



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

**Regulación hormonal del crecimiento, maduración y
sobremaduración en un modelo de fruto no climatérico:
Prunus avium L var. Pime Giant**


Veronica Tijero Esteve



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0. Spain License.**



**Regulación hormonal del crecimiento,
maduración y sobremaduración en un
modelo de fruto no climatérico: *Prunus
avium* L var. Prime Giant**

Verónica Tijero Esteve

Barcelona 2019



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Barcelona, Julio de 2019

**Regulación hormonal del crecimiento, maduración y
sobremaduración en un modelo de fruto no climatérico:
Prunus avium L var. Prime Giant**

Memoria presentada por Verónica Tijero Esteve para optar al grado de
Doctora por la Universidad de Barcelona.

Este trabajo se enmarca en el programa de doctorado de Ecología, Ciencias
Ambientales y Fisiología Vegetal dentro del Departamento de Biología
Evolutiva, Ecología y Ciencias Ambientales (BEECA) de la Facultad de
Biología de la Universidad de Barcelona.

El presente trabajo se ha realizado en el Departamento de Biología
Evolutiva, Ecología y Ciencias Ambientales (BEECA) de la Facultad de
Biología de la Universidad de Barcelona, bajo la dirección del Dr. Sergi
Munné Bosch.

Doctoranda

Verónica Tijero Esteve

Director y tutor de Tesis

Sergi Munné Bosch

“Nature is a language and every new fact one learns is a new word; but it is not a language taken to pieces and dead in the dictionary, but the language put together into a most significant and universal sense. I wish to learn this language, not that I may know a new grammar, but that I may read the great book that is written in that tongue”

Ralph Waldo Emerson

“Sometimes it is the people no one can imagine anything of who do the things no one can imagine”

Alan Turing

AGRADECIMIENTOS

Y por fin llegó el día. Siempre dije que esto de los agradecimientos no iba conmigo, que yo pasaría de poner este apartado en la tesis...al fin y al cabo, es un apartado OPCIONAL. La verdad es que hubiese sido muy divertido no tenerlo y ver las caras de todos aquellos que lo esperaban (insertar mi risa maléfica). También surgió la idea del “gracias a todos, menos a uno...”. No diré quién fue el gran poeta que me recomendó esta estupenda frase, pues debo proteger la identidad de mis informantes. Lo cierto es que no soy una persona que se le dé muy bien estas cosas, y me refiero al sentimentalismo, no va conmigo. Las personas a las que tengo que agradecer todo su infinito apoyo ya lo saben...pero creo que dedicarle unas cuantas líneas no está de más. Así que, intentaré no ser muy empalagosa ni cursi... ¡Crucemos los dedos! ¡Vamos a por ello!

A la primera persona que debo agradecer es a mi tutor/director/jefe, el doctor Sergi Munné Bosch. Hace 6 años ya que nos conocimos en una reunión muy divertida con Henar y Laura. La recuerdo como si fuese ayer. En aquel momento pensé muy seriamente “¿dónde me estoy metiendo?”. Quién me iba a decir que así sería el principio de todo. Desde unas semillas de *Chamaerops*, pasando por *Silene*, atravesando unos “campos” de maíz de invernadero, con unos toques de *Cistus*, rosas y gemas de cerezos...para al fin, llegar a mis queridas cerezas. Aunque ha sido un largo y duro viaje, gracias por darme la oportunidad de poder experimentar con tantas cosas, de poder aprender y crecer, tanto profesional como personalmente. Gracias por transmitirme esa pasión por el mundo de las plantas y acompañarme durante todo el proceso. No ha sido fácil y tú lo sabes... aun así, me apoyaste en todo momento y confiaste en mí sin duda alguna. Ha sido todo un placer haber podido trabajar en tu grupo. Gracias.

¿Recuerdas la reunión Laura? ¿Recuerdas lo que hicimos después? Nos fuimos a comprar metros y metros de tela de nylon para poder hacer unas preciosas bolsas que nos servirían para enterrar tus semillitas. Me preguntabas “¿tú crees que por aquí cabrá una hormiga?” Y yo sin saber de qué iba la broma... y ¡menuda broma! ¿Nos volvimos inseparables después de la quinta? Quinta bolsa eeeeh... Probablemente fuera el pegamento y la desesperación de no saber cómo haríamos mil bolsas (o más de mil, si las conté yo) lo que nos unió. Por suerte Henar nos dejó su máquina de coser y nos salvó la vida. Ahora que lo pienso, cuántas cosas hemos pasado juntas...y al fin, tu pequeña Padawan está a punto de convertirse en

¡¡¡el último Jedi!!! Esto... emmm... quiero decir... ¡doctora! Todo este proceso no hubiese sido el mismo sin ti. Gracias... por los buenos momentos, las risas, las horas en el lab con el martillo mientras escuchábamos el “*I came in like a wreeeeeking baaaaall*” (lo sé... no te has podido resistir y has cantado mientras lo leías), gracias por enseñarme tantas cosas, por tus consejos... y, sobre todo, por ser mi amiga.

Javier Alberto, qué puedo decirte que no te haya dicho ya...pues que después de 6 años, sigo sin saber cómo programar la centrífuga. *Shame! Shame! Shame!* Un pequeño borrón en mi expediente, pero ¿a qué he sido una buena alumna? Me enseñaste a hacer pruebas de todo y con todo, a cuestionarme todo y a preguntar de todo. Pero lo más importante, que procrastinar es parte del proceso. Muchas gracias por estar allí cuando me surgían dudas y problemas, por machacar cerecitas, por tus sabios consejos y por tus comics/memes científicos que aún siguen por el despacho. Has sido un gran compañero de lab y un excelente profesor.

Paula, gracias. (Es broma). Cómo no iba a dedicarle un párrafo de mis agradecimientos a la persona que más me ha ayudado durante toda la tesis. ¡*Team Cherries* hasta el infinito y más allá! La de horas que hemos pasado juntas...cerezas, laboratorio, muestreos, vuelos, Lisboa, reformas, naranjas, fresas, Cádiz, URGENCIAS... son tantas las anécdotas y los buenos recuerdos que me parece mentira que esto se acabe ya. Empezaste conmigo, y aunque lo intenté, no estoy muy segura de haber sido la mejor “*supervisor*” (con acento *irish* para que se entienda mejor). Pero no me hizo falta... eres brillante Paula, no lo olvides. *Now, it's time to say goodbye*. Gracias por estar allí, siempre. (Aquí insertaría un GIF, lo dejo a tu imaginación, aunque creo que le pega tu foto con el cartel de DRAMA).

Alba Cotado, has sido todo un descubrimiento, tengo que reconocerlo. Ahora no puedo imaginarme mi vida sin ti (otro cartel de DRAMA, por favor). Ya sé que suena cursi... pero, si no fuese por ti, no veo la luz al final del túnel. Gracias por estos meses de *coaching* y por ser, obviamente, mi SUPERAMI. Gracias por enseñarme lo bonitas que pueden ser las montañas y lo alucinantes que pueden llegar a ser tus saxis. No pierdas nunca tu pasión por la naturaleza, Pachamama te lo agradecerá. Pero por favor, aléjate de los abismos...recuerda poner siempre el 3D en el maps. Ya queda poco para la recta final. ¡Qué Odin guíe nuestro camino! ¡Nos vemos en el Valhalla y celebraremos la victoria con hidromiel!

Erola, ¡echo de menos tus bromas! ¡Cómo ha pasado el tiempo eee... ya no eres la más joven del grupo! Pero no te preocupes, siempre recordaré cuando eras un pollito en el lab... y el “incidente” con los tubos de plástico y la acetona, *of course*. Muchos ánimos con la tesis, tus plantas y todas las cosas en R que haces y que, obviamente, no entiendo... por eso las he llamado “cosas”. Marina, es una pena que no hayamos tenido más tiempo para conocernos, aunque me causaste una primera GRAN impresión, ya sabes, un árbol, un agujero, en fin, no quiero entrar en más detalles... Maren y Marta, gracias por todos vuestros sabios consejos, me habéis ayudado mucho durante mi tiempo en el grupo. Celia, Andrea, Miriam, Sandra, David H. espero que aprendáis y disfrutéis mucho de esta etapa científica, de vuestras plantas, los muestreos, los análisis, las idas y venidas al Parc, los dolores de cabeza, los *deadlines*, el estrés, las interminables horas de trabajo... pero al final, creedme, vale la pena. Camila, nos has robado el corazón, creo que “descorchar” ha sido la clave... Gracias por tu inmenso apoyo en estos últimos meses. ¡Lo pasarás en grande haciendo el doctorado! A las nuevas generaciones: Tania, Cris, Alba, Ricard, Ignasi, Laia, Vicent, Ernest, David T., Rachida y a los que vengan, *have fun!* La ciencia es divertida y ¡la fisiología vegetal mucho más! (cedo los derechos de esta frase para que la utilicéis como slogan publicitario para el departamento). Edu, o doctor Ramos, gracias por todos los buenos momentos en el lab, en clases, en el bar... la experiencia no habría sido igual sin ti. Camilo, vecino de despacho en mi temporada en la sexta planta, gracias por todo. Esther, espero no haberte vuelto loca con tanto papeleo y paquete para enviar, gracias por ayudarme en todo momento. Y a ti Mónica, por todas las comandas. Carmen, qué hubiese hecho yo sin ti, con la de cosas que me has dejado para mis experimentos y la alegría que nos has regalado siempre. Os echaré de menos a todos.

No puedo olvidarme de aquellos que me han acompañado durante este tiempo a nivel personal, renovando mi energía, escuchando mis quejas, dándome ánimos y abrazos muy necesitados. Meri, a pesar de la distancia y de los años, *friendship never ends*. Gracias por estar allí siempre que lo necesitaba. *My true love*, Mar, te daré un superachuchón cuando te vea, por todas las veces que me has devuelto la sonrisa en los momentos más duros. Viviana, nunca volverás a ser Virginia... *never*. ¡Fuerza! Queda poco para que tú también seas doctora, que no panda el cúnico, si yo he podido ¡tú también puedes! A mi brasileña favorita, Dani de mi *coração*, ¡cómo te echo de menos! Sin tu apoyo no sé qué hubiese sido de mí. El universo sigue enviándonos señales ¿crees que algún día sabremos que nos quiere decir?

Por último, a los incondicionales, mi familia. Creo que no hace falta decir lo mucho que os quiero, lo mucho que me habéis ayudado a superar cada obstáculo y la energía que me habéis dado para levantarme después de cada tropiezo. Siempre habéis creído en mí, a pesar de todo. Habéis sido un gran apoyo durante estos años. Y mami, sé que no te lo digo a menudo, pero muchas gracias por todo. Gracias por quererme, por cuidarme, por aconsejarme, por sujetar con fuerza mi mano, pero, sobre todo, por luchar. Gracias por luchar. Nada de esto hubiese sido lo mismo sin ti.

“How lucky I am to have something that makes saying goodbye so hard.”

Winnie-the-Pooh (A. A. Milne)

ABSTRACT

Sweet cherry fruits (*Prunus avium* L.) are highly appreciated by consumers worldwide because of their visual and organoleptic characteristics. As a non-climacteric stone fruit, the biochemical and physical changes that occur during its growth, ripening and over-ripening are regulated by hormones. To better understand the complex interplay between some phytohormones during these processes, and how quality parameters are affected, sweet cherries were harvested from a commercial orchard at different developmental stages and during postharvest time. Results showed high concentrations of growth promoters such as auxins, cytokinins and gibberellins, at the very beginning of fruit development, to later decrease as soon as the ripening process started, and negatively correlated with ripening parameters, thus suggesting a possible inhibitory role in sweet cherries ripening process. Also, jasmonic acid and salicylic acid showed a decrease as ripening progress, depriving fruit protection against pathogens. In contrast, abscisic acid concentrations increased at the onset of ripening, and was positively correlated with quality parameters, promoting sweet cherries ripening. Melatonin, a newly-studied compound, decreased drastically at the onset of ripening and after its exogenous application, melatonin exhibited an important role as a sweet cherry ripening inhibitor, particularly at low concentrations. During over-ripening, cherry fruits clearly suffered a huge water loss, and abscisic acid, cytokinins and gibberellins decreased in parallel with fruit decay, suggesting a protective role against over-ripening. Therefore, a hormonal cross-talk is observed during sweet cherry development and over-ripening, acting together or regulating each other, which may help to create new strategies and technologies to improve fruit quality.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	i
INTRODUCCIÓN	1
1. Crecimiento y desarrollo de frutos carnosos.....	3
1.1. Crecimiento.....	4
1.2. Maduración.....	6
1.3. Sobremaduración en poscosecha.....	8
2. Fitohormonas en frutos no climatéricos.....	9
2.1. Auxinas.....	10
2.2. Citoquininas.....	11
2.3. Giberelinas	13
2.4. Ácido abscísico	15
2.5. Ácido jasmónico.....	16
2.6. Ácido salicílico.....	18
2.7. Melatonina	19
3. Indicadores de maduración y calidad	21
3.1. Antocianinas.....	21
3.2. Sólidos solubles totales y acidez total	22
4. Modelo de estudio: <i>Prunus avium</i> L. var. Prime Giant.....	23
OBJETIVOS.....	27
INFORME DEL DIRECTOR DE TESIS SOBRE EL IMPACTO DE LOS ARTÍCULOS PUBLICADOS Y LA PARTICIPACIÓN DE LA DOCTORANDA.....	31
RESULTADOS.....	37
Capítulo 1: Implicación del ácido abscísico en la maduración y calidad de cerezas dulces: efectos diferenciales durante la pre- y la poscosecha.....	39
Capítulo 2: Relación del perfil hormonal con las variaciones en el contenido de azúcares y antocianinas durante el desarrollo y maduración de cerezas dulces.....	63

Capítulo 3: La melatonina como inhibidor de la maduración de las cerezas en el árbol.....	77
Capítulo 4: El perfil hormonal revela un <i>cross-talk</i> hormonal durante el deterioro de las cerezas dulces.....	95
DISCUSIÓN GENERAL	107
1. Interacción hormonal en el desarrollo de las cerezas en el árbol	110
1.1. Hormonas promotoras del crecimiento e inhibidoras de la maduración	110
1.2. El ácido abscísico como regulador de la maduración y calidad de las cerezas	114
1.3. Implicación del ácido jasmónico y el ácido salicílico en el desarrollo de las cerezas	116
2. Importancia de la melatonina como inhibidora de la maduración..	118
2.1. Niveles endógenos de melatonina durante el desarrollo del fruto	119
2.2. Efectos de la aplicación exógena de melatonina sobre la maduración	120
3. Sobremaduración y deterioro del fruto en poscosecha.	122
4. <i>Cross-talk</i> hormonal en cerezas	127
CONCLUSIONES	133
BIBLIOGRAFÍA	137

ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico
CK	Citoquinina
GA	Giberelina
IAA	Ácido indol-3-acético
iP	Isopentenil adenina
IPP	Isopentenil difosfato
JA	Ácido jasmónico
MeJA	Metil jasmonato
MEP	Metileritritol fosfato
NCED	9- <i>cis</i> -epoxicarotenoide dioxigenasa
OPDA	Ácido 12- <i>oxo</i> -fitodienoico
PAL	Fenilalanina amonio liasa
PGR	Reguladores del crecimiento en plantas
SA	Ácido salicílico
TA	Acidez total
TSS	Sólidos solubles totales/Azúcares solubles totales
Z	<i>trans</i> -Zeatina
ZR	Ribósido de <i>trans</i> -zeatina

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. Crecimiento y desarrollo de frutos carnosos

Las plantas han desarrollado, a lo largo del tiempo, diferentes mecanismos que favorecen la dispersión de las semillas, por lo que en la naturaleza podemos encontrar una gran diversidad de estas (Mauseth, 2016). En general, podemos dividir los frutos en dos grandes grupos. Por un lado, tenemos los frutos secos que, al llegar a su plena madurez, la dispersión de la semilla suele ser a través del viento o por adhesión al pelaje de los animales. Mientras que, por el otro lado, tenemos los frutos carnosos que, al contrario de los secos, son frutos con una capa suave y comestible que permite la dispersión de las semillas a través de animales, los cuales consumen esta parte del fruto y después, se deshacen de lo que queda de él (Dardick & Callahan, 2014).

Independientemente del tipo, los frutos están formados por diferentes capas de tejido derivado del ovario de la flor (**Figura 1**), los cuales son los siguientes:

- ❖ Exocarpio: tejido más exterior que suele formar la piel o corteza del fruto.
- ❖ Mesocarpio: tejido intermedio. En los frutos carnosos, es la capa blanda y comestible del fruto.
- ❖ Endocarpio: tejido más interior. Es la capa adyacente a la semilla que, en muchos casos, suele actuar como barrera protectora de esta misma.

Cuando se habla de frutos carnosos, las diferencias entre estas tres capas proporcionan una clasificación aún más amplia (Li, 2012; Mauseth, 2016), por lo que podemos dividir estos frutos en bayas, pomos, hesperidios, pepónides y drupas. Estas últimas se diferencian por tener el endocarpio endurecido como barrera física para la protección de la semilla contra posibles depredadores y enfermedades (Doster & Michailides, 1999), dando lugar a lo que conocemos como frutos carnosos con hueso. La mayoría de las drupas pertenecen a la familia *Rosaceae*, grupo de gran importancia económica (Dirlewanger et al., 2002; Janick, 2005), en la que se incluyen frutos como ciruelas, melocotones, cerezas y almendras, entre otros.

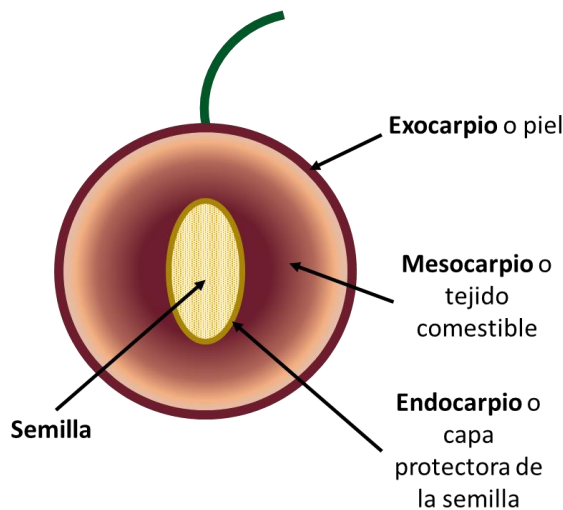


Figura 1. Tejidos diferenciados en un fruto carnoso con hueso.

1.1. Crecimiento

Dentro de la familia de las Rosáceas, encontramos el género *Prunus*, el cual incluye diferentes frutos carnosos con hueso como melocotones y nectarinas [*Prunus persica* (L.) Batsch], albaricoques (*Prunus armeniaca* L.),

ciruelas (*Prunus domestica* L.), almendras (*Prunus dulcis* Mill.) y cerezas ácidas (*Prunus cerasus* L.) y dulces (*Prunus avium* L., Hummer & Janick, 2009). La mayoría de los frutos del género *Prunus* se caracterizan por seguir un patrón de crecimiento y desarrollo doble-sigmoideo desde el cuajado del fruto (Coombe, 1976), describiendo tres fases importantes (**Figura 2**) en las que se produce la diferenciación de los tejidos (Olmstead et al., 2007).

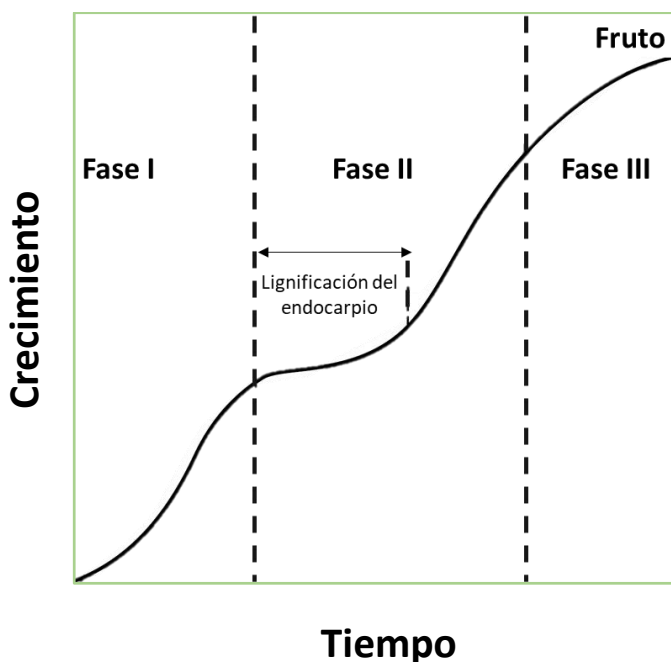


Figura 2. Patrón de crecimiento y desarrollo doble-sigmoideo

En la fase I, se ha descrito un crecimiento exponencial del mesocarpio debido a una elevada y rápida división celular, que determinará la densidad final del fruto. Durante la fase II, el crecimiento se ralentiza para favorecer el desarrollo del embrión en la semilla y el endurecimiento del endocarpio, mediante la lignificación de sus células, para la protección de la semilla. Por último, en la fase III, el crecimiento del fruto vuelve a ser una prioridad. Las

células del mesocarpio se expanden rápidamente, dejando poco espacio intercelular. Las vacuolas experimentan un incremento en su volumen, ocupando la mayor parte de la célula. Este crecimiento en expansión se suele extender hasta que el fruto llega a la madurez final (Coombe, 1976; Olmstead et al., 2007; Rapoport et al., 2013; Dardick & Callahan, 2014; Farinati et al., 2017). La duración de cada fase y, por consiguiente, el tamaño del fruto dependerá de su variedad, de las condiciones ambientales en las que se desarrollan y del genotipo, siendo un proceso altamente influenciado por reguladores del crecimiento (Zhang & Whiting, 2012; McAtee et al., 2013).

1.2. Maduración

La maduración ocurre poco antes del completo desarrollo del fruto en el árbol. Durante este proceso, el fruto sufre cambios físicos y químicos que lo modifican, con el fin de mejorar su palatabilidad. Dentro de estas modificaciones que se producen, se pueden apreciar (1) cambios de color debido a la variación en el contenido de clorofilas, carotenoides o antocianinas, (2) cambios en la textura del fruto por modificaciones en la turgencia de las células, así como también en la pared celular, (3) cambios en el sabor y aroma por acumulación de azúcares, ácidos orgánicos y compuestos volátiles, los cuales son muy apreciados por el consumidor y además, como consecuencia, se observa (4) un aumento de la susceptibilidad del fruto a diferentes patógenos (**Figura 3**, Giovannoni, 2004). La síntesis de proteínas, pigmentos y otros compuestos, que se obtienen durante la maduración del fruto, requieren un elevado aporte energético generado gracias al proceso de respiración (Tucker, 1993). En general, si el proceso de maduración está asociado o no a un aumento en la tasa de respiración, los frutos se clasifican en climatéricos y no climatéricos.



Figura 3. Modelo de modificaciones durante el proceso de maduración en un fruto no climatérico como las cerezas.

Los frutos climatéricos se caracterizan por una rápida y elevada producción de etileno, simultánea a un incremento en la actividad respiratoria, al inicio de la maduración del fruto (Tucker, 1993; Lelievre, et al., 1997). La regulación positiva de genes que participan en la biosíntesis de esta fitohormona provoca una producción autocatalítica de etileno al inicio del proceso de maduración en frutos carnosos como son la manzana, tomate, mango, aguacate, ciruela, etc., actuando como señal clave en la regulación de la composición del fruto, su textura, el cambio de color, entre otros (Klee & Clark, 2004; Li, 2012, Seymour et al., 2013). Por el contrario, los frutos no climatéricos no presentan el mismo patrón que los climatéricos al inicio de la maduración. En frutos no climatéricos, el etileno se encuentra a niveles basales, por lo que no se lleva a cabo su producción autocatalítica y, por

consiguiente, esta hormona no regularía las señales necesarias para el inicio de la maduración (Chai et al., 2011; Symons et al., 2012). Diversos estudios indican que la principal hormona reguladora de este proceso en frutos no climatéricos es el ácido abscísico (Ban et al., 2003; Jia et al., 2011; Cherian et al., 2014). El proceso de maduración, tanto de frutos climatéricos como de no climatéricos, es un proceso muy complejo y otras hormonas vegetales como las auxinas, giberelinas, citoquininas o jasmonatos también pueden estar implicadas (Davies et al., 1997; Liu et al., 2010; Csukasi et al., 2011; Wang et al., 2008).

1.3. Sobremaduración en poscosecha

En la actualidad, hay una creciente demanda por aumentar la calidad de la fruta fresca y extender su vida útil. Una vez cosechados los frutos del árbol, estos comienzan a experimentar una serie de cambios fisiológicos derivados de la maduración provocando su rápido deterioro por lo que, en algunos casos, los frutos no llegan al consumidor en óptimas condiciones (Valero & Serrano, 2010). Esta maduración excesiva o sobremaduración afecta negativamente a la calidad del fruto, tan apreciada por el consumidor. Las causas principales que producen este deterioro por sobremaduración son el ablandamiento, pérdida de peso por deshidratación, cambio de color, pardeamiento, cambios en el equilibrio entre ácidos y azúcares, entre otros (Kappel et al., 2002; Levey, 2004).

Minimizar los daños causados por esta sobremaduración y evitar las pérdidas de poscosecha son objetivos principales en la investigación a nivel agronómico (Farinati et al., 2017). Las principales técnicas que se usan actualmente para extender la vida útil del producto y reducir su tasa de

deterioro consisten en el almacenamiento en frío, el empaquetamiento en atmósferas controladas, tratamientos con calor, luz ultravioleta, poliaminas, calcio, 1-metilciclopropeno, recubrimientos comestibles, además de la aplicación exógena de fitohormonas como el metil jasmonato o el ácido salicílico (Jiang et al., 2001; Blankenship & Dole, 2003; Sallato et al., 2007; Valero & Serrano, 2010). Y aunque en la actualidad se han desarrollado tecnologías innovadoras para la conservación de la calidad de los frutos, un conocimiento más profundo sobre la biología y fisiología de estos mismos ayudaría a comprender mejor los cambios que producen el deterioro durante la sobremaduración y la poscosecha del fruto.

2. Fitohormonas en frutos no climatéricos

Las hormonas vegetales son compuestos naturales, sin valor nutritivo ni fitotóxicos, que afectan al desarrollo de las plantas e intervienen en muchos procesos metabólicos, normalmente a niveles muy bajos, permitiendo que las plantas reaccionen ante diferentes estímulos, sean internos o externos. Muchas de estas hormonas se utilizan en agricultura, como la horticultura o la viticultura, para obtener beneficios concretos, como reducir un posible daño originado por estreses abióticos y/o bióticos, además de modificar ciertas características en las plantas como su morfología o diferentes componentes, dando como resultado una mejora vegetal, a nivel global (Peleg & Blumwald, 2011; Rademacher, 2015). Fitohormonas como auxinas, citoquininas, giberelinas o ácido abscísico son conocidas por estar vinculadas a procesos como el crecimiento o maduración de frutos no climatéricos (Seymour et al., 2013; Kumar et al., 2014). En otros estudios, se indica que hormonas como el ácido jasmónico, el ácido salicílico y la melatonina también estarían implicadas en estos procesos, además de ser componentes en tratamientos para

la conservación de frutos durante su poscosecha (Sayyari et al., 2009; Cherian et al., 2014). No obstante, estas hormonas vegetales no solo actuarían por sí solas activando una red de señales, sino que su acción conjunta, tanto cooperativa como antagónica, añade complejidad a todos los procesos (Loreti et al., 2008)

2.1. Auxinas

Charles y Francis Darwin fueron los primeros en descubrir el fototropismo en coleóptilos de gramíneas (Darwin, 1880). A principios del siglo XX, se identificó un compuesto promotor del crecimiento en coleóptilos de *Avena sativa* L. (Went, 1942), al que se denominó auxina (del griego *auxein*, que significa “crecer”), cuya estructura química fue identificada, posteriormente, como la del ácido indol-3-acético (IAA; Berger & Avery, 1944). Una distancia molecular de 0,5 nm, aproximadamente, entre la carga positiva del anillo aromático y la carga negativa del grupo carboxilo es la característica estructural que confiere actividad auxínica a estas hormonas, es decir, lo que les permite actuar como promotoras del crecimiento (Koepfli et al., 1938).

La forma natural, predominante y activa de las auxinas en plantas es el IAA, aunque también existen otras formas naturales como el ácido fenilacético, el ácido indol butírico, el ácido indol propiónico, entre otras (Ludwig-Müller & Cohen 2002). La síntesis de IAA puede derivar del triptófano por 3 vías: (1) por una transaminación del triptófano dando lugar al ácido indol-3-pirúvico, que pasa a IAA por la acción de un grupo de monooxigenasas que contienen flavina, (2) por la descarboxilación del triptófano a triptamina que, después, se convertirá en IAA por las mismas monooxigenasas, y por último, (3) una descarboxilación oxidativa hace que el

triptófano produzca indolacetaldoxina y que, por hidrólisis, se obtenga IAA (Woodward & Bartel, 2005; Korasick et al., 2013). Además, existe una ruta alternativa en la síntesis de IAA, independiente del triptófano, donde el precursor indol-3-glicerol fosfato se transforma en IAA (Korasick et al., 2013).

La formación de IAA ocurre, principalmente, en meristemos apicales, hojas jóvenes y frutos en el desarrollo. El IAA influye en la división, crecimiento y diferenciación celular, estimula el crecimiento de tallos y raíces secundarias (Jenik & Barton, 2005). También, regula los tropismos de la planta (Muday, 2001), retrasa la abscisión de órganos (Ellis et al., 2005; Basu et al., 2013; Xie et al., 2018) y regula el correcto desarrollo floral (Pfluger & Zambryski, 2004). En frutos, los niveles endógenos de auxinas suelen ser muy elevados durante las primeras fases de desarrollo, debido a su implicación en la división y crecimiento celular (Böttcher et al., 2010). Además, existen numerosos estudios en los que la aplicación exógena de auxinas retrasa la maduración en frutos como las fresas, manzana, uvas o melocotones (Ohmiya & Haji, 2002; Villarreal et al., 2009; Böttcher et al., 2011).

2.2. Citoquininas

En los años 50, un nuevo compuesto capaz de promover la división celular en tejidos vegetales fue aislado a partir de muestras de DNA (*deoxyribonucleic acid*, en inglés) autoclavado, de origen animal, recibiendo el nombre de quinetina (Miller et al., 1955). Esto facilitó futuras investigaciones sobre el funcionamiento de una nueva clase de reguladores del crecimiento vegetal, ahora conocidas como citoquininas (CKs). No fue hasta el año 1963 que la

primera CK natural, a la que se le dio el nombre de zeatina, fue aislada de plantas de maíz (*Zea mays* L.; Letham, 1963).

De forma natural, la adenina es la forma parental de las CKs. A este anillo se suelen unir, en la posición N^6 , cadenas laterales para formar las CKs y, dependiendo de la cadena lateral, las CKs pueden ser isoprenoides o aromáticas (Kieber & Schaller, 2014). Dentro las CKs isoprenoides se encuentran la isopentenil adenina (iP), la zeatina, tanto *cis* como *trans*, y la dihidrozeatina. Mientras que las CKs aromáticas incluyen las familias de la benciladenina y sus derivados hidroxilados, aunque su ruta de síntesis aún se está investigando (Mok & Mok, 2001; Sakakibara, 2006). En la biosíntesis de las CKs isoprenoides, el primer paso es la transferencia del grupo isopentenil del dimetilalil difosfato al adenosín fosfato, generando iP, por la acción de la enzima isopentenil transferasa. A continuación, el citocromo P450 monooxigenasa hidroxila la iP para formar la *trans*-zeatina (Z, Takei et al., 2001; 2004; Frébort et al., 2011). La cadena isoprenoide del iP y de la Z se puede originar de la ruta del ácido mevalónico o de la ruta del metileritritol fosfato (MEP, Frébort et al., 2011).

Las CKs participan en numerosos procesos del desarrollo y crecimiento de las plantas. Además de promover la división celular, también están implicadas en el control de la relación brote/raíz y la dominancia apical (Werner et al., 2001; Shimizu-Sato et al., 2009). Promueven la diferenciación del cloroplasto y la producción de clorofilas (Chory et al., 1994; Mok & Mok, 2001), por lo que participan en el retraso de la senescencia en hojas (Kim et al., 2006). Asimismo, las CKs actúan en la asimilación y movilización de nutrientes, regulan el efecto sumidero en diferentes tejidos (Kuiper, 1988; Werner et al., 2003; Zürcher et al., 2016) y participan en las respuestas ante un estrés abiótico y biótico (Sakakibara, 2006; Argueso et al., 2009; 2012). Los niveles

de CKs son altos en frutos inmaduros, ya que están implicadas en su crecimiento (división celular) y cuajado en el árbol (Werner & Schmülling, 2009), por lo que las aplicaciones exógenas de CKs promueven el incremento del tamaño del fruto y a su vez, pueden estar implicadas en el retraso de la maduración (NeSmith, 2002; Peppi & Fidelibus, 2008).

2.3. Giberelinas

Los orígenes de las giberelinas (GAs) se remontan al siglo XIX, en Japón. La enfermedad llamada *bakanae* en plantas de arroz (*Oriza sativa* L.), causada por el hongo *Gibberella fujikuroi*, producía una sustancia que promovía una elongación excesiva de las plántulas, además de provocarles infertilidad (Yabuta & Sumiki, 1938). Estas sustancias que causaban el crecimiento vegetal fueron llamadas GAs tras los primeros estudios sobre sus propiedades. No fue hasta unos años después de la Segunda Guerra Mundial que las diferentes investigaciones sobre las GAs se difundieron a la comunidad científica internacional (Stowe & Yamaki, 1957). Gracias a estudios con mutantes enanos de *Pisum sativum* L. y *Zea mays* L., y a sus propiedades como promotoras del crecimiento, las GAs fueron reconocidas como hormonas vegetales (Brian & Hemming, 1955; Phinney, 1956).

Las GAs incluyen un largo grupo de diterpenoides tetracíclicos formados por esqueletos de 19 o 20 átomos de carbono, que se biosintetizan vía isopentenil difosfato (IPP), precursor común de isoprenoides (Wanke et al., 2001; Sponsel & Hedden, 2004). La ruta completa está dividida en tres fases y en tres localizaciones celulares diferentes. La primera fase se desarrolla en los plastidios a través de la ruta del MEP, donde el geranil-geranil difosfato se convierte en *ent*-kaureno, un hidrocarburo tetracíclico, con la ayuda de dos

ciclasas. En la segunda fase, el *ent*-kaureno se oxida para formar GA₁₂-aldehído, precursor general de las GAs. Este proceso es catalizado por las monooxigenasas dependientes del citocromo P450 que se ubican en el retículo endoplasmático. Por último, en el citosol se lleva a cabo una serie de oxidaciones sucesivas para la formación del resto de GAs (Sponsel & Hedden, 2004; Sun, 2008; Yamaguchi, 2008; Hedden & Thomas, 2012). Hasta el momento, se han identificado unas 136 GAs, siendo GA₁, GA₃, GA₄ y GA₇ las formas más activas (Yamaguchi, 2008).

Por medio de estudios en mutantes con defectos en la ruta de biosíntesis de GAs, inhibidores y aplicaciones exógenas de esta hormona, se ha podido descubrir cómo las GAs promueven importantes procesos en el desarrollo vegetal, como la proliferación celular (Archard et al., 2009), la respuesta de las GAs durante la germinación, la elongación del hipocótilo, la formación del gancho (Lee et al, 2002; Achard et al., 2007), la acumulación de clorofilas (Cheminant et al., 2011) y el control del desarrollo floral y el tiempo de floración (Chen et al, 2004; Tamaki et al., 2007). Además, las GAs promueven el cuajado del fruto y su desarrollo temprano, ya que participan durante la división celular, al igual que las CKs, en la fase I del crecimiento del fruto (**Figura 2**, Zhang et al., 2008). Debido a su implicación en diversos procesos biológico, las GAs son comúnmente utilizadas en compuestos de uso comercial y biotecnológico, en campos como la horticultura, floricultura y agricultura (Salazar-Cerezo et al., 2018). La aplicación exógena de GAs en frutos no climatéricos incrementa su firmeza y su tamaño, retrasa la maduración y permite al fruto mantener su calidad durante el almacenamiento después de su cosecha (Kappel & MacDonald, 2002; Clayton et al., 2003; Zhang & Whiting, 2011).

2.4. Ácido abscísico

El ácido abscísico (ABA) fue descubierto a principios de los años 60 por Frederick Addicott y su grupo de investigación, los cuales estudiaban posibles compuestos responsables de la abscisión en frutos de algodón. Se aislaron dos compuestos, a los que se les llamó abscisina I y abscisina II, siendo la última lo que se conoce como ABA (Addicott et al., 1968). A partir de entonces, muchos estudios se han centrado en desvelar su función.

Este sesquiterpenoide ($C_{15}H_{20}O_4$) se sintetiza por la vía del MEP, a partir de un precursor común de cinco carbonos, el IPP, presente en la formación de compuestos isoprenoides, como los carotenoides (precursores directos del ABA), clorofilas, plastoquinonas, citoquininas, giberelinas o proteínas preniladas (Wanke et al., 2001; Sponsel & Hedden, 2004). La primera fase de la biosíntesis del ABA se desarrolla en los plastidios. Un proceso de epoxidación transforma la zeaxantina en violaxantina, pasando por la anteraxantina, como intermediario. Tras sufrir una serie de modificaciones estructurales, la violaxantina se convierte en dos isómeros: 9-*cis*-violaxantina y 9-*cis*-neoxantina, que seguidamente, dan lugar a la xantoxina, gracias a la acción clave de la enzima 9-*cis*-epoxicarotenoide dioxigenasa (NCED). La xantoxina es exportada al citosol, donde se convertirá finalmente en ABA (Schwartz et al., 1997, Xiong & Zhu, 2003; Nambara & Marion-Poll, 2005; Finkelstein, 2013).

Aunque en un principio, su nombre indicara que estaba implicado en la abscisión de frutos, hojas y flores (Schwartz & Zeevart, 2004; Mauseth, 2016), el ABA es una hormona que regula la dormición de las semillas y yemas, además de participar activamente en otros procesos fisiológicos importantes para las plantas como la maduración del embrión y su germinación, división y elongación celular, inducción floral y especialmente, en procesos de

respuesta a diversos tipos de estrés abiótico: sequía, salinidad, frío, radiación ultravioleta, entre otros (Nambara & Marion-Poll, 2005; Finkelstein, 2013). A pesar de ser conocida como una hormona inhibidora del crecimiento, el ABA mantiene un papel importante en la maduración de los frutos no climatéricos, ya que actúa como regulador del cambio de color y sabor de los frutos, a través de la síntesis de antocianinas y la acumulación de azúcares, que se produce al inicio del proceso de maduración (Li et al., 2011; Kumar et al., 2014; Wang et al., 2015).

2.5. Ácido jasmónico

En 1962, se aisló por primera vez el éster metílico del ácido jasmónico (metil jasmonato, MeJA) a partir de un ácido esencial procedente del *Jasminum grandiflorum* L., o jazmín (Demole et al., 1962). Pero no fue hasta principios de 1990 que se demostró el gran papel que ejerce el ácido jasmónico (JA) como potente señal en la defensa de las plantas contra patógenos, y su participación en numerosos procesos fisiológicos (Howe, 2004; Browse, 2009).

El JA es una hormona vegetal que pertenece a la familia de los ácidos grasos oxigenados, comúnmente llamados oxilipinas. Su biosíntesis comienza en los plastidios. A partir del ácido graso α -linolénico, liberado de las membranas del cloroplasto, las lipoxigenasas y dioxigenasas oxidan ácidos grasos poliinsaturados (Blée, 2002) para formar hidroperóxidos, los cuales pueden dañar la estructura de la membrana cuando su producción excede la capacidad de los antioxidantes de membrana (Gardner, 1979; Inouye, 1984). Sin embargo, en condiciones de balance oxidativo, estos hidroperóxidos actúan como sustrato de diferentes enzimas, dando como resultado la

formación de diversas clases de oxilipinas, como el ácido 12-*oxo*-fitodienoico (OPDA; Blée, 2002; Feussner and Wasternack, 2002; Mosblech et al., 2009; Wasternack, 2007). El OPDA se traslada al peroxisoma, donde la enzima OPDA reductasa convierte esta molécula en el ácido 3-*oxo*-pentenilo-ciclopentano-octanoico, el cual experimenta tres ciclos de β -oxidaciones para dar lugar al JA (Schaller & Stinzi, 2009; Wasternack & Kombrink, 2010). Los derivados del JA se obtienen gracias a la acción de diferentes enzimas que modifican esta hormona. Entre los derivados, se encuentra el MeJA, un compuesto volátil de uso comercial muy elevado (Perez et al., 1997; Kondo, 2010) y los conjugados de aminoácidos (Yan et al., 2016). Por otro lado, los hidroperóxidos también pueden ser oxidados por vías no enzimáticas para generar fitoprostranos, mediadores de las defensas vegetales y marcadores de estrés oxidativo (Mueller, 2004; Schaller & Stinzi, 2009).

Los niveles endógenos de JA pueden variar dependiendo de las condiciones ambientales o el estado de la planta, así como también dependerá del tipo de tejido en el que se encuentre (Howe, 2004). En plantas sin estrés, los niveles suelen ser más altos en tejidos jóvenes que en tejidos viejos (Wasternack & Hause, 2002). En procesos de desarrollo, tanto en flores como en frutos, el JA se acumula a niveles elevados, sugiriendo así, un papel importante en el desarrollo reproductivo de las plantas (Howe, 2004). Los frutos no climatéricos como fresas y uvas presentan una concentración elevada de MeJA, JA y jasmonato isoleucina cuando el fruto aún es inmaduro, que luego disminuye cuando se inicia el proceso de maduración (Gansser et al., 1997; Böttcher et al., 2015). Asimismo, el JA se utiliza para mejorar la producción de metabolitos secundarios. La aplicación exógena de MeJA induce el cambio de coloración en frutos, regulando positivamente la ruta de los fenilpropanoides y genes que regulan la biosíntesis de JA (Howe, 2004; Concha et al., 2013).

2.6. Ácido salicílico

El ingrediente activo de un compuesto con acción calmante fue aislado de árboles del género *Salix* en el siglo XIX. Conocido como ácido salicílico (SA), en 1899 se obtuvo un derivado comercial con el nombre de aspirina (ácido acetilsalicílico, ASA). Pero no fue hasta el siglo XX cuando se descubrió que el SA estaba implicado en la activación de la respuesta contra patógenos en plantas (Grant & Lamb, 2006).

El SA es un compuesto fenólico sintetizado a partir del corismato, producto final de la ruta de biosíntesis del siquimato. Mediante el empleo del marcaje radioactivo y del análisis genético en mutantes, se llevó a cabo la identificación de dos rutas biosintéticas diferentes que se producen en compartimentos diferentes, necesarias para la formación de SA en plantas: la ruta de los fenilpropanoides, en el citoplasma, y la ruta del isocorismato, en los cloroplastos (Delany, 2004; Dempsey et al., 2011; Rivas-San Vicente & Plasencia, 2011).

Los niveles de SA aumentan en los tejidos vegetales que se ven expuestos a una infección. Esta hormona actúa como una señal endógena activando la resistencia sistémica en plantas, a través de la inducción de genes que activan la producción de enzimas clave para la resistencia contra patógenos, como la catalasa o como la peroxidasa (Wang & Irving, 2001; Bari & Jones, 2009). No obstante, a pesar de que la mayoría de investigaciones se centran en el papel principal del SA en la respuesta contra patógenos (Shah, 2003; Durrant & Dong, 2004; Vlot et al., 2009), esta hormona ha sido reconocida como mediadora en las señales reguladoras en la respuesta a diversos estreses abióticos, como la sequía, estrés por frío, tolerancia a metales pesados, estrés por calor y estrés osmótico (Borsani et al., 2001; Kang & Saltveit 2002; Larkindale & Knight, 2002; Metwally et al., 2003; Munné-Bosch & Peñuelas,

2003; Chini et al., 2004; Freeman et al., 2005). A pesar de la escasa información sobre la acumulación de SA durante la maduración de frutos y su posible función, algunos estudios con aplicaciones exógenas de SA sugieren un rol como inhibidor de la maduración (Asghari & Aghdam, 2010; Wang et al., 2015b)

2.7. Melatonina

La melatonina o *N*-acetil-5-metoxitriptamina es una molécula aislada de la glándula pineal bovina a finales de los años 50 (Lerner et al., 1958). Al participar en numerosos procesos fisiológicos en animales y humanos (Reiter, 1993; Dollins et al., 1994; Pandi-Perumal et al., 2008; Hardeland et al., 2012), esta indolamina se convirtió en una de las moléculas más estudiadas desde su descubrimiento. Siendo exclusivamente considerada una hormona animal (Reiter, 1991), la melatonina se identificó en plantas en el año 1995 (Dubbels et al., 1995; Hattori et al., 1995). Desde entonces, esta molécula se ha detectado en numerosas especies vegetales y en diferentes órganos como hojas, tallos, raíces, flores, frutos y semillas (Nawaz et al., 2016).

