la fertilización inicial, aplicación de giberelina (AG<sub>3</sub>) a la caída de pétalos y rayado de ramas a los 15 días posteriores, en las **hojas jóvenes** del cv. Navelate.

hojas jóvenes		Nitrógeno foliar (%MS)			
Nivel de N		N1		N2	
Dosis de AG <sub>3</sub>		0 ppm	50 ppm	0 ppm	50 ppm
Aplicación de rayado	-R	2,55 b	2,42 b	2,70 a	2,33 c
	+R	2,50 b	2,49 b	2,48 b	2,58 b

Fertilización nitrogenada: 11/09 N1: 800g y N2: 1300g de urea por planta. Aplicación de 50 ppm de AG<sub>3</sub> a la caída de pétalos: 01/10. -R: sin rayado; +R: con rayado de ramas a los 15 días posteriores a la caída de pétalos: 15/10. Medias con una letra común no son significativamente diferentes, según test DGC,  $p \leq 0,05$ .

### 5.2.3. Evolución de los parámetros de fluorescencia de la clorofila, en hojas maduras y hojas jóvenes del cv. Navelate

En general, las hojas maduras expresaron un valor medio de rendimiento cuántico del FSII ( $\Phi$ FSII) significativamente superior ( $p < 0,0001$ ) al de las hojas jóvenes (0,67 vs. 0,63, respectivamente). Analizando la evolución de este indicador en el tiempo se observó que estas diferencias fueron significativas ( $p < 0,0001$ ) en las dos primeras semanas de octubre (01/10 y 14/10) y en la fecha del 11/11 ( $p = 0,0295$ ). Posteriormente, no se encontraron diferencias en el rendimiento cuántico entre ambos tipos de hojas (Fig. 13 a). El rendimiento cuántico del FSII de las hojas de la brotación de primavera fue aumentando de una manera lineal desde el inicio de la estación de crecimiento, logrando su valor máximo a fines de octubre, y luego se redujo levemente a principios del mes de noviembre (11/11), para estabilizarse hacia fines del mismo mes. Las hojas maduras mostraron valores relativamente más estables en el período considerado, aunque se observó un leve aumento sostenido en el tiempo con un máximo durante fines de octubre (Fig. 13 a).

En cuanto a la evolución de la eficiencia máxima del FSII, las hojas maduras tuvieron valores promedios de  $F_v/F_m$  significativamente superiores ( $p < 0,0001$ ) en relación a las hojas de la brotación nueva (0,81 vs. 0,79). Estas diferencias fueron obtenidas principalmente en la primera fecha de medición (Fig. 13 b). En las demás fechas no se encontraron diferencias significativas, e incluso en la última semana de octubre los resultados fueron contrarios a los observados previamente (Fig. 13 b).

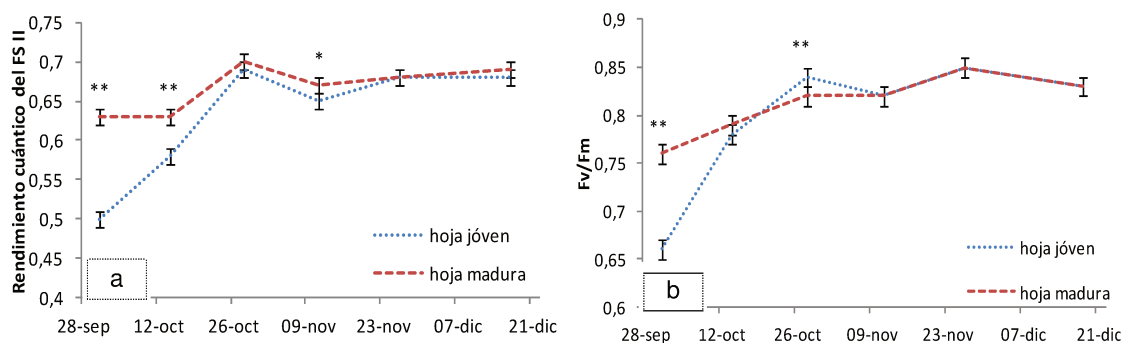


Figura 13. Evolución de los parámetros de fluorescencia de la clorofila: (a) rendimiento cuántico del FSII, (b) eficiencia máxima del FSII ( $F_v/F_m$ ), de las hojas de la nueva brotación y las hojas maduras del cv. Navelate. Las líneas verticales indican el error estándar y los asteriscos simples o dobles (\*; \*\*) expresan diferencias significativas ( $p \leq 0,05$  y  $\leq 0,01$ , respectivamente) entre medias, test LSD.

### **5.2.3.1. Efectos de los factores evaluados sobre los parámetros de fluorescencia de la clorofila**

En cuanto al efecto de los factores analizados (dosis de nitrógeno en la fertilización inicial, aplicación de giberelina a caída de pétalos y el rayado de ramas) sobre los parámetros correspondientes a la fluorescencia de la clorofila ( $\Phi_{FSII}$  y  $Fv/Fm$ ), se presentan los resultados obtenidos de los distintos tipos de hojas de manera particionada (Tabla 14) debido a la influencia del grado de desarrollo sobre estos parámetros, como fue explicado anteriormente (Fig. 13). Además, los parámetros de fluorescencia de la clorofila, de ambos tipos de hojas, fueron significativamente afectados según la fecha de análisis (Tabla 14).

En las hojas maduras, una interacción significativa entre la dosis de nitrógeno de la fertilización inicial y la fecha de medición fue encontrada sobre el rendimiento cuántico del FSII (Tabla 14), a favor de las plantas con la dosis N2 el 01/10 y el 18/12 (Fig. 14 a).

En las hojas jóvenes, el efecto de la aplicación de 50 ppm  $AG_3$  tuvo una interacción significativa con la fecha de observación sobre la eficiencia máxima del FSII ( $Fv/Fm$ ), (Tabla 14), debido a que a los 14 días de la realización del tratamiento hormonal se registró una disminución de este parámetro (Fig. 14 b).

Tabla 14. Efectos del nivel de nitrógeno de la fertilización inicial, aplicación de giberelina a la caída de pétalos y el rayado de ramas, sobre el rendimiento cuántico ( $\Phi$ ) del fotosistema II (FSII), la eficiencia máxima del FSII (Fv/Fm), y valor 'p' del ANAVA, de las hojas maduras y jóvenes del cv. Navelate.

Factor	Nivel	Hojas maduras		Hojas jóvenes	
		$\Phi_{\text{FSII}}$	Fv/Fm	$\Phi_{\text{FSII}}$	Fv/Fm
Nitrógeno	N1	0,66 ns	0,81 ± 0,07	0,62 ± 0,14	0,80 ns
	N2	0,67	0,81 ± 0,07	0,63 ± 0,13	0,80
AG <sub>3</sub>	0 ppm	0,67 ns	0,81 ± 0,07	0,62 ± 0,14	0,80 ns
	50 ppm	0,67	0,81 ± 0,07	0,63 ± 0,13	0,80
Rayado	- R	0,66 ns	0,82 ± 0,06	0,61 ± 0,14	0,80 ns
	+ R	0,67	0,81 ± 0,07	0,63 ± 0,12	0,80
		<b>Valor 'p'</b>			
Nitrógeno (N)		0,2024	0,4460	0,0918	0,2990
AG <sub>3</sub>		0,9885	0,3860	0,1232	0,5957
Rayado (R)		0,2854	0,0236	0,0097	0,4047
Fecha		<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
N x fecha		<b>0,0112</b>	0,3020	0,2406	0,7893
AG <sub>3</sub> x fecha		0,9441	0,2209	0,4163	<b>0,0166</b>
R x fecha		0,1156	0,9342	0,3488	0,4794
N x AG <sub>3</sub>		0,7165	0,0435	0,0615	0,2520
N x R		0,0602	0,9562	0,0292	0,3041
AG <sub>3</sub> x R		0,9137	0,1600	0,6700	0,7715
N x AG <sub>3</sub> x R		0,0645	<b>0,0209</b>	<b>0,0003</b>	0,2008

Fertilización nitrogenada: 11/09, N1: 800g y N2: 1300g de urea por planta. Aplicación de 50 ppm de AG<sub>3</sub> a la caída de pétalos: 01/10. -R sin rayado y +R con rayado de ramas a los 15 días posteriores a la caída de pétalos: 15/10. ns: sin diferencias significativas entre medias, test LSD,  $p \leq 0,05$ .

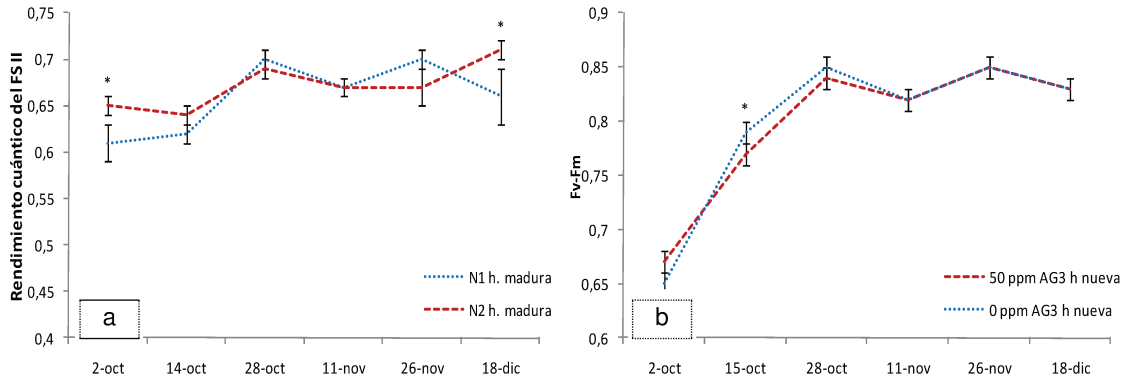


Figura 14. Efecto de la dosis de nitrógeno de la fertilización inicial sobre la evolución de: (a) el rendimiento cuántico del fotosistema II (FSII), en hojas desarrolladas, y (b) efecto de la aplicación de giberelina sobre la eficiencia máxima del FSII (Fv/Fm), de las hojas jóvenes de la nueva brotación, del cv. Navelate. Las líneas verticales representan el error estándar y el asterisco (\*) indica diferencias significativas entre medias, test LSD,  $p \leq 0,05$  y  $\leq 0,01$ . N1: 800g y N2: 1300g de urea por planta, aplicación: 11/09. 50 ppm de AG<sub>3</sub> a la caída de pétalos: 01/10.

En las hojas maduras se observó una interacción significativa entre los efectos de los tres factores evaluados sobre la eficiencia máxima del fotosistema II (Fv/Fm) (Tabla 14). Cuando a las plantas del naranjo ‘Navelate’ se las fertilizó al inicio de la brotación primaveral con la dosis de nivel N1 y no se les aplicó AG<sub>3</sub>, las hojas maduras disminuyeron su relación Fv/Fm, cuando fueron tratadas con el rayado de ramas. Por otro lado, con la dosis correspondiente a N2, a la caída de pétalos se les aplicó 50 ppm de AG<sub>3</sub> y luego tuvieron la aplicación de rayado, presentaron un menor nivel de Fv/Fm de las hojas maduras en comparación a las demás combinaciones entre estos tratamientos (Tabla 15).

Tabla 15: Interacciones entre los efectos de la dosis de nitrógeno en la fertilización inicial, la aplicación de giberelina (AG<sub>3</sub>) a la caída de pétalos y la aplicación de rayado a los 15 días posteriores, sobre la eficiencia máxima del fotosistema II (Fv/Fm) de las **hojas maduras**, de ‘Navelate’.

Hojas maduras		Fv/Fm			
Nivel de N		N1		N2	
Aplicación de rayado		-R	+R	-R	+R
Dosis de AG <sub>3</sub>	0 ppm AG <sub>3</sub>	0,81 a	0,79 b	0,82 a	0,81 a
	50 ppm AG <sub>3</sub>	0,81 a	0,82 a	0,82 a	0,80 b

N1: 800g y N2: 1300g de urea por árbol. -R: sin rayado, +R: con rayado. Fertilización nitrogenada: 11/09, aplicación de AG<sub>3</sub>: 01/10 y rayado de ramas: 15/10. Medias con una letra común no son significativamente diferentes, según test de DGC,  $p \leq 0,05$ .

En las hojas jóvenes, todos los factores aplicados resultaron en una interacción significativa sobre el rendimiento cuántico del FSII ( $\Phi_{\text{FSII}}$ ) (Tabla 14). Cuando a las plantas del naranjo ‘Navelate’ se las fertilizó al inicio de la brotación primaveral con la dosis correspondiente a N1 y no tuvieron aplicación de AG<sub>3</sub>, disminuyeron el rendimiento cuántico del fotosistema II de las hojas jóvenes ante la aplicación de rayado. Sin embargo, cuando tuvieron la aplicación de AG<sub>3</sub>, se observó el efecto contrario al aplicar el rayado (Tabla 16). Por otro lado, cuando a las plantas se les suministró la dosis N2, y a la caída de pétalos no se les aplicó 50 ppm de AG<sub>3</sub> y sin la aplicación de rayado, presentaron un menor nivel de  $\Phi_{\text{FSII}}$  de las hojas jóvenes en comparación a las demás combinaciones entre estos tratamientos (Tabla 16).

Tabla 16: Interacciones entre los efectos de la dosis de nitrógeno (N) en la fertilización inicial, la aplicación de ácido giberélico (AG<sub>3</sub>) a la caída de pétalos y la aplicación de rayado (R) a los 15 días posteriores, sobre el rendimiento cuántico del fotosistema II ( $\Phi_{\text{FSII}}$ ) de las **hojas jóvenes**, de 'Navelate'.

Hojas jóvenes		$\Phi_{\text{FSII}}$			
Nivel de N		N1		N2	
Aplicación de rayado		-R	+R	-R	+R
Dosis de AG <sub>3</sub>	0 ppm AG <sub>3</sub>	0,64 a	0,61 b	0,59 b	0,65 a
	50 ppm AG <sub>3</sub>	0,60 b	0,64 a	0,64 a	0,65 a

N1: 800g y N2: 1300g de urea por árbol. -R: sin rayado, +R: con rayado. Fertilización nitrogenada: 11/09, aplicación de AG<sub>3</sub>: 01/10 y rayado de ramas: 15/10. Medias con una letra común no son significativamente diferentes, según test de DGC,  $p \leq 0,05$ .

#### 5.2.4. Evolución de las variables del intercambio gaseoso del metabolismo fotosintético en las hojas maduras y hojas de la brotación de primavera del cv. Navelate

En general, las hojas jóvenes resultaron en mayores valores de asimilación neta del CO<sub>2</sub> (ACO<sub>2</sub>,  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) en comparación a las hojas maduras ( $p < 0,0001$ ), siendo esta diferencia superior al 40% (8,31  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  vs. 5,89  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Las diferencias fueron observadas en todas las fechas a excepción de la primera (Fig. 15 a). En promedio, ambos tipos de hojas expresaron los mayores niveles de ACO<sub>2</sub> ( $p < 0,0001$ ) a mediados de noviembre (Fig. 15 a).

Además, las hojas jóvenes presentaron una conductancia estomática (Gs) media superior ( $p < 0,0001$ ) a la de las hojas maduras (135,89  $\text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  vs. 95,78  $\text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Esta diferencia se mantuvo en todas las fechas de medición, a excepción de la primera (Fig. 15 b).

En la relación CO<sub>2</sub> interno/CO<sub>2</sub> del aire (Ci/Ca) fueron observadas diferencias significativas ( $p < 0,0001$ ) entre las fechas de evaluación. Los mayores valores se alcanzaron entre fines de octubre y mediados de noviembre (Fig. 15 c). Las hojas jóvenes tuvieron valores superiores en su relación Ci/Ca en comparación a las hojas viejas en la primera fecha

de medición (02/10), mientras que en la última fecha (27/11) ocurrió lo contrario. Ambos tipos de hojas no se diferenciaron en las fechas intermedias (Fig. 15 c).

La tasa de transpiración ( $E$ :  $\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) de las hojas fue incrementándose durante la estación de crecimiento. En cuanto a la comparación entre tipos de hojas, en promedio la tasa de transpiración fue superior ( $p<0,0001$ ) en las hojas jóvenes ( $0,0032$  vs.  $0,0025$   $\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) en todas las fechas evaluadas (Fig. 15 d).

La eficiencia del uso del agua (EUA,  $\mu\text{mol CO}_2/\text{mol H}_2\text{O}$ ) mostró oscilaciones marcadas durante la estación de crecimiento. Al inicio del desarrollo de la brotación las hojas maduras mostraron una eficiencia en el uso del agua superior ( $p<0,0001$ ), aunque a partir de fines de octubre las hojas jóvenes fueron las más eficientes ( $p<0,0001$ ) (Fig. 15 e).

El déficit de presión de vapor (DPV, mb) de las hojas de 'Navelate' presentó un valor superior ( $p<0,0001$ ) en la fecha de medición del 28/10 en comparación a las demás fechas (Fig. 15 f). Las hojas maduras mostraron un DPV superior ( $p<0,0001$ ) en comparación a las hojas de la brotación nueva ( $28,50$  vs.  $26,43$  mb), y este comportamiento fue observado en todas las fechas de medición a excepción de la primera (Fig. 15 f).



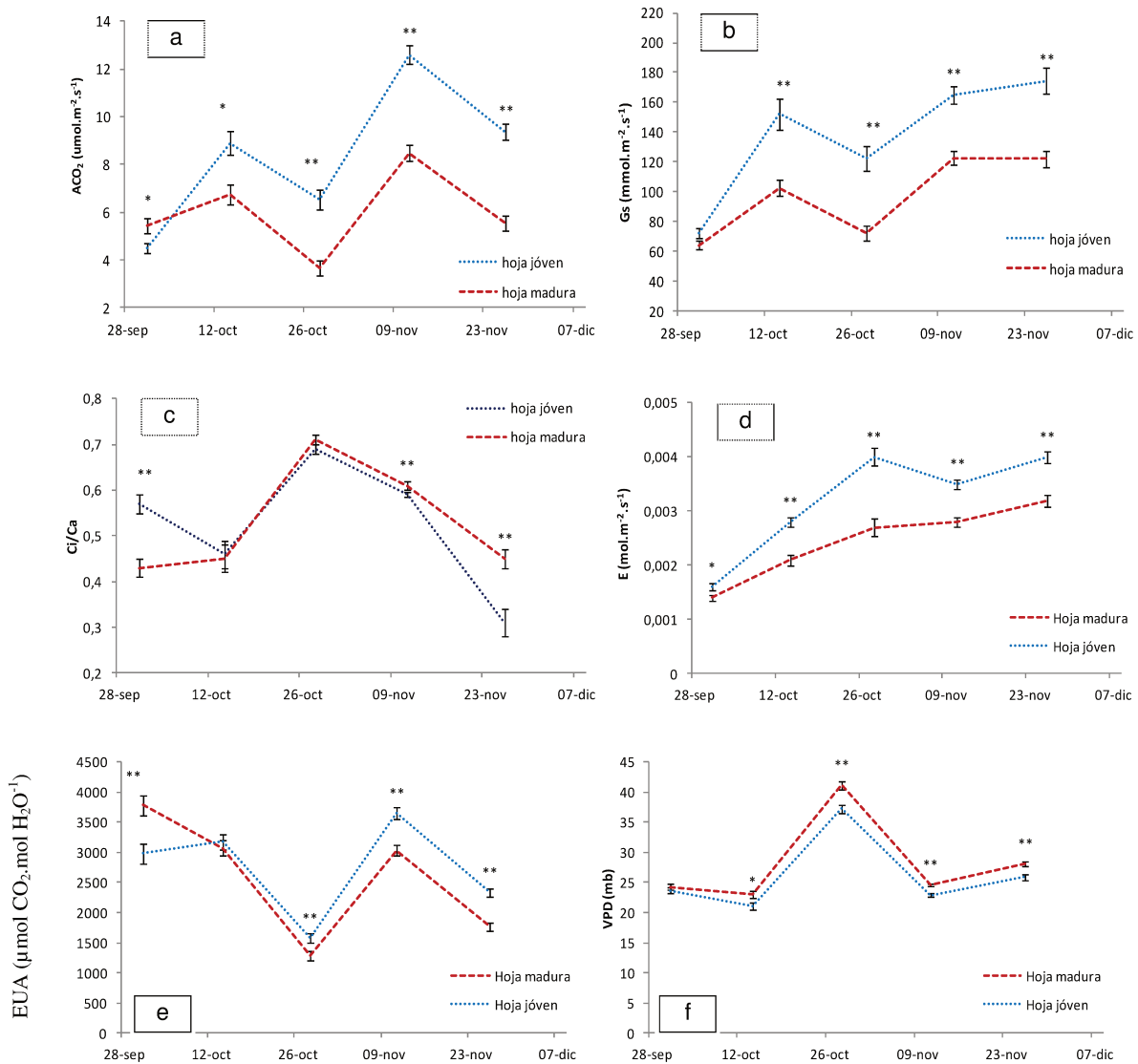


Figura 15. Evolución de: (a) asimilación neta del CO<sub>2</sub> (ACO<sub>2</sub>, μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>), (b) conductancia estomática (Gs, mmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>), (c) relación CO<sub>2</sub> interno/CO<sub>2</sub> del aire (Ci/Ca), (d) tasa de transpiración (E: mol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>), (e) eficiencia del uso del agua (EUA, μmol CO<sub>2</sub>/mol H<sub>2</sub>O) y (f) déficit de presión de vapor (DPV, mb), de hojas maduras y hojas de la brotación de primavera de 'Navelate'. Las líneas verticales indican el error estándar y los asteriscos (\*; \*\*) indican diferencias significativas entre medias ( $p \leq 0,05$  y  $p \leq 0,01$ , respectivamente) entre medias según el test LSD.

#### **5.2.4.1. Efectos de los factores evaluados sobre las variables del intercambio gaseoso del metabolismo fotosintético**

Según lo descrito en el punto 5.2.4, la evolución de los parámetros del metabolismo fotosintético estuvieron influenciados por el grado de madurez de la hoja en que se realizó la medición (Fig. 15), por esta razón el efecto de los tratamientos se analizó de forma separada para cada tipo de hoja (Tablas 17 y 18). Por otro lado, se evidenció un efecto significativo de la fecha de medición sobre esta variable, en ambos tipos de hojas (Tablas 17 y 18). Por lo tanto, a los fines de simplificar el análisis del efecto de los factores estudiados (nitrógeno, giberelina, y rayado) sobre las variables del metabolismo fotosintético, los resultados de la evolución en el tiempo de las medias de los factores principales se detallan en los Anexos 8, 9, 10 y 11.

Los factores aplicados resultaron en interacciones significativas sobre los parámetros del metabolismo fotosintético de ambos tipos de hojas (Tablas 17 y 18).

Tabla 17. Efectos del nivel de nitrógeno de la fertilización inicial (N), la aplicación de giberelina a la caída de pétalos (AG<sub>3</sub>) y el rayado de ramas, sobre la asimilación neta del CO<sub>2</sub> (ACO<sub>2</sub>, μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>), la conductancia estomática (Gs, mmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>), la relación CO<sub>2</sub> interno/CO<sub>2</sub> del aire (Ci/Ca), la tasa de transpiración (E: mmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>), la eficiencia del uso del agua (EUA, μmol CO<sub>2</sub>/mol H<sub>2</sub>O) y el déficit de presión de vapor (DPV, mb), **en hojas maduras** del cv. Navelate y valor 'p' del ANAVA.

Factor	Nivel	ACO <sub>2</sub>	Gs	Ci/Ca	E	EUA	DPV
N	N1	5,52 ± 0,2	91,32 ± 3,4	0,54 ± 0,02	2,4 ns	2479,4 ± 108	28,91 ± 0,6
	N2	6,45 ± 0,3	102,37 ± 3,8	0,51 ± 0,01	2,5	2688,3 ± 98	27,87 ± 0,6
AG <sub>3</sub>	0 ppm	6,17 ± 0,2	100,80 ± 3,6	0,49 ± 0,02	2,5 ± 0,08	2658,0 ± 111	28,23 ± 0,7
	50 ppm	5,79 ± 0,3	92,89 ± 3,6	0,55 ± 0,01	2,4 ± 0,07	2509,6 ± 95	28,55 ± 0,6
Rayado	- R	6,31 ± 0,3	97,45 ± 3,8	0,51 ± 0,01	2,4 ± 0,08	2771,8 ± 110	27,89 ± 0,6
	+ R	5,66 ± 0,2	96,24 ± 3,4	0,53 ± 0,02	2,5 ± 0,07	2395,9 ± 94	28,89 ± 0,6
<b>Valor 'p'</b>							
N		0,0008	0,0096	0,0531	0,1555	0,0231	0,0028
AG <sub>3</sub>		0,1682	0,0627	0,0003	0,1603	0,1057	0,3725
R		0,0195	0,7745	0,4257	0,4878	0,0001	0,0041
Fecha		<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
N x fecha		0,0043	0,0744	<0,0001	0,4205	0,0059	<0,0001
AG <sub>3</sub> x fecha		<0,0001	0,0911	0,0007	0,3198	0,0004	0,0201
R x fecha		0,2272	0,0684	0,9907	0,0141	0,7009	0,2019
N x AG <sub>3</sub>		0,0434	0,1471	0,1344	0,9803	0,0001	<0,0001
N x R		0,9362	0,7129	0,0002	0,5847	0,0756	<0,0001
AG <sub>3</sub> x R		0,5223	0,0275	0,3955	<b>0,0095</b>	0,0456	0,7743
N x AG <sub>3</sub> x R		<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0018</b>	<b>&lt;0,0001</b>	0,3778	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>

Fertilización nitrogenada: 11/09, N1: 800g y N2: 1300g de urea por planta, aplicación de AG<sub>3</sub>: 01/10 y rayado de ramas: 15/10. ns: sin diferencias significativas entre medias, test LSD, p ≤ 0,05.

Tabla 18. Efectos del nivel de nitrógeno en la fertilización inicial (N), la aplicación de giberelina a la caída de pétalos (AG<sub>3</sub>) y el rayado de ramas, sobre la asimilación neta del CO<sub>2</sub> (ACO<sub>2</sub>, μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>), la conductancia estomática (Gs, mmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>), la relación CO<sub>2</sub> interno/CO<sub>2</sub> del aire (Ci/Ca), la tasa de transpiración (E: mmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>), la eficiencia del uso del agua (EUA, μmol CO<sub>2</sub>/mol H<sub>2</sub>O) y el déficit de presión de vapor (DPV, mb), en **hojas jóvenes de la brotación de primavera** de ‘Navelate’ y valor ‘p’ del ANAVA.

Factor	Nivel	ACO <sub>2</sub>	Gs	Ci/Ca	E	EUA	DPV
N	N1	8,52 ± 0,3	146,51 ± 6,1	0,53 ± 0,02	3,3 a	2671,9 ± 91	26,37 ± 0,6
	N2	8,20 ± 0,3	130,63 ± 4,7	0,50 ± 0,02	3,0 b	2767,4 ± 86	26,37 ± 0,6
AG <sub>3</sub>	0 ppm	8,69 ± 0,4	149,18 ± 6,0	0,50 ± 0,02	3,3 ns	2718,0 ± 99	26,01 ± 0,7
	50 ppm	8,09 ± 0,3	127,96 ± 4,8	0,53 ± 0,01	3,1	2721,3 ± 80	26,63 ± 0,5
Rayado	- R	8,73 ± 0,3	143,18 ns	0,52 ± 0,02	3,2 ns	2864,9 ± 99	25,80 ± 0,5
	+ R	8,04 ± 0,3	133,97	0,51 ± 0,02	3,2	2574,3 ± 76	26,85 ± 0,6
<b>Valor ‘p’</b>							
N		0,1904	0,0096	0,0173	<b>0,0038</b>	0,2400	0,7959
AG <sub>3</sub>		0,0383	0,0006	0,1093	0,1301	0,9682	0,0922
R		0,0180	0,1318	0,6617	0,3743	0,0004	0,0042
Fecha		<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
N x fecha		0,0006	0,0072	<0,0001	0,0317	0,0001	0,0001
AG <sub>3</sub> x fecha		0,0006	0,0076	0,0146	0,1539	0,0656	0,0037
R x fecha		<0,0001	<0,0001	0,0088	<0,0001	0,0040	<0,0001
N x AG <sub>3</sub>		0,0077	<b>0,0402</b>	0,0117	0,4486	<0,0001	<0,0001
N x R		0,0057	0,0543	<0,0001	0,0505	0,0286	<0,0001
AG <sub>3</sub> x R		0,0064	0,7566	0,4873	0,7220	0,0002	0,0127
N x AG <sub>3</sub> x R		<b>&lt;0,0001</b>	0,0703	<b>&lt;0,0001</b>	0,1539	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>

Fertilización nitrogenada: 11/09, N1: 800g y N2: 1300g de urea por planta, aplicación de AG<sub>3</sub>: 01/10 y rayado de ramas: 15/10. Letras distintas indican diferencias significativas entre medias de niveles de cada factor, ns: sin diferencias significativas entre medias, test LSD, p ≤ 0,05.

A continuación se describen los efectos de las interacciones entre los tres factores aplicados sobre la asimilación neta del CO<sub>2</sub> (ACO<sub>2</sub>) y el déficit de presión de vapor (DPV), mientras que las interacciones correspondientes a las demás variables del metabolismo fotosintético se presentan en el Anexo 12.

Con respecto a la variable  $ACO_2$ , los mayores valores para las hojas maduras se observaron cuando las plantas se fertilizaron con el nivel N1 sin aplicación de  $AG_3$  ni rayado; mientras que cuando se sometieron a las dosis N2 los mayores niveles de  $ACO_2$  se observaron combinados con 50 ppm, o bien con Rayado de ramas, en comparación a los demás tratamientos (Tabla 19). Por otro lado, en las hojas jóvenes los valores promedios de este parámetro fotosintético fueron más elevados con el nivel de fertilización N1, en la situación control (Tabla 19).

Tabla 19: Interacciones entre los efectos de la dosis de nitrógeno (N) en la fertilización inicial, la aplicación de giberelina ( $AG_3$ ) a la caída de pétalos y de rayado de ramas a los 15 días posteriores (R), sobre la asimilación neta del  $CO_2$  ( $ACO_2$ ,  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) de las hojas maduras y de las hojas jóvenes, del cv. 'Navelate'.

Nivel de N	Asimilación neta del $CO_2$ ( $ACO_2$ , $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ )							
	Hojas maduras				Hojas jóvenes			
	N1		N2		N1		N2	
Rayado	-R	+R	-R	+R	-R	+R	-R	+R
0 ppm $AG_3$	6,85 a	4,81 b	5,19 b	6,75 a	11,12 a	7,24 b	6,92 b	8,49 b
50 ppm $AG_3$	4,81 b	5,29 b	7,60 a	5,47 b	7,49 b	8,26 b	8,55 b	8,02 b

N1: 800g y N2: 1300g de urea por árbol. -R: sin rayado, +R: con rayado. Fertilización nitrogenada: 11/09, aplicación de  $AG_3$ : 01/10 y rayado de ramas: 15/10. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (particionado por tipo de hoja), según test de DGC,  $p \leq 0,05$ .

Con respecto al Déficit de presión de vapor (DPV) de las hojas maduras, resultó que los valores medios de los tratamientos con el nivel N1 de fertilización y 50 ppm de  $AG_3$ , independientemente del Rayado, tuvieron los menores valores; mientras que cuando las plantas tuvieron el nivel N2 de fertilización los menores DPV correspondieron a las combinaciones N2 y  $AG_3$  o bien N2 y Rayado (Tabla 20). En las hojas jóvenes se observaron los menores valores de DPV con las combinaciones N1 control, N1 con  $AG_3$  y con Rayado, N2 y  $AG_3$  y en la combinación N2 con Rayado (Tabla 20).

Tabla 20: Interacciones entre los efectos de la dosis de nitrógeno (N) en la fertilización inicial, la aplicación de giberelina (AG<sub>3</sub>) a la caída de pétalos y de rayado a los 15 días posteriores (R), sobre el Déficit de presión de vapor (DPV, mb) de las hojas maduras y de las hojas jóvenes, del cv. Navelate.

Nivel de N	Déficit de presión de vapor (DPV, mb)							
	Hojas maduras				Hojas jóvenes			
	N1		N2		N1		N2	
Rayado	-R	+R	-R	+R	-R	+R	-R	+R
0 ppm AG <sub>3</sub>	30,98 a	30,98 a	30,98 a	26,40 b	24,52 b	28,70 a	28,70 a	24,52 b
50 ppm AG <sub>3</sub>	26,40 b	26,40 b	26,40 b	30,98 a	28,70 a	24,52 b	24,52 b	28,70 a

N1: 800g y N2: 1300g de urea por árbol. -R: sin rayado, +R: con rayado. Fertilización nitrogenada: 11/09, aplicación de AG<sub>3</sub>: 01/10 y rayado de ramas: 15/10. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (particionado por tipo de hoja), según test de DGC,  $p \leq 0,05$ .

### 5.2.5. Evolución del contenido de carbohidratos no estructurales en hojas maduras, hojas de la brotación de primavera y frutos en fase I

Durante el desarrollo de la brotación, desde el mes de octubre hasta diciembre, el contenido de **glucosa** presentó una interacción significativa ( $p < 0,0001$ ) entre el tipo de órgano analizado y la fecha. En promedio, las hojas de la nueva brotación tuvieron mayores valores medios de glucosa que las hojas maduras (+70%; 24,4 vs. 14,4 mg.g MS<sup>-1</sup>). Las diferencias entre los dos tipos de hojas fueron observadas en todas las fechas, siendo más amplias al inicio de las mediciones (~600%; 15/10), y luego fueron disminuyendo hasta la última fecha (27/11) (Fig. 16 a). El contenido de glucosa de las hojas maduras osciló levemente, entre valores de 13,29 y 8,29 mg.g MS<sup>-1</sup> durante el período analizado. En cambio, en las hojas jóvenes varió de niveles de 60,29 mg.g<sup>-1</sup> MS a 13,13 mg.g<sup>-1</sup> MS (Fig. 16 a). El contenido de glucosa (mg.g MS<sup>-1</sup>) en los frutos se mantuvo relativamente estable desde el inicio de su desarrollo hasta principios de noviembre, a partir de allí tuvo un incremento de aproximadamente cuatro veces su valor inicial (Fig. 16 a).

En cuanto a los niveles de **fructosa** existió una interacción significativa entre los distintos órganos evaluados y la fecha de medición ( $p < 0,0001$ ). Al inicio de las mediciones (15/10) las hojas maduras tuvieron la mayor concentración de este azúcar, a partir de allí su contenido fue en disminución. Las hojas jóvenes contenían el menor valor en la primera fecha, luego alcanzaron un valor máximo el 30/10 y a partir de allí disminuyeron nuevamente su concentración (Fig. 16 b). En los frutos, el contenido de fructosa se fue incrementando gradualmente durante el período de su desarrollo (+75 %), logrando valores superiores a ambos tipos de hojas, durante el mes de noviembre (Fig. 16 b).

De la misma manera, el contenido de **sacarosa** mostró a una interacción significativa entre el órgano en cuestión y la fecha de medición ( $p < 0,0001$ ). El contenido de sacarosa fue superior en las hojas maduras (30,0 mg.g MS<sup>-1</sup>) en relación a las hojas jóvenes (16,2 mg.g MS<sup>-1</sup>) y a los frutos (6,1 mg.g MS<sup>-1</sup>), y esto fue observado en todas las fechas (Fig. 16 c). El contenido de sacarosa en las hojas maduras no varió significativamente a través del tiempo ( $p = 0,4567$ ). Las hojas de la brotación nueva presentaron valores bajos durante octubre y luego triplicaron su valor durante su desarrollo, logrando niveles similares a las hojas maduras recién en la última fecha de observación (Fig. 16 c). Los niveles de sacarosa en los frutos fueron los menores en comparación a los demás carbohidratos, con valores casi nulos hacia el final del período analizado (Fig. 16 c).

En cuanto al contenido de **almidón**, también se observaron interacciones entre los diferentes órganos y la fecha de observación ( $p < 0,0001$ ). En general, las mediciones realizadas durante el mes de octubre arrojaron mayores valores que las del mes de noviembre ( $p < 0,0001$ ) mostrando una tendencia decreciente durante el desarrollo de la brotación primaveral (Fig. 16 d). En promedio, las hojas maduras tuvieron un mayor contenido de almidón ( $p < 0,0001$ ) en comparación a las hojas jóvenes y los frutos en etapa I de desarrollo (83,37; 74,09 y 40,49 mg glucosa.g MS<sup>-1</sup>, respectivamente), diferenciándose principalmente en la primera fecha evaluada (15/10) (Fig. 16 d). Los valores medios de almidón en los frutos fueron los mayores en comparación con los demás carbohidratos, variando entre 38 y 42 mg.g MS<sup>-1</sup> de glucosa durante su desarrollo inicial (Fig. 16 d).

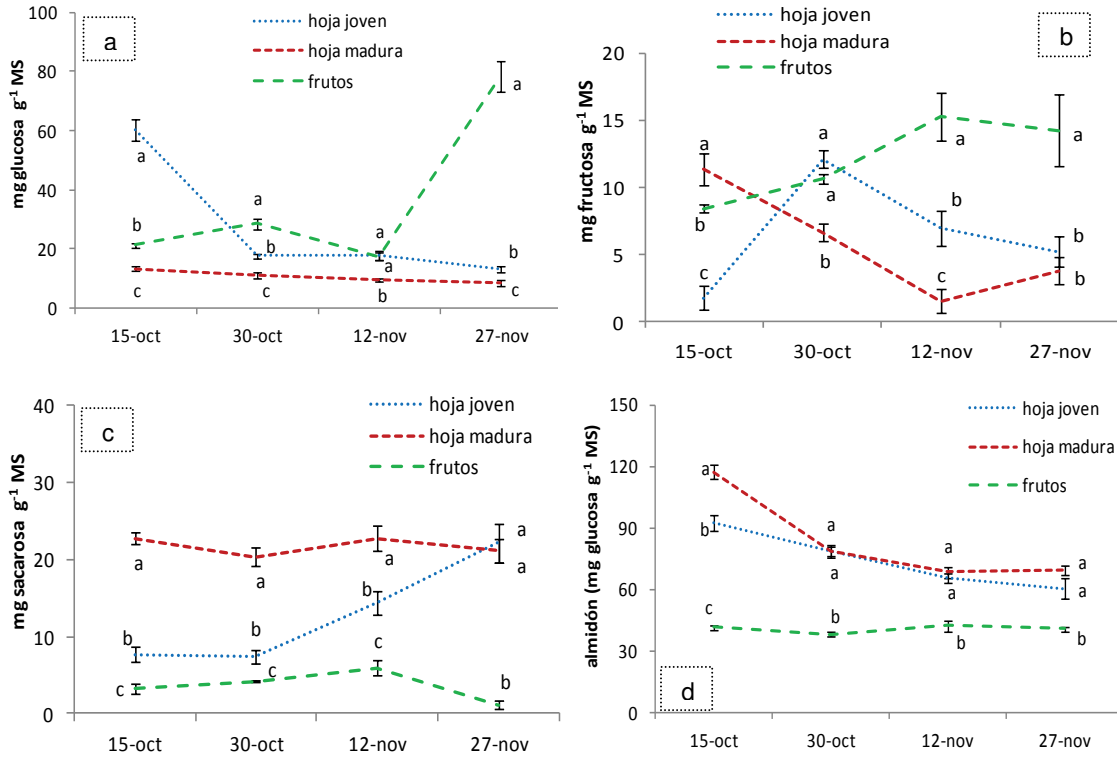


Figura 16. Evolución del contenido de: (a) glucosa ( $\text{mg.g MS}^{-1}$ ), (b) fructosa ( $\text{mg.g MS}^{-1}$ ), (c) sacarosa ( $\text{mg.g MS}^{-1}$ ) y (d) almidón ( $\text{mg glucosa.g MS}^{-1}$ ), en hojas maduras, hojas jóvenes y frutos en la etapa I de desarrollo, del cv. Navelate. Las líneas verticales representan el error estándar y letras diferentes indican diferencias significativas entre medias para cada fecha, test LSD ( $p \leq 0,05$ ).

### 5.2.5.1. Efectos de los factores evaluados sobre el contenido de carbohidratos no estructurales en hojas maduras, hojas jóvenes y frutos en crecimiento

Debido a que la evolución de los diferentes carbohidratos no estructurales fue significativamente diferente en los órganos analizados (Fig. 16), se presenta el efecto de los factores de manera independiente para cada uno de ellos, comenzando con las hojas maduras (Tabla 21), luego las hojas jóvenes de la brotación de primavera (Tabla 22) y por último en los frutos en etapa I de desarrollo (Tabla 26).

#### 5.2.5.1.1. Hojas maduras

Las hojas maduras del naranjo ‘Navelate’ presentaron un contenido de fructosa superior con el nivel N1. Por el contrario, los contenidos de sacarosa y de almidón fueron mayores con el nivel N2 (Tabla 21).



La interacción AG<sub>3</sub> x fecha para el caso del almidón resultó significativa ya que las plantas con la aplicación de AG<sub>3</sub> disminuyeron su nivel de almidón en la fecha 12/11; sin embargo en la última fecha de noviembre fue observado lo contrario (Fig. 17).

El efecto del rayado sobre los contenidos de glucosa, fructosa y sacarosa fue dependiente de la fecha de medición, por lo que hubo interacción significativa entre estos factores (Tabla 21). Las plantas con rayado tuvieron a fines de octubre menores contenidos de glucosa (Fig. 18 a) y de fructosa (Fig. 18 b), pero mayores niveles de sacarosa (Fig. 18 c), en comparación con las plantas sin rayado.

Tabla 21. Efectos del nivel de nitrógeno de la fertilización inicial, la aplicación de giberelina a la caída de pétalos y el rayado de ramas, sobre el contenido de glucosa, fructosa, sacarosa y almidón en **hojas maduras** del cv. Navelate y valor 'p' del ANAVA.

Factor	Nivel	Glucosa (mg.g MS <sup>-1</sup> )	Fructosa (mg.g MS <sup>-1</sup> )	Sacarosa (mg.g MS <sup>-1</sup> )	Almidón (mg gluc.g MS <sup>-1</sup> )
Nitrógeno	N1	10,52 ns	6,92 a	20,33 b	80,69 b
	N2	10,44	4,75 b	23,23 a	86,06 a
AG <sub>3</sub>	0 ppm	11,19 ns	6,71 ns	20,92 ns	83,81 ns
	50 ppm	9,77	4,96	23,23	82,94
Rayado	- R	10,19 ns	6,02 ns	21,58 ns	82,67 ns
	+ R	10,77	5,65	21,98	84,08
<b>Valor 'p'</b>					
Nitrógeno (N)		0,9139	<b>0,0233</b>	<b>0,0294</b>	<b>0,0383</b>
AG <sub>3</sub>		0,0693	0,0654	0,1889	0,7324
Rayado (R)		0,4573	0,6898	0,7623	0,5800
Fecha		0,0001	<0,0001	0,4567	<0,0001
N x fecha		0,2082	0,6171	0,3077	0,4685
AG <sub>3</sub> x fecha		0,7432	0,8434	0,5514	<b>0,0038</b>
R x fecha		<b>0,0018</b>	<b>0,0118</b>	<b>0,0269</b>	0,5851
N x AG <sub>3</sub>		0,9569	0,5350	0,3024	0,3629
N x R		0,3714	0,6898	0,8861	0,7080
AG <sub>3</sub> x R		0,3862	0,4003	0,3489	0,4071
N x AG <sub>3</sub> x R		0,2042	0,2331	0,4744	0,2841

Fertilización nitrogenada: 11/09, N1: 800g y N2: 1300g de urea por planta, 50 ppm AG<sub>3</sub> a la caída de pétalos: 01/10 y rayado de ramas: 15/10. Letras distintas indican diferencias significativas entre medias de niveles de cada factor, test LSD,  $p \leq 0,05$ .

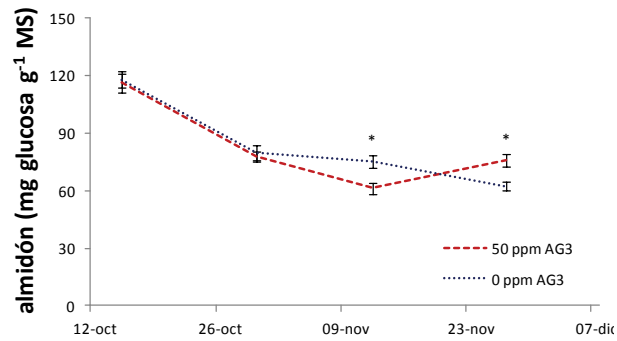


Figura 17. Efecto de la aplicación de giberelina sobre el contenido de almidón ( $\text{mg glucosa.g MS}^{-1}$ ) en **hojas maduras** del cv. Navelate. Las líneas verticales indican el error estándar y el asterisco (\*) indica diferencias significativas entre medias, test LSD ( $p \leq 0,05$ ). Aplicación de 50 ppm de AG<sub>3</sub> el 01/10.

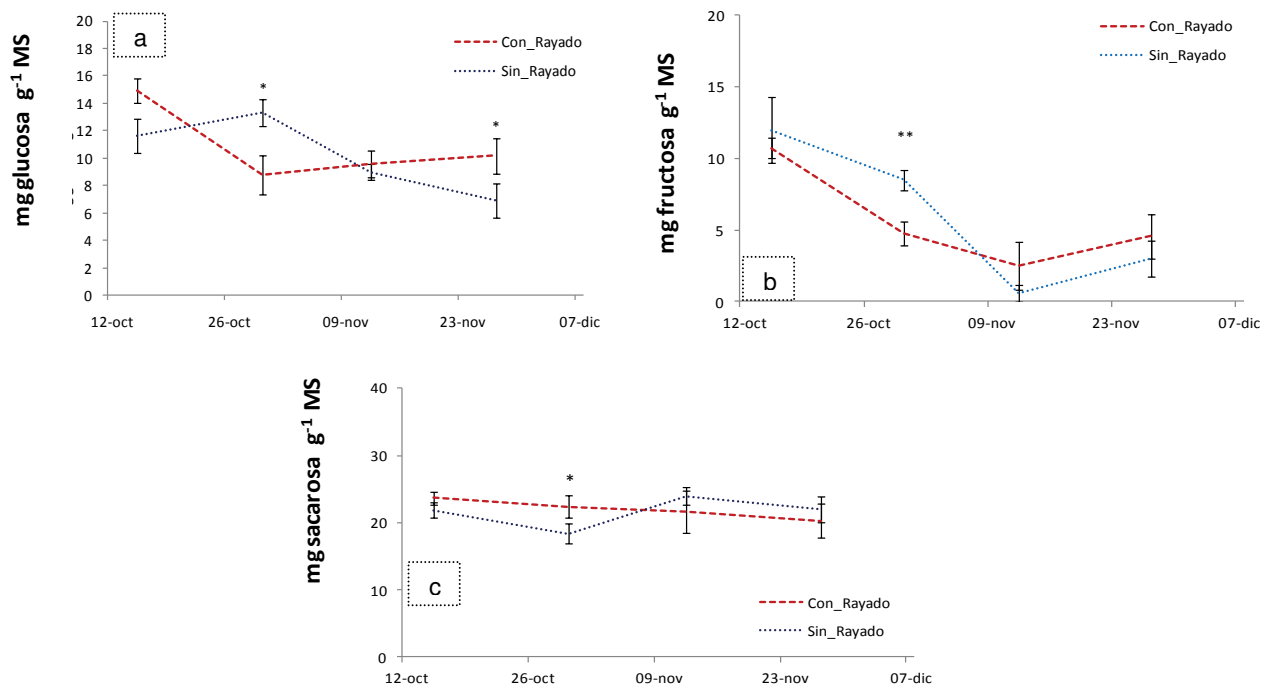


Figura 18. Efecto del rayado de ramas (aplicación 15/10) sobre el contenido de: (a) glucosa ( $\text{mg.g MS}^{-1}$ ); (b) fructosa ( $\text{mg.g MS}^{-1}$ ) y (c) sacarosa ( $\text{mg.g MS}^{-1}$ ) en **hojas maduras** del cv. Navelate. Las líneas verticales indican el error estándar y las medias seguidas de asterisco simple (\*) o doble (\*\*) indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$  y  $\leq 0,01$ , respectivamente), test LSD.

### 5.2.5.1.2. Hojas jóvenes

El contenido de glucosa de las hojas jóvenes se incrementó en respuesta a la aplicación de 50 ppm de AG<sub>3</sub>, que se evidenció a los 15 días posteriores a la realización del tratamiento (Tabla 22). Para las variables fructosa y almidón hubo interacciones significativas entre los tres factores evaluados, mientras que para el caso de la sacarosa la interacción fue entre el nitrógeno y el rayado de ramas (Tabla 22).

El efecto de la fecha de muestreo fue significativo en todos los carbohidratos analizados (Tabla 22). A los fines de simplificar el análisis, los resultados de las interacciones entre fecha y factores principales se detallan en el Anexo 13.

Tabla 22. Efectos del nivel de nitrógeno de la fertilización inicial, aplicación de giberelina a la caída de pétalos y rayado de ramas, sobre el contenido de glucosa, fructosa, sacarosa y almidón en **hojas jóvenes** del cv. Navelate y valor 'p' del ANAVA.

Factor	Nivel	Glucosa (mg.g MS <sup>-1</sup> )	Fructosa (mg.g MS <sup>-1</sup> )	Sacarosa (mg.g MS <sup>-1</sup> )	Almidón (mg gluc.g MS <sup>-1</sup> )
Nitrógeno	N1	26,21 ns	6,27 ± 0,9	15,08 ± 1,6	74,90 ± 2,7
	N2	28,25	6,81 ± 0,8	10,33 ± 1,2	73,27 ± 3,5
AG <sub>3</sub>	0 ppm	25,54 b	6,50 ± 0,9	12,54 ns	77,17 ± 3,5
	50 ppm	28,92 a	6,58 ± 0,9	12,88	71,00 ± 2,6
Rayado	- R	27,21 ns	7,08 ± 0,9	10,92 ± 1,1	73,23 ± 3,6
	+ R	27,25	6,00 ± 0,9	14,50 ± 1,7	74,94 ± 2,6
<b>Valor 'p'</b>					
Nitrógeno (N)		0,2259	0,5726	0,0014	0,5624
AG <sub>3</sub>		<b>0,0472</b>	0,9307	0,8164	0,0303
Rayado (R)		0,9810	0,2606	0,0144	0,5423
fecha		<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
N x fecha		0,0490	0,8036	0,2487	0,1557
AG <sub>3</sub> x fecha		0,0001	0,1665	0,3452	<0,0001
R x fecha		0,0525	0,3280	0,3211	0,0002
N x AG <sub>3</sub>		0,0729	0,7611	0,1070	0,9407
N x R		0,7932	0,0009	<b>0,0144</b>	0,2364
AG <sub>3</sub> x R		0,2646	0,3860	0,6426	0,0003
N x AG <sub>3</sub> x R		0,1132	<b>0,0439</b>	0,3543	<b>0,0042</b>

Fertilización nitrogenada: 11/09, N1: 800g y N2: 1300g de urea por planta, 50 ppm AG<sub>3</sub> a la caída de pétalos: 01/10 y rayado de ramas: 15/10. Letras distintas indican diferencias significativas entre medias de niveles de cada factor, test LSD,  $p \leq 0,05$ .

En el contenido foliar de fructosa, los tres factores aplicados presentaron interacción significativa (Tabla 23). Las plantas que recibieron el nivel N1 y rayado pero no se les aplicó AG<sub>3</sub>, tuvieron menores contenidos foliares de fructosa con respecto a las demás combinaciones de tratamientos (Tabla 23).

Tabla 23: Interacciones entre los efectos de la dosis de nitrógeno (N) en la fertilización inicial, la aplicación de giberelina (AG<sub>3</sub>) a la caída de pétalos y de rayado a los 15 días posteriores (R), sobre el contenido de fructosa (mg.g<sup>-1</sup>MS) de las hojas jóvenes, del cv. Navelate.

Hojas jóvenes		Fructosa (mg.g <sup>-1</sup> MS)			
		N1		N2	
Nivel de N		-R	+R	-R	+R
Aplicación de rayado		-R	+R	-R	+R
Dosis de AG <sub>3</sub>	0 ppm AG <sub>3</sub>	9,67 a	2,50 b	5,25 a	8,58 a
	50 ppm AG <sub>3</sub>	7,25 a	5,67 a	6,17 a	7,25 a

N1: 800g y N2: 1300g de urea por árbol. -R: sin rayado, +R: con rayado. Fertilización nitrogenada: 11/09, aplicación de AG<sub>3</sub>: 01/10 y rayado de ramas: 15/10. Medias con una letra común no son significativamente diferentes, según test de DGC, p≤ 0,05.

Con respecto al contenido foliar de sacarosa, el efecto de los factores nivel de N en la fertilización inicial y rayado de ramas, presentaron interacción significativa (Tabla 24). Cuando a las plantas de 'Navelate' se les suministró la dosis N1, aumentaron su concentración foliar de sacarosa al aplicarle rayado de ramas (Tabla 24). Mientras que, las plantas fertilizadas con la dosis N2, no se diferenciaron en el contenido de sacarosa, ante el suministro del rayado (Tabla 24).

Tabla 24: Contenido de sacarosa ( $\text{mg.g}^{-1}\text{MS}$ ) de las hojas jóvenes, en función de la combinación del efecto de la dosis de nitrógeno (N) en la fertilización inicial y la aplicación de rayado de ramas (R), en 'Navelate'.

Hojas jóvenes		Sacarosa ( $\text{mg gMS}^{-1}$ )	
Aplicación de rayado		-R	+R
Nivel de N	N1	11,50 b	18,67 a
	N2	10,33 b	10,33 b

N1: 800g y N2: 1300g de urea por árbol. -R: sin rayado, +R: con rayado. Fertilización nitrogenada: 11/09 y rayado de ramas: 15/10. Medias con una letra común no son significativamente diferentes, según test de DGC,  $p \leq 0,05$ .

Los tres factores aplicados resultaron en una interacción significativa sobre el contenido foliar de almidón (Tabla 25). Cuando se aplicó el nivel N2, 50 ppm de  $\text{AG}_3$  y sin rayado, presentaron menor nivel de almidón de las hojas jóvenes en comparación a las demás combinaciones de los factores analizados (Tabla 25).

Tabla 25: Interacciones entre los efectos de la dosis de nitrógeno (N) en la fertilización inicial, la aplicación de giberelina ( $\text{AG}_3$ ) a la caída de pétalos y de rayado a los 15 días posteriores (R), sobre el contenido de almidón ( $\text{mg glucosa.g}^{-1}\text{MS}$ ) de las hojas jóvenes, del cv. Navelate.

Hojas jóvenes		Almidón ( $\text{mg glucosa gMS}^{-1}$ )			
Nivel de N		N1		N2	
Aplicación de rayado		-R	+R	-R	+R
Dosis de $\text{AG}_3$	0 ppm $\text{AG}_3$	79,83 a	75,92 a	83,33 a	69,58 a
	50 ppm $\text{AG}_3$	71,58 a	72,25 a	58,17 b	82,00 a

N1: 800g y N2: 1300g de urea por árbol. -R: sin rayado, +R: con rayado. Fertilización nitrogenada: 11/09, aplicación de  $\text{AG}_3$ : 01/10 y rayado de ramas: 15/10. Medias con una letra común no son significativamente diferentes, según test de DGC,  $p \leq 0,05$ .

### 5.2.5.1.3. Frutos en fase I

En cuanto al efecto de los factores aplicados, el rayado de ramas sólo modificó el contenido medio de almidón de los frutos en etapa I, disminuyendo su valor en un 10% promedio (Tabla 26). Además, en las variables glucosa, sacarosa y almidón hubo interacciones significativas entre los factores evaluados (Tabla 26).

El efecto de la fecha de muestreo fue significativo (Tabla 26). A los fines de simplificar el análisis, los resultados significativos de las interacciones entre fecha y factores principales se detallan en el Anexo 13.

Tabla 26. Efectos del nivel de nitrógeno de la fertilización inicial, la aplicación de giberelina a la caída de pétalos y el rayado de ramas, sobre el contenido de glucosa, fructosa, sacarosa y almidón en **frutos en desarrollo (etapa I)**, de 'Navelate', y valor 'p' de las interacciones.

<b>Factor</b>	<b>Nivel</b>	<b>Glucosa</b> (mg.g <sup>-1</sup> MS)	<b>Fructosa</b> (mg.g <sup>-1</sup> MS)	<b>Sacarosa</b> (mg.g <sup>-1</sup> MS)	<b>Almidón</b> (mg gluc.g <sup>-1</sup> MS)
<b>Nitrógeno</b>	<b>N1</b>	37,19 ns	11,60 ns	3,96 ± 0,7	40,33 ± 5,1
	<b>N2</b>	35,44	12,21	3,25 ± 0,4	40,65 ± 10,6
<b>AG<sub>3</sub></b>	<b>0 ppm</b>	33,85 ± 3,3	11,47 ns	3,25 ± 0,4	42,38 ± 9,69
	<b>50 ppm</b>	38,77 ± 4,6	12,34	3,96 ± 0,6	38,60 ± 6,1
<b>Rayado</b>	<b>- R</b>	37,41 ± 3,9	12,23 ns	3,44 ± 0,4	42,63 a
	<b>+ R</b>	35,21 ± 4,1	12,58	3,77 ± 0,6	38,35 b
<b>Valor 'p'</b>					
Nitrógeno (N)		0,4911	0,6627	0,2071	0,8162
AG <sub>3</sub>		0,0292	0,5291	0,2052	0,0062
Rayado (R)		0,3852	0,3308	0,5485	<b>0,0021</b>
fecha		<0,0001	0,0038	<0,0001	0,1918
N x fecha		0,8088	0,3871	0,0005	0,0006
AG <sub>3</sub> x fecha		0,0015	0,0004	0,3435	0,0104
R x fecha		0,7918	0,0667	0,2541	0,0369
N x AG <sub>3</sub>		0,8931	0,4184	0,5992	<b>0,0364</b>
N x R		0,8777	0,2904	0,4539	0,0638
AG <sub>3</sub> x R		<b>0,0444</b>	0,5261	0,0024	0,2731
N x AG <sub>3</sub> x R		0,9071	0,1130	<b>0,0009</b>	0,1134

Fertilización nitrogenada: 11/09, N1: 800g y N2: 1300g de urea por planta, aplicación de 50 ppm AG<sub>3</sub> a la caída de pétalos: 01/10 y rayado de ramas: 15/10. Letras distintas indican diferencias significativas entre medias de niveles de cada factor, ns: no significativo, test LSD,  $p \leq 0,05$ .

El contenido de glucosa de los frutos en etapa I de desarrollo fue afectado por la interacción de los factores AG<sub>3</sub> y Rayado (Tabla 27). Cuando no se aplicó AG<sub>3</sub>, disminuyeron la concentración de glucosa con la aplicación posterior del rayado (Tabla 27).

Tabla 27: Variación del contenido de glucosa (mg g<sup>-1</sup>MS) de los frutos en etapa I de desarrollo, en función de la combinación del efecto de la dosis de giberelina (AG<sub>3</sub>) a la caída de pétalos y la aplicación de rayado de ramas (R), en 'Navelate'.

Frutos en Fase I		Glucosa (mg.g <sup>-1</sup> MS)	
Aplicación de rayado		-R	+R
Dosis de AG <sub>3</sub>	0 ppm	37,54 a	30,17 b
	50 ppm	37,29 a	40,25 a

-R: sin rayado, +R: con rayado. Aplicación de 50 ppm de AG<sub>3</sub>: 01/10 y rayado de ramas: 15/10. Medias con una letra común no son significativamente diferentes, según test de DGC, p≤ 0,05.

Los mayores niveles de sacarosa en los frutos en desarrollo se observaron con la combinación del nivel N1, aplicación de AG<sub>3</sub> y rayado de ramas (Tabla 28).

Tabla 28: Interacciones entre los efectos de la dosis de nitrógeno (N) en la fertilización inicial, la aplicación de giberelina (AG<sub>3</sub>) a la caída de pétalos y el de rayado de ramas a los 15 días posteriores (R), sobre el contenido de sacarosa (mg.g<sup>-1</sup>MS) de los frutos en etapa I de desarrollo, del cv. Navelate.

Frutos en Fase I		Sacarosa (mg.g <sup>-1</sup> MS)			
Nivel de N		N1		N2	
Aplicación de rayado		-R	+R	-R	+R
Dosis de AG <sub>3</sub>	0 ppm AG <sub>3</sub>	4,98 b	2,00 c	3,00 c	3,08 c
	50 ppm AG <sub>3</sub>	2,25 c	6,67 a	3,58 c	3,33 c

N1: 800g y N2: 1300g de urea por árbol. -R: sin rayado, +R: con rayado. Fertilización nitrogenada: 11/09, aplicación de AG<sub>3</sub>: 01/10 y rayado de ramas: 15/10. Medias con una letra común no son significativamente diferentes, según test de DGC, p≤ 0,05.

Se observó una interacción entre los tratamientos nivel de nitrógeno y aplicación de AG<sub>3</sub> que afectó el nivel de almidón de los frutos en fase I (Tabla 29), presentando los mayores contenidos de almidón con el nivel N2, pero sólo cuando no se le aplicó 50 ppm de AG<sub>3</sub> (Tabla 29).

Tabla 29: Contenido de almidón (mg glucosa.g<sup>-1</sup>MS) de frutos en etapa I de desarrollo, en función de la combinación del efecto de la dosis de nitrógeno (N) en la fertilización inicial y la aplicación de giberelina (AG<sub>3</sub>) a la caída de pétalos, en ‘Navelate’.

Frutos en Fase I		Almidón (mg glucosa.g <sup>-1</sup> MS)	
Nivel de N		N1	N2
Dosis de AG <sub>3</sub>	0 ppm AG <sub>3</sub>	40,79 b	43,96 a
	50 ppm AG <sub>3</sub>	39,88 b	37,33 b

N1: 800g y N2: 1300g de urea por árbol Aplicación de 50 ppm de AG<sub>3</sub>: 01/10. Fertilización nitrogenada: 11/09. Medias con una letra común no son significativamente diferentes, según test de DGC,  $p \leq 0,05$ .

### ***5.3. Evaluación del contenido de prolina y malondialdehído, ante la aplicación de prácticas culturales como la fertilización nitrogenada, la aplicación de ácido giberélico y el rayado de ramas***

#### **5.3.1. Evolución del contenido de prolina en hojas maduras, hojas de la brotación de primavera y frutos en desarrollo**

El contenido de prolina fue variable entre los diferentes órganos analizados ( $p < 0,0001$ ) y entre las fechas evaluadas ( $p < 0,0001$ ). Las hojas jóvenes de la brotación primaveral y las hojas maduras no se diferenciaron en el contenido de prolina en sus valores medios (87,17 y 85,61  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  MS, respectivamente). Sin embargo, hubo una interacción significativa entre el tipo de hoja y la fecha de evaluación ( $p < 0,0001$ ). En el inicio de la brotación (15/10), las hojas maduras presentaron un nivel de prolina significativamente superior (+29 %) al de las hojas de la nueva brotación (Fig. 19). Con el desarrollo de las



hojas jóvenes, el contenido de prolina fue en aumento, superando al de las hojas maduras, al final del periodo analizado ( $p < 0,0001$ ) (Fig. 19). El menor contenido de prolina fue medido en los frutos en etapa I de crecimiento, en todas las fechas analizadas, salvo en su etapa inicial de desarrollo, momento en el cual su contenido fue similar al de las hojas nuevas (Fig. 19).

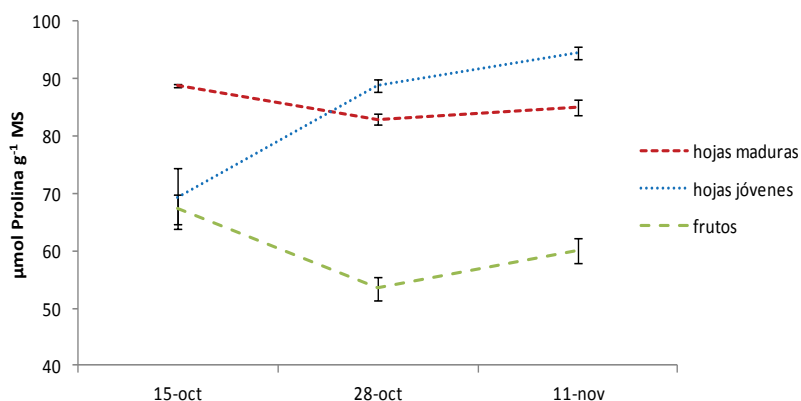


Figura 19. Evolución del contenido de prolina ( $\mu\text{mol g}^{-1}$  MS) en hojas jóvenes, hojas maduras y frutos en etapa I de crecimiento, del cv. Navelate, durante la brotación de primavera. Las líneas verticales indican el error estándar.

### 5.3.1.1. Efectos de los factores evaluados sobre el contenido de prolina en hojas maduras, hojas de la brotación de primavera y frutos en desarrollo

De acuerdo a lo descrito anteriormente (Fig. 19), el efecto de los tratamientos evaluados sobre el contenido del metabolito prolina fue analizado para cada tipo de órgano (hojas maduras, hojas jóvenes de la brotación de primavera y frutos en desarrollo) de manera independiente (Tabla 30). Además, el contenido de prolina de los órganos estudiados fue significativamente afectado según la fecha de observación (Fig. 19). Por lo tanto, a los fines de simplificar el análisis del efecto de los factores estudiados (nitrógeno, giberelina, y rayado) sobre esta variable, los resultados significativos de la interacción entre fecha de medición y factores principales se detallan en el Anexo 14.

Tabla 30. Resultados del ANAVA del efecto de los tratamientos nivel de nitrógeno de la fertilización inicial, aplicación de giberelina y rayado de ramas, sobre la concentración de prolina ( $\mu\text{mol g}^{-1}$  MS), durante el período de crecimiento exponencial de los frutos del cv. Navelate.

Factor		Prolina ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ MS)		
		Hojas maduras	Hojas jóvenes	Frutos
Nitrógeno	N1	86,57 a	86,67 $\pm$ 1,4	59,02 $\pm$ 1,5
	N2	84,67 b	87,47 $\pm$ 1,9	61,56 $\pm$ 2,4
AG <sub>3</sub>	0 ppm	85,83 ns	86,82 $\pm$ 1,4	58,98 ns
	50 ppm	85,39	81,55 $\pm$ 1,9	61,60
Rayado	Sin rayado	85,58 ns	85,00 $\pm$ 2,0	60,28 $\pm$ 2,0
	Con rayado	85,65	83,37 $\pm$ 1,3	60,30 $\pm$ 2,1

	Valor 'p' del ANAVA		
Nitrógeno	<b>0,0036</b>	0,5809	0,0993
AG <sub>3</sub>	0,1723	0,0194	0,7684
Rayado	0,0659	0,3014	0,4766
Fecha	0,0001	<0,0001	<0,0001
Nitrógeno x fecha	0,0101	0,4307	0,0038
AG <sub>3</sub> x fecha	0,1095	0,1053	0,4458
Rayado x fecha	0,5969	0,0025	0,3462
Nitrógeno x AG <sub>3</sub>	0,8977	0,9824	0,2294
Nitrógeno x Rayado	0,2340	0,3062	<b>0,0375</b>
AG <sub>3</sub> x Rayado	0,7669	0,4988	0,4083
Nitrógeno x AG <sub>3</sub> x Rayado	0,6422	<b>0,0185</b>	0,0645

Fertilización nitrogenada: 11/09, N1: 800g y N2: 1300g de urea por planta, aplicación de 50 ppm de AG<sub>3</sub>: 01/10 y rayado de ramas: 15/10. Letras distintas indican diferencias significativas entre medias de niveles de cada factor, ns: no significativo, test LSD,  $p \leq 0,05$ .

En las hojas maduras el contenido de prolina solo fue modificado por el efecto de N, por el cual, el nivel N1 presentó un mayor contenido foliar medio de prolina con respecto al N2 (Tabla 30).

En las hojas jóvenes, todos los factores aplicados resultaron en una interacción significativa sobre el contenido de prolina (Tabla 30). Este resultado se debió a que las hojas jóvenes de las plantas que combinaron el nivel N2 y Rayado de ramas, pero sin aplicación

de AG<sub>3</sub>, presentaron mayores valores de prolina en comparación a los demás tratamientos (Tabla 31).

Tabla 31: Interacciones entre los efectos de la dosis de nitrógeno (N) en la fertilización inicial, la aplicación de giberelina (AG<sub>3</sub>) a la caída de pétalos y de rayado a los 15 días posteriores (R), sobre el contenido de prolina ( $\mu\text{mol g}^{-1}$  MS) de las hojas jóvenes, del cv. Navelate.

Hojas jóvenes		Prolina ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ MS)			
Nivel de N		N1		N2	
Aplicación de rayado		-R	+R	-R	+R
Dosis de AG <sub>3</sub>	0 ppm AG <sub>3</sub>	88,63 b	87,31 b	86,38 b	92,83 a
	50 ppm AG <sub>3</sub>	84,72 b	86,80 b	88,12 b	82,57 b

N1: 800g y N2: 1300g de urea por árbol. -R: sin rayado, +R: con rayado. Fertilización nitrogenada: 11/09, aplicación de AG<sub>3</sub>: 01/10 y rayado de ramas: 15/10. Medias con una letra común no son significativamente diferentes, según test de DGC,  $p \leq 0,05$ .

En los frutos, se observó una interacción significativa entre los efectos del nivel de nitrógeno en la fertilización inicial y el rayado de ramas (Tabla 30), debido a que las plantas que tuvieron el nivel N1 y sin rayado presentaron menores contenidos de prolina en sus frutos en relación a las demás combinaciones entre estos factores (Tabla 32).

Tabla 32: Contenido de prolina ( $\mu\text{mol g}^{-1}$  MS) de los frutos en etapa I, en función de la combinación del efecto de la dosis de nitrógeno (N) en la fertilización inicial y la aplicación de rayado de ramas (R), en 'Navelate'.

Frutos en Fase I		Prolina ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ MS)	
Aplicación de rayado		-R	+R
Nivel de N	N1	56,82 b	61,21 a
	N2	63,73 a	59,39 a

N1: 800g y N2: 1300g de urea por árbol. -R: sin rayado, +R: con rayado. Fertilización nitrogenada: 11/09 y rayado de ramas: 15/10. Medias con una letra común no son significativamente diferentes, según test de DGC,  $p \leq 0,05$ .

### 5.3.2. Evolución del contenido de malondialdehído en hojas de la brotación de primavera y hojas maduras

El análisis estadístico de esta variable reveló que hubo diferencias significativas entre el grado de desarrollo de la hoja ( $p < 0,0001$ ), siendo superior el contenido de malondialdehído (MDA) en las hojas maduras, en comparación con las hojas de la brotación nueva (47,03 vs. 30,11 nmol MDA  $g^{-1}$  MS). En ambos tipos de hojas, el contenido de MDA aumentó significativamente ( $p = 0,0001$ ) en la segunda fecha, con respecto a la primera fecha evaluada (Fig. 20).

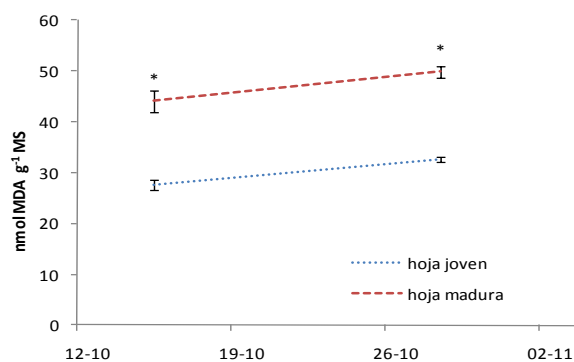


Figura 20. Evolución del contenido de malondialdehído (MDA, nmol  $g^{-1}$  MS) en hojas maduras y hojas de la brotación de primavera del cv. Navelate. Las líneas verticales indican el error estándar y el asterisco (\*) indica diferencias significativas entre medias, test LSD ( $p \leq 0,05$ ).

#### 5.3.2.1. Efectos de los factores evaluados sobre el contenido foliar de malondialdehído

Según lo descrito anteriormente (Fig. 20), el efecto de los factores evaluados sobre el contenido de malondialdehído (MDA) fue analizado para cada tipo de hoja de manera independiente (Tabla 33).

Los factores evaluados (nivel de nitrógeno, aplicación de giberelina y rayado) no tuvieron un efecto significativo sobre la concentración foliar de MDA de las hojas maduras (Tabla 33).

Las hojas jóvenes de la brotación de primavera de las plantas que tuvieron la aplicación de 50 ppm de AG<sub>3</sub> disminuyeron el nivel de MDA con respecto a las no tratadas (con AG<sub>3</sub>: 28,95 vs. sin AG<sub>3</sub>: 31,27 nmol MDA g<sup>-1</sup> MS, respectivamente) (Tabla 33). Debido a la interacción entre este factor y la fecha, se observó que el efecto fue significativo solamente a los 15 días de efectuada la aplicación (Fig. 21).

Tabla 33. Efecto de los tratamientos nivel de nitrógeno de la fertilización inicial, aplicación de giberelina a la caída de pétalos y rayado de ramas, sobre el contenido foliar de malondialdehído (MDA, nmol.g<sup>-1</sup> MS), durante el período de crecimiento inicial de los frutos del cv. Navelate, y resultados de la significancia estadística (valor 'p') del ANAVA.

Contenido foliar de MDA (nmol.g <sup>-1</sup> MS)					
Factor	Nivel	Hojas maduras		Hojas jóvenes	
Nitrógeno	N1	46,79	ns	30,44	ns
	N2	47,26		29,78	
AG <sub>3</sub>	0 ppm	46,99	ns	31,27	a
	50 ppm	47,07		28,95	b
Rayado	Sin rayado	47,30	ns	30,87	ns
	Con rayado	46,76		29,35	
		<b>Valor 'p'</b>			
Nitrógeno		0,8350		0,4200	
AG <sub>3</sub>		0,9703		<b>0,0066</b>	
Rayado		0,8089		0,0662	
Fecha		0,0133		<0,0001	
Fecha x Nitrógeno		0,2204		0,1174	
Fecha x AG <sub>3</sub>		0,2286		<b>0,0001</b>	
Fecha x Rayado		0,5826		0,1589	
Nitrógeno x AG <sub>3</sub>		0,2007		0,2187	
Nitrógeno x Rayado		0,2629		0,3227	
AG <sub>3</sub> x Rayado		0,7803		0,0939	
Nitrógeno x AG <sub>3</sub> x Rayado		0,5710		0,2986	

Fertilización nitrogenada: 11/09, N1: 800g y N2: 1300g de urea por planta, aplicación de 50 ppm de AG<sub>3</sub>: 01/10 y rayado de ramas: 15/10. Letras distintas indican diferencias significativas entre medias de niveles de cada factor, ns: no significativo, test LSD,  $p \leq 0,05$ .

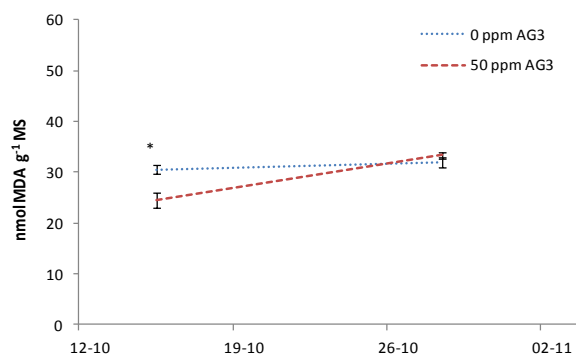


Figura 21. Efecto de la aplicación de giberelina a la caída de pétalos sobre el contenido de malondialdehído (MDA, nmol.g<sup>-1</sup> MS) en las hojas jóvenes de la brotación de primavera, del cv. Navelate. Las líneas verticales indican el error estándar y el asterisco (\*) indica diferencias significativas entre medias, test LSD  $p \leq 0,05$ . Aplicación de 50 ppm de AG<sub>3</sub> el 01/10.

#### ***5.4. Relación entre las variables que intervienen en el balance de carbono en la planta, el estado nutricional y los indicadores de estrés con el cuajado de frutos y la productividad***

##### **5.4.1. Relación entre las variables cuajado de frutos, número de frutos y kg por planta del cv. Navelate**

Según los resultados arrojados por el análisis de correlación de Pearson, la variable ‘cuajado de frutos’, expresado en porcentaje, presentó una correlación positiva de 0,60 y 0,62, con las variables productivas ‘N° de frutos.pl<sup>-1</sup>’ y con ‘Kg.pl<sup>-1</sup>’. Por otro lado, las variables de productividad, N° de frutos.pl<sup>-1</sup> y Kg.pl<sup>-1</sup>, tuvieron una alta correlación positiva (0,96), y significativa entre ellas, durante el ciclo productivo analizado (Tabla 34).

Tabla 34. Coeficiente de correlación de Pearson para las variables de producción del cv Navelate. En la diagonal principal se observan las correlaciones de cada variable con sí misma. Por debajo de la diagonal principal están los coeficientes de correlación, y por encima de la misma se encuentra el valor 'p'.

Correlación de Pearson: Coeficientes/Probabilidades			
	Cuajado final de frutos (%)	Nº frutos.pl <sup>-1</sup>	Kg. pl <sup>-1</sup>
Cuajado de frutos (%)	1,0000	<b>0,0020</b>	<b>0,0013</b>
Nº frutos.pl <sup>-1</sup>	0,5994	1,0000	<b>0,0001</b>
Kg.pl <sup>-1</sup>	0,6176	0,9613	1,0000

El modelo de regresión lineal que representa la respuesta de la producción en Kg.pl<sup>-1</sup> ('y') en función del número de frutos por planta ('x') del cv. Navelate, respondió a la ecuación ' $y = 0,27x$ ' (Fig. 22).

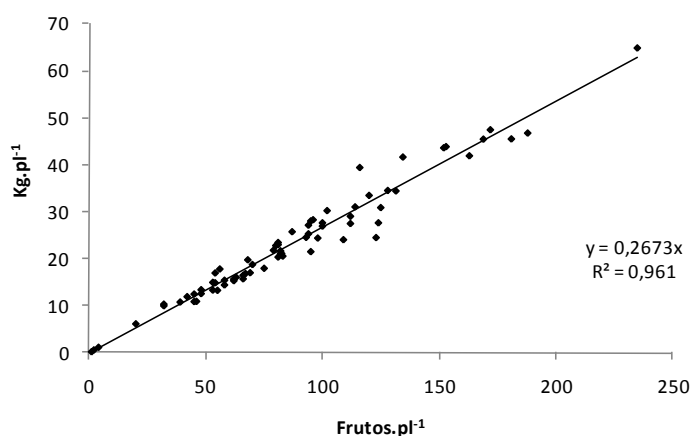


Figura 22. Modelo de regresión lineal simple que representa la relación entre la producción (y: Kg.pl<sup>-1</sup>) y el número de frutos (x: frutos.pl<sup>-1</sup>), correspondiente al cv. Navelate.