El precursor principal para la biosíntesis de melatonina es el triptófano, un aminoácido esencial producido por las plantas a través de la vía del corismato (Murch et al., 2000). Este triptófano es convertido a triptamina por el triptófano descarboxilasa. Seguidamente, la triptamina 5-hidroxilasa convierte la triptamina en serotonina (Posmyk & Janas, 2009). La serotonina se transforma en el intermediario *N*-acetilserotonina mediante una *N*-acetilación catalizada por la serotonina *N*-acetiltransferasa. Como último paso de la ruta biosintética, la *N*-acetilserotonina se metila por la acción de la acetilserotonina metiltransferasa para generar melatonina (Byeon et al., 2013).

Diversas investigaciones muestran que la melatonina es un metabolito multifuncional debido a su implicación en numerosos procesos fisiológicos. Esta molécula juega un papel importante en respuestas al estrés en plantas, como frío, salinidad y sequía, entre otros (Arnao & Hernández-Ruiz, 2014, 2015; Marta et al., 2016; Zhang et al., 2016; Li et al., 2017). Por ello, muchos estudios la identifican como un antioxidante natural, ya que su carácter anfífilico le permite atravesar fácilmente la membrana celular, distribuirse por el núcleo, mitocondria y citosol, y actuar como protección contra las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (Posmyk & Janas, 2009; Tan et al., 2012; Reiter et al., 2013; Arnao & Hernández-Ruiz, 2015). Sin embargo, se ha visto que la melatonina, además, participa en el desarrollo vegetal como regulador del crecimiento en raíces y tallos (Pelagio-Flores et al., 2012; Arnao & Hernández-Ruiz, 2015, 2017; Wang et al., 2016), promueve la germinación de las semillas (Zhang et al., 2014), retrasa la senescencia foliar (Arnao & Hernández-Ruiz, 2008; Wang et al., 2011) y la floración (Byeon & Back, 2014). Se ha observado que la aplicación exógena de melatonina afecta significativamente en la concentración de azúcares en maíz, manzana, *Arabidopsis* y en *Prunus avium* x *Prunus cerasus* (Sarropoulou et al., 2012; Wang et al., 2014; Zhao et al., 2015a, 2015b). Estudios recientes en frutos, señalan a este compuesto como promotor de maduración y regulador de senescencia en tomate y banana, dos frutos climatéricos (Sun et al., 2015, 2016; Hu et al., 2017). Por otro lado, durante el pre-verano, la aplicación exógena de melatonina en uvas provoca cambios en el tamaño y peso del fruto, favoreciendo su sincronización en el proceso de maduración, así como una mayor acumulación de azúcares (Meng et al., 2015).

3. Indicadores de maduración y calidad

A nivel comercial, la calidad del fruto maduro es un aspecto muy apreciado por los consumidores. Durante la maduración, se lleva a cabo una serie de procesos fisiológicos, tanto físicos como bioquímicos, que promueven cambios en el color, sabor, textura, aroma y contenido nutricional del fruto (Lelievre et al., 1997; Giovannoni, 2004). Estos cambios determinan su calidad final y su vida útil una vez cosechados del árbol. Por ello, los indicadores de maduración son una herramienta útil para determinar la calidad óptima del fruto.

3.1. Antocianinas

La acumulación de pigmentos en frutos es un importante indicador de maduración del fruto en el árbol. Muchos de estos pigmentos juegan un papel importante en la protección contra posibles estreses abióticos, como la protección contra la luz UV y, además, debido a sus propiedades, suelen atraer polinizadores o predadores que contribuyen a la dispersión de las semillas del fruto (Schaefer et al., 2004; Tanaka et al., 2008).

En algunos frutos no climatéricos, como las uvas, fresas o cerezas, los pigmentos más abundantes son las antocianinas, compuestos hidrosolubles responsables de la coloración rojiza de los frutos durante la maduración (Zhang et al., 2014). Se sintetizan a partir del aminoácido aromático fenilalanina, que proviene del corismato, producto final en la ruta del siquimato. La fenilalanina es el precursor común de numerosos compuestos fenólicos derivados del metabolismo secundario de las plantas, entre los que se encuentran los flavonoides. Las antocianinas pertenecen a este último grupo debido a su estructura química formada por un esqueleto C6-C3-C6 llamado

antocianidina, la cual es una aglicona unida a una molécula de azúcar (Sinopoli et al., 2019). Estas moléculas suelen ser marcadores de maduración debido a que se acumulan progresivamente durante este proceso (Usenik et al., 2008).

Las antocianinas son pigmentos con una actividad antioxidante muy potente, por ello tienen un valor nutricional importante para el consumidor, ya que están descritos como compuestos que ayudan a prevenir enfermedades cardiovasculares, tienen actividad anticarcinogénica y antiinflamatoria y controlan la diabetes (He & Giusti, 2010).

3.2. Sólidos solubles totales y acidez total

Además de la apariencia externa, el sabor es otro parámetro clave para la aceptación final de los frutos carnosos con hueso. Los dos factores más importantes que influyen en el sabor son los sólidos solubles totales (TSS, también llamados azúcares solubles totales) y la acidez total (TA). Estos dos parámetros se utilizan (incluyendo la relación TSS/TA) como indicadores de la maduración de los frutos (Valero & Serrano, 2010), además de informar sobre el potencial grado de aceptación del consumidor (Crisosto et al., 2003)

Por un lado, los TSS son un parámetro utilizado comúnmente para determinar la cantidad aproximada de azúcares existentes en frutos (Magwaza & Oparab, 2015). La glucosa, fructosa y sacarosa son los carbohidratos más abundantes en frutos. Estas moléculas provienen de la hidrólisis del almidón o por la movilización de azúcares de la planta madre hacia el fruto, que se acumulan durante el proceso de maduración (Tucker, 1993). Además, se ha estudiado el efecto de los azúcares en el crecimiento y desarrollo de las plantas, actuando como señal en diversos procesos (Jia et al., 2013). Por otro

lado, el parámetro de TA es un componente importante en la calidad organoléptica de los frutos, siendo los ácidos orgánicos, como el ácido málico o el ácido cítrico, los responsables de su acidez (Tucker, 1993). La acumulación de TA puede variar según el cultivar y la especie que se estudie (Crisosto et al., 2003).

4. Modelo de estudio: *Prunus avium* L. var. Prime Giant

Dentro del género *Prunus* de la familia de las Rosáceas, encontramos las cerezas dulces (*Prunus avium* L.), uno de los cultivos más importantes alrededor del mundo, teniendo como productores principales a Turquía, Estados Unidos, Irán, Italia, España y Chile, en los últimos siete años (FAO, 2018). En el año 2016, la producción de cerezas se estimó en unas 94 mil toneladas, solo en España, representado, aproximadamente, el 4% de la producción total mundial en el mismo año. Debido a las condiciones favorables del clima mediterráneo, España es uno de los principales exportadores de Europa gracias a la cosecha temprana de estos frutos. Las principales zonas de cultivo de cerezas se encuentran en Extremadura, Cataluña y Aragón (Valverde, 2014). La gran producción de este fruto se debe a sus diversas características, tanto nutricionales como organolépticas, que le otorgan propiedades altamente apreciadas por el consumidor, como son su dulce sabor, color del fruto y firmeza (Crisosto et al., 2003; Serrano et al., 2005; Usenik et al., 2008).

Ambrunés, Bing, Lapins, Burlat, Hong Deng, Sunburst, Santina y Satonishiki son solo una parte de la extensa variedad de cultivares que se pueden encontrar alrededor del mundo. Dentro de los cultivares con gran importancia local, se puede encontrar la variedad Prime Giant, proveniente de

California, Estados Unidos. También llamada Giant Red, Mariant o Giant Ruby, esta variedad creada por Marvin Nies es un híbrido entre los parentales Lodi x Ruby, caracterizado por su maduración temprana y su elevada productividad. Su fruto es de color rojo oscuro, firme y grande, llegando a tener un calibre de unos 28-30 mm (**Figura 4**, Quero-García et al., 2017).

Las cerezas están clasificadas, generalmente, como frutos no climatéricos porque no exhiben un aumento en la producción de etileno durante el desarrollo de estos frutos. Aunque diversos trabajos han estudiado el efecto de la aplicación exógena de esta hormona durante la maduración de las cerezas, se ha determinado que el etileno no afecta este proceso (Kondo & Inoue, 1997; Gong et al., 2002; Zhao et al., 2013). Por lo que, la regulación del proceso de maduración en cerezas es independiente del etileno. Debido a esto, a sus propiedades organolépticas y a las claras diferencias entre estadios en su desarrollo, las cerezas son un buen modelo de fruto con hueso no climatérico.



Figura 4. Etapas de formación del fruto en el árbol *Prunus avium* L. var. Prime Giant

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El objetivo de esta tesis es estudiar la regulación a nivel hormonal, y sus posibles interacciones, a lo largo del crecimiento, proceso de maduración y sobremaduración en cerezas, como modelo de fruto no climatérico.

Para poder elucidar el rol de las diferentes fitohormonas frente a estos procesos, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- ❖ Analizar del perfil hormonal para comprender el posible papel que desempeñan las hormonas durante el desarrollo de las cerezas en el árbol.
- ❖ Estudiar el rol de la melatonina en la maduración de este fruto y cómo afecta a su calidad.
- ❖ Evaluar la regulación hormonal durante el proceso de sobremaduración y deterioro de las cerezas.
- ❖ Analizar el papel del ABA durante el tratamiento a baja temperatura para la conservación de las cerezas.

**INFORME DEL DIRECTOR DE
TESIS SOBRE EL IMPACTO DE
LOS ARTÍCULOS PUBLICADOS
Y LA PARTICIPACIÓN DE LA
DOCTORANDA**



Barcelona, 10 de julio de 2019

El Dr. Sergi Munné Bosch, como director de la Tesis Doctoral titulada **“Regulación hormonal del crecimiento, maduración y sobremaduración en un modelo de fruto no climatérico: *Prunus avium* L. Prime Giant”** presentada por la doctoranda Verónica Tijero Esteve,

INFORMA sobre el factor de impacto y la participación de la doctoranda en cada uno de los artículos incluidos en la memoria de esta Tesis Doctoral

Capítulo 1. Artículo **“Implication of abscisic acid on ripening and quality in sweet cherries: Differential effects during pre- and post-harvest”**, publicado en la revista *Frontiers in Plant Science*, índice de impacto (2018) de 4.106. En este trabajo se describe la implicación del ácido abscísico en procesos de pre- y poscosecha en las cerezas, un modelo de fruto no climatérico. Cabe destacar la aproximación experimental original en que se evalúa el papel de esta importante fitohormona comparativamente antes y después de la cosecha permitiendo establecer un análisis comparativo de ambos de procesos que es de gran interés. La doctoranda ha realizado todos los muestreos, los análisis de las muestras, el tratamiento estadístico y la elaboración de los resultados, y además ha participado en el diseño experimental y discusión de los resultados, constanding por tanto como primera autora del trabajo. La doctoranda ha demostrado una gran capacidad de trabajo, así como un excelente manejo en los muestreos y una excelente predisposición en la introducción al uso de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para el análisis de vitamina E, y en la cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) para los análisis de hormonas. La doctoranda demuestra también una gran capacidad de análisis e interpretación de los resultados y se introduce, asimismo, en la redacción de artículos científicos.

Capítulo 2. Artículo **“Linking hormonal profiles with variations in sugar and anthocyanin contents during the natural development and ripening of sweet cherries”**, publicado en la revista *New Biotechnology*, índice de impacto (2018) de 3.739. En este trabajo se estudia la relación entre el perfil



hormonal y algunos parámetros de calidad de las cerezas, demostrando por primera vez que la maduración de las cerezas no se regula por la acción de una única hormona, sino por un balance hormonal, el cual además influirá de forma decisiva en la calidad del fruto. Cabe destacar la aproximación experimental original en que se realiza un análisis del perfil hormonal que permite elucidar el papel de diferentes hormonas y su posible interacción en el control de la maduración en este modelo de fruto no climatérico. La doctoranda ha participado en todos los muestreos y los análisis de las muestras y además ha contribuido en el diseño experimental y discusión de los resultados, constando como coprimera autora del trabajo. La doctoranda ha demostrado una gran capacidad de trabajo, así como un excelente manejo en los muestreos, así como en el LC-MS/MS para los análisis del perfil hormonal. La doctoranda demuestra también una gran capacidad de análisis e interpretación de los resultados y participa activamente en la redacción del artículo.

Capítulo 3. Artículo **“Melatonin as an inhibitor of sweet cherries ripening in orchard trees”**, publicado en la revista *Plant Physiology and Biochemistry*, índice de impacto (2018) de 3.404. En este trabajo se describe el papel de la melatonina en la regulación de la maduración de las cerezas. Cabe destacar la aproximación experimental original y de gran robustez en la que no solo se analizan los niveles endógenos de melatonina en relación a otros reguladores y parámetros de calidad, sino que además se realizan tratamientos con aplicaciones de melatonina a diferentes concentraciones que permiten elucidar el papel de este regulador en la maduración de este fruto no climatérico. La doctoranda ha realizado todos los muestreos, los análisis de las muestras, el tratamiento estadístico y la elaboración de los resultados, y además ha participado en el diseño experimental y discusión de los resultados, constando por tanto como primera autora del trabajo. La doctoranda ha demostrado una gran capacidad de trabajo, así como un excelente manejo en los muestreos y un excelente manejo del LC-MS/MS para los análisis de melatonina y otros reguladores. La doctoranda demuestra también una gran capacidad de análisis e interpretación de los resultados y participa activamente en la redacción del artículo.

Capítulo 4. Artículo **“Hormonal profiling reveals a hormonal cross-talk during fruit decay in sweet cherries”**, publicado en la revista *Journal of Plant Growth Regulation*, índice de impacto (2018) de 2.179. En este trabajo se describe por primera vez como el perfil hormonal cambia durante la maduración de las cerezas en poscosecha, lo cual tiene gran importancia para el posible desarrollo de nuevos productos para la inhibición de la sobremaduración en este modelo de fruto no climatérico. La doctoranda ha



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

realizado todos los muestreos, los análisis de las muestras, el tratamiento estadístico y la elaboración de los resultados, y además ha participado en el diseño experimental y discusión de los resultados, constanding por tanto como primera autora del trabajo. La doctoranda ha demostrado una gran capacidad de trabajo, así como un excelente manejo del LC-MS/MS para los análisis de hormonas. La doctoranda demuestra también una gran capacidad de análisis e interpretación de los resultados y, lo que es todavía más importante, una gran capacidad de autocrítica. La doctoranda demuestra un excelente grado de madurez científica.

Y, para que así conste a los efectos oportunos,

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Sergi Munné Bosch', written over a horizontal line.

Dr. Sergi Munné Bosch

RESULTADOS

Capítulo 1: Implicación del ácido abscísico en la maduración y calidad de cerezas dulces: efectos diferenciales durante la pre- y la poscosecha.

Chapter 1: Implication of abscisic acid on ripening and quality in sweet cherries: Differential effects during pre- and post-harvest

Verónica Tijero, Natalia Teribia, Paula Muñoz, Sergi Munné-Bosch

Departamento de Biología Evolutiva, Ecología y Ciencias Ambientales, Sección de Fisiología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona, Av. Diagonal 643, 08028, Barcelona, España.

Publicado en **Frontiers in Plant Science** (2016) 7, 602

RESUMEN DEL CAPÍTULO 1

La cereza dulce, fruto no climatérico, generalmente se almacena en frío durante la poscosecha para evitar la sobremaduración. El objetivo del estudio fue evaluar el papel del ácido abscísico (ABA) en el crecimiento y maduración de este fruto, considerando, también, su supuesta implicación en la sobremaduración y los efectos en la calidad. En este estudio se midieron las concentraciones endógenas de ABA durante la maduración de las cerezas dulces (*Prunus avium* L. var. Prime Giant), recolectadas de diferentes árboles frutales, y en cerezas expuestas a 4°C y 23°C durante 10 días de poscosecha. Además, examinamos hasta qué punto las concentraciones endógenas de ABA estaban relacionadas con los parámetros de calidad, como la biomasa del fruto, la acumulación de antocianinas y los niveles de vitaminas C y E. Las concentraciones endógenas de ABA aumentaron progresivamente durante el crecimiento y maduración del fruto en el árbol, para disminuir, posteriormente, durante la poscosecha a 23°C. Sin embargo, el tratamiento con frío aumentó los niveles de ABA, que produjo una inhibición de la sobremaduración. Además, los niveles de ABA se correlacionaron positivamente con los niveles de antocianinas y vitamina E durante la precosecha, pero no durante la poscosecha. En conclusión, el ABA juega un papel importante en el desarrollo de la cereza dulce, estimulando su proceso de maduración e influyendo positivamente en los parámetros de calidad durante la precosecha. También se discute la posible influencia de ABA previniendo la sobremaduración en cerezas dulces almacenadas en frío.



Implication of Abscisic Acid on Ripening and Quality in Sweet Cherries: Differential Effects during Pre- and Post-harvest

Verónica Tijero[†], Natalia Teribia[†], Paula Muñoz and Sergi Munné-Bosch*

Department of Plant Biology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain

OPEN ACCESS

Edited by:

Mario Pezzotti,
University of Verona, Italy

Reviewed by:

Christoph Martin Geilfus,
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel,
Germany
Gianfranco Diretto,
Italian National Agency for New
Technologies, Energy and Sustainable
Economic Development, Italy

*Correspondence:

Sergi Munné-Bosch
smunne@ub.edu

[†]These authors have contributed
equally to this work.

Specialty section:

This article was submitted to
Plant Physiology,
a section of the journal
Frontiers in Plant Science

Received: 11 February 2016

Accepted: 18 April 2016

Published: 04 May 2016

Citation:

Tijero V, Teribia N, Muñoz P
and Munné-Bosch S (2016)
Implication of Abscisic Acid
on Ripening and Quality in Sweet
Cherries: Differential Effects during
Pre- and Post-harvest.
Front. Plant Sci. 7:602.
doi: 10.3389/fpls.2016.00602

Sweet cherry, a non-climacteric fruit, is usually cold-stored during post-harvest to prevent over-ripening. The aim of the study was to evaluate the role of abscisic acid (ABA) on fruit growth and ripening of this fruit, considering as well its putative implication in over-ripening and effects on quality. We measured the endogenous concentrations of ABA during the ripening of sweet cherries (*Prunus avium* L. var. Prime Giant) collected from orchard trees and in cherries exposed to 4°C and 23°C during 10 days of post-harvest. Furthermore, we examined to what extent endogenous ABA concentrations were related to quality parameters, such as fruit biomass, anthocyanin accumulation and levels of vitamins C and E. Endogenous concentrations of ABA in fruits increased progressively during fruit growth and ripening on the tree, to decrease later during post-harvest at 23°C. Cold treatment, however, increased ABA levels and led to an inhibition of over-ripening. Furthermore, ABA levels positively correlated with anthocyanin and vitamin E levels during pre-harvest, but not during post-harvest. We conclude that ABA plays a major role in sweet cherry development, stimulating its ripening process and positively influencing quality parameters during pre-harvest. The possible influence of ABA preventing over-ripening in cold-stored sweet cherries is also discussed.

Keywords: sweet cherry, ABA, ripening, over-ripening, ascorbate, vitamin E, cold storage

INTRODUCTION

In recent decades, sweet cherry has become one of the most important non-climacteric fruits worldwide, with an important distribution to international markets from highly productive countries at origin, such as Turkey, United States, Iran, Italy, and Spain, among others (FAO, 2015). However, both its flavor and nutritional quality is strongly dependent on tree growth conditions at pre-harvest, post-harvest treatments and its consumption at an optimum ripening stage (Ashton, 2007). Over-ripening, which leads to a loss of quality during post-harvest, is associated with fruit darkening, softening and a general loss of organoleptic properties (Meheriuk et al., 1995). Cold treatments are generally used to store them properly during post-harvest in order to avoid fruit quality loss, but the physiological and biochemical mechanisms underlying fruit ripening on the tree and over-ripening during post-harvest are still relatively unknown for sweet cherries.

It has been shown that high concentrations of abscisic acid (ABA) are required for ripening in sweet cherries (Luo et al., 2013; Wang et al., 2015). ABA is a sesquiterpenoid hormone, derived from carotenoids, that is implicated in several physiological processes, from seed dormancy to senescence processes, including plant stress responses and the regulation of fruit development (Nambara and Marion-Poll, 2005; Finkelstein, 2013; Leng et al., 2014). ABA has been shown to play a major role in the ripening process of non-climacteric fleshy fruits, such as cherry fruits, modulating color changes (through modulation of anthocyanin biosynthesis) and sugar accumulation (Kumar et al., 2014; Wang et al., 2015). However, nothing is known about the possible role of ABA in the regulation of fruit quality in terms of vitamin C and E accumulation, or to what extent ABA can affect over-ripening processes in sweet cherries.

Among various quality parameters, the content and composition of water- and lipid-soluble vitamins in edible fleshy fruits is of paramount importance for human health (FAO, 2004). Sweet cherries are rich in vitamin C, which is considered one of the most important water-soluble antioxidants, together with anthocyanins, in this fruit (Serrano et al., 2005). Aside from protecting cells from reactive oxygen species, ascorbate is involved in the regulation of growth processes in plants (Veljovic-Jovanovic et al., 2001), and it plays a role, as a cofactor, in the regulation of 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED), the key limiting step in the biosynthesis of ABA from carotenoids (Conklin and Barth, 2004). Furthermore, ascorbate recycles oxidized tocopherols (vitamin E), when this lipid-soluble antioxidant reacts with lipid peroxy radicals in its function of inhibiting the propagation of lipid peroxidation in biological membranes (Munné-Bosch and Alegre, 2002). Although vitamin C has received some attention in the ripening of sweet cherries as a component of organic acids (Serrano et al., 2005), nothing is known about the levels of vitamin E, its possible variations with ripening and regulation by phytohormones in non-climacteric fruits. Only in mango, a climacteric fruit, it has been shown that vitamin E biosynthesis may be modulated by ethylene (Singh et al., 2011).

The aim of this study was to get some insights into the role of ABA in the ripening process of sweet cherries, focusing on the endogenous levels of this phytohormone during fruit development in orchard trees and under different conditions of post-harvest. In addition, to better understand the role of ABA in ripening, as well as the loss of quality during fruit storage, we simultaneously analyzed various parameters associated with the ripening process and the fruit quality, such as fruit biomass, anthocyanin accumulation, and levels of antioxidants, including carotenoids, and vitamins C and E.

MATERIALS AND METHODS

Experimental Design and Sampling

Three independent, complementary experiments were performed using sweet cherries (*Prunus avium* L. var. Prime Giant). The first experiment focused on a study of fruit ripening on the tree followed by an over-ripening process at 23°C, the

second one was performed preventing over-ripening at 4°C, and the third one was performed to test for the tissular location of vitamins in cherry fruits.

For the first experiment, sweet cherries were obtained from trees growing in an exploited orchard at Partida Vall del Sector III (Lleida, NE Spain). Fruits were harvested at various developmental stages on the tree between 23 and 4 days before harvest, and between 3 and 10 days of post-harvest at 23°C, which led to over-ripening (Supplementary Figure S1). First sampling in orchard trees was performed during 30th April 2015 (23 days before harvest), which corresponds to 34 days after full bloom. For the second experiment, 10 kg from the same cherry cultivar and orchard were brought to the laboratory 3 days after commercial harvest. Fruits without visual defects were chosen for experiments. Then, half of the fruits were kept at 23 ± 2°C in the laboratory, while the other half were subject to 4 ± 1°C in a cold chamber. In both cases, fruits were kept in darkness and samples were taken daily during storage for 1 week.

A third experiment was performed to evaluate possible tissue-specific accumulation of vitamins in sweet cherries. The pit, flesh and skin from fruits collected 23 days pre-harvest or 3 days post-harvest were manually separated and immediately immersed in liquid nitrogen for hormone, anthocyanin and vitamins C and E analyses.

All samplings were performed early in the morning (between 9 and 10 a.m. local time) with an average temperature of 10 ± 2°C during pre-harvest and 23 ± 2°C during post-harvest for the first experiment, and with an average temperature of 4 ± 1°C for the second one. Six fruits per tree from eight trees were randomly sampled at each time point during pre-harvest, and six fruits from commercial boxes were randomly sampled daily during post-harvest, for each, 23°C and cold storage. For all experiments, samples were immediately snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analyses.

Endogenous Concentrations of Abscisic Acid

Abscisic acid levels were determined by ultrahigh-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) as described previously (Müller and Munné-Bosch, 2011). In short, 100 mg per sample were extracted with 200 µL methanol:isopropanol:acetic acid 50:49:1 (v/v/v) using ultrasonication and vortexing (Branson 2510 ultrasonic cleaner, Branson, Danbury, CT, USA) for 30 min. Deuterium-labeled ABA was then added, and after centrifugation at 600 g for 15 min at 4°C, the pellet was re-extracted using the same procedure. Supernatants were pooled and filtered through a 0.22 µm PTFE filter (Waters, Milford, MA, USA) before analyses. ABA levels were analyzed by using UHPLC-ESI-MS/MS as described in Müller and Munné-Bosch (2011). Quantification was made considering recovery rates for each sample by using a deuterium-labeled internal standard.

Fruit Quality Parameters

Fruit biomass was estimated by weighing the samples immediately at each sampling time point or after transferring

them to the laboratory in bags (with high humidity to avoid desiccation).

Total anthocyanins were determined spectrophotometrically in methanolic extracts as described (Gitelson et al., 2001). In short, 200 mg per sample were extracted with 1 mL methanol using ultrasonication and vortexing. Extracts were centrifuged at 600 g for 10 min at 4°C and the pellet was re-extracted following the same procedure. Supernatants were pooled and 1% HCl was added. Then, total anthocyanins were measured spectrophotometrically at 530 nm. Total anthocyanins were calculated using the molar extinction coefficient of cyanidin-3-glucoside as a reference, as described (Siegelman and Hendricks, 1958).

Carotenoids levels were estimated by HPLC after extraction with methanol, as described (Munné-Bosch and Alegre, 2000). In short, samples were extracted with methanol, as described for anthocyanins, and separated on a Dupont non-encapped Zorbax ODS-5 μm column (250 mm long, 4.6 mm i.d.; 20% Carbon, Teknokroma, St. Cugat, Spain) at 30°C for 38 min at a flow rate of 1 mL min^{-1} . The solvent mixture for the gradient consisted of (A) acetonitrile:methanol (85:15, v/v) and (B) methanol:ethyl acetate (68:32, v/v). The gradient used was: 0–14 min 100% A, 0% B; 14–16 min decreasing to 0% A, 100% B; 16–28 min 0% A, 100% B; 28–30 min increasing to 100% A, 0% B; and 30–38 min 100% A, 0% B. Detection was carried out at 445 nm and compounds were identified and quantified as described previously (Munné-Bosch and Alegre, 2000).

The analysis of vitamin C was adapted from Takahama and Oniki (1992) and Queval and Noctor (2007). In short, ascorbic acid and its oxidized form, dehydroascorbic acid were extracted with 6% *m*-phosphoric acid (w/v) and 0.2 mM diethylenetriaminepentaacetic acid, using ultrasonication and vortexing. After centrifugation at 600 g for 10 min at 4°C, the supernatants were collected and the pellet was re-extracted following the same procedure. Their levels were determined spectrophotometrically at 265 nm, using the ascorbate oxidase assay. The oxidized state of ascorbate was calculated as $\text{DHA}/(\text{AA} + \text{DHA}) \times 100$, where AA is ascorbate and DHA is dehydroascorbate.

The analysis of vitamin E was performed as described (Amaral et al., 2005). In short, 200 mg per sample were extracted with methanol, exactly as described for anthocyanins, and then filtered prior to HPLC analyses. The HPLC equipment consisted of an integrated system with a Jasco PU-2089 Plus pump, a Jasco AS-2055 Plus auto-sampler and a FP-1520 fluorescence detector (Jasco, Tokyo, Japan). All tocopherol and tocotrienol forms were separated on an Inertsil 100A (5 μm , 30 \times 250 mm, GL Sciences Inc., Tokyo, Japan) normal-phase column, operating at room temperature. The flow rate was 0.7 mL min^{-1} and the injection volume was 10 μL . The mobile phase was a mixture of *n*-hexane and *p*-dioxane (95.5:4.5, v/v). Detection was carried out at an excitation of 295 nm and emission at 330 nm. Quantification was based on the results obtained from the fluorescence signal and compared to that of a calibration curve made with authentic standards of each compound (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany).

Statistical Analysis

Data were analyzed by using one-way (first experiment) or two-way (second experiment) factorial analysis of variance (ANOVA). Multiple comparisons tests were carried out by using Bonferroni *post-hoc* tests. In all cases, differences were considered significant at a probability level of $P \leq 0.05$. Furthermore, correlation analyses using the Spearman rank's correlation were made. All statistical analyses were performed using the SPSS 20.0 statistical package.

RESULTS

ABA Levels Increase During Ripening on the Tree but Decrease During Over-Ripening

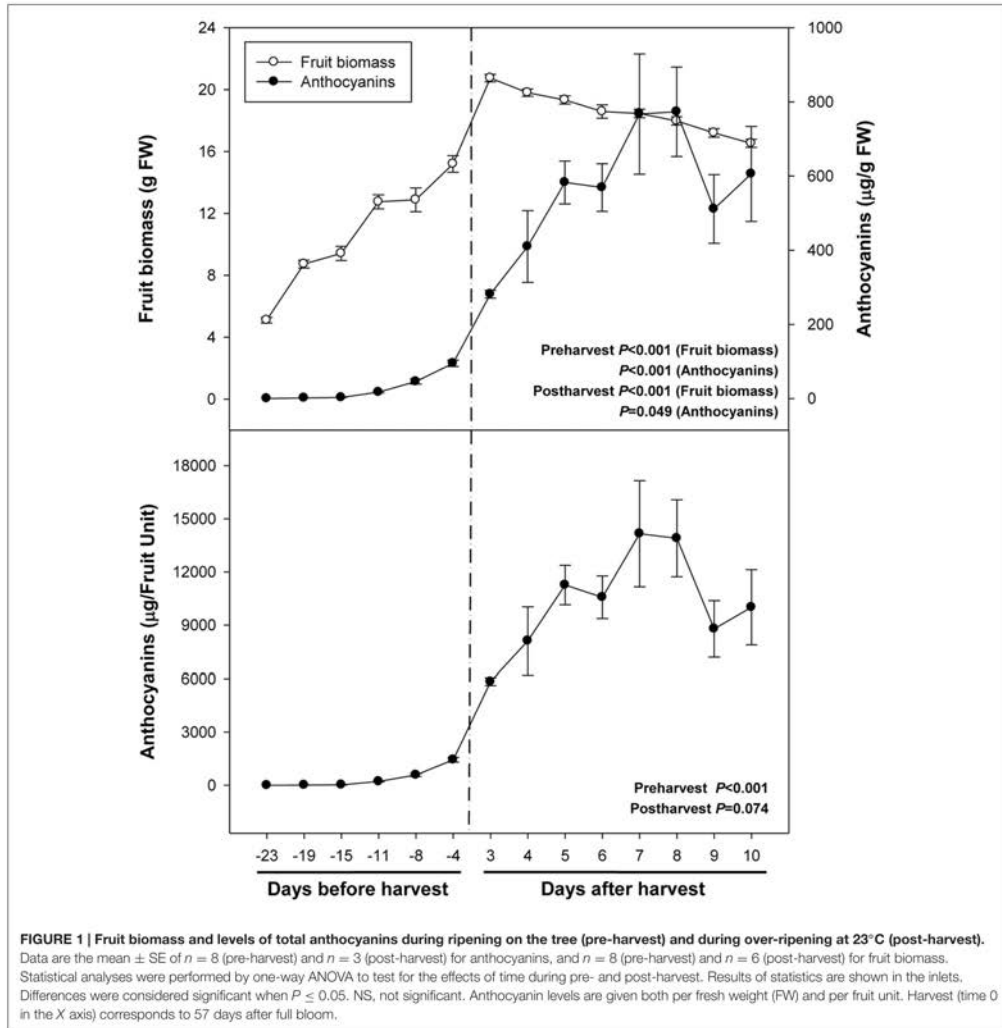
Fruit biomass increased fivefold during ripening on the tree (from 23 days pre-harvest to 3 days post-harvest), to decrease later by 20% due to over-ripening for 1 week (from day 3 to day 10 of post-harvest at 23°C, **Figure 1**). Anthocyanin levels increased from non-detectable values to 95 $\mu\text{g/g}$ fruit during pre-harvest (between 23 and 4 days preharvest), to increase even further up to 582 $\mu\text{g/g}$ fruit at 5 days post-harvest. Then, anthocyanin levels remained relatively constant at high levels during over-ripening until the end of the experiment (10 days post-harvest, **Figure 1**).

Abscisic acid levels increased sharply from 26 ng/g fruit at 23 days pre-harvest to 540 ng/g fruit at 11 days pre-harvest, to keep later constant until 4 days pre-harvest (**Figure 2**). Over-ripening at 23°C led to a depletion of endogenous ABA concentrations in the fruit to attain minimum values of 142 ng/g fruit at 10 days post-harvest. It is noteworthy that ABA increases preceded anthocyanin accumulation during pre-harvest. In contrast, ABA did not change in parallel with anthocyanin accumulation during post-harvest (**Figures 1 and 2**).

Levels of carotenoids decreased sharply during fruit ripening on the tree (**Table 1**). Violaxanthin, an ABA precursor, decreased from 0.58 mg/g FW at 23 days to non-detectable values at 4 days pre-harvest (**Table 1**), which occurred in parallel with increases of ABA levels during fruit ripening on the trees (**Figure 2**). Lutein and zeaxanthin levels also decreased progressively down to non-detectable values during fruit ripening on the tree, while fruits at 4 days pre-harvest still kept 0.17 mg/g FW of β -carotene. The amounts of this antioxidant expressed per fruit unit increased during ripening, attaining maximum levels of 3 mg per fruit unit at 4 days pre-harvest (**Table 1**). Carotenoids were not detected during post-harvest (data not shown).

Total ascorbate levels increased during pre-harvest to decrease later during post-harvest, both when expressed on a fresh weight and a fruit unit basis (**Figure 3**). Interestingly, ascorbate levels showed a biphasic response during post-harvest, with minimum ascorbate levels at 5 and 10 days post-harvest. It is noteworthy that the oxidation state of ascorbate kept constant, both, during pre- and post-harvest, but decreased sharply from around 40% to levels below 20% just after harvest (**Figure 3**).

Vitamin E levels were much lower than those of ascorbate, with maximum levels of 3.5 $\mu\text{g/g}$ fruit being attained at 15 and

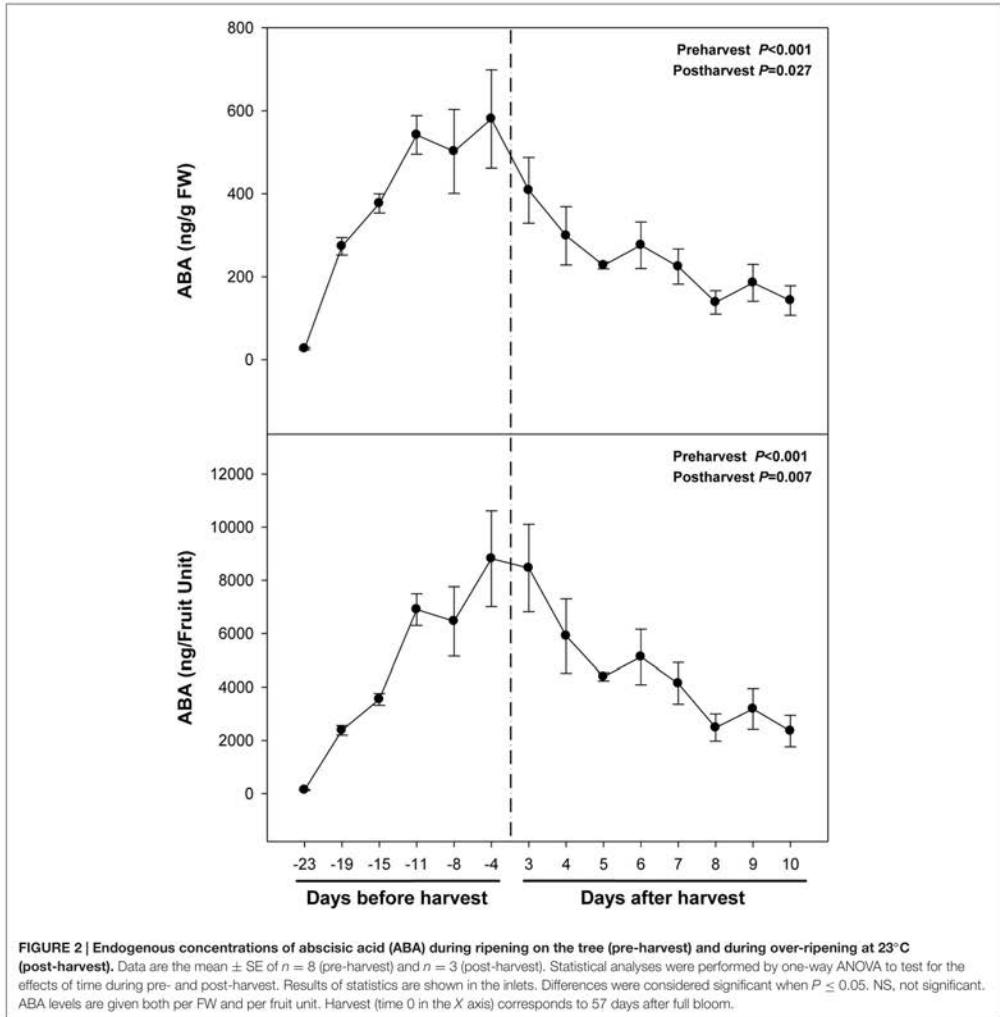


11 days pre-harvest and at the end of the experiment (Figure 4). Sharp fluctuations in total vitamin E levels were mainly due to those of α -tocopherol, the major vitamin E form present in fruits (Supplementary Figure S1). γ -Tocopherol levels were lower but also more stable than those of α -tocopherol. Vitamin E levels tended to increase during ripening, an effect that was particularly observed for γ -tocopherol (Supplementary Figure S1) and when results were expressed on a fruit unit basis (Figure 4). Neither vitamin E levels nor those of α - and γ -tocopherol were altered during post-harvest either when expressed per g fruit or per fruit

unit (Figure 4; Supplementary Figure S2). β - and δ -tocopherols, and tocotrienols were not detected in cherry fruits.

Variations in ABA Levels during Cold Storage

Cold storage prevented over-ripening, as observed with the maintenance of visual fruit firmness (Supplementary Figure S2), biomass and anthocyanin levels (Figure 5). Cold treatment prevented anthocyanin accumulation, an effect that was already



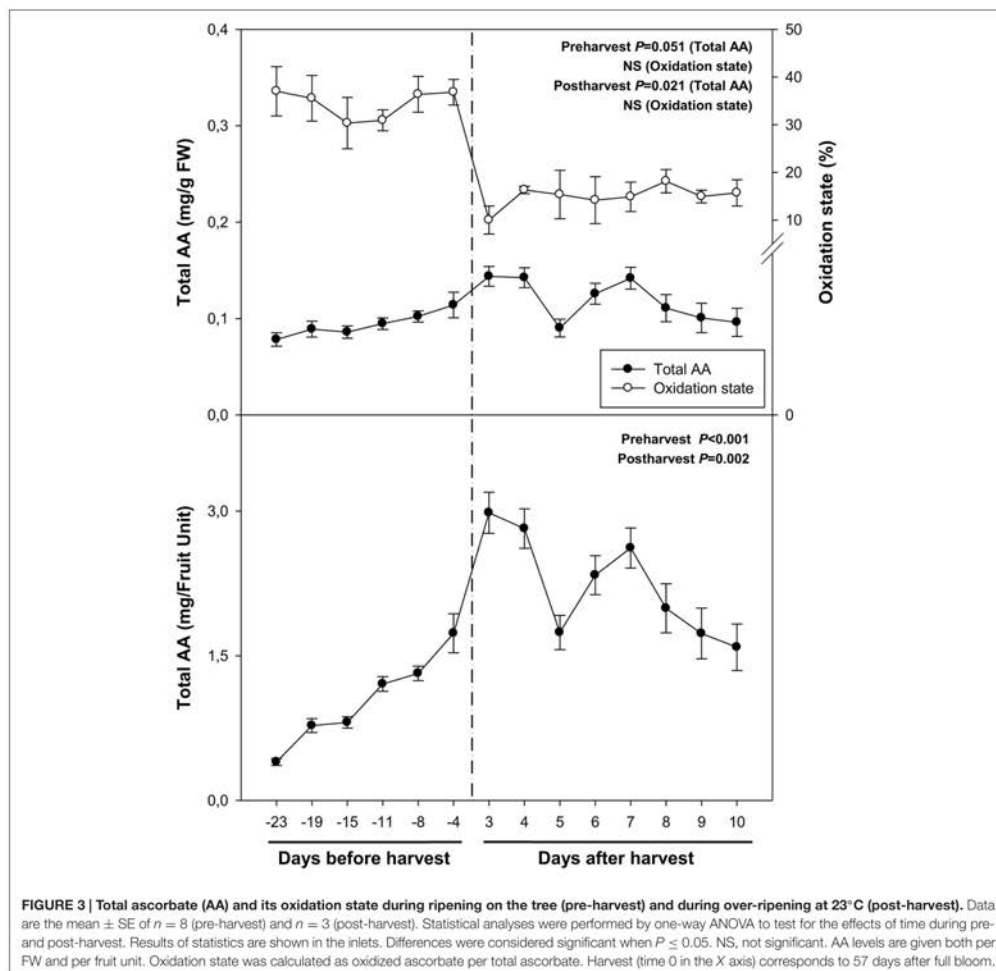
observed at 2 days of cold storage. ABA levels increased in response to cold storage, with an increment at 2 days of treatment (Figure 6). Thereafter, ABA levels in cold-stored fruits did not increase further but kept always at higher levels compared to fruits stored at 23°C. In this case, ABA levels inversely correlated, or simply did not correlate with those of anthocyanins. During over-ripening at 23°C, ABA levels decreased, while those of anthocyanins increased. When over-ripening was prevented by cold storage, enhanced ABA levels did not lead to changes in anthocyanin accumulation.

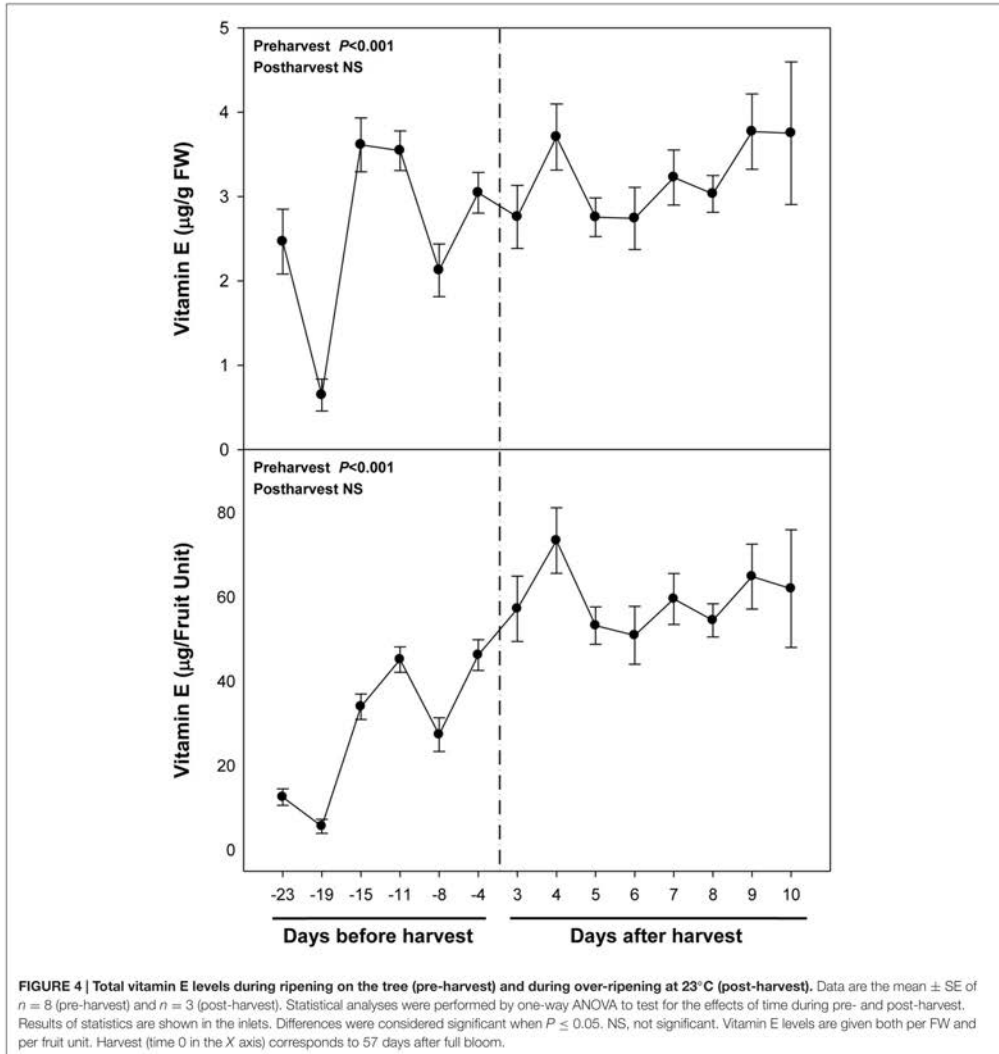
Cold storage did not alter total ascorbate levels, but affected its oxidation state. The ascorbate oxidation state increased in response to cold treatment, but differences were small and *post hoc* analyses did not reveal significant difference at any time point (Figure 7). In contrast, ABA levels correlated with vitamin E levels in cold-stored fruits, those of total vitamin E were increasing in parallel with ABA, during the first days of cold treatment (Figure 8). The levels of α - and γ -tocopherol were not significantly altered by cold treatment when analyzed separately (Supplementary Figure

TABLE 1 | Carotenoid levels during sweet cherry ripening on the tree.

Days pre-harvest	Violaxanthin	Lutein	Zeaxanthin	β -carotene
Carotenoids (mg/g FW)				
23	0.58 \pm 0.18 ^a	3.35 \pm 0.25 ^a	0.43 \pm 0.05 ^a	0.49 \pm 0.10 ^a
15	0.14 \pm 0.03 ^b	0.73 \pm 0.11 ^b	0.29 \pm 0.05 ^b	0.20 \pm 0.06 ^{ab}
4	ND ^c	ND ^c	ND ^b	0.17 \pm 0.08 ^b
Carotenoids (mg/g Fruit unit)				
23	0.47 \pm 0.15 ^a	2.74 \pm 0.20 ^a	0.35 \pm 0.04 ^a	0.40 \pm 0.08 ^a
15	1.34 \pm 0.30 ^b	6.86 \pm 1.04 ^b	2.74 \pm 0.47 ^b	1.65 \pm 0.75 ^{ab}
4	ND ^a	ND ^c	ND ^a	3.06 \pm 0.91 ^b

Levels of violaxanthin, lutein, zeaxanthin and β -carotene are given at 23, 15, and 4 days pre-harvest, both on a fresh weight (FW) and fruit unit basis. ND, not detected. Different letters indicate significant differences between time points using Bonferroni post hoc tests (ANOVA, $P < 0.05$).

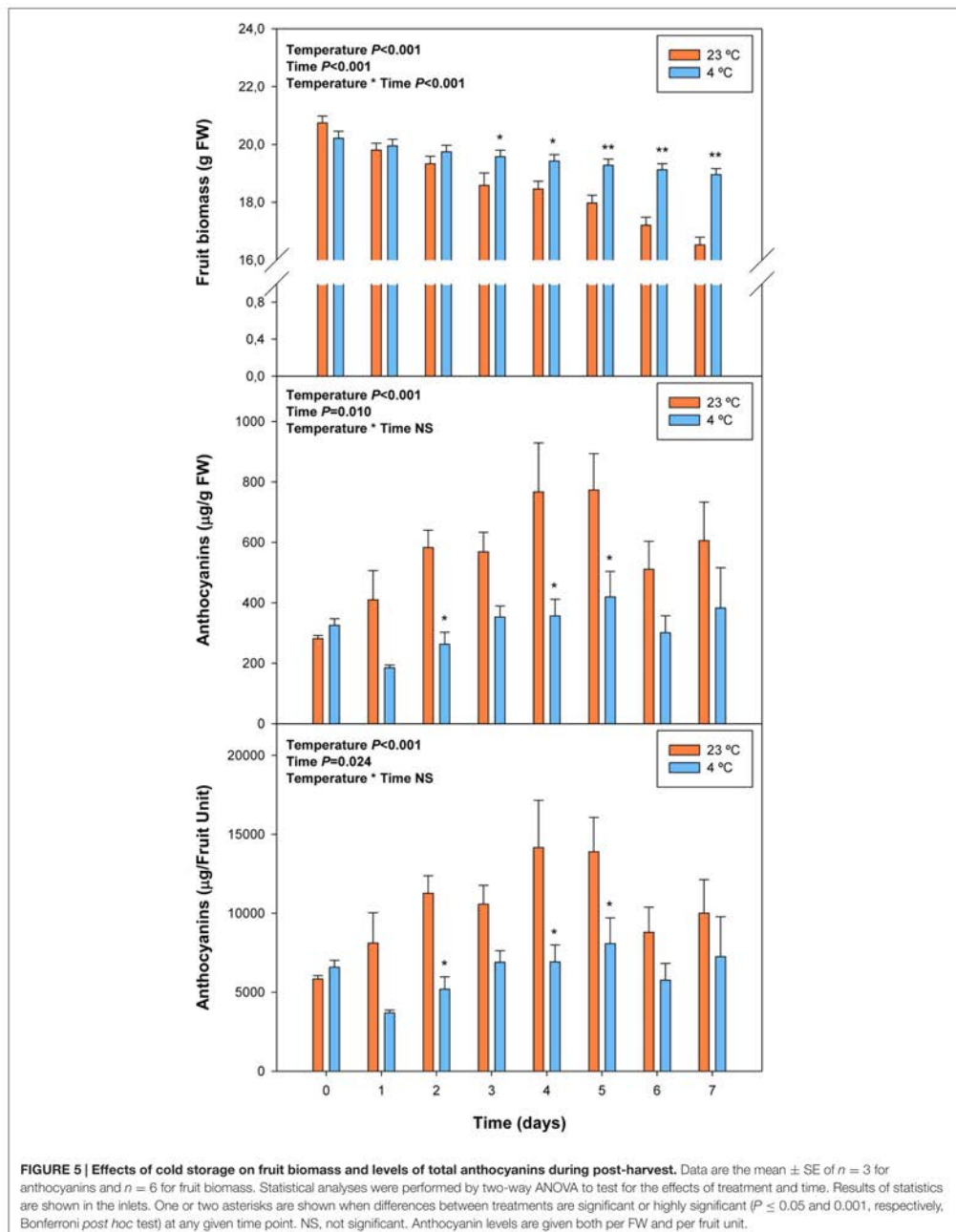


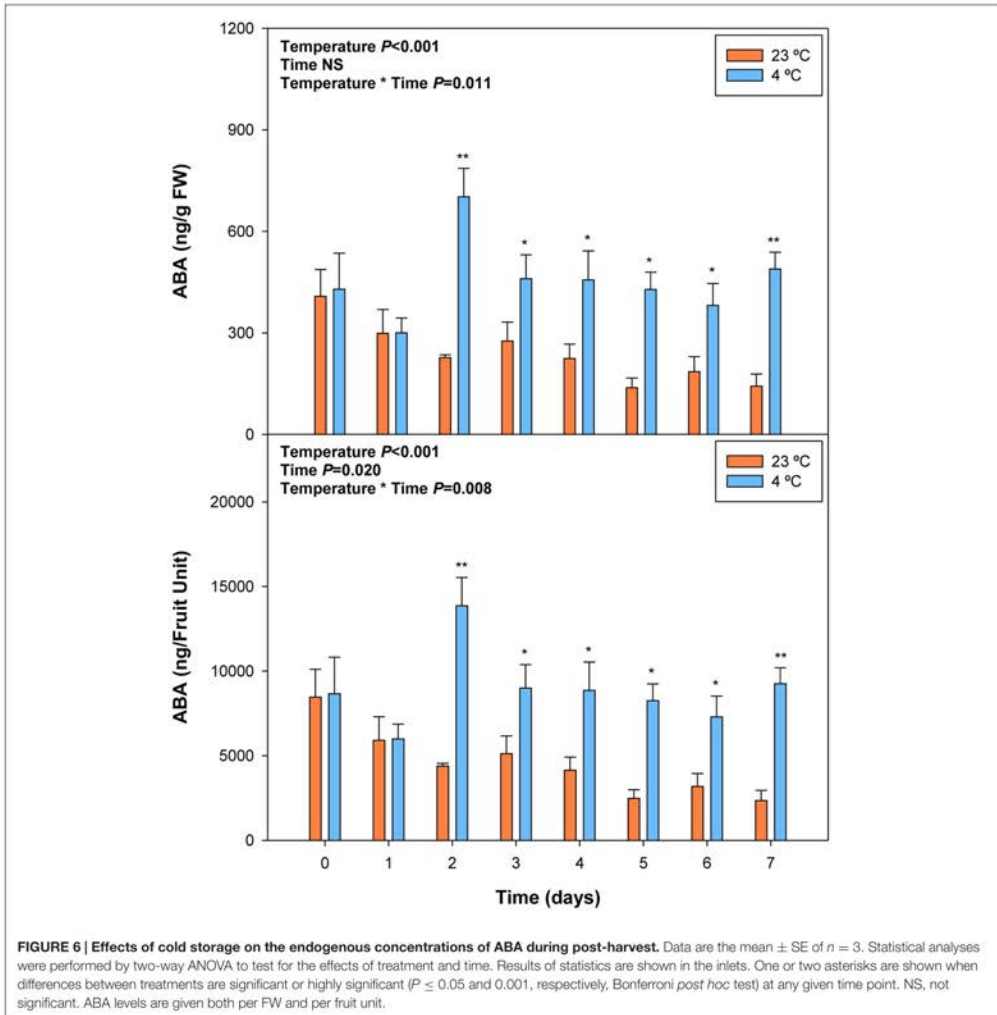


S3), thus indicating that cold effects on total vitamin E levels (Figure 8) were cumulative. It is noteworthy that α - and γ -tocopherol followed a completely different tissue-specific accumulation, with γ -tocopherol accumulating, almost exclusively (>99%), in the pit (Figure 9). In contrast, α -tocopherol, anthocyanins, ascorbate and ABA were all detected in the pit, flesh and skin during both pre- and post-harvest (Figure 9).

DISCUSSION

Sweet cherry is a non-climacteric fruit, which ripening is known to be promoted by ABA (Setha et al., 2005). Its ethylene concentration is low and has no direct effect in the ripening of sweet cherries (Hartmann, 1992; Kondo and Gemma, 1993), although it may influence anthocyanin accumulation (Kondo and Inoue, 1997). ABA is, however, the phytohormone that plays

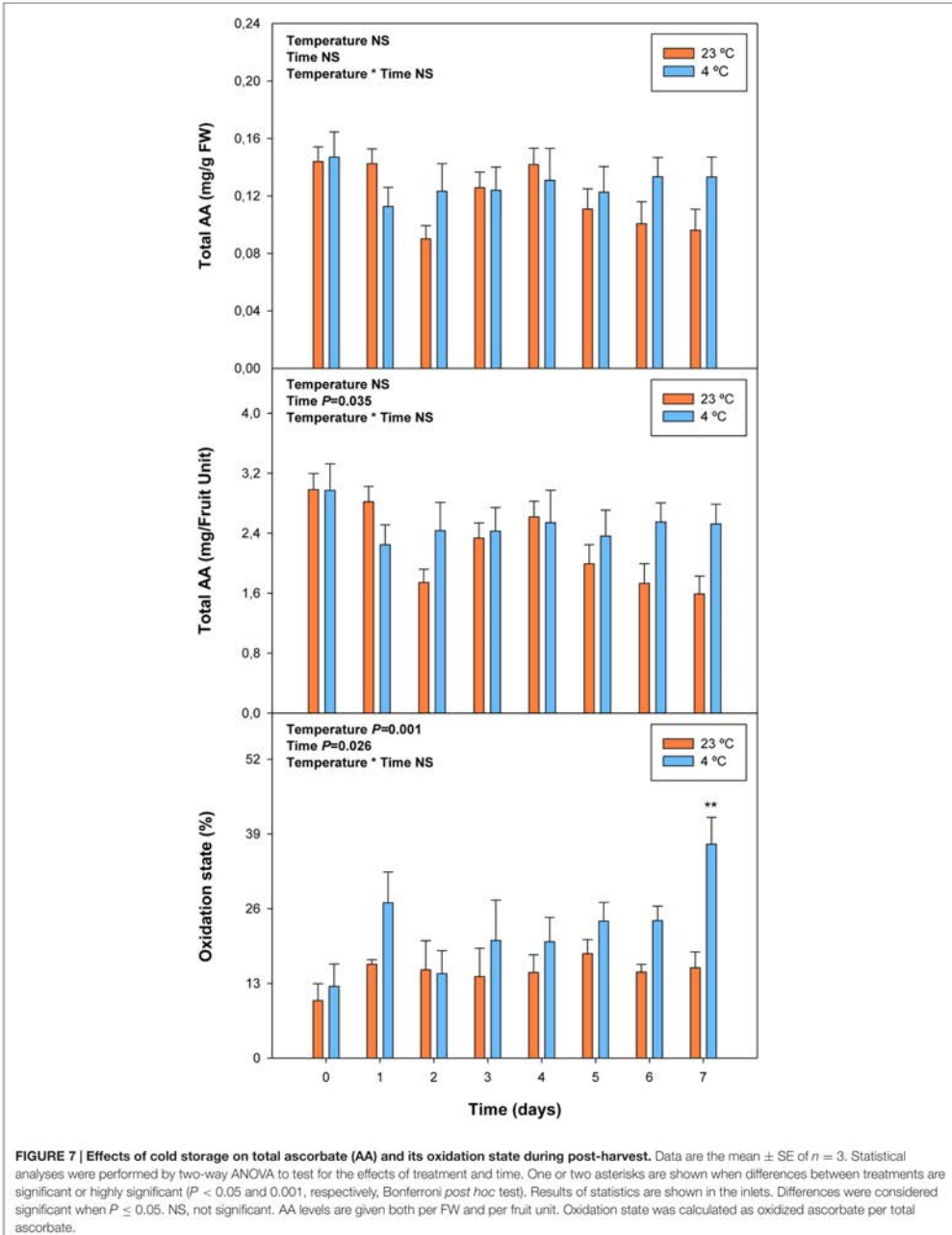


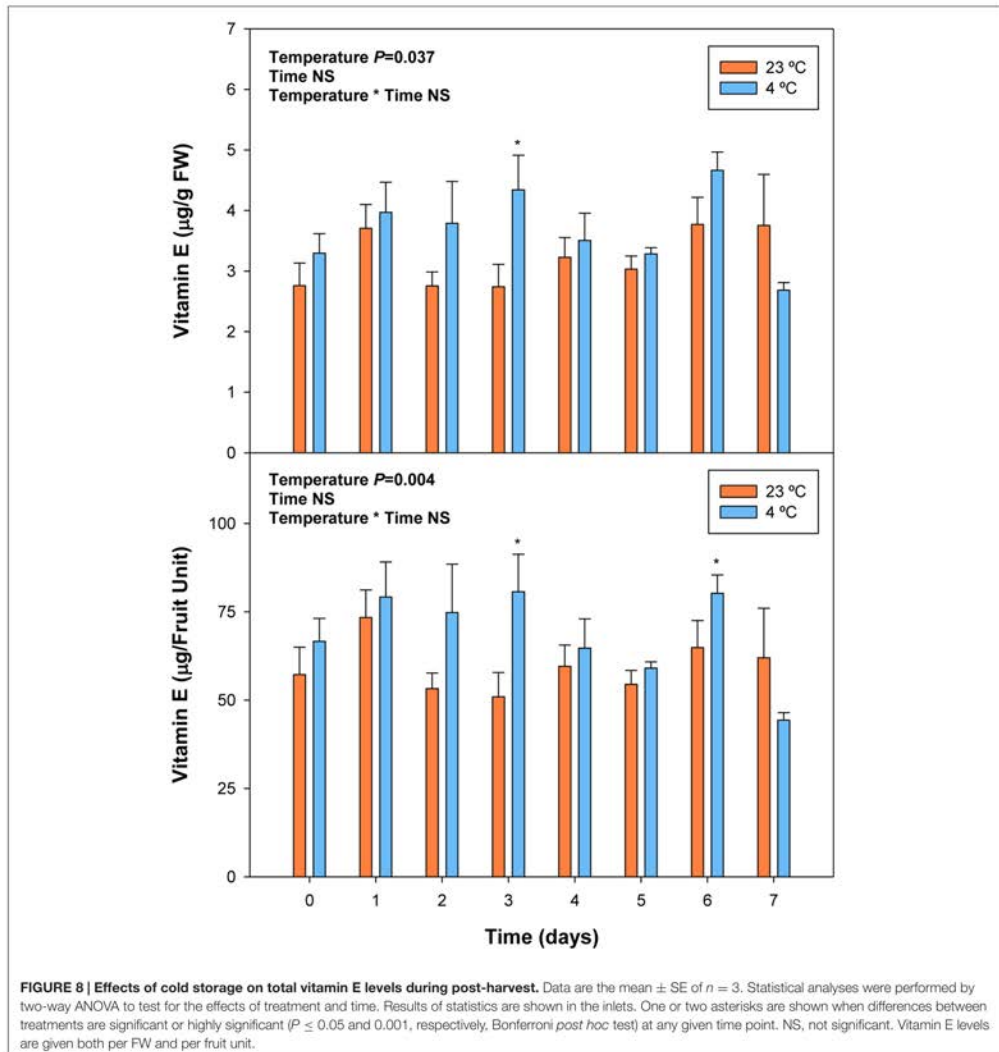


a major role in the regulation of anthocyanin accumulation and organoleptic sweet cherries properties, such as the ratio of total soluble sugars to total acidity (Kondo and Gemma, 1993; Kondo and Inoue, 1997; Luo et al., 2013). Studies in other non-climacteric fruits, such as grapes, have also shown that ABA not only modulates color development and sugar accumulation, but it may also be implicated in the control of softening during the ripening process (Castellarin et al., 2016). Here, we provide correlative evidence supporting a role for ABA in the regulation of both anthocyanin and vitamin E

accumulation during pre-harvest, but not during post-harvest, in sweet cherries "Prime Giant." Furthermore, results suggest that ABA may help prevent over-ripening during post-harvest at 4°C.

We found that ABA levels strongly and positively correlate with anthocyanin accumulation during ripening of fruits on the tree (Table 2), which is in agreement with previous studies (Luo et al., 2013). However, a strong negative correlation was observed between endogenous concentrations of ABA and anthocyanin levels during post-harvest (Table 2). Over-ripening





at 23°C led to progressive decreases in ABA concentrations, while anthocyanin accumulation kept at high levels, thus suggesting an inhibitory role for ABA in over-ripening (Figures 1 and 2). Furthermore, ABA levels increased after 2 days of cold storage, while anthocyanin levels kept at lower levels at 4°C relative to 23°C (Figures 5 and 6), thus suggesting ABA might prevent over-ripening in cold-stored fruits. The role of ABA in over-ripening has been poorly studied to date,

particularly in non-climacteric fruits. However, the application of antitranspirants, such as ABA, in rambutan, a non-climacteric fruit, has been shown to be effective in preventing over-ripening (Siriphollakul et al., 2006), thus supporting further the idea that ABA helps promote ripening in fruits on the tree, but delays over-ripening in detached fruits during post-harvest. This indicates that ABA does not act alone but together with other signaling compounds in the regulation of the ripening

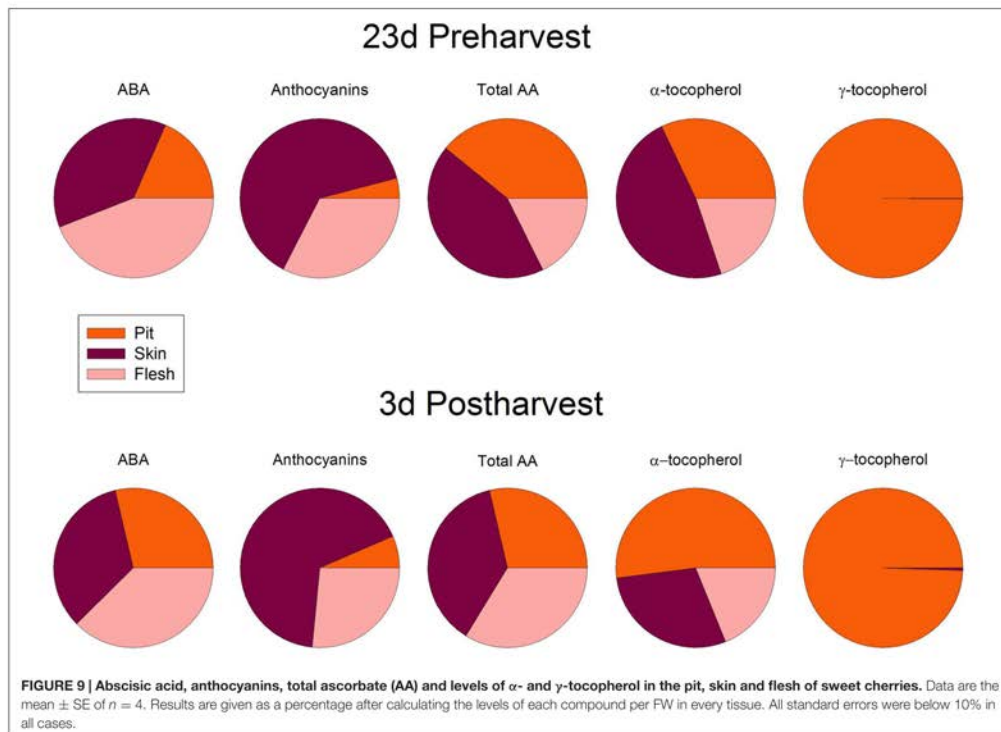


TABLE 2 | Results of Spearman's rank correlation analyses between endogenous concentrations of ABA and quality parameters during pre- and post-harvest.

Parameters	Experiments 1 and 2 (All data)	Experiment 1	Pre-harvest	Post-harvest	Experiment 2
Anthocyanins	0.009	0.033	0.703**	-0.354	-0.531**
Total AA	0.147	0.064	0.219	0.290	0.239
Oxidation state	0.132	0.169	-0.133	-0.287	0.251
Vitamin E	0.196*	0.124	0.282*	-0.137	0.130
α -tocopherol	0.155	0.041	0.176	-0.046	0.147
γ -tocopherol	0.186	0.180	0.367*	-0.179	-0.001

Correlation coefficients values are given followed by one or two asterisks when the correlation is significant or highly significant ($P \leq 0.05$ and 0.001 , respectively). Significant correlations with coefficients above 0.35 are shown in bold. Absence of an asterisk indicates the correlation was not significant. Data was analyzed altogether, and also separately (for each experiment, differentiating also pre- and post-harvest data for Experiment 1).

process in fruits on the tree, an aspect that warrants further investigations.

Aside from its role in the regulation of the ripening process of fruits on the tree, by modulating softening, sugar accumulation and color development (though the modulation of anthocyanin accumulation, Luo et al., 2013; Wang et al., 2015; Castellarin et al., 2016), nothing is known about the possible effects of ABA on vitamin accumulation in sweet cherries or other non-climacteric fruits. Vitamin C is a water-soluble compound that

acts as a cofactor for many iron and copper hydroxylases and dioxygenases involved in key physiological processes in humans, such as in the production of collagen and the synthesis of carnitine (Bender, 2003; Johnston et al., 2007). That is the reason why the frequent intake of foods rich in bioactive compounds, such as vitamin C, is associated with a healthy diet (Arrigoni and De Tullio, 2002). In addition, this compound is considered as one of the most important antioxidants for plant growth and defense (Foyer and Noctor, 2011), which is present in

many plant cell compartments, such as mitochondria, plastids, peroxisomes and the apoplast (Smirnov, 2000; Foyer, 2001). Moreover, ascorbate is the principal non-enzymatic water-soluble antioxidant that is able to eliminate reactive oxygen species (Cadenas and Packer, 2002). Vitamin C is especially vulnerable to oxidative and enzymatic degradation in raw fruits and vegetables (Redmond et al., 2003). Some studies have reported a loss of vitamin C in many fruits stored under non-optimal conditions after harvest (Munyaka et al., 2010; Neves et al., 2015). Although correlation analyses did not reveal any significant relationship between endogenous concentrations of ABA and vitamin C levels during ripening, over-ripening or cold treatment (Table 2), the present study confirmed that this vitamin is present at high amounts in sweet cherries, attaining maximum levels of 3 mg per fruit unit just after harvest, and it was found that its oxidation increases after 7 days of cold storage. Furthermore, ascorbate is known to act as a cofactor of 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED), the key limiting step in the biosynthesis of ABA from carotenoids, particularly neoxanthin and/or violaxanthin (Conklin and Barth, 2004). In the present study, violaxanthin levels decreased concomitantly with increases of ABA levels during ripening of fruits on the trees, which is consistent with a role for violaxanthin as a precursor of ABA in sweet cherries (Luo et al., 2013).

On the other hand, vitamin E, a lipid-soluble antioxidant in cell membranes, also with health-promoting effects (Booth et al., 2004), is found at high concentrations in some fruits, such as kiwis or avocados (Chun et al., 2006), but it has received little consideration in sweet cherries, mainly due to their low levels in the fruit, at least, compared to other antioxidants, such as anthocyanins or vitamin C. Among vitamin E compounds, both α - and β -tocopherol were previously shown to be present in sweet cherries, being α -tocopherol the most abundant with amounts around 1 $\mu\text{g/g}$ fruit (Bastos et al., 2015), which is similar to the amounts obtained in the present study (Supplementary Figure S3). However, we did not detect β - but, instead, γ -tocopherol in sweet cherries, which accumulated particularly in the pit (Figure 9). Most importantly, we found a positive correlation between endogenous concentrations of ABA and vitamin E accumulation in sweet cherries, particularly at pre-harvest (Table 2). Interestingly, endogenous concentrations of ABA correlated more strongly with γ - than with α -tocopherol levels. Previous studies have shown the presence of an ABA-responsive element (ABRE) in the promoter region of *HYDROXYPHENYLPYRUVATE DIOXYGENASE (HPPD)*, which encodes for the enzyme responsible of the formation of homogentisate, needed for the biosynthesis of all vitamin E compounds (Chaudhary and Khurana, 2009; Falk and Munné-Bosch, 2010). Therefore, our data supports the contention that ABA is implicated in the biosynthesis of

vitamin E compounds in sweet cherries, as it has been shown in leaves of plants exposed to various abiotic stresses (Chaudhary and Khurana, 2009; Munné-Bosch et al., 2009). It is noteworthy that the correlative evidence obtained in the present study supporting a link between ABA and vitamin E biosynthesis was observed in fruits that were ripening on the tree during pre-harvest, but not during post-harvest at 23°C. Furthermore, enhanced vitamin E levels were preceded by ABA increases during cold storage, thus suggesting ABA may also regulate tocopherol accumulation in response to cold stress in sweet cherries. This may indeed be a defensive response, since both ABA and tocopherols are known to be needed to combat cold-induced reactive oxygen production in plants (El Kayal et al., 2006).

CONCLUSION

The ABA plays a major role in the control of the ripening process in sweet cherries, particularly stimulating this process during pre-harvest and positively influencing quality parameters, such as the accumulation of anthocyanins and vitamin E. Further research is, however, needed to better understand the mechanisms underlying the regulation of vitamin E biosynthesis by ABA during pre-harvest and cold storage, as well as the inhibitory role of ABA in the over-ripening of sweet cherries, beyond its possible function as an antitranspirant.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

VT and SM-B conceived and designed the experiments with the help of NT. VT, NT, and PM performed the experiments. SM-B wrote the manuscript with the help of VT; all authors contributed to the discussion, revised and approved the final manuscript.

FUNDING

Research was supported by the Generalitat de Catalunya through the ICREA Academia prize given to SM-B.

ACKNOWLEDGMENTS

We are very grateful to Maren Müller and Serveis Científicotècnics (University of Barcelona) for their help with ABA analyses. We also thank Josep Maria Gilart for giving us the opportunity to sample the fruits in his orchard.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

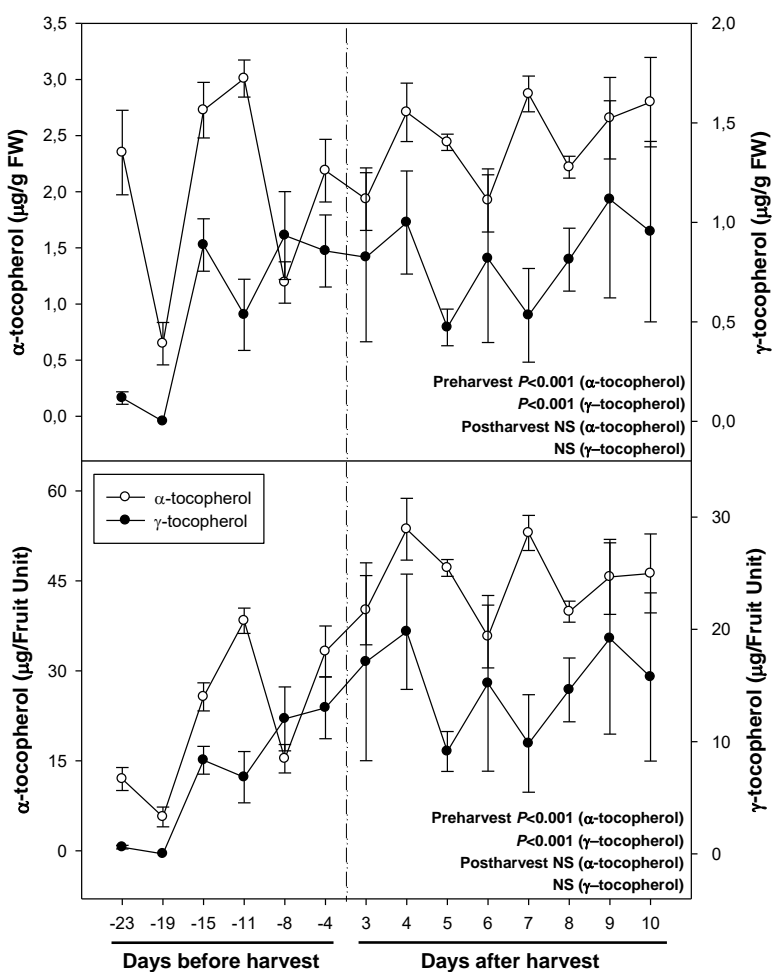
The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2016.00602>

REFERENCES

- Amaral, J. S., Casal, S., Torres, D., Seabra, R. M., and Oliveira, B. P. P. (2005). Simultaneous determination of tocopherols and tocotrienols in hazelnuts by a normal phase liquid chromatographic method. *Anal. Sci.* 21, 1545–1548. doi: 10.2116/analsci.21.1545
- Arrigoni, O., and De Tullio, M. C. (2002). Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochim. Biophys. Acta* 1569, 1–9. doi: 10.1016/S0304-4165(01)00235-5
- Ashton, R. W. (2007). *Sweet Cherries for Southern Orchards*. London: Third Millennium Publishing.
- Bastos, C., Barros, L., Duenas, M., Calheta, R. C., Queiroz, M. J. R. P., Santos-Buelga, C., et al. (2015). Chemical characterization and bioactive properties of *Prunus avium* L.: the widely studied fruits and the unexplored stems. *Food Chem.* 173, 1045–1053. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.10.145
- Bender, D. A. (2003). "Vitamin C (ascorbic acid)," in *Nutritional Biochemistry of the Vitamins*, 2nd Edn, ed. D. A. Bender (Cambridge: Cambridge University Press), 357–384.
- Booth, S. L., Golly, I., Sacheck, J. M., Roubenoff, R., Dallal, G. E., Hamada, K., et al. (2004). Effect of vitamin E supplementation on vitamin K status in adults with normal coagulation status. *Am. J. Clin. Nutr.* 80, 143–148.
- Cadenas, E., and Packer, L. (2002). *Handbook of Antioxidants*, 2nd Edn. New York, NY: Marcel Dekker.
- Castellarin, S. D., Gambetta, G. A., Wada, H., Krasnow, M. N., Cramer, G. R., Peterlunger, E., et al. (2016). Characterization of major ripening events during softening in grape: turgor, sugar accumulation, abscisic acid metabolism, colour development, and their relationship with growth. *J. Exp. Bot.* 67, 709–722. doi: 10.1093/jxb/erv483
- Chaudhary, N., and Khurana, P. (2009). Vitamin E biosynthesis genes in rice: molecular characterization, expression profiling and comparative phylogenetic analysis. *Plant Sci.* 177, 479–491. doi: 10.1016/j.plantsci.2009.07.014
- Chun, J., Lee, J., Yea, L., Exler, J., Ronald, R., and Eitenmiller, R. R. (2006). Tocopherol and tocotrienol contents of raw and processed fruits and vegetables in the United States diet. *J. Food Comp. Anal.* 19, 196–204. doi: 10.1016/j.jfca.2005.08.001
- Conklin, P. L., and Barth, C. (2004). Ascorbic acid, a familiar small molecule intertwined in the response of plants to ozone, pathogens, and the onset of senescence. *Plant Cell Environ.* 17, 959–970. doi: 10.1111/j.1365-3040.2004.01203.x
- El Kayal, W., Keller, G., Debayles, C., Kumar, R., Weier, D., Teulieres, C., et al. (2006). Regulation of tocopherol biosynthesis through transcriptional control of tocopherol cyclase during cold hardening in *Eucalyptus gunnii*. *Physiol. Plant.* 126, 212–223. doi: 10.1111/j.1399-3054.2006.00614.x
- Falk, J., and Munné-Bosch, S. (2010). Tocochromanol functions in plants: antioxidation and beyond. *J. Exp. Bot.* 61, 1549–1566. doi: 10.1093/jxb/erq030
- FAO (2004). *Vitamin and Mineral Requirements in Human Nutrition*. World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations. Available at: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/42716/1/9241546123.pdf> [accessed on 2 February, 2016].
- FAO (2015). *The Statistical Division (FAOSTAT) of the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)*. Available at: http://www.novagrim.com/Pages/2000_2011_cherry_statistics_EN.aspx [accessed on 2 February, 2016].
- Finkelstein, R. (2013). *Abscisic Acid Synthesis and Response. The Arabidopsis Book*. Rockville, MD: American Society of Plant Biologists.
- Foyer, C. H. (2001). Prospects of enhancement of the soluble antioxidants, ascorbate and glutathione. *BioFactors* 15, 75–78. doi: 10.1002/biof.5520150204
- Foyer, C. H., and Noctor, G. (2011). Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiol.* 155, 2–18. doi: 10.1104/pp.110.167569
- Gitelson, A. A., Merzlyak, M. N., and Chivkunova, O. B. (2001). Optical properties and non-destructive estimation of anthocyanin content in plant leaves. *Photochem. Photobiol.* 74, 38–45. doi: 10.1562/0031-8655(2001)074
- Hartmann, C. (1992). Biochemical changes in harvested cherries. *Post-Harvest Biol. Technol.* 258, 89–96.
- Johnston, C. S., Steinberg, F. M., and Rucker, R. B. (2007). *Ascorbic Acid. Handbook of Vitamins*, 4th Edn. (Boca Raton, FL: CRC Press), 489–520.
- Kondo, S., and Gemma, H. (1993). Relationship between abscisic acid (ABA) content and maturation of the sweet cherry. *J. Japan Soc. Hort. Sci.* 62, 63–68. doi: 10.2503/jjshs.62.63
- Kondo, S., and Inoue, K. (1997). Abscisic acid (ABA) and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) content during growth of 'Satohishiki' cherry fruit, and the effect of ABA and ethephon application on fruit quality. *J. Hort. Sci.* 72, 221–227.
- Kumar, R., Khurana, A., and Sharma, A. K. (2014). Role of plant hormones and their interplay in development and the ripening of fleshy fruits. *J. Exp. Bot.* 16, 4561–4575. doi: 10.1093/jxb/eru277
- Leng, P., Yuan, B., and Guo, Y. (2014). The role of abscisic acid in fruit ripening and responses to abiotic stress. *J. Exp. Bot.* 65, 4577–4588. doi: 10.1093/jxb/eru204
- Luo, H., Dai, S. J., Ren, J., Zhang, C. X., Ding, Y., Li, Z., et al. (2013). The role of ABA in the maturation and post-harvest life of a non-climacteric sweet cherry fruit. *J. Plant Growth Regul.* 33, 373–383. doi: 10.1007/s00344-013-9388-7
- Meheriuk, M., Girard, B., Moys, L., Beveridge, H. J. T., McKenzie, D.-L., Harrison, J., et al. (1995). Modified atmosphere packaging of 'Lapins' sweet cherry. *Food Res. Int.* 28, 239–244. doi: 10.1016/0963-9969(95)00003-5
- Müller, M., and Munné-Bosch, S. (2011). Rapid and sensitive hormonal profiling of complex plant samples by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Plant Method* 7:37. doi: 10.1186/1746-4811-7-37
- Munné-Bosch, S., and Alegre, L. (2000). Changes in carotenoids, tocopherols and diterpenes during drought and recovery, and the biological significance of chlorophyll loss in *Rosmarinus officinalis* plants. *Planta* 210, 925–931. doi: 10.1007/s004250050699
- Munné-Bosch, S., and Alegre, L. (2002). The function of tocopherols and tocotrienols in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 21, 31–57. doi: 10.1080/0735-260291044179
- Munné-Bosch, S., Falara, V., Pateraki, I., López-Carbonell, M., Cela, J., and Kanellis, A. K. (2009). Physiological and molecular responses of the isoprenoid biosynthetic pathway in a drought-resistant *Mediterranean shrub*, *Cistus creticus* exposed to water deficit. *J. Plant Physiol.* 166, 136–145. doi: 10.1016/j.jplph.2008.02.011
- Munyaka, A. W., Makule, E. E., Oey, I., Loey, A. V., and Hendrickx, M. (2010). Thermal stability of L-ascorbic and ascorbic acid oxidase in broccoli (*Brassica oleracea* var. italica). *J. Food Sci.* 75, 336–340. doi: 10.1111/j.1750-3841.2010.01573.x
- Nambara, E., and Marion-Poll, A. (2005). Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56, 165–185. doi: 10.1146/annurev-arplant.56.032604.144046
- Neves, L. C., Tosin, J. M., Benedette, R. M., and Cisneros-Zevallos, L. (2015). Post-harvest nutraceutical behaviour during ripening and senescence of 8 highly perishable fruit species from the Northern Brazilian Amazon region. *Food Chem.* 174, 188–196. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.10.111
- Queval, G., and Noctor, G. (2007). A plate reader method for measurement of NAD, NADP, glutathione, and ascorbate in tissue extracts: application to redox profiling during *Arabidopsis* rosette development. *Anal. Biochem.* 363, 58–69. doi: 10.1016/j.ab.2007.01.005
- Redmond, G. A., Decaze, A. M., Gormley, T. R., and Butler, F. (2003). The vitamin C status of freeze-chilled mashed potato. *J. Food Eng.* 56, 219–221. doi: 10.1016/S0260-8774(02)00255-8
- Serrano, M., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Castillo, S., and Valero, D. (2005). Chemical constituents and antioxidant activity of sweet cherry at different ripening stages. *J. Agric. Food Chem.* 53, 2741–2745. doi: 10.1021/jf0479160
- Setha, S., Kondo, S., Hirai, N., and Ohigashi, H. (2005). Quantification of ABA and its metabolites in sweet cherries using deuterium-labeled internal standards. *Plant Growth Regul.* 45, 183–188. doi: 10.1007/s10725-005-3088-7
- Siegelman, H. W., and Hendricks, S. B. (1958). Photocatalysis of anthocyanin synthesis in apple skin. *Plant Physiol.* 33, 185–190. doi: 10.1104/pp.33.6.409
- Singh, R. K., Ali, S. A., Nath, P., and Sane, V. A. (2011). Activation of ethylene-responsive p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase leads to increased tocopherol levels during ripening in mango. *J. Exp. Bot.* 62, 3375–3385. doi: 10.1093/jxb/err006
- Siriphollakul, P., Niyomlao, W., and Kanlayanarat, S. (2006). Antitranspirants maintain freshness and improve storage life of rambutan

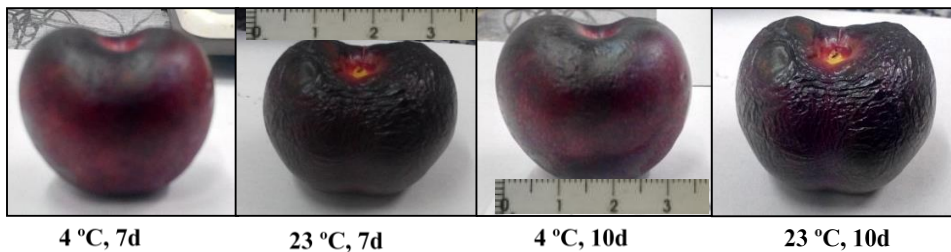
- (*Nephellium lappaceum* L.) fruit. *Acta Hort.* 712, 611–616. doi: 10.17660/ActaHortic.2006.712.74
- Smirnoff, N. (2000). Ascorbic acid: metabolism and functions of a multifaceted molecule. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3, 229–235. doi: 10.1016/S1369-5266(00)00069-8
- Takahama, U., and Oniki, T. (1992). Regulation of peroxidase-dependent oxidation of phenolics in the apoplast of spinach leaves by ascorbate. *Plant Cell Physiol.* 33, 379–387.
- Veljovic-Jovanovic, S. D., Pignocchi, C., Noctor, G., and Foyer, C. H. (2001). Low ascorbic acid in the vtc-1 mutant of *Arabidopsis* is associated with decreased growth and intracellular redistribution of the antioxidant system. *Plant Physiol.* 127, 426–435. doi: 10.1104/pp.010141
- Wang, Y., Chen, P., Sun, L., Li, Q., Dai, S., Sun, Y., et al. (2015). Transcriptional regulation of PaPYLs, PaPP2Cs and PaSnRK2s during sweet cherry fruit development and in response to abscisic acid and auxin at onset of fruit ripening. *Plant Growth Regul.* 75, 455–464. doi: 10.1007/s10725-014-0006-x
- Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.
- Copyright © 2016 Tijero, Teribia, Muñoz and Munne-Bosch. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Suppl. Figure 1. Levels of α - and γ -tocopherols during ripening on the tree (preharvest) and during over-ripening at 23°C (postharvest). Data are the mean \pm SE of n=8 (preharvest) and n=3 (postharvest). Statistical analyses were performed by one-way ANOVA to test for the effects of time during pre- and postharvest. Results of statistics are shown in the inlets. Differences were considered significant when $P \leq 0.05$. NS, not significant. Vitamin E levels are given both per fresh weight (FW) and per fruit unit.

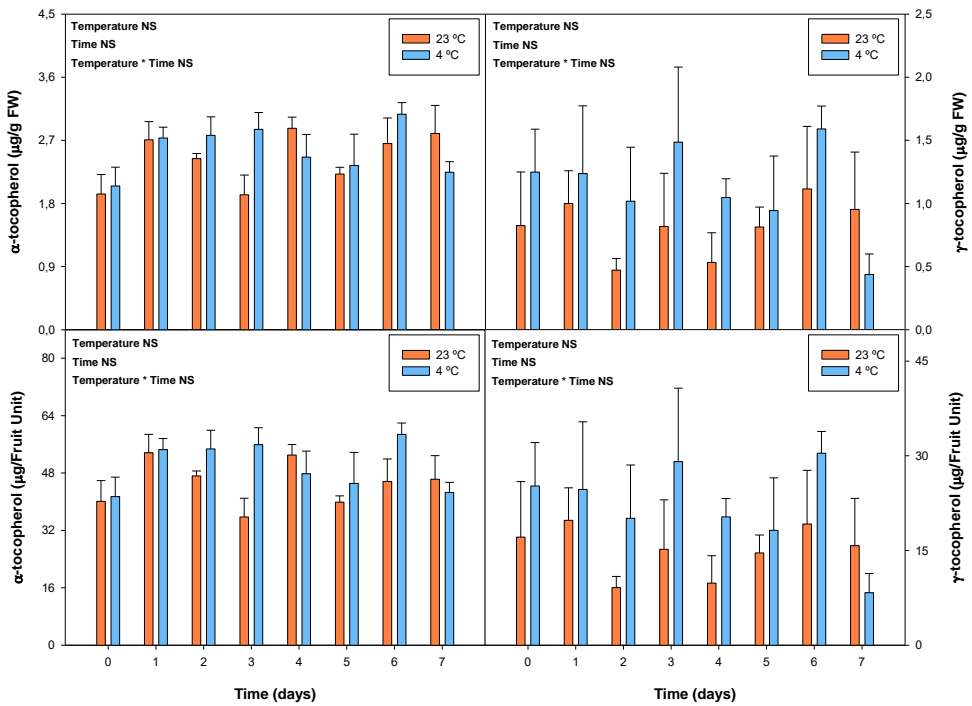


Suppl. Figure 2. Cold storage improves firmness in sweet cherries.