Por otro lado, la relación entre el peso de los frutos y el número de frutos por planta no resultó significativa ( $p=0,5857$ ). El peso de los frutos promedio fue de 0,267 kg, con un coeficiente de variación del 10%, siendo los valores mínimos y máximos de 0,200 y 0,341 kg, respectivamente.

#### 5.4.2. Relación entre la ‘tasa relativa de abscisión de frutos’, y los parámetros del metabolismo fotosintético

Las variables que presentaron una correlación estadísticamente significativa con la tasa relativa de cuajado de frutos (TRCF: frutos caídos.árbol<sup>-1</sup>.día<sup>-1</sup>) fueron: %N foliar, Fv/Fm, ACO<sub>2</sub>, Gs, DPV, E y EUA, aunque sus coeficientes fueron débiles (<0,5). Los mayores coeficientes de correlación negativa fueron logrados entre TRCF y ACO<sub>2</sub> (-0,32), mientras que el mayor valor de coeficiente de correlación positiva se observó entre TRCF y DPV (0,23) (Tabla 35).

Tabla 35. Coeficientes de Pearson, resultantes de la relación entre las variables: tasa relativa de caída de frutos (TRCF), y las del metabolismo fotosintético (Fv/Fm, ΦFSII, SPAD, ACO<sub>2</sub>, Gs, DPV, E, EUA y Ci/Ca), en ambos tipos de hojas del cv. Navelate, durante la estación primaveral.

Variables		Coeficientes de Pearson	valor ‘p’
TRCF	SPAD	0,0224	0,5129
TRCF	%N	-0,2268	<b>0,0024</b>
TRCF	Fv/Fm	-0,0704	<b>0,0393</b>
TRCF	ΦFSII	-0,0637	0,0647
TRCF	ACO <sub>2</sub>	-0,3190	<b>&lt;0,0001</b>
TRCF	Gs	-0,2834	<b>&lt;0,0001</b>
TRCF	DPV	0,2323	<b>&lt;0,0001</b>
TRCF	E	-0,1992	<b>&lt;0,0001</b>
TRCF	EUA	-0,1207	<b>0,0016</b>
TRCF	Ci/Ca	0,0164	0,6704

Referencias: tasa relativa de caída de frutos (TRCF), porcentaje de nitrógeno foliar (%N MS), índice SPAD, eficiencia máxima del FSII (Fv/Fm), rendimiento cuántico del FSII (ΦFSII), asimilación neta del CO<sub>2</sub> (ACO<sub>2</sub>), conductancia estomática (Gs), déficit de presión de vapor (DPV), tasa de transpiración (E), eficiencia del uso del agua (EUA, μmol CO<sub>2</sub>/mol H<sub>2</sub>O), y relación CO<sub>2</sub> interno/CO<sub>2</sub> del aire (Ci/Ca).



#### **5.4.3. Relación entre el contenido de nitrógeno foliar, índice de verdor (SPAD) y fluorescencia de la clorofila ( $\Phi$ FSII y Fv/Fm) con las variables de producción**

Los resultados arrojados por el análisis de correlación de Pearson, indicaron una correlación negativa y débil ( $<0,5$ ), entre las variables índice de verdor (SPAD), de ambos tipos de hojas, con el cuajado (%C) de frutos (Tabla 36, Anexo 15). Estos resultados fueron significativos en algunas de las fechas observadas, principalmente durante el mes de octubre. Además, el contenido foliar de nitrógeno de las hojas maduras presentó una relación positiva durante el mes de noviembre con el n° de frutos.pl<sup>-1</sup> y el rendimiento en kg.pl<sup>-1</sup>. En las hojas jóvenes se observaron coeficientes positivos a fines del mes de octubre entre estas variables. Por otro lado, no se encontraron correlaciones significativas entre el índice SPAD y las variables productivas ‘N° de frutos y Kg por planta’ (Tabla 36, Anexo 15).

Las correlaciones significativas entre las variables de producción y los parámetros correspondientes a la fluorescencia de la clorofila ( $\Phi$ FSII y Fv/Fm) también fueron débiles ( $<0,5$ ) y se presentan de manera separada para cada tipo de hoja y fecha evaluada (Tabla 36).

El cuajado de frutos (%C) se correlacionó de manera positiva con el rendimiento cuántico del FSII ( $\Phi$ FSII) de las hojas maduras durante la primera mitad del mes de octubre, y luego en la fecha 17/12. En el caso de las hojas jóvenes, las relaciones entre ambas variables fueron positivas en las fechas intermedias del mes de noviembre y diciembre (Tabla 36).

Las variables ‘N° de frutos’ y ‘Kg por planta’ se correlacionaron positivamente con el  $\Phi$ FSII de las hojas maduras y jóvenes al inicio del mes de octubre, además de la fecha 24/11 en el caso de las hojas jóvenes. Las correlaciones con el parámetro Fv/Fm de las mismas hojas, resultaron significativas en algunas de las fechas observadas (Tabla 36).

Tabla 36. Coeficientes de Pearson significativos, resultantes de las relaciones entre las variables: índice de verdor (SPAD), contenido de nitrógeno foliar (%N MS), fluorescencia de la clorofila ( $\Phi$ FSII y Fv/Fm) con las variables de producción (% cuajado final de frutos, N° frutos.pl<sup>-1</sup> y Kg.pl<sup>-1</sup>), en ambos tipos de hojas del cv. Navelate, durante la estación primaveral.

			Coeficientes de Pearson					
Variables			02-oct	14-oct	28-oct	11-nov	24-nov	17-dic
Hoja	SPAD	% C frutos		-0,22	-0,17			
madura	%N foliar	N° frutos. pl <sup>-1</sup>				0,56	0,18	
		Kg. pl <sup>-1</sup>				0,55	0,26	
		% C frutos	0,20	0,24				0,27
	$\Phi$ FSII	N° frutos. pl <sup>-1</sup>	0,30					
		Kg. pl <sup>-1</sup>	0,19					
Hoja	SPAD	% C frutos			-0,29		-0,29	
joven	%N foliar	N° frutos. pl <sup>-1</sup>			0,43			
		Kg. pl <sup>-1</sup>			0,40			
		% C frutos				0,22		0,40
	$\Phi$ FSII	N° frutos. pl <sup>-1</sup>	0,44				0,29	
		Kg. pl <sup>-1</sup>	0,46				0,32	
	Fv/Fm	N° frutos. pl <sup>-1</sup>		0,13		0,29		
		Kg. pl <sup>-1</sup>			0,28			

Índice de verdor (SPAD), rendimiento cuántico del FSII ( $\Phi$ FSII), eficiencia máxima del FSII (Fv/Fm), porcentaje de cuajado de frutos (%C), contenido de nitrógeno foliar (%N foliar).

Las correlaciones halladas entre los parámetros índice de verdor (SPAD), contenido de nitrógeno foliar y fluorescencia de la clorofila se presentan en el Anexo 16.

#### **5.4.4. Relación entre los parámetros del intercambio gaseoso del metabolismo fotosintético con las variables de producción en ‘Navelate’**

Los parámetros del intercambio gaseoso del metabolismo fotosintético se correlacionaron con las variables nº de frutos y Kg por planta, pero no lo hicieron con el porcentaje de cuajado de frutos. Las correlaciones variaron en función a la fecha de medición y el tipo de hoja. El metabolismo fotosintético que presentaron las plantas durante la primera mitad del mes de octubre, resultó el más importante para explicar el rendimiento. En general, la  $ACO_2$ , Gs y EUA presentaron correlaciones positivas con el rendimiento. Por otro lado, el DPV de ambos tipos de hojas se relacionó de manera negativa con las variables productivas (Tabla 37, Anexo 17). Los coeficientes observados en relación al parámetro ‘E’ fueron positivos a principios de octubre y a final de noviembre. Los coeficientes obtenidos para el parámetro  $C_i/C_a$  y las variables de rendimiento fueron negativos en la primera fecha de medición en las hojas jóvenes, pero en la siguiente fecha se observaron coeficientes positivos en las hojas maduras (Tabla 37, Anexo 17).

Tabla 37. Coeficientes de correlación de Pearson, resultantes de la relación entre los parámetros del intercambio gaseoso del metabolismo fotosintético con las variables productivas, según la fecha y el tipo de órgano evaluado, en el cv. Navelate.

			Coeficientes de Pearson					
Variables			02-oct	14-oct	28-oct	11-nov	24-nov	
Hoja madura	ACO <sub>2</sub>	N° frutos. pl <sup>-1</sup>	0,2391	0,4624				
	(μmol.m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup> )	Kg. pl <sup>-1</sup>		0,4414				
	Gs	N° frutos. pl <sup>-1</sup>	0,3655	0,3997				
	(mmol.m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup> )	Kg. pl <sup>-1</sup>	0,3359	0,4045				
	E	N° frutos. pl <sup>-1</sup>	0,4281				0,3227	
	(mol.m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup> )	Kg. pl <sup>-1</sup>	0,4691				0,3215	
	Ci/Ca	N° frutos. pl <sup>-1</sup>		0,2851				
		Kg. pl <sup>-1</sup>		0,2972				
	EUA	N° frutos. pl <sup>-1</sup>	0,2402	0,3910				
		Kg. pl <sup>-1</sup>		0,3439				
	DPV (mb)	N° frutos. pl <sup>-1</sup>	-0,6407	-0,4610	-0,4238	-0,2525		
		Kg. pl <sup>-1</sup>	-0,6321	-0,4405	-0,3915			
	Hoja joven	ACO <sub>2</sub>	N° frutos. pl <sup>-1</sup>		0,3603		0,2982	
		(μmol.m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup> )	Kg. pl <sup>-1</sup>		0,3517		0,3140	
E		N° frutos. pl <sup>-1</sup>	0,3730				0,4935	
(mol.m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup> )		Kg. pl <sup>-1</sup>	0,4082				0,4993	
Ci/Ca		N° frutos. pl <sup>-1</sup>	-0,2437					
		Kg. pl <sup>-1</sup>	-0,2659					
EUA		N° frutos. pl <sup>-1</sup>		0,3981		0,3625		
		Kg. pl <sup>-1</sup>		0,3110		0,3875		
DPV (mb)		N° frutos. pl <sup>-1</sup>	-0,6281	-0,4209		-0,3008		
		Kg. pl <sup>-1</sup>	-0,6273	-0,4078		-0,2827		

Referencias: asimilación neta del CO<sub>2</sub> (ACO<sub>2</sub>), conductancia estomática (Gs), relación CO<sub>2</sub> interno/CO<sub>2</sub> del aire (Ci/Ca), tasa de transpiración (E), eficiencia del uso del agua (EUA, μmol CO<sub>2</sub>/mol H<sub>2</sub>O) y déficit de presión de vapor (DPV).

Las correlaciones entre los diferentes parámetros resultantes del intercambio gaseoso del metabolismo fotosintético no presentaron variaciones de importancia entre el grado de madurez de la hoja, por ello en la Anexo 18 se presenta una síntesis promedio de las relaciones obtenidas de todo el periodo y de ambos tipos de hojas.

Otras correlaciones entre los parámetros del intercambio gaseoso del metabolismo fotosintético, con las variables índice SPAD, el rendimiento cuántico del FSII ( $\Phi$ FSII) y la eficiencia máxima del FSII (Fv/Fm) resultaron significativas (Anexo 19).

#### **5.4.5. Análisis de los componentes principales entre las variables productivas, índice SPAD, fluorescencia de la clorofila, y parámetros del intercambio gaseoso del metabolismo fotosintético**

A modo de resumen e integración de las relaciones entre las diferentes variables obtenidas en ambos tipos de hojas y los parámetros productivos, con los tratamientos aplicados, se presenta un gráfico biplot (Fig. 23). Sobre la componente principal (CP1), que representa un 42,8% de la variabilidad total, a la derecha se puede observar que las variables que más se relacionaron con la producción, en n° de frutos y kg por planta, fueron rendimiento cuántico del fotosistema II (FSII), eficiencia máxima del FSII (Fv/Fm) y asimilación neta del CO<sub>2</sub> (A). Por el otro lado (hacia la izquierda), la variable que se correlacionó negativamente con la producción fue el déficit de presión de vapor (DPV). Además, se puede visualizar que los tratamientos que más se acercaron a las variables productivas fueron el nivel de fertilización superior combinado con el rayado de ramas (N2:R) y la aplicación del nivel N2 de fertilización combinado con aplicación de 50 ppm de AG<sub>3</sub> (N2:AG<sub>3</sub>). Por el otro lado, el tratamientos más distante a los parámetros de rendimiento fue la menor dosis de nitrógeno combinado con la aplicación de AG<sub>3</sub> (N1:AG<sub>3</sub>) (Fig. 23).

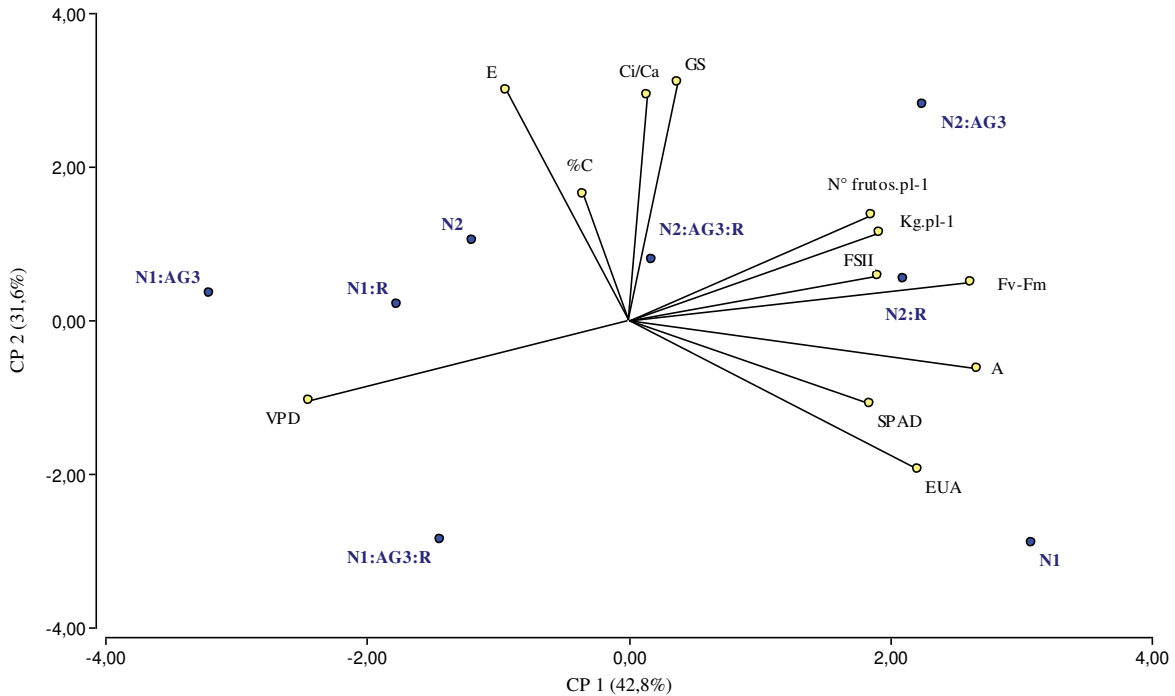


Figura 23: Gráfico Biplot del análisis de los componentes principales entre las variables productivas, índice SPAD, fluorescencia de la clorofila, y parámetros del intercambio gaseoso del metabolismo fotosintético obtenidos de ambos tipos de hojas del cv. Navelate, resultantes de los diferentes tratamientos aplicados. Referencias: asimilación neta del CO<sub>2</sub> (A), conductancia estomática (Gs), relación CO<sub>2</sub> interno/CO<sub>2</sub> del aire (Ci/Ca), tasa de transpiración (E), eficiencia del uso del agua (EUA) y déficit de presión de vapor (DPV), Índice de verdor (SPAD), rendimiento cuántico del FSII (FSII), eficiencia máxima del FSII (Fv-Fm), porcentaje de cuajado de frutos (%C),

#### 5.4.6. Relación entre el contenido de carbohidratos no estructurales con las variables de producción del cv. Navelate

El contenido de carbohidratos solubles (glucosa, fructosa y sacarosa) que presentaron las hojas jóvenes, en algunas fechas de la estación primaveral, resultaron en una correlación significativa y negativa con las variables N° de frutos y Kg por planta (Tabla 38, Anexo 20). En los frutos en fase I se observó, en la primera fecha de análisis (14/10), que el contenido de glucosa presentó una correlación negativa con las variables de rendimiento, lo contrario se observó con el nivel de almidón que resultó en una relación positiva y significativa.

Además, en las siguientes fechas, la glucosa y sacarosa de los frutos se correlacionaron negativamente con los parámetros de producción (Tabla 38, Anexo 20).

En las hojas maduras no se encontraron correlaciones significativas entre el contenido de carbohidratos y las variables de producción.

Tabla 38. Coeficientes de correlación de Pearson, resultantes de la relación entre el contenido de carbohidratos no estructurales de las hojas jóvenes y frutos, con los parámetros de producción, particionados según el tipo de órgano y la fecha de observación.

			Coeficientes de Pearson			
Variables			14-oct	28-oct	11-nov	24-nov
Hoja Joven	Glucosa	N° frutos. pl <sup>-1</sup>	-0,4989			
		Kg. pl <sup>-1</sup>	-0,4885			
	Fructosa	N° frutos. pl <sup>-1</sup>			-0,5371	
		Kg. pl <sup>-1</sup>			-0,5618	
	Sacarosa	N° frutos. pl <sup>-1</sup>	-0,4499			
		Kg. pl <sup>-1</sup>	-0,4420			
Frutos	Glucosa	N° frutos. pl <sup>-1</sup>	-0,4539			-0,4829
		Kg. pl <sup>-1</sup>	-0,4917			-0,4925
	Sacarosa	N° frutos. pl <sup>-1</sup>		-0,4064		
		Kg. pl <sup>-1</sup>		-0,3903		
	Almidón	N° frutos. pl <sup>-1</sup>	0,4072			
		Kg. pl <sup>-1</sup>	0,4266			

En cuanto a las relaciones observadas entre los distintos carbohidratos no estructurales, en todos los órganos analizados, los coeficientes hallados en las diferentes fechas de análisis, se describen en los Anexos 21 y 22.

Otras correlaciones entre los distintos carbohidratos no estructurales con las demás variables fisiológicas medidas (prolina, contenido de N foliar, índice SPAD y Fv/Fm) resultaron significativas y se presentan en los Anexos 23 y 24.

#### 5.4.7. Relación entre los indicadores de estrés (prolina y MDA) con las variables de producción del cv. Navelate

El contenido de prolina de las hojas jóvenes, medido en la fecha del 15 de octubre, donde se observó la TRCF máxima, presentó una correlación positiva y significativa con las variables productivas ‘Nº frutos y Kg por planta’ (Tabla 39). Por otro lado, no se hallaron correlaciones significativas entre las variables productivas y los contenidos de este metabolito en las demás fechas y órganos analizados, como tampoco con el contenido de MDA.

Tabla 39. Coeficiente de correlación de Pearson y valor ‘p’, resultantes de la relación entre el contenido de prolina ( $\mu\text{M.g MS}^{-1}$ ) de las hojas jóvenes, observado en la fecha 15/10 (representativa de TRCF máxima), y las variables productivas nº de frutos.pl<sup>-1</sup> y Kg.pl<sup>-1</sup>.

Tipo de hoja	Variables		Coeficiente de Pearson	valor ‘p’
Hoja joven	prolina	Nº frutos. pl <sup>-1</sup>	0,4171	0,0426
	prolina	Kg. pl <sup>-1</sup>	0,4276	0,0371

Las correlaciones resultantes entre el contenido de prolina, MDA, índice SPAD y contenido de N foliar (%MS), según el tipo de hoja se presentan en el Anexo 25. Además, se describe el modelo de regresión lineal que representó la relación entre el contenido de prolina de las hojas jóvenes con su valor SPAD en el Anexo 26.



#### 5.4.8. Análisis de los componentes principales entre las variables productivas, con el contenido de carbohidratos no estructurales, porcentaje de nitrógeno foliar, e indicadores de estrés

A modo de resumen e integración de las relaciones entre las variables productivas, con el contenido de carbohidratos no estructurales, %N, e indicadores de estrés, se presenta un gráfico biplot (Fig. 24). Sobre la componente principal (CP1), que representa un 41,2% de la variabilidad total, a la derecha se puede observar que las variables que más se relacionaron con la producción, en nº de frutos y kg por planta, fueron los niveles de prolina (Prol), almidón (Alm) y %N. Por el otro lado (hacia la izquierda), la variable que se correlacionó negativamente con la producción fue el contenido de glucosa (Gluc). Los contenidos foliares de sacarosa (Sac), fructosa (Fruct) y MDA formaron un ángulo recto y, por lo tanto, no se evidencia una relación con las variables de producción (Fig. 24).

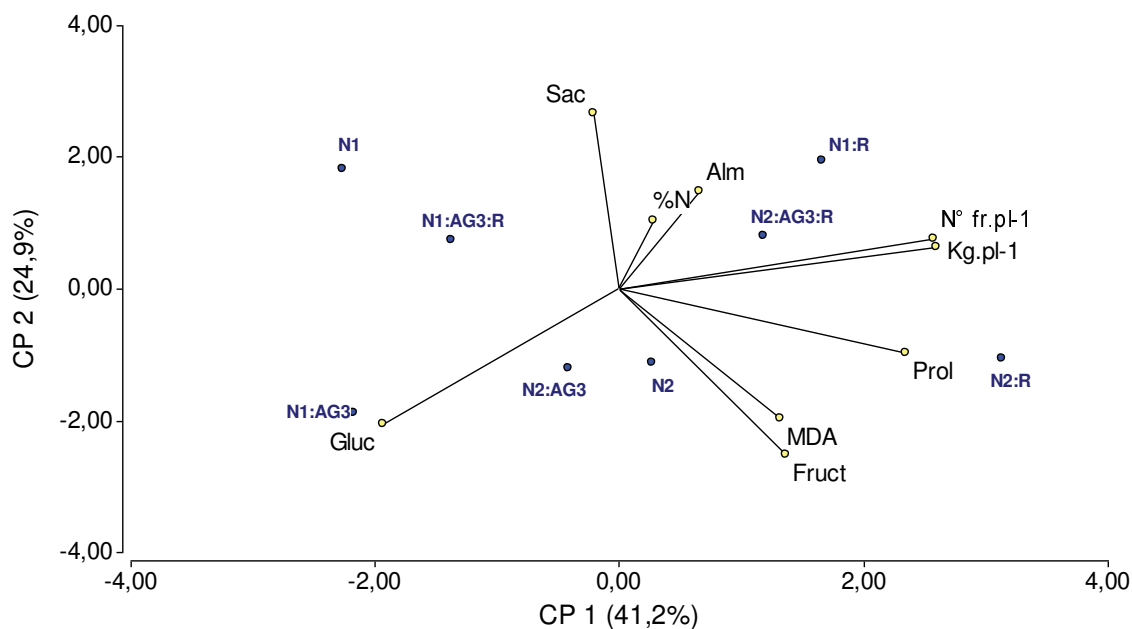


Figura 24: Gráfico Biplot del análisis de los componentes principales utilizando las variables productivas, con el contenido de carbohidratos no estructurales, porcentaje de nitrógeno foliar, e indicadores de estrés, del cv. Navelate, resultantes de los diferentes tratamientos aplicados. Referencias: glucosa (Gluc), fructosa (Fruct), sacarosa (Sac), almidón (Alm), contenido de nitrógeno foliar (%N), prolina (Prol), malondialdehído (MDA).

## 6. DISCUSIÓN

El proceso de abscisión de las estructuras reproductivas de ‘Navelate’ se produjo durante los meses de octubre a diciembre (90 días aproximadamente). Este periodo comprendió desde el estado fenológico de caída de pétalos hasta el final de la etapa I de crecimiento exponencial de los frutos. El patrón de abscisión fue similar a lo observado en el cv. Monte Parnaso, correspondiente al naranjo navel de mayor superficie implantada en la región sur de Brasil - Rio Grande do Sul, en el cual, el 70% de las estructuras reproductivas abscisionaron según un modelo exponencial negativo, hasta los 50 días posteriores al estado de caída de pétalos (50 DPCP) (Koller *et al.*, 2006). En ‘Navelate’, durante el periodo analizado se presentaron dos momentos de máximas tasas de abscisión, a mediados del mes de octubre y a los 30 días siguientes; sin embargo, fue durante el mes de octubre cuando se registraron los mayores valores absolutos de abscisión de estructuras reproductivas. En el primer mes después de la antesis, la abscisión ocurre en la región comprendida entre el pedúnculo y la rama; luego con el crecimiento de los frutos hay un aumento progresivo de abscisión entre el disco floral y el ovario. Algunos investigadores atribuyen la caída inmediata después de la floración de los cítricos a la presencia de deformaciones en el estilo y en el ovario (Ribeiro *et al.*, 2009). Otros, en cambio, adjudican esta caída precoz a los fenómenos de competencia, y que cuanto más intenso son, más precoces son los estados fenológicos en los que se inicia la abscisión (Guardiola *et al.*, 1984). Bermejo *et al.* (2016), estudiaron de forma comparativa el proceso de cuajado de frutos entre cultivares de naranjos con y sin semillas (‘Pineapple’ y ‘Washington’, respectivamente), y observaron que en la primera fase de abscisión de estructuras reproductivas, ocurrida en la transición morfológica del ovario a fruto, la retención de los frutos estuvo en relación al nivel de giberelinas alcanzado por el ovario, la cual fue superior en el cultivar que produce semillas debido al aporte del desarrollo de un embrión que no tienen los cultivares partenocárpico. Mientras que en el cultivar partenocárpico, el crecimiento inicial del fruto en formación estuvo sostenido por el nivel hormonal presente en el pericarpio.

En regiones subtropicales y templadas, se ha relacionado la capacidad de los cítricos para establecer los frutos durante la brotación de primavera con la distribución de los diferentes tipos de brotes que se desarrollan (Agustí *et al.*, 1982b; Rivas *et al.*, 2010; Micheloud *et al.*, 2018). En particular, los brotes florales que poseen hojas mantienen un mayor porcentaje de cuajado de frutos que los brotes de flores sin hojas (Monselise, 1985; Rivas *et al.*, 2010). De esta manera, los resultados finales de la fase de crecimiento exponencial de los frutos (etapa I) en ‘Navelate’, evidenciaron un cuajado de frutos superior en los brotes campaneros (6,92%) y mixtos (1,90%) en comparación a los ramilletes florales (0,43%) y flores solitarias (0,19%). De manera similar, experimentos realizados con ‘Washington’ demostraron que las flores situadas en brotes con hojas presentaron un mayor índice de cuajado y un desarrollo inicial del ovario más rápido, lo que estaría indicando un efecto por los aportes de fotoasimilados en este proceso (Agustí, 2003). Además, las inflorescencias con hojas tienen una mayor producción hormonal, lo que podría explicar la mayor disponibilidad de carbohidratos, mayor fuerza de destino y mejor conexión vascular con el fruto (Davies & Albrigo, 1994).

En las regiones templadas, la brotación de primavera de los *Citrus* es la que determina la producción anual, en la que los procesos de desarrollo vegetativo y reproductivo ocurren simultáneamente. Al inicio de la estación de crecimiento, las hojas jóvenes no tienen desarrollado su aparato fotosintético de manera completa, necesitando de un período de tiempo para madurar, como fue descrito en otras especies frutales como el olivo (Maayan *et al.*, 2008), y del aporte de carbohidratos desde otras partes de la planta (Dovis *et al.*, 2014). Durante el proceso de maduración, a medida que se expanden, incrementando el área foliar y su masa seca, se puede observar el desarrollo de plástidos, la organización de las granas, el aumento de la densidad de las membranas tilacoidales, la síntesis de clorofilas y carotenoides, el desarrollo de estomas, y el aumento del contenido y actividad de ciertas enzimas como la Rubisco (Cai *et al.*, 2005; Mlinarić *et al.*, 2016). Además, el desarrollo foliar implica una alta actividad metabólica, evidenciada por las altas tasas respiratorias, y por lo tanto alta demanda en la síntesis de proteínas, existiendo una correlación positiva entre el contenido de nitrógeno de las hojas jóvenes y la tasa de expansión foliar. Luego, cuando alcanzan su tamaño máximo comienzan a formar la pared celular secundaria lignificada, por lo que el contenido de nitrógeno por unidad de masa seca

es superior en las hojas jóvenes en relación a las hojas maduras (Kursar & Coley, 1991). Esto último fue observado en la comparación del contenido foliar de nitrógeno entre las hojas maduras y las jóvenes de la brotación de primavera del cv. Navelate (2,27 vs. 2,51%N, respectivamente). Por otro lado, en las hojas jóvenes de 'Navelate', los valores de índice verde (SPAD) modelados a partir de los registros a campo evidenciaron una evolución en aumento durante el período septiembre-diciembre conforme al estado de desarrollo. Sin embargo, las hojas maduras, mostraron valores del índice de verdor relativamente estables, pero superiores al de las hojas jóvenes.

En cuanto al estado nutricional de las plantas del cv. Navelate, correspondiente al ciclo anterior a la realización del experimento, el contenido de nitrógeno (2,32% de N de la MS foliar), se ubicó en el límite inferior del rango óptimo (entre bajo y óptimo) (Chapman, 1976); por lo cual era esperable una respuesta favorable a la mayor dosis de fertilización nitrogenada. En el periodo primaveral las hojas maduras presentaron valores medios de 2,27% N, mientras que los valores promedios de las hojas de la nueva brotación alcanzaron valores de 2,51% N al finalizar la estación de crecimiento, encontrándose en el límite entre rango óptimo y bajo (Chapman, 1976). En cuanto al potencial productivo en función del nivel nutricional foliar, trabajos previos realizados sobre naranjo navel 'Newhall', donde evaluaron dosis de nitrógeno y frecuencias de fertirrigación sobre el rendimiento y la calidad de la fruta, observaron que las concentraciones de N foliar para maximizar el rendimiento estuvieron por encima del 2,5% N (Kusakabe *et al.*, 2006). A partir de un análisis de base de datos de Israel de 20 huertos de naranjas 'Shamouti' durante un período de 7 años, concluyeron que para obtener rendimientos máximos de 65 a 70 t ha<sup>-1</sup>, las concentraciones óptimas de nitrógeno foliar, analizando hojas de ramas fructíferas, fueron 1,9% a 2,3% MS. Sin embargo, indicaron que las correlaciones encontradas entre rendimiento y las concentraciones de nutrientes, en experimentos de campo, fueron generalmente débiles, con valores del coeficiente de determinación del modelo ( $R^2$ ) de aproximadamente 0,25 o menos. Este resultado es consecuencia de factores incontrolables como condiciones climáticas, estrés biótico y la fertilidad de los árboles, que cambian de un año a otro y pueden dominar las respuestas a los nutrientes (Raveh, 2013).

Los tratamientos de fertilización al inicio de la brotación con la dosis 1300 g de urea (N2) y de 800 g de urea (N1), contrariamente a lo esperado según nuestra hipótesis propuesta, no se diferenciaron en el contenido de nitrógeno total en ambos tipos de hojas del cv. Navelate. Además, las plantas correspondientes al tratamiento N2 tuvieron registros de índice de verdor en las hojas jóvenes inferiores al tratamiento N1 durante la brotación primaveral (Anexo 6, Fig. 5 b). Las lecturas de índices de verdor de las hojas no siempre se traducen directamente en correlaciones con el contenido de nitrógeno. Por ello, algunos autores (Calabretta *et al.*, 2004) recomiendan utilizar la tecnología SPAD en la época otoñal (marzo-abril HS), donde sí se pueden encontrar correlaciones más consistentes entre el valor SPAD y el contenido de nitrógeno foliar. La falta de relación directa entre las lecturas del medidor del índice de verdor y el contenido de nitrógeno foliar durante el desarrollo primaveral puede deberse al patrón de asignación del nitrógeno de la hoja entre las proteínas solubles (de las cuales los componentes del ciclo de Calvin representan una gran proporción) y los complejos pigmento-proteína / centro de reacción de los tilacoides (de los que depende la absorción de la luz por la clorofila), que varían con el suministro de nitrógeno y el ambiente de luz de la copa del árbol (Jifon *et al.*, 2005). Cuando la correlación entre las lecturas de verdor y el contenido de nitrógeno foliar no es elevada, significa que la mayoría del nitrógeno de la hoja está ubicada en el pool de proteína soluble en relación al de los complejos de centros de reacción de proteínas-pigmentos, ya que las estimaciones no destructivas de clorofila solo determinan la fracción tilacoidal del total de nitrógeno foliar (Kursar & Coley, 1991; Jifon *et al.*, 2005). El pool de proteínas solubles de las hojas jóvenes proviene fundamentalmente de la removilización de las sustancias almacenadas en las hojas viejas (Calabretta *et al.*, 2004), ya que en plantas siempre verdes las hojas constituyen un reservorio de carbohidratos y nitrógeno, que apoyan el crecimiento inicial de la primavera (Arias *et al.*, 2005).

En diferentes cultivos se han intentado relacionar las lecturas SPAD, distintos niveles de fertilización nitrogenada, y el rendimiento (Calabretta *et al.*, 2004; De Souza *et al.*, 2011). En frutilla y manzano también se hallaron resultados inconsistentes entre el índice de verdor y el contenido de nitrógeno foliar (Neilsen *et al.*, 1995). En otro estudio realizado en condiciones de campo sobre el naranjo 'Newhall' injertado sobre *Poncirus trifoliata* se observó que las ramas con las mayores cargas de frutas poseían hojas jóvenes de menor área

y peso seco, y también menores concentraciones de nutrientes como nitrógeno (N), Fósforo (P) y Potasio (K). Esta limitación en el desarrollo y suministro nutricional de las hojas fue consecuencia de la competencia entre los frutos y las hojas adyacentes en desarrollo durante el periodo primaveral (Zhang *et al.*, 2013). En ‘Navelate’ fueron encontradas correlaciones negativas entre el índice de verdor y el porcentaje de cuajado de frutos, independientemente de los tratamientos. Sin embargo, al igual que lo mencionado previamente por otros autores, estos datos tampoco fueron consistentes, ya que el tratamiento con la mayor dosis de fertilización nitrogenada resultó ser el de mayor porcentaje de cuajado y de kg de frutos por planta, sin diferenciarse en el contenido de nitrógeno en hoja, y sin embargo, tuvo el menor valor de índice de verdor de las hojas jóvenes.

En síntesis, el índice de verdor es consecuencia de una compleja relación de factores que modifican la cantidad de nitrógeno fijado en estructuras fotosintéticas, como puede ser la cantidad de nitrógeno aportada, la recirculación de las reservas (Arias *et al.*, 2005), la disponibilidad de carbohidratos para fijar el nitrógeno soluble en las organelas celulares, el crecimiento de los brotes (Kursar & Coley, 1991), la competencia de los frutos (Zhang *et al.*, 2013), la expansión foliar y las prácticas culturales aplicadas (Spaziani-Pereira *et al.*, 2010), entre otros factores. En el presente trabajo, el aumento de la dosis nitrogenada en la fertilización inicial (N2) disminuyó el índice de verdor de las hojas jóvenes, posiblemente por una mayor expansión celular, una mayor competencia con los frutos debido a un aumento del cuajado, a una limitante de carbohidratos para fijar el nitrógeno disponible, o a una combinación de dichos factores.

Las hojas jóvenes en desarrollo poseen menor contenido de clorofilas y de la enzima Rubisco (Mlinarić *et al.*, 2016), por lo que la luz absorbida dirigida hacia las reacciones fotoquímicas es baja en relación a las hojas maduras, permitiendo una adecuada funcionalidad fotosintética, además de la mayor actividad de enzimas antioxidantes como estrategia fotoprotectora. En relación a la actividad fotoquímica, la proporción de fotones absorbidos no aprovechados disminuye con el desarrollo de las hojas. En este sentido, en los resultados observados en el cv. Navelate, al inicio del periodo analizado, las hojas desarrolladas presentaron valores superiores de rendimiento cuántico del FSII ( $\Phi$ FSII) y de eficiencia máxima del FSII ( $F_v/F_m$ ), en relación a las hojas de la brotación de primavera. A

partir de mediados de octubre, ambos tipos de hojas presentaron valores similares de eficiencia fotosintética ( $F_v/F_m$ ), con niveles superiores a 0,75. Comparativamente, en los cvs. Nova y Loretina también se ha encontrado que los parámetros de fluorescencia de la clorofila se mantuvieron relativamente constantes durante todo el período de desarrollo exponencial de los frutos (etapa I) en las hojas maduras (Rivas *et al.*, 2007), con valores en la relación  $F_v/F_m$  entre 0,60 y 0,70. En ‘Navelate’ estos valores se ubicaron entre 0,75 y 0,85, los cuales resultan óptimos para los cítricos (Jifon & Syvertsen, 2003), ya que a partir de 0,75 significa que poseen el FSII completamente funcional, y cercanos a 0,85 representa un valor referente para plantas  $C_3$  sanas y sin estrés (Mlinarić *et al.*, 2016). Además, en estudios realizados sobre el comportamiento de estos parámetros en el naranjo ‘Valencia’, comparando la época invernal con la estival, revelaron una mayor relación  $F_v/F_m$  en la temporada de verano, cuando hubo mayor disponibilidad de energía solar (Ribeiro *et al.*, 2009).

En respuesta a la aplicación de la mayor dosis de N en fertilización inicial (N2) para mejorar el cuajado de los frutos de ‘Navelate’, el comportamiento cuántico del fotosistema II ( $\Phi_{PSII}$ ) de las hojas maduras aumentó significativamente, en concordancia con nuestra hipótesis inicial. Adicionalmente, en ambos tipos de hojas, el  $\Phi_{PSII}$  se correlacionó de manera significativa y positiva con el cuajado de frutos,  $\text{frutos.pl}^{-1}$  y  $\text{kg.pl}^{-1}$ .

La dosis superior de nitrógeno al inicio de la brotación primaveral resultó en un aumento de la retención de frutos en el momento en que fueron observadas las mayores tasas de abscisión (a mediados de octubre y noviembre), en comparación a la aplicación de la menor dosis (N1). Además, el efecto del tratamiento N2 sobre la mayor retención de frutos se expresó tanto en los brotes florales múltiples con hojas (BM) como en los multiflorales sin hojas (RF), los cuales constituyen los destinos más competitivos. Esto se tradujo en un mayor porcentaje final de cuajado de frutos y de producción por planta, tal como se esperaba según la hipótesis planteada. Es sabido que la adecuada nutrición nitrogenada mejora el proceso fotosintético de los cítricos, ya que este elemento es componente importante de las estructuras fotosintéticas, como la clorofila, el complejo de recolección de luz y la Rubisco (Bondada & Syvertsen, 2005; Jifon *et al.*, 2005). Además, la mayor carga de frutos tiene un efecto predominante sobre la tasa fotosintética, y la mayor fertilización nitrogenada favorece el crecimiento de los destinos por lo que se establece una retroalimentación positiva que se

discutirá con más profundidad en el párrafo siguiente. Estos factores en conjunto son evidencias que explican la correlación observada entre el  $\Phi$ PSII,  $ACO_2$  y la  $G_s$  con el rendimiento en situaciones de mayor disponibilidad de nitrógeno (Iglesias *et al.*, 2002; Jifon & Syvertsen, 2003). De acuerdo a los resultados obtenidos, otros autores como Mattos *et al.* (2005), concluyeron que el rendimiento de los árboles cítricos está regulado principalmente por el suplemento de nitrógeno, porque la disponibilidad de este elemento mejora la fotosíntesis, la producción de carbohidratos y el peso específico de las hojas, permitiendo incrementar los rendimientos. Si bien en la experiencia realizada en ‘Navelate’ la fertilización nitrogenada se realizó por única vez al inicio del periodo de brotación primaveral, se debe tener en cuenta que resultados de otras investigaciones, como en ‘Washington’, demostraron que el fraccionamiento del abonado nitrogenado puede incrementar su cosecha, aun cuando en ambos casos (fraccionado o no fraccionado) el contenido foliar en este elemento alcanza los mismos niveles óptimos (Agustí, 2003).

En ‘Navelate’, se observó una correlación negativa entre el contenido foliar de nitrógeno y la tasa relativa de caída de frutos (TRCF), y el número de frutos cuajados fue mayor cuando se fertilizó con altas dosis de nitrógeno al inicio de la estación primaveral. Es sabido que el nitrógeno es fundamental para el crecimiento de los destinos ya que representa el principal componente mineral de los frutos, y a su vez es un componente de las estructuras fotosintéticas, como la clorofila, el complejo de recolección de luz y la enzima Rubisco (Evans & Poorter, 2001). En ‘Navelate’ el porcentaje de nitrógeno foliar se relacionó positivamente a la  $ACO_2$ , y con el nivel de sacarosa y almidón de las hojas jóvenes, como también la carga de frutos y el rendimiento. Por lo tanto, el nitrógeno tiene la particularidad de afectar tanto la actividad fotosintética (actividad de la fuente) como el crecimiento del árbol y el rendimiento de la fruta (actividad de los destinos) (Syvertsen *et al.*, 2003). En consecuencia, su disponibilidad en el período crítico, a partir de mediados de octubre, resulta determinante en el comportamiento agronómico del cultivo. Además, la mayor actividad de la fuente y del destino se retroalimentan positivamente en situaciones de adecuado suministro nitrogenado (Davies & Albrigo, 1994; Syvertsen *et al.*, 2003). En cambio, lo contrario ocurre ante limitaciones en una de ellas. Cuando se reduce la demanda de los productos fotosintéticos por una menor actividad de los destinos, estos se acumulan



en la fuente reduciendo el proceso fotosintético (Iglesias *et al.*, 2002) y en ciertas ocasiones extremas provocando daños en las estructuras fotosintéticas (Bondada & Syvertsen, 2005).

En lo que respecta al grado de desarrollo de las hojas del cv. Navelate, a partir del mes de octubre las hojas jóvenes presentaron valores de  $ACO_2$  superiores al 40% en comparación con las hojas desarrolladas, lo cual puede sugerir una maduración bastante rápida del aparato fotosintético (Cai *et al.*, 2005). En otras especies frutales, tales como manzano (*Malus domestica* L.), aguacate (*Persea americana* Mill.) y el lichi (*Litchi chinensis* Sonn.), también fue observado que la  $ACO_2$  aumentó en relación a la tasa de expansión foliar, acompañado por aumentos en la  $G_s$  y de la eficiencia de carboxilación (Hieke *et al.*, 2002). Los valores máximos de  $ACO_2$  fueron observados posteriormente a mediados de noviembre y se registraron  $12,6$  y  $8,5 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  para las hojas jóvenes y las maduras, respectivamente. Los valores mínimos de este parámetro en las hojas desarrolladas fueron obtenidos en la última semana del mes de octubre ( $3,65 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), lo cual estuvo asociado a registros de temperaturas máximas cercanos a los  $37^\circ\text{C}$  y altos niveles de DPV ambiental (14 mb). Este registro térmico fue mayor al nivel superior del rango de valores óptimos para el desarrollo del cultivo de los cítricos, el cual está entre  $23^\circ\text{C}$  y  $34^\circ\text{C}$ , el máximo valor es  $39^\circ\text{C}$ , y el mínimo de  $13^\circ\text{C}$  (Goldschmidt & Koch, 1996; Pimentel *et al.*, 2007). Esto puede indicar que la  $ACO_2$  estuvo limitada por el cierre estomático, debido a que en ese mismo momento se registraron valores muy bajos de conductancia estomática ( $G_s$ ) y los mayores valores de DPV. Los valores mínimos de  $ACO_2$  en las hojas jóvenes fueron observados durante las primeras mediciones a fines del mes de septiembre, posiblemente como consecuencia del escaso grado de desarrollo del aparato fotosintético (Cai *et al.*, 2005). Además, en esta fecha inicial, las hojas jóvenes tuvieron un mayor nivel de  $C_i$  en comparación a las hojas desarrolladas, lo que podría atribuirse a una alta tasa respiratoria, a una limitante bioquímica en la fijación del  $CO_2$  por parte de la Rubisco, o por ambos motivos, como fue descrito previamente en olivo (Maayan *et al.*, 2008).

Los niveles de  $ACO_2$  registrados en 'Navelate' durante el periodo primaveral, fueron superiores a los reportados por otros autores quienes hallaron valores medios de  $ACO_2$  de  $4,7$  y  $3,0 \mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  en el verano y el invierno, respectivamente, en plantas de naranja 'Valencia' de 1 año de edad (Ribeiro *et al.*, 2009). Además, en el trabajo anteriormente

mencionado, notaron una reducción significativa en Gs al comparar los valores observados a media mañana con los obtenidos en la tarde, lo cual fue atribuido a los mayores valores de DPV. Los cambios diurnos de ACO<sub>2</sub> y Gs sugieren que ambos procesos son dependientes; el alto rendimiento fotosintético en la mañana está soportado por una gran abertura estomática. Esta relación directa entre la asimilación del CO<sub>2</sub> y la conductancia estomática también fue comprobada con los resultados obtenidos en el naranjo ‘Navelate’, con una correlación media significativa cercana al 80% entre ambos parámetros registrados durante toda la estación primaveral. A su vez, ambos parámetros (ACO<sub>2</sub> y Gs) tuvieron una correlación significativa y negativa con el DPV de la cámara subestomática, con coeficientes promedios de -0,50 en ambos casos. La baja conductancia estomática reduce la disponibilidad de CO<sub>2</sub>, provocando una disminución en la ACO<sub>2</sub> (Ribeiro *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2017). El cierre de los estomas en plantas de cítricos fue observado a partir del mediodía (Jifon & Syvertsen, 2003; Ribeiro *et al.*, 2009), cuando el DPV y la temperatura alcanzan sus valores más altos. Éste y otros trabajos demostraron que los altos valores de DPV son la principal causa que promueve el cierre estomático en cítricos durante las horas del mediodía y de la tarde en el verano (Machado *et al.*, 2005), y como fue observado también en otros frutales como manzano, litchi, higuera, y olivo (Hieke *et al.*, 2002; Maayan *et al.*, 2008; Mlinarić *et al.*, 2016). Esto podría explicar la disminución de los valores de ACO<sub>2</sub> y Gs con el aumento de la temperatura del aire y del DPV en las hojas de ‘Navelate’ durante la última semana del mes de octubre cuando se registraron temperaturas de 36,4°C.

Por otro lado, las bajas temperaturas del aire y del suelo son otros factores que reducen la ACO<sub>2</sub> de los cítricos (Ribeiro *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2011). Las plantas cítricas tienen un umbral de temperatura de alrededor de 13°C, con una importante reducción del metabolismo por debajo del mismo (Davies & Albrigo, 1994). Ante estas condiciones, se demora la regeneración de la RuBP provocando la falta de esqueletos carbonados para el proceso de carboxilación (Ribeiro *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2011). Además, las bajas temperaturas retardan la movilización de almidón desde las hojas durante la noche (Hou *et al.*, 2016), lo que podría ejercer un efecto inhibitor (Feed-back) sobre la fotosíntesis (Iglesias *et al.*, 2002; Syvertsen *et al.*, 2003) y un daño físico en el sistema fotosintético (Bondada & Syvertsen, 2005). Por otro lado, las bajas temperaturas reducen la difusión física de los gases en las hojas (Vu, 1999; Santos *et al.*, 2011), y afectan la funcionalidad de

la raíz al aumentar la resistencia hidráulica de la planta (Norisada *et al.*, 2005). En las condiciones del experimento realizado sobre 'Navelate' se registraron temperaturas mínimas inferiores a 13°C durante el mes de septiembre (24 días), y la cantidad de días con bajas temperaturas disminuyeron con el avance de la estación primaveral (8, 4 y 2 días en octubre, noviembre y diciembre, respectivamente). En relación al mes de septiembre, fueron observados los mínimos valores de tasa de transpiración (E) del período analizado, y valores muy bajos de ACO<sub>2</sub> y Gs. Si bien este efecto fue observado en ambos tipos de hojas, fue más pronunciado en las hojas jóvenes. Estas evidencias hacen suponer una limitación metabólica en la actividad fotosintética del cv. Navelate a causa de las bajas temperaturas durante el inicio de la brotación primaveral. Por lo tanto, la competencia inicial de los órganos en crecimiento en condiciones de clima templado presenta el agravante de esta limitación en la capacidad fotosintética, por lo que la removilización del carbono y los minerales tendría mayor importancia en comparación a condiciones de temperaturas nocturnas más elevadas, como ocurre en regiones de clima subtropical de Brasil (Ribeiro & Machado, 2007).

En las plantas de cítricos, los carbohidratos y el nitrógeno son almacenados en las raíces, tallos y hojas durante el invierno, y se movilizan en la próxima primavera para ser utilizados durante el desarrollo de la brotación y floración (Goldschmidt & Koch, 1996). Sin embargo, una vez que los carbohidratos de reserva se agotan por sustentar la demanda energética de los órganos en desarrollo, el cuajado y el crecimiento de los frutos deben ser sostenidos por la actividad fotosintética de ese momento (Syvertsen & Lloyd, 1994; Nebauer *et al.*, 2011). Por lo tanto, una mejora en el proceso fotosintético en esta etapa resultará en una mayor retención de frutos y un aumento de su crecimiento inicial, y consecuentemente en una mejora del rendimiento del cultivo (Iglesias *et al.*, 2003). En el naranjo 'Navelate' la mayor caída de frutos se observó a partir de mediados de octubre, y de allí la correlación positiva encontrada entre los parámetros fotosintéticos en torno a esa fecha y el rendimiento. En general, los parámetros ACO<sub>2</sub>, Gs y EUA presentaron correlaciones positivas con las variables número de frutos y rendimiento por planta. Por otro lado, el DPV medido en ambos tipos de hojas, se relacionó de forma negativa con las variables productivas de 'Navelate'. Según las correlaciones realizadas entre los factores del metabolismo fotosintético y las variables productivas (N° de frutos y Kg.pl<sup>-1</sup>), el período crítico en la

definición del rendimiento del naranjo 'Navelate' se ubicaría durante las primeras dos semanas del mes de octubre, correspondiente con los estados fenológicos de finalización de la caída de pétalos, cuajado inicial de frutos, cuando se observa que el ovario empieza a crecer, hasta frutos verdes rodeados por los sépalos a modo de una corona. De acuerdo a la escala BBCH de los cítricos (Agustí *et al.*, 1995) éstos estarían comprendidos entre los estadíos 69 al 72.

Los principales destinos de los carbohidratos de los cítricos durante la primavera son los órganos en crecimiento, como los frutos, los brotes vegetativos y las raíces, y en menor medida los órganos de almacenamiento. Por otro lado, las hojas maduras constituyen la fuente. Con respecto a la evolución del contenido de carbohidratos (CH) no estructurales en los diferentes órganos del cv. Navelate, los resultados observados apoyaron la hipótesis planteada, dado que las hojas desarrolladas presentaron los mayores niveles de sacarosa y de almidón, y los menores en CH reductores. Sin embargo, en las hojas jóvenes se observaron valores fotosintéticos netos positivos desde inicios del mes de octubre, los cuales continuaron en aumento durante el periodo primaveral, llegando a superar a las hojas maduras a partir de principios de octubre y durante todo el periodo primaveral. Además, en las hojas jóvenes fue observada la presencia de sacarosa desde el inicio del mes de octubre, aunque en niveles bajos, por lo que se debe destacar su rol como fuente de carbono para el crecimiento inicial de los frutos presentes en los brotes campaneros y mixtos, fundamentalmente en el primer periodo de abscisión. Luego, estas hojas en crecimiento, mostraron contenidos similares de almidón al de las hojas desarrolladas hacia fines de octubre, y comenzaron a aumentar su contenido de sacarosa a partir de principios de noviembre, hasta igualar a las hojas maduras hacia finales del mismo mes. Según Goldschmidt & Koch (1996) durante la etapa de cuajado de frutos, entre los días 20 al 25 después de plena floración, las hojas jóvenes pasan una transición de 'destino' a 'fuente'; si bien el desarrollo vegetal es un proceso complejo y depende de las sumas térmicas, entre otros factores. Otras investigaciones indicaron que la transición de sumidero a fuente de asimilados se logra cuando las hojas completan el 80% de su expansión foliar y que este proceso ocurre en 60 días aproximadamente y coincide con la antesis. Además, antes de ser exportadoras, las hojas jóvenes utilizan los carbohidratos para el proceso de respiración y

crecimiento de su propia estructura, según lo descrito para plantas de *Litchi chinensis* (Hieke *et al.*, 2002).

El almidón puede comprender alrededor del 12% de la materia seca foliar (Goldschmidt & Golomb, 1982), acumulándose en los cloroplastos durante el día y agotándose por la noche al ser redistribuido a los órganos en crecimiento. La persistencia de grandes cantidades de almidón en el cloroplasto debido a una baja o nula actividad de los destinos por la falta de nitrógeno causó un gran deterioro físico de la estructura y función del cloroplasto (Bondada & Syvertsen, 2005). En naranjo ‘Hamlin’ de 2 años de edad, se observó que en las plantas deficientes en nitrógeno (N), el contenido de N foliar y la concentración de clorofila total disminuyó significativamente (-88%) debido al daño estructural de los cloroplastos a causa de la acumulación de gránulos de almidón (Bondada & Syvertsen, 2005). Aunque este es el proceso más común, también puede ocurrir lo contrario. En plantas de naranjo ‘Newhall’ se observó que una alta carga de frutos (2 frutos/brote) se correspondió a la menor tasa de fotosíntesis neta ( $ACO_2$ ), en comparación con ramas con menor cantidad de frutos (1 y 0 frutos/brote). Las ramas con más frutos tenían un área foliar y peso seco más reducidos, y también menores concentraciones de Nitrógeno (N), Fósforo (P) y Potasio (K). La reducción de  $ACO_2$  con el aumento exagerado de la carga de frutos en este caso fue causada por un desarrollo foliar limitado y un menor suministro nutricional hacia las hojas (Zhang *et al.*, 2013). Por lo tanto, es importante el mantenimiento de un adecuado equilibrio fuente/destino durante el periodo de definición del cuajado de frutos. En nuestro trabajo, fue observado que el cuajado de frutos del cultivo ocurre en el momento en que las hojas jóvenes en desarrollo están en un proceso de transición, en el que se encuentran aumentando marcadamente su actividad fotosintética. Por lo tanto, cabe preguntarse cómo influyen los factores ambientales, las prácticas culturales, y la relación fuente/destino en el estado de desarrollo con que llegan las hojas de la brotación primaveral al período crítico del cultivo, y su influencia sobre el rendimiento.

De acuerdo a estos resultados, estudios realizados en Santa Fe (Argentina) sobre diferentes cultivares de cítricos, durante el desarrollo de la brotación primaveral se encontró que las hojas maduras tuvieron mayores niveles de carbohidratos solubles (entre 121,7 y 175,9 mg glucosa. g  $MS^{-1}$ ) en comparación a las jóvenes (entre 85,7 y 161,7 mg glucosa.g  $MS^{-1}$ ) (Nescier *et al.*, 2017). Otros investigadores han reportado que las hojas adultas de

cítricos alcanzan un contenido máximo de carbohidratos no estructurales (azúcares solubles y almidón), de alrededor de 275 mg g<sup>-1</sup> justo antes de la brotación de la primavera en condiciones subtropicales, los que se movilizan durante el desarrollo del fruto (Ribeiro & Machado, 2007). En los cítricos, los carbohidratos de reserva son requeridos durante las fases fenológicas de mayor demanda a partir de la floración, ya que es muy elevada en esta especie (Dovis *et al.*, 2014). Desde el comienzo del desarrollo floral hasta la antesis, el crecimiento de una sola flor requiere ≈90 mg de glucosa (Bustan & Goldschmidt, 1998), con necesidad de energía extra para la producción de néctar (Monselise, 1985). En el naranjo ‘Valencia late’ fue observado que en el periodo primaveral las reservas de las hojas, ramas y raíces se remobilizan, y aproximadamente el 80% de los carbohidratos se consumen antes del final de la caída fisiológica de frutos (fin de etapa I). Las raíces son la principal fuente de reservas, aportando alrededor del 75% de los carbohidratos no estructurales durante las etapas de floración y fructificación (Dovis *et al.*, 2014). En otras investigaciones, han observado una intensa removilización de los carbohidratos desde las hojas adultas durante el desarrollo de la brotación primaveral, con un fuerte consumo del almidón almacenado (Monerri *et al.*, 2011; Nescier *et al.*, 2017). En ‘Navelate’ este proceso de removilización de reservas de carbohidratos también fue observado, y como consecuencia de dicho proceso el contenido de reservas de almidón de las hojas desarrolladas disminuyó un 40% desde mediados de octubre hasta fines del mes de noviembre (45 días). Por otro lado, desde mediados de noviembre los frutos fueron aumentando el contenido de carbohidratos reductores, superando ampliamente a ambos tipos de hojas; esto indicaría la actividad de síntesis de estructuras celulares a causa de su elevada tasa de división celular (Hieke *et al.*, 2002).

Las restricciones al crecimiento del fruto por falta de asimilados tienen efectos diferentes según el momento en que se producen. Investigaciones desarrolladas por Mehouchi *et al.* (1995) en *Citrus unshiu* demostraron que las defoliaciones durante la primera fase de crecimiento del fruto reducen su contenido de hidratos de carbono, teniendo como consecuencia restricciones en el crecimiento y abscisiones masivas de las estructuras reproductivas. Si en cambio la defoliación se realiza 40 días antes de la antesis, como se demostró que el paso de flor a fruto en la especie *Citrus clementina* cv. Marisol, puede suceder a costa del almidón acumulado en el ovario durante la ontogénesis de la flor, aunque

posteriormente los frutos caen (Mesejo *et al.*, 2019). Por ello, la presencia de hojas es más importante cuando se inicia la fase de crecimiento rápido. Aparentemente, en esta etapa ante situaciones de desbalance nutricional se desencadena un mecanismo de autorregulación que ajusta la carga de frutos a la disponibilidad de carbono (Guardiola & García-Luís, 2000). En cambio, luego de superada la etapa de caída fisiológica, si bien la insuficiencia de carbono detiene el desarrollo de los frutos no inducen a la abscisión de éstos sino a una reducción de su tamaño final (Mehouachi *et al.*, 1995; Iglesias *et al.*, 2003).

En estudios realizados en Santa Fe (Argentina) encontraron que los cultivares de cítricos que presentaron un mayor contenido de almidón foliar en las hojas maduras al inicio de la brotación en el mes de septiembre se relacionaron con un mayor porcentaje de cuajado final de frutos (Nescier *et al.*, 2017). En este sentido, los resultados obtenidos en ‘Navelate’ arrojaron que el nivel de almidón de las hojas jóvenes y de los frutos, en etapas tempranas de desarrollo (mediados del mes de octubre) tuvo una correlación positiva con el número de frutos y la producción por planta. Sin embargo, los niveles de glucosa y sacarosa de estas hojas se relacionaron negativamente con los parámetros de rendimiento por planta. Estos resultados evidencian que para que se observe una menor abscisión de estructuras reproductivas, las hojas jóvenes no sólo deben presentar una alta capacidad fotosintética, sino que además, los azúcares producidos deben movilizarse rápidamente hacia los destinos. La explicación a este fenómeno se debe a que el aumento de carbohidratos solubles foliares tiene un efecto negativo sobre la fotosíntesis (efecto feed-back) (Iglesias *et al.*, 2003). Para que los azúcares puedan movilizarse hacia los frutos, éstos deben presentar una alta tasa metabólica originada por la elevada tasa de división celular, y si bien previo a la caída fisiológica de los frutos estos están en excesos y demandan una gran cantidad de asimilados, la elevada competencia entre ellos podría afectar temporariamente su capacidad de crecimiento, y ser la causa de su abscisión (Nebauer *et al.*, 2011). El aumento transitorio en los niveles de carbohidratos al inicio de la abscisión de los frutos observado en ‘Valencia late’ (Dovis *et al.*, 2014), y las correlaciones negativas entre los niveles de carbohidratos solubles y el rendimiento encontradas en ‘Navelate’ durante el período de mayor caída de frutos podría tener su explicación en este fenómeno. Una disminución temporaria de la actividad de los destinos como consecuencia de la competencia entre ellos, podría ser la causa, o al menos uno de los factores que provoque el aumento en los niveles de

carbohidratos solubles en las hojas jóvenes, y posteriormente la caída masiva de frutos (Guardiola & García-Luís, 2000). Por otro lado, la comprensión metabólica del efecto de las técnicas aplicadas para mejorar el cuajado de los frutos debe contemplar este efecto y no solamente el balance nutricional. Igualmente, debe considerarse este efecto para analizar el impacto de los factores abióticos que puedan generar situaciones de estrés en este momento crítico del cultivo.

Para cada cultivar y ambiente, existe un número límite de frutos por planta, por debajo del cual el tamaño es influenciado por el número, pero por encima de éste, el tamaño resulta ser independiente de la carga de frutos (Agustí, 2003). Por ello, el desarrollo de investigaciones en las condiciones locales es de gran importancia para el sector productivo. En el experimento realizado con 'Navelate', la relación entre el peso de los frutos y el número de frutos por planta no resultó significativa, sin embargo, la relación entre el número de frutos y el rendimiento por planta fue significativamente lineal, lo que indicaría que, en las condiciones de cultivo evaluadas, el potencial productivo se puede incrementar con la aplicación de prácticas de manejo agronómico que mejoren el cuajado de frutos, y sin afectar la calidad.

Con respecto a las técnicas de estímulo al cuajado de frutos, como la aplicación de AG<sub>3</sub> a la caída de pétalos y el rayado de ramas, en plantas de naranjo con bajo índice partenocárpico, no son efectivas cuando la competencia entre las estructuras reproductivas es muy elevada, como ocurre en situaciones de alta intensidad de floración (Agustí *et al.*, 1982a; Agustí *et al.*, 2003b; Gravina *et al.*, 2004). Cuando la intensidad de floración resulta muy elevada, se establece una competencia entre los órganos en desarrollo durante la brotación primaveral (hojas, flores, frutos), y en la que la planta se ve limitada en nutrir a los ovarios que inician su crecimiento, los cuales se desprenden del árbol (Agustí *et al.*, 1982b; Mehouchi *et al.*, 1995). En esta investigación, las plantas fueron seleccionadas por presentar una intensidad de floración media (72,42 flores.100 nudos<sup>-1</sup>) por lo que contaron con una adecuada relación de brotes generativos con y sin hojas, lo cual no resultaría limitante para la expresión de los efectos de las técnicas aplicadas para el estímulo al cuajado de los frutos.



En el caso del naranjo 'Navelate', la aplicación de giberelinas presentó resultados muy dispares sobre el cuajado de frutos y el rendimiento de acuerdo con la disponibilidad de nitrógeno y la combinación con el rayado de ramas. Es común que la aplicación de hormonas durante la antesis disminuya la abscisión durante el desarrollo inicial de los frutos (Talon *et al.*, 1999). Agustí *et al.* (1982a) encontraron una respuesta limitada al ácido giberélico aplicado entre 5 y 20 mg l<sup>-1</sup> cuando el 80% de las flores habían perdido los pétalos. También en estos experimentos la aplicación de AG<sub>3</sub> consiguió retrasar la abscisión de frutos, pero no tuvo ningún efecto sobre la cosecha. Sólo cuando la aplicación de 5 mg l<sup>-1</sup> fue seguida de un rayado de ramas 10 días después, consiguieron una respuesta positiva con un incremento de ésta del orden del 12% respecto de los árboles sin tratar. Reguladores del crecimiento como las citoquininas (benzyladenina, BA) fueron evaluados a través de tratamientos aplicados a los ovarios del tangor 'Washington Murcott' durante la floración, observando un aumento de la división celular (Ferrer *et al.*, 2017). Esto también fue comprobado en otras especies como en mandarinas 'Satsuma' (Guardiola *et al.*, 1993). En el naranjo 'Navelate' el efecto de la aplicación de 50 ppm de AG<sub>3</sub> a la caída de pétalos (01/10) provocó un retraso en la tasa de abscisión de las estructuras reproductivas, principalmente en los brotes mixtos. Sin embargo, no se logró una mejora significativa en el porcentaje de cuajado de frutos al final de esta etapa, como tampoco en el rendimiento en comparación al control, contrariamente a lo esperado según la hipótesis inicial. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Agustí *et al.* (1982a). De acuerdo con nuestras observaciones, otras pruebas en macadamia (*Macadamia integrifolia* Maiden & Betche) con aplicación de BA resultaron en un efecto temporal en la retención de las estructuras reproductivas al retrasar la abscisión, pero sin modificar el número final de frutos (Trueman, 2010). En otro experimento, la aplicación de AG<sub>3</sub> no tuvo efecto en los parámetros de crecimiento de la lima ácida 'Tahití' en concentraciones que variaron de 20 a 75 mg l<sup>-1</sup> (Spaziani-Pereira *et al.*, 2010), demostrando que la ausencia de respuesta posiblemente no sea debido a las dosis usadas, sino a que la utilización de reguladores de crecimiento debe estar acompañada por una mejora en el nivel nutricional, lo cual se discute en los próximos párrafos. El hecho de que esta lima sea triploide puede ser también un condicionante a la falta de respuesta a las aplicaciones de AG<sub>3</sub>. Por otro lado, tratamientos efectivos de aplicación exógena de AG sobre la producción han sido comprobados a través de distintos cultivares de cítricos, por

ejemplo en mandarinos ‘Clementina’ (Talón 1997; Talón *et al.*, 1990; 1999; Guardiola *et al.*, 1993; Mesejo *et al.*, 2013; 2016). Recientemente, se han demostrado las relaciones entre el metabolismo de las giberelinas y el cuajado de frutos en cítricos (Bermejo *et al.*, 2016; Mesejo *et al.*, 2016), así como el papel de las auxinas en el proceso (Bermejo *et al.*, 2018).

Las fitohormonas actúan a través de una cadena de señales que conducen a cambios en el transporte de solutos, el metabolismo celular y la expresión génica, que favorecen la descarga de fotoasimilados del floema hacia los destinos aumentando su capacidad de crecimiento, por ejemplo la invertasa ácida participa en la hidrólisis de la molécula de sacarosa (Nebauer *et al.*, 2011). En ‘Navelate’, la aplicación de AG<sub>3</sub> evidenció un aumento de la actividad sumidero del fruto, cuando fue complementado con rayado de ramas, ya que los frutos tuvieron mayores niveles de carbohidratos reductores y sacarosa. En estudios realizados sobre toronja (*Citrus paradisi* Macf) encontraron que el nivel más alto de actividad de invertasa ácida ocurre en el albedo (componente del pericarpio) durante la primera etapa de crecimiento, acompañado por altos niveles de azúcares reductores que pueden ser utilizados en la respiración y en la síntesis de componentes celulares. Una relación positiva entre el nivel de invertasa ácida y la tasa de división celular también fue observada en otro experimento con cítricos (Lowell *et al.*, 1989). Estos hallazgos estarían indicando que el estímulo al crecimiento de los frutos debe acompañarse por un adecuado aporte nutricional por parte de la fuente y capacidad de consumo de parte de los destinos. Por ello, en muchas investigaciones sobre cítricos, la mejora del cuajado de frutos sólo es posible con el complemento del rayado de ramas posterior a la aplicación de los tratamientos con AG<sub>3</sub> (Agustí *et al.*, 1982a; Koller *et al.*, 2006; Mehouchi *et al.*, 2009). Por lo tanto, cuando existen limitaciones nutricionales, no es posible sostener en el tiempo el crecimiento de los órganos hormonalmente estimulados, los cuales finalizan abscisionando. En los resultados obtenidos en ‘Navelate’, con respecto a la aplicación de 50 mg.l<sup>-1</sup> de AG<sub>3</sub> a la caída de pétalos, un retardo en la tasa de abscisión de las estructuras reproductivas fue observado en los brotes mixtos, que poseen una mayor capacidad de cuajado debido al aporte nutricional de las hojas en desarrollo.

Con respecto al número de frutos por planta, cuando se aplicó el tratamiento de AG<sub>3</sub> y se combinó con rayado de ramas no se observaron diferencias entre la utilización de los niveles N1 y N2 de fertilización inicial. Sin embargo, un incremento superior al 100% se

observó en el nº de frutos por planta en el tratamiento de 50 mg.l<sup>-1</sup> de AG<sub>3</sub> y sin rayado, al pasar del nivel N1 a N2 en la dosis nitrogenada. Estas observaciones hacen suponer que al estimular el crecimiento de los frutos mediante la aplicación de AG<sub>3</sub> a la caída de pétalos en situaciones de limitantes nutricionales, podrían aumentar la competencia, y por lo tanto resultar contraproducentes. Los resultados productivos observados a partir de las técnicas aplicadas, indicarían que bajo las condiciones del ensayo se evidenció una limitación por recursos carbonados y nitrogenados durante el crecimiento exponencial de los frutos de ‘Navelate’, o para el desarrollo de la estructura fotosintética de la fuente, o para ambos procesos; por lo que debería priorizarse el manejo de la fertilización nitrogenada de manera previa al estímulo hormonal para el cuajado de los frutos.

En un estudio realizado en condiciones de campo, en la región de Rio Grande do Sul (Brasil), sobre naranjo navel cv. Monte Parnaso injertado sobre *Poncirus trifoliata*, evaluaron tratamientos donde combinaron las técnicas de rayado de ramas y la aplicación de diferentes reguladores de crecimiento, para la mejora del cuajado y la productividad (Koller *et al.*, 2006). En cuanto a los reguladores de crecimiento, contrariamente a lo hallado en ‘Navelate’, la aplicación de 5 mg.l<sup>-1</sup> de AG<sub>3</sub>, a los 10 días posteriores a la caída de pétalos aumentó la producción, pero disminuyó el peso medio del fruto en relación a otros tratamientos que aumentaron la producción (Koller *et al.*, 2006). Las respuestas positivas en el rendimiento se debieron al aumento de la expansión celular y la mejor nutrición inicial de los frutos, promovida por la aplicación de AG<sub>3</sub>, así como por la aceleración del crecimiento de los frutos estimulada por el rayado de ramas al final de la caída de pétalos (Agustí *et al.*, 1982a; Talón *et al.*, 1990).

En cuanto a los cambios metabólicos, la aplicación de 50 ppm AG<sub>3</sub> provocó una disminución puntual de la eficiencia máxima del FSII (Fv/Fm) de las hojas jóvenes a los 14 días de la realización del tratamiento hormonal (Control: 0,79 vs. 50 ppm AG<sub>3</sub>: 0,77). Sin embargo, sólo valores de Fv/Fm inferiores a 0,72 se consideran indicativos de fotoinhibición en *Citrus* (Ribeiro *et al.*, 2009), por lo que se podría considerar que la aplicación de AG<sub>3</sub> no afectó la eficiencia cuántica de las plantas de ‘Navelate’. Las hojas maduras de las plantas que tuvieron la aplicación de 50 ppm de AG<sub>3</sub> presentaron menores niveles de almidón hasta la fecha 12/11, observándose el efecto contrario posteriormente. En este sentido, se puede mencionar que es conocido que las giberelinas intervienen en el estímulo de la hidrólisis del

almidón, como ocurre en las semillas en el proceso de germinación (Sponsel & Hedden, 2004). Además, cuando a las plantas del naranjo 'Navelate' se las fertilizó al inicio de la brotación primaveral con la dosis correspondiente a N2, y a la caída de pétalos se les aplicó 50 ppm de AG<sub>3</sub> y sin la aplicación de rayado, presentaron un menor nivel de almidón en las hojas jóvenes en comparación a las demás combinaciones entre estos tres tratamientos, evidenciando un efecto predominante de la giberelina sobre los carbohidratos. Por otro lado, teniendo en cuenta la disminución en la ACO<sub>2</sub> observada a fines del mes de octubre, esto indicaría la necesidad de utilización de los carbohidratos para el proceso de respiración y la actividad metabólica celular propia de las hojas en desarrollo (Hieke *et al.*, 2002). Por último, con respecto al índice SPAD y el contenido foliar de nitrógeno total, como también de los metabolitos Prolina y MDA, la aplicación de 50 ppm de AG<sub>3</sub> a la caída de pétalos disminuyó sus niveles en comparación al testigo sin AG<sub>3</sub>, tal como se esperaba según la hipótesis inicial. Dicha aplicación podría haber tenido un efecto de dilución de los componentes celulares ante el proceso de alargamiento celular en respuesta al estímulo hormonal (Peer *et al.*, 2015) y de utilización del nitrógeno de reserva en el caso del aminoácido Prolina (Abebe *et al.*, 2003).

Del mismo modo, en los frutos en fase exponencial del crecimiento, la aplicación de AG<sub>3</sub> cuando fue complementado con el rayado de ramas resultó en un aumento del contenido de carbohidratos reductores (glucosa, fructosa) y sacarosa, lo que refleja un incremento de la capacidad sumidero de los frutos. Sin embargo, este estímulo del crecimiento inicial no logró sostenerse y traducirse en términos productivos en kg.pl<sup>-1</sup>, sino que sólo ocurrió una demora en la tasa de abscisión de los frutos, principalmente de los brotes mixtos. Esto puede explicarse por el aumento de la competencia por los recursos carbonados y nutricionales entre los órganos en activo crecimiento (frutos, hojas, brotes, raíces) con la aplicación de AG<sub>3</sub>, ya que el número de frutos que se mantuvieron en desarrollo inicialmente (hasta mediados de noviembre) fue mayor en los árboles tratados. En cuanto a los carbohidratos de los frutos, la glucosa y la fructosa proceden de la hidrólisis de la sacarosa, y el almidón se mantiene en reserva cuando no necesita ser hidrolizado, es decir, si al fruto le llega suficiente sacarosa desde las hojas; pero, aún así, si el fruto crece más, reduce su contenido (Iglesias *et al.*, 2003; 2007). En cuanto a los frutos de las plantas que se fertilizaron con el nivel N2, el contenido de almidón observado fue menor ante la aplicación

de AG<sub>3</sub> en comparación al control, lo cual también podría indicar el efecto de la competencia por recursos entre un mayor número de frutos cuajados, o destinos con mayor actividad.

Los resultados del tratamiento de rayado de ramas aplicado a mediados del mes de octubre en 'Navelate' evidenciaron una mayor retención de los frutos durante los 30 días siguientes a su aplicación, expresado principalmente sobre los brotes mixtos. Por el contrario, los brotes campaneros presentaron un aumento de la tasa de abscisión en la fecha del 24/11 en respuesta al rayado. Sin embargo, los valores absolutos de la tasa de caída de frutos de estos brotes campaneros no lograron contrarrestar el efecto positivo que tuvo esta técnica en el aumento del porcentaje final de cuajado de frutos y en la producción en kg por planta. Estos resultados están en concordancia con la hipótesis inicial planteada. De manera similar, en investigaciones realizadas en mandarinas 'Loretina' de 2 años y 'Nova' de 7 años donde observaron que el rayado de ramas retrasó la abscisión de los frutos independientemente del tipo de brote, sin embargo solo los brotes generativos con hojas mostraron un mejor cuajado final de frutos (Rivas *et al.*, 2007). Del mismo modo, en trabajos desarrollados sobre mandarina 'Satsuma', evaluaron la aplicación del rayado de ramas y la aplicación de AG<sub>3</sub> en el momento de antesis y obtuvieron una reducción de las tasas de abscisión temprana de frutos en desarrollo. Estos hallazgos sugirieron que el efecto del rayado sobre este retraso de la abscisión de las estructuras reproductivas probablemente esté mediado no sólo por el aumento de carbohidratos, sino también por el aumento en los niveles hormonales (Mehouachi *et al.*, 2009).

El tratamiento de rayado se realizó a los 15 días posteriores a la caída de pétalos (DPCP) y resultó en un aumento en el número de frutos y rendimiento por planta de 'Navelate', y la respuesta se dio con diferente disponibilidad de nitrógeno. De manera similar, en un estudio realizado sobre naranjo 'Monte Parnaso' obtuvieron una mejora en los niveles productivos con esta técnica aplicada en dos momentos, a los 10 DPCP, o bien en noviembre después de la caída natural de los frutos. A su vez, observaron que el rayado resultó en un menor crecimiento del diámetro del tronco de las plantas (Koller *et al.*, 2006), atribuyendo dicho efecto a que el rayado reduce la nutrición del sistema radicular al interrumpir temporalmente el descenso de la savia elaborada, perjudicando el crecimiento de

las raíces, la absorción de agua y nutrientes minerales. Además, al aumentar la fructificación, se incrementa el consumo de nutrientes por los frutos, en detrimento del crecimiento vegetativo de las plantas (Koller *et al.*, 2006).

En cuanto a las variables relacionadas a la actividad metabólica, la aplicación del rayado de ramas cuando se combinó con el nivel de fertilización N1 resultó en una disminución significativa del índice de verdor respecto al control sin rayado, sin observarse cambios en el contenido foliar de nitrógeno. En este sentido, algunas investigaciones reportaron un efecto de clorosis foliar, reduciendo en consecuencia el índice SPAD, en respuesta al rayado, por ejemplo en lima ácida 'Tahití' (Spaziani-Pereira *et al.*, 2010), mandarinos 'Okitsu' (Iglesias *et al.*, 2002), 'Nova' y 'Loretina' (Rivas *et al.*, 2007). Otros trabajos informaron que el rayado resultó en una acumulación de carbohidratos de reservas observando un aumento en el tamaño y la cantidad de gránulos de almidón en cloroplastos que causaron daño a la estructura del tilacoide, que puede explicar los síntomas de la clorosis foliar que aparecen después del tratamiento de rayado (Bondada & Syvertsen, 2005). Sin embargo, la respuesta fisiológica al rayado en *Citrus* también varía dentro de la canopia dependiendo del tipo de brote y de la edad de las hojas (Rivas *et al.*, 2007). En las investigaciones realizadas sobre 'Nova' y 'Loretina', en las hojas maduras no se observaron diferencias en la concentración de clorofilas entre árboles control y rayados, como tampoco tuvo efecto sobre hojas jóvenes de brotes florales. La acumulación de almidón, y la reducción de la actividad del FII en respuesta al rayado se dieron sólo en las hojas de los brotes vegetativos (Rivas *et al.*, 2007). Todas las evidencias mencionadas hacen inferir que el rayado de ramas disminuye el índice de verdor de dos maneras diferentes; por posibles daños físicos en las estructuras tilacoidales y la reducción de la actividad del FSII en brotes con pocos frutos, y por una mejora del cuajado de los frutos, lo que aumenta la competencia por los recursos disponibles, como fue discutido anteriormente.