Photographs of fruits stored at 23 °C and 4 °C were taken after 7d and 10d postharvest.



Suppl. Figure 3. Cold treatment effects on the levels of α - and γ -tocopherols during postharvest storage of sweet cherries. Data are the mean \pm SE of n=3. Statistical comparisons were performed by two-way ANOVA. NS, not significant.



Capítulo 2: Relación del perfil hormonal con las variaciones en el contenido de azúcares y antocianinas durante el desarrollo y maduración de cerezas dulces.

Chapter 2: Linking hormonal profiles with variations in sugar and anthocyanin contents during the natural development and ripening of sweet cherries.

Natalia Teribia, Verónica Tijero, Sergi Munné-Bosch

Departamento de Biología Evolutiva, Ecología y Ciencias Ambientales,
Sección de Fisiología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de
Barcelona, Av. Diagonal 643, 08028, Barcelona, España.

Publicado en **New Biotechnology** (2016) 33, 824-833

RESUMEN DEL CAPÍTULO 2

Las cerezas son muy apreciadas por los consumidores de todo el mundo y, generalmente, se almacenan en frío durante la poscosecha para evitar la sobremaduración antes de su distribución al mercado. La cereza es un fruto no climatérico de la que se sabe que la maduración está regulada por el ácido abscísico. En este estudio se examina el perfil hormonal, incluyendo medidas de ácido abscísico, auxinas, citoquininas y giberelinas mediante cromatografía líquida de ultra alta eficacia acoplada a espectrometría de masas en tándem (UHPLC-MS/MS), en relación con las variaciones del contenido en azúcares y antocianinas durante el crecimiento y maduración de esta fruta. El perfil hormonal reveló que los niveles de ácido indol-3-acético, GA₁ y *trans*-zeatina disminuyeron en las primeras etapas del desarrollo del fruto. De la misma forma, los niveles de GA₃ disminuyeron en etapas tempranas, y también después que se inicia la acumulación de antocianinas. Los niveles de ácido abscísico aumentaron con la síntesis de antocianinas, así como los niveles de isopentenil adenosina, que también aumentaron durante la maduración de las cerezas. Además, se observó una fuerte correlación negativa entre la GA₄ y la biomasa y antocianinas del fruto, y entre la *trans*-zeatina y la biomasa y los azúcares totales. Por el contrario, los niveles de ácido abscísico e isopentenil adenosina se correlacionaron positivamente con la biomasa, antocianinas y azúcares totales del fruto. Los resultados sugieren que las auxinas, citoquininas y giberelinas podrían actuar coordinadamente con el ácido abscísico en la regulación del desarrollo y maduración de la cereza. También se muestra que las medidas del perfil hormonal por UHPLC-MS/MS pueden ser una herramienta útil para dilucidar el momento de acción de cada compuesto hormonal específico durante la maduración, lo cual tiene aplicaciones importantes en el sector biotecnológico agroalimentario.



Linking hormonal profiles with variations in sugar and anthocyanin contents during the natural development and ripening of sweet cherries

Natalia Teribia¹, Verónica Tijero¹, Sergi Munné-Bosch^{*}

Department of Plant Biology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 March 2016

Received in revised form 20 July 2016

Accepted 24 July 2016

Available online 27 July 2016

Keywords:

Sweet cherry

Ripening

Auxins

Gibberellins

Cytokinins

Fruit quality

ABSTRACT

Sweet cherries are highly appreciated by consumers worldwide and are usually cold-stored during postharvest to prevent over-ripening before distribution to the market. Sweet cherry is a non-climacteric fruit, for which ripening is known to be regulated by abscisic acid. Here we aimed to examine the hormone profiles, including measurements of abscisic acid, auxins, cytokinins and gibberellins by ultrahigh performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UHPLC–MS/MS), in relation to variations in sugar and anthocyanin contents, during growth and ripening of this fruit. Hormonal profiling revealed that indole-3-acetic acid, GA₁ and *trans*-zeatin levels decreased at early stages of fruit development, while GA₃ levels decreased at early stages but also later, once anthocyanin accumulation started. Conversely, abscisic acid levels rose significantly once the fruit started to synthesize anthocyanins, and isopentenyladenosine levels also increased during the ripening of sweet cherries. A strong negative correlation was found between GA₄ levels and both fruit biomass and anthocyanin levels, and between the levels of *trans*-zeatin and both fruit biomass and total sugar contents. In contrast, abscisic acid and isopentenyladenosine levels correlated positively with fruit biomass, anthocyanin and total soluble sugar content. Results suggest that auxins, cytokinins and gibberellins may act coordinately with abscisic acid in the regulation of sweet cherry development and ripening. Furthermore, it is shown that hormonal profile measurements by UHPLC–MS/MS may be a helpful tool to elucidate the timing of action of each specific hormonal compound during ripening, which has important applications in the agri-food biotechnological sector.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

Introduction

Sweet cherry has become an important fruit worldwide due to its visual and organoleptic characteristics such as colour, sweetness and sourness. Nowadays, there is an increasing interest in improving fruit quality, mainly fruit size, and delaying maturity. Sweet cherry displays a characteristic three-stage growth pattern: (i) an initial phase of exponential growth driven by cell division and expansion, (ii) a relatively quiet second stage that correlates with endocarp hardening and embryo development, and (iii) a third, final stage of re-establishment of rapid growth, mainly characterised by cell expansion [1–3]. The ripening process starts with the accumulation of carbohydrates and anthocyanins during the second stage of growth and ends after the third growth phase has

completed [4]. In contrast with climacteric fruits, such as tomato or apple, in which ethylene production and respiratory activity increase at the onset of ripening, sweet cherry is a non-climacteric fruit whose maturation process is known to be associated with abscisic acid (ABA) [5,6]. Most of the previous research on plant growth regulators on cherry fruit quality focused mainly on preharvest application of GA₃ in the second phase of growth, to increase fruit size and delay ripening [7,8]. Nonetheless, our knowledge about the possible use of other phytohormones, such as other gibberellins, and auxins or cytokinins, for improving sweet cherry quality is still very limited, despite its potential significance in the agri-food biotechnological sector.

In some non-climacteric fruits such as strawberries and grapes [9,10] and climacteric fruits such as apples [11], the role of auxins delaying the ripening process has been reported. With regard to gibberellins, GA₁ was found to be the most abundant at early stages of development in non-climacteric fruit (grapes), while GA₄ was only detected at later developmental stages. In sweet oranges, both GA₁ and GA₄ have been reported as biologically active gibberellins [12]. However, no information is yet available on the endogenous

^{*} Corresponding author at: University of Barcelona, Faculty of Biology, Department of Plant Biology, Av. Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain.

E-mail address: smunne@ub.edu (S. Munné-Bosch).

¹ These authors contributed equally to this work.

levels and role of other gibberellins in the growth and ripening of sweet cherries. Cytokinins, and particularly, its most active form, *trans*-zeatin, are involved in the regulation of cell division and sink strength in fruits, which is why their highest concentration is related to fruit set and early growth phases in some fruits [13]. Furthermore, a decrease in cytokinin levels before ripening in non-climacteric fruits, such as oranges and grapes, has been reported, suggesting that cytokinins may play an inhibitory role in fruit maturation [14]. On the other hand, 2-isopentenyladenine levels have been shown to increase during ripening in grapes, kiwifruit, tomato and strawberry, suggesting a role for this cytokinin in the ripening process [15]. Nevertheless, there is no information on either the concentration or effects of cytokinins on development and ripening of sweet cherries.

The aim of this study was to obtain insights into the variations in the endogenous levels of growth regulators, such as auxins, gibberellins and cytokinins, aside from those of the well-known ABA, in the growth and ripening of sweet cherries, focusing on the endogenous levels of these phytohormones during fruit development in orchard trees. In addition, to better understand the relation of the hormone profiles with fruit quality during ripening, we simultaneously measured various parameters associated with the maturation process, such as fruit biomass, malic acid levels, pH, fructose and glucose contents, and anthocyanin accumulation.

Material and methods

Experimental design and samplings

For the experiments, sweet cherries (*Prunus avium* L. var. Prime Giant) were obtained from trees growing in an exploited orchard at Partida Vall del Sector III (Lleida, NE Spain). Fruits were harvested at eight developmental stages (Fig. 1), which were visually characterised as follows: stage I, fully green and small-sized; stage II, green but larger in size; stage III, increased size with maximum of 30% red; stage IV, red-pink colour, with maximum 30% green; stage V, 90% red, 10% green; stage VI, almost red; stage VII, fully red, large-sized; and stage VIII, commercial harvest. Developing cherry fruits at stages I and II were sampled during 30th April 2015, fruits at stages III and IV were sampled during 7th May, fruits at stages V and VI were sampled during 15th May, fruits at stage VII were sampled during 22nd May, and fruits at stage VIII were sampled during 29th May. All samplings were performed early in the morning (between 9 and 10 a.m. local time) to minimise diurnal climatic variability between samplings. Six fruits per tree from a total of 8 trees were sampled at each development stage. Samples were immediately dipped in liquid nitrogen and stored at -80°C until analyses.

Hormone profiling

Phytohormone levels were determined by ultrahigh-performance liquid chromatography coupled to tandem mass

spectrometry (UHPLC–MS/MS) as described previously [16] with minor modifications. In short, fruit samples (100 mg) were extracted with 200 μL methanol:isopropanol:acetic acid, 50:49:1 (v/v/v), using ultrasonication and vortexing (Branson 2510 ultrasonic cleaner, Branson, USA) for 30 min. Deuterium-labelled internal standards, including d_5 -indole-3-acetic acid, gibberellins (d_2 -GA₁, d_2 -GA₃, d_2 -GA₄, d_2 -GA₇), cytokinins (d_6 -2-isopentenyl adenine, d_6 -isopentenyl adenosine, d_5 -*trans*-zeatin and d_5 -*trans*-zeatin riboside) and abscisic acid (d_6 -ABA) were added. After centrifugation, the pellet was re-extracted using the same procedure and the collected supernatants were merged and filtered through a 0.22 μm PTFE filter (Waters, USA) before analyses. Phytohormone levels were analysed by UHPLC–ESI–MS/MS. The system consisted of an Aquity UPLC™ System (Waters) quaternary pump equipped with an autosampler. An HALO™ C18 (Advanced Materials Technology Inc., USA) column (2.1 \times 75 mm, 2.7 μm) was used. Solvent A was water with 0.05% glacial acetic acid and solvent B was acetonitrile with 0.05% glacial acetic acid. Flow rate was set at 0.6 mL/min. Quantification was made considering recovery rates for each sample by using the deuterium-labelled internal standards [16].

Fruit quality parameters

Sweet cherry quality was determined by measuring fruit biomass, levels of total anthocyanins and soluble sugars, and acidity. Fruit biomass was estimated by weighing the samples immediately at each harvest time point after transferring to the laboratory in bags (with high humidity to avoid desiccation). Total anthocyanins were determined as described [17]. Fruit samples (200 mg) were extracted with 1 mL methanol using ultrasonication and vortexing. Extracts were centrifuged at 1000 \times g for 10 min at 4°C and the pellet was re-extracted following the same procedure. Supernatants were collected and pooled before extract acidification. In order to acidify the extracts, 1% HCl was added and total anthocyanins measured spectrophotometrically at 530 nm. Total anthocyanins were calculated using cyanidin-3-glucoside as a reference, using a molar absorption coefficient of 34300 $\text{L cm}^{-1} \text{mol}^{-1}$ as described [18].

For sugar analyses, samples (50 mg) were extracted with 1 mL ethanol 80% (v/v) at 80°C . After centrifugation, the supernatants were pooled and dried completely under a nitrogen stream. The extracts were suspended in 1 mL of MilliQ water, passed through Sep-Pak Plus (100 mg) C18 cartridges (Waters, Milford, MA, USA), and then 0.5 mL of MilliQ water was added prior to injection into the HPLC system. Glucose, fructose and sucrose were isocratically separated on an Aminex HPX-87C column (Bio-Rad Carbohydrate Standard, Hercules, CA, USA) using water as a solvent at a flow rate of 0.6 mL/min. Detection was carried out with a differential refractometer (Knauer, Berlin, Germany) with the cell at 80°C . Glucose, fructose and sucrose from Sigma (Steinheim, Germany) were used for quantification. Sucrose levels were always kept

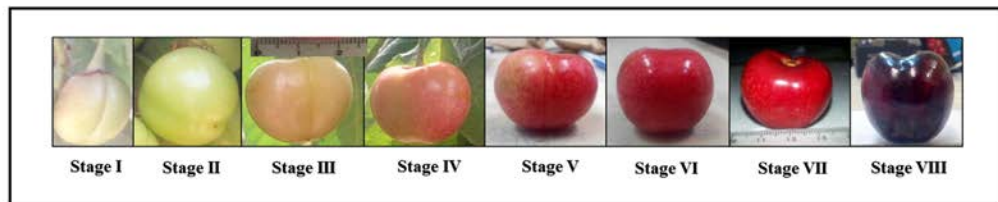


Fig. 1. Sweet cherries during the study of natural development of fruits on the tree (from left to right, stages I to VIII).

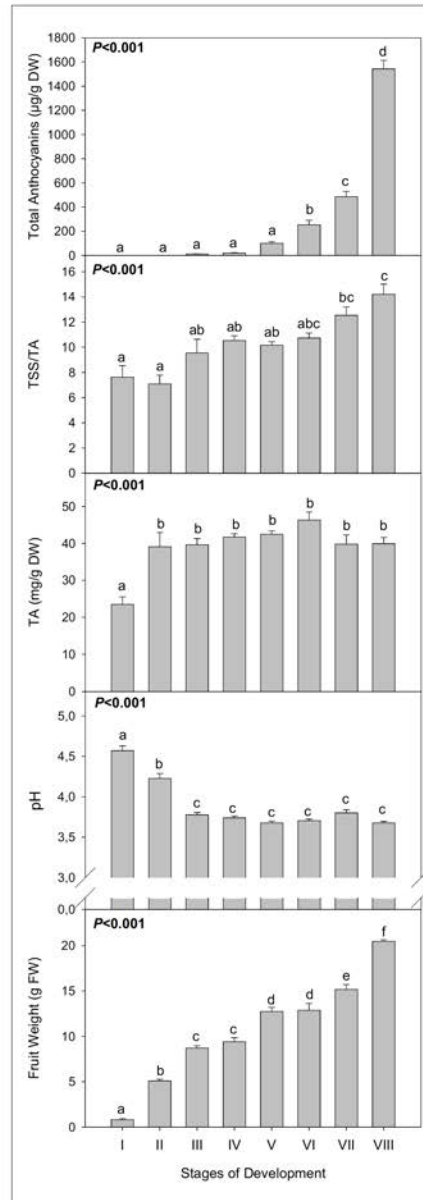


Fig. 2. Total anthocyanins, total acidity (TA), pH, total soluble sugars to total acidity ratio (TSS/TA), and fruit mass during natural fruit development. Data are means \pm SE of $n = 8$. Statistical comparisons were performed by one-way ANOVA followed by a post hoc Tukey test. Different letters indicate significant differences between the developmental stages at $P < 0.05$.

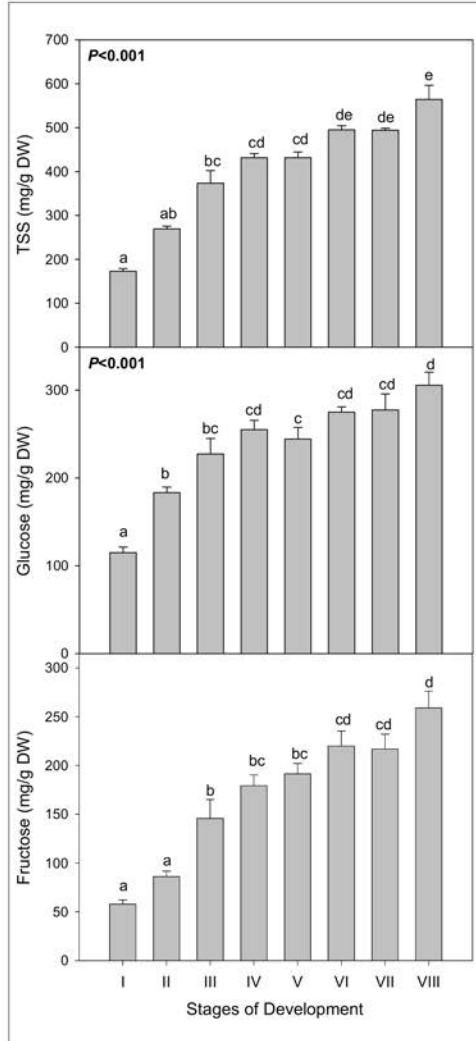


Fig. 3. Total soluble sugars (TSS) and total content of glucose and fructose during natural fruit development. Data are means \pm SE of $n=8$. Statistical comparisons were performed by one-way ANOVA followed by a post hoc Tukey test. Different letters indicate significant differences between the developmental stages at $P < 0.05$.

below 1% of total soluble sugars, so only results from glucose and fructose levels are shown.

In order to analyse malic acid content and pH in the fruit, 5 g of sample was homogenised with 25 mL of distilled water using a vortex (Branson 2510 ultrasonic cleaner, Branson, USA). The pH was measured using a pH-meter. 10 mL of this juice were diluted with 100 mL of distilled water and this solution was used for the determination of titratable acidity (to estimate malic acid contents) with 0.1 N NaOH, using phenolphthalein (1%) as an indicator [19].

Statistical analysis

Data were analysed by one-way factorial analysis of variance (ANOVA). Multiple comparisons tests were carried out using Tukey HSD post hoc tests. All statistical tests were performed using the SPSS 20.0 statistical package. Furthermore, Spearman's rank correlation analyses were performed between hormones and quality parameters using the SPSS 20.0 statistical package. In all cases, differences were considered significant at a probability level of $P < 0.05$.

Results and discussion

Quality parameters during natural development and ripening

Natural fruit development was characterised by an initial phase of growth, in which the fruit weight increased 10-fold from stage I to III (Fig. 2). In the second phase of growth (II–VI), the fruit continued to increase in size slowly and then quickly reached its final weight, increasing 1.6-fold at the end of ripening process during the third phase of growth. Anthocyanins started to be synthesised at stage III, corresponding to the onset of ripening (Fig. 1). This is in agreement with previous studies, showing that anthocyanins start to accumulate in sweet cherries during the onset of ripening [5]. Subsequently, anthocyanins showed an exponential increase up to the end of the experiment, attaining maximum levels at stage VIII (Fig. 2).

Total soluble sugars (as glucose plus fructose) started to accumulate significantly at stage III, increasing gradually during fruit ripening (Fig. 3), in agreement with previous studies [20]. Glucose was the most abundant soluble sugar in sweet cherries and levels of both glucose and fructose increased during ripening in fruits on the tree (Fig. 3), attaining the highest levels at the commercial stage. The ratio of total soluble sugars to total acidity (TSS/TA, Fig. 2), which is an indicator of flavour partly determining fruit consumer acceptance [21], increased gradually during ripening in fruits on the tree, mainly due to the rise in glucose and fructose levels (Fig. 3).

The initial growth phase between stages I and II was associated with a decrease in pH value, which was associated with a 1.7-fold increase in total acidity (Fig. 2). Thereafter, malic acid content remained at an elevated level up to the stage of commercial harvest (Fig. 2), whereas pH value decreased significantly at stage III, owing to the synthesis of other organic acids such as ascorbic or citric acids [22] and it remained low and constant until stage VIII.

Changes in ABA, auxins, gibberellins and cytokinins during natural development and ripening

During the onset of fruit development, at stages I and II, the endogenous levels of ABA were low (Fig. 4). However, at stage III, when fruit ripening started with anthocyanins accumulation (Fig. 2), ABA levels increased sharply and remained high during the

whole ripening process. A strong positive correlation ($r > 0.5$, $P < 0.05$) was found between ABA levels and quality parameters (anthocyanins, TSS and fruit biomass, Table 1), which is in agreement with other studies in which ABA regulates the expression of anthocyanin biosynthesis genes, as well as sugar metabolism in sweet cherries [23]. Moreover, a negative correlation ($r = -0.644$, $P < 0.05$) between ABA and pH value was found, so that pH decreased (turned into acid) while ABA levels increased, as has been described in climacteric fruits, ABA modulating the accumulation of organic acids in tomato [24].

The highest concentrations of the auxin indole-3-acetic acid were observed at stage I (Fig. 5), when the fruit was fully green and very small (Fig. 1), which may be associated to the high capacity of these developing fruits at this stage for growth, due to the role of auxins as a stimulator of cell expansion [25]. Thereafter, auxin levels sharply decreased and remained constant at low levels throughout fruit development and ripening on the tree (Fig. 5). These results are consistent with previous evidence in other non-climacteric fruits, where auxins promote cell expansion and inhibit the ripening process [26,27].

Among gibberellins, GA₁ levels paralleled those of auxin during natural development, while changes in GA₃ and GA₄ followed a different response. GA₃ levels peaked at stage III to decrease thereafter, attaining minimum levels at commercial stage, while GA₄ levels were maximum at stage I and started to decrease (Fig. 6) concomitantly with enhanced anthocyanins levels (Fig. 2). No previous reports are available on endogenous GA levels in sweet cherry. In the present study, GA₄ was the major GA, similarly to strawberry fruits, in which GA₄ was extremely high in the receptacle at the white stage of development [28]. In tomato, GA₁ is the most abundant GA during ripening [10]. Our results support the contention that GA₁, with high levels at stage I, may play a role in promoting cellular expansion together with auxins, in agreement with other studies [29,30]. Although ABA is an essential phytohormone to promote ripening in non-climacteric fruits [31], our results suggest that GA₄ may also play a role in this process. A strong negative correlation was found between GA₄ and anthocyanins, TSS and fruit biomass ($r > 0.5$, $P < 0.001$, Table 1), supporting the idea that GA₄ inhibits the ripening process in sweet cherries. Furthermore, GA₃ may also be important in the onset of ripening because of the high levels of this hormone found at stage III, when the second phase of growth started, which was

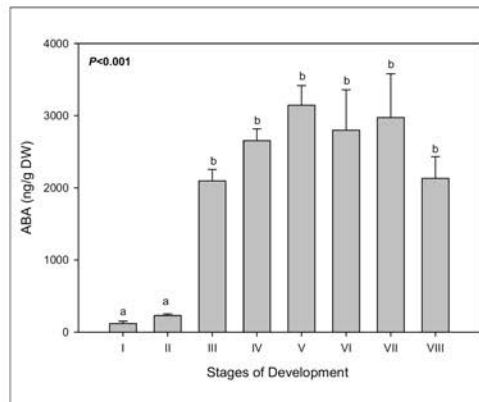


Fig. 4. Endogenous concentration of abscisic acid (ABA) during natural fruit development. Data are means \pm SE of $n = 8$. Statistical comparisons were performed by one-way ANOVA followed by a posthoc Tukey test. Different letters indicate significant differences between the developmental stages at $P < 0.05$.

Table 1

Spearman's rank correlation analyses between endogenous concentrations of phytohormones and quality parameters. Correlations with significant P-values ($P < 0.05$) are shown in bold. NS, not significant. ABA, abscisic acid; IAA, indole-3-acetic acid; GA, gibberellin; Z, *trans*-zeatin; ZR, *trans*-zeatin riboside; IPA, isopentenyladenoside; 2iP, isopentenyl adenine; TSS/TA, total soluble sugars to total acidity ratio.

Hormones	Total Anthocyanins ($\mu\text{g/g DW}$)		TSS (mg/g DW)		Glucose (mg/g DW)		Fructose (mg/g DW)	
	rho	P	rho	P	rho	P	rho	P
ABA	0.595	<0.001	0.598	<0.001	0.597	<0.001	0.611	<0.001
IAA	-0.381	0.002	-0.473	0.001	-0.474	<0.001	-0.460	<0.001
GA ₁	-0.160	NS	-0.138	NS	-0.120	NS	-0.146	NS
GA ₃	-0.200	NS	0.112	NS	-0.096	NS	0.144	NS
GA ₄	-0.633	<0.001	-0.558	<0.001	-0.544	<0.001	-0.566	<0.001
GA ₇	-0.165	NS	-0.192	NS	-0.163	NS	-0.222	NS
Z	-0.746	<0.001	-0.640	<0.001	-0.613	<0.001	-0.676	<0.001
ZR	-0.422	0.001	-0.351	0.006	-0.360	0.004	-0.366	0.004
IPA	0.376	0.003	0.308	0.016	0.290	0.023	0.343	0.007
2iP	0.174	NS	0.204	NS	0.198	NS	0.207	NS

Hormones	TA (mg/g DW)		TSS/TA		FruitWeight (g FW)		pH	
	rho	P	rho	P	rho	P	rho	P
ABA	0.270	NS	0.407	0.017	0.607	<0.001	-0.637	<0.001
IAA	-0.153	NS	-0.235	NS	-0.298	0.020	0.335	NS
GA ₁	-0.155	NS	-0.021	NS	-0.167	NS	0.181	NS
GA ₃	-0.381	0.026	-0.256	NS	0.184	NS	0.029	NS
GA ₄	-0.375	0.029	-0.536	0.001	-0.620	<0.001	0.569	<0.001
GA ₇	-0.022	NS	-0.218	NS	-0.111	NS	0.114	NS
Z	-0.331	NS	-0.488	0.004	-0.698	<0.001	0.536	<0.001
ZR	-0.501	0.003	-0.423	0.013	-0.381	0.002	0.644	<0.001
IPA	0.201	NS	0.351	0.045	0.422	0.001	-0.317	NS
2iP	0.115	NS	0.116	NS	0.179	NS	0.188	NS

followed by a decrease thereafter, when anthocyanins began noticeably to accumulate (Fig. 6), thus suggesting that GA₃ could promote cell expansion during the second phase of growth. Exogenous applications of GA₃ at preharvest resulted in an increase of 15% in fruit size and a delay in ripening in previous studies [8,32].

Both *trans*-zeatin and its riboside showed maximum levels at the initial stages of fruit development on the tree (Fig. 7), when cell division is maximum [1–3]. Thereafter, their levels both decreased and remained low during ripening on the tree (Fig. 7). Similarly to tomato, in which *trans*-zeatin is involved in cell division in the ovary and in fruit development [33], it appears that *trans*-zeatin, the most abundant cytokinin in sweet cherry, promotes cell division in this fruit, as suggested by its highest concentration at stages I and II (during the first phase of growth). *trans*-Zeatin and

its riboside may therefore be inhibitors of the ripening process, which is supported by the fact that they remained at low levels at advanced stages of development on the tree. Cytokinins are known to be positive regulators of sink strength, attracting carbohydrates and amino acids from source tissues to sites of high cytokinin concentration (i.e. sinks) [34]. At the start of development, the fruit is growing and as a consequence consumes sugars. This is in accordance with the high amounts of cytokinins during the first stages of development (stage I and II) of sweet cherry fruits on the tree. When the ripening process started, the levels of *trans*-zeatin and its riboside decreased and, at this point, soluble sugars started to accumulate, which may be due to degradation of cell wall polysaccharides [35]. *trans*-Zeatin and both fruit biomass and fructose levels correlated negatively ($r > 0.6$, Table 1), as a result of

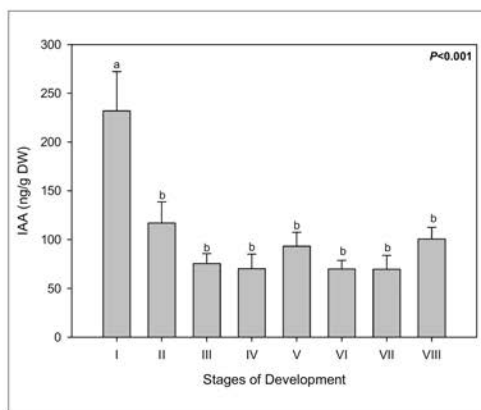


Fig. 5. Endogenous concentrations of indole-3-acetic acid (IAA) during natural fruit development. Data are means \pm SE of $n = 8$. Statistical comparisons were performed by one-way ANOVA followed by a post hoc Tukey test. Different letters indicate significant differences between the developmental stages at $P < 0.05$.

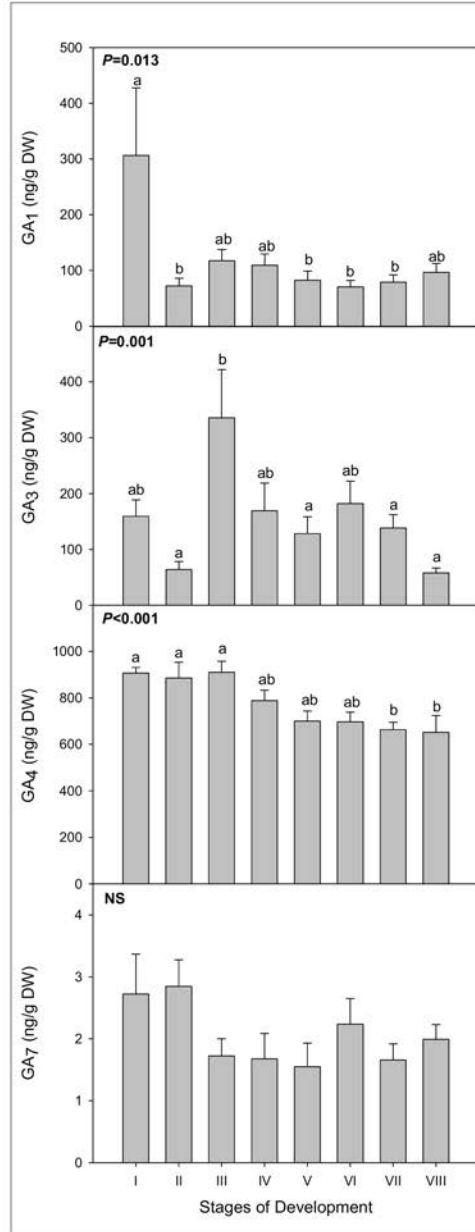


Fig. 6. Endogenous concentration of gibberellins (GAs), including GA₁, GA₃, GA₄, GA₇ during natural fruit development. Data are means \pm SE of $n = 8$. Statistical comparisons were performed by one-way ANOVA followed by a post hoc Tukey test. Different letters indicate significant differences between the developmental stages at $P < 0.05$. NS, not significant.

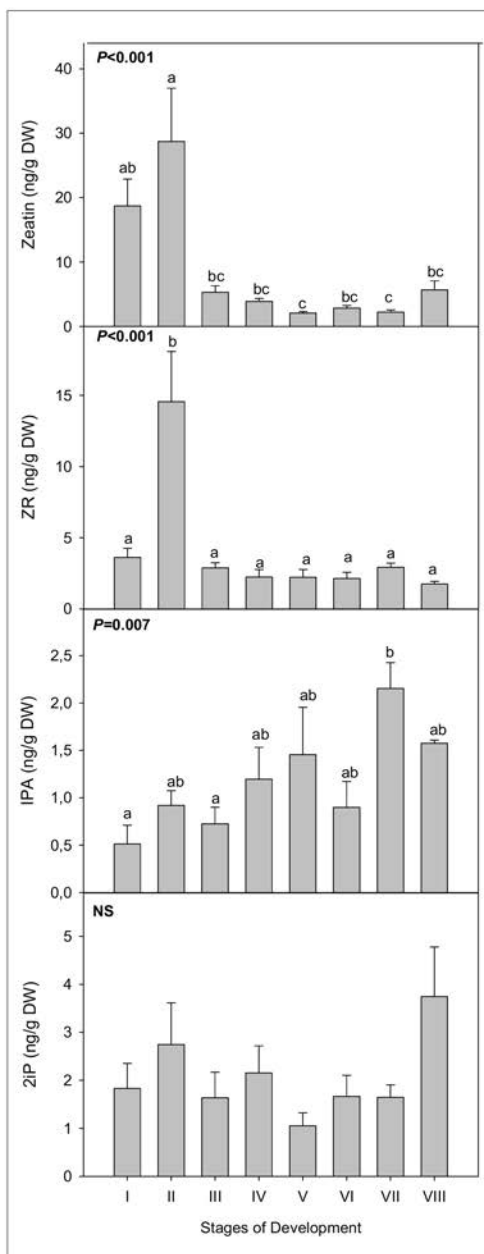


Fig. 7. Endogenous concentrations of cytokinins, including *trans*-zeatin, *trans*-zeatin riboside (ZR), isopentenyladenosine (IPA) and 2-isopentenyladenine (2iP) during natural fruit development. Data are means \pm SE of $n=8$. Statistical comparisons were performed by one-way ANOVA followed by a post hoc Tukey test. Different letters indicate significant differences between the developmental stages at $P < 0.05$. NS, not significant.

the very high *trans*-zeatin levels in small, growing, non-ripening fruits (Fig. 7). Interestingly, a strong negative relationship between *trans*-zeatin and anthocyanins was found ($r = -0.746$), since anthocyanins started to accumulate when *trans*-zeatin levels decreased, which may be associated with the role of cytokinins as regulators of tissue greening [36]. Furthermore, levels of isopentenyladenosine (IPA) and 2-isopentenyladenine were low (<3 ng/g DW) throughout the natural development, but those of IPA increased progressively during fruit ripening on the tree (Fig. 7). In contrast with GA₄ or *trans*-zeatin, correlations between IPA and quality parameters were positive (Table 1). Since 2-isopentenyladenine has been shown to increase during ripening in grapes, kiwifruit, tomato and strawberry, suggesting a role for this cytokinin form in the ripening process [15], IPA could play a similar role in sweet cherries, as indicated by the enhanced levels of this cytokinin during ripening (Fig. 7).

Hormone profiles suggest that ABA, auxins, GAs and cytokinins do not act alone but coordinately in the regulation of sweet cherry development and ripening (Fig. 8), as proposed previously in other plant systems [37]. It has been suggested that in the growth of the tomato fruit pericarp or the strawberry fruit receptacle, cell elongation and cell division activity are coordinated by a delicate balance between GAs and auxins [28,29]. In sweet cherry fruits, not only high levels of GAs and auxins are needed to start the fruit development, but also high levels of cytokinins and low levels of ABA. Interestingly, there is an increasing number of reports on

cross-talk between ethylene, auxins and ABA in ripening of climacteric fruits. It has been shown that low concentrations of auxins and high concentrations of ABA are required for ripening in cherries, to the extent that exogenous application of indole-3-acetic acid causes a delay in the ripening process due to a cross-talk between these two hormones [6].

Thus, the progression of fruit ripening is a complex process involving changes in various hormone classes, and even specific compounds within each hormone type, which has important implications in the agri-food biotechnological sector. Hormonal profiling of fruits at various ripening stages, as shown in the present study, can provide new insights into the specific classes of hormones involved in the regulation of fruit ripening and, even more importantly, the specific compounds within each hormonal type that are more likely to be associated with a particular ripening stage. This paves the way to develop new strategies for influencing the metabolism and/or action of a specific hormone to modulate ripening in orchard trees. It is noteworthy that hormone profiles will undoubtedly vary depending on the plant species, variety, and/or even the climatological conditions at which the orchard is found. It is well known that ripening involves the integration of multiple hormonal signals, with some acting as promoters and others as repressors. In the present study, results suggest that GA₄ and *trans*-zeatin are acting as repressors, while ABA and IPA promote ripening. Although applications of GA₃ have been used to improve the quality of sweet cherries, our results suggest that the

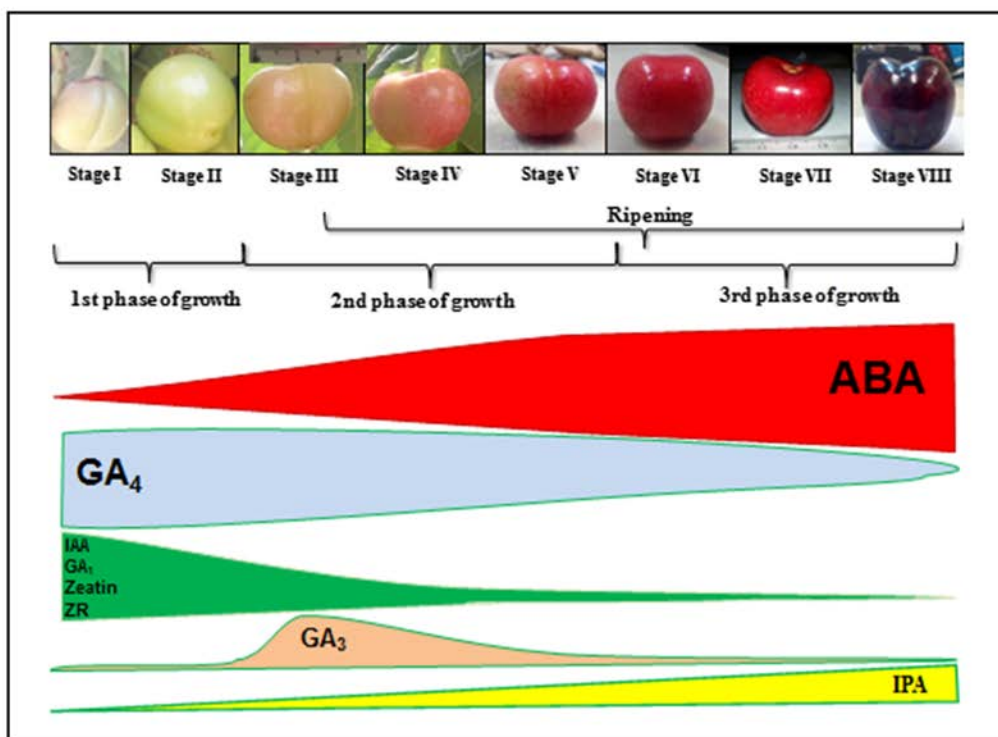


Fig. 8. Model showing the changes in hormone profiles at various stages of fruit development.

application of compounds that influence the endogenous levels and/or action not only of GA₃ but also of GA₁ and GA₄, cytokinins (*trans*-zeatin) and auxin, may be more effective in enhancing quality and delaying ripening. Further experiments are however required to test the effects of the application of a combination of these hormones or compounds that alter their metabolism and/or action in sweet cherries and other non-climacteric fruits.

Conclusion

These results suggest that auxins, cytokinins and gibberellins promote cell expansion and division, especially, during the first and second phase of cherry growth, while ABA promotes fruit ripening. This occurred concomitantly with endogenous variations in sugar and anthocyanin content. Hormonal profiling by UHPLC–MS/MS appeared to be a helpful tool to (i) identify specific classes of hormones involved in the regulation of fruit ripening, (ii) unravel particular compounds within a hormonal type that may be involved in the regulation of specific developmental and ripening stages, and (iii) elucidate the timing of hormonal action during fruit development, which may all have important implications for the development of new products in the agri-food biotechnology sector. Although results suggest a link between hormone profiles and various quality parameters, such as anthocyanin and sugar contents, further research is required to understand the mechanisms through which hormones act coordinately to control fruit ripening and quality in sweet cherries and other non-climacteric fruits.

Acknowledgements

We are very grateful to Maren Müller, Paula Muñoz, Esther Miralles and Serveis Científic-tècnics (University of Barcelona) for their help with phytohormone and sugar analyses. We also thank Josep Maria Gilart for giving us the opportunity to sample the fruits in his orchard. Research was supported by the Generalitat de Catalunya through the ICREA Academia prize to S.M.B.

References

- [1] Olmstead JW, Iezzoni AF, Whiting MD. Genotypic differences in sweet cherry fruit size are primarily a function of cell number. *J Am Soc Hortic Sci* 2007;132:697–703.
- [2] Tukey HB, Young JO. Historical study of the developing fruit of the sour cherry. *Botanical Gazette*.
- [3] Greco M, Chiappetta A, Bruno L, Bitonti MB. In *Posidonia oceanica* cadmium induces changes in DNA methylation and chromatin patterning. *J Exp Bot* 2012;63:695–709.
- [4] Serrano M, Guillén F, Martínez-Romero D, Castillo S, Valero D. Chemical constituents and antioxidant activity of sweet cherry at different ripening stages. *J Agric Food Chem* 2005;53:2741–5.
- [5] Luo H, Dai S, Ren J, Zhang C, Ding Y, Li Z, et al. The role of ABA in the maturation and postharvest life of a nonclimacteric sweet cherry fruit. *J Plant Growth Regul* 2013;33:373–83.
- [6] Wang Y, Chen P, Sun L, Li Q, Dai S, Sun Y, et al. Transcriptional regulation of *PuPPLs*, *PuPP2Cs* and *PoSnrRK2s* during sweet cherry fruit development and in response to abscisic acid and auxin at onset of fruit ripening. *Plant Growth Regul* 2014;75:455–64.
- [7] Lenahan OM, Whiting MD, Elfving DC. Gibberellic acid inhibits floral bud induction and improves Bing sweet cherry fruit quality. *HortScience* 2006;41:654–9.
- [8] Zhang C, Whiting M. Plant growth regulators improve sweet cherry fruit quality without reducing endocarp growth. *Sci Hort* 2013;150:73–9.
- [9] Fortes AM, Teixeira RT, Agudelo-Romero P. Complex interplay of hormonal signals during grape berry ripening. *Molecules* 2015;20:9326–43.
- [10] Symons GM, Chua Y-J, Ross JJ, Quittenden LJ, Davies NW, Reid JB. Hormonal changes during non-climacteric ripening in strawberry. *J Exp Bot* 2012;63:4741–50.
- [11] Schaffer RJ, Ireland HS, Ross JJ, Ling TJ, David KM. SEPALLATA1/2-suppressed mature apples have low ethylene, high auxin and reduced transcription of ripening-related genes. *AOB Plants* 2013;5:pls047.
- [12] El-Otmani M, Lovatt CJ, Coggins CW, Agusti M. Plant growth regulators in citriculture: factors regulating endogenous levels in *Citrus* tissues. *Crit Rev Plant Sci* 1995;14:367–412.
- [13] Gillaspay G, Ben-David H, Gruissem W. Fruits: a developmental perspective. *Plant Cell* 1993;5:1439–51.
- [14] Kumar R, Khurana A, Sharma AK. Role of plant hormones and their interplay in development and ripening of fleshy fruits. *J Exp Bot* 2014;65:4561–75.
- [15] Böttcher C, Burbidge CA, Boss PK, Davies C. Changes in transcription of cytokinin metabolism and signalling genes in grape (*Vitis vinifera* L.) berries are associated with the ripening-related increase in isopentenyladenine. *BMC Plant Biol* 2015;15:223.
- [16] Müller M, Munné-Bosch S. Rapid and sensitive hormonal profiling of complex plant samples by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Plant Methods* 2011;7:37.
- [17] Gitelson AA, Merzlyak MN, Chivkunova OB. Optical properties and nondestructive estimation of anthocyanin content in plant leaves. *Photochem Photobiol* 2001;74:38–45.
- [18] Siegelman HW, Hendricks SB. Photocatalysis of anthocyanin synthesis in apple skin. *Plant Physiol* 1958;33:185–90.
- [19] Latimer DW. Official Methods of Analysis of AOAC International. 19th ed. Rockville, MD, USA: AOAC International; 2012.
- [20] Kovács E, Kristóf Z, Perlaki R, Szöllösi D. Cell wall metabolism during ripening and storage of nonclimacteric sour cherry (*Prunus cerasus* L., cv. Kántorjánosi). *Acta Alimentaria* 2008;37:415–26.
- [21] Crisosto CH, Crisosto GM, Metheny P. Consumer acceptance of Brooks and Bing cherries is mainly dependent on fruit SSC and visual skin color. *Postharvest Biol Technol* 2003;28:159–67.
- [22] Mahmood T, Anwar F, Abbas M, Boyce MC, Saari N. Compositional variation in sugars and organic acids at different maturity stages in selected small fruits from Pakistan. *Int J Mol Sci* 2012;13:1380–92.
- [23] Shen X, Zhao K, Liu L, Zhang K, Yuan H, Liao X, et al. A role for *PacMYBA* in ABA-regulated anthocyanin biosynthesis in red-colored sweet cherry cv. Hong Deng (*Prunus avium* L.). *Plant Cell Physiol* 2014;55:862–80.
- [24] Bastías A, López-Climent M, Valcárcel M, Rosello S, Gómez-Cadenas A, Casaroto JA. Modulation of organic acids and sugar content in tomato fruits by an abscisic acid-regulated transcription factor. *Physiol Plant* 2011;141:215–26.
- [25] Perrot-Rechenmann C. Cellular responses to auxin: division versus expansion. *Cold Spring Harbor Perspect Biol* 2010;2:a001446.
- [26] Benítez-Burraco A. Cloning and characterization of two ripening-related strawberry (*Fragaria x ananassa* cv: chandler) pectate lyase genes. *J Exp Bot* 2003;54:633–45.
- [27] Kuhn N, Guan L, Dai ZW, Wu B-H, Lauvergat V, Gomès E, et al. Berry ripening: recently heard through the grapevine. *J Exp Bot* 2014;65:4543–59.
- [28] Csukasi F, Osorio S, Gutierrez JR, Kitamura J, Gialvalisco P, Nakajima M, et al. Gibberellin biosynthesis and signalling during development of the strawberry receptacle. *New Phytol*. 2011;191:376–90.
- [29] de Jong M, Mariani C, Vriezen WH. The role of auxin and gibberellin in tomato fruit set. *J Exp Bot* 2009;60:1523–32.
- [30] Ross JJ, Reid JB. Evolution of growth-promoting plant hormones. *Funct Plant Biol* 2010;37:795.
- [31] Ren J, Chen P, Dai S, Li P, Li Q, Ji K, et al. Role of abscisic acid and ethylene in sweet cherry fruit maturation: molecular aspects. *New Zeal J Crop Hort Sci* 2011;39:161–74.
- [32] Cline JA, Trought M. Effect of gibberellic acid on fruit cracking and quality of Bing and Sam sweet cherries. *Can J Plant Sci* 2007;87:545–50.
- [33] Matsuo S, Kikuchi K, Fukuda M, Honda I, Imanishi S. Roles and regulation of cytokinins in tomato fruit development. *J Exp Bot* 2012;63:5569–79.
- [34] Roitsch T, Ehneß R. Regulation of source/sink relations by cytokinins. *Plant Growth Regul* 2000;32:359–67.
- [35] Fischer RL, Bennett AB. Role of cell wall hydrolases in fruit ripening. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1991;42:675–703.
- [36] Pilkington SM, Montefiori M, Galer AL, Neil Emery RJ, Allan AC, Jameson PE. Endogenous cytokinin in developing kiwifruit is implicated in maintaining fruit flesh chlorophyll levels. *Ann Bot* 2013;112:57–68.
- [37] Serrano JC, Sanjuán R, Ruiz-Rivero O, Fos M, García-Martínez JL. Gibberellin regulation of fruit set and growth in tomato. *Plant Physiol* 2007;145:246–57. frame 15.62.3.198.462.108.692?name=GraphicalAbstractFrame;text=GraphicalAbstract;0.3.5146.0.0.0column.0.183.462pageclip 1rules 1.0,0.1757,"Black;15"pro 1cymodes 2,2,2,2GraphicalAbstractFrame

Capítulo 3: La melatonina como inhibidor de la maduración de las cerezas en el árbol.