La aplicación del rayado de ramas provocó una respuesta positiva y significativa en los valores medios de rendimiento cuántico del FSII ( $\Phi$ PSII) de las hojas jóvenes, que se expresó más marcadamente en los tratamientos que combinaron 'N2' y 'rayado'. Los principales efectos que el rayado produjo sobre estos parámetros se registraron luego del mes de su aplicación. Por otro lado, trabajos realizados sobre naranja 'Salustiana' reportaron que no se observaron diferencias estadísticas en los parámetros de fluorescencia de la

clorofila ( $\Phi$ PSII y Fv/Fm) entre las hojas de las plantas con rayado y el control sin rayar, que contenían diferentes niveles de carga de frutos. Sin embargo, cuando la rama rayada no presentaba frutos, estos parámetros disminuyeron significativamente (Nebauer *et al.*, 2011). En 'Nova' y 'Loretina' observaron el mismo efecto del rayado en hojas de brotes vegetativos, con una evidente reducción del  $\Phi$ PSII desde 7 a 60 días posteriores a la aplicación (Rivas *et al.*, 2007; 2008). Este efecto fue atribuido a eventos de fotoinhibición crónica y reducción en unidades de PSII funcionales (Rivas *et al.*, 2007; 2008). En cuanto a las hojas jóvenes de brotes reproductivos, a diferencia de las hojas maduras, respondieron al aumento del requerimiento de carbohidratos, lo que se manifestó en el aumento del  $\Phi$ PSII (Rivas *et al.*, 2007). El aumento del  $\Phi$ PSII implica un incremento de la cantidad de electrones provenientes del  $H_2O$  y que reducen el  $NADP^+$  a  $NADPH^+H^+$ , al mismo tiempo de proporcionar energía para la formación de ATP a partir de ADP y Pi. La energía de ambos compuestos se utiliza en el proceso de la reducción de  $CO_2$  y en la síntesis de carbohidratos (Syvertsen & Lloyd, 1994). En el trabajo anteriormente mencionado (Rivas *et al.*, 2007), los autores concluyeron que las hojas jóvenes, a diferencia de las hojas maduras, fueron capaces de modular el  $\Phi$ PSII en respuesta a las demandas de carbohidratos durante el periodo de caída natural de frutos, a causa de una mejora en el cuajado de frutos resultante de la aplicación del rayado. Este mecanismo parece ser activado por una mejora de la tasa de utilización de los azúcares, liberando fosfato inorgánico citosólico (Pi) en las hojas, promoviendo fotofosforilación y aumento de la fijación de  $CO_2$  a triosa-P por Rubisco (Paul & Pellny, 2003). También se ha sugerido que las tasas fotosintéticas máximas no pueden ser mantenidas por Pi-cíclico a través de la síntesis de almidón estromal solo, y el cloroplasto a menudo se considera dependiente de la síntesis citosólica de sacarosa para su suministro de Pi (Foyer & Galtier, 1996). En consecuencia, el grado de modulación por retroalimentación de la fotosíntesis depende de la naturaleza del carbohidrato sintetizado. Además, cuando la sacarosa es el principal carbohidrato de almacenamiento, las hojas parecen mostrar menores disminuciones en la fijación de  $CO_2$  que las hojas que acumulan almidón (Goldschmidt & Huber, 1992). Esto último es acorde a lo encontrado en 'Navelate', donde el rayado provocó una mejora del cuajado de fruto, principalmente de los brotes mixtos, observándose un mayor  $\Phi$ PSII en las hojas jóvenes a partir del mes posterior a la aplicación de esta técnica, como consecuencia del incremento en el número y el tamaño de los frutos en crecimiento en

los árboles rayados. En base a estas evidencias, la mejora del comportamiento cuántico del FSII en los tratamientos que mejoraron la carga de frutos parece ser una consecuencia del aumento del cuajado de frutos.

En una investigación realizada en condiciones de campo sobre la naranja ‘Salustiana’ con plantas de 40 años desde su plantación, no se encontraron diferencias estadísticas significativas en la  $ACO_2$ , Gs y Ci/Ca entre los brotes rayados y el control sin rayar, que contenían diferentes niveles de carga de frutos cada uno de ellos (Nebauer *et al.*, 2011). Sin embargo, cuando la rama rayada no contenía frutos estos parámetros disminuyeron significativamente. En este experimento, el contenido de carbohidratos no estructurales en las hojas aumentó a medida que fue mayor la relación hoja:fruto de las ramas con rayado. Además, fue reportado una acumulación de almidón en las ramas vegetativas a las que se les aplicó rayado (Li *et al.*, 2003a). Por último, evaluaron la expresión de genes implicados en el metabolismo del carbono; cuando las ramas fueron rayadas y poseían frutos observaron un aumento en los niveles de los genes que participan en la síntesis y transporte de sacarosa, principal azúcar transportado a través del floema en *Citrus* (Zimmermann & Ziegler, 1975). Por el contrario, en las ramas vegetativas con rayado detectaron un aumento de genes implicados en la síntesis de almidón. De la misma manera, Li *et al.* (2007) demostraron que los genes que codifican las enzimas involucradas en la síntesis de almidón se expresan en *Citrus* rayados solo cuando no hay presencia de frutos. La síntesis y exportación de sacarosa en las hojas se promueve cuando existen destinos fuertes. Por el contrario, la expresión de ADP-glucosa pirofosforilasa aumenta cuando no hay destinos fuertes, y el exceso de asimilados es convertido en almidón que se almacena en las hojas (Nebauer *et al.*, 2011). En el trabajo mencionado, la  $ACO_2$  se relacionó inversamente con el contenido de almidón después de 48 horas, aunque la regulación de la fotosíntesis no fue una consecuencia directa de la acumulación de almidón (Nebauer *et al.*, 2011). Por lo tanto, el rayado puede inducir a una inhibición por retroalimentación de la fotosíntesis reduciendo la tasa  $ACO_2$  (Iglesias *et al.*, 2003). Por esto, el rayado ha sido relacionado con el desarrollo de estrés en las hojas (Rivas *et al.*, 2007; 2008), ya que en determinadas situaciones puede alterar las estructuras tilacoideas y el funcionamiento de la maquinaria fotosintética (Bondada & Syvertsen, 2005; Rivas *et al.*, 2011). En acuerdo con la hipótesis inicial, en ‘Navelate’ el tratamiento de rayado de ramas produjo una leve disminución (-7%) de la  $ACO_2$  de las hojas desarrolladas,



observada a partir de los 15 días posteriores a la aplicación del tratamiento, y que se mantuvo por el resto del periodo (Anexo 11, Fig. 11). Las hojas jóvenes presentaron el mismo comportamiento durante el mes de octubre, pero el efecto se invirtió durante noviembre. No obstante, esta reducción en la  $ACO_2$ , con respecto al tratamiento control sin rayado, los niveles de este parámetro fotosintético que se mantuvieron en las plantas con rayado ( $5,66 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  en hojas desarrolladas y  $8,04 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  en hojas jóvenes) pueden considerarse normales para *Citrus*, según lo indicado por otros autores, los cuales se ubican entre 3 y  $8 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (Pimentel *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2009). Una respuesta similar a la  $ACO_2$  se observó en los parámetros E y Gs. Al mismo tiempo, se produjo un mayor DPV en las hojas jóvenes a los 15 días posteriores al rayado.

El efecto del rayado en la mejora del cuajado de frutos se atribuye a que la acumulación de carbohidratos en la copa está disponible para satisfacer la demanda que ejercen los frutos en su etapa inicial de crecimiento (Rivas *et al.*, 2007). En concordancia a la hipótesis planteada, en 'Navelate' la aplicación del rayado, resultó en una disminución de los contenidos de glucosa y fructosa, y un aumento de sacarosa en las hojas desarrolladas a partir de los 15 días posteriores a su realización, atenuándose las diferencias con el control durante el mes de noviembre. El efecto del rayado en las hojas jóvenes resultó similar, aunque los cambios se observaron con 15 días de demora con respecto a las hojas desarrolladas, además de expresarse de una manera más marcada. El cambio más notorio fue en el tratamiento de rayado combinado con N1 donde se observó un aumento del 60% en el contenido de sacarosa en las hojas jóvenes de los brotes mixtos, mientras que en las hojas desarrolladas las variaciones de los carbohidratos no estructurales no fueron de relevancia. Esto demuestra el efecto del rayado sobre la activación del FSII en los brotes con hojas y flores, y por lo tanto, los frutos pueden mantenerse en el árbol, incrementándose el cuajado dado la mayor producción de NADPH y ATP para satisfacer la demanda del crecimiento inicial de los frutos. De manera similar a lo observado en 'Navelate', en experiencias con mandarina 'Loretina' de dos años de edad, evidenciaron que el rayado causó una acumulación de carbohidratos que alcanzó un máximo por encima del control a los 30 días posteriores a su aplicación, encontrándose diferencias significativas en la concentración de carbohidratos foliares según el tipo de hoja. En las hojas maduras, el rayado no modificó las concentraciones de fructosa y sacarosa, pero aumentó el contenido de glucosa y de almidón

en 20,8 y 116,6%, respectivamente. Entre los tipos de brotes, los vegetativos mostraron una mayor concentración de fructosa, glucosa y almidón de 111,9; 83,1 y 147,6%, respectivamente, sin diferenciarse en la concentración de sacarosa foliar con respecto al control sin rayar. Las hojas jóvenes de los brotes mixtos de los árboles rayados presentaron concentraciones crecientes de todos los carbohidratos, aunque mostraron el menor incremento en la concentración de almidón foliar entre los tipos de brotes (Rivas *et al.*, 2007). Por lo cual se concluye que los cambios en la síntesis y transporte de los diferentes carbohidratos causados por el rayado dependen de la presencia de frutos en el árbol y/o rama analizada.

Con respecto a los cambios en los metabolitos indicadores de estrés celular en respuesta a la aplicación de rayado, tal como se esperaba según la hipótesis inicial, fue observado en 'Navelate' un aumento en el contenido de MDA en hojas maduras durante el avance del período de brotación de primavera de una manera similar a lo reportado en experimentos realizados en árboles de mandarina 'Loretina' de 2 años de edad (Rivas *et al.*, 2008) aunque, en el trabajo anteriormente mencionado esta respuesta fue encontrada en hojas jóvenes. Además, reportaron que este proceso fue acompañado por niveles crecientes de prolina y por un aumento de la actividad de las enzimas antioxidantes, en las hojas jóvenes de los árboles rayados (Rivas *et al.*, 2008). Contrariamente a la hipótesis inicial, en 'Navelate', las hojas jóvenes presentaron una relación significativa y positiva entre el contenido de prolina y el rendimiento. En los frutos analizados, la dosis de nitrógeno presentó una interacción con el rayado de ramas sobre el contenido de prolina, resultando la combinación N2 y rayado la de mayor nivel de este metabolito en los frutos. Si bien el aminoácido prolina tiene una función de protección celular ante una situación de estrés biótico y abiótico, también sirve como reserva de carbono y nitrógeno para el crecimiento después de la exposición a tensiones ambientales (Abebe *et al.*, 2003); posiblemente por esta razón pudo haber resultado en un mayor nivel de este metabolito en los frutos en desarrollo cuando las plantas recibieron un mayor nivel de nitrógeno en la fertilización inicial, y una mayor disponibilidad de carbohidratos por efecto del rayado de ramas. Por otro lado, no se lograron diferenciar estadísticamente los tratamientos control y rayado por el contenido de MDA en las hojas jóvenes. De manera contraria, en el estudio desarrollado por Rivas *et al.* (2011) donde evidenciaron que el rayado dio lugar a un estrés por daño celular y fue

demostrado por el aumento de la lipooxidación (expresado como contenido de MDA) de hojas jóvenes, revelando un mal funcionamiento del aparato fotoquímico. El aumento simultáneo en el contenido de prolina podría contribuir para evitar el daño fotooxidativo, y/o mejorar la actividad de varios antioxidantes (Correa-Molinari *et al.*, 2004). La acumulación de este aminoácido en las células se ha informado a partir de diferentes tensiones abióticas como la salinidad, sequía, bajas temperaturas y radiación UVB (Abebe *et al.*, 2003; Shinde *et al.*, 2016). Estas diferencias se explican dado que este análisis fue realizado en hojas de brotes vegetativos (Rivas *et al.*, 2008), mientras que en ‘Navelate’ los análisis de estos metabolitos se realizaron en brotes mixtos.

Por lo anteriormente mencionado, los productores a veces se refieren al rayado o anillado como una práctica arriesgada ya que el crecimiento general del árbol podría ser retrasado a pesar de que no se observen síntomas externos de daño aparente. Además, no se recomienda esta técnica para ser aplicada en árboles débiles y durante condiciones adversas de crecimiento (Goren *et al.*, 2003). Sin embargo, en las condiciones de cultivo y de manejo agronómico del presente trabajo, los resultados obtenidos en ‘Navelate’ en respuesta al rayado fueron de una mejora en los niveles productivos sin evidencias de daños o estrés celular, indicando un mejor comportamiento al estimular un mayor cuajado de frutos y producción por planta.

## 7. CONCLUSIONES

- ✓ La mayor dosis de fertilización nitrogenada al inicio de la brotación primaveral y el rayado de ramas a los 15 días posteriores a la caída de pétalos resultaron en una mejora del cuajado de los frutos y del rendimiento por planta del naranjo 'Navelate'. La aplicación de AG<sub>3</sub> a la caída de pétalos sólo fue efectiva a la dosis más alta de nitrógeno o cuando se combinó con el rayado.
- ✓ Los tratamientos que mejoraron el cuajado de frutos aumentaron su retención en los dos momentos en que fueron observadas las mayores tasas de abscisión, a mediados de octubre y de noviembre. La mayor retención de frutos se expresó en los brotes florales múltiples con hojas (BM) y en los multiflorales sin hojas (RF) para el caso de la mayor dosis de fertilización nitrogenada, y en los BM en el caso del rayado de ramas.
- ✓ El aumento de la dosis nitrogenada y la aplicación del rayado de ramas no modificaron el contenido de nitrógeno total (%MS) foliar. El índice de verdor (SPAD) de las hojas maduras no expresó correctamente el nivel de nitrógeno foliar durante la brotación primaveral. Con aplicación de la menor dosis de fertilización nitrogenada, el rayado redujo el índice de verdor en relación al tratamiento testigo pero no se encontraron evidencias de daños o estrés celular.
- ✓ La mayor disponibilidad de nitrógeno resultó en una mejora de  $\Phi$ FSII y de ACO<sub>2</sub> de las hojas maduras cuando fue combinada con AG<sub>3</sub> o con rayado, y en un aumento en los contenidos de sacarosa y almidón foliar. El rayado de ramas resultó en una mejora de  $\Phi$ FSII cuando se combinó con la mayor dosis de nitrógeno, además aumentó el contenido de sacarosa foliar. En las hojas jóvenes el aumento del contenido de sacarosa se observó cuando el rayado se combinó con el nivel N1.
- ✓ La aplicación de AG<sub>3</sub> indujo inicialmente una mayor actividad sumidero de los frutos cuando fue complementado con el rayado de ramas, aumentando los niveles de carbohidratos reductores y sacarosa de los frutos. Por lo cual, cuando existieran limitaciones por recursos carbonados y nitrogenados, debería priorizarse el manejo nutricional respecto al estímulo hormonal para que se obtengan mejoras en el cuajado de los frutos.

✓ Los parámetros  $\Phi$ FSII,  $ACO_2$ , Gs y EUA medidos en la primera mitad del mes de octubre en ambos tipos de hojas presentaron correlaciones positivas con las variables N° de frutos.pl<sup>-1</sup> y Kg.pl<sup>-1</sup>. Por el contrario, el DPV se relacionó de forma negativa con las variables productivas del cv. Navelate. La fertilización nitrogenada inicial y la aplicación del rayado de ramas posterior a la caída de pétalos produjo cambios favorables en los mecanismos metabólicos y fisiológicos en el momento crítico del cultivo, lo cual resultó en una menor abscisión de frutos y un aumento de la producción del cv. Navelate, en las condiciones agroclimáticas de la citricultura del Río Uruguay.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- ABEBE, T.; GUENZI, A.C.; MARTIN, B.; CUSHMAN, J.C. 2003. Tolerance of mannitol-accumulating transgenic wheat to water stress and salinity. *Plant Physiology*, 131: 1748-1755.
- ADAMS, E.; FRANK, L. 1980. Metabolism of proline and the hydroxyprolines. *Annual Review of Biochemistry*, 49: 1005-1061.
- AGUSTÍ, M. 1980. Biología y control de la floración en el género *Citrus*. PhD Thesis. Universidad Politécnica de Valencia. España.
- AGUSTÍ, M. 2003. Citricultura. Ed. Mundi-prensa. Madrid, España. 422p.
- AGUSTÍ, M. 2004. Fruticultura. Ed. Mundi-prensa. Madrid, España. 507p.
- AGUSTI, M.; GARCIA-MARI, F.; GUARDIOLA, J.L. 1982a. Gibberellic Acid and Fruit Set in Sweet Orange. *Scientia Horticulturae*, 17: 257-264.
- AGUSTÍ, M.; GARCÍA-MARÍ, F.; GUARDIOLA, J.L. 1982b. The influence of flowering intensity on the shedding of reproductive structures in sweet orange. *Scientia Horticulturae*, 17: 343-352.
- AGUSTÍ, M.; ALMELA, V.; PONS, J. 1992. Effects of girdling on alternate bearing in *Citrus*. *Horticultural Science*, 67: 203-207.
- AGUSTÍ, M.; ZARAGOZA, S.; BLEIHOLDER, H.; BUHR, L.; HACK, H.; KLOSE, R.; STAUSS, R. 1995. Escala BBCH para la descripción de los estadios fenológicos del desarrollo de los agrios (Gén. *Citrus*). *Levante Agrícola*, 332: 189-199.
- AGUSTÍ, M.; MARTINEZ-FUENTES, A.; MESEJO, C.; ALMELA, V. 2003a. El cultivo de naranjo dulce 'Navelate'. *Levante Agrícola*, 368: 358-367.
- AGUSTÍ, M.; MARTINEZ-FUENTES, A.; MESEJO, C.; JUAN, M.; ALMELA, V. 2003b. Cuajado y desarrollo de los frutos cítricos. Ed. Generalitat Valenciana. Valencia, España. 80p.
- ANDERSON, C.M.; BANFI, G.; CASAFUS, C.M.; COSTA, N.B.; FABIANI, A.; GARRÁN, S.M.; MARCO, G.; MIKA, R.H. 2012. Manual para productores de naranja y mandarina de la Región del Río Uruguay. Concordia, Argentina: INTA. 203p.

- ARIAS, M.; CARBONELL, J.; AGUSTÍ, M. 2005. Endogenous free polyamines and their role in fruit set of low and high parthenocarpic ability citrus cultivars. *Plant Physiology*, 162: 845-853.
- BALZARINI, M.; DI RIENZO, J.; TABLADA, M.; GONZALES, L.; BRUNO, C.; CÓRDOBA, M.; ROBLEDO, W.; CASANOVES, F. 2017. *Estadística y Biometría*. 2a ed. Córdoba. Ed. Brujas; Universidad Nacional de Cordoba. 426p.
- BATES, L.S.; WALDREN, R.P.; TEARE, I.D. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil*, 39: 205-207.
- BERMEJO, A.; MARTÍNEZ-ALCÁNTARA, B.; MARTÍNEZ-CUENCA, M.; YUSTE, R.; MESEJO, C.; REIG, C.; AGUSTÍ, M.; PRIMO-MILLO, E.; IGLESIAS, D.J. 2016. Biosynthesis and Contents of Gibberellins in Seeded and Seedless Sweet Orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) Cultivars. *Journal of Plant Growth Regulation*, 35: 1036-1048.
- BERMEJO, A.; GRANERO, B.; MESEJO, C.; REIG, C.; TEJEDO, V.; AGUSTÍ, M.; PRIMO MILLO, E.; IGLESIAS, D.J. 2018. Auxin and Gibberellin Interact in *Citrus* Fruit Set. *Journal of Plant Growth Regulation*, 37: 491-501.
- BONDADA, B.R.; SYVERTSEN, J.P. 2005. Concurrent changes in net CO<sub>2</sub> assimilation and chloroplast ultrastructure in nitrogen deficient *Citrus* leaves. *Environmental and Experimental Botany*, 54: 41-48.
- BONANDA, B.R. 2011. Anomalies in structure, growth characteristics, and nutritional composition as induced by 2,4-dichlorophenoxy acetic acid drift phytotoxicity in grapevine leaves and clusters. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 136: 165-176.
- BOUZO, C.A.; FAVARO, J.C.; PILATTI, R.A.; SCAGLIA, E.M. 2005. Cinturón Hortícola de Santa Fe: Descripción de la zona y situación Actual. *Revista FAVE sección Ciencias Agrarias*, 4 (1-2): 63-69.
- BRADSTREET, R.B. 1965. *The Kjeldahl Method for Organic Nitrogen*. Elsevier Inc. 248p.
- BUSTAN, A.; GOLDSCHMIDT, E.E. 1998. Estimating the cost of flowering in a grapefruit tree. *Plant, Cell & Environment*, 21: 217-224.
- CAI, Z.Q.; SLOT, M.; FAN, Z.X. 2005. Leaf development and photosynthetic properties of three tropical tree species with delayed greening. *Photosynthetica*, 43 (1): 91-98.

- CALABRETTA, M.L.; GIUFRIDA, A.; LEONARDI, A.; INTRIGLIOLO, F.; MERLE, H.; AGUSTÍ, M. 2004. SPAD Utilization to determine nutritional status in orange trees. Proc International Society of Citriculture, 2: 571-575.
- CHAMPLIN, M.H.; WESTWOOD, M.N. 1980. Relationship of nutritional factors to fruit set. Plant Nutrition, 2: 477-505.
- CHAPMAN, H.D. 1976. Métodos de análisis para suelos, plantas y aguas. Editora Trillas, Mexico. 195p.
- CHICA, E.J.; ALBRIGO, L.G. 2013. Cool Temperature and Water Deficit Interact during Floral Induction in *Citrus*. Proceedings of the Florida State Horticultural Society. 126: 45-50.
- CORREA-MOLINARI, H.B.; MARUR, C.J.; BESPALHOK, J.C.; KOBAYASHI, A.K.; PILEGGI, M.; PEREIRA LEITES, R.; PROTASIO PEREIRA, L.; ESTEVES VIEIRA, L.G. 2004. Osmotic adjustment in transgenic citrus rootstock Carrizo citrange (*Citrus sinensis* Osb. X *Poncirus trifoliata* L. Raf.) overproducing proline. Plant Science, 167 (6): 1375-1381.
- DAVENPORT, T.L. 1990. *Citrus* flowering. Revue Horticole, 12: 349-408.
- DAVIES, F.S.; ALBRIGO, L.G. 1994. Environmental constraints on growth, development and physiology of *Citrus*. In: *Citrus*. (Eds.): F.S. DAVIES; L.G. ALBRIGO. CAB Int. Wallingford, UK. pp. 51-82.
- DE SOUZA PRADO, A.K.; CARUSO MACHADO, E.; MEDINA, C.L.; FAVERO MACHADO, D.; MAZZAFERA, P. 2007. Flowering and fruit set in 'Valência' orange trees under different crop load status and with and without irrigation. Bragantia, 66: 173-182.
- DE SOUZA, T.R.; SALOMÃO, L.C.; DE ANDRADE, T.F.; BÔAS, R.L.V.; QUAGGIO, J.A. 2011. Medida indireta da clorofila e sua relação com o manejo da adubação nitrogenada em plantas cítricas fertirrigadas. Revista Brasileira de Fruticultura, 33 (3): 993-1003.
- DI RIENZO J.A.; CASANOVES F.; BALZARINI M.G.; GONZALEZ L.; TABLADA M.; ROBLEDO C.W. 2017. InfoStat versión 2017. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>



- DISTÉFANO, G.; GENTILE, A.; HERRERO, M. 2011. Pollen – pistil interactions and early fruiting in parthenocarpic citrus. *Annals of Botany*, 108: 499-509.
- DOVIS, V.L.; MACHADO, E.C.; RIBEIRO, R.V.; MAGALHÃES FILHO, J.R.; MARCHIORI, P.E.R.; SALES, C.R.G. 2014. Roots are important sources of carbohydrates during flowering and fruiting in ‘Valencia’ sweet orange trees with varying fruit load. *Scientia Horticulturae*, 174: 87-95.
- EL-OTMANI, M.; COGGINS, C.H.; AGUSTÍ, M.; LOVATT, C. 2000. Plant growth regulators in Citriculture: World current uses. *Critical. Plant Science*, 19 (5): 395-447.
- EVANS, J.R.; POORTER, H. 2001. Photosynthesis acclimation of plants to growth irradiance: The relative importance of specific leaf area and nitrogen partitioning in maximizing carbon gain. *Plant, Cell & Environment*, 24:755-767.
- FAO, 2016. Frutos Cítricos frescos y elaborados. Estadísticas anuales 2016. Acceso: 05/01/2021. <http://www.fao.org/economic/est/est-commodities/citricos/es/>
- FAVARO, M.A.; MICHELOUD, N.; CHIESA, M.A.; ROESCHLIN, R.A.; VOJNOV, A.A.; CASTAGNARO, A.P.; GADEA-VACAS, J.; GMITTER, F.G.; RISTA, L.M.; GARIGLIO, N.F.; MARANO, M.R. 2014. Surface barriers of mandarin cv. 'Okitsu' leaves make a major contribution to canker disease resistance. *Phytopathology*, 104 (9): 970-976. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-10-13-0277-RPMID:24548213>.
- FEDERCITRUS (Federación Argentina del Citrus). 2016. La actividad cítrica Argentina. Acceso: 23/01/2016. <http://www.federcitrus.org/noticias/upload/informes>.
- FERNANDEZ, M.E.; GYENGE, J.E. 2010. Técnicas de Medición en Ecofisiología Vegetal Conceptos y Procedimientos. Ediciones INTA. 140p.
- FERRER, C.; MARTIZ, J.; SAA, S.; CAUTIN, R. 2017. Increase in final fruit size of tangor (*Citrus reticulata* × *C. sinensis*) cv W. Murcott by application of benzyladenine to flowers. *Scientia Horticulturae*, 223: 38-43.
- FOYER, C.H.; GALTIER, N. 1996. Source–sink interaction and communication in leaves. In: Photoassimilate Distribution in Plants and Crops: Source–Sink Relations. (Eds.): E. ZAMINSKI; A.A. SCHAFFER. Marcel Dekker, New York, pp 311-340.
- FOYER, C.H.; NOCTOR, G. 2005. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell & Environment*, 28 (8): 1056-1071.

- FUNDANEA. 2016. Producción y comercio exterior de cítricos del Uruguay. Acceso: 07/01/2016. [http://fundanea.org.ar/noticias/uruguay\\_informe.pdf](http://fundanea.org.ar/noticias/uruguay_informe.pdf)
- GARCÍA-LUÍS, A.; ALMELA, V.; MONERRI, C.; AGUSTÍ, M.; GUARDIOLA, J. 1986. Inhibition of flowering in vivo by existing fruits and applied growth regulators in *Citrus unshiu*. *Physiology Plant*, 66: 515-520.
- GARCÍA-LUÍS, A.; FORNES, F.; GUARDIOLA, J.L. 1995. Leaf carbohydrates and flower formation in *Citrus*. *Horticultural Science*, 120 (2): 222-227.
- GARIGLIO, N.F.; PILATTI, R.A.; AGUSTÍ, M. 2007. Capítulo 2: Requerimientos ecofisiológicos de los árboles frutales. En: *Árboles Frutales: Ecofisiología, Cultivo y Aprovechamiento*. (Ed.): G. SOZZI. Buenos Aires, Argentina. pp. 43-80.
- GARIGLIO, N.F.; WEBER, M.E.; CASTRO, D.; MICHELOUD, N.G. 2012. Influence of the Environmental Conditions, the Variety, and Different Cultural Practices on the Phenology of Peach in the Central Area of Santa Fe (Argentina). In: *Phenology and Climate Change*. (Ed.): X. ZHANG Ed. InTech. Croatia. pp. 1-25.
- GARIGLIO, N.F.; BOUZO, C.A.; TRAVADELO, M.R. 2014. Cultivos frutales y ornamentales para zonas templado-cálidas. Experiencias en la zona central de Santa Fe. Ediciones UNL. Santa Fe, Argentina. 292p.
- GIL FIBLA, J.B.; VEYRAT, P. 1971. La naranja Navelate: origen, características y difusión, 8th Congr. Comité de Liaison de l'Agrumiculture Méditerranéenne. 5p.
- GOBIERNO DE SANTA FE. 2008. Plan Estratégico de la Cadena Frutihortícola Santafesina. Acceso: 20/7/2011. [www.santafe.gov.ar](http://www.santafe.gov.ar)
- GOLDSCHMIDT, E.E.; GOLOMB, A. 1982. The carbohydrate balance of alternate bearing *Citrus* trees and the significance of reserves for flowering and fruiting. *Horticultural Science*, 107: 206-208.
- GOLDSCHMIDT, E.E.; HUBER, S.C. 1992. Regulation of photosynthesis by end-product accumulation in leaves of plants storing starch, sucrose, and hexose sugars. *Plant Physiology*, 99: 1443-1448.
- GOLDSCHMIDT, E.E.; KOCH, K.E. 1996. Cap. 34 *Citrus*. In: *Photoassimilate distribution in plants and crops. Source-sink relationships*. (Eds.). E. ZAMSKI; A.A. SCHAFFER. Ed. Marcel Dekker. Inc. New York. Basel Hong Kong. pp. 797-822.

- GOÑI, C.; OTERO, A. 2011. Supplementary irrigation in 'spring' navel orange and satsuma 'owari' mandarin on temperate growing conditions. *Acta Horticulturae*, 889: 331-338.
- GOREN, R.; MONSELISE, S.P. 1971. Effects of ringing on yields of low bearing orange trees [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. *Horticultural Science*, 46: 435-441.
- GOREN, R.; HUBERMAN, M.; GOLDSCHMIDT, E.E. 2003. Girdling: physiological and horticultural aspects. *Horticultural Reviews*, 30: 1-36.
- GRAVINA, A. 1999. Ciclo fenológico – reproductivo en *Citrus*. Bases Fisiológicas y de Manejo. Universidad de la república, Facultad de Agronomía. 55p.
- GRAVINA, A.; ARBIZA, H.; TELIAS, A.; BENZANO, F.; D'OLIVEIRA FLORES, V.; CASANOVA, S.; GAMBETTA, G. 2004. Harvest date effect on fruit quality and return bloom in three *Citrus* cultivars. *Proc. International Society of Citriculture*, 1: 284-290.
- GRAVINA, A.; GAMBETTA, G.; REY, F.; GUIMARAES, N. 2016. Mejora de la productividad en mandarina 'Afourer' en aislamiento de polinización cruzada. *Agrociencia Uruguay*, 20 (2): 22-28.
- GUARDIOLA, J.L.; GARCÍA-LUÍS, A. 2000. Increasing fruit size in *Citrus*. Thinning and stimulation of fruit growth. *Plant Growth Regulation*, 31: 121-132.
- GUARDIOLA, J.L.; GARCÍA-MARÍ, F.; AGUSTÍ, M. 1984. Competition and fruit set in the Washington navel orange. *Physiology Plant*, 62: 297-302.
- GUARDIOLA, J.L.; BARRES, M.T.; ALBERT, C.; GARCÍA-LUIS, A. 1993. Effects of exogenous growth regulators on fruit development in *Citrus unshiu*. *Annals of Botany*, 71: 169-176.
- HEATH, R.L.; PACKER, L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125: 189-198.
- HIEKE, S.; MENZEL, C.M.; LÜDDERS, P. 2002. Effects of leaf, shoot and fruit development on photosynthesis of lychee trees (*Litchi chinensis*). *Tree Physiology*, 22: 955-961.
- HOU, W.; SUN, A.H.; CHEN, H.L.; YANG, F.S.; PAN, J.L.; GUAN, M.Y. 2016. Effects of chilling and high temperatures on photosynthesis and chlorophyll fluorescence in leaves of watermelon seedlings. *Biologia Plantarum*, 60: 148-154.
- HUNT, R. 1990. Basic Growth Analysis. Unwin Hyman Ltd. London, UK. 111p.

- IGLESIAS, D.J.; LLISO, I.; TADEO, F.R.; TALON, M. 2002. Regulation of photosynthesis through source–sink imbalance in *Citrus* is mediated by carbohydrate content in leaves. *Physiologia Plantarum*, 116: 563-572.
- IGLESIAS, J.D.; TADEO, F.R.; PRIMO-MILLO, E.; TALON, M. 2003. Fruit set dependence on carbohydrate availability in *Citrus* trees. *Tree Physiology*, 23: 199-204.
- IGLESIAS, D.J.; CERCOS, M.; COLMENERO FLORES, J.M.; NARANJO, M.; RÍOS, G.; CARRERA, E.; RUIZ-RIBERO, O.; LLISO, I.; MORILLON, R.; TADEO, F.R.; TALON, M. 2007. Physiology of *Citrus* fruiting. Review. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 19 (4): 333-362.
- INDEC (Instituto Nacional de Estadísticas y Censos). 2008. Frutales: superficie y variedades implantadas. Acceso: 20/8/2010.  
<http://www.indec.gov.ar/nuevaweb/cuadros/11/y050105.xls>.
- INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria). 2012. Informes regionales. Análisis económico de la campaña citrícola en Tucumán y dinámica del mercado. Acceso: 24/01/2014. <http://inta.gob.ar/documentos/analisis-economico-de-la-campana-citricola-en-tucuman-y-dinamica-del-mercado.-ano-2012/>
- IPEC (Instituto Provincial de Estadísticas y Censos). 2007. Fruticultura: cantidad de plantas por especie según departamentos (en línea). Acceso 23/01/2014.  
<http://www.santafe.gov.ar/index.php/web/content/view/full/14204>.
- JIFON, J.L.; SYVERTSEN, J.P. 2003. Moderate shade can increase net gas exchange and reduce photoinhibition in *Citrus* leaves. *Tree Physiology*, 23: 119-127.
- JIFON, J.; SYVERTSEN, J.; WHALEY, E. 2005. Growth Environment and Leaf Anatomy Affect Nondestructive Estimates of Chlorophyll and Nitrogen in *Citrus sp.* leaves. *J. American Society for Horticultural Science*, 130 (2): 152-158.
- KIMBALL, D.A. 1999. Analysis of *Citrus* Microbiology. In: *Citrus Processing. A complete guide.* (Ed.): D.A. KIMBALL. Gaithersburg, Maryland. Aspen Publishers. pp. 297-312.
- KOLLER, O.C.; SCHÄFER, G.; SARTORI, I.A.; PANZENHAGEN, N.V.; GONÇALVES DE LIMA, J. 2006. Produção da laranjeira-de-umbigo ‘Monte Parnaso’ com incisão anelar de ramos e uso de reguladores vegetais. *Revista Brasileira de Fruticultura Jaboticabal*, 28 (3): 425-429.

- KÖPPEN, W. 1948. Climatología: un estudio de los climas de la tierra. Trad. Pedro H.R. Pérez. Fondo de Cultura Económica, México. 478p.
- KURSAR, T.A.; COLEY, P.D. 1991. Nitrogen content and expansion rate of young leaves of rain forest species: Implications for herbivory. *Biotropica*, 23 (2): 141-150.
- KUSAKABE, A.; WHITE, S.A.; WALWORTH, J.L.; WRIGHT, G.C.; THOMPSON, T.L. 2006. Response of Microsprinkler-Irrigated Navel Oranges to Fertigated Nitrogen Rate and Frequency. *Soil Science Society of America Journal*, 70:1623-1628.
- LE BAIL, M.; JEUFFROY, M.E.; BOUCHARD, C.; BARBOTTIN, M. 2005. Is it possible to forecast the grain quality and yield of different varieties of winter wheat from Minolta SPAD meter measurements? *European Journal of Agronomy*, 23: 379-391.
- LI, C.Y.; WEISS, D.; GOLDSCHMIDT, E.E. 2003. Girdling affects carbohydrate-related gene expression in leaves, bark and roots of alternate-bearing citrus trees. *Annals of Botany*, 92 (1): 137-143.
- LI, W.D.; WEI, D.; FAN, P.G.; YAN, S.T.; LI, S.H. 2007. Photosynthesis in response to sink-source activity in relation to end products and activities of metabolic enzymes in peach trees. *Tree Physiology*, 27: 1307-1318.
- LOVATT, C.J.; ZENG, Y.; HAKE, K.D. 1988. Demonstration of a change in nitrogen metabolism influencing flower initiation in *Citrus*. *Israel Journal of Botany*, 37: 181-188.
- LOVATT, C.J.; KRUEGER, R.R. 2015. Morphological and yield characteristics of 'Washington' navel orange and 'Tahiti' lime trees produced with buds from "floral" versus "vegetative" mother shoots. *Acta Horticulturae*, 3 (1065): 1831-1837.
- LOWELL, C.; TOMLINSON, P.; KOCH, K. 1989. Sucrose-metabolizing enzymes in transport tissues and adjacent sink structures in developing citrus fruit. *Plant Physiology*, 90: 1394-1402.
- MAAYAN, I.; SHAYA, F.; RATNER, K.; MANI, Y.; LAVEE, S.; AVIDAN, B.; SHAHAK, Y.; OSTERSETZER-BIRAN, O. 2008. Photosynthetic activity during olive (*Olea europaea*) leaf development correlates with plastid biogenesis and Rubisco levels. *Physiologia Plantarum*, 134: 547-558.