Chapter 3: Melatonin as an inhibitor of sweet cherries ripening in orchard trees.

Verónica Tijero, Paula Muñoz, Sergi Munné-Bosch

Departamento de Biología Evolutiva, Ecología y Ciencias Ambientales,
Sección de Fisiología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de
Barcelona, Av. Diagonal 643, 08028, Barcelona, España.

Publicado en **Plant Physiology and Biochemistry** (2019) 140, 88-95.

RESUMEN DEL CAPÍTULO 3

Aunque los efectos de la melatonina en la maduración de frutos en la poscosecha se han estudiado con cierto detalle en frutos no climatéricos, la información aún es escasa durante la precosecha. En este trabajo se estudió si la melatonina puede o no desempeñar un papel durante la maduración de las cerezas en árboles. Se evaluó (i) las variaciones endógenas en el contenido de melatonina mediante cromatografía líquida de ultra-alta eficacia acoplada a espectrometría de masas en tándem (UHPLC-MS/MS) durante la maduración de las cerezas en dos años consecutivos, y (ii) hasta qué punto los tratamientos con melatonina (a 10^{-4} M y 10^{-5} M) influyen en la maduración y calidad del fruto en el árbol, en particular, al influir en el contenido endógeno de otras fitohormonas. El contenido de melatonina endógena disminuyó a medida que progresaba la maduración del fruto, lo que sugiere un papel inhibitorio en la maduración de frutos. Además, el tratamiento con melatonina a 10^{-5} M retrasó la acumulación de antocianinas, sugiriendo un papel en el control de la maduración y calidad de las cerezas dulces. También encontramos que el contenido endógeno de citoquininas, inhibitorias de la maduración de frutos, se vio afectado por los tratamientos con melatonina, lo que sugiere una interacción de la melatonina con otras fitohormonas en su efecto inhibitorio de la maduración. Sin embargo, ni el contenido de ácido abscísico ni de auxinas se vieron influenciados por los tratamientos con melatonina. Se concluye que (i) la melatonina puede jugar un papel inhibitorio durante la maduración de las cerezas dulces en árbol, al menos en parte, a través de una interacción hormonal con citoquininas, y (ii) la melatonina exógena puede usarse para modular la maduración y calidad del fruto en árbol.



Contents lists available at ScienceDirect

Plant Physiology and Biochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/plaphy

Short communication

Melatonin as an inhibitor of sweet cherries ripening in orchard trees

Verónica Tijero^a, Paula Muñoz^{a,b}, Sergi Munné-Bosch^{a,b,*}^a Department of Evolutionary Biology, Ecology and Environmental Sciences, University of Barcelona, Barcelona, Spain^b Institute of Nutrition and Food Safety, University of Barcelona, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Fruit ripening
Non-climacteric
Melatonin
Pre-harvest
Prunus avium L.
Sweet cherries

ABSTRACT

Although melatonin effects on postharvest fruit ripening have been studied in some detail, information is still scarce during pre-harvest. Here, we examined whether or not melatonin may exert a regulatory role during sweet cherries ripening in orchard trees. We evaluated (i) the endogenous variations in melatonin contents, in comparison to those of well-known phytohormones such as ABA, salicylic acid and jasmonic acid, by ultrahigh performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) during fruit ripening over two consecutive years, and (ii) to what extent melatonin treatments at low and high concentrations (at 10^{-4} M and 10^{-5} M, respectively) influence fruit ripening on the tree. Endogenous melatonin contents decreased in parallel to those of salicylic acid and jasmonic acid, while ABA contents increased as fruit ripening progressed, thus suggesting an inhibitory role for melatonin in fruit ripening. Furthermore, melatonin treatment at 10^{-5} M, which transiently increased endogenous melatonin contents at physiological concentrations, delayed anthocyanin accumulation, thus confirming an inhibitory regulatory role for melatonin in fruit ripening. We also found that the endogenous contents of cytokinins, but not those of ABA were transiently affected by melatonin treatment at 10^{-5} M. It is concluded that melatonin may delay sweet cherries ripening in orchard trees, probably exerting a modulatory role through a hormonal cross-talk. These results have important implications for the use of melatonin in the control of the timing of sweet cherries ripening in orchard trees.

1. Introduction

Fleshy fruit ripening is a complex process where many physiological and biochemical changes take place. This process involves colour modification, in which chloroplasts turn into chromoplasts, and carotenoids and anthocyanins start to accumulate, in addition to organic acids, sugars, vitamins and volatiles that ultimately determine fruit quality (Giovannoni, 2004). Fleshy fruits are classified as climacteric, when an increase in respiration rate regulated by ethylene is needed to start the ripening process, and non-climacteric, when fruits do not exhibit an increase in the respiration rate (Chai et al., 2011; Symons et al., 2012).

Many studies have shown how abscisic acid (ABA) plays an important role in non-climacteric fruit ripening, by regulating fruit softening (Castellarin et al., 2016), colour change (the accumulation of anthocyanins and/or carotenoids, Deytieux et al., 2005; Jia et al., 2011), and the contents of sugars and organic acids (Kondo and Gemma, 1993; Kondo and Inoue, 1997; Luo et al., 2013), along with vitamins and antioxidants (Tijero et al., 2016). Other phytohormones like auxins, gibberellins (GAs), cytokinins (CKs), jasmonic acid (JA) and salicylic acid (SA) are also involved in non-climacteric fruit ripening,

working in coordination with ABA, but increasing fruit size by promoting cell expansion and cell division, and delaying or inhibiting fruit ripening (Lenahan et al., 2006; Zhang and Whiting, 2013; Kumar et al., 2014; Teribia et al., 2016).

Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine) is an indolamine synthesized from tryptophan, widely studied in mammals and, more recently, in plants. Melatonin is a ubiquitous compound in plants, predominantly occurring in the *Rosaceae*, *Poaceae*, *Vitaceae*, *Apiaceae* and *Brassicaceae* plant families, the richest sources of melatonin found in roots, seeds, leaves, bulbs, flowers and fruits (Nawaz et al., 2016). Since the recent application of liquid chromatography (LC) coupled to mass spectrometry (MS) for an accurate identification and quantification of melatonin in plant tissues (Chen et al., 2008), the interest on the possible roles of melatonin and its effects on plant systems has recently increased. Although some recent studies have indicated an important modulatory role for melatonin during fruit ripening during postharvest in climacteric fruits (Sun et al., 2015, 2016; Hu et al., 2017; Zhai et al., 2007), information is still scarce on the putative role of this compound on the ripening of non-climacteric fruits. In a recent study, measurements of endogenous melatonin by HPLC in two sweet cherry varieties showed an increase of this compound during early stages of fruit

* Corresponding author. Department of Evolutionary Biology, Ecology and Environmental Sciences, University of Barcelona, Barcelona, Spain.
E-mail address: smunne@ub.edu (S. Munné-Bosch).

<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.05.007>

Received 19 March 2019; Received in revised form 3 May 2019; Accepted 3 May 2019

Available online 04 May 2019

0981-9428/© 2019 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

development, followed by a decrease during ripening, which was associated with a possible role of melatonin as an antioxidant, since the contents of melatonin inversely correlated with those of malondialdehyde, an indicator of membrane lipid peroxidation (Zhao et al., 2012). In this study, however, the contents of melatonin ranged between 7 and 35 ng/g fresh matter, which might be considered too low for a direct antioxidant function and is more consistent with a putative hormonal/regulatory role (Arnao and Hernández-Ruiz, 2018). In another non-climacteric fruit, grape berries, melatonin contents were higher on the skin during pre-*veraison* to later decrease at the *veraison* stage, which is also consistent with an inhibitory role for melatonin in fruit ripening (Vitalini et al., 2011). Furthermore, exogenous melatonin treatment at pre-*veraison* increased berry size and improved the aroma of wines (Meng et al., 2015). In contrast, other studies have shown that exogenous melatonin can promote ripening of grape fruits through increases in ABA (Xu et al., 2007). Therefore, more studies are needed to unravel the role of melatonin in the ripening of non-climacteric fruits. The aim of the present study was not only to evaluate the possible role of melatonin during the ripening process of a non-climacteric fruit, such as sweet cherry, in the orchard tree, but also its possible cross-talk with other hormones. In particular, we focused on the possible cross-talk of melatonin with ABA and auxin, known to be important in the control of ripening in non-climacteric fruits, but also with salicylic acid, jasmonic acid, cytokinins and gibberellins, less studied thus far but also with a putative role in ripening. We hypothesized that melatonin might exert an inhibitory role in the ripening of sweet cherry on the tree by modulating the contents of endogenous hormones, mainly ABA and auxin.

2. Materials and methods

2.1. Plant material, treatments and sampling

We carried out two different experiments for this work. For the first one, we studied the sweet cherry (*Prunus avium* L. var Prime Giant) ripening process on the tree in commercial orchards in Lleida (Partida Vall del Sector II, Lleida, NE Spain). The fruits were harvested at seven different developmental and ripening stages during the spring of 2015 and 2016, using the developmental stages described in Teribía et al. (2016). Experiments were performed between April 30th, 2015 (stage I) and May 22nd, 2015 (stage VII), and between April 15th, 2016 (stage I) and May 31st, 2016 (stage VII). Supplementary Fig. 1 shows the prevailing climatologic conditions at each developmental stage over the two consecutive seasons studied.

For the second experiment, we applied three different treatments to the fruits: melatonin at either 10^{-4} M or 10^{-5} M, which were compared to a control (water), containing each solution 0.1% Tween-20. The solutions were sprayed on the surface of fruits at stage II (for a description of stages see Teribía et al., 2016). Samplings were performed at 0 h before treatments, and at 4 h, 1d, 5d, 11d and 19d of treatments. Treatments started on May 5th, 2016.

A pool of six fruits per tree was used as one replicate, and eight trees (eight replicates) were used for each development stage and treatment at each sampling time point. Samplings for each experiment were performed between 9 and 10 a.m. local time. After being collected, samples were immediately frozen in liquid nitrogen, transported to the laboratory and then stored at -80°C until analyses.

2.2. Fruit quality parameters

Total anthocyanins were determined as described (Gitelson et al., 2001). In short, 200 mg per sample were extracted in 2 mL methanol using ultrasonication and vortexing. The extracts were centrifuged at 13000 rpm during 10 min at 4°C . The pellet was re-extracted following the same procedure. Supernatants were collected and pooled in order to acidify the extracts by adding 1% HCl. Then total anthocyanins were measured spectrophotometrically at 530 nm using the molar extinction

coefficient of cyanidin-3- glucoside as a reference.

Total acidity (TA) was estimated with 5 g of each sample homogenized in 25 mL of distilled water, using a vortex (Branson 2510 ultrasonic cleaner, Branson, USA). Ten mL of the mix were diluted in 100 mL of distilled water and used for titratable acidity determination with 0.1M NaOH and 1% phenolphthalein as an indicator to estimate malic acid content as described (Latimer, 2012).

We used a refractometer (Hannah Instruments, Italy) to obtain the °Brix in 1 mL of sweet cherries juice. Total soluble solids (TSS) were then calculated as described (Boulton et al., 1999).

2.3. Hormone profiling

The plant hormones, including melatonin, ABA, salicylic acid (SA), jasmonic acid (JA), the auxin indole-3-acetic acid (IAA), the cytokinins *trans*-zeatin (*t*-Z), its riboside (*t*-ZR) and isopentenyl adenosine (IPA), and the gibberellins GA₁, GA₃, GA₄ and GA₇, were extracted and quantified by UHPLC/ESI-MS/MS as described (Müller and Munné-Bosch, 2011). Deuterium-labelled compounds were used as internal standards.

2.4. Statistical analyses

Data from the fruit ripening process on the tree and its quality were analysed by one-way factorial analysis of variance (ANOVA), while the effects of the exogenous treatments were analysed by two-way ANOVAs. Multiple comparisons tests were carried out using Tukey's HSD posthoc tests. Differences were considered significant at a probability level of $P < 0.05$. All statistical tests and Spearman correlations were carried out using the SPSS 20.0 statistical package. In all cases, differences or correlations were considered significant at a probability level of $P < 0.05$.

3. Results and discussion

3.1. Melatonin contents in ripe cherries

A growing number of studies describe various techniques to detect melatonin in a large variety of vegetables, seeds, herbs and fruits (Reiter et al., 2007), as melatonin is found in different plant families, such as the *Rosaceae*, to which sweet cherries belong to. Supplementary Table 1, which includes a summary of melatonin contents found in various sweet cherry varieties at harvest, shows melatonin ranging between non-detectable values and 20 ng/g fresh matter, depending on the variety, method of extraction and analytical procedure. Among the various separation techniques used thus far, LC-MS methods appear to be the most accurate for identification of this compound, giving as well high sensitivity and specificity (Feng et al., 2014). Irrespective of the varietal and methodological differences, all studies suggest that melatonin is found at relatively low contents in sweet cherries, which is more likely associated with a hormonal than an antioxidant role (Arnao and Hernández-Ruiz, 2018). However, more studies are needed to unravel the tissue-specific distribution of melatonin in sweet cherries, since bulk melatonin contents in the fruit may hinder high concentrations of this compound in specific tissues.

3.2. Endogenous melatonin contents decrease during sweet cherries ripening

The ripening process involves some characteristic physiological and biochemical changes in fruits, as well as changes in their organoleptic properties. In the present study, a progressive increase of the fruit mass was observed during fruit development from stage I to stage VII over the two seasons studied during 2015 and 2016 (Suppl. Fig. 2). Anthocyanin content showed a similar trend between both years of study, with an exponential increase between stages IV and VII, reaching maximum amounts of 0.5 mg/g DW and 0.8 mg/g DW (during 2015 and

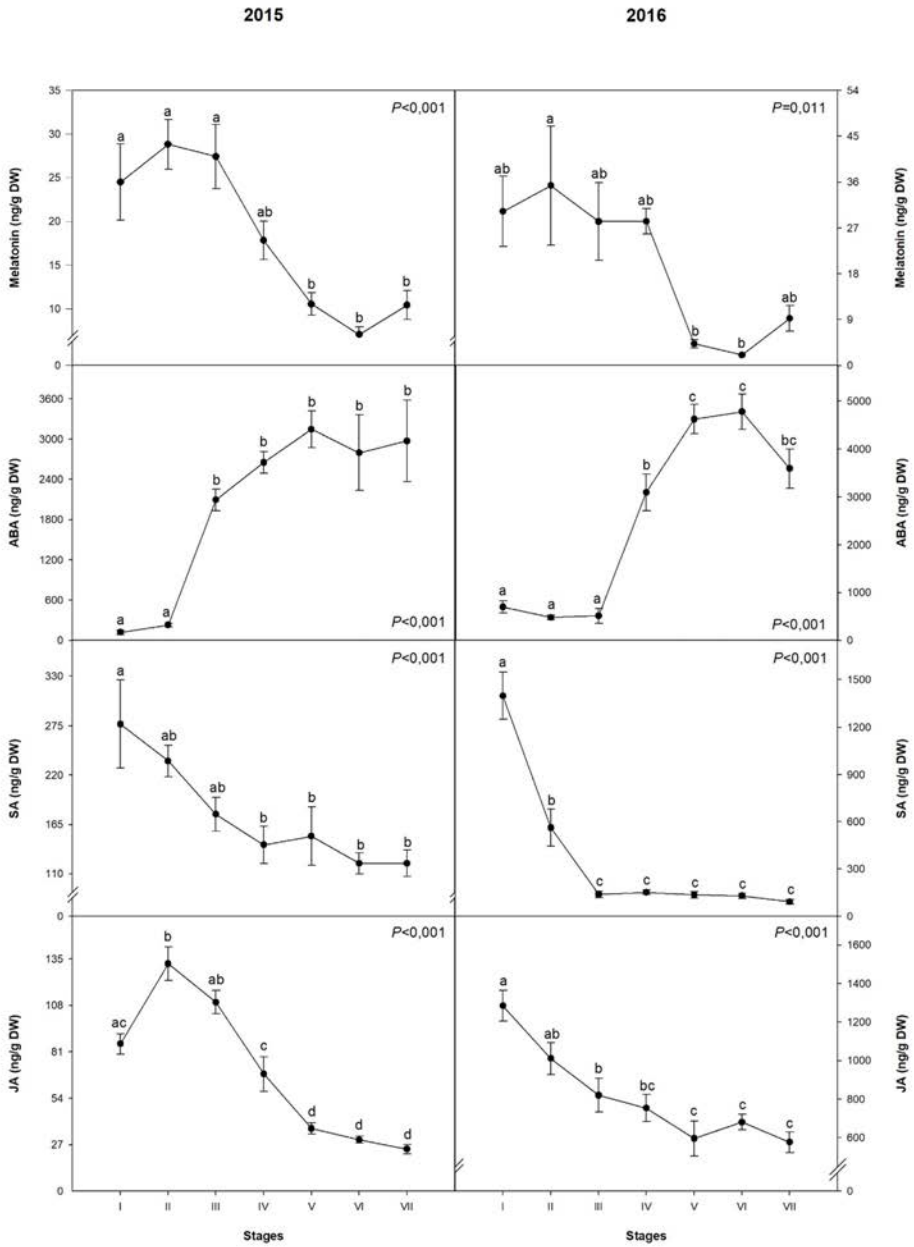


Fig. 1. Melatonin, abscisic acid (ABA), salicylic acid (SA) and jasmonic acid (JA) content during natural fruit development over two consecutive seasons (during 2015 and 2016). Data are the mean \pm SE of $n = 8$. Statistical comparisons were performed by one-way ANOVA followed by a posthoc Tukey test. Different letters indicate significant differences between stages at $P < 0.05$.

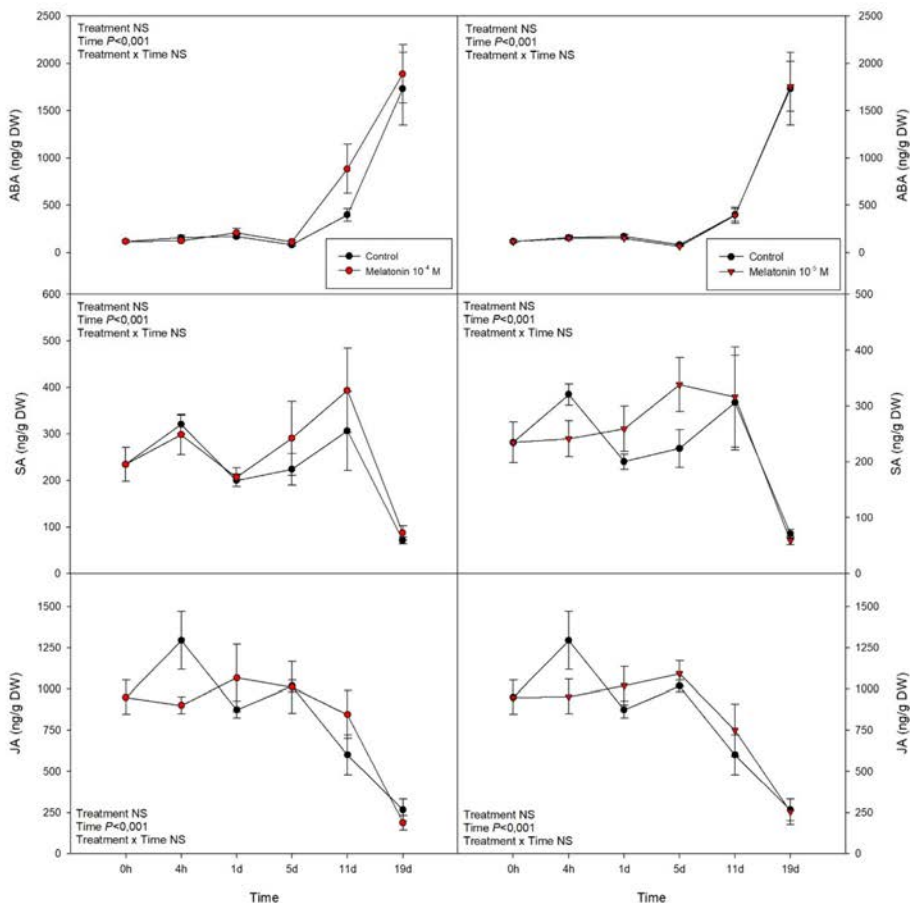


Fig. 2. Effects of melatonin treatments on the endogenous contents of abscisic acid (ABA), salicylic acid (SA) and jasmonic acid (JA). Melatonin was applied at either 10^{-4} M or 10^{-5} M and compared to a control, and hormones were measured at 0 h (before treatments) and at 4 h, 1 d, 5 d, 11 d and 19 d of treatments. Data are the mean \pm SE of $n = 8$. Statistical comparisons were performed by two-way ANOVAs followed by a posthoc Tukey test. Results of statistics are shown in the inlets. Differences were considered significant when $P \leq 0.05$. NS, not significant.

2016, respectively, when cherries were ready to harvest, *Suppl. Fig. 2*). This is in agreement with other studies in sweet cherry revealing that anthocyanins start to accumulate at the onset of the ripening process (Luo et al., 2013).

ABA is a well-known ripening promoter, not only in sweet cherries but also in different non-climacteric fruits such as strawberries or grapes, being involved in colour modulation (through the regulation of anthocyanin biosynthesis) and sugar accumulation (at the onset of fruit ripening, Kumar et al., 2014; Wang et al., 2015). In contrast, very little is known about the putative role of melatonin during fruit ripening on the tree, and how the endogenous contents of melatonin are altered by the fruit developmental stage in sweet cherries, except for a study using HPLC showing that melatonin contents inversely correlated with malondialdehyde amounts in two varieties (Zhao et al., 2012). Our results showed that endogenous melatonin decreased during fruit ripening in sweet cherries, obtaining similar results between the two consecutive

seasons studied (Fig. 1). Melatonin contents reached their maximum, while ABA contents remained at their lowest at early stages of development. Later on development, ABA contents increased sharply at the start of ripening, while melatonin contents decreased (Fig. 1). This increment of ABA started just before anthocyanins accumulated in sweet cherries (*Suppl. Fig. 2*), which is in accordance with several studies pointing out ABA as a key phytohormone in non-climacteric fruit ripening (Shen et al., 2014). Other studies have shown that various hormones, such as CKs, GAs and auxins, in addition to ABA, are indeed involved in the modulation of fruit ripening in sweet cherries (Teribia et al., 2016). In the present study, results suggest that melatonin should be added to this group of endogenous regulators, results being consistent with an inhibitory role for this compound in fruit ripening. Variations in the endogenous contents of SA and JA were compared to those of melatonin, showing a contrasting dynamic, with a drastic decrease of melatonin content from maximum levels at stage I of sweet

cherry development, to minimum levels at stage VII, when cherry fruits were ready to harvest (Fig. 1). Although JA and SA are commonly associated with plant defence responses, these hormones affect the ripening by inhibiting or delaying this process (Ziosi et al., 2008; Wang and Zheng, 2005; Garrido-Bigotes et al., 2017). JA is known as a promoter of cell division and fruit set at the first developmental stages in grapevine (Böttcher et al., 2015), while SA has an important role delaying sweet cherry ripening as a postharvest treatment (Valero et al., 2011). Similar to JA and SA, melatonin was found at high concentration during the first stages of development, being constant until stage III during 2015, and stage IV during 2016, to decrease later as ripening progressed (Fig. 1). This result supports the contention of an inhibitory role of melatonin during sweet cherries ripening, as melatonin remained higher during the first stages of development until the onset of ripening, when it started to drop to minimum levels, as it happens with JA and SA. These results are indicative of the fact that a delicate hormonal balance is needed to modulate sweet cherries ripening, as melatonin, JA and SA are kept at low levels, while ABA contents increase to start the ripening process.

3.3. Exogenous melatonin effects

To confirm the putative role of melatonin as an inhibitor of fruit ripening on the tree, the effects of melatonin treatments were evaluated using two different melatonin concentrations at 10^{-4} M and 10^{-5} M, which were compared to a control (treated with water), all of them applied on the surface of fruits at stage II. A huge increase in the endogenous melatonin content was observed 4 h after 10^{-4} M treatment was applied (Fig. 3). Endogenous melatonin increases were more moderate after applying the 10^{-5} M treatment, not as sharp as 10^{-4} M treatment, but significantly different after 1d relative to controls (Fig. 3). After reaching a maximum after treatments, endogenous melatonin contents progressively decreased in sweet cherries, reaching similar values as the control treatment by the end of the experiment (Fig. 3).

Cherry fruit quality was assessed to evaluate the effects of exogenous melatonin treatments. Table 1 shows the results of fruit mass, anthocyanin contents, TA, TSS and the TSS/TA ratio at 11d and 19d of treatments. No significant differences were observed between treatments for fruit biomass, TSS and the TSS/TA ratio. However, sweet cherries treated with melatonin at 10^{-4} M presented higher levels of TA. In addition, results showed a lower accumulation of anthocyanin in cherry fruits treated with 10^{-5} M melatonin (Table 1). Given that melatonin has an indole-based structure and is considered a plant growth regulator similar to auxins (Arnao and Hernández-Ruiz, 2006, 2018), our results confirm melatonin may play an inhibitory role of fruit ripening, as indicated by reduced anthocyanin contents when melatonin was applied at low concentrations. Interestingly, this effect was not observed when applied at higher concentrations. In contrast, huge increases in endogenous melatonin, as a result of the melatonin application at 10^{-5} M, resulted in significant changes in TA but not in anthocyanins.

3.4. Hormone cross-talk

A complete phytohormone profiling was carried out after exogenous melatonin applications to better understand the possible effects of melatonin treatments during the hormonal regulation of cherry fruits ripening. While melatonin did not affect endogenous ABA, JA and SA contents (Fig. 2), the endogenous amounts of GAs (Suppl. Fig. 3) and cytokinins (Fig. 4) were strongly, and differentially, influenced by melatonin treatments, depending on the concentration applied. Results of GA₁, GA₃, GA₄ and GA₇ showed no significant differences between sweet cherry fruits treated with 10^{-5} M and fruits treated with control solution (Suppl. Fig. 3). However, fruits treated with 10^{-4} M melatonin showed significant differences for GA₁, GA₃ and GA₇ compared to

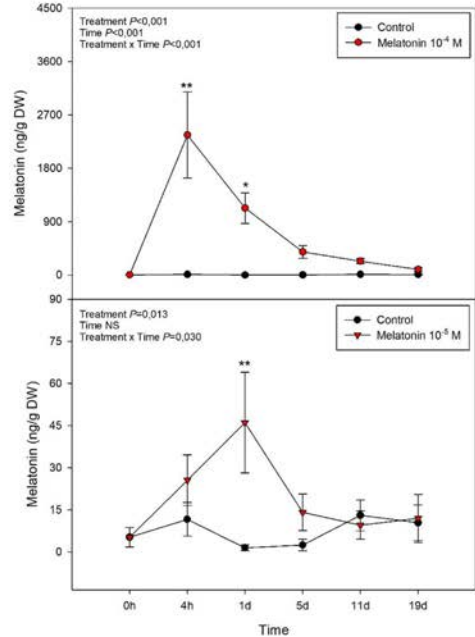


Fig. 3. Endogenous melatonin contents after melatonin applications at either 10^{-4} M or 10^{-5} M relative to controls. Measurements were performed at 0 h (just before treatments) and 4 h, 1d, 5d, 11d and 19d of treatments. Data are the mean \pm SE of $n = 8$. Statistical comparisons were performed by two-way ANOVAs followed by a posthoc Tukey test. Results of statistics are shown in the inlets. Two asterisks indicate significant differences at $P \leq 0,001$ (one asterisk at $P < 0,05$) in the posthoc test. NS, not significant.

controls (Suppl. Fig. 3). Endogenous contents of GA₁ after 4 h of 10^{-4} M treatment were higher than the control, and remained constant throughout the entire experiment. Contrary to GA₁, cherries treated with 10^{-4} M presented lower levels of GA₃ and GA₇ compared to the control treatment (Suppl. Fig. 3). Some studies suggest that GAs may act as a signal to increase sink demand in fruits, stimulating fruit growth and sugar accumulation, thus leading to changes in carbon metabolism (Zhang et al., 2007). Although fruit biomass was not affected in our study, we observed an increase in TA with 10^{-4} M melatonin (Table 1), suggesting that changes in GAs might be associated with the TA increase. It is noteworthy, however, that huge (non-physiological) endogenous contents of melatonin resulted from 10^{-4} M melatonin treatments, thus indicating that the changes in TA caused by this melatonin treatment do not reflect indeed any physiological relevant effect.

In contrast, endogenous cytokinin, particularly zeatin contents, were altered with the 10^{-5} M melatonin treatment, achieving maximum values of 27 ng/g DW at 24 h of treatment, to later decrease drastically after 5d ($P = 0.013$ for the interaction effect in the two-way ANOVA, Fig. 4). At the onset of ripening, there is a dramatic fruit colour change, so that green fruit turns into a dark red colour by the accumulation of anthocyanins, while chlorophylls start its degradation and chloroplasts are dismantled (Muñoz and Munné-Bosch, 2018). Melatonin-induced cytokinin increases might lead to a delay in sweet cherries ripening, causing a lower anthocyanin accumulation after 19d

Table 1
Sweet cherries quality parameters at 11 and 19 days of treatments. Data are the mean of n = 8. An asterisk indicates significant difference between the melatonin and control treatments (Student's t-test, P ≤ 0,05).

Quality parameters	11 days			19 days		
	Control	10 ⁻⁴ M	10 ⁻⁵ M	Control	10 ⁻⁴ M	10 ⁻⁵ M
Fruit biomass (g FW)	6,28 ± 0,44	6,19 ± 0,43	6,21 ± 0,29	8,82 ± 0,52	8,74 ± 0,59	9,62 ± 0,52
Anthocyanins (µg/g DW)	19,87 ± 5,92	15,04 ± 2,75	15,01 ± 3,04	77,70 ± 7,70	155,99 ± 49,23	34,28 ± 11,57*
TA (mg/g DW)	5,97 ± 0,16	6,69 ± 0,30*	5,98 ± 0,21	5,41 ± 0,42	6,56 ± 0,21*	5,46 ± 0,26
TSS (mg/g DW)	9,87 ± 0,91	11,12 ± 0,73	9,27 ± 0,29	9,41 ± 0,38	10,49 ± 0,60	8,36 ± 0,42
TSS/TA ratio	1,65 ± 0,14	1,68 ± 0,12	1,55 ± 0,05	1,75 ± 0,07	1,60 ± 0,09	1,53 ± 0,08

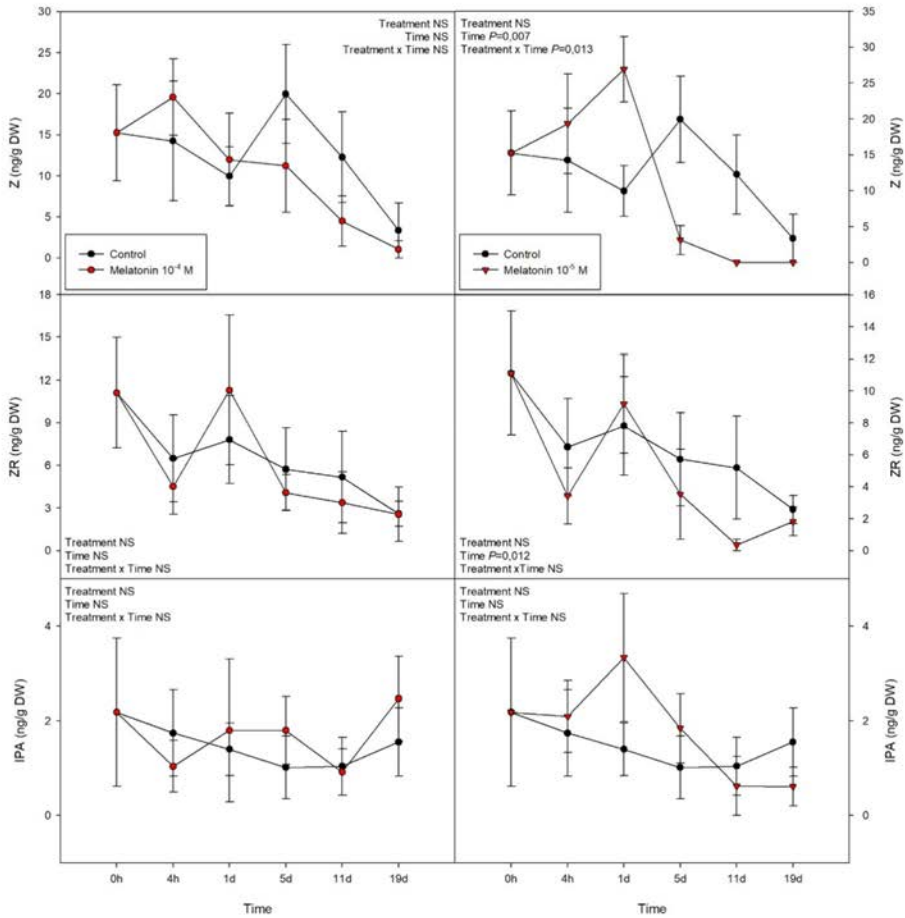


Fig. 4. Effects of melatonin treatments on the endogenous contents of cytokinins, including *trans*-zeatin (Z), *trans*-zeatin riboside (ZR) and isopentenyl adenosine (IPA). Melatonin was applied at either 10⁻⁴ M or 10⁻⁵ M and compared to a control, and hormones were measured at 0 h (before treatments) and at 4 h, 1d, 5d, 11d and 19d of treatments. Data are the mean ± SE of n = 8. Statistical comparisons were performed by two-way ANOVAs followed by a posthoc Tukey test. Results of statistics are shown in the inlets. Differences were considered significant when P ≤ 0.05. NS, not significant.

of application (Table 1). Indeed, a strong correlation between endogenous melatonin and zeatin was observed when all data were pooled together in a correlation analysis (Suppl. Fig. 4). Interestingly, the positive correlation between melatonin and cytokinins has also been observed in other studies (Arnao and Hernández-Ruiz, 2009; Ma et al., 2018), evidence obtained thus far therefore indicating that melatonin effects on fruit ripening might be exerted, at least in part, through a cross-talk with cytokinins in sweet cherries. It is noteworthy, however, that posthoc analyses did not reveal differences in zeatin contents in any time point of measurement after exogenous melatonin treatments (Fig. 4), thus indicating that the strong inter-individual variability in the field might be partly masking the putative melatonin-cytokinin interaction. Interestingly, as it occurred with ABA, endogenous contents of auxin were not influenced by melatonin treatments (Suppl. Fig. 5), thus suggesting that melatonin effects on fruit ripening may be more related to cytokinins than to auxin and ABA in sweet cherries.

4. Conclusions

The ripening of non-climacteric fruits has been classically considered to be mainly regulated by ABA, which is involved in the accumulation of anthocyanins and sugars, and also partly by auxin, with an inhibitory effect on ripening. Results obtained in the present study suggest that melatonin may add to the compounds involved in the control of the hormonal balance exerting a role on the control of the timing of fruit ripening. Endogenous melatonin showed the same dynamics as JA and SA, hormones that inhibit or delay ripening together with auxin and cytokinins. In contrast, ABA increases may trigger sweet cherry ripening. In addition, results from our experiments with exogenous melatonin support a delaying effect for melatonin in fruit ripening, melatonin applied at low concentration possibly exerting an inhibitory role on fruit ripening through a cross-talk with cytokinins. As melatonin is a non-harmful compound, our results have an important implication in the agri-food biotechnology sector since melatonin applications could be used to modulate the timing of sweet cherries ripening. Our results support the contention that endogenous melatonin may be present at low concentration in sweet cherries while ABA promotes fruit ripening, whereas exogenous melatonin can be applied at initial stages of development to delay fruit ripening in orchard trees. The effectiveness of these applications will however be notably influenced by the concentration of melatonin applied, among other possible factors. Yet, further research is required to better understand the underlying mechanisms governing the role of melatonin in sweet cherries ripening.

Acknowledgments

This study was funded by the prize ICREA Academia awarded to SM-B by the Generalitat de Catalunya. We are very grateful to Serveis Científic-Tècnics of the University of Barcelona for technical assistance. PM holds a FPI predoctoral fellowship from the Spanish Government. The founding sources had no involvement in the conduct of this research and/or preparation of this article.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.05.007>.

Author Contribution

SMB designed the experiments with the help of VT and PM. VT and PM performed the experiments. VT prepared figures and performed statistical analyses. VT wrote the manuscript with the help of SMB. All authors approved final submission.

References

- Arnao, M.B., Hernández-Ruiz, J., 2006. The physiological function of melatonin in plants. *Plant Signal. Behav.* 1, 89–95.
- Arnao, M.B., Hernández-Ruiz, J., 2009. Protective effects of melatonin against chlorophyll degradation during the senescence of barley leaves. *J. Pineal Res.* 46, 58–63.
- Arnao, M.B., Hernández-Ruiz, J., 2018. Melatonin and its relationship to plant hormones. *Ann. Bot.* 121, 195–207.
- Böttcher, C., Burbidge, C.A., di Rienzo, V., et al., 2015. Jasmonic acid-isoleucine formation in grapevine (*Vitisvinifera* L.) by two enzymes with distinct transcription profiles. *J. Integr. Plant Biol.* 57, 618–627.
- Boulton, R.B., Singleton, V.L., Bisson, L.F., Kunkee, R.E., 1999. Principles and Practices of Winemaking, first ed. Springer, New York, N.Y., USA.
- Castellarin, S.D., Gambetta, G.A., Wada, H., Krasnow, M.N., Cramer, G.R., Peterlunger, E., et al., 2016. Characterization of major ripening events during softening in grape: turgor, sugar accumulation, abscisic acid metabolism, colour development, and their relationship with growth. *J. Exp. Bot.* 67, 709–722.
- Chai, Y.M., Jia, H.F., Li, C.L., Dong, Q.H., Shen, Y.Y., 2011. *FaPYR1* is involved in strawberry fruit ripening. *J. Exp. Bot.* 62, 5079–5089.
- Chen, Q., Qi, W., Li, M., Wei, W., 2008. Melatonin in plants: Content, method and function. *Chin. J. Appl. Environ. Biol.* 14, 126–131.
- Deytoux, C., Geny, L., Doneche, B., 2005. Relation between hormonal balance and polygalacturonase activity in grape berry. *Acta Hort.* (Wageningen.) 682, 163–170.
- Feng, X., Wang, M., Zhao, Y., Han, P., Dai, Y., 2014. Melatonin from different fruit sources, functional roles, and analytical methods. *Trends Food Sci. Technol.* 37, 21–31.
- Garrido-Bigotes, A., Figueroa, P.M., Figueroa, C.R., 2017. Jasmonates metabolism and its relationship with abscisic acid during strawberry fruit development and ripening. *J. Plant Growth Regul.* 1–13.
- Giovannoni, J.J., 2004. Genetic regulation of fruit development and ripening. *Plant Cell* 16, S170–S180.
- Gitelson, A.A., Merzlyak, M.N., Chivkunova, O.B., 2001. Optical properties and non-destructive estimation of anthocyanin content in plant leaves. *Photochem. Photobiol.* 74, 38–45.
- Hu, W., Yang, H., Tie, W., et al., 2017. Natural variation in banana varieties highlights the role of melatonin in postharvest ripening and quality. *J. Agric. Food Chem.* 65, 9987–9994.
- Jia, H.F., Chai, Y.M., Li, C.L., Lu, D.L., Luo, J.J., Qin, L., Shen, Y.Y., 2011. Abscisic acid plays an important role in the regulation of strawberry fruit ripening. *Plant Physiol.* 157, 188–199.
- Kondo, S., Gemma, H., 1993. Relationship between abscisic acid (ABA) content and maturation of the sweet cherry. *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.* 62, 63–68.
- Kondo, S., Inoue, K., 1997. Abscisic acid (ABA) and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) content during growth of 'Satohishiki' cherry fruit, and the effect of ABA and ethephon application on fruit quality. *J. Hortic. Sci.* 72, 221–227.
- Kumar, R., Khurana, A., Sharma, A.K., 2014. Role of plant hormones and their interplay in development and the ripening of fleshy fruits. *J. Exp. Bot.* 16, 4561–4575.
- Latimer, D.W., 2012. Official Methods of Analysis of AOAC International, nineteenth ed. AOAC International, Rockville, MD, USA.
- Lenahan, O.M., Whiting, M.D., Elfving, D.C., 2006. Gibberellic acid inhibits floral bud induction and improves Bing sweet cherry fruit quality. *Hortic. Sci.* 41, 654–659.
- Luo, H., Dai, S.J., Ren, J., Zhang, C.X., Ding, Y., Li, Z., et al., 2013. The role of ABA in the maturation and post-harvest life of a non-climacteric sweet cherry fruit. *J. Plant Growth Regul.* 33, 373–383.
- Ma, X., Zhang, J., Burgess, P., Rossi, S., Huang, B., 2018. Interactive effects of melatonin and cytokinins on alleviating drought-induced leaf senescence in creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera*). *Environ. Exp. Bot.* 145, 1–11.
- Meng, J.F., Xu, T.F., Song, C.Z., Yu, Y., Hu, F., Zhang, L., Zhang, Z.W., Xi, Z.M., 2015. Melatonin treatment of pre-veraison grape berries to increase size and synchronicity of berries and modify wine aroma components. *Food Chem.* 185, 127–134.
- Müller, M., Munné-Bosch, S., 2011. Rapid and sensitive hormonal profiling of complex plant samples by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Plant Methods* 7, 37.
- Muñoz, P., Munné-Bosch, S., 2018. Photo-oxidative stress during leaf, flower and fruit development. *Plant Physiol.* 176, 1004–1014.
- Nawaz, M.A., Huang, Y., Bie, Z., Ahmed, W., Reiter, R.J., Niu, M., Hameed, S., 2016. Melatonin: current status and future perspectives on plant science. *Front. Plant Sci.* 6, 1230.
- Reiter, R.J., Tan, D., Manchester, L.C., Simopoulos, A.P., Maldonado, M.D., Flores, L.J., Terron, M.P., 2007. Melatonin in edible plants (phytomelatonin): identification, concentrations, bioavailability and proposed functions. *World Rev. Nutr. Diet.* 97, 211–230.
- Shen, X., Zhao, K., Liu, L., Zhang, K., Yuan, H., Liao, X., Wang, Q., Guo, X., Li, F., Li, T., 2014. A role for *PacMYBA* in ABA-regulated anthocyanin biosynthesis in red-colored sweet cherry cv. Hong Deng (*Prunus avium* L.). *Plant Cell Physiol.* 55, 862–880.
- Sun, Q., Zhang, N., Wang, J., Zhang, H., Li, D., Shi, J., et al., 2015. Melatonin promotes ripening and improves quality of tomato fruit during postharvest life. *J. Exp. Bot.* 66, 657–668.
- Sun, Q., Zhang, N., Wang, J., Cao, Y., Li, X., Zhang, H., et al., 2016. A label-free differential proteomics analysis reveals the effect of melatonin on promoting fruit ripening and anthocyanin accumulation upon postharvest in tomato. *J. Pineal Res.* 61, 138–156.
- Symons, G.M., Chua, Y.J., Ross, J.J., Quittenden, L.J., Davies, N.M., Reid, J.B., 2012. Hormonal changes during non-climacteric ripening in strawberry. *J. Exp. Bot.* 63, 4741–4750.

- Teribia, N., Tijero, V., Munné-Bosch, S., 2016. Linking hormonal profiles with variations in sugar and anthocyanin contents during the natural development and ripening of sweet cherries. *N. Biotech.* 33, 824–833.
- Tijero, V., Teribia, N., Muñoz, P., Munné-Bosch, S., 2016. Implication of abscisic acid on ripening and quality in sweet cherries: differential Effects during pre- and post-harvest. *Front. Plant Sci.* 7, 602.
- Valero, D., Díaz-Mula, H.M., Zapata, P.J., Castillo, S., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Serrano, M., 2011. Postharvest treatments with salicylic acid, acetylsalicylic acid or oxalic acid delayed ripening and enhanced bioactive compounds and antioxidant capacity in sweet cherry. *J. Agric. Food Chem.* 59, 5483–5489.
- Vitalini, S., Gardana, C., Zanzotto, A., Simonetti, P., Faoro, F., Fico, G., et al., 2011. The presence of melatonin in grapevine (*Vitis vinifera* L.) berry tissues. *J. Pineal Res.* 55, 424–434.
- Wang, S.Y., Zheng, W., 2005. Preharvest application of methyl jasmonate increases fruit quality and antioxidant capacity in raspberries. *Int. J. Food Sci. Technol.* 40, 187–195.
- Wang, Y., Chen, P., Sun, L., Li, Q., Dai, S., Sun, Y., et al., 2015. Transcriptional regulation of *PapYLS*, *PaPP2Cs* and *PaSnRK2s* during sweet cherry fruit development and in response to abscisic acid and auxin at onset of fruit ripening. *J. Plant Growth Regul.* 75, 455–464.
- Xu, L., Yue, Q., Xiang, G., Bian, F., Yao, Y., 2007. Melatonin promotes ripening of grape berry via increasing the levels of ABA, H₂O₂, and particularly ethylene. *Hortic. Res.* 5, 41.
- Zhai, R., Liu, J., Liu, F., Zhao, Y., Liu, L., et al., 2007. Melatonin limited ethylene production, softening and reduced physiology disorder in pear (*Pyrus communis* L.) fruit during senescence. *Postharvest Biol. Technol.* 139, 38–46.
- Zhang, C., Whiting, M., 2013. Plant growth regulators improve sweet cherry fruit quality without reducing endocarp growth. *Sci. Hortic.* 150, 73–79.
- Zhang, C., Tanabe, K., Tamura, F., Itai, A., Yoshida, M., 2007. Roles of gibberellins in increasing sink demand in Japanese pear fruit during rapid fruit growth. *Plant Growth Regul.* 52, 161–172.
- Zhao, Y., Tan, D.X., Lei, Q., Chen, H., Wang, L., Li, Q., Gao, Y., Kong, J., 2012. Melatonin and its potential biological functions in the fruits of sweet cherry. *J. Pineal Res.* 55, 79–88.
- Ziosi, V., Bonghi, C., Bregoli, A.M., Trainotti, L., Biondi, S., Sutthiwal, S., Kondo, S., Costa, G., Torrigiani, P., 2008. Jasmonates-induced transcriptional changes suggest a negative interference with the ripening syndrome in peach fruit. *J. Exp. Bot.* 59, 563–573.

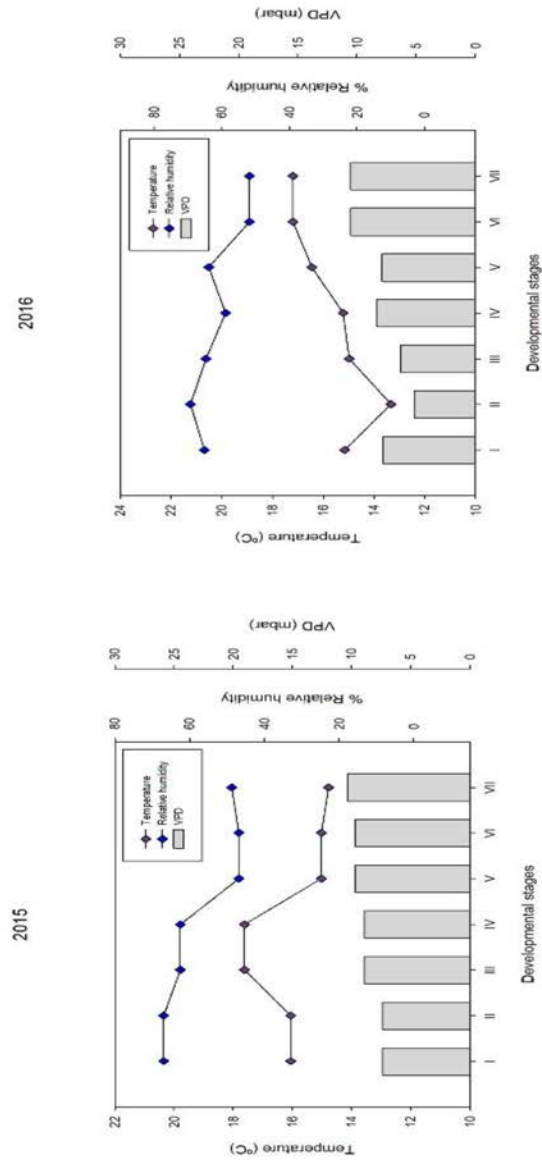
Supplementary material

Supplementary Table 1. Melatonin concentration in several sweet cherry varieties, showing different extraction and analytical methods. Data are the mean of each variety at the ripe stage.

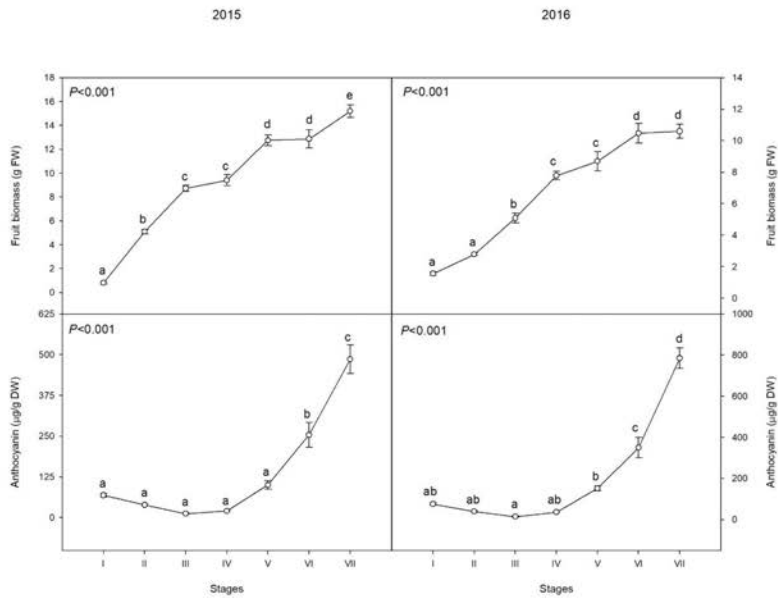
Variety	Concentration (ng/g FW)	Extraction method	Analytical method
Ambrunés ^a	0,00		
Pico Colorado ^a	0,05	0,05M phosphate buffer (pH 8,0); chloroform and 0,1M KOH, with an organic phase separation	HPLC/ESI-MS quadrupole, SIM mode (Agilent 1100)
Pico Negro ^a	0,16		
Sweetheart ^a	0,06		
Hongdeng ^b	~10		
Rainier ^b	~20	Methanol, with an extract purification in a C18 SPE cartridge (Waters)	HPLC with fluorescence detector (Agilent 1100)
Prime Giant ^c	1,43	Methanol:isopropanol:acetic acid (50:49:1, v/v/v), using deuterium labeled internal standards	UHPLC/ESI-MS/MS triple quadrupole, in MRM mode (Waters)

^a González-Gómez *et al.*, 2009; ^bZhao *et al.*, 2013; ^cThis study

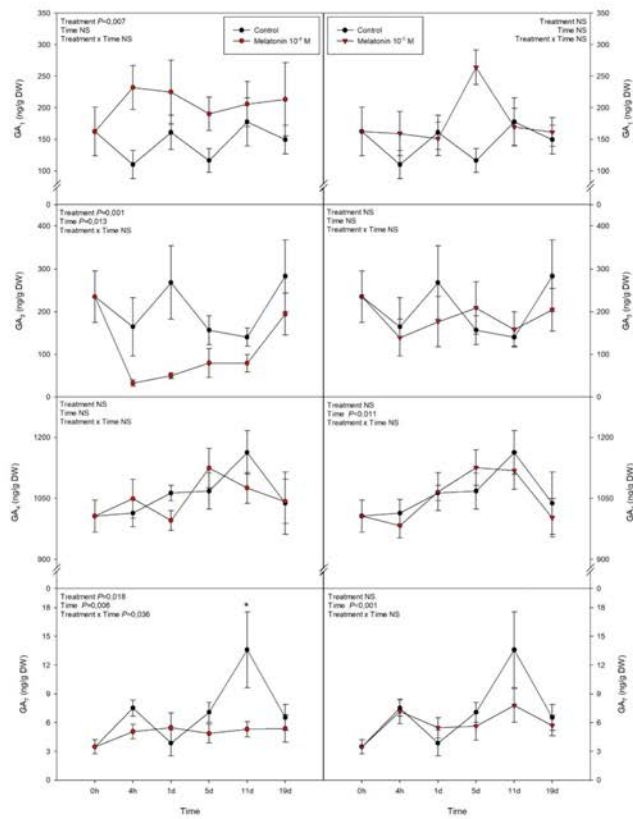
Supplementary Fig 1. Climatologic conditions at different stages of sweet cherries development and ripening. Temperature, % relative humidity and vapour pressure deficit (VPD) are the means of each harvest day, between 2015 and 2016 spring-time.



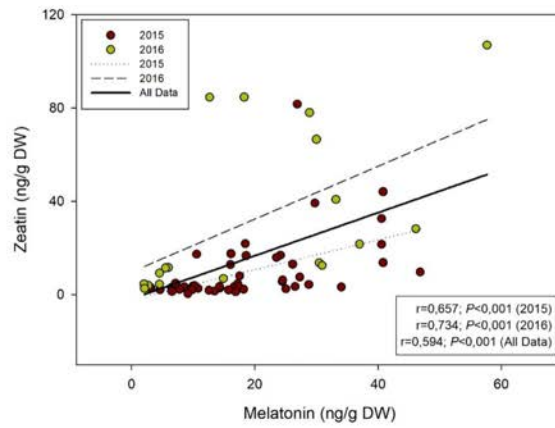
Supplementary Fig 2. Fruit biomass and anthocyanin contents during cherry fruit natural development over two years (2015 and 2016). Data are the mean \pm SE of $n=8$. Statistical comparisons were performed by one-way ANOVA followed by a posthoc Tukey test. Different letters indicate significant differences between the different stages at $P<0.05$. NS, not significant.



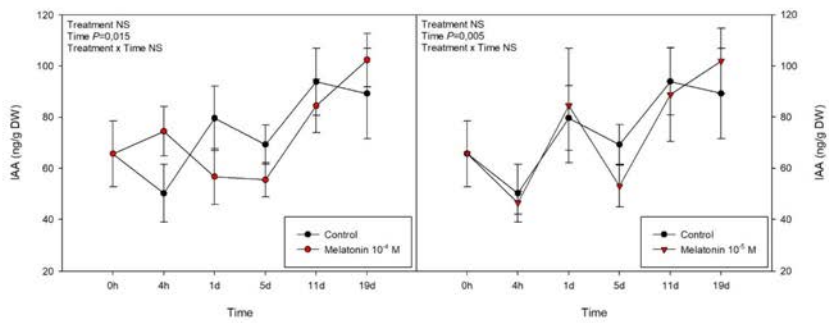
Supplementary Figure 3. Effects of melatonin treatments on the endogenous contents of gibberellins, including GA₁, GA₃, GA₄ and GA₇. Melatonin was applied at either 10⁻⁴M or 10⁻⁵M and compared to a control, and hormones were measured at 0h (before treatments) and at 4h, 1d, 5d, 11d and 19d of treatments. Data are the mean ± SE of n=8. Statistical comparisons were performed by two-way ANOVAs followed by a posthoc Tukey test. Results of statistics are shown in the inlets. Differences were considered significant when $P \leq 0.05$. NS, not significant.



Supplementary Fig. 4. Results of Spearman's rank correlation analyses between endogenous contents of melatonin and those of *trans*-zeatin. Data includes measurements of both years (2015 and 2016). Correlation coefficients and *P*-values are shown in the inlets.



Supplementary Figure 5. Effects of melatonin treatments on the endogenous contents of the auxin indole-3-acetic acid (IAA). Melatonin was applied at either 10^{-4} M or 10^{-5} M and compared to a control, and hormones were measured at 0h (before treatments) and at 4h, 1d, 5d, 11d and 19d of treatments. Data are the mean \pm SE of $n=8$. Statistical comparisons were performed by two-way ANOVAs followed by a posthoc Tukey test. Results of statistics are shown in the inlets. Differences were considered significant when $P \leq 0.05$. NS, not significant.



Capítulo 4: El perfil hormonal revela un *cross-talk* hormonal durante el deterioro de las cerezas dulces

Chapter 4: Hormonal Profiling Reveals a Hormonal Cross-talk during Fruit Decay in Sweet Cherries

Verónica Tijero, Natalia Teribia, Sergi Munné-Bosch

Departamento de Biología Evolutiva, Ecología y Ciencias Ambientales, Sección de Fisiología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona, Av. Diagonal 643, 08028, Barcelona, España.

Publicado en **Journal of Plant Growth Regulation** (2019) 38, 431-437.

RESUMEN DEL CAPÍTULO 4

Aunque el deterioro del fruto en cerezas se ha estudiado con cierto detalle, la información aún es escasa sobre el posible papel de las fitohormonas durante la poscosecha. En este estudio examinamos si se producen cambios en el contenido endógeno de las fitohormonas durante el deterioro de las cerezas dulces almacenadas a temperatura ambiente. Se evaluó (i) las variaciones endógenas en el contenido de fitohormonas, incluyendo el ácido abscísico, giberelinas, citoquininas, auxinas, ácido jasmónico, ácido salicílico y melatonina, por UHPLC-ESI-MS/MS durante el proceso de deterioro del fruto a temperatura ambiente, y (ii) en qué medida estos cambios en el contenido de fitohormonas se asocian con alteraciones en el contenido de agua, azúcares solubles y acidez. El contenido endógeno de ácido abscísico, citoquininas y giberelinas disminuyeron en paralelo con el deterioro del fruto, lo que sugiere un papel protector por parte de estos compuestos frente a la sobremaduración. Las formas libres de citoquininas (zeatina y 2-isopentenil adenina, en lugar de sus ribósidos) y la giberelina 3 cambiaron en paralelo con el deterioro del fruto. Se concluye que el ácido abscísico, las formas libres de citoquinina y la giberelina 3 podrían prevenir el deterioro de las cerezas dulces durante su almacenamiento a temperatura ambiente.



Hormonal Profiling Reveals a Hormonal Cross-Talk During Fruit Decay in Sweet Cherries

Verónica Tijero¹ · Natalia Teribia¹ · Sergi Munné-Bosch¹

Received: 9 May 2018 / Accepted: 3 August 2018 / Published online: 31 August 2018
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018

Abstract

Although fruit decay in sweet cherries has been studied in some detail, information is still scarce about the possible role of phytohormones during postharvest. Here, we examined whether or not changes in endogenous contents of phytohormones occur during fruit decay of sweet cherries stored at room temperature. We evaluated (i) the endogenous variations in the contents of phytohormones, including abscisic acid, gibberellins, cytokinins, auxin, jasmonic acid, salicylic acid and melatonin, by UHPLC–ESI–MS/MS during fruit decay at room temperature, and (ii) to what extent these changes in phytohormone contents were associated with alterations in water contents, soluble sugars and acidity. Endogenous contents of abscisic acid, cytokinins and gibberellins decreased in parallel with fruit decay, thus suggesting a protective role against over-ripening for these compounds. Among cytokinins and gibberellins, free cytokinin bases (zeatin and 2-isopentenyl adenine, rather than their ribosides), and gibberellin 3, changed in parallel with fruit decay. It is concluded that abscisic acid, free cytokinin bases and gibberellin 3 may prevent fruit decay during storage of sweet cherries at room temperature.

Keywords Acidity · Fruit decay · Hormone profiling · LC–MS/MS · Over-ripening

Introduction

Sweet cherries are highly appreciated by consumers worldwide because of their organoleptic and nutritional properties, especially for their sweetness, skin colour and firmness (Crisosto et al. 2003; Serrano et al. 2005; Usenik et al. 2008). However, sweet cherries are highly perishable and prone to damage after harvest. Many physical and chemical changes occur during fruit decay, leading to both water and acidity loss as well as pedicel browning, which progress concurrently with softening, bad appearance and an increased susceptibility to pathogens (Belge et al. 2014). Thus, many studies are trying to find an adequate postharvest technology to prolong shelf life of sweet cherry, while organoleptic properties, and most particularly sugar and acidity are kept for a longer time until fruits are consumed (reviewed by

McCune et al. 2011; Habib et al. 2015; Chockchaisawasdee et al. 2016; Correia et al. 2017).

Hormonal profiling by liquid or gas chromatography coupled to mass spectrometry has recently become a powerful tool to establish the putative role of hormones in both pre-harvest and postharvest processes in fruits and vegetables (Kumar et al. 2014). In a previous study (Teribia et al. 2016), we showed that a hormonal cross-talk, rather than abscisic acid alone, is involved in the regulation of sweet cherries ripening on the tree. Moreover, ABA seemed to be involved in preventing postharvest decay at low temperatures (Tijero et al. 2016). The purpose of this study was to get some insights on how fruit decay affects the hormonal profile of sweet cherries stored at room temperature and what hormones are more associated with the maintenance of the quality of this non-climacteric fruit, particularly water and acidity loss. Because just after harvest fruits are deprived of their normal supply of water, minerals and organic molecules including hormones, which normally would be supplied by translocation from other plant organs (Ludford 1987), we hypothesized that endogenous contents of not only abscisic acid, but also other hormones, might decrease during fruit decay. By measuring the hormonal profile by LC–MS/MS, we aimed at establishing what hormones specifically

✉ Sergi Munné-Bosch
smunne@ub.edu

¹ Department of Evolutionary Biology, Ecology and Environmental Sciences, Faculty of Biology, University of Barcelona, Avinyuda Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain

decrease during fruit decay and which ones correlated better with water and acidity loss. This information may be very helpful to develop new technologies aimed at increasing postharvest shelf life in sweet cherries.

Materials and Methods

Plant Material and Samplings

Ten kg of sweet cherries (*Prunus avium* L. cv. Prime Giant) from a commercial orchard situated in Lleida (Spain) was brought to the laboratory at the University of Barcelona just after 3 days of commercial harvest during the summer of 2015, when fruits were sold and distributed to commercial suppliers. Then, fruits without visual defects were selected and stored in darkness at 23 ± 2 °C in the laboratory for 1 week during experiments. Samplings were performed at 0 day, 1 day, 3 day, 5 day and 7 day of storage in the laboratory. For each sampling time, six fruits (one fruit per replicate) were selected randomly and immediately frozen separately in liquid nitrogen. All samples were stored at -80 °C until analyses.

Quality Parameters

Sugar analyses were performed by HPLC as described (Teribia et al. 2016). Glucose, fructose and sucrose from Sigma (Steinheim, Germany) were used as standards. Sucrose content was kept below 1% of total soluble sugars throughout the study, and only glucose and fructose contents are shown in the results.

For total acidity measurements, 5 g of sample was homogenized in 25 mL of distilled water using a vortex (Branson 2510 ultrasonic cleaner, Branson, USA). After dilution (1:10, v/v) in distilled water, titratable acidity was determined by using 0.1M NaOH and 1% phenolphthalein (Latimer 2012).

Hormone Profiling

The endogenous contents of hormones, including abscisic acid (ABA), salicylic acid (SA), jasmonic acid (JA), the auxin indole-3-acetic acid (IAA), the cytokinins *trans*-zeatin (*t-Z*), its riboside (*t-ZR*), isopentenyl adenosine (IPA) and 2-isopentenyl adenine (2iP), the gibberellins GA₁, GA₃, GA₄ and GA₇, and melatonin were extracted and quantified

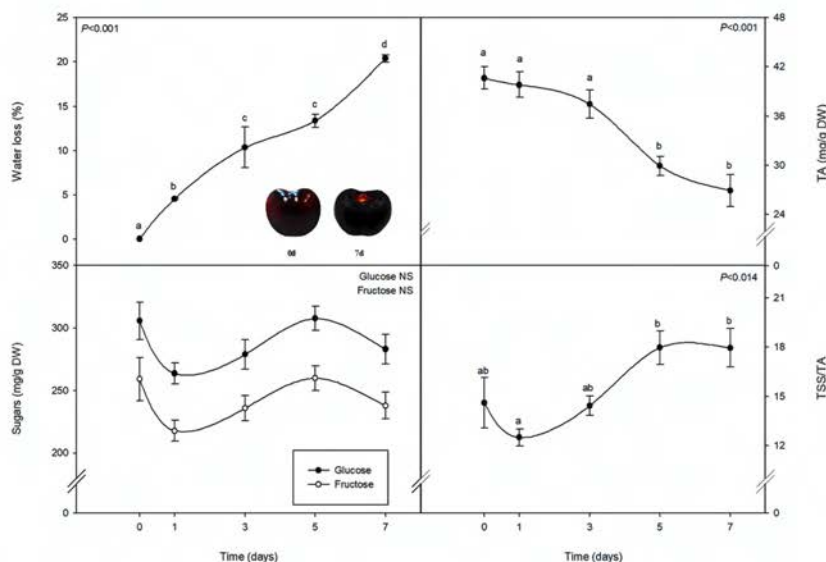


Fig. 1 Water loss (in percentage), sugar (glucose and fructose) contents, total acidity (TA) and total soluble sugars to total acidity (TSS/TA) ratio in sweet cherries stored at room temperature for 7 days. Data are the mean \pm SE of $n=6$. Statistical comparisons were per-

formed by one-way ANOVA followed by a post hoc Tukey test. Different letters indicate significant differences between sampling points at $p \leq 0.05$. NS not significant

by UHPLC/ESI–MS/MS exactly as described (Müller and Munné-Bosch 2011). Deuterium-labelled compounds were used as internal standards for quantification.

Statistical Analysis

All data were analysed by one-way factorial analysis of variance (ANOVA). Multiple comparisons tests were carried out using Tukey's HSD post hoc tests. Differences were considered significant at a probability level of $p \leq 0.05$. All statistical analyses were performed using the SPSS 20.0 statistical package.

Results and Discussion

Fruit Decay of Sweet Cherries at Room Temperature

Sweet cherries red colour, sweet taste and nutritional properties have made them highly demanded among commercial stone fruits. Parameters like sugars and acidity, and most particularly the sugar/acidity ratio, are associated with a high fruit acceptance by consumers (Crisosto et al. 2003). But ripe fruits are predisposed to deteriorate rapidly after their harvest. In our study, a progressive water loss occurred in sweet cherries stored at room temperature, which occurred very early during postharvest. Water loss preceded acidity loss, the latter occurring particularly between 3 days and 5 days of storage (Fig. 1), which corresponds to 6–8 days after harvest. Sugars were kept unaltered during the experiment, which together with the aforementioned acidity loss resulted in a 20% increase in the total soluble sugars (TSS)-to-total acidity (TA) ratio (Fig. 1). Sweet cherries are highly perishable with a limited shelf life of 7–10 days, and in some cases fail to reach the consumer at optimal quality after being transported to the market (Wani et al. 2014). Harvested sweet cherries stored at room temperature usually show a rapid weight loss, changes in the sugar–acid balance, softening, colour changes and stem browning (Kappel et al. 2002; Bernalte et al. 2003; Alique et al. 2005). During postharvest storage at 20 °C for 4 days, “Ambrunés” and “Canada Giant” sweet cherries also showed a decrease in total acidity, whereas soluble sugars were constant (Bernalte et al. 2003; Alique et al. 2005), as it occurred in our study with “Prime Giant”. Are, however, changes in water loss and acidity occurring during storage at room temperature associated to the degradation of specific phytohormones?

Hormonal Profiling

UHPLC–ESI–MS/MS analyses revealed a 72% reduction in the ABA content during fruit decay, losses occurring

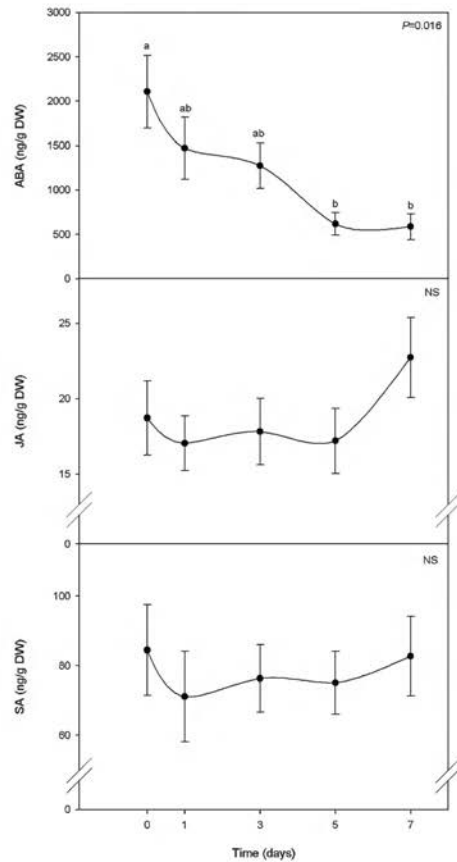


Fig. 2 Endogenous contents of abscisic acid (ABA), salicylic acid (SA) and jasmonic acid (JA) in sweet cherries stored at room temperature for 7 days. Data are the mean \pm SE of $n=6$. Statistical comparisons were performed by one-way ANOVA followed by a post hoc Tukey test. Different letters indicate significant differences between sampling points at $p \leq 0.05$. NS not significant

progressively from the start of the experiment until 5 days of storage. Interestingly, water loss continued to increase in sweet cherries during this latest period (Fig. 1), despite ABA content did not decrease further (Fig. 2). JA and SA contents were not altered throughout fruit decay (Fig. 2), despite SA and MeJA pre- or post-harvest treatments improve the storage life of cherries (Yao and Tian 2005). These results indicate that desiccation, once the fruit is separated from the mother plant, was due at least in part to a rapid and

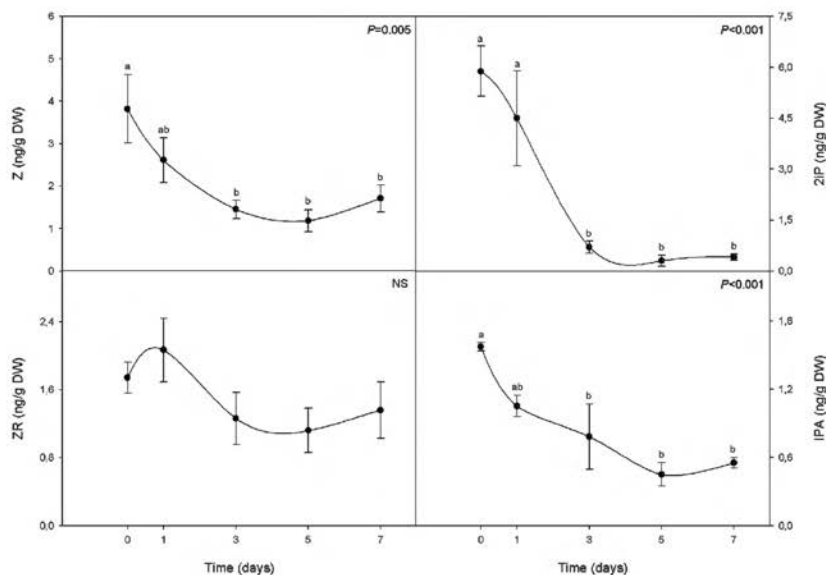


Fig. 3 Endogenous contents of cytokinins, including *trans*-zeatin (Z), *trans*-zeatin riboside (ZR), 2-isopentenyl adenine (ZiP) and isopentenyl adenosine (IPA) in sweet cherries stored at room temperature for 7 days. Data are the mean \pm SE of $n=6$. Statistical comparisons were performed by one-way

ANOVA followed by a post hoc Tukey test. Different letters indicate significant differences between sampling points at $p \leq 0.05$. NS not significant

early degradation of ABA during postharvest, because this hormone has been shown to be involved in the regulation of water loss in sweet cherries and other climacteric fruits (Siriphollakul et al. 2006; Tijero et al. 2016). Furthermore, several proline-rich cell wall proteins involved in cell wall structure are upregulated by ABA treatment (Davies and Robinson 2000). Therefore, a severe loss of ABA in sweet cherries during storage at room temperature may not only lead to a rapid water loss, but also to fruit softening, an aspect that requires further investigation.

t-Zeatin content decreased as fruit decay progressed, from maximum contents at the start of the experiment to minimum values already attained at 3 days of storage. Afterwards, *t*-zeatin content was kept unaltered until the end of the experiment (Fig. 3). 2-Isopentenyl adenine content showed a similar trend to that of *t*-zeatin, but decreases in the former were higher than in the latter (Fig. 3). Cytokinin ribosides, which are less biologically active (Mok and Mok 2001), showed more moderate losses compared to active

ones, to the extreme that *t*-zeatin riboside content was not significantly altered throughout storage (Fig. 3). Aside from changes in ABA content, a severe cytokinin loss may also contribute to fruit decay in sweet cherries. Exogenous application of forchlorfenuron (a cytokinin) in strawberry helped maintain a higher capacity of resistance to stress stimuli after storage, thus preventing fruit decay (Li et al. 2016). Similarly, benzylaminopurine (another synthetic cytokinin) inhibits pectin disassembly and prevents texture deterioration in summer squash (Massolo et al. 2014). Therefore, it is likely that both cytokinin and ABA losses contribute to sweet cherries decay stored at room temperature. The hormone profiling performed in the present study suggests that the cytokinin-mediated effect on fruit decay is most likely associated to a loss of endogenous bioactive, free cytokinin bases, rather than to their ribosides.

Previous studies have shown the importance of gibberellin applications, and most particularly, GA_3 in sweet cherry orchards to regulate both pre- and post-harvest processes. It

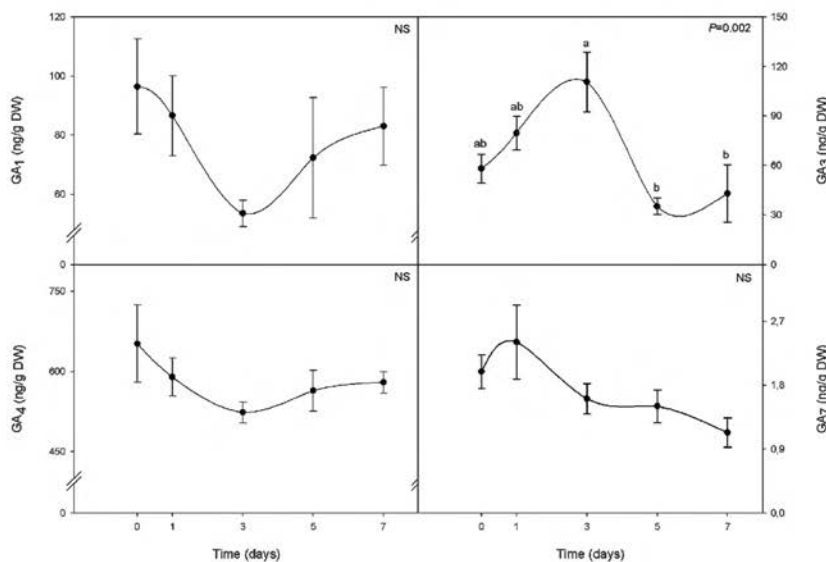


Fig. 4 Endogenous contents of gibberellins (GAs), including GA₁, GA₃, GA₄ and GA₇ in sweet cherries stored at room temperature for 7 days. Data are the mean \pm SE of $n=6$. Statistical comparisons were

performed by one-way ANOVA followed by a post hoc Tukey test. Different letters indicate significant differences between sampling points at $p \leq 0.05$. *NS* not significant

has been demonstrated that preharvest applications of GA₃ increase fruit firmness and reduce pitting susceptibility in ‘Lapins’ and ‘Sweetheart’ (Wang and Einhorn 2017), and delay red colour development in ‘Ziraat’, ‘Regina’ and ‘Sweetheart’ (Ozkan et al. 2016), while it also limits stem browning after cold storage for ‘Lapins’ and ‘Sweetheart’ (Wang and Einhorn 2017). Bioactive gibberellin (GA₁, GA₃, GA₄ and GA₇) contents showed a contrasting variation pattern between them, with GA₃ being the only one showing significant decreases over time (Fig. 4). Interestingly, GA₃ decreased between 3 days and 5 days of storage, which contrasts the variation observed for ABA and cytokinins, which decreased earlier in time (Figs. 2, 3). It is interesting to note that acidity loss was significant during this period only (between 3 days and 5 days of storage at room temperature), thus suggesting GA₃ may have a role in fruit decay at later stages, particularly coincident with acidity loss. Preharvest

GA₃-treated fruits had a greater concentration of titratable acidity at final harvest in ‘Merpet’, ‘Celeste’ and ‘Lapins’ (Choi et al. 2002) and improved postharvest fruit quality, especially firmness, in ‘Bing’ (Koyuncu et al. 2008). In contrast to ABA, cytokinins and GA₃, auxin and melatonin contents remained constant throughout the experiment (Fig. 5).

It is concluded that hormone profiling by LC–MS/MS is a useful tool to establish the role of specific phytohormones in fruit decay, which has important implications in the study of fruit postharvest processes. Endogenous contents of ABA, cytokinins and gibberellins decreased as fruit decay progressed in sweet cherries, thus suggesting a protective role for these compounds against over-ripening. Among cytokinins and gibberellins, free cytokinin bases (zeatin and 2-isopentenyl adenine, rather than their ribosides), and gibberellin 3, appeared to have a specific role in fruit decay.

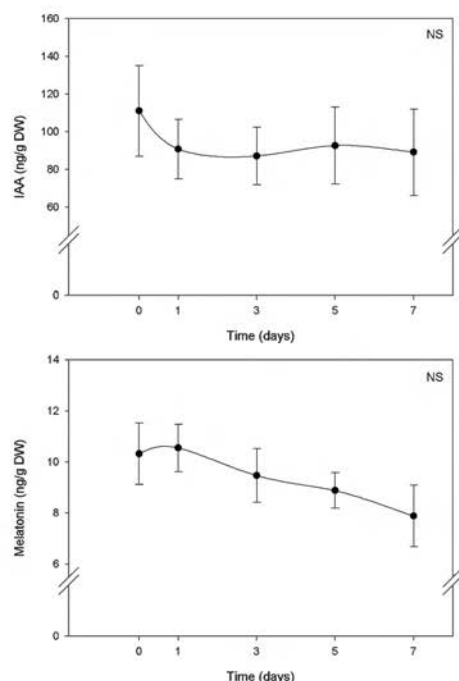


Fig. 5 Endogenous contents of the auxin, indole-3-acetic acid (IAA) and melatonin content in sweet cherries stored at room temperature for 7 days. Data are the mean \pm SE of $n=6$. Statistical comparisons were performed by one-way ANOVA. NS not significant

Acknowledgements This study was funded by the prize ICREA Academia awarded to SM-B by the Generalitat de Catalunya. We are very grateful to Paula Muñoz (University of Barcelona) and the staff of the Serveis Científic-Tècnics of the University of Barcelona for technical assistance.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of interest Authors declare no conflict of interest.

References

Alique R, Zamorano JP, Martínez MA, Alonso J (2005) Effect of heat and cold treatments on respiratory metabolism and shelf-life of sweet cherry, type *picota* cv. *Ambrunés* Postharvest Biol Technol 35:153–165

Belge B, Llovera M, Comabella E, Gatiús F, Guillén P, Graell J et al (2014) Characterization of cuticle composition after cold storage of “Celeste” and “Somerset” sweet cherry fruit. J Agric Food Chem 62:8722–8729

Bernalte MJ, Sabio E, Hernández MT, Gervasini C (2003) Influence of storage delay on quality of “Van” sweet cherry. Postharvest Biol Technol 28:303–312

Chockchaisawasdee S, Golding JB, Vuong QV, Papoutsis K, Stathopoulos CE (2016) Sweet cherry: composition, postharvest preservation, processing and trends for its future use. Trends Food Sci Technol 55:72–78

Choi C, Wiersma PA, Toivonen P, Kappel F (2002) Fruit growth, firmness and cell wall hydrolytic enzyme activity during development of sweet cherry fruit treated with gibberellic acid (GA_3). J Hortic Sci Biotechnol 77:615–621

Correia S, Schouten R, Silva AP, Gonçalves B (2017) Factors affecting quality and health promoting compounds during growth and postharvest life of sweet cherry (*Prunus avium* L.). Front Plant Sci 8:216

Crisosto CH, Crisosto GM, Metheny P (2003) Consumers acceptance of “Brooks” and “Bing” cherries is mainly dependent on fruit SCC and visual skin color. Postharvest Biol Technol 28:159–167

Davies C, Robinson SP (2000) Differential screening indicates a dramatic change in mRNA profiles during grape berry ripening: cloning and characterisation of cDNAs encoding putative cell wall and stress response proteins. Plant Physiol 122:803–812

Habib M, Bhat M, Dar BBN, Wani AA (2015) Sweet cherries from farm to table: A review. Crit Rev Food Sci Nutr 57:1638–1649

Kappel F, Toivonen P, McKenzie DL, Stan S (2002) Storage characteristics of new sweet cherry cultivars. Hortic Sci 37:139–143

Koyuncu MA, Dilmaçınal T, Savran HE, Yildirim A (2008) Shelf life quality of ‘Bing’ sweet cherry following preharvest treatment with gibberellic acid (GA_3). Acta Hort 795:825–830

Kumar R, Khurana A, Sharma AK (2014) Role of plant hormones and their interplay in development and ripening of fleshy fruits. J Exp Bot 65:4561–4575

Latimer DW (2012) Official methods of analysis of AOAC International, 19th edn. AOAC International, Rockville

Li L, Li D, Luo Z, Huang X, Li X (2016) Proteomic response and quality maintenance in postharvest fruit of strawberry (*Fragaria × ananassa*) to exogenous cytokinin. Sci Rep 6:27094

Ludford PM (1987) Postharvest hormone changes in vegetables and fruit. In: Davies PJ (ed) Plant hormones and their role in plant growth and development. Springer, Dordrecht

Massolo JF, Lemoine ML, Chaves AR, Concellón A, Vicente AR (2014) Benzyl-aminopurine (BAP) treatments delay cell wall-degradation and softening, improving quality maintenance of refrigerated summer squash. Postharvest Biol Technol 93:122–129

McCune LM, Kubota C, Stendell-Hollis NR, Thomson CA (2011) Cherries and health: a review. Crit Rev Food Sci Nutr 51:1–12

Mok DWS, Mok MC (2001) Cytokinin metabolism and action. Annu Rev Plant Biol Plant Mol Biol 52:89–118

Müller M, Munné-Bosch S (2011) Rapid and sensitive hormonal profiling of complex plant samples by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. Plant Meth 7:37

Ozkan Y, Ucar M, Yildiz K, Ozturk B (2016) Pre-harvest gibberellic acid (GA_3) treatments play an important role on bioactive compounds and fruit quality of sweet cherry cultivars. Sci Hortic 211:358–362

Serrano M, Guillén F, Martínez-Romero D, Castillo S, Valero D (2005) Chemical constituents and antioxidant activity of sweet cherry at different ripening stages. J Agric Food Chem 53:2741–2745

Siriphollakul P, Niyomlao W, Kanlayanarat S (2006) Antitranspirants maintain freshness and improve storage life of rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) fruit. Acta Hort 712:611–616

Teribia N, Tijero V, Munné-Bosch S (2016) Linking hormonal profiles with variations in sugar and anthocyanin contents during

- the natural development and ripening of sweet cherries. *New Biotechnol* 33:824–833
- Tijero V, Teribia N, Muñoz P, Munné-Bosch S (2016) Implication of abscisic acid on ripening and quality in sweet cherries: differential effects during pre- and post-harvest. *Front Plant Sci* 7:602
- Usenik V, Fabčić J, Stampar F (2008) Sugars, organic acids, phenolic composition and antioxidant activity of sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Food Chem* 107:185–192
- Wang Y, Einhorn TC (2017) Optimizing preharvest application rate of gibberellic acid (GA₃) and homobrassinolide (HBR) to improve shipping quality of sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Acta Hort* 1161:411–416
- Wani AA, Singh P, Gul K, Wani MH, Langowski HC (2014) Sweet cherry (*Prunus avium*): Critical factors affecting the composition and shelf life. *Food Pack Shelf Life* 1:86–99
- Yao H, Tian S (2005) Effects of pre- and post-harvest application of salicylic acid or methyl jasmonate on inducing disease resistance of sweet cherry fruit in storage. *Postharvest Biol Technol* 35:253–262

DISCUSIÓN GENERAL

DISCUSIÓN GENERAL

Durante los últimos años, la elevada producción de frutos carnosos con hueso a nivel mundial plasma el elevado interés que tienen los consumidores por este alimento. Ya sea su apreciada apariencia o su dulce sabor, la producción mundial de drupas superó las 800 mil toneladas en 2017, con más de 100 mil hectáreas cultivadas alrededor del mundo (FAOSTAT, 2018). Parte de esta gran producción proviene del cultivo de cerezas, tanto de variedades tempranas como tardías, ya que el consumo de este fruto está fuertemente determinado por su gran aporte de nutrientes y componentes bioactivos. Dado que las cerezas poseen un elevado contenido en polifenoles, fibra, vitamina C, entre otros (Kelley et al., 2018), sus propiedades nutraceuticas y beneficios como alimento rico en antioxidantes son altamente valorados por el consumidor, por lo que diversos estudios se centran en las diferentes estrategias utilizadas para su conservación una vez cosechado el fruto, con el fin de que estos puedan llegar al mercado en óptimas condiciones y con las propiedades nutricionales intactas (Serrano et al., 2005). Además, existe un creciente interés por la mejora de su calidad, en lo que se refiere a su sabor, color y calibre, mediante la modulación del proceso de maduración. Técnicas moleculares, *breeding*, injertos o aplicaciones exógenas de promotores de la maduración son solo unos cuantos ejemplos de algunas de las técnicas utilizadas para la producción de cerezas con una mayor aceptabilidad por parte de los consumidores. Nuevas perspectivas a nivel fisiológico son claves para generar nuevos conocimientos y un entendimiento más amplio de los procesos biológicos que derivan en la formación de un fruto con unas características tan apreciadas en el mercado.