- MACHADO, E.C.; SCHMIDT, P.T.; MEDINA, C.L.; RIBEIRO, R.V. 2005. Photosynthetic responses of three *Citrus* species to environmental factors. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 40: 1161-1170.
- MARENCO, R.A.; ANTEZANA-VERA, S.A.; NASCIMENTO, H.C.S. 2009. Relationship between leaf traits and SPAD-502 readings in six amazonian tree species. *Photosynthetica*, 47 (2): 184-190.
- MARTÍNEZ FUENTES, A.; MESEJO, C.; MUÑOZ FAMBUENA, N.; REIG, C.; GONZALES MAS, M.C.; IGLESIAS, D.J.; PRIMO MILLO, E.; AGUSTÍ, M. 2013. Fruit load restricts the flowering promotion effect of paclobutrazol in alternate bearing *Citrus* spp. *Scientia Horticulturae*, 151: 122-127.
- MATT, P.; KRAPP, A.; HAAKE, V.; MOCK, H.P.; STITT, M. 2002. Decreased Rubisco activity leads to dramatic changes of nitrate metabolism, amino acid metabolism and the levels of phenylpropanoids and nicotine in tobacco antisense RBCS transformants. *Plant Journal*, 30: 663-677.
- MATTOS JÚNIOR, D.; BATAGLIA, O.C.; QUAGGIO, J.A. 2005. Nutrição dos citros. In: *Citros* (Ed.): D. MATTOS JÚNIOR; J.D. DE NEGRI; R.M. PIO; J. POMPEU JUNIOR. Campinas: Instituto Agronômico e Fundag, pp. 197-219.
- MAXWELL, K.; JOHNSON, G.N. 2000. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51: 659-668.
- MECON (Ministerio de economía y finanzas públicas). 2011. Complejo citrícola: Limón. Acceso: 24/01/2014.  
[http://www.mecon.gov.ar/peconomica/docs/Complejo\\_Citricola\\_%20Limon.pdf](http://www.mecon.gov.ar/peconomica/docs/Complejo_Citricola_%20Limon.pdf)
- MEHOUACHI, J.; SERNA, D.; ZARAGOZA, S.; AGUSTÍ, M.; TALON, M.; PRIMO-MILLO, E. 1995. Defoliation increases fruit abscission and reduces carbohydrates levels in developing fruit and woody tissues of *Citrus unshiu*. *Plant Science*, 107: 189-197.
- MEHOUACHI, J.; IGLESIAS, D.; AGUSTÍ, M.; TALON, M. 2009. Delay of early fruitlet abscission by branch girdling in *Citrus* coincides with previous increases in carbohydrate and gibberellin concentrations. *Plant Growth Regulation*, 58:15-23.
- MESEJO, C.; YUSTE, R.; MARTÍNEZ-FUENTES, A.; REIG, C.; IGLESIAS, D.J.; PRIMO-MILLO, E.; AGUSTÍ, M. 2013. Self-pollination and parthenocarpic ability in

- developing ovaries of self-incompatible Clementine mandarins (*Citrus clementina*). *Physiologia Plantarum*, 148: 87-96.
- MESEJO, C.; YUSTE, R.; REIG, C.; MARTÍNEZ-FUENTES, A.; IGLESIAS, D.J.; MUNOZ-FAMBUENA, N.; BERMEJO, A.; GERMANÀ, M.A.; PRIMO-MILLO, E.; AGUSTÍ, M. 2016. Gibberellin reactivates and maintains ovary-wall cell division causing fruit set in parthenocarpic *Citrus* species. *Plant Science*, 247: 13-24.
- MESEJO, C.; MARTÍNEZ-FUENTES, A.; REIG, C.; AGUSTÍ, M. 2019. The flower to fruit transition in *Citrus* is partially sustained by autonomous carbohydrate synthesis in the ovary. *Plant Science*, 285: 224-229.
- MGAP (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca). 1979. Índice de productividad de grupos CONEAT. 167p.
- MGAP-DIEA. 2014. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca a través de Estadísticas Agropecuarias comunica: Resultados de la encuesta citrícola primavera 2014. Acceso: 7/01/2015. <http://www.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2,diea,diea-ipr-produccion-vegetal-citricultura>.
- MICHELOUD, N.; PILATTI, R. 2014. Cítricos (Cap. 2). En: GARIGLIO, N.F.; BOUZO, C.; TRAVADELO, M.R. (eds.). Cultivos frutales y ornamentales para zonas templado-cálidas. Experiencias en la zona central de Santa Fe. Ediciones UNL. Santa Fe, Argentina. pp. 25-49.
- MICHELOUD, N.G.; CASTRO, D.C.; FAVARO, M.A.; BUYATTI, M.A.; PILATTI, R.A.; GARIGLIO, N.F. 2017. Respuesta de diferentes variedades de cítricos a los daños causados por fuertes heladas. *Revista UNCuyo*, 48 (2): 43-56.
- MICHELOUD, N.G.; CASTRO, D.C.; BUYATTI, M.A.; GABRIEL, P.M.; GARIGLIO, N.F. 2018. Factors affecting phenology of different *Citrus* varieties under the temperate climate conditions of Santa Fe, Argentina. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, 40 (1): 1-10. <http://dx.doi.org/10.1590/0100-29452018315>
- MLINARIĆ, S.; ANTUNOVIĆ DUNIĆ, J.; ŠTOLFA, I.; CESAR, V.; LEPEDUŠ, H. 2016. High irradiation and increased temperature induce different strategies for competent photosynthesis in young and mature fig leaves. *South African Journal of Botany*, 103: 25-31.

- MONERRI, C.; FORTUNATO-ALMEIDA, A.; MOLINA, R.V.; NEBAUER, S.G.; GARCÍA-LUIS, A.; GUARDIOLA, J.L. 2011. Relation of carbohydrate reserves with the forthcoming crop, flower formation and photosynthetic rate, in the alternate bearing 'Salustiana' sweet orange. *Scientia Horticulturae*, 129: 71-78.
- MONSELISE, S.P. 1985. *Citrus* and related genera. In: Handbook of flowering. (Ed.) S.P., MONSELISE. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 275-294.
- MORÓN, A.; MARTINO, D.; SAWCHIK, J. 1999. Manejo y fertilidad de suelos. Ed. INIA. Montevideo, Uruguay. 165p.
- MUÑOZ- FAMBUENA, N.; MESEJO, C.; GONZALES-MAS, M.C.; PRIMO-MILLO, E.; AGUSTÍ, M.; IGLESIAS, D. 2011. Fruit regulates seasonal expression of flowering genes in alternate-bearing 'Moncada' mandarin. *Annals of Botany*, 108 (3): 511-519.
- MUÑOZ-FAMBUENA, N.; MESEJO, C.; GONZALES-MAS, M.C.; IGLESIAS, D.; PRIMO-MILLO, E.; AGUSTÍ, M. 2012. Gibberellic acid reduces flowering intensity in Sweet Orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] by repressing CiFT gene expression. *Journal of Plant growth regulation*, 31 (4): 529-536.
- NEBAUER, S.G.; RENAU-MORATA, B.; GUARDIOLA, J.L.; MOLINA, R.V. 2011. Photosynthesis down-regulation precedes carbohydrate accumulation under sink limitation in *Citrus*. *Tree Physiology*, 31: 169-177.
- NEILSEN, D.; HOGUE, E.J.; NEILSEN, G.H.; PARCHOMCHUK, P. 1995. Using SPAD-502 values to assess the nitrogen status of apple trees. *Hortscience*, 30 (3): 508-512.
- NESCIER, C.M.; MICHELOUD, N.G.; RIBERO, G.G. 2017. Utilización de niveles foliares de carbohidratos no estructurales como indicadores productivos en *Citrus*. XXV Jornadas de Jóvenes Investigadores AUGM. Encarnación, Itapúa, Paraguay. 18-20 Octubre.
- NISHIKAWA, F.; ENDO, T.; SHIMADA, T.; FUJII, H.; SHIMIZU, T.; OMURA, M.; IKOMA, Y. 2007. Increased CiFT abundance in the stem correlates with floral induction by low temperature in Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.). *Journal of Experimental Botany*, 58: 3915-3927.
- NORISADA, M.; HARA, M.; YAGI, H.; TANGE, T. 2005. Root temperature drives winter acclimation of shoot water relations in *Cryptomeria japonica* seedlings. *Tree Physiology*, 25: 1447-1455.



- ORDUZ-RODRIGUEZ, J.O.; MONROY, H.J.; FISCHER, G. 2010. Phenological behavior of Arrayana mandarin in the piedemont of the Meta departamento, Colombia. *Agronomía Colombiana*, 28 (1): 63-70.
- OLIVEIRA, C.R.M.; MELLO-FARIAS, P.C.; DE OLIVEIRA, D. S.C.; CHAVES, A.L.S.; HERTER, F.G. 2017. Water availability effect on gas exchanges and on phenology of 'Cabula' orange. *Acta Horticulturae*, 1 (1150): 133-138.
- OTERO, A. 2003. Categorías de floración en los cítricos mandarinas. Hoja de divulgación N° 82. INIA Uruguay. 3p.
- OTERO, A.; GRASSO, R.; RIVAS, F.; GOÑI, C. 2015. Diagnóstico nutricional y Fertirriego: una propuesta dentro de los sistemas de producción intensivos en cítricos. In: INIA (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria); Programa Nacional Producción Citrícola. Resultados de investigación en Citricultura: Genética, Sanidad, Productividad. Salto (Uruguay): INIA, p. 35-40.
- PALACIOS, J. 2005. Citricultura. Imp. Alfa Beta. Buenos Aires, Argentina. 518p.
- PAUL, M.J.; PELLNY, T.K. 2003. Carbon metabolite feedback regulation of leaf photosynthesis and development. *Journal of Experimental Botany*, 54: 539-547.
- PEER, W.; BEVERIDGE, C.; BUSOV, V.; MURPHY, A.; TAIZ, L. 2015. Vegetative Growth and Organogenesis. In: *Plant Physiology and Development*. 6th ed. (Ed.): L. TAIZ; E. ZEIGER; I.M. MOLLER; A. MURPHY. U.S.A, Canada: Sinauer Associates Inc., pp. 553-587.
- PILATTI, R.A.; DOVIS, V.L.; GARIGLIO, N.F.; BUYATTI, M.A.; MICHELOUD, N.G. 2009. Efecto de la fertilización foliar con nitrógeno sobre la floración, el establecimiento de frutos y el rendimiento en cítricos. *Revista FAVE, Sección Ciencias Agrarias*, 8 (2): 19-28.
- PIMENTEL, C.; BERNACCHI, C.; LONG, S. 2007. Limitations to photosynthesis at different temperatures in the leaves of *Citrus limon*. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 19 (2): 141-147.
- RAVEH, E. 2013. *Citrus* leaf nutrient status: A critical evaluation of guidelines for optimal yield in Israel. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 176: 420-428.

- RIBEIRO, R.V.; MACHADO, E.C. 2007. Some aspects of *Citrus* ecophysiology in subtropical climates: re-visiting photosynthesis under natural conditions. Review. Brazilian Journal of Plant Physiology, 19 (4): 393-411.
- RIBEIRO, R.V.; MACHADO, E.C.; SANTOS, M.G.; OLIVEIRA, R.F. 2009. Seasonal and diurnal changes in photosynthetic limitation of young sweet orange trees. Environmental and Experimental Botany, 66: 203-211.
- RIVAS, F.; GRAVINA, A.; AGUSTI, M. 2007. Girdling effects on fruit set and quantum yield efficiency of PSII in two *Citrus* cultivar. Tree Physiology, 27: 527-535.
- RIVAS, F.; FORNES, F.; AGUSTI, M. 2008. Girdling induces oxidative damage and triggers enzymatic and non enzymatic antioxidative defences in *Citrus* leaves. Environmental and Experimental Botany, 64: 256-263.
- RIVAS, F.; MARTÍNEZ-FUENTES, A.; MESEJO, C.; REIG, C.; AGUSTÍ, M. 2010. Efecto hormonal y nutricional del anillado en frutos de diferentes tipos de brotes de cítricos. Agrociencia, XIV (1): 8-14.
- RIVAS, F.; FORNES, F.; RODRIGO, M.J.; ZACARÍAS, L.; AGUSTÍ, M. 2011. Changes in carotenoids and ABA content in *Citrus* leaves in response to girdling. Scientia Horticulturae, 127: 482-487.
- ROMERO, P.; RODRIGO, M.J.; ALFEREZ, F.; BALLESTER, A.R.; GONZÁLEZ-CANDELAS, L.; ZACARÍAS, L.; LAFUENTE, M.T. 2012. Unravelling molecular responses to moderate dehydration in sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) by using a fruit-specific ABA-deficient mutant. Journal of Experimental Botany, 63 (7): 2753-2767.
- SAITO, A.; FUKASAWA, A.T.; IGARASHI, M.; SATO, T.; SUZUKI, M. 2007. Self-compatibility of 3 apple *Malus pumila* cultivars and identification of S-allele genotypes in their self-pollinated progenies. Horticulture Research, 6: 27-32.
- SANTOS, C.M.A.; RIBEIRO, R.V.; MAGALHÃES FILHO, J.R.; MACHADO, D.F.S.P.; MACHADO, E.C. 2011. Low substrate temperature imposes higher limitation to photosynthesis of orange plants as compared to atmospheric chilling. Photosynthetica, 49 (4): 546-554.
- SCHIJLEN, E.; RIC DE VOS, C.H.; MARTENS, S.; JONKER, H.H.; ROSIN, F.M.; MOLTHOFF, J.W.; TIKUNOV, Y.M.; ANGENENT, G.C.; VAN TUNEN, A.J.;

- BOVY, A.G. 2007. RNA interference silencing of chalcone synthase, the first step in the flavonoid biosynthesis pathway, leads to parthenocarpic tomato fruits. *Plant Physiology*, 144: 1520-1530.
- SCHOLBERG, J.M.S.; PARSON, L.R.; WHEATON, T.A.; MCNEAL, B.L.; MORGAN, K.T. 2002. Soil temperature, nitrogen concentration, and residence time affects nitrogen uptake efficiency in *Citrus*. *Environmental Quality*, 31: 759-768.
- SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria). 2012. Oficina de comercio exterior. Estadísticas: certificaciones del SENASA a productos de origen animal y vegetal. Acceso: 24/01/2014. <http://www.senasa.gov.ar/estadistica.php#>
- SHINDE, S.; VILLAMOR, J.G.; LIN, W.; SHARMA, S.; VERSLUES, P.E. 2016. Proline Coordination with Fatty Acid Synthesis and Redox Metabolism of Chloroplast and Mitochondria. *Plant Physiology*, 172 (2):1074-1088. doi: 10.1104/pp.16.01097.
- SOUTHWICK, S.; DAVENPORT, T. 1986. Characterization of water stress and low temperature effects on flower induction in *Citrus*. *Plant Physiology*, 81: 26-29.
- SPAZIANI PEREIRA, C.; SIQUEIRA, D.L.D.; SANTOS, D.D.; SALOMÃO, L.C.C.; CECON, P.R. 2010. Crescimento vegetativo e intensidade de cor verde das folhas de limeira ácida 'Tahiti' anelada e tratada com ácido giberélico. *Ciência Rural*, 40 (9): 1916-1921.
- SPONSEL, V.M.; HEDDEN, P. 2004. Gibberellin biosynthesis and inactivation. En: DAVIES, P.J. (Ed.) *Plant Hormones: biosynthesis, signal transduction, action*. Ithaca EE.UU. pp. 63-94.
- SYVERTSEN, J.P.; LLOYD, J.J. 1994. *Citrus* Chapter 4. In: *Handbook of Environmental Physiology of Fruit Crops. Volume II: Subtropical and Tropical Crops*. (Eds): B. SHAFFER; P.C. ANDERSEN. CRC Press, Inc. Florida (USA). pp. 65-99.
- SYVERTSEN, J.P.; GOÑI, C.; OTERO, A. 2003. Fruit load and canopy shading affect leaf characteristics and net gas exchange of Spring navel orange trees. *Tree Physiology*, 23: 899-906.
- TADEO, F.; MOYA, J.L.; IGLESIAS, D.; TALON, M.; RPIMO-MILLO, E. 2003. *Histología y Citología de Cítricos*. Ed. Generalitat Valenciana. Valencia, España. 99p.
- TALÓN, M. 1997. Regulación del cuajado del fruto en cítricos. Evidencias y conceptos. *IVIA. Levante Agrícola*, 36 (338): 27-37.

- TALÓN, M.; HEDDEN, P.; PRIMO-MILLO, E. 1990. Gibberellins in *Citrus sinensis*: a comparison between seeded and seedless varieties. *Plant growth Regulation*, 9: 201-206.
- TALÓN, M.; JUAN, M.; SOLER, J.; AGUSTÍ, M.; PRIMO-MILLO, E. 1999. Criterios de racionalización de las aplicaciones de ácido giberélico para mejorar el cuajado de los frutos cítricos. *Levante Agrícola*, 347:128-133.
- TRAVADELO, M.; BORTOLUZZI, A.; MAINA, M.; JUSTO, A.; MICHELOUD, N. 2017. Localización de planta de empaque asociativa de productores frutícolas del centro de Santa Fe, Argentina. *Agroalimentaria*, 23 (44): 123-131.
- TRUEMAN, S.J. 2010. Benzyladenine delays immature fruit abscission but does not affect final fruit set or kernel size of Macadamia. *African Journal of Agricultural Research*, 5 (12): 1523-1530.
- VAN KOOTEN, O.; SNELL, J.F.H. 1990. The use of chlorophyll fluorescence nomenclature and plant stress physiology. *Photosynthesis Research*, 25: 147-150.
- VASCONCELOS-RIBEIRO, R.; CARUSO MACHADO, E.; BRUNINI, O. 2006. Ocorrência de condições ambientais para a indução do florescimento de laranjeiras no estado de Sao Paulo. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 28 (2): 247-253.
- VU, J.C.V.; 1999. Photosynthetic responses of *Citrus* to environmental changes. In: *Handbook of Plant and Crop Stress*. (Ed.): M. PESSARAKLI. Marcel Dekker, New York. pp. 947-961.
- WALLERSTEIN, I.; GOREN, R.; MONSELISE, S.P. 1974. The effect of girdling on starch accumulation in sour oranges seedlings. *Canadian Journal of Botany*, 52: 935-937.
- YAMANISHI, O.K.; NAKAJIMA, Y.; HASEGAWA, K. 1993. Effect of late season trunk strangulation on fruit quality, return bloom and fruiting in Pummelo trees grown in a plastic house. *Japanese Society for Horticultural Science*, 62 (2): 337-343.
- ZHANG, W.W.; FUA, X.Z.; PENG, L.Z.; LING, L.L.; CAO, L.; MA, X.H.; XIE, F.; LI, C. 2013. Effects of sink demand and nutrient status on leaf photosynthesis of spring-cycle shoot in 'Newhall' navel orange under natural field conditions. *Scientia Horticulturae*, 150: 80-85.
- ZIMMERMANN, M.H.; ZIEGLER, H. 1975. List of sugars and sugar alcohols in sieve-tube exudates. In: *Transport in Plants: Phloem Transport*. (Eds): M.H. ZIMMERMANN; J.A. MILBURN. Springer, New York. pp. 480-503.

## 9. ANEXOS

### Anexo 1. Condiciones ambientales y balance hídrico del suelo durante el periodo comprendido en la experiencia

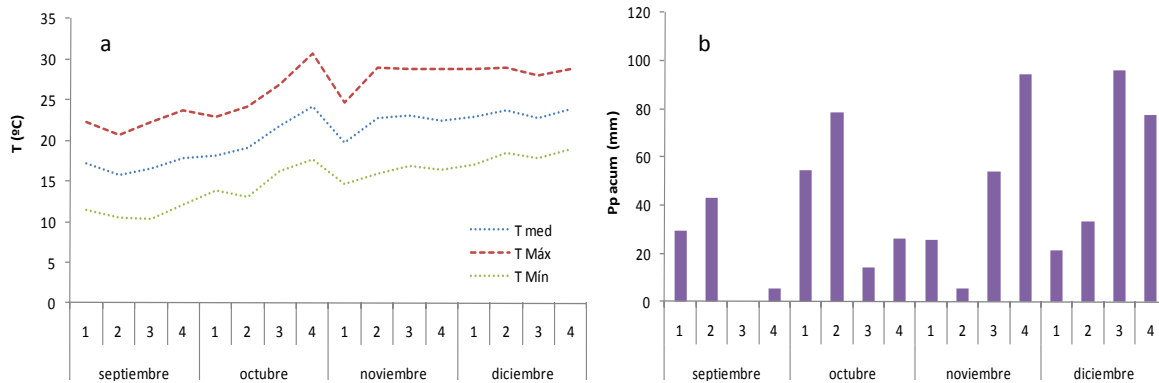


Figura 1. Evolución de: (a) temperatura (°C) media (T med), máxima (T Máx) y mínima (T Mín) y (b) Precipitación (mm) acumulada (Pp acum) semanal, durante la estación primaveral, donde fue realizada la experiencia, en la localidad de Salto (Uruguay).

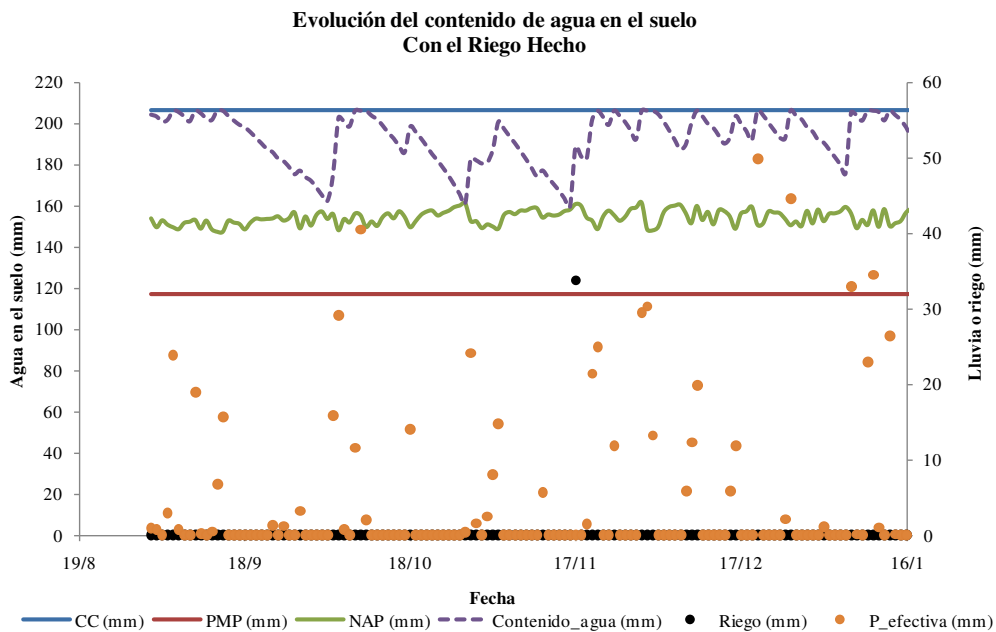


Figura 2. Evolución del Balance Hídrico del suelo en las condiciones del experimento de 'Navelate' durante la estación primaveral, en la localidad de Salto (Uruguay).

**Anexo 2. Resultados estadísticos de intensidad de floración (IF) de las plantas de ‘Navelate’ seleccionadas para el ensayo.**

Análisis de la varianza: Intensidad de floración (IF)

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
IF	288	0,06	0,02	60,03

Tabla 1. Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	30787,34	80	384,84	1,64	0,0946
planta	24374,99	71	343,31	1,86	0,0767
rama	6412,35	3	2137,45	1,14	0,3333
Error	519383,77	277	1875,03		
Total	550171,11	287			

**Anexo 3. Evolución de la tasa relativa de abscisión de estructuras reproductivas, según tipos de brotes**

Tabla 2. Comparación de la tasa relativa de abscisión de frutos durante la primavera, según el tipo de brote del naranjo ‘Navelate’.

Tipo de brote	Tasa Relativa de caída de frutos (frutos.día <sup>-1</sup> )					
	29/09	13/10	27/10	10/11	24/11	17/12
<b>FC</b>	0,02 c	0,03 d	0,03 c	0,04 c	0,05 a	0,005 a
<b>FS</b>	0,03 b	0,14 a	0,06 a	0,03 c	0,02 b	0,00 a
<b>RF</b>	0,04 a	0,09 b	0,07 a	0,11 a	0,05 a	0,01 a
<b>RM</b>	0,02 c	0,05 c	0,05 b	0,09 b	0,06 a	0,01 a

FC: brote campanero, FS: flor solitaria, RF: ramillete floral, RM: brote mixto. Medias de cada columna seguidas de igual letra no indican diferencias significativas, según test de  $LSD \leq 0,05$ .

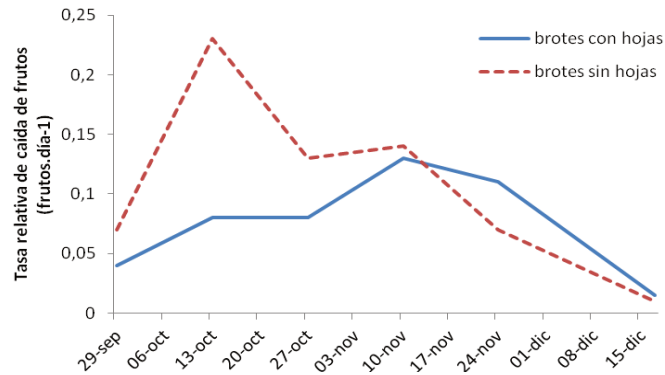


Figura 3. Tasa relativa de abscisión de frutos (frutos.día<sup>-1</sup>), durante la primavera, según el tipo de brote del naranjo ‘Navelate’. Brotos con hojas: BC: brote campanero y BM: brote mixto; brotes sin hojas: FS: flor solitaria y RF: ramillete floral.

#### Anexo 4. Evolución del porcentaje de retención de frutos, según tipos de brotes

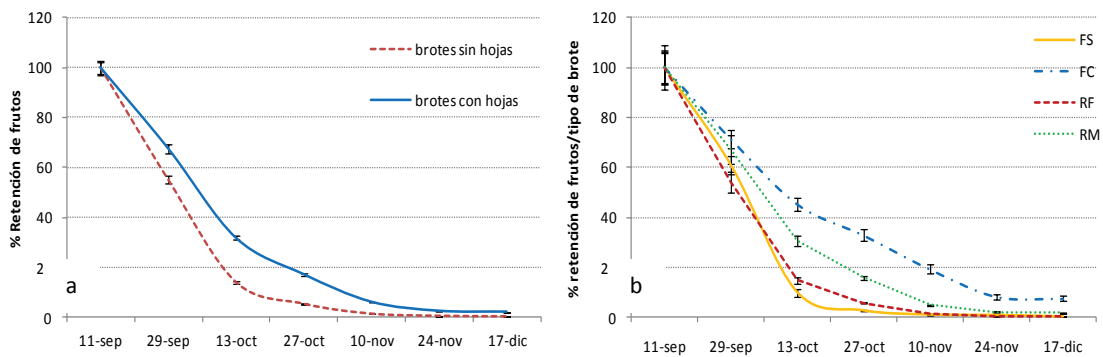


Figura 4. Evolución del porcentaje de retención de frutos, durante la primavera: (a) agrupados en brotes con o sin hojas, y (b) discriminado según el tipo de brote en ‘Navelate’. Brotos con hojas: FC: brote campanero y RM: brote mixto; brotes sin hojas: FS: flor solitaria y RF: ramillete floral.

**Anexo 5. Interacción de los factores ‘aplicación de ácido giberélico a la caída de pétalos’ y ‘rayado de ramas a los 15 días posteriores’, sobre el cuajado de frutos (%) de los brotes mixtos (BM)**

El rayado mejoró el cuajado de frutos de los brotes mixtos en las plantas no tratadas previamente con AG<sub>3</sub>; mientras que no se observaron diferencias en el cuajado de frutos en respuesta al Rayado de ramas en las plantas tratadas previamente con 50 ppm de AG<sub>3</sub> (Tabla 3).

Tabla 3: Interacción de los factores ‘aplicación de ácido giberélico a la caída de pétalos’ y ‘rayado de ramas a los 15 días posteriores’, sobre el cuajado de frutos (%) de los brotes mixtos (BM) de ‘Navelate’.

<b>Cuajado de frutos BM (%)</b>			
	Dosis de AG <sub>3</sub>	0 ppm	50 ppm
Aplicación de	-R	0,67 b	1,24 a
Rayado	+R	1,80 a	1,52 a

Aplicación de 50 ppm de AG<sub>3</sub> a la caída de pétalos: 01/10. -R: sin rayado y +R: con rayado de ramas a los 15 días posteriores a la caída de pétalos: 15/10. Medias con una letra común no son significativamente diferentes, test LSD,  $p \leq 0,05$ .



## **Anexo 6. Efecto de los factores aplicados sobre la evolución del índice SPAD de las hojas maduras y hojas jóvenes del cv. Navelate**

En cuanto al efecto de los factores evaluados, el nivel de nitrógeno inicial no modificó ( $p=0,5694$ ) el índice de verdor de las hojas maduras (Fig. 5 a). Por otro lado, las hojas de la nueva brotación tuvieron en promedio un valor SPAD mayor con la menor dosis de nitrógeno inicial (N1: 800g urea) en comparación con la dosis N2 de 1300g de urea ( $p=0,0002$ ). En estas hojas, este factor presentó una interacción con la fecha de evaluación ( $p<0,0001$ ), ya que en algunas de ellas el nivel N1 no logró diferenciarse de forma significativa con el nivel N2 (Fig. 5 b).

La aplicación de  $AG_3$  afectó el índice de verdor en las hojas desarrolladas, las cuales disminuyeron el valor medio de índice SPAD con la aplicación de 50 ppm de  $AG_3$  ( $p=0,0258$ ). La interacción entre la fecha y la aplicación de  $AG_3$  ( $p=0,0422$ ) se debe a que sólo se observaron diferencias significativas en los registros obtenidos a los 7 días posteriores a la aplicación de este tratamiento, a favor de las plantas control para ambos tipos de hojas (Fig. 5 c y 5 d).

El rayado de ramas, disminuyó el índice de verdor en ambos tipos de hojas ( $p=0,0122$  y  $p<0,0001$ ). Esto fue observado en las hojas maduras en las fechas 28/10 y 17/12 (Fig. 5 e) y en las hojas jóvenes en todas las fechas de registro después de la aplicación del rayado (Fig. 5 f), por lo cual resultó significativa la interacción fecha y rayado ( $p=0,0316$ ).

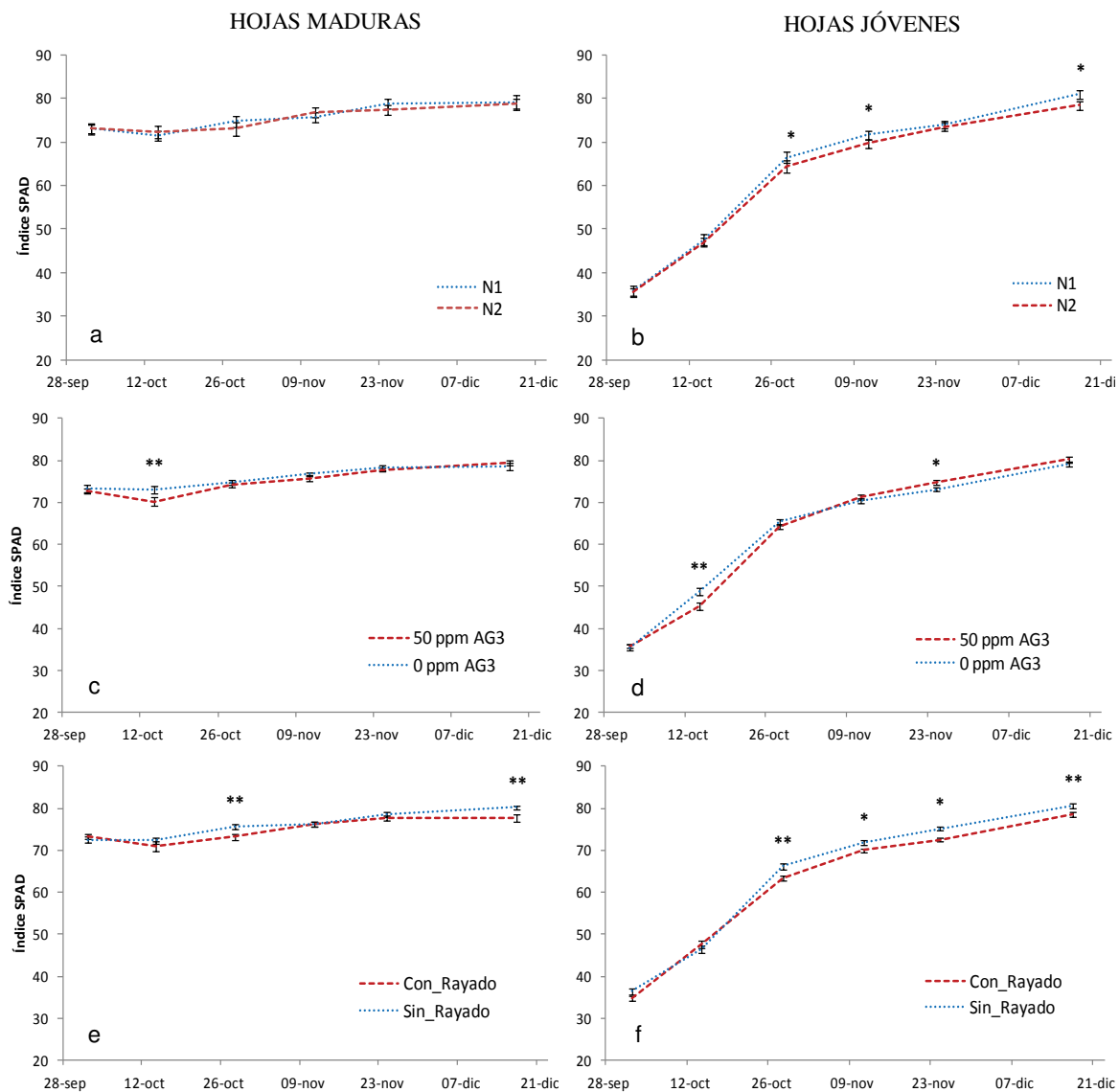


Figura 5. Efecto de los factores: (a, b) nivel de nitrógeno de la fertilización inicial, (c, d) aplicación de giberelina a la caída de pétalos, y (e, f) rayado de ramas, sobre la evolución del índice SPAD de hojas maduras y hojas jóvenes, de 'Navelate'. Líneas verticales indican el error estándar y las medias seguidas de asterisco simple (\*) o doble (\*\*) indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$  y  $\leq 0,01$ , respectivamente), test LSD. N1: 800g y N2: 1300g de urea por planta, aplicación 11/09. AG<sub>3</sub>: 0 y 50 ppm por planta, aplicación 01/10, y rayado de ramas, aplicación 15/10.

## **Anexo 7. Efecto de los factores aplicados sobre la evolución del contenido de nitrógeno foliar del cv. Navelate**

En las hojas maduras, el efecto de la fertilización inicial con nitrógeno fue dependiente de la fecha, siendo la interacción significativa entre estos factores ( $p=0,0123$ ). A mediados de octubre, las plantas que recibieron el tratamiento N1 tuvieron mayores contenidos foliares de nitrógeno (%MS) en relación al tratamiento N2, sin diferenciarse luego en las demás fechas analizadas (Fig. 6 a). Por el contrario, en las hojas jóvenes el nivel N2 fue superior a N1 en la última semana de octubre, sin diferencias en las demás fechas del periodo analizado (Fig. 6 b).

En ambos tipos de hojas fueron observadas interacciones significativas entre la aplicación de AG<sub>3</sub> y la fecha de análisis (hoja madura  $p=<0,0001$  y hoja joven  $p=0,0191$ ), teniendo en cuenta que en las hojas maduras los niveles foliares de nitrógeno del tratamiento con 50 ppm de AG<sub>3</sub> fueron inferiores en relación con el control durante el mes de noviembre (Fig. 6 c), mientras que en las hojas jóvenes las diferencias se expresaron entre fines de octubre y mediados de noviembre (Fig. 6 d).

La interacción significativa entre el rayado de ramas y la fecha de observación se debe a que en las hojas maduras ( $p=0,0001$ ), a fines de octubre el tratamiento control superó al tratamiento de rayado en el contenido de nitrógeno, mientras que a mediados de noviembre se observó el comportamiento inverso (Fig. 6 e). En las hojas jóvenes ( $p=0,0204$ ), el contenido de nitrógeno a mediados de noviembre fue superior cuando se aplicó rayado en relación al control sin tratar, mientras que no se observaron diferencias entre medias en las demás fechas observadas del periodo analizado (Fig. 6 f).

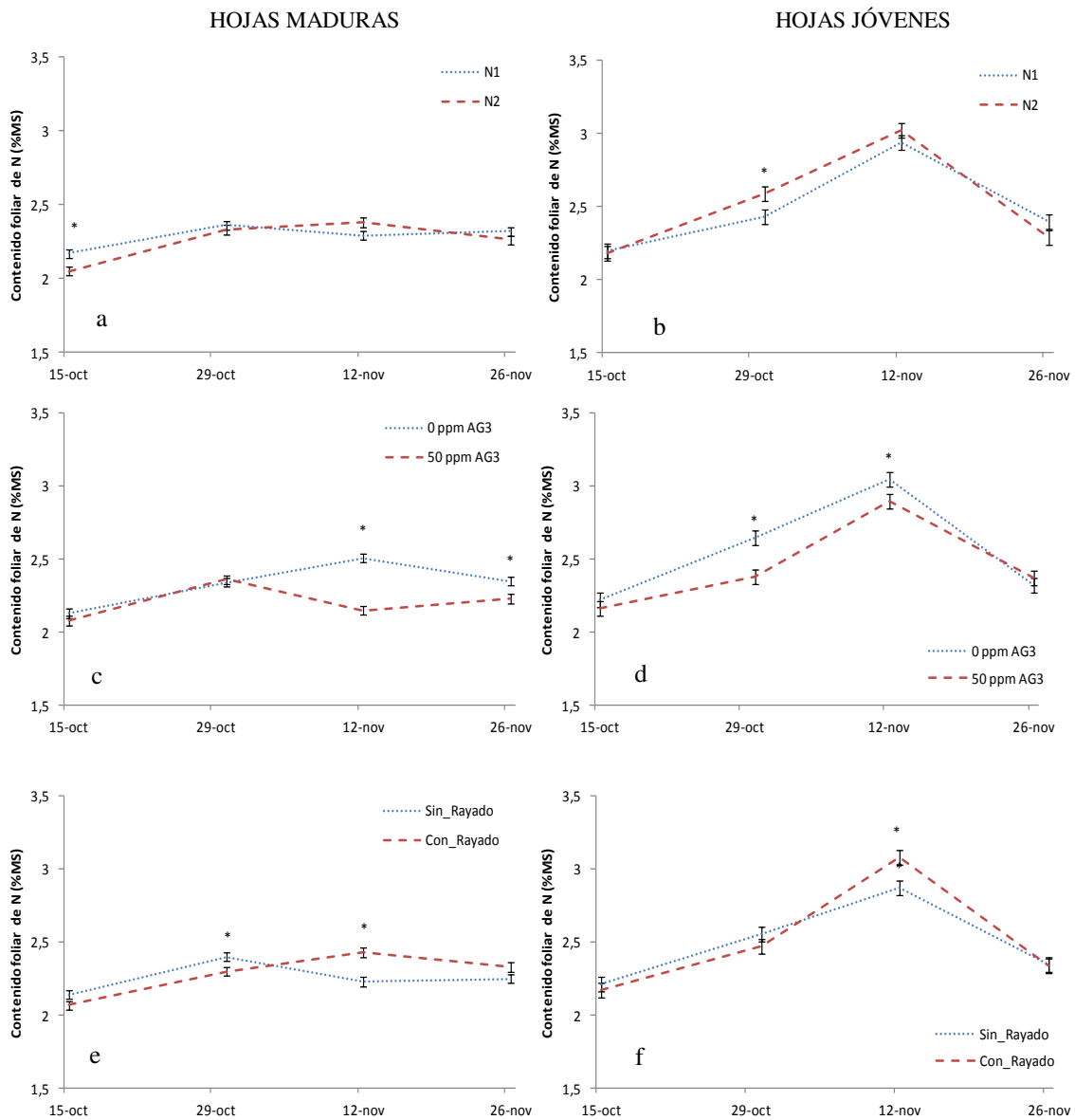


Figura 6. Efecto de los factores: (a, b) nivel de nitrógeno de la fertilización inicial, (c, d) aplicación de giberelina a la caída de pétalos, y (e, f) rayado de ramas, sobre la evolución del contenido de nitrógeno (%MS) de hojas maduras y hojas jóvenes, del cv. Navelate. Líneas verticales indican el error estándar y las medias seguidas de asterisco (\*) indica diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ), test LSD. N1: 800g y N2: 1300g de urea por planta, aplicación 11/09. AG<sub>3</sub>: 0 y 50 ppm por planta, 01/10. Rayado de ramas, 15/10.