1. Interacción hormonal en el desarrollo de las cerezas en el árbol

Los frutos pertenecientes al género *Prunus* son denominados drupas debido a procesos de lignificación que se producen en la capa interna que protege a la semilla. Esta adaptación anatómica propia de las drupas, o frutos con hueso, sugiere una evolución independiente del fruto como mecanismo de dispersión de la semilla en plantas, respecto a otras especies vegetales con otro tipo de frutos (Van der Pijl, 1982). Durante los primeros estadios de crecimiento, el fruto verde, duro y poco atractivo para los depredadores funciona como protector de las semillas en desarrollo. Es en esta fase cuando se llevan a cabo diferentes procesos intrínsecos para la acumulación de nutrientes, agua o reservas que provienen de la planta madre, con el fin de generar frutos con las características óptimas para el consumo y, por consiguiente, la dispersión de estas semillas. Muchos de estos procesos se ven afectados y/o regulados por diferentes hormonas vegetales.

1.1. Hormonas promotoras del crecimiento e inhibidoras de la maduración

Hormonas comúnmente conocidas como reguladoras del crecimiento en plantas (PGR, *plant growth regulators* en inglés) se encuentran presentes en las primeras fases del desarrollo de las cerezas estudiadas (*Prunus avium* L var. Prime Giant). Para poder evaluar el rol de las hormonas durante el desarrollo de las cerezas en el árbol, se caracterizaron siete estadios fenológicos del fruto (**Figura 5A**), en los cuales se realizó un perfil hormonal.

Los resultados obtenidos en el **Capítulo 2** muestran como la auxina IAA alcanza niveles máximos, superando los 200 ng/g de peso seco, en el estadio I de las cerezas (**Figura 5A**), para luego disminuir alrededor de un 70% y

permanecer a concentraciones bajas a medida que avanza el desarrollo. De las CKs analizadas, la *trans*-zeatina (Z) y su ribósido (ZR) presentan también valores altos durante los primeros estadios, alcanzando concentraciones máximas durante el estadio II (**Figura 5A**). Estas hormonas disminuyen drásticamente un 93% y un 85%, respectivamente, y mantienen valores muy bajos hasta la cosecha del fruto maduro. Asimismo, entre las GAs analizadas, la concentración endógena de GA₁ que se obtiene en el estadio I (**Figura 5A**) es la más elevada, respecto al resto de estadios. Al igual que el IAA, los niveles de GA₁ en el estadio I disminuyen un 53%, aproximadamente, para luego permanecer constantes a lo largo del proceso de maduración. Además de la GA₁, los resultados de las GA₃ y GA₄ muestran diferentes respuestas durante el desarrollo de las cerezas. La GA₃ presenta una concentración máxima en el estadio III, para después disminuir en el estadio IV (**Figura 5A**) y permanecer a niveles bajos durante el resto del proceso. Por otro lado, la GA₄ es la GA mayoritaria en cerezas Prime Giant, llegando a concentraciones superiores a los 900 ng/g de peso seco durante los tres primeros estadios del desarrollo y disminuyendo progresivamente hasta un 27%, aproximadamente, en el estadio comercial del fruto.

Los frutos carnosos con hueso están caracterizados por seguir un crecimiento doble sigmoideo dividido en tres fases. Durante la primera fase del crecimiento de las cerezas, los frutos verdes y pequeños del estadio I (**Figura 5A**) experimentan una serie de modificaciones fisiológicas a nivel celular que deriva en una fase de crecimiento exponencial del fruto. Las células vegetales están limitadas por la pared celular que, durante el proceso de crecimiento, debe distenderse y relajar las tensiones provocadas por sus componentes estructurales (Perrot-Rechemann, 2010). El IAA presente en el estadio I de las cerezas Prime Giant (**capítulo 2, Figura 5B**) actuaría como regulador del crecimiento ácido, tal y como lo describen Rayle & Cleland

(1992). Este IAA estimularía una disminución del pH mediante la activación del bombeo de protones hacia la matriz de la pared celular, dando como resultado una acidificación del apoplasto. Esto provocaría la activación, a un pH de 4,5 (en concordancia con los resultados obtenidos en el estadio I del **capítulo 2**), de unas proteínas no enzimáticas llamadas expansinas, que inducen la distensión de la pared celular vegetal y, por consiguiente, la expansión celular. De esta forma, la auxina IAA regularía la expansión celular, promoviendo el crecimiento ácido para la captación de agua que se almacenará, posteriormente, en las vacuolas lo que, además, favorecerá la acumulación de azúcares, ácidos orgánicos, protones, iones, entre otros (Coombe, 1976).

Las CKs son hormonas clave para el crecimiento y desarrollo vegetal, ya que regulan la proliferación y diferenciación celular. En el **capítulo 2**, el elevado contenido de Z y ZR durante los estadios I y II (**Figura 5B**) sugeriría una regulación del crecimiento del fruto regulado por estas CKs. Además, los niveles altos de Z y ZR indicarían una regulación positiva del efecto sumidero (*sink strength*, en inglés), atrayendo carbohidratos desde la planta madre hasta las cerezas, que se encuentran en constante crecimiento durante la fase I y, como consecuencia, consumen azúcares (Roitsch & Ehneß, 2000; **Figura 5A**). Debido a esto, las CKs presentan una función dual, es decir, generan señales metabólicas para estimular el ciclo celular y a su vez, son proveedoras activas de carbohidratos a los tejidos sumidero (Roitsch and González, 2004). Asimismo, los resultados de la **Tabla 1** muestran una fuerte correlación negativa entre las antocianinas y la Z, sugiriendo que para el comienzo de la acumulación de antocianinas es necesario que los niveles de CKs sean bajos, posiblemente, debido a que las CKs están implicadas en la regulación de la biosíntesis de clorofilas (Dobrąnszki & Mandler-Drienyovszki, 2014).

Al igual que las auxinas y las CKs, las GAs promueven el crecimiento del fruto. En el **capítulo 2**, el perfil hormonal de los siete estadios fenológicos de las cerezas describe, niveles máximos de la GA₁ en el estadio I, muy similar al perfil de IAA (**Figura 5B**). En este caso, la GA₁ estaría actuando como reguladora de la elongación celular en la fase I del crecimiento de las cerezas, en coordinación con las auxinas (Csukasi et al., 2011). La acumulación de GA₄ en estos frutos en los estadios I, II y III (**Figura 5**) indicaría que la GA₄ estaría implicada en promover la expansión celular hasta que el proceso de maduración en cerezas comienza, como también sucede durante el crecimiento del receptáculo en fresas en estadio blanco (Csukaki et al., 2011). De igual modo, la GA₃ presenta un aumento de su contenido durante el estadio III (**Figura 5B**). Este incremento señalaría a la GA₃ como principal hormona vegetal reguladora de la elongación celular durante la segunda fase de crecimiento de las cerezas. A nivel comercial, se han desarrollado productos que incluyen GAs, debido a su importante actividad biológica. La utilización de GA₃ en aplicaciones exógenas es muy conocida en el sector de la floricultura (da Silva Vieira et al., 2010), e incluso, a nivel frutícola, mejorando la producción y aumentando el tamaño final del fruto como, por ejemplo, en uvas y en cerezas (Özkaya et al., 2006; Abu-Zahra, 2010).

Los resultados obtenidos después de realizar correlaciones entre las auxinas, CKs y GAs y algunos parámetros de calidad de cerezas, como la biomasa del fruto, el contenido de antocianinas, azúcares y ácidos, además de la relación azúcares/ácidos (**capítulo 2**), indican una regulación negativa del proceso de maduración (**Tabla 1**). Es decir, en el caso de las cerezas Prime Giant, el IAA, la Z, GA₄ afectan a la acumulación de antocianinas y azúcares (glucosa y fructosa) indicando un papel inhibitorio por parte de estas hormonas en la maduración de las cerezas.

Tabla 1. Correlación de Spearman entre las concentraciones endógenas de hormonas y los parámetros de calidad en cerezas de la variedad Prime Giant. En negrita se muestran las correlaciones significativas. * para $P \leq 0,05$ y ** para $P \leq 0,001$.

<i>Hormonas</i>	<i>Biomasa del fruto</i>	<i>Antocianinas totales</i>	<i>TSS</i>	<i>Glucosa</i>	<i>Fructosa</i>	<i>TA</i>	<i>TSS/TA</i>
<i>IAA</i>	-0,298*	-0,381*	-0,473**	-0,474**	-0,460**	-0,153	-0,235
<i>Z</i>	-0,689**	-0,746**	-0,640**	-0,613**	-0,676**	-0,331	-0,488*
<i>ZR</i>	-0,381*	-0,422**	-0,351*	-0,360*	-0,366*	-0,501*	-0,423*
<i>GA₁</i>	-0,167	-0,160	-0,138	-0,102	-0,146	-0,155	-0,021
<i>GA₃</i>	0,184	-0,200	0,112	-0,096	0,144	-0,381*	-0,256
<i>GA₄</i>	-0,620**	-0,633**	-0,558**	-0,544**	-0,566**	-0,375*	-0,536**
<i>ABA</i>	0,607**	0,595**	0,598**	0,597**	0,611**	0,270	0,407*

IAA, ácido indolacético; *Z*, zeatina; *ZR*, ribósido de zeatina; *GA*, giberelinas; *ABA*, ácido abscísico; *TSS*, azúcares solubles totales; *TA*, ácidos totales.

1.2. El ácido abscísico como regulador de la maduración y calidad de las cerezas

Si bien las hormonas explicadas en el apartado anterior son conocidas por promover el crecimiento celular, y como consecuencia, el crecimiento de las cerezas, el ABA es conocido por regular el proceso de maduración en diferentes frutos no climatéricos, como fresas o uvas, al estar implicada en la modulación del color y en la acumulación de azúcares (Castellarin et al., 2016; Wang et al., 2015a).

Tras realizar el perfil hormonal de los siete estadios fenológicos estudiados en las cerezas (**Figura 5A**), los resultados muestran cómo el contenido endógeno de ABA es bajo durante los primeros estadios del desarrollo del fruto (**Capítulos 1, 2 y 3**). No es hasta el estadio III cuando el ABA experimenta un aumento significativo de hasta 20 veces más que el contenido inicial en el estadio I (**Figura 5B**), manteniéndose elevado hasta la cosecha del fruto, cuando alcanza su madurez comercial. Esto sugiere una elevada

actividad de la enzima NCED que, en frutos, actúa al principio de la maduración promoviendo la síntesis de ABA a partir de la degradación de xantofilas, permitiendo así que esta hormona se acumule rápidamente y se mantenga a concentraciones elevadas durante la maduración (Zhang et al., 2009). Esto concuerda con los niveles de carotenoides obtenidos en el **Capítulo 1**, donde la violaxantina, precursor de la biosíntesis de ABA, disminuye hasta niveles no detectables, mientras el contenido de ABA aumenta paralelamente, a medida que avanza la maduración.

El proceso de maduración en frutos es un proceso complejo, altamente coordinado e irreversible, en el que se llevan a cabo cambios bioquímicos y fisiológicos específicos que conducen al desarrollo de un fruto comestible con una calidad óptima y deseable para el consumidor. Teniendo en cuenta esto, se valoró la relación entre diferentes parámetros de calidad y la fitohormona ABA. Los resultados de la **Tabla 1** muestran una correlación fuertemente positiva del ABA con las antocianinas y los TSS, dos de los principales indicadores de maduración en frutos. En cerezas, las antocianinas se acumulan alrededor del estadio IV (**Capítulo 1, 2 y 3**), justo después del elevado incremento de ABA (**Figura 5B**). En cultivos hortícolas, el mecanismo molecular por el cual se sintetizan las antocianinas está siendo cada vez más estudiado. Los MYB son factores de transcripción implicados en la regulación de diferentes rutas metabólicas encargadas de la síntesis de metabolitos secundarios en plantas, como son las antocianinas (Liu et al., 2015). Entre la familia MYB se pueden encontrar los *PacMYBA*, factores de transcripción propios de las cerezas, que regulan positivamente la biosíntesis de antocianinas en estos frutos. La represión de la expresión de *PacNCED* provoca una inhibición en la síntesis de ABA, afectando la acumulación de antocianinas en cerezas de la variedad Hong Deng (Shen et al., 2014). De esta manera, el ABA induce fuertemente la biosíntesis de estos pigmentos

flavonoides en cerezas, tal y como se puede observar en los resultados obtenidos en este estudio. Con respecto al TSS, el ABA actúa como regulador en el transporte y metabolismo de los azúcares, estimulando la absorción de estos carbohidratos por transportadores a través de la membrana celular (Kobayashi et al., 2001). En cerezas, los azúcares y las antocianinas comienzan a acumularse durante la segunda fase de crecimiento (**Capítulo 2**), donde la GA₃ regula la expansión celular, incrementando el tamaño de las cerezas, según los resultados obtenidos (**Figura 5**). De la misma forma, en un estudio con cerezas de la variedad Sweetheart, se observó un incremento del tamaño de las cerezas, además de aumentar su firmeza, tras la aplicación de GA₃, sin embargo, esto comportó un retraso en la maduración del fruto (Kappel & MacDonald, 2002). Por ello, el contenido de GA₃ disminuye una vez alcanza su máximo en el estadio III del desarrollo de las cerezas (**Capítulo 2**), para proseguir con el proceso de maduración regulado por ABA.

1.3. Implicación del ácido jasmónico y el ácido salicílico en el desarrollo de las cerezas

JA y SA son hormonas comúnmente conocidas por su implicación en la regulación de la respuesta de defensa de las plantas contra patógenos (Grant & Lamb, 2006; Browse, 2009). Siendo dos hormonas que se utilizan, por lo general, como aplicación exógena para mejorar la calidad de frutos, retrasando o inhibiendo el proceso de maduración en uvas y fresas (Wang & Zheng, 2005; Asghari & Aghdam, 2010; Valero et al., 2011; Garrido-Bigotes et al., 2018), es importante saber su comportamiento a nivel endógeno para optimizar futuros tratamientos que se podrían administrar en cerezas.

Después de realizar el perfil hormonal en cerezas de la variedad Prime Giant durante dos años consecutivos, los resultados del **Capítulo 3** muestran un contenido endógeno de JA y SA elevado durante los primeros estadios del desarrollo de las cerezas, obteniendo valores máximos en el estadio I (**Figura 5**). Con el avance del desarrollo, el contenido de estas hormonas disminuye progresivamente, hasta llegar a valores mínimos una vez comienza el proceso de maduración en el fruto y permaneciendo en valores bajos hasta el final del experimento, es decir, hasta que las cerezas alcanzan su madurez comercial (estadio VII, **Figura 5**). Estos resultados sugieren una posible desprotección contra patógenos de las cerezas maduras por parte de el JA y el SA. En otros estudios, se ha podido observar la implicación de estas dos hormonas en la reducción del daño causado por hongos en cerezas, tras la aplicación exógena de MeJA y SA en diferentes estadios de maduración (Yao & Tian, 2005; Chan et al., 2008). Y aunque, se ha sugerido que el JA podría estar implicado en la producción de metabolitos secundarios, como son las antocianinas (Wang et al, 2008), los resultados obtenidos en el **Capítulo 3** no apoyan esta idea, ya que el JA presenta una gran disminución antes de la acumulación de antocianinas en el fruto. Asimismo, en frutos climatéricos, la aplicación exógena de SA retrasa el proceso de maduración (Srivastava & Dwivedi, 2000). Que la concentración de SA disminuya a medida que avanza la maduración en cerezas es un indicio del posible rol que podría tener esta hormona como inhibidora de este proceso.

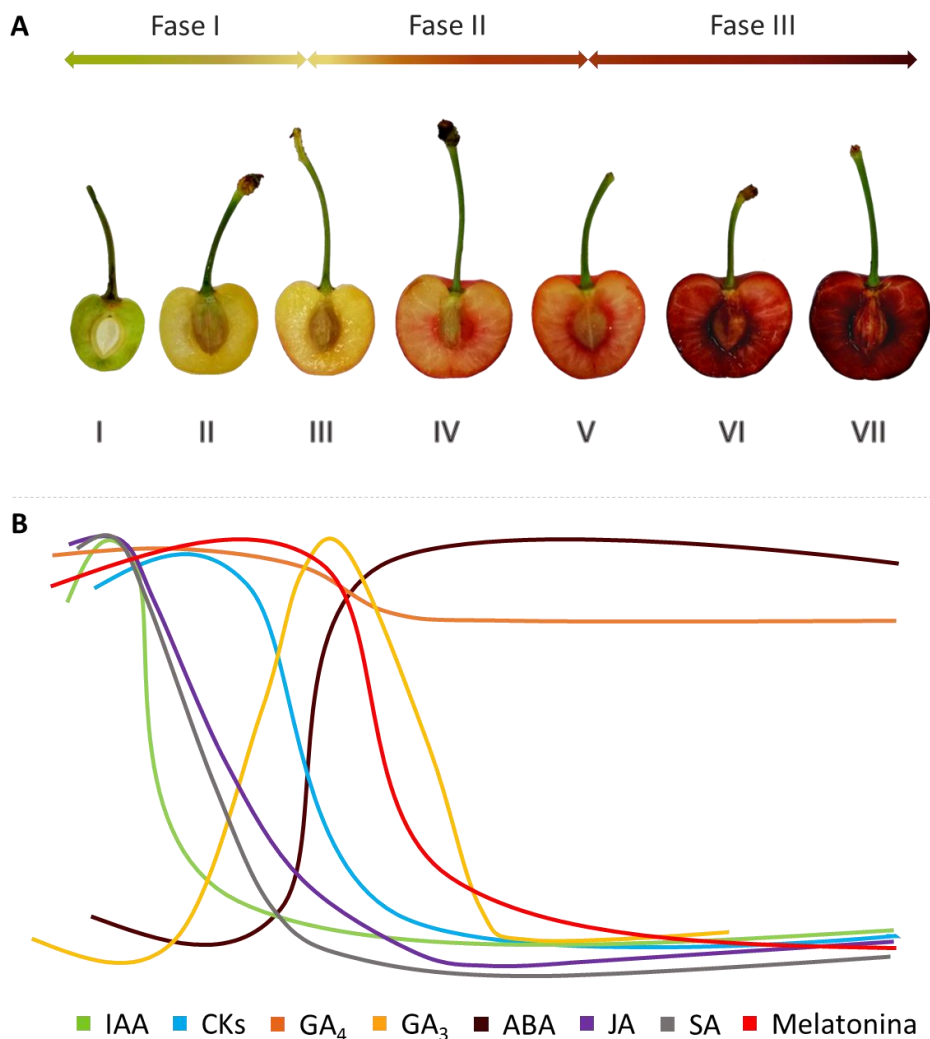


Figura 5. Proceso de desarrollo de las cerezas Prime Giant. **A)** Caracterización de siete estadios fenológicos (numeración arbitraria, del I al VII) y sus fases de crecimiento. **B)** Modelo propuesto de la variación hormonal endógena respecto a los estadios fenológicos de desarrollo de las cerezas. IAA: ácido indolacético; CKs: citoquininas; GA₃: giberelina 3; GA₄: giberelina 4; ABA: ácido abscísico; JA: ácido jasmónico; SA: ácido salicílico.

2. Importancia de la melatonina como inhibidora de la maduración

La melatonina es un compuesto ubicuo en plantas, predominante, principalmente, en las familias *Rosaceae*, *Poaceae*, *Apiaceae*, *Vitaceae* y *Brassicaceae* (Nawaz et al., 2016). Por ello, en la actualidad existe un elevado

interés por estudiar las diferentes funciones y posibles efectos que podría tener la melatonina en plantas, siendo objeto de estudio su implicación en la regulación de diversos procesos celulares y fisiológicos, actuando como una hormona vegetal (Arnao & Hernández-Ruiz, 2019).

2.1. Niveles endógenos de melatonina durante el desarrollo del fruto

Debido a su estructura química (formada por un anillo indol) y al precursor común (triptófano), algunos trabajos han relacionado la melatonina y el IAA a nivel bioquímico y funcional (Arnao & Hernández-Ruiz, 2006), principalmente, por su capacidad como estimuladora del crecimiento en plantas (Hernández-Ruiz et al., 2005).

Para evaluar el posible rol hormonal que podría ejercer la melatonina en cerezas, se midió el contenido endógeno de este compuesto a lo largo del desarrollo del fruto en el árbol (**Capítulo 3**). Los resultados obtenidos durante el 2015 y 2016 muestran unos niveles elevados y constantes de melatonina en los primeros estadios del desarrollo, cuando el fruto aún está verde y en período de crecimiento (**Figura 5A**). Una vez que comienza a madurar, estos niveles disminuyen progresivamente hasta llegar a concentraciones mínimas en el último estadio de maduración (estadio VII), justo antes de su cosecha (**Figura 5**). Estas variaciones en el contenido endógeno de la melatonina son muy semejantes a las dinámicas obtenidas por las hormonas promotoras del crecimiento durante el desarrollo de las cerezas. Además, se ha observado cómo los niveles de melatonina también disminuyen en uva, otro fruto no climatérico, a medida que la baya pasa del estadio de pre-envero a envero (Murch et al., 2010; Vitalini et al., 2011), en concordancia con los resultados obtenidos en el **Capítulo 3**. Se ha visto que la melatonina es un compuesto

que participa en el crecimiento y desarrollo de raíces y brotes, germinación de semillas y procesos de rizogénesis en plantas como *Arabidopsis thaliana*, avena (*Avena sativa* L.), mostaza (*Brassica juncea* L.), coliflor (*Brassica oleracea* L.), girasol (*Helianthus annuus* L.), arroz (*Oryza sativa* L.), cebada (*Hordeum vulgare* L.), plantas del género *Prunus*, entre otros (Arnao & Hernández-Ruiz, 2017). Por lo que, los resultados del **Capítulo 3** indican que la melatonina juega un papel importante en el desarrollo de frutos no climatéricos, como regulador hormonal del crecimiento de las cerezas, posiblemente, por una interacción hormonal entre el IAA y la melatonina (Arnao & Hernández-Ruiz, 2017).

Si bien la melatonina endógena presente en los primeros estadios del desarrollo de las cerezas actúa como reguladora del crecimiento del fruto, su función durante de la maduración no está del todo clara. Hasta ahora, se conocen estudios en los que la melatonina favorece el proceso de maduración tanto en tomate (fruto climatérico, Sun et al., 2015) como uva (fruto no climatérico, Xu et al., 2018). Sin embargo, se ha visto que la melatonina estimula la degradación de ABA, suprimiendo su síntesis y favoreciendo su catálisis (Li et al., 2015). Por lo tanto, ¿cuál es la función de la melatonina en la maduración de las cerezas?

2.2. Efectos de la aplicación exógena de melatonina sobre la maduración

Para confirmar el posible rol de la melatonina durante la maduración de las cerezas, se realizó un estudio en campo en el que se aplicaron dos concentraciones diferentes de melatonina, a 10^{-4} M y a 10^{-5} M (**Capítulo 3**) en cerezas que se encontraban en estadio II del desarrollo (**Figura 5A**) para

evaluar el efecto de la melatonina exógena 19 días después de su aplicación. A nivel endógeno, los resultados (**Capítulo 3**) muestran un incremento de más de 400 veces la concentración de melatonina a las 4 horas después de aplicar el tratamiento de 10^{-4} M. Tras la aplicación del tratamiento a 10^{-5} M, el contenido de melatonina, comparado con el contenido del control, muestran un aumento significativo de melatonina al cabo de 24 horas, a pesar de no ser un incremento tan elevado como con el tratamiento de 10^{-4} M. Posteriormente de alcanzar sus respectivos niveles máximos, el contenido de melatonina disminuye progresivamente en los dos casos, llegando a concentraciones parecidas al tratamiento control. La melatonina tiene la capacidad de atravesar membranas celulares y entrar en diferentes compartimentos subcelulares gracias a su naturaleza anfipática (Shida et al., 1994), por lo que una aplicación exógena de melatonina es fácilmente absorbida y acumulada en plantas, tal y como muestran los resultados de este estudio.

En cerezas, la maduración empieza alrededor del estadio III (**Figura 5A**), como se describe en el **Capítulo 2**. La acumulación de antocianinas y el balance entre azúcares y ácidos, entre otros, son propiedades clave para el consumidor. En el **Capítulo 3**, se midieron los niveles de antocianinas, TSS, TA y la relación TSS/TA, después de la aplicación de melatonina. Al cabo de 19 días de la aplicación, los TSS y la relación TSS/TA no se ven afectados significativamente tras el tratamiento. Sin embargo, los resultados muestran un aumento significativo de TA después de 11 días en cerezas tratadas con melatonina 10^{-4} M, en comparación a las cerezas control. Una característica importante para el consumidor es el sabor del fruto, que no solo se ve influenciado por los azúcares presentes, sino también por los ácidos (Crisosto et al., 2003). En estudios con tomate, se observó una mayor coloración debido a la estabilización de las antocianinas por parte de los ácidos orgánicos, sugiriendo que la aplicación exógena de melatonina fomentaba una mejora en

el sabor de los frutos (Liu et al., 2016). Por otro lado, después de 19 días, se observa una menor acumulación de antocianinas en las cerezas tratadas con melatonina 10^{-5} M respecto al control. El retraso en la acumulación de este pigmento afectaría directamente en la maduración del fruto, por lo que, estos resultados sugieren que la aplicación exógena de melatonina inhibe el proceso de maduración de las cerezas. La melatonina exógena reprime la biosíntesis de ABA en especies del género *Malus* (Li et al., 2015), por lo que este proceso se podría estar llevando a cabo en la maduración de las cerezas, tras la aplicación de melatonina. En el **apartado 4** de la **Discusión General (Cross-talk hormonal en pre- y poscosecha)** se discutirá con más profundidad este aspecto. Asimismo, los resultados obtenidos tras la aplicación de melatonina a 10^{-4} M y 10^{-5} M indican que los efectos del tratamiento exógeno pueden cambiar en función de la concentración aplicada, como se ha podido ver en otros estudios (Reiter et al., 2015)

3. Sobremaduración y deterioro del fruto en poscosecha.

Consumir fruta fresca es importante para la salud humana, por lo que mejorar la calidad del fruto y su conservación, para alargar su vida útil, es objeto de estudio (Valero & Serrano, 2010). A diferencia de los frutos climatéricos, los frutos no climatéricos solamente maduran en el árbol, por lo que, una vez cosechadas, su vida útil es corta, influyendo negativamente en su calidad. Como modelo de fruto no climatérico, las cerezas son altamente perecederas y sufren un importante deterioro físico (**Figura 6**). Entre las características más relevantes durante el deterioro del fruto, se pueden observar cambios en el color, modificaciones de la pared celular vegetal, pérdida de agua y susceptibilidad al ataque de patógenos (Belge et al., 2014).

La cosecha del fruto implica la privación del abastecimiento de agua, nutrientes, minerales y moléculas, como las fitohormonas, de la planta madre, por lo que el deterioro del fruto podría afectar de manera directa al contenido endógeno de hormonas y, por tanto, influir en su respuesta frente a este proceso de sobremaduración. En el **Capítulo 4**, se analiza el perfil hormonal durante la sobremaduración natural de las cerezas, tras mantener los frutos durante una semana a temperatura ambiente. Los resultados obtenidos muestran, a nivel de calidad, una elevada pérdida de agua debido a que el fruto no puede recibir un suministro de esta misma por parte de la planta madre, para compensar las pérdidas por transpiración (Nakano et al., 2003). Paralelamente, se observa una disminución en el contenido de TA, después de 3 días de almacenamiento, mientras que el contenido de TSS no se ve afectado a lo largo del tratamiento, como sucede en otras variedades de cerezas (Alique et al., 2005). La relación entre TSS y TA juega un papel importante en la aceptabilidad de un fruto y un desequilibrio en esta relación cambia la aprobación del consumidor, que prefiere frutos con un TSS/TA alto, es decir, un elevado aumento de TSS, más un sutil aumento de TA (Crisosto et al., 2003). Una disminución de TA (**Capítulo 4, Figura 6**) provoca un desequilibrio en la relación TSS/TA, por lo que la aceptabilidad del fruto disminuye, no solo visualmente, también por cambios en el sabor.

A nivel hormonal, no se observan diferencias significativas en el contenido de JA y SA a lo largo del experimento (**Capítulo 4**), a pesar de que la aplicación exógena de estas hormonas promueve una mejora en la calidad y vida útil de las cerezas, en otro estudio (Yao & Tian, 2005). Tampoco se observaron diferencias significativas en el contenido de GAs, a excepción de la GA₃, que disminuye su contenido después de 3 días de almacenamiento. En cerezas de la variedad Celeste, Lapins y Merpet, la aplicación exógena de GA₃ aumenta la concentración de acidez al final de la maduración (Choi et al.,

2002). Los resultados de GA₃ concuerdan con los resultados obtenidos de TA, sugiriendo un posible rol por parte de la GA₃ en la reducción de TA, y por ello, en el deterioro de la calidad del fruto.

A lo largo de la sobremaduración, se observa una disminución en el contenido de CKs, hasta niveles mínimos después de 3 días a temperatura ambiente (**Capítulo 4**). De la misma forma que la GA₃, aplicaciones de bencilaminopurina en una variedad de calabaza mostraron la implicación de las CKs en la mejora de la conservación de este fruto, inhibiendo la desestructuración de la pectina, principal componente de la pared celular vegetal, y como consecuencia, previene del daño causado en la textura del fruto (Massolo et al., 2014). Durante la sobremaduración, las CKs podrían estar implicadas en la regulación del mantenimiento de las propiedades de la pared celular vegetal, por lo que, una disminución del contenido endógeno de CKs en las cerezas, favorecería el deterioro del fruto cosechado y mantenido a temperatura ambiente.

Al igual que las CKs y GA₃, los niveles de ABA también disminuyen durante la sobremaduración de las cerezas. Esto provoca una rápida pérdida de agua en cerezas, causando el ablandamiento del fruto, como se ha podido ver en cítricos, donde mutantes deficientes en ABA manifestaron deshidratación en los tejidos (Alfárez et al., 2005; Romero et al., 2016). La aplicación exógena de ABA en el rambután provoca una reducción de la pérdida de peso, lo que implica una menor pérdida de agua por transpiración (Siriphollakul et al., 2006). Por otro lado, ni IAA ni melatonina mostraron diferencias significativas en su contenido en el deterioro del fruto. Por ello, los resultados obtenidos en el **Capítulo 4** sugieren un papel protector en la sobremaduración y deterioro de las cerezas por parte del ABA, CKs y GA₃.



Figura 6. Resumen de las características físicas que presentan las cerezas que se comercializan y las cerezas después de siete días de almacenaje.

Teniendo en cuenta cómo afecta la sobremaduración a las cerezas y al deterioro que causa un aspecto físico poco deseable en el fruto (**Figura 6**), diversos estudios se centran en encontrar la mejor tecnología de conservación, no solo para las cerezas, sino también para muchos otros frutos con vida útil corta, debido a la importancia económica que tienen los cultivos de árboles frutales alrededor del mundo (Farinati et al., 2017).

Desde el punto de vista del consumidor, una técnica muy utilizada comúnmente para el almacenamiento de la fruta fresca es la conservación en frío. La preservación de frutos a baja temperatura conlleva una disminución de su metabolismo y un retraso en su deterioro. Por ello, para estudiar la función del ABA como hormona reguladora de la acumulación de

antocianinas y azúcares en cerezas, se llevó a cabo un tratamiento de temperatura durante la poscosecha de estos frutos. Se almacenaron cerezas a dos temperaturas distintas: a 23°C y a 4°C, durante una semana. Los resultados obtenidos en el **Capítulo 1** muestran una elevada acumulación de antocianinas a 23°C, mientras que a 4°C, el contenido es menor y permanece constante. Se ha observado que, en cerezas, la actividad de PAL, una enzima clave para la síntesis de antocianinas, varía en frutos almacenados a 20°C, por una elevada pérdida en el contenido de agua del fruto (Tsaniklidis et al., 2017). Esto concuerda con los resultados obtenidos en el **Capítulo 4**, donde se ve una elevada pérdida de agua después de almacenar las cerezas durante una semana, lo que favorecería la acumulación de antocianinas a 23°C. A estos resultados se le suma una fuerte correlación negativa entre las antocianinas y el contenido de ABA a 23°C, lo que indicaría que el ABA no es un regulador positivo en la acumulación de estos pigmentos en la sobremaduración, como sí lo es durante el proceso de maduración de las cerezas.

Por otro lado, el contenido endógeno de ABA, a dos temperaturas distintas, presenta diferencias significativas. A 23°C, la concentración de ABA disminuye progresivamente (**Capítulo 1 y 4**), lo que influye en la pérdida de turgencia del fruto. En cambio, se observa un incremento del ABA en cerezas, después de 2 días almacenadas a 4°C. Asimismo, el tratamiento en frío mantiene a niveles elevados y constantes la biomasa del fruto, lo que indica una menor pérdida de agua durante la sobremaduración de las cerezas, además de una extender el tiempo de vida útil de las cerezas. Esto concuerda con los resultados obtenidos en el estudio del rambután (Sirirphollakul et al., 2006), es decir, un aumento de ABA reduce las pérdidas de agua por transpiración, por lo que el ABA actuaría como hormona protectora durante la sobremaduración a bajas temperaturas.

4. *Cross-talk* hormonal en cerezas

En procesos como el crecimiento, maduración y sobremaduración de frutos, las hormonas juegan un papel muy importante. El desarrollo de frutos incluye una serie de cambios, como la división celular, biosíntesis de lignina, modificaciones en la pared celular vegetal, acumulación de pigmentos, removilización de nutrientes, entre otros, por lo que un balance adecuado entre las fitohormonas es necesario para llevar a cabo todos estos procesos. No obstante, la detección y cuantificación de las hormonas es un procedimiento mucho más complejo que la cuantificación de otros metabolitos. Por ejemplo, en el **Capítulo 3**, se puede ver una recopilación de datos sobre el contenido de melatonina en diferentes variedades de cerezas, incluyendo la estudiada en esta tesis, la variedad Prime Giant, que han llegado a su madurez comercial. Los resultados indican que la diversidad en las concentraciones de melatonina se debe a la influencia del método de extracción y, principalmente, a la técnica de cuantificación utilizada. El método más sensible y más preciso, en la identificación de estos compuestos, es la cromatografía líquida acoplada al espectrómetro de masas (LC-MS, Feng et al., 2014).

Llegado a este punto, queda claro que las fitohormonas IAA, CKs y GAs son compuestos que promueven el crecimiento de las plantas. Además, también actúan en diferentes órganos vegetales y a nivel celular. En las cerezas de la variedad Prime Giant (**Figura 5**), así como también en otros frutos, estas tres hormonas actúan coordinadamente regulando el cuajado del fruto (*fruit set*, en inglés), es decir, están implicadas en la formación del fruto una vez la flor ha sido polinizada, y en su crecimiento en el árbol (Werner & Schmülling, 2009; Kumar et al., 20124), regulando la división y expansión celular y los cambios producidos en la pared celular (Downes et al., 2001; Marowa et al., 2016). Además, pasan de tener valores endógenos elevados a valores

mínimos, cuando el proceso de maduración comienza (**Capítulo 2**). En este caso, lo que se observa es un incremento significativo del contenido endógeno de ABA (**Capítulos 1, 2 y 3**), por lo que, se crea un delicado equilibrio entre las hormonas de crecimiento y la principal hormona reguladora de la maduración. Asimismo, hormonas conocidas por su implicación en la respuesta contra patógenos también influyen en el desarrollo de las cerezas en el árbol. JA y SA, presentes durante el crecimiento del fruto, se hallan a concentraciones mínimas en la maduración de las cerezas (**Capítulo 3**), dejando a las cerezas desprovistas de protección contra patógenos, por lo que son más susceptibles a su ataque. Estos resultados presentan un balance hormonal, en el que, durante el crecimiento del fruto, las hormonas promotoras del crecimiento son mayoritarias, mientras que el ABA se mantiene a niveles mínimos. Y, por el contrario, las hormonas que regulan el crecimiento deben disminuir para que el ABA pueda incrementar y favorecer el proceso de maduración. Si se desequilibra este balance hormonal, el proceso de maduración se retrasaría o el crecimiento se vería interrumpido (Wang et al., 2014).

Con respecto a la melatonina, se ha podido observar en el **Capítulo 3** que está implicada en el crecimiento de las cerezas y que la aplicación exógena de este compuesto inhibe el proceso de maduración, retrasando la acumulación de antocianinas. No obstante, la TA y las antocianinas no son los únicos parámetros que se ven afectados por el tratamiento de melatonina. Si bien, a nivel hormonal, ni el JA ni el SA se ven afectados tras la aplicación exógena de melatonina. Siendo estructuralmente similar al IAA y teniendo el mismo precursor en su biosíntesis, melatonina e IAA podrían coparticipar en procesos de crecimiento y desarrollo en plantas. Sin embargo, se ha observado que estas dos hormonas mantienen una relación dosis-dependiente, ya que una concentración elevada de melatonina podría tener un efecto antagónico al

IAA, inhibiendo el crecimiento y, en cambio, a concentraciones bajas, la melatonina influye en la biosíntesis del IAA aumentando el contenido endógeno y favoreciendo el proceso de crecimiento de raíces (Chen et al., 2009; Wang et al., 2016). En los resultados del **Capítulo 3**, se observa que ni la melatonina a 10^{-5} M ni a 10^{-4} M afecta al contenido endógeno del IAA, por lo que las concentraciones de melatonina no son suficientes para ver una respuesta en la relación melatonina-IAA. Por otro lado, tras la aplicación exógena de melatonina, el contenido de ABA no muestra cambios significativos. En los resultados del **Capítulo 3** se observa un incremento de ABA, por lo que la melatonina exógena no afecta a su contenido endógeno y en este caso, no influiría negativamente a el proceso de maduración. Por lo tanto, ¿cuál sería el mecanismo por el cual la melatonina retrasa la acumulación de antocianinas en cerezas y, por ende, la maduración?

Mientras que los niveles endógenos de ABA no se ven alterados tras la aplicación de melatonina, GAs y CKs son fuertemente influenciados, dependiendo de la concentración de melatonina aplicada. En el caso de las GAs, no se muestran diferencias significativas entre el tratamiento con melatonina 10^{-5} M y el control. Por el contrario, la aplicación de mayor concentración (10^{-4} M) afecta positivamente a la GA_1 , incrementando su contenido después de 4 horas. El efecto opuesto se observa en la GA_3 y GA_7 , que presentan concentraciones más bajas que las cerezas control. Esta disminución en el contenido endógeno de GAs podría estar relacionada con el aumento de TA que se obtiene después de 11 días tras el tratamiento de melatonina 10^{-4} M, ya que, además de las CKs, las GAs podrían estar implicadas en la demanda de nutrientes y compuestos orgánicos, estimulando el metabolismo del carbono (Zhang et al., 2007). La aplicación de melatonina 10^{-5} M también tiene sus efectos en la regulación hormonal. La Z experimenta un aumento en su contenido a las 24 horas del tratamiento, para luego

disminuir drásticamente, al cabo de 5 días. El cambio más importante asociado a la maduración es el cambio de la coloración del fruto. Las cerezas pasan por un proceso llamado *degreening*, el cambio de color verde a rojo intenso. Es un proceso por el cual las clorofilas se degradan, mientras el fruto comienza a acumular antocianinas (Muñoz & Munné-Bosch, 2018). En este caso, los resultados del **Capítulo 3** indican que la melatonina actúa como inhibidora de la maduración de las cerezas, posiblemente induciendo un aumento del contenido de CK, como se puede observar en estudios con *Lolium perenne* L. y *Agrostis stolonifera* L., donde la melatonina exógena regula la transcripción de genes implicados en la biosíntesis y señalización de las CKs (Zhang et al., 2017; Ma et al., 2018), las cuales juegan un papel importante en la supresión de la degradación de clorofilas (Choi & Hwang, 2007), retrasando, así, la acumulación de antocianinas.

El conocimiento generado durante la tesis deja abierta nuevas puertas hacia futuros estudios. El empleo de compuestos que promuevan la biosíntesis de hormonas como el IAA, la Z y la GA₄ sería mucho más efectivo que la aplicación de GA₃ (**Capítulo 2**), para aumentar el tamaño de las cerezas que, por tanto, ayudaría a mejorar la calidad del fruto, atrayendo más nutrientes y azúcares (Coombe, 1976), durante la primera fase de crecimiento. Sin embargo, para comprobar su efecto como inhibidoras de la maduración no solo en cerezas, también en otros frutos no climatéricos, se requieren experimentos adicionales, como la aplicación exógena directa de estas mismas hormonas o una combinación de ellas. Además, como se observa en el **Capítulo 3**, las hormonas no se comportan de la misma manera si se aplican a diferentes concentraciones. El IAA actúa como inhibidor del crecimiento a elevadas concentraciones en *Lupinus albus* L. (Hernández-Ruiz et al., 2004) Por lo que, saber la concentración adecuada para modular procesos importantes en frutos, como es el crecimiento o su maduración, es otro

importante objeto de estudio. Otro factor a tener en cuenta en futuros estudios es el estadio del fruto. Es decir, una aplicación de Z, por ejemplo, no tendrá el mismo efecto si se realiza en el cuajado el fruto, donde promoverá la división celular, que si se aplica al final de la maduración, donde probablemente ejerza como inhibidor. De hecho, la aplicación exógena de SA en la poscosecha de cerezas, de la variedad Cristalina y Prime Giant, reduce significativamente la sobremaduración del fruto, evitando que su calidad decaiga (Valero et al., 2011). Por el contrario, si se aplica durante la maduración, los frutos muestran protección frente a patógenos induciendo una respuesta de defensa (Hussain et al., 2014). Por esto, hace falta más investigación para comprender la compleja interacción hormonal que se produce durante el desarrollo completo del fruto en el árbol y cómo afecta a los parámetros de calidad.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- ❖ Las hormonas implicadas en la regulación del crecimiento en cerezas son el IAA, las GAs y las CKs, promoviendo la división y expansión celular.
- ❖ El ABA juega un papel importante en la regulación del proceso de maduración en frutos no climatéricos, favoreciendo positivamente la acumulación de antocianinas y de azúcares en las cerezas.
- ❖ La melatonina también regularía el desarrollo de las cerezas, con un posible rol como inhibidoras de la maduración.
- ❖ Existe un complejo balance hormonal o *cross-talk* durante el desarrollo de las cerezas en el árbol. Estas hormonas actúan conjuntamente e interaccionan entre ellas, dando lugar a diferentes respuestas en las plantas. Esto se refleja en el equilibrio entre hormonas promotoras del crecimiento y el ABA, ya que esta última no puede promover la maduración si las otras no se encuentran a niveles mínimos.
- ❖ La respuesta a la aplicación exógena de melatonina depende de la concentración aplicada. A concentraciones bajas (10^{-5} M), la melatonina retrasa la acumulación de antocianinas, mientras que a concentraciones elevadas (10^{-4} M), se observa un aumento de la acidez.
- ❖ La aplicación exógena de melatonina 10^{-5} M afecta directamente a la concentración de CKs, concretamente a la Z, creando un *cross-talk* hormonal, que respondería inhibiendo la degradación de las clorofilas, por lo que retrasaría la acumulación de antocianinas y a su vez, inhibiría la maduración en las cerezas.