## **Anexo 8. Efecto de los factores principales aplicados sobre la evolución de los parámetros del intercambio gaseoso del metabolismo fotosintético de las hojas maduras y hojas jóvenes del cv. Navelate**

En las hojas maduras del cv. 'Navelate', los principales efectos de la aplicación de la dosis superior de nitrógeno de la fertilización inicial (N2) fueron el aumento de niveles la asimilación neta del CO<sub>2</sub> (ACO<sub>2</sub>,  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), la conductancia estomática (Gs,  $\text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) y de la eficiencia del uso del agua (EUA,  $\mu\text{mol CO}_2/\text{mol H}_2\text{O}$ ), y una disminución de los valores de déficit de presión de vapor (DPV, mb) en comparación al uso de la menor dosis nitrogenada (N1) ( $p=0,0008$ ,  $0,0096$ ,  $0,0231$  y  $0,0028$ , respectivamente). La aplicación de ácido giberélico (AG<sub>3</sub>) a la caída de pétalos no tuvo efectos de importancia en los principales parámetros del intercambio gaseoso del metabolismo fotosintético de las hojas maduras, únicamente indujo la disminución de los valores en la relación CO<sub>2</sub> interno/CO<sub>2</sub> del aire (Ci/Ca) ( $p=0,0003$ ). En cuanto a la ejecución del tratamiento de rayado de ramas, se observó una disminución de los parámetros de ACO<sub>2</sub> y de EUA, con un aumento del DPV, en estas hojas ( $p=0,0195$ ,  $0,0001$  y  $0,0041$ , respectivamente).

En las hojas jóvenes del cv. 'Navelate' no se observaron cambios en los parámetros ACO<sub>2</sub> y EUA en función de la diferente dosis de nitrógeno de la fertilización inicial. Por otro lado, los tratamientos aplicados de AG<sub>3</sub> y de rayado de ramas provocaron una disminución de los valores medios de la ACO<sub>2</sub> de las hojas jóvenes ( $p=0,0383$  y  $0,0180$ , respectivamente).

Debido a la influencia de la interacción de la fecha de medición con los factores de manejo evaluados, se describió la evolución en el tiempo del efecto de los factores individuales (Anexos 9, 10 y 11).

## **Anexo 9. Efecto de la dosis de nitrógeno de la fertilización inicial sobre la evolución de los parámetros del intercambio gaseoso del metabolismo fotosintético de las hojas maduras y hojas jóvenes del cv. Navelate**

En relación a la fertilización nitrogenada, se observó un aumento de la  $ACO_2$  de las hojas maduras cuando la dosis de nitrógeno fue más alta (N2:  $6,45 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  y N1:  $5,52 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) (Fig. 7 a). Al analizar la interacción con la fecha ( $p=0,0043$ ), durante el mes de octubre los niveles de  $ACO_2$  fueron mayores en las plantas con N2, sin presentar diferencias a partir de noviembre. Por otro lado, en las hojas jóvenes el efecto de la fertilización sobre la  $ACO_2$  se fue modificando durante el periodo evaluado ( $p=0,0006$ , Fig. 7 b).

Con respecto a la relación  $C_i/C_a$ , se observó una interacción con la fecha ( $p<0,0001$ ). En las hojas maduras, al inicio del período se observó un mayor nivel de  $C_i/C_a$  en las plantas con la dosis de N2 (Fig. 7 c). Las hojas jóvenes de las plantas con N1 tuvieron en promedio una relación  $CO_2$  interno/ $CO_2$  del aire ( $C_i/C_a$ ) mayor que las hojas de las plantas con dosis N2 ( $p=0,0173$ ). Por otro lado, a mediados de octubre, se observó que el efecto del nitrógeno N2 disminuyó significativamente el valor de esta variable en ambos tipos de hojas (Fig. 7 c, d).

En las hojas maduras la tasa transpiratoria se diferenció solamente en la fecha 15/10 ( $p<0,0001$ ), y además fue superior con la dosis N2 (Fig. 7 e). En cambio, la tasa de transpiración de las hojas jóvenes fue mayor en las plantas con N1 ( $p=0,0317$ ), y este efecto se observó en todas las fechas de medición a excepción del 11/11 (Fig. 7 f).

En cuanto al déficit de presión de vapor (DPV), fue levemente mayor en las plantas con el nivel N1, aunque esta diferencia se observó solamente en la fecha 15/10 (Fig. 7 g, h). Este mismo comportamiento se halló en ambos tipos de hojas, aunque las diferencias fueron más importantes en las hojas maduras ( $p<0,0001$ , Fig. 7 g, h).

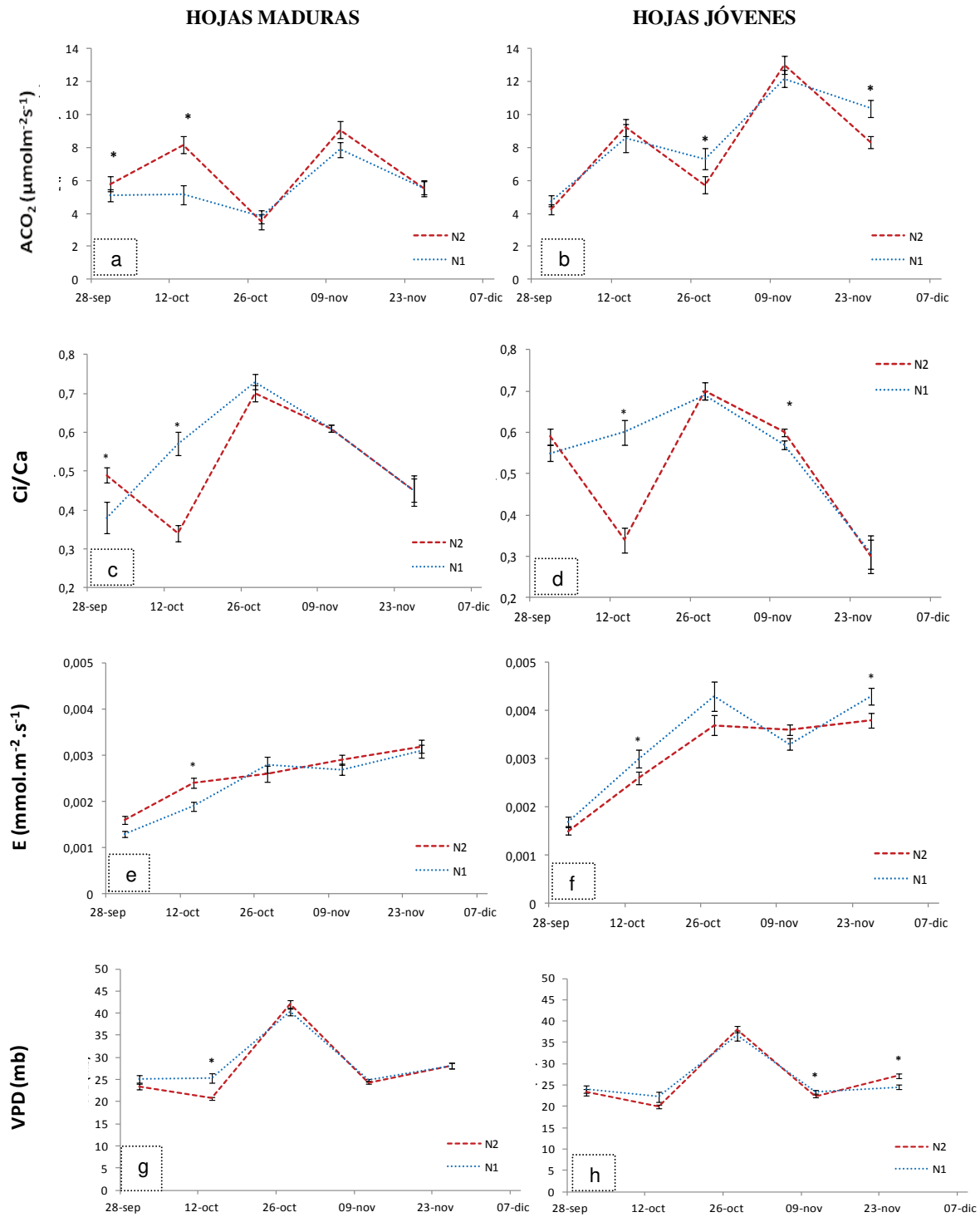


Figura 7. Efectos de la dosis de nitrógeno en la fertilización inicial, sobre: (a,b) asimilación neta del  $\text{CO}_2$  ( $ACO_2$ ,  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), (c,d) relación  $\text{CO}_2$  interno/ $\text{CO}_2$  del aire (Ci/Ca), (e,f) tasa de transpiración (E:  $\text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), y (g,h) déficit de presión de vapor (DPV, mb), en hojas maduras y hojas jóvenes del cv. Navelate. Las líneas verticales indican el error estándar y el asterisco (\*) indica diferencias significativas, test LSD ( $p \leq 0,05$ ). N1: 800g y N2: 1300g de urea por planta, aplicación: 11/09.

En las hojas maduras los valores medios de conductancia estomática ( $G_s$ ,  $\text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) fueron superiores con la dosis más altas de nitrógeno (N1:  $89,82 \text{ mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  y N2:  $101,74 \text{ mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) ( $p=0,0096$ ), mientras que en las hojas jóvenes, sucedió lo contrario (N1:  $143,68 \text{ mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  y N2:  $128,11 \text{ mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) ( $p=0,0096$ ). En ambos casos las principales diferencias fueron encontradas durante el mes de octubre (Fig. 8 a, b).

En relación a la variable eficiencia de uso del agua (EUA,  $\mu\text{mol CO}_2/\text{mol H}_2\text{O}$ ), también existió una interacción con la fecha de medición ( $p=0,0059$  y  $0,0001$ ). La mayor dosis inicial de nitrógeno incrementó significativamente la EUA, solamente en la fecha del 15/10 en ambos tipos de hojas (Fig. 8 c, d).

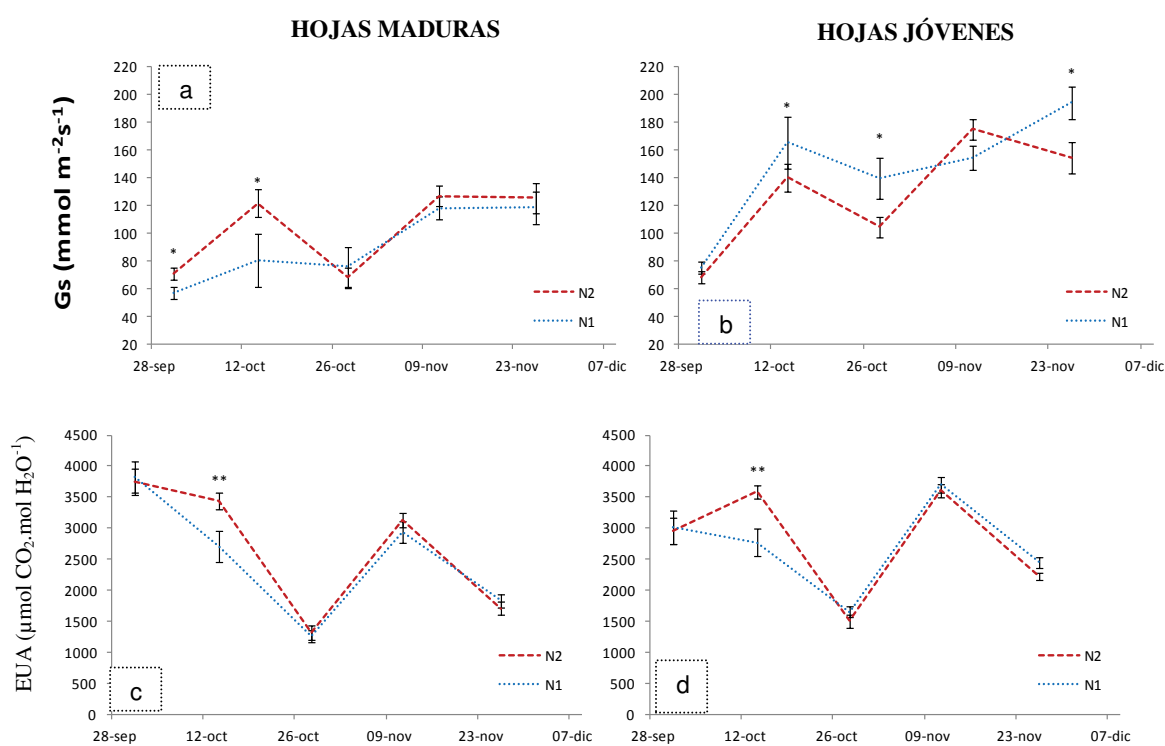


Figura 8. Efectos de la dosis de nitrógeno en la fertilización inicial, sobre: (a,b) conductancia estomática ( $G_s$ ,  $\text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) y (c,d) eficiencia del uso del agua (EUA,  $\mu\text{mol CO}_2/\text{mol H}_2\text{O}$ ) en hojas maduras y hojas jóvenes del cv. Navelate. Las líneas verticales indican el error estándar y los asteriscos (\*; \*\*) indican diferencias significativas entre medias ( $p \leq 0,05$  y  $p \leq 0,01$ , respectivamente), según el test LSD. N1: 800g y N2: 1300g de urea por planta, aplicación 11/09.



## **Anexo 10. Efecto de la aplicación de giberelina a la caída de pétalos sobre la evolución de los parámetros del intercambio gaseoso del metabolismo fotosintético de las hojas maduras y hojas jóvenes del cv. Navelate**

Las hojas de la nueva brotación de las plantas que tuvieron aplicación de 50 ppm de AG<sub>3</sub> resultaron en menores niveles medios de ACO<sub>2</sub>, con respecto a las plantas sin el tratamiento ( $p=0,0383$ ). Este efecto fue significativo en la fecha 15/10 (-40%), en este caso para ambos tipos de hojas ( $p<0,0001$  y  $0,0006$ ; Fig. 9 a, b).

La aplicación de AG<sub>3</sub> incrementó la relación Ci/Ca pero solamente durante el mes de octubre ( $p=0,0007$ , Fig. 9 c, d). Este efecto fue notorio en las hojas maduras ( $p=0,0003$ ; Fig. 9 c). En cambio, en las hojas jóvenes los valores de Ci/Ca prácticamente no fueron modificados por la aplicación de AG<sub>3</sub> (Fig. 9 d).

La aplicación de 50 ppm de AG<sub>3</sub> disminuyó levemente (-3,4%), la tasa transpiratoria. Esta diferencia fue observada en los dos tipos de hojas ( $p<0,0001$ ), siendo expresada durante el mes de octubre (Fig. 9 e, f).

En cuanto a la variable DPV, se observó una interacción nivel de AG<sub>3</sub> y fecha para ambos tipos de hojas ( $p=0,0201$  y  $0,0037$ ). Las hojas de las plantas con aplicación de 50 ppm de AG<sub>3</sub> tuvieron un valor más alto de DPV en la fecha del 15/10, mientras que en las demás fechas no se notaron diferencias (Fig. 9 g, h).

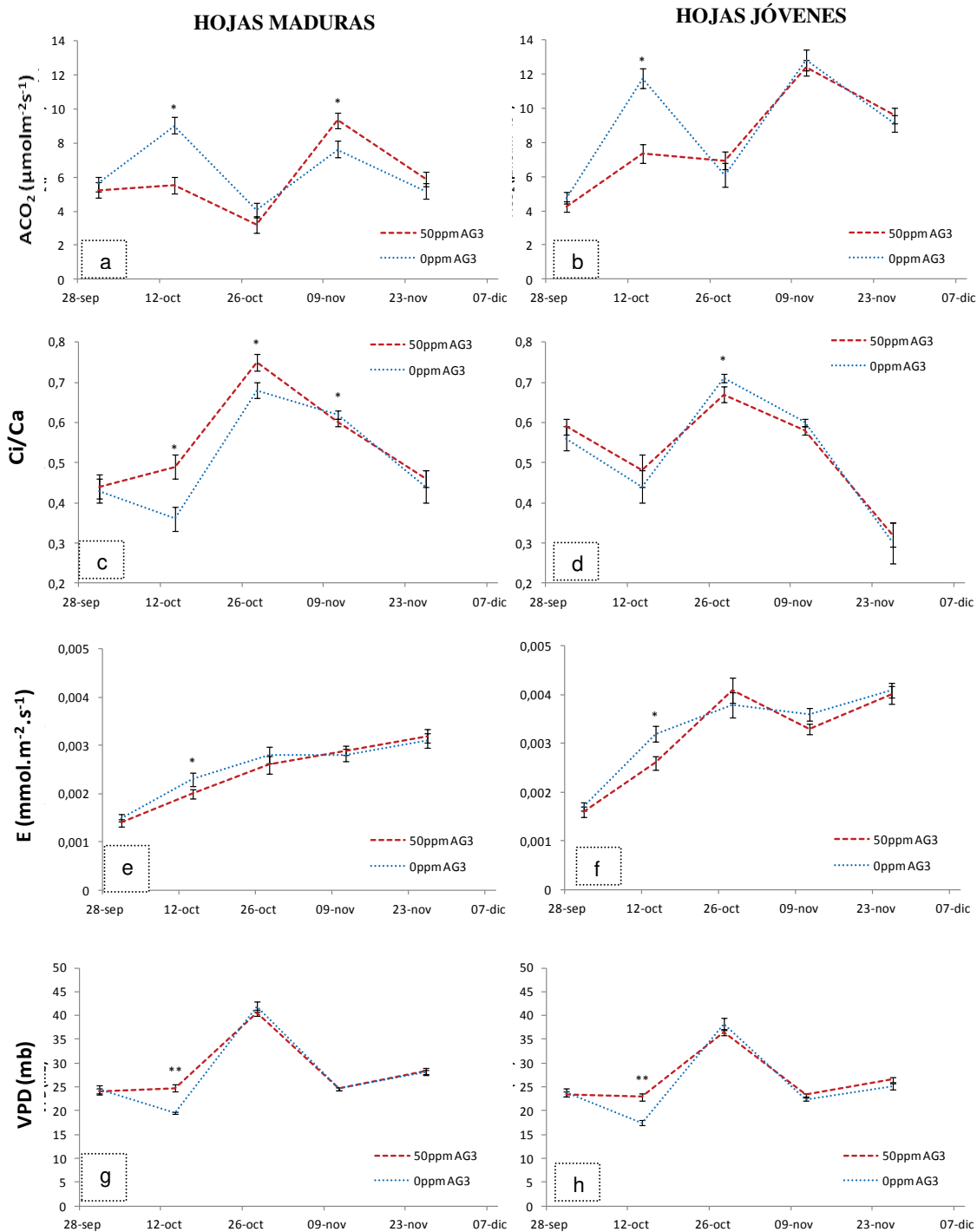


Figura 9. Efectos de la aplicación de aplicación de giberelina a la caída de pétalos, sobre: (a,b) asimilación neta del  $CO_2$  ( $ACO_2$ ,  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), (c,d) relación  $CO_2$  interno/ $CO_2$  del aire ( $C_i/C_a$ ), (e,f) tasa de transpiración ( $E$ :  $\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) y (g,h) déficit de presión de vapor (DPV, mb), en hojas maduras y hojas jóvenes del cv. Navelate. Las líneas verticales indican el error estándar y las medias seguidas de asterisco simple (\*) o doble (\*\*) indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$  y  $\leq 0,01$ , respectivamente), test LSD. Dosis: 50 ppm de  $AG_3$ , aplicación: 01/10.

Las hojas jóvenes de las plantas que no tuvieron la aplicación de AG<sub>3</sub> presentaron una conductancia estomática (Gs) superior que las que fueron rociadas con 50 ppm de AG<sub>3</sub> ( $p=0,0006$ ). La disminución de Gs con la aplicación de AG<sub>3</sub> fue expresada solamente a mediados de octubre ( $p=0,0076$ ) en ambos tipos de hojas (Fig. 10 a, b).

En niveles medios, la aplicación de 50 ppm de AG<sub>3</sub> no afectó la EUA, sin embargo hubo una interacción significativa con la fecha de observación ( $p=0,0004$ ), ya que en la medición del 15/10 la aplicación hormonal redujo la EUA en ambos tipos de hojas (Fig. 10 c, d).

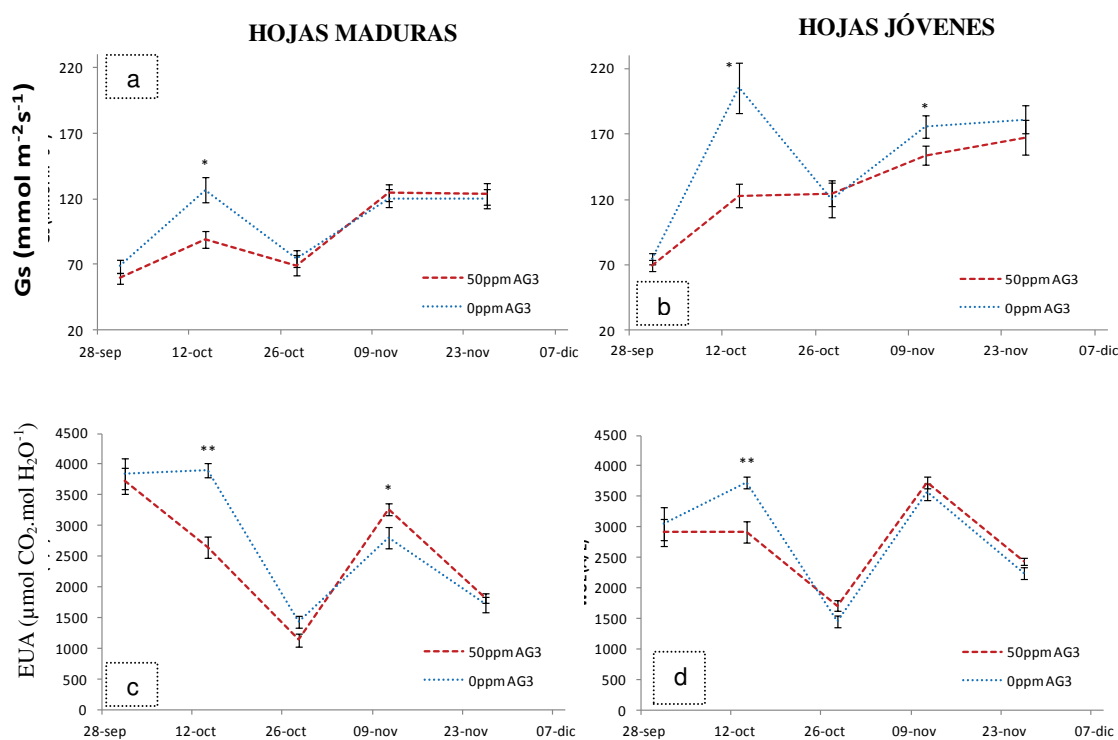


Figura 10. Efectos de la aplicación de giberelina a caída de pétalos, sobre: (a,b) conductancia estomática (Gs, mmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>) y (c,d) eficiencia del uso del agua (EUA, μmol CO<sub>2</sub>/mol H<sub>2</sub>O) en hojas maduras y hojas jóvenes del cv. Navelate. Las líneas verticales indican el error estándar y los asteriscos (\*; \*\*) indican diferencias significativas entre medias ( $p \leq 0,05$  y  $p \leq 0,01$ , respectivamente) entre medias según el test LSD.

## **Anexo 11. Efecto del rayado de ramas sobre la evolución de los parámetros del intercambio gaseoso del metabolismo fotosintético de las hojas maduras y hojas jóvenes del cv. Navelate**

Las plantas que tuvieron rayado resultaron en niveles menores de  $ACO_2$ , EUA, y mayores de DPV con respecto a las plantas sin la aplicación de esta técnica ( $p=0,0195$ ,  $0,0001$  y  $0,0041$ , respectivamente).

Las plantas que tuvieron rayado disminuyeron en un 7,3% sus niveles medios de  $ACO_2$  con respecto al tratamiento control (Fig. 11 a, b). La interacción del tratamiento y la fecha en las hojas jóvenes ( $p<0,0001$ ) se debe a que se observó el efecto contrario a partir del 11/11 (Fig. 11 b).

El rayado de ramas no produjo ningún efecto significativo sobre los valores medios de la variable Ci/Ca (Fig. 11 c, d). Sin embargo, se encontró una interacción entre la aplicación de este tratamiento y la fecha en las hojas jóvenes ( $p=0,0088$ ) a causa de una disminución en los niveles de Ci/Ca en la fecha 15/10 en respuesta al rayado (Fig. 11 d).

En cuanto al parámetro E, fue encontrada una interacción entre rayado y fecha en ambos tipos de hojas ( $p=0,0141$  y  $<0,0001$ ). La disminución de la tasa transpiratoria fue observada en el tratamiento con rayado en la fecha 28/10, y fue más notoria en las hojas jóvenes (Fig. 11 e, g).

Las plantas con rayado expresaron un DPV superior con respecto a las que no tenían la aplicación de esta técnica (27,99 vs. 26,93 mb), aunque la diferencia entre los tratamientos se manifestó solamente en una de las fechas evaluadas (Fig. 11 g, h), resultando significativa la interacción rayado y fecha en las hojas jóvenes ( $p<0,0001$ ).

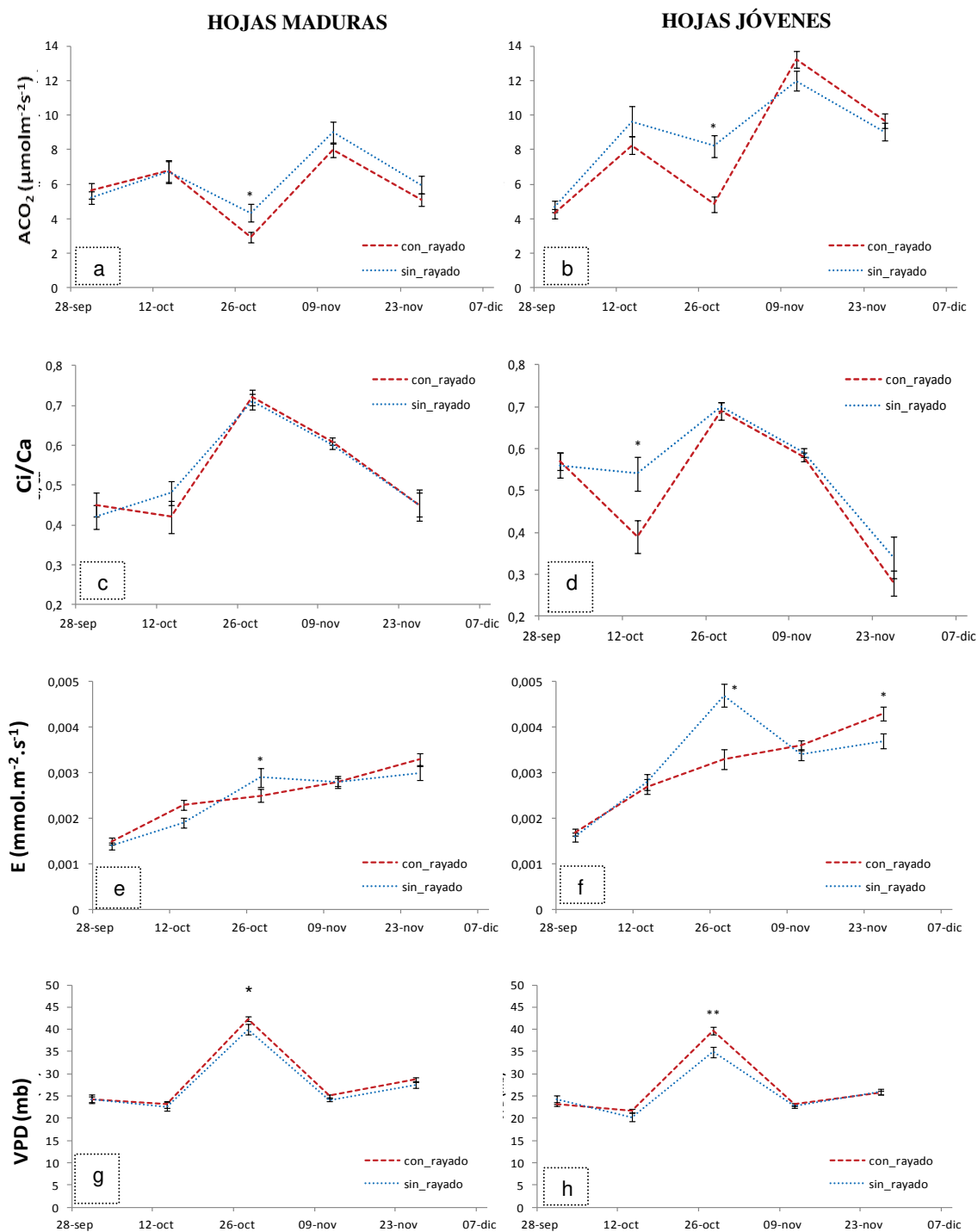


Figura 11. Efectos de la aplicación del rayado de ramas a los 15 días posteriores a la caída de pétalos sobre: (a,b) asimilación neta del  $CO_2$  ( $ACO_2$ ,  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), (c,d) relación  $CO_2$  interno/ $CO_2$  del aire ( $C_i/C_a$ ), (e,f) tasa de transpiración ( $E$ :  $\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) y (g,h) déficit de presión de vapor (DPV, mb), en hojas maduras y hojas jóvenes del cv. Navelate. Las líneas verticales indican el error estándar y las medias seguidas de asterisco simple (\*) o doble (\*\*) indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$  y  $\leq 0,01$ , respectivamente), test LSD. Rayado de ramas: aplicación 15/10.

Con respecto a la variable Gs, la interacción rayado y fecha ( $p < 0,0001$ ) se observó una disminución de este parámetro, hacia fines de octubre, posterior a la aplicación del rayado (Fig. 12 a, b).

La aplicación del rayado provocó una disminución de EUA en aproximadamente un 10% con respecto al control sin tratar en ambos tipos de hojas ( $p = 0,0040$ ; Fig. 12 c, d).

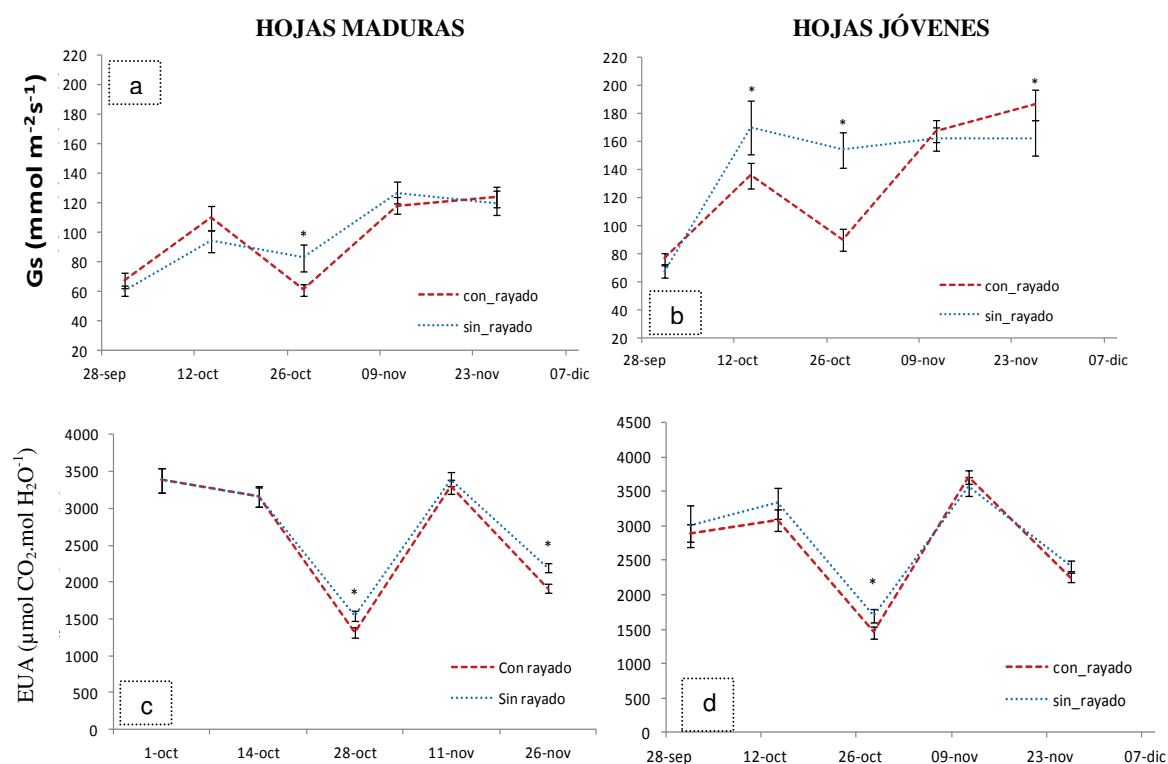


Figura 12. Efectos de la aplicación del rayado de ramas, a los 15 días posteriores a la caída de pétalos (15/10), sobre: (a,b) conductancia estomática (Gs,  $\text{mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) y (c,d) eficiencia del uso del agua (EUA,  $\mu\text{mol CO}_2/\text{mol H}_2\text{O}$ ) en hojas maduras y hojas jóvenes del cv. Navelate. Las líneas verticales indican el error estándar y el asterisco (\*) indica diferencia significativa entre medias ( $p \leq 0,05$ ), según el test LSD.

**Anexo 12. Efecto de las interacciones entre los factores aplicados sobre los parámetros del metabolismo fotosintético de las hojas maduras y de las hojas jóvenes, del cv. ‘Navelate’.**

En cuanto a la interacción de los factores ( $p < 0,0001$ ) sobre la variable Relación de  $\text{CO}_2$  interno/ $\text{CO}_2$  del aire (Ci/Ca), se observaron que, en ambos tipos de hojas, los valores menores correspondieron a las combinaciones N1 con Rayado y N2 control, en relación a las combinaciones de los demás tratamientos (Tabla 4).

Tabla 4: Interacciones entre los efectos de la dosis de nitrógeno (N) en la fertilización inicial, la aplicación de giberelina ( $\text{AG}_3$ ) a la caída de pétalos y de rayado a los 15 días posteriores (R), sobre la Relación  $\text{CO}_2$  interno/ $\text{CO}_2$  del aire (Ci/Ca) de las hojas maduras y de las hojas jóvenes, del cv. Navelate.

Relación $\text{CO}_2$ interno/ $\text{CO}_2$ del aire (Ci/Ca)								
Tipo de hoja	Hojas maduras				Hojas jóvenes			
Nivel de N	N1		N2		N1		N2	
Rayado	-R	+R	-R	+R	-R	+R	-R	+R
0 ppm $\text{AG}_3$	0,59 a	0,47 b	0,47 b	0,53 a	0,62 a	0,48 c	0,44 c	0,55 b
50 ppm $\text{AG}_3$	0,53 a	0,58 a	0,54 a	0,55 a	0,53 b	0,53 b	0,55 b	0,51 b

N1: 800g y N2: 1300g de urea por árbol. -R: sin rayado, +R: con rayado. Fertilización nitrogenada: 11/09, aplicación de  $\text{AG}_3$ : 01/10 y rayado de ramas: 15/10. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (particionado por tipo de hoja), según test de DGC,  $p \leq 0,05$ .

En ambos tipos de hojas del cv. Navelate, la EUA fue mayor en los tratamientos N1 y cuando se utilizó N2 combinado con  $\text{AG}_3$ , en relación a los demás tratamientos aplicados ( $p < 0,0001$ ; Tabla 5).

Tabla 5: Interacciones entre los efectos de la dosis de nitrógeno (N) en la fertilización inicial, la aplicación de giberelina (AG<sub>3</sub>) y de rayado (R), sobre la eficiencia del uso del agua (EUA,  $\mu\text{mol CO}_2/\text{mol H}_2\text{O}$ ) de las hojas maduras y de las hojas jóvenes, del cv. Navelate.

Eficiencia del uso del agua (EUA, $\mu\text{mol CO}_2/\text{mol H}_2\text{O}$ )								
Tipo de hoja	Hojas maduras				Hojas jóvenes			
	N1		N2		N1		N2	
Nivel de N								
Rayado	-R	+R	-R	+R	-R	+R	-R	+R
0 ppm AG <sub>3</sub>	3415,1 a	1972,7 b	2119,3 b	2706,2 b	3638,5 a	2117,8 c	2134,5 c	2703,5 b
50 ppm AG <sub>3</sub>	2091,8 b	2369,5 b	3128,9 a	2457,5 b	2195,8 c	2742,4 b	3249,2 a	2718,9 b

N1: 800g y N2: 1300g de urea por árbol. -R: sin rayado, +R: con rayado. Fertilización nitrogenada: 11/09, aplicación de AG<sub>3</sub>: 01/10 y rayado de ramas: 15/10. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (particionado por tipo de hoja), según test de DGC,  $p \leq 0,05$ .

### Anexo 13. Efecto de los factores aplicados sobre la evolución de los carbohidratos no estructurales de las hojas jóvenes y frutos en fase I, del cv. 'Navelate'.

Las hojas jóvenes de la brotación de primavera presentaron un incremento en el valor de glucosa ( $p=0,0490$ ) con el nivel N2 en comparación a N1, en la fecha de medición correspondiente al 12/11 (Fig. 13).

La aplicación de 50 ppm de AG<sub>3</sub> provocó un incremento en el contenido de glucosa ( $p=0,0001$ ), que se evidenció a los 15 días posteriores a la realización del tratamiento (Fig. 14 a). Por otro lado, modificó el nivel medio del contenido de almidón, disminuyéndolo ( $p<0,0001$ ). Este efecto se mantuvo durante el mes de octubre, mientras que a fin del mes de noviembre se observó un resultado contrario (Fig. 14 b).

La aplicación de rayado produjo un aumento en los niveles foliares de almidón ( $p=0,0002$ ) únicamente en la última fecha del mes de noviembre (Fig. 15).



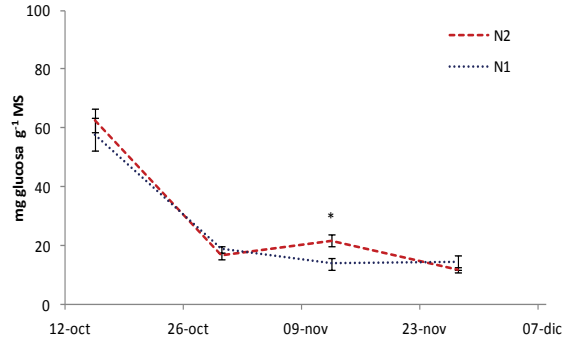


Figura 13. Efecto del nivel de nitrógeno de la fertilización inicial sobre el contenido de glucosa ( $\text{mg.g MS}^{-1}$ ) en **hojas de la brotación nueva** del cv. Navelate. Las líneas verticales indican el error estándar y el asterisco (\*) indica diferencias significativas entre medias, test LSD ( $p \leq 0,05$ ). N1: 800g y N2: 1300g de urea, aplicación 11/09.