- ❖ Los resultados obtenidos con la aplicación de melatonina tienen un gran valor en el sector de la biotecnología agroalimentaria, ya que, además de no ser un compuesto dañino para la salud humana, a través de la melatonina se puede modular el ritmo de la maduración en las cerezas.
- ❖ La disminución de ABA, CKs y GA₃ durante la sobremaduración de las cerezas indica que estas hormonas participan en la protección contra el deterioro del fruto.
- ❖ A temperatura ambiente, el ABA no regula la acumulación de antocianinas, que experimentan un incremento muy elevado en su concentración después de una semana de almacenamiento, debido, al menos en parte, a la gran pérdida de agua.
- ❖ A 4°C, la concentración de ABA aumenta, evitando pérdidas de agua durante la conservación en frío de las cerezas y alargando su vida útil.
- ❖ Los resultados obtenidos en este trabajo son de gran importancia a nivel comercial, ya que sientan las bases para el desarrollo de posibles productos que sean capaces de modular los procesos de crecimiento, maduración y sobremaduración en cerezas, u otros frutos, y de esta manera, mejorar su calidad.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Abu-Zahra, T.R. (2010). Berry size of Thompson seedless as influenced by the application of gibberellic acid and cane girdling. *Pakistan Journal of Botany*. 42, 1755-1760.
- Achard, P., Gusti, A., Cheminant, S., Alioua, M., Dhondt, S., Coppens, F., Beemster, G.T. & Genschik, P. (2009). Gibberellin signaling controls cell proliferation rate in Arabidopsis. *Current Biology*. 19, 1188-1193.
- Achard, P., Liao, L., Jiang, C., Desnos, T., Bartlett, J., Fu, X. & Harberd, N.P. (2007). DELLAs contribute to plant photomorphogenesis. *Plant Physiology*. 143, 1163-1172.
- Addicott, F.T., Lyon, J.L., Ohkuma, K., Thiessen, W.E., Carns, H.R., Smith, O.E., Cornforth, J.W., Milborrow, B.V., Ryback, G. & Wareing, P.F. (1968). Abscisic acid: A new name for abscisin II (dormin). *Science*. 159, 1493.
- Alfárez, F., Sala, J.M., Sánchez-Ballesta, M.T., Mulas, M., Lafuente, M.T. & Zacarias, L. (2005). A comparative study of the postharvest performance of an ABA-deficient mutant of oranges I. Physiological and quality aspects. *Postharvest Biology and Technology*. 37, 222-231.
- Alique, R., Zamorano, J.P., Martínez, M.A. & Alonso, J. (2005). Effect of heat and cold treatments on respiratory metabolism and shelf-life of sweet cherry, type picota cv. 'Ambrunés'. *Postharvest Biology and Technology*. 35, 153-165.
- Argueso, C.T., Ferreira, F.J., Hutchison, C.E., To, J.P.C., Epple, P., Mathews, D.E., Schaller, G.E., Dangl, J.L. & Kieber, J.J. (2012). Two-component

elements mediate interactions between cytokinin and salicylic acid in plant immunity. *PLoS Genetics*. 8, e1002448.

Argueso, C.T., Ferreira, F.J. & Kieber, J.J. (2009). Environmental perception avenues: the interaction of cytokinin and environmental response pathways. *Plant, Cell & Environment*. 32, 1147-1160.

Arnao, M.B. & Hernández-Ruiz, J. (2019). Melatonin: a new plant hormone and/or a plant master regulator?. *Trends in Plant Science*. 24, 38-48.

Arnao, M.B. & Hernández-Ruiz, J. (2017). Growth activity, rooting capacity, and tropism: three auxinic precepts fulfilled by melatonin. *Acta Physiologiae Plantarum*. 39, 127.

Arnao, M.B., & Hernández-Ruiz, J. (2015). Functions of melatonin in plants: a review. *Journal of Pineal Research*. 59, 133-150.

Arnao, M.B. & Hernández-Ruiz, J. (2014). Melatonin: plant growth regulator and/or biostimulator during stress?. *Trends in Plant Science*. 19, 789-797.

Arnao, M.B. & Hernández-Ruiz, J. (2008). Protective effect of melatonin against chlorophyll degradation during the senescence of barley leaves. *Journal of Pineal Research*. 46, 58-63.

Arnao, M.B. & Hernández-Ruiz, J. (2006). The physiological function of melatonin in plants. *Plant Signaling and Behavior*. 1, 89-95.

Asghari, M. & Aghdam, M.S. (2010). Impact of salicylic acid on post-harvest physiology of horticultural crops. *Trends in Food Science and Technology*. 21, 502-509.

Ban, T., Ishimaru, M., Kobayashi, S., Shiozaki, S., Goto-Yamamoto, N. & Horiuchi, S. (2003). Abscisic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid affect the expression of anthocyanin biosynthetic pathway genes in

- 'Kyoto' grape berries. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 109, 330-335.
- Bari, R. & Jones, J.D.G. (2009). Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology*. 69, 473-488.
- Basu, M.M., González-Carranza, Z.H., Azam-Ali, S., Tang, S., Shahid, A.A. & Roberts, J.A. (2013). The manipulation of auxin in the abscission zone cells of *Arabidopsis* flowers reveals that indoleacetic acid signaling is a prerequisite for organ shedding. *Plant Physiology*. 162, 96-106.
- Belge, B., Llovera, M., Comabella, E., Gatiús, F., Guillén, P., Graell, J. & Lara, I. (2014). Characterization of cuticle composition after cold storage of 'Celeste' and 'Somerset' sweet cherry fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 62, 8722-8729.
- Blankenship, S.M & Dole, J.M. (2003). 1-Methylcyclopropene: a review. *Postharvest Biology and Technology*. 28, 1-25.
- Blée, E. (2002). Impact of phyto-oxylinins in plant defense. *Trends in Plant Science*. 7, 315-322.
- Berger, J. & Avery, G.S. Jr. (1944). Isolation of an auxin precursor and an auxin (Indoleacetic Acid) from maize. *American Journal of Botany*. 31, 199-203.
- Borsani, O., Valpuesta, V. & Botella, A. (2001). Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and osmotic stress in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiology*. 126, 1024-1030.
- Böttcher, C., Burbidge, C.A., di Rienzo, V., Boss, P.K & Davies, C. (2015). Jasmonic acid-isoleucine formation in grapevine (*Vitis vinifera* L.) by two

- enzymes with distinct transcription profiles. *Journal of Integrative Plant Biology*. 57, 618-627.
- Böttcher, C., Harvey, K., Forde, C.G., Boss, P.K. & Davies, C. (2011). Auxin treatment of pre-veraison grape (*Vitis vinifera* L.) berries both delays ripening and increases the synchronicity of sugar accumulation. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 17, 1-8.
- Böttcher, C., Keyzers, R.A., Boss, P.K. & Davies, C. (2010). Sequestration of auxin by the indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3-1 in grape berry (*Vitis vinifera* L.) and the proposed role of auxin conjugation during ripening. *Journal of Experimental Botany*. 61, 3615-3625.
- Brian, P.W. & Hemming, H.G. (1955). The effect of gibberellic acid on shoot growth of pea seedlings. *Physiologia Plantarum*. 8, 669-681.
- Browse, J. (2009). Jasmonate passes muster: a receptor and targets for the defense hormone. *Annual Review of Plant Biology*. 60, 183-205.
- Byeon, Y. & Back, K. (2014). An increase in melatonin in transgenic rice causes pleiotropic phenotypes, including enhanced seedling growth, delayed flowering, and low grain yield. *Journal of Pineal Research*. 56, 408-414.
- Byeon, Y., Lee, H.Y., Lee, K. & Back, K. (2014). Caffeic acid *O*-methyltransferase is involved in the synthesis of melatonin by methylating *N*-acetylserotonin in *Arabidopsis*. *Journal of Pineal Research*. 57, 219-227.
- Byeon, Y., Lee, H.Y., Lee, K., Park, S. & Back, K. (2013). Cellular localization and kinetics of the rice melatonin biosynthetic enzymes SNAT and ASMT. *Journal of Pineal Research*. 56, 107-114.

- Castellarin, S.D., Gambetta, G.A., Wada, H., Krasnow, M.N., Cramer, G.R., Peterlunger, E., Shackel, K.A. & Matthews, M.A. (2016). Characterization of major ripening events during softening in grape: turgor, sugar accumulation, abscisic acid metabolism, colour development, and their relationship with growth. *Journal of Experimental Botany*. 67, 709-722.
- Chai, Y.M., Jia, H.F., Dong, Q.H. & Shen, Y.Y. (2011). FaPYR1 is involved in strawberry fruit ripening. *Journal of Experimental Botany*. 62, 5079-5089.
- Chan, Z., Wang, Q., Xu, X., Meng, X., Qin, G., Li, B. & Tian, S. (2008). Functions of defense-related proteins and dehydrogenases in resistance response induced by salicylic acid in sweet cherry fruits at different maturity stages. *Proteomics*. 8, 4791-4807.
- Cheminant, S., Wild, M., Bouvier, F., Pelletier, S., Renou, J.P., Erhardt, M., Hayes, S., Terry, M.J., Genschik, P. & Achard, P. (2011). DELLAs regulate chlorophyll and carotenoid biosynthesis to prevent photooxidative damage during seedling deetiolation in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 23, 1849-1860.
- Cheng, H., Qin, L., Lee, S., Fu, X., Richards, D.E., Cao, D., Luo, D., Harberd, N.P. & Peng, J. (2004). Gibberellin regulates *Arabidopsis* floral development via suppression of DELLA protein function. *Development*. 131, 1055-1064.
- Chen, Q., Qi, W.B., Reiter, R.J., Wei, W. & Wang, B.M. (2009). Exogenously applied melatonin stimulates root growth and raises endogenous indoleacetic acid in roots of etiolated seedlings of *Brassica juncea*. *Journal of Plant Physiology*. 166, 324-328.

- Cherian, S., Figueroa, C.R. & Nair, H. (2014). Movers and shakers in the regulation of fruit ripening: a cross-dissection of climacteric versus non-climacteric fruit. *Journal of Experimental Botany*. 65, 4705-4722.
- Chini, A., Grant, J.J., Seki, M., Shinozaki, K. & Loake, G.J. (2004). Drought tolerance established by enhanced expression of the *CC1-NBS-LRR* gene, *ADRI*, requires salicylic acid, EDS1 and ABI1. *Plant Journal*. 38, 810-822.
- Choi, C., Wiersma, P.A., Toivonen, P. & Kappel, F. (2002). Fruit growth, firmness and cell wall hydrolytic enzyme activity during development of sweet cherry fruit treated with gibberellic acid (GA₃). *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 77, 615-621.
- Choi, J. & Hwang, I. (2007). Cytokinin: perception, signal transduction, and role in plant growth and development. *Journal of Plant Biology*. 50, 98-108.
- Chory, J., Reinecke, D., Sim, S., Washburn, T. & Brenner, M. (1994). A role for cytokinins in de-etiolation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 104, 339-347.
- Clayton, M., Biasi, W.V., Agar, I.T., Southwick, S.M. & Mitcham, E.J. (2003). Postharvest quality of 'Bing' cherries following preharvest treatment with hydrogen cyanamide, calcium ammonium nitrate, or gibberellic acid. *HortScience*. 38, 407-411.
- Concha, C.M, Figueroa, N.E., Poblete, L.A., Oñate, F.A., Schwab, W. & Figueroa, C.R. (2013). Methyl jasmonate treatment induces changes in fruit ripening by modifying the expression of several ripening genes in *Fragaria chiloensis* fruit. *Plant Physiology and Biochemistry*. 70, 433-444.

- Coombe, B.G. (1976). The development of fleshy fruits. *Annual Review of Plant Physiology*. 27, 507-528.
- Crisosto, C.H., Crisosto, G.M. & Metheney, P. (2003). Consumers acceptance of “Brooks” and “Bing” cherries is mainly dependent on fruit SCC and visual skin color. *Postharvest Biology and Technology*. 28, 159-167.
- Csukasi, F., Osorio, S., Gutierrez, J.R., Kitamura, J., Giavalisco, P., Nakajima, M, Fernie, A.R., Rathjen, J.P., Botella, M.A., Valpuesta, V. & Medina-Escobar, N. (2011). Gibberellin biosynthesis and signalling during development of the strawberry receptacle. *New Phytologist*. 191, 376-390.
- da Silva Vieira, M.R., Citadini, V., Lima, G.P.P., de Souza, A.V. & de Souza Alves, L. (2010). Use of gibberellin in floriculture. *African Journal of Biotechnology*. 9, 9118-9121.
- Dardick, C. & Callahan, A.M. (2014). Evolution of the fruit endocarp: molecular mechanisms underlying adaptations in seed protection and dispersal. *Frontiers in Plant Science*. 5, 284.
- Darwin, C. (1880). *The power of movement in plants*. John Murray. London, UK.
- Davies, C., Boss, P.K. & Robinson, S.P. (1997). Treatment of grape berries, a nonclimacteric fruit with a synthetic auxin, retards ripening and alters the expression of developmentally regulated genes. *Plant Physiology*. 115, 1155-1161.
- Delany, T.P. (2004). Salicylic Acid. In: Davies, P.J. (ed). *Plant hormones biosynthesis, signal transduction, action!* 3rd edition. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

- Demole, E., Lederer, E. & Mercier, D. (1962). Isolement et détermination de la structure du jasmonate de méthyle, constituant odorant caractéristique de l'essence de jasmin. *Helvetica Chimica Acta*. 45, 675-685.
- Dempsey, D'M.A., Vlot, A.C., Wildermuth, M.C & Klessig, D.F. (2011). Salicylic Acid Biosynthesis and Metabolism. *The Arabidopsis Book*. 9, 156.
- Dirlewanger, E., Cosson, P., Tavaud, M., Aranza, M.J., Poizat, C., Zanetto, A., Arús, P. & Laigret, F. (2002). Development of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Theoretical & Applied Genetics*. 105, 127-138.
- Dobrąnszki, J. & Mandler-Drienyovszki, N. (2014). Cytokinin-induced changes in the chlorophyll content and fluorescence of in vitro apple leaves. *Journal of Plant Physiology*. 171, 1472-1478.
- Dollins, A.B., Zhdanova, I.V., Wurtman, R.J., Lynch, H.J. & Deng, M.H. (1994). Effect of inducing nocturnal serum melatonin concentrations in daytime on sleep, mood, body temperature, and performance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 91, 1824-1828.
- Doster, M.A. & Michailides, T.J. (1999). Relationship between shell discoloration of pistachio nuts and incidences of fungal decay and insect infestation. *Plant Disease*. 83, 259-264.
- Downes, B.P., Steinbaker, C.R. & Crowell, D.N. (2001). Expression and processing of a hormonally regulated beta-expansin from soybean. *Plant Physiology*. 126, 244-252.
- Dubbels, R., Reiter, R.J., Klenke, E., Goebel, A., Schnakenberg, E., Ehlers, C., Schiwara, H.W. & Schloot, W. (1995). Melatonin in edible plants

- identified by radioimmunoassay and by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Pineal Research*. 18, 28-31.
- Durrant, W.E. & Dong, X. (2004). Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*. 24, 185-209.
- Ellis, C.M., Nagpal, P., Young, J.C., Hagen, G., Guilfoyle, T.J. & Reed, J.W. (2005). AUXIN RESPONSE FACTOR1 and AUXIN RESPONSE FACTOR2 regulate senescence and floral organ abscission in *Arabidopsis thaliana*. *Development*. 132, 4563-4574.
- Farinati, S., Rasori, A., Varotto, S. & Bonghi, C. (2017). *Rosaceae* fruit development, ripening and post-harvest: An epigenetic perspective. *Frontiers in Plant Science*. 8, 1247.
- Feng, X., Wang, M., Zhao, Y., Han, P. & Dai, Y. (2014). Melatonin from different fruit sources, functional roles, and analytical methods. *Trends in Food Science & Technology*. 37, 21-31.
- Feussner, I. & Wasternack, C. (2002). The lipoxygenase pathway. *Annual Review of Plant Biology*. 53, 275-297.
- Finkelstein, R. (2013). Abscisic acid synthesis and response. *The Arabidopsis Book*. 11, 166.
- Food and agriculture organization of the United Nations (FAO). FAOSTAT. <http://www.fao.org/faostat/en> Accessed 2 April 2018.
- Frébort, I., Kowalska, M., Hluska, T., Frébortová, J. & Galuszka, P. (2011). Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *Journal of Experimental Botany*. 62, 2431-2452.

- Freeman, J.L., Garcia, D., Kim, D., Hopf, A.M. & Salt, D.E. (2005). Constitutively elevated salicylic acid signals glutathione-mediated nickel tolerance in *Thlaspi* nickel hyperaccumulators. *Plant Physiology*. 137, 1082-1091.
- Ganser, D., Latza, S. & Berger, R.G. (1997). Methyl jasmonate in developing strawberry (*Fragaria ananasa* Duch. Cv. Kent). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45, 2477-2480.
- Gardner, H.W. (1979). Lipid hydroperoxide reactivity with proteins and amino acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 27, 220-229.
- Garrido-Bigotes, A., Figueroa, P.M. & Figueroa, C.R. (2018). Jasmonate metabolism and its relationship with abscisic acid during strawberry fruit development and ripening. *Journal of Plant Growth Regulation*. 37, 101.
- Giovannoni, J.J. (2004). Genetic regulation of fruit development and ripening. *The Plant Cell*. 16, 170-180.
- Gong, Y., Fan, X. & Mattheis, J.P. (2002). Response of 'Bing' and 'Rainier' sweet cherries to ethylene and 1-methylcyclopropene. *Journal of American Society for Horticulture Science*. 127, 831-835.
- Grant, M. & Lamb, C. (2006). Systemic immunity. *Current Opinion in Plant Biology*. 9, 414-420.
- Hardeland, R., Madrid, J.A., Tan, D.X. & Reiter, R.J. (2012). Melatonin, the circadian multioscillator system and health: the need for detailed analysis of peripheral melatonin signal. *Journal of Pineal Research*. 52, 139-166.
- Hattori, A., Migitaka, H., Iigo, M., Yamamoto, K., Ohtani-Kaneko, R., Hara, M., Suzuki, T. & Reiter, R.J. (1995). Identification of melatonin in plants and its effects on plasma melatonin levels and binding to melatonin

- receptors in vertebrates. *Biochemistry and Molecular Biology International*. 35, 627-634.
- He, J. & Giusti, M.M. (2010). Anthocyanins: Natural colorants with health-promoting properties. *Annual Review of Food Science and Technology*. 1, 163-187.
- Hedden, P. & Thomas, S.G. (2012). Gibberellin biosynthesis and its regulation. *Biochemical Journal*. 444, 11-25.
- Hernández-Ruiz, J., Cano, A. & Arnao, M.B. (2005). Melatonin acts as a growth-stimulating compound in some monocot species. *Journal of Pineal Research*. 39, 137-142.
- Hernández-Ruiz, J., Cano, A. & Arnao, M.B. (2004). Melatonin: a growth-stimulating compound present in lupin tissues. *Planta*. 220, 140-144.
- Howe, G.A. (2004). Jasmonates. In: Davies, P.J. (ed). *Plant hormones biosynthesis, signal transduction, action!* 3rd edition Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Hu, W., Yang, H., Tie, W., Yan, Y., Ding, Z., Liu, Y., Wu, C., Wang, J., Reiter, R.J., Tan, D.X., Shi, H., Xu, B. & Jin, Z. (2017). Natural variation in banana varieties highlights the role of melatonin in postharvest ripening and quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 65, 9987-9994.
- Hummer, K.E. & Janick, J. (2009). Rosaceae: Taxonomy, economic importance, genomics. In: Folta, K.M. & Gardiner, S.E. (eds). *Genetics and Genomics of Rosaceae*. 6th edition, Springer, New York, USA.
- Hussain, M., Hamid, M.I. & Ghazanfar, M.U. (2014). Salicylic acid induced resistance in fruits to combat against postharvest pathogens: a review. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. 48, 34-42.

- Inouye, S. (1984). Site-specific cleavage of double-strand DNA by hydroperoxide of linoleic acid. *FEBS Letters*. 172, 231-234.
- Janick, J. (2005). The origins of fruits, fruit growing, and fruit breeding. *Plant Breeding Reviews*. 25, 255-320.
- Jenik, P.D & Barton, M.K. (2005). Surge and destroy: the role of auxin in plant embryogenesis. *Development*. 132, 3577-3585.
- Jia, H., Wang, Y., Sun, M., Li, B., Han, Y., Zhao, Y., Li, X., Ding, N., Li, C., Ji, W. & Jia, W. (2013). Sucrose functions as a signal involved in the regulation of strawberry fruit development and ripening. *New Phytologist*. 198, 453-465.
- Jia, H.F., Chai, Y.M., Li, C.L., Luo, J.J., Qin, L. & Shen, Y.Y. (2011). Abscisic acid plays an important in the regulation of strawberry fruit ripening. *Plant Physiology*. 157, 188-199.
- Jiang, Y., Joyce, D.C. & Terry, L.A. (2001). 1-Methylcyclopropene treatment affects strawberry fruit decay. *Postharvest Biology and Technology*. 23, 227-232.
- Kang, H.M. & Saltveit, M.E. (2002). Chilling tolerance of maize, cucumber and rice seedling leaves and roots are differentially affected by salicylic acid. *Physiologia Plantarum*. 115, 571-576.
- Kappel, F. & MacDonald, R.A. (2002). Gibberellic acid increases fruit firmness, fruit size, and delays maturity of 'Sweetheart' sweet cherry. *Journal of the American Pomological Society*. 56, 219-222.
- Kappel, F., Toivonen, P., McKenzie, D. L. & Stan, S. (2002). Storage characteristics of new sweet cherry cultivars. *Horticultural Science*. 37, 139-143.

- Kelley, D.S., Adkins, Y. & Laugero, K.D. (2018). A review of the health benefits of cherries. *Nutrients*. 10, 368.
- Kieber, J.J. & Schaller, G.E. (2014). Cytokinins. *The Arabidopsis Book*. 12.
- Kim, H.J., Ryu, H., Hong, S.H., Woo, H.R., Lim, P.O., Lee, I.C., Sheen, J., Nam, H.G. & Hwang, I. (2006). Cytokinin-mediated control of leaf longevity by AHK3 through phosphorylation of ARR2 in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103, 814-819.
- Klee, H.J. & Clark, D.G. (2004). Ethylene signal transduction in fruits and flowers. In: Davies, P.J. (ed). *Plant hormones biosynthesis, signal transduction, action!* 3rd edition. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Kobashi, K., Sugaya, S., Gemma, H. & Iwahori, S. (2001). Effect of abscisic acid (ABA) on sugar accumulation in the flesh tissue of peach fruit at the start of the maturation stage. *Plant Growth Regulation*. 35, 215-223.
- Koepfli, J.B., Thimann, K.V. & Went, F.W. (1938). Phytohormones: structure and physiological activity. I. *Journal of Biological Chemistry*. 122, 763-780.
- Kondo, S. (2010). Roles of jasmonates in fruit ripening and environmental stress. *Acta Horticulturae*. 884,711-716.
- Kondo, S. & Inoue, K. (1997). Abscisic acid and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) content during growth of 'Satohnishiki' cherry fruit, and the effect of ABA and ethephon application on fruit quality. *Journal of Horticultural Science*. 72, 221-227.
- Korasick, D.A., Enders, T.A. & Strader, L.C. (2013). Auxin biosynthesis and storage forms. *Journal of Experimental Botany*. 64, 2541-2555.

- Kuiper, D. (1988). Growth response of *Plantago major* L. ssp. *pleiosperma* (Pilger) to changes in mineral supply: evidence for regulation by cytokinins. *Plant Physiology*. 87, 555-557
- Kumar, R., Khurana, A. & Sharma, A.K. (2014). Role of plant hormones and their interplay in development and ripening of fleshy fruits. *Journal of Experimental Botany*. 65, 4561-4575.
- Larkindale, J. & Knight, M.R. (2002). Protection against heat stress-induced oxidative damage in *Arabidopsis* involves calcium, abscisic acid, ethylene, and salicylic acid. *Plant Physiology*. 128, 682-695.
- Lee, S., Cheng, H., King, K.E., Wang, W., He, Y., Hussain, A., Lo, J., Harberd, N.P. & Peng, J. (2002). Gibberellin regulates *Arabidopsis* seed germination via RGL2, a GAI/RGA-like gene whose expression is up-regulated following imbibition. *Genes & Development*. 16, 646-658.
- Lelievre, J.M., Latche, A., Jones, B., Bouzayen, M. & Pech, J.C. (1997). Ethylene and fruit ripening. *Physiologia Plantarum*. 101, 727-39.
- Lerner, A.B., Case, J.D., Takahashi, Y., Lee, T.H. & Mori, W. (1958). Isolation of melatonin, a pineal factor that lightens melanocytes. *Journal of the American Chemical Society*. 80, 2587.
- Letham, D.S. (1963). Zeatin, a factor inducing cell division isolated from *Zea mays*. *Life Sciences*. 8, 569-573.
- Levey, D.J. (2004). The evolutionary ecology of ethanol production and alcoholism. *Integrative and Comparative Biology*. 44, 284-289
- Li, C., Tan, D.X., Liang, D., Chang, C. Jia, D. & Ma, F. (2015). Melatonin mediates the regulation of ABA metabolism, free-radical scavenging, and

- stomatal behaviour in two *Malus* species under drought stress. *Journal of Experimental Botany*. 66, 669-680.
- Li, C., Jia, H., Chai, Y. & Shen, Y. (2011). Abscisic acid perception and signaling transduction in strawberry: a model for non-climacteric fruit ripening. *Plant Signaling & Behavior*. 6, 1950-1953.
- Li, H., Chang, J., Chen, H., Wang, Z., Gu, X., Wei, C., Zhang, Y., Ma, J., Yang, J., & Zhang, X. (2017). Exogenous melatonin confers salt stress tolerance to watermelon by improving photosynthesis and redox homeostasis. *Frontiers in Plant Science*. 8, 295.
- Li, K.T. (2012). Physiology and classification of fruits. In: Sinha, N.K., Sidhu, J.S., Barta, J., Wu, J.S.B. & Cano, M.P. (eds). Handbook of fruits and fruit processing. 2nd edition. John Wiley & Sons, Iowa, USA.
- Liu, D.J., Chen, J.Y. & Lu, W.J. (2010). Expression and regulation of the early auxin-responsive Aux/IAA genes during strawberry fruit development. *Molecular Biology Reports*. 38, 1187-1198.
- Liu, J., Zhang, R., Sun, Y., Liu, Z., Jin, W. & Sun, Y. (2016). The beneficial effects of exogenous melatonin on tomato fruit properties. *Scientia Horticulturae*. 207, 14-20.
- Liu, J., Osbourn, A. & Ma1, P. (2015). MYB Transcription Factors as regulators of phenylpropanoid metabolism in plants. *Molecular Plant*. 8, 689-708.
- Loreti, E., Povero, G., Novi, G., Solfanelli, C., Alpi, A. & Perata, P. (2008). Gibberellins, jasmonate and abscisic acid modulate the sucrose-induced expression of anthocyanin biosynthetic genes in *Arabidopsis*. *New Phytologist*. 179, 1004-1016.

- Ludwig-Müller, J. & Cohen, J.D. (2002). Identification and quantification of three active auxins in different tissues of *Tropaeolum majus*. *Physiologia Plantarum*. 115, 320-329.
- Ma, X., Zhang, J., Burgess, P., Rossi, S. & Huang, B. (2018). Interactive effects of melatonin and cytokinin on alleviating drought-induced leaf senescence in creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera*). *Environmental and Experimental Botany*. 145, 1-11.
- Magwazaa, L.S. & Oparab, U.L. (2015). Analytical methods for determination of sugars and sweetness of horticultural products - A review. *Scientia Horticulturae*. 184, 179-192.
- Marowa, P., Ding, A. & Kong, Y. (2016). Expansins: roles in plant growth and potential applications in crop improvement. *Plant Cell Reports*. 35, 949-965.
- Marta, B., Szafranska, K., & Posmyk, M.M. (2016). Exogenous melatonin improves antioxidant defense in cucumber seeds (*Cucumis sativus* L.) germinated under chilling stress. *Frontiers in Plant Science*. 7, 575.
- Massolo, J.F., Lemoine, M.L., Chaves, A.R., Concellón, A. & Vicente, A.R. (2014). Benzyl-aminopurine (BAP) treatments delay cell wall degradation and softening, improving quality maintenance of refrigerated summer squash. *Postharvest Biology and Technology*. 93, 122-129.
- Mauseth, J.D. (2016). Botany: an introduction to plant biology. 6th edition. Jones & Bartlett Learning. Burlington, Massachusetts, USA.
- McAtee, P., Karim, S., Schaffer, R. & David, K. (2013). A dynamic interplay between phytohormones is required for fruit development, maturation, and ripening. *Frontiers in Plant Science*. 4, 79.

- Meng, J.F., Xu, T.F., Song, C.Z., Yu, Y., Hu, F., Zhang, L., Zhang, Z.W. & Xi, Z.M. (2015). Melatonin treatment of pre-veraison grape berries to increase size and synchronicity of berries and modify wine aroma components. *Food Chemistry*. 185, 127-134.
- Metwally, A., Finkemeier, I., Georgi, M. & Dietz, K.J. (2003). Salicylic acid alleviates the cadmium toxicity in barley seedlings. *Plant Physiology*. 132, 272-281.
- Miller, C.O., Skoog, F., von Saltza, M.H. & Strong, F.M. (1955). Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *Journal of the American Chemical Society*. 77, 1392-1392.
- Mok, D.W. & Mok, M.C. (2001). Cytokinin metabolism and action. *Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 52, 89-118.
- Mosblech, A., Feussner, I. & Heilmann, I. (2009). Oxylipins: structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation. *Plant Physiology and Biochemistry*. 47, 511-517.
- Muday, G. (2001). Auxins and tropisms. *Journal of Plant Growth Regulation*. 20, 226-243.
- Mueller, M.J. (2004). Archetype signals in plants: the phytoprostanes. *Current Opinion in Plant Biology*. 7, 441-448.
- Munné-Bosch, S. & Peñuelas, J. (2003). Photo- and antioxidative protection, and a role for salicylic acid during drought and recovery in field grown *Phillyrea angustifolia* plants. *Planta*. 217, 758-766.
- Muñoz, P. & Munné-Bosch, S. (2018). Photo-oxidative stress during leaf, flower and fruit development. *Plant Physiology*. 176, 1004-1014.

- Murch, S.J., Hall, B.A., Le, C.H. & Saxena, P.K. (2010). Changes in the levels of indoleamine phytochemicals during véraison and ripening of wine grapes. *Journal of Pineal Research*. 49, 95-100.
- Murch, S.J., Krishnaraj, S. & Saxena, P.K. (2000). Tryptophan is a precursor for melatonin and serotonin biosynthesis in *in vitro* regenerated St John's wort (*Hypericum perforatum* L. cv. Anthos) plants. *Plant Cell Reports*. 19, 698-704.
- Nakano, R., Ogura, E., Kubo, Y. & Inaba, A. (2003). Ethylene biosynthesis in detached young persimmon fruit is initiated in calyx and modulated by water loss from the fruit. *Plant Physiology*. 131, 276-286.
- Nambara, E. & Marion-Poll, A. (2005). Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annual Review of Plant Biology*. 56, 165-85.
- Nawaz, M.A., Huang, Y., Bie, Z., Ahmed, W., Reiter, R.J., Niu, M., & Hameed, S. (2016). Melatonin: current status and future perspectives un plant science. *Frontiers in Plant Science*. 6, 1230
- NeSmith, D.S. (2002). Response of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei* Reade) to the growth regulators CPPU and gibberellic acid. *HortScience*. 37, 666-668.
- Ohmiya, A. & Haji, T. (2002). Promotion of ethylene biosynthesis in peach mesocarp discs by auxin. *Plant Growth Regulation*. 36, 209-214.
- Olmstead, J.W., Iezzoni, A.F. & Whiting, M.D. (2007). Genotypic differences in sweet cherry fruit size are primarily a function of cell number. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 132, 697-703.

- Özkaya, O., Dündar, Ö. & Küden, A. (2006). Effect of preharvest gibberellic acid treatments on postharvest quality of sweet cherry. *Journal of Food, Agriculture and Environment*. 4, 189-191.
- Pandi-Perumal, S.R., Trakht, I., Srinivasan, V., Spence, D.W., Maestroni, G.J.M., Zisapel, N. & Cardinali, D.P. (2008). Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Progress in Neurobiology*. 85, 335-353.
- Pelagio-Flores, R., Muñoz-Parra, E., Ortiz-Castro, R. & López-Bucio, J. (2012). MT regulates Arabidopsis root system architecture likely acting independently of auxin signaling. *Journal of Pineal Research*. 53, 279-288.
- Peleg, Z. & Blumwald, E. (2011). Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. *Current Opinion in Plant Biology*. 14, 290-295.
- Peppi, M.C. & Fidelibus, M.W. (2008). Effects of forchlorfenuron and abscisic acid on the quality of 'Flame Seedless' grapes. *HortScience*. 43, 173-176.
- Perez, A.G, Sanz, C., Olias, R. & Olias, M. (1997). Effect of methyl jasmonate on in vitro strawberry ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45, 3733-3737.
- Perrot-Rechenmann, C. (2010). Cellular responses to auxin: Division versus expansion. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2, 1-15.
- Pfluger, J. & Zambryski, P. (2004). The role of SEUSS in auxin response and floral organ patterning. *Development*. 131, 4697-4707.

- Phinney, B.O. (1956). Growth response of single-gene dwarf mutants in maize to gibberellic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 42, 185-189.
- Posmyk, M.M. & Janas, K.M. (2009). Melatonin in plants. *Acta Physiologiae Plantarum*. 31, 1-11.
- Quero-García, J., Schuster, M., López-Ortega, G. & Charlot, G. (2017). Sweet cherry varieties and improvement. In: Quero-García, J., Iezzoni, A., Pulawska, J. & Lang, G. (eds). *Cherries: Botany, Production and Uses*. CABI. Boston, Massachusetts, USA.
- Rademacher, W. (2015). Plant growth regulators: Backgrounds and uses in plant production. *Journal of Plant Growth Regulation*. 34, 845-872.
- Rapoport, H.F., Pérez-López, D., Hammami, S.B.M., Agüera, J. & Moriana, A. (2013). Fruit pit hardening: physical measurement during olive fruit growth. *Annals of Applied Biology*. 163, 200-208.
- Rayle, D.L. & Cleland, R. (1992). The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiology*. 99, 1271-1274.
- Reiter, R.J., Tan, D.X., Zhou, Z., Cruz, M.H.C., Fuentes-Broto, L. & Galano, A. (2015). Phytomelatonin: assisting plants to survive and thrive. *Molecules*. 20, 7396-7437.
- Reiter, R.J., Tan, D.X., Rosales-Corral, S. & Manchester, L.C. (2013). The universal nature, unequal distribution and antioxidant functions of melatonin and its derivatives. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 13, 373-384.
- Reiter, R.J. (1993). The melatonin rhythm: Both a clock and a calendar. *Experientia*. 49, 654-664.

- Reiter, R.J. (1991). Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocrine Reviews*. 12, 151-180.
- Rivas-San Vicente, M. & Plasencia, J. (2011). Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. *Journal of Experimental Botany*. 62, 3321-3338.
- Roitsch, T. & González, M.C. (2004). Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. *Trends in Plant Science*. 9, 606-613.
- Roitsch, T. & Ehneß, R. (2000). Regulation of source/sink relations by cytokinins. *Plant Growth Regulation*. 32, 359.
- Romero, P., Gandía, M. & Alférez, F. (2013). Interplay between ABA and phospholipases A2 and D in the response of citrus fruit to postharvest dehydration. *Plant Physiology and Biochemistry*. 70, 287-294.
- Sakakibara, H. (2006). Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annual Review of Plant Biology*. 57, 431-449.
- Salazar-Cerezo, S., Martínez-Montiela, N., García-Sánchez, J., Pérez-Y-Terrón, R. & Martínez-Contreras, R.D. (2018). Gibberellin biosynthesis and metabolism: A convergent route for plants, fungi and bacteria. *Microbiological Research*. 208, 85-98.
- Sallato, B.V., Torres, R. Zoffoli, J.P. & Latorre, B.A. (2007). Effect of boscalid on postharvest decay of strawberry caused by *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifera*. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 5, 67-78.
- Sarropoulou, V., Dimassi-Therious, K., Therios, I. & Koukourikou-Petridou, M. (2012). Melatonin enhances root regeneration, photosynthetic pigments, biomass, total carbohydrates and proline content in the cherry

- rootstock PHL-C (*Prunus avium* x *Prunus cerasus*). *Plant Physiology and Biochemistry*. 61, 162-168.
- Sayyari, M., Babalar, M., Kalantari, S., Serrano, M. & Valero, D. (2009). Effect of salicylic acid treatment on reducing chilling injury in stored pomegranates. *Postharvest Biology and Technology*. 53, 152-154.
- Schaefer, H.M., Schaefer, V. & Levey, D.J. (2004). How plant-animal interactions signal new insights in communication. *Trends in Ecology and Evolution*. 19, 577-584.
- Schaller, A. & Stintzi, A. (2009). Enzymes in jasmonate biosynthesis - Structure, function, regulation. *Phytochemistry*. 70, 1532-1538.
- Schwartz, S.H. & Zeevaart, J.A.D. (2004). Abscisic acid biosynthesis and metabolism. In: Davies, P.J. (ed). *Plant hormones biosynthesis, signal transduction, action!* 3rd edition. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands.
- Schwartz, S.H., Tan, B.C., Gage, D.A., Zeevaart, J.A.D. & McCarty, D.R. (1997). Specific oxidative cleavage of carotenoid by VP14 of maize. *Science*. 276, 1872-1874.
- Serrano, M., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Castillo, S. & Valero, D. (2005). Chemical constituents and antioxidant activity of sweet cherry at different ripening stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53, 2741-2745.
- Seymour, G.B., Ostergaard, L., Chapman, N.H., Knapp, S. & Martin, C. (2013). Fruit development and ripening. *Annual Review of Plant Biology*. 64, 219-241.

- Shah, J. (2003). The salicylic acid loop in plant defense. *Current Opinion in Plant Biology*. 6, 365-371.
- Shen, X., Zhao, K., Liu, L., Zhang, K., Yuan, H., Liao, X., Wang, Q., Guo, X., Li, F. & Li, T. (2014). A role for PacMYBA in ABA-regulated anthocyanin biosynthesis in red-colored sweet cherry cv. Hong Deng (*Prunus avium* L.). *Plant and Cell Physiology*. 55, 862-880.
- Shida, C.S, Castrucci, A.M.L. & Lamy-Freund, M.T. (1994). High melatonin solubility in aqueous medium. *Journal of Pineal Research*. 16, 198-201.
- Shimizu-Sato, S., Tanaka, M. & Mori, H. (2009). Auxin-cytokinin interactions in the control of shoot branching. *Plant Molecular Biology*. 69, 429-435.
- Sinopoli, A., Calogero, G. & Bartolotta, A. (2019). Computational aspects of anthocyanidins and anthocyanins: A review. *Food Chemistry*. DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.05.172
- Siriphollakul, P., Niyomlao, W. & Kanlayanarat, S. (2006). Antitranspirants maintain freshness and improve storage life of rambutan (*Nephellium lappaceum* L.) fruit. *Acta Horticulturae*. 712, 611-616.
- Sponsel, V.M. & Hedden, P. (2004). Gibberellin biosynthesis and inactivation. In: Davies, P.J. (ed). *Plant hormones biosynthesis, signal transduction, action!* 3rd edition. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands.
- Srivastava, M.K. & Dwivedi, U. (2000). Delayed ripening of banana fruit by salicylic acid. *Plant Science*. 158, 87-96.
- Stowe, B.B & Yamaki, T. (1957). The history and physiological action of the gibberellins. *Annual Review of Plant Physiology*. 8, 181-216.

- Sun, Q., Zhang, N., Wang, J., Cao, Y., Li, X., Zhang, H., Zhang, L., Tan, D. & Guo, Y. (2016). A label-free differential proteomics analysis reveals the effect of melatonin on promoting fruit ripening and anthocyanin accumulation upon postharvest in tomato. *Journal of Pineal Research*. 61, 138-153.
- Sun, Q., Zhang, N., Wang, J., Zhang, H., Li, D., Shi, J., Li, R., Weeda, S., Zhao, B., Ren, S. & Guo, Y.D. (2015). Melatonin promotes ripening and improves quality of tomato fruit during postharvest life. *Journal of Experimental Botany*. 66, 657-68.
- Sun, T.P. (2008). Gibberellin metabolism, perception and signaling pathways in Arabidopsis. *The Arabidopsis Book*. 6, 103
- Symons, G.M., Chua, Y.J., Ross, J.J., Quittenden, L.J., Davies, N.W. & Reid, J.B. (2012). Hormonal changes during non-climacteric ripening in strawberry. *Journal of Experimental Botany*. 63, 4741-4750.
- Takei, K., Yamaya, T. & Sakakibara, H. (2004). Arabidopsis CYP735A1 and CYP735A2 encode cytokinin hydroxylases that catalyze the biosynthesis of *trans*-zeatin. *Journal of Biological Chemistry*. 279, 41866-41872.
- Takei, K., Sakakibara, H. & Sugiyama, T. (2001). Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*. 276, 26405-26410.
- Tamaki, S., Matsuo, S., Wong, H.L., Yokoi, S. & Shimamoto, K. (2007). Hd3a protein is a mobile flowering signal in rice. *Science*. 316, 1033-1036.
- Tan, D.X., Hardeland, R., Manchester, L.C., Korkmaz, A., Ma, S., Rosales-Corral, S. & Reiter, R.J. (2012). Functional roles of melatonin in plants,

- and perspectives in nutritional and agricultural science. *Journal of Experimental Botany*. 63, 577-597.
- Tanaka, Y., Sasaki, N. & Ohmiya, A. (2008). Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *Plant Journal*. 54, 733-749.
- Tsaniklidis, G., Kafkaletou, M., Delis, C. & Tsantili, E. (2017). The effect of postharvest storage temperature on sweet cherry (*Prunus avium* L.) phenolic metabolism and colour development. *Scientia Horticulturae*. 225, 751-756.
- Tucker, G.A. (1993). Introduction. In: Seymour, G. B., Taylor, J. E. & Tucker, G. A. (eds). *Biochemistry of Fruit Ripening*. Springer. Dordrecht, The Netherlands.
- Usenik, V., Stampar, F. & Veberic, R. (2009). Anthocyanins and fruit colour in plums (*Prunus domestica* L.) during ripening. *Food Chemistry*. 114, 529-534.
- Usenik, V., Fabcic, J. & Stampar, F. (2008). Sugars, organic acids, phenolic composition and antioxidant activity of sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Food Chemistry*. 107, 185-192.
- Valero, D., Díaz-Mula, H.M., Zapata, P.J., Castillo, S., Guillén, F., Martínez-Romero, D. & Serrano, M. (2011). Postharvest treatments with salicylic acid, acetylsalicylic acid or oxalic acid delayed ripening and enhanced bioactive compounds and antioxidant capacity in sweet cherry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59, 5483-5489.
- Valero, D. & Serrano, M. (2010). *Postharvest and technology for preserving fruit quality*. CRC Press. Florida, USA.

- Valverde, C. (2014). Global agricultural information network. USDA Foreign Agricultural Service.
- Van der Pijl, L. (1982). Principles of Dispersal in Higher Plants. 3rd ed. Springer-Verlag, New York, USA.
- Villarreal, N.M., Martínez, G.A. & Civello, P.M. (2009). Influence of plant growth regulators on polygalacturonase expression in strawberry fruit. *Plant Science*. 176, 749-757
- Vitalini, S., Gardana, C., Zanzotto, A., Simonetti, P., Faoro, F., Fico, G. & Iriti, M. (2011). The presence of melatonin in grapevine (*Vitis vinifera* L.) berry tissues. *Journal of Pineal Research*. 55, 424-434.
- Vlot, A.C., Dempsey, D.M.A. & Klessig, D.F. (2009). Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology*. 47, 177-206.
- Wang, P., Sun, X., Xie, Y., Li, M., Chen, W., Zhang, S., Liang, D. & Ma, F. (2014). Melatonin regulates proteomic changes during leaf senescence in *Malus hupehensis*. *Journal of Pineal Research*. 57, 291-307.
- Wang, P., Yin, L., Liang, D., Li, C., Ma, F. & Yue, Z. (2011). Delayed senescence of apple leaves by exogenous melatonin treatment: toward regulating the ascorbate–glutathione cycle. *Journal of Pineal Research*. 53, 11-20.
- Wang, Q., An, B., Wei, Y., Reiter, R. J., Shi, H., Luo, H. & He, C. (2016). Melatonin regulates root meristem by repressing auxin synthesis and polar auxin transport in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science*. 7, 1882.
- Wang, S.Y., Bowman, L. & Ding, M. (2008). Methyl jasmonate enhances antioxidant activity and flavonoid content in blackberries (*Rubus* sp.) and

- promotes antiproliferation of human cancer cells. *Food chemistry*. 107, 1261-1269.
- Wang, S.Y. & Zheng, W. (2005). Preharvest application of methyl jasmonate increases fruit quality and antioxidant capacity in raspberries. *International Journal of Food Science and Technology*. 40, 187-195.
- Wang, Y., Chen, P., Sun, L., Li, Q., Dai, S., Sun, Y., Kai, W., Zhang, Y., Liang, B. & Leng, P. (2015a). Transcriptional regulation of PaPYLs, PaPP2Cs and PaSnRK2s during sweet cherry fruit development and in response to abscisic acid and auxin at onset of fruit ripening. *Journal of Plant Growth Regulation*. 75, 455-464.
- Wang, Y.H. & Irving, H.R. (2011). Developing a model of plant hormone interactions. *Plant Signaling & Behavior*. 6, 494-500.
- Wang, Z., Ma, L., Zhang, X., Xu