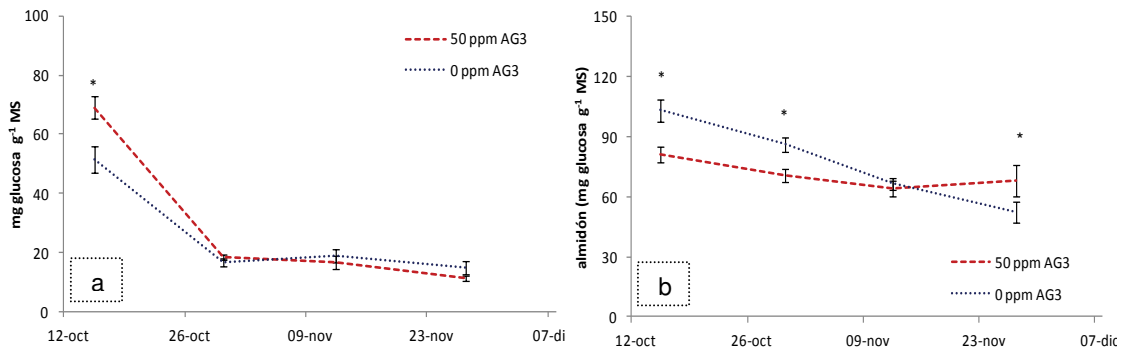


Figura 14. Efecto de la aplicación de giberelina sobre el contenido de: (a) glucosa ( $\text{mg.g MS}^{-1}$ ) y (b) almidón ( $\text{mg glucosa.gMS}^{-1}$ ) en **hojas de la brotación nueva** del cv. Navelate. Las líneas verticales indican el error estándar y el asterisco (\*) indica diferencias significativas entre medias, test LSD ( $p \leq 0,05$ ). (Aplicación de 50 ppm de  $\text{AG}_3$  el 01/10).

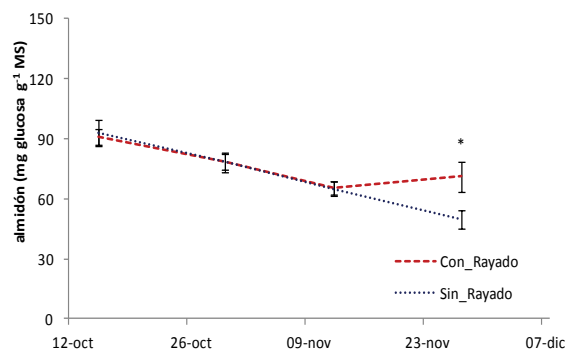


Figura 15. Efecto del rayado de ramas (aplicación 15/10) sobre el contenido de almidón (mg glucosa.g MS<sup>-1</sup>) en **hojas de la brotación nueva** del cv. Navelate. Las líneas verticales indican el error estándar y el asterisco (\*) indica diferencias significativas entre medias, test LSD ( $p \leq 0,05$ ).

Una interacción entre nivel de nitrógeno y fecha fue observada para los contenidos de sacarosa y almidón ( $p=0,0005$  y  $p=0,0006$ , respectivamente). Los frutos en desarrollo presentaron contenidos medios de sacarosa superiores con el nivel N2 en la primera fecha de observación (15/10), mientras que lo contrario ocurrió durante el mes de noviembre (Fig. 16 a). Con respecto al almidón, los frutos del tratamiento N1, expresaron un mayor nivel de almidón en relación a las plantas con N2 hacia fines de octubre, mientras que a mediados de noviembre se observó el efecto contrario (Fig. 16 b).

Los frutos de las plantas que tuvieron el tratamiento de AG<sub>3</sub> presentaron menores contenidos de fructosa y de almidón ( $p=0,0004$  y  $p=0,0104$ , respectivamente) a mediados de noviembre (Fig. 17 b y c). Posteriormente, se observaron mayores niveles de glucosa ( $p=0,0015$ ) y fructosa en la última semana de noviembre, en respuesta a la aplicación de AG<sub>3</sub> (Fig. 17 a y b).

El rayado disminuyó el contenido de almidón de los frutos ( $p=0,0369$ ), siendo significativas las diferencias entre tratamientos en la fecha 12/11 (Fig. 18).

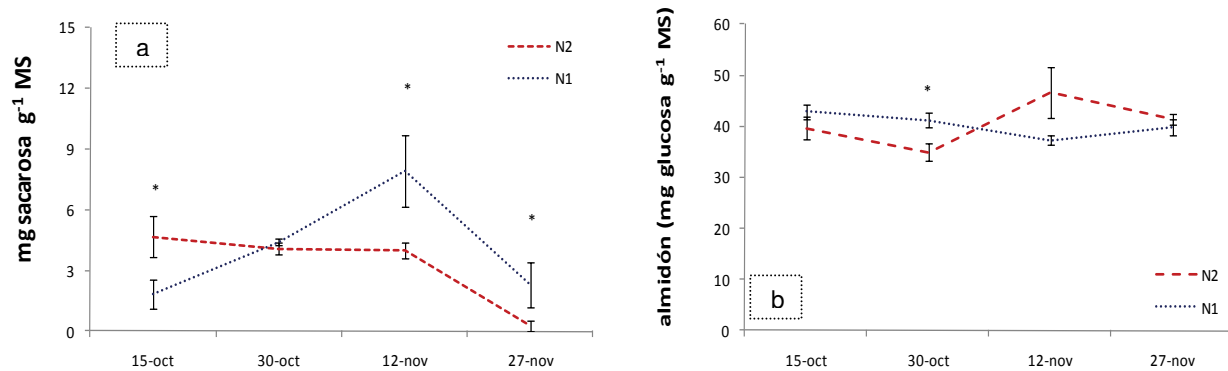


Figura 16. Efectos del nivel de nitrógeno de la fertilización inicial sobre el contenido de: (a) sacarosa ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  MS) y (b) almidón ( $\text{mg glucosa}\cdot\text{g}^{-1}$  MS), en **frutos en etapa I de desarrollo** del cv. Navelate. Las líneas verticales indican el error estándar y el asterisco (\*) indica diferencias significativas entre medias, test LSD ( $p \leq 0,05$ ). N1: 800g y N2: 1300g de urea, aplicación 11/09.

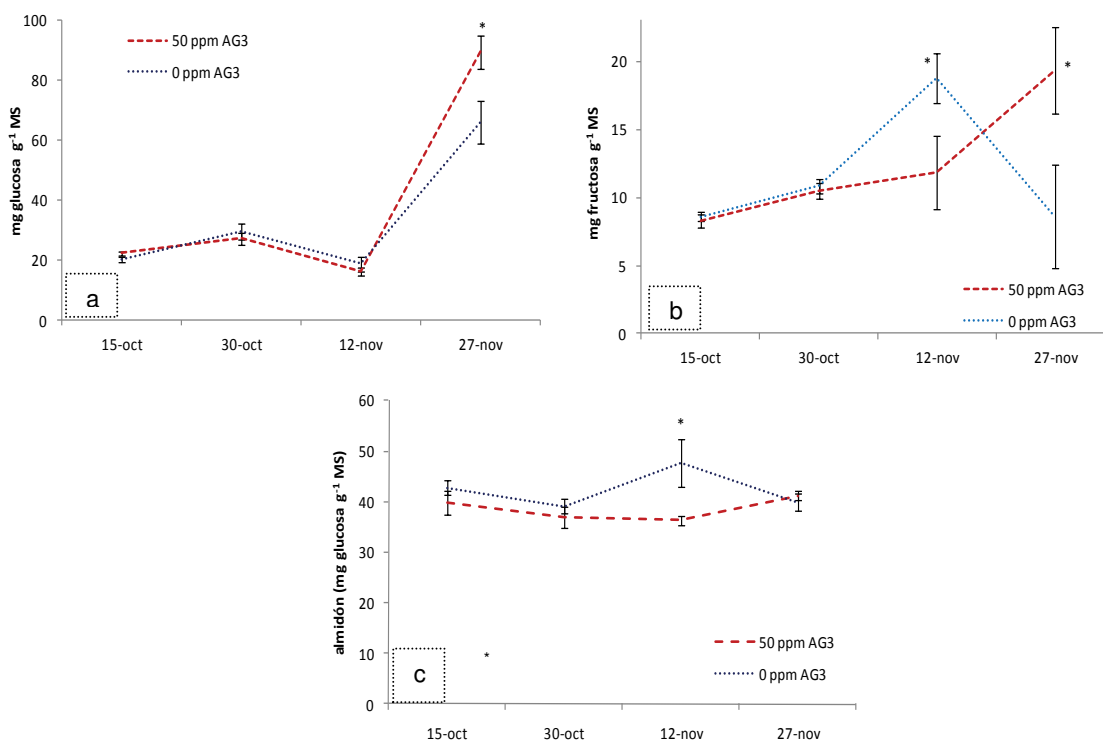


Figura 17. Efectos de la aplicación de giberelina sobre el contenido de: (a) glucosa ( $\text{mg}\cdot\text{g MS}^{-1}$ ), (b) fructosa ( $\text{mg}\cdot\text{g MS}^{-1}$ ) y (c) almidón ( $\text{mg glucosa}\cdot\text{g MS}^{-1}$ ) en **frutos en etapa I de desarrollo** del cv. Navelate. Las líneas verticales indican el error estándar y el asterisco (\*) indica diferencias significativas entre medias, test LSD ( $p \leq 0,05$ ). Aplicación de 50 ppm de AG<sub>3</sub> el 01/10.

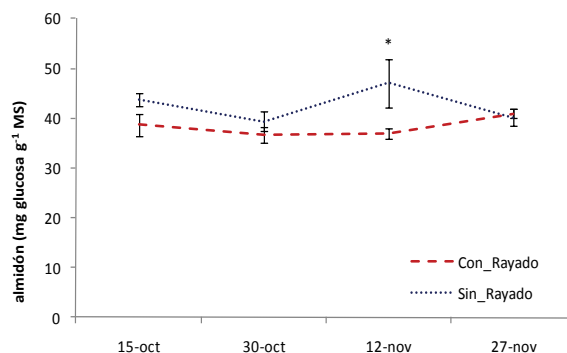


Figura 18. Efectos del rayado de ramas (aplicación 15/10) sobre el contenido de almidón (mg glucosa.g<sup>-1</sup>MS) en **frutos en etapa I de desarrollo** del cv. Navelate. Las líneas verticales indican el error estándar y el asterisco (\*) indica diferencias significativas entre medias, test LSD ( $p \leq 0,05$ ).

#### **Anexo 14. Efecto de los factores aplicados sobre la evolución del contenido de prolina de las hojas maduras, hojas jóvenes y frutos en fase I, del cv. ‘Navelate’.**

En las hojas maduras, el efecto de nivel de fertilización fue dependiente de la fecha de análisis, debido a la interacción significativa entre estos factores ( $p=0,0101$ ). Durante el mes de octubre no se detectaron diferencias entre medias, mientras que a mediados del mes de noviembre el contenido de prolina en hojas maduras fue superior en el tratamiento N1 en comparación al nivel N2 (Fig. 19 a).

En los frutos, el nivel de nitrógeno inicial presentó una interacción significativa con la fecha de medición ( $p=0,0038$ ). Así, los frutos de las plantas fertilizadas con la mayor dosis de nitrógeno presentaron niveles superiores de prolina en la primer fecha (15/10), mientras que en la fecha siguiente (30/10) se observó el efecto contrario (Fig. 19 b).

En cuanto al rayado de ramas, en las hojas jóvenes se observó una interacción entre los factores rayado y fecha ( $p=0,0025$ ), debido a la disminución del contenido de prolina en la fecha 11/11 en las hojas nuevas de las plantas con la aplicación de esta técnica en relación al testigo (Fig. 19 c).

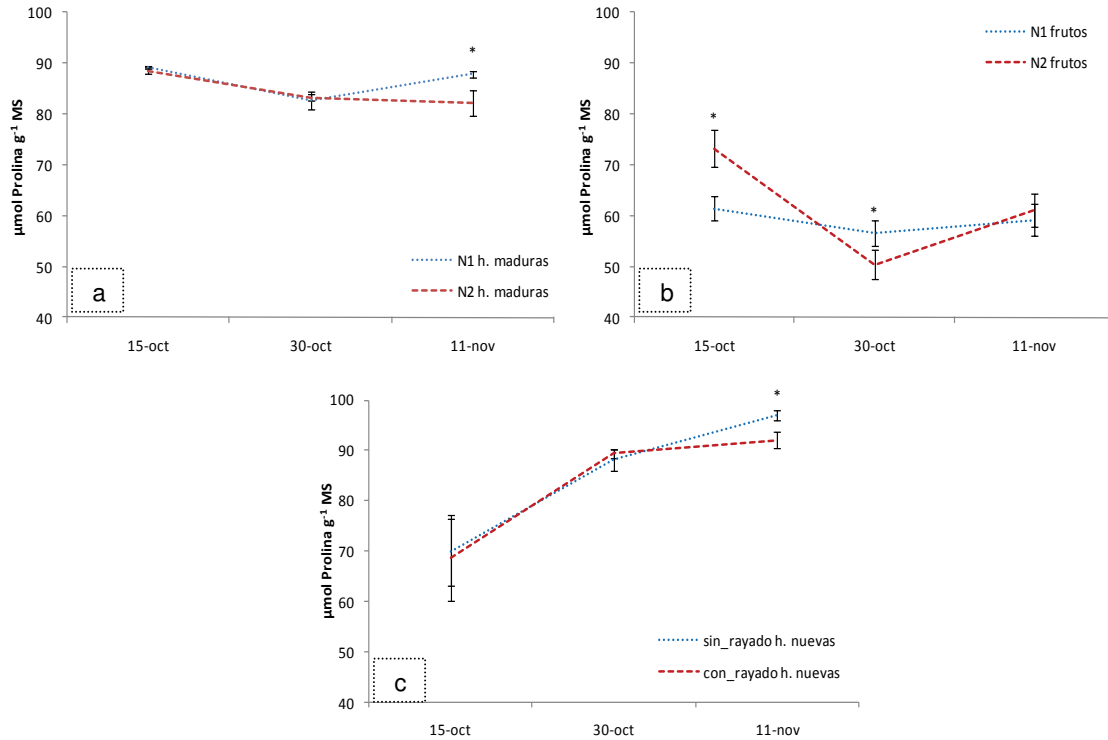


Figura 19. Efecto de los factores nivel de nitrógeno de la fertilización inicial en: (a) hojas maduras, (b) frutos en crecimiento; y efecto del rayado de ramas en: (c) hojas de la nueva brotación, sobre el contenido de prolina ( $\mu\text{mol g}^{-1} \text{MS}$ ) en el cv. Navelate. Las líneas verticales indican el error estándar y el asterisco (\*) indica diferencias significativas entre medias, test LSD  $p \leq 0,05$ . N1: 800g y N2: 1300g de urea, aplicación 11/09, y aplicación de rayado de ramas el 15/10.

**Anexo 15. Relación entre el porcentaje de nitrógeno foliar, índice SPAD y la fluorescencia de la clorofila con las variables productivas**

Tabla 6. Valores ‘p’ correspondientes a los Coeficientes de Pearson, resultantes de la relación entre las variables índice de verdor (SPAD), fluorescencia de la clorofila ( $\Phi$ FSII y Fv/Fm) y las de producción (% cuajado de frutos, N° frutos.pl<sup>-1</sup> y Kg.pl<sup>-1</sup>), en ambos tipos de hojas observadas en ‘Navelate’, durante la estación primaveral.

			Valores ‘p’ de Coeficientes de Pearson					
Variables			02-oct	14-oct	28-oct	11-nov	24-nov	17-dic
Hoja		% C frutos		0,0498	0,0001	ns	ns	
madura	%N foliar	N° frutos.pl <sup>-1</sup>		ns	ns	0,0001	0,0329	
		Kg. pl <sup>-1</sup>		ns	ns	0,0001	0,0020	
	SPAD	% C frutos	ns	0,0124	0,0497	ns	ns	ns
		% C frutos	0,0298	0,0409	ns	ns	ns	0,0254
	$\Phi$ FSII	N° frutos. pl <sup>-1</sup>	0,0119	ns	ns	ns	ns	ns
		Kg. pl <sup>-1</sup>	0,0085	ns	ns	ns	ns	ns
Hoja		% C frutos		0,0036	ns	ns	ns	
joven	%N foliar	N° frutos. pl <sup>-1</sup>		ns	0,0340	ns	ns	
		Kg. pl <sup>-1</sup>		ns	0,0498	ns	ns	
	SPAD	% C frutos	ns	ns	0,0006	ns	0,0008	ns
		% C frutos	ns	ns	ns	0,0153	ns	0,0006
	$\Phi$ FSII	N° frutos. pl <sup>-1</sup>	0,0004	ns	ns	ns	0,0119	ns
		Kg. pl <sup>-1</sup>	0,0001	ns	ns	ns	0,0066	ns
	Fv/Fm	N° frutos. pl <sup>-1</sup>	ns	0,0486	ns	0,0119	ns	ns
		Kg. pl <sup>-1</sup>	ns	ns	ns	0,0162	ns	ns

ns: no signitificativo (p>0,05).

**Anexo 16. Coeficientes de correlación de Pearson y valor 'p', resultantes de la relación entre los parámetros Índice SPAD, porcentaje de nitrógeno foliar (%MS), y fluorescencia de la clorofila.**

En general, en las hojas maduras, las correlaciones entre los parámetros índice de verdor (SPAD), contenido de nitrógeno foliar y fluorescencia de la clorofila fueron débiles (<0,2). Estas correlaciones fueron de mayor importancia en las hojas jóvenes (Tabla 7), donde se destacan las relaciones entre el índice de verdor con los parámetros de rendimiento cuántico del FSII y la eficiencia máxima del FSII (Fv/Fm), como también entre estos últimos ( $\Phi_{\text{FSII}}$  y Fv/Fm), las cuales resultaron significativas y tuvieron un sentido positivo (Tabla 7).

Tabla 7. Coeficientes de correlación de Pearson y valor 'p', resultantes de la relación entre los parámetros Índice SPAD, contenido de nitrógeno foliar (%MS), rendimiento cuántico del FSII ( $\Phi_{\text{FSII}}$ ) y la eficiencia máxima del FSII (Fv/Fm), en función del tipo de hoja.

Tipo de hoja	Parámetros		Coeficiente de Pearson	valor 'p'
Hoja joven	Índice	$\Phi_{\text{FSII}}$	0,4699	<0,0001
	SPAD	Fv/Fm	0,5683	<0,0001
	% N foliar	$\Phi_{\text{FSII}}$	0,1459	0,0005
		Fv/Fm	0,1985	<0,0001
	$\Phi_{\text{FSII}}$	Fv/Fm	0,5264	<0,0001

## Anexo 17. Relación entre los parámetros del intercambio gaseoso del metabolismo fotosintético y las variables productivas

Tabla 8. Valor 'p' correspondientes a los coeficientes de correlación de Pearson, resultantes de la relación entre los parámetros del intercambio gaseoso del metabolismo fotosintético con las variables productivas, según la fecha y tipo de órgano evaluado, de 'Navelate'.

			Valores 'p' de Coeficientes de Pearson				
Variables			02-oct	14-oct	28-oct	11-nov	24-nov
Hoja madura	ACO <sub>2</sub> ( $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ )	N° frutos. pl <sup>-1</sup>	0,0431	0,0006	ns	ns	ns
		Kg. pl <sup>-1</sup>	ns	0,0012	ns	ns	ns
	Gs ( $\text{mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ )	N° frutos. pl <sup>-1</sup>	0,0016	0,0037	ns	ns	ns
		Kg. pl <sup>-1</sup>	0,0039	0,0032	ns	ns	ns
	E ( $\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ )	N° frutos. pl <sup>-1</sup>	0,0002	ns	ns	ns	0,0057
		Kg. pl <sup>-1</sup>	<0,0001	ns	ns	ns	0,0059
	Ci/Ca	N° frutos. pl <sup>-1</sup>	ns	0,0426	ns	ns	ns
		Kg. pl <sup>-1</sup>	ns	0,0342	ns	ns	ns
	DPV (mb)	N° frutos. pl <sup>-1</sup>	0,0421	0,0046	ns	ns	ns
		Kg. pl <sup>-1</sup>	ns	0,0135	ns	ns	ns
	EUA	N° frutos. pl <sup>-1</sup>	<0,0001	0,0007	0,0002	0,0323	ns
		Kg. pl <sup>-1</sup>	<0,0001	0,0012	0,0007	ns	ns
Hoja joven	ACO <sub>2</sub> ( $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ )	N° frutos. pl <sup>-1</sup>	ns	0,0094	ns	0,0110	ns
		Kg. pl <sup>-1</sup>	ns	0,0114	ns	0,0072	ns
	Gs ( $\text{mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ )	N° frutos. pl <sup>-1</sup>	ns	ns	ns	ns	ns
		Kg. pl <sup>-1</sup>	ns	ns	ns	ns	ns
	E ( $\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ )	N° frutos. pl <sup>-1</sup>	0,0013	0,0048	ns	ns	<0,0001
		Kg. pl <sup>-1</sup>	0,0004	0,0377	ns	ns	<0,0001
	Ci/Ca	N° frutos. pl <sup>-1</sup>	0,0391	ns	ns	ns	ns
		Kg. pl <sup>-1</sup>	0,0240	ns	ns	ns	ns
	DPV (mb)	N° frutos. pl <sup>-1</sup>	ns	0,0038	ns	0,0018	ns
		Kg. pl <sup>-1</sup>	ns	0,0263	ns	0,0008	ns
	EUA	N° frutos. pl <sup>-1</sup>	<0,0001	0,0021	ns	0,0102	ns
		Kg. pl <sup>-1</sup>	<0,0001	0,0030	ns	0,0161	ns

Referencias: asimilación neta del CO<sub>2</sub> (ACO<sub>2</sub>), conductancia estomática (Gs), relación CO<sub>2</sub> interno/CO<sub>2</sub> del aire (Ci/Ca), tasa de transpiración (E), eficiencia del uso del agua (EUA,  $\mu\text{mol CO}_2/\text{mol H}_2\text{O}$ ) y déficit de presión de vapor (DPV). ns: no significativo ( $p>0,05$ ).



## **Anexo 18. Coeficientes de correlación de Pearson entre los parámetros del intercambio gaseoso del metabolismo fotosintético**

Las correlaciones entre los diferentes parámetros resultantes del intercambio gaseoso del metabolismo fotosintético no presentaron variaciones de importancia entre el grado de madurez de la hoja, por ello en la Tabla 9 se presenta una síntesis promedio de las relaciones obtenidas de todo el periodo y de ambos tipos de hojas.

La asimilación neta del CO<sub>2</sub> (ACO<sub>2</sub>) presentó una correlación significativa y positiva con la conductancia estomática (Gs), la tasa de transpiración (E) y la eficiencia del uso del agua (EUA), aunque la relación más fuerte fue entre ACO<sub>2</sub> y Gs (Tabla 9). Por otro lado, se encontró que la ACO<sub>2</sub> se correlacionó de manera significativa y negativa con la relación CO<sub>2</sub> interno/CO<sub>2</sub> del aire (Ci/Ca) y el déficit de presión de vapor (DPV), respectivamente (Tabla 9). La conductancia estomática (Gs) también presentó una alta correlación positiva con la tasa de transpiración (E). Por el contrario, su relación con el DPV fue inversa (Tabla 9). La variable Ci/Ca tuvo una correlación positiva con el DPV y negativa con el EUA, aunque en ambos casos esta fue débil (Tabla 9). Por último, la eficiencia del uso del agua (EUA) se correlacionó negativamente con el DPV y con E (Tabla 9).

Tabla 9. Coeficientes de correlación de Pearson y valor 'p', resultantes de la relación entre los parámetros del intercambio gaseoso del metabolismo fotosintético, del cv. Navelate, promedios de todo el periodo y tipos de hojas evaluados.

Variables		Coeficiente de Pearson	valor 'p'
ACO <sub>2</sub> ( $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ )	Gs	0,7788	<0,0001
	Ci/Ca	-0,2198	<0,0001
	E	0,5967	<0,0001
	DPV	-0,5404	<0,0001
	EUA	0,5600	<0,0001
Gs ( $\text{mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ )	Ci/Ca	-0,0144	0,7083
	E	0,8565	<0,0001
	DPV	-0,4624	<0,0001
	EUA	0,0844	0,0280
Ci/Ca	E	0,0773	0,0442
	DPV	0,2467	<0,0001
	EUA	-0,3899	<0,0001
E ( $\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ )	DPV	-0,0407	0,2898
	EUA	-0,2305	<0,0001
DPV (mb)	EUA	-0,6579	<0,0001

Referencias: asimilación neta del CO<sub>2</sub> (ACO<sub>2</sub>), conductancia estomática (Gs), relación CO<sub>2</sub> interno/CO<sub>2</sub> del aire (Ci/Ca), tasa de transpiración (E), eficiencia del uso del agua (EUA,  $\mu\text{mol CO}_2/\text{mol H}_2\text{O}$ ) y déficit de presión de vapor (DPV).

## **Anexo 19. Coeficiente de correlación de Pearson entre los parámetros del intercambio gaseoso del metabolismo fotosintético, SPAD y fluorescencia de la clorofila**

Otras correlaciones entre los parámetros del intercambio gaseoso del metabolismo fotosintético, con las variables índice SPAD, el rendimiento cuántico del FSII ( $\Phi_{FSII}$ ) y la eficiencia máxima del FSII ( $F_v/F_m$ ) resultaron significativas (Tabla 10). En las hojas jóvenes, se destacan las relaciones que presentaron un mayor coeficiente, como son las variables  $ACO_2$  y E con el índice SPAD, además la tasa de transpiración (E) con el parámetro  $F_v/F_m$  (Tabla 10). El contenido de nitrógeno foliar de las hojas maduras presentó correlaciones significativas con algunos parámetros fotosintéticos, los coeficientes fueron negativos con  $ACO_2$  y la EUA, mientras que tuvieron sentido positivo con  $C_i/C_a$  y DPV. Por otro lado, en las hojas jóvenes el %N foliar presentó correlaciones positivas con  $ACO_2$ ,  $C_i/C_a$  y la EUA (Tabla 10).

Tabla 10. Coeficiente de correlación de Pearson y valor 'p', resultantes de la relación entre los parámetros del intercambio gaseoso del metabolismo fotosintético con las variables SPAD y fluorescencia de la clorofila, particionados según el tipo de órgano.

Tipo de Órgano	Variables		Coeficiente de Pearson	valor 'p'	
Hoja Madura	Gs (mmol.m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup> )	SPAD	0,1622	0,0029	
		Fv/Fm	0,1521	0,0052	
	Ci/Ca	ΦFSII	0,2224	<0,0001	
		Fv/Fm	0,1196	0,0283	
	E (mol.m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup> )	SPAD	0,1583	0,0036	
		ΦFSII	0,2090	0,0001	
		Fv/Fm	0,2906	<0,0001	
	DPV (mb)	ΦFSII	0,2542	<0,0001	
		Fv/Fm	0,1989	0,0002	
	Hoja Joven		SPAD	0,5087	<0,0001
	ACO <sub>2</sub> (μmol.m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup> )	%N foliar	0,3365	<0,0001	
		ΦFSII	0,2718	<0,0001	
Fv/Fm		0,3689	<0,0001		
Gs (mmol.m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup> )	SPAD	0,4532	<0,0001		
	ΦFSII	0,1789	0,0011		
	Fv/Fm	0,3672	<0,0001		
Ci/Ca	SPAD	-0,1464	0,0072		
	%N foliar	0,2991	<0,0001		
E (mol.m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup> )	SPAD	0,5968	<0,0001		
	ΦFSII	0,3686	<0,0001		
	Fv/Fm	0,5459	<0,0001		
DPV (mb)	SPAD	0,1649	0,0024		
	ΦFSII	0,2443	<0,0001		
	Fv/Fm	0,2435	<0,0001		
EUA	%N foliar	0,2725	<0,0001		
	Fv/Fm	-0,1404	<0,0001		

Referencias: asimilación neta del CO<sub>2</sub> (ACO<sub>2</sub>), conductancia estomática (Gs), relación CO<sub>2</sub> interno/CO<sub>2</sub> del aire (Ci/Ca), tasa de transpiración (E), eficiencia del uso del agua (EUA, μmol CO<sub>2</sub>/mol H<sub>2</sub>O) y déficit de presión de vapor (DPV).

**Anexo 20. Relación entre el contenido de carbohidratos no estructurales y las variables productivas**

Tabla 11. Valor 'p' correspondientes a los coeficientes de correlación de Pearson, resultantes de la relación entre el contenido de carbohidratos con los parámetros de producción (N° frutos. pl<sup>-1</sup> y Kg. pl<sup>-1</sup>), particionados según el tipo de órgano y la fecha de observación.

Variables			Valores 'p' de Coeficientes de Pearson			
			14-oct	28-oct	11-nov	24-nov
Hoja joven	Glucosa	N° frutos. pl <sup>-1</sup>	0,0131	ns	ns	ns
		Kg. pl <sup>-1</sup>	0,0154	ns	ns	ns
	Fructosa	N° frutos. pl <sup>-1</sup>	ns	ns	0,0262	ns
		Kg. pl <sup>-1</sup>	ns	ns	0,0189	ns
	Sacarosa	N° frutos. pl <sup>-1</sup>	0,0356	ns	ns	ns
		Kg. pl <sup>-1</sup>	0,0394	ns	ns	ns
Frutos	Glucosa	N° frutos. pl <sup>-1</sup>	0,0259	ns	ns	0,0196
		Kg. pl <sup>-1</sup>	0,0147	ns	ns	0,0170
	Sacarosa	N° frutos. pl <sup>-1</sup>	ns	0,0488	ns	ns
		Kg. pl <sup>-1</sup>	ns	0,0584	ns	ns
	Almidón	N° frutos. pl <sup>-1</sup>	0,0483	ns	ns	ns
		Kg. pl <sup>-1</sup>	0,0376	ns	ns	ns

ns: no significativo (p>0,05).

## Anexo 21. Coeficiente de correlación de Pearson (valor 'p'), resultantes de la relación entre los diferentes carbohidratos no estructurales

En cuanto a las relaciones observadas entre los distintos carbohidratos no estructurales, en todos los órganos analizados se encontró una estrecha relación positiva entre los monosacáridos glucosa y fructosa (Tablas 12 y 13). En las hojas maduras, ambos monosacáridos tuvieron un momento de relación negativa con la sacarosa a fines de octubre y luego se transformó en positiva. Un comportamiento similar fue observado en las hojas jóvenes, mientras que en los frutos las relaciones entre estos carbohidratos solubles fueron solamente positivas (Tablas 12 y 13). Con respecto al almidón se encontró una relación positiva con el nivel de fructosa en las hojas jóvenes a mediados de octubre. En los frutos en desarrollo, el almidón se correlacionó de manera negativa con el nivel de glucosa a mediados del mes de octubre, cambiando de sentido en la fecha siguiente (Tablas 12 y 13). Por último, no se hallaron relaciones significativas entre los niveles de sacarosa y almidón.

Tabla 12. Coeficientes de correlación de Pearson, resultantes de la relación entre los carbohidratos no estructurales, en cada tipo de órgano evaluado y fecha analizada, en 'Navelate'.

Variables			Coeficientes de Pearson			
			14-oct	28-oct	11-nov	24-nov
Hoja madura	Glucosa	Fructosa	0,62	0,97		0,87
		Sacarosa		-0,71	0,58	
	Fructosa	Sacarosa		-0,67		0,63
Hoja joven	Glucosa	Fructosa		0,74	0,74	0,74
		Sacarosa	0,61		-0,52	0,57
	Fructosa	Sacarosa		-0,55		
Frutos	Glucosa	Almidón	0,82			
		Fructosa	0,54		0,88	0,59
	Fructosa	Sacarosa			0,83	
		Almidón	-0,52	0,49		
	Fructosa	Sacarosa		0,66	0,79	

**Anexo 22. Relación entre el contenido de carbohidratos no estructurales de los diferentes órganos**

Tabla 13. Valor ‘p’ correspondientes a los coeficientes de correlación de Pearson, resultantes de la relación entre los carbohidratos no estructurales, en cada tipo de órgano evaluado y fecha analizada, en ‘Navelate’.

Variables		Valores ‘p’ de Coeficientes de Pearson				
		14-oct	28-oct	11-nov	24-nov	
Hoja madura	Glucosa	Fructosa	0,0023	<0,0001	ns	0,0023
		Sacarosa	ns	0,0001	0,0048	ns
	Fructosa	Sacarosa	ns	0,0004	ns	0,0122
Hoja joven	Glucosa	Fructosa	ns	<0,0001	0,0007	0,0006
		Sacarosa	0,0023	ns	0,0107	0,0073
	Fructosa	Sacarosa	ns	0,0049	ns	ns
		Almidón	0,0127	ns	ns	ns
Frutos	Fructosa	Sacarosa	0,0060	ns	<0,0001	0,0274
		Almidón	0,0094	0,0142	ns	ns
	Glucosa	Sacarosa	ns	ns	<0,0001	ns
		Sacarosa	ns	0,0005	<0,0001	ns

ns: no significativo ( $p > 0,05$ ).

### **Anexo 23. Coeficiente de correlación de Pearson (valores ' $p$ '), resultantes de la relación entre el contenido de carbohidratos con las variables SPAD, fluorescencia de la clorofila, e indicadores de estrés**

Otras correlaciones entre los distintos carbohidratos no estructurales con las demás variables fisiológicas medidas resultaron significativas (Tablas 14 y 15). En las hojas maduras, el nivel de prolina se correlacionó de manera inversa con los contenidos de almidón y de sacarosa, medidos en diferentes fechas. Además el contenido de N foliar presentó un coeficiente negativo con el contenido de sacarosa de fines de octubre. En estas hojas, además el almidón se relacionó de una manera positiva con el índice SPAD (Tabla 14). En las hojas jóvenes, en la primer fecha de análisis (14/10), la eficiencia máxima del FSII (Fv/Fm) tuvo una correlación negativa con el contenido de glucosa. En estas hojas, el índice SPAD tuvo una correlación positiva con los niveles de glucosa y fructosa de la fecha 30/10, y de almidón de la siguiente fecha (11/11). A fines de noviembre el índice SPAD presentó una correlación negativa con los niveles de glucosa y sacarosa (Tabla 14). El contenido foliar de N tuvo coeficientes positivos con los niveles de sacarosa y de almidón en algunas fechas medidas. Además, en las hojas jóvenes, el nivel de prolina presentó una relación negativa con la fructosa, pero positiva con la glucosa. Por último, en los frutos se encontró que la prolina tuvo una relación positiva con el contenido de glucosa y almidón (Tabla 14 y 15).



Tabla 14. Valor 'p' correspondientes a los coeficientes de correlación de Pearson resultantes de la relación entre el contenido de carbohidratos con las variables SPAD, fluorescencia de la clorofila a, e indicadores de estrés, particionados según el tipo de órgano y la fecha de observación.

			Valores 'p' de Coeficientes de Pearson				
Variables			14-oct	28-oct	11-nov	24-nov	
Hoja madura	Sacarosa	prolina	ns	ns	0,0094	ns	
		%N foliar	ns	0,0356	ns	ns	
	Almidón	prolina	0,0034	ns	ns	ns	
		SPAD	0,0477	ns	ns	ns	
Hoja joven	Glucosa	prolina	ns	ns	0,0384	ns	
		Fv/Fm	0,0013	ns	ns	ns	
		SPAD	ns	0,0386	ns	ns	
	Fructosa	prolina	ns	ns	0,0357	ns	
		SPAD	ns	0,0388	ns	ns	
		SPAD	ns	ns	ns	0,0234	
	Sacarosa	% N foliar	ns	ns	ns	0,0056	
		Almidón	SPAD	ns	ns	0,0113	ns
			% N foliar	ns	0,0051	ns	ns
	Frutos	Glucosa	prolina	ns	0,0341	ns	ns
		Almidón	prolina	ns	0,0046	ns	ns

ns: no significativo ( $p > 0,05$ ).

**Anexo 24. Relación entre el contenido de carbohidratos no estructurales con parámetros fisiológicos**

Tabla 15. Coeficiente de correlación de Pearson y valores ‘p’, resultantes de la relación entre el contenido de carbohidratos con las variables SPAD, fluorescencia de la clorofila, e indicadores de estrés, particionados según el tipo de órgano y la fecha de observación.

			Valores ‘p’ de Coeficientes de Pearson			
Variables			14-oct	28-oct	11-nov	24-nov
Hoja madura	Sacarosa	prolina			-0,5406	
		%N foliar		-0,4307		
	Almidón	prolina	-0,5735			
		SPAD	0,4081			
Hoja joven	Glucosa	prolina			0,4250	
		Fv/Fm	-0,6183			
		SPAD		0,4248		
	Fructosa	prolina			-0,5119	
		SPAD		0,4242		
	Sacarosa	SPAD				-0,4923
		%N foliar				0,5821
	Almidón	SPAD			0,5076	
		% N foliar		0,5523		
	Frutos	Glucosa	prolina		0,4339	
Almidón		prolina		0,5586		

**Anexo 25. Coeficiente de correlación de Pearson entre el contenido de prolina, malondialdehído, índice SPAD y nitrógeno foliar**

En general, el contenido de prolina que presentaron las hojas maduras se correlacionó de forma negativa con %N foliar (%MS), mientras que este último se relacionó positivamente con el contenido de MDA (Tabla 16). Por otro lado, en estas hojas no se observaron correlaciones entre prolina y MDA. En las hojas jóvenes, el nivel de prolina mostró una correlación significativa y positiva con el MDA y ambas variables se correlacionaron positivamente con el índice SPAD y el %N foliar (Tabla 16).

Tabla 16. Coeficiente de correlación de Pearson y valor 'p', resultantes de la relación entre el contenido de prolina ( $\mu\text{M. g MS}^{-1}$ ), malondialdehído ( $\text{nmol MDA g MS}^{-1}$ ) índice SPAD y contenido de nitrógeno foliar (%MS), según el tipo de hoja.

Tipo de hoja	Parámetros		Coeficiente de Pearson	valor 'p'
Hoja madura	prolina	%N foliar	-0,4185	0,0003
	MDA	%N foliar	0,3095	0,0323
Hoja joven	prolina	MDA	0,4131	0,0035
	prolina	Índice SPAD	0,6667	<0,0001
		%N foliar	0,5153	<0,0001
	MDA	Índice SPAD	0,4739	0,0007
%N foliar		0,4228	0,0028	

## Anexo 26. Modelo de regresión lineal de la relación entre el contenido de prolina y el índice SPAD de las hojas jóvenes

El modelo de regresión lineal que representó la relación entre el contenido de prolina ('y') de las hojas jóvenes con su valor SPAD ('x'), fue  $y = 50,11 + 0,61x$  ( $p < 0,0001$ ) con un ajuste  $R^2 = 0,44$  (Fig. 20).

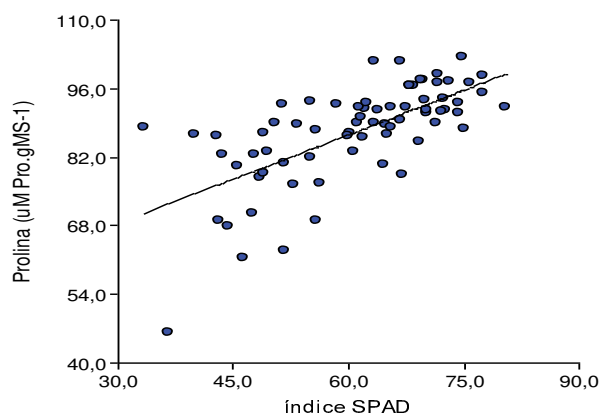


Figura 20. Modelo de regresión lineal simple que representa la relación entre el contenido de prolina ('y') de las hojas jóvenes y su valor SPAD ('x'), correspondiente al cv. Navelate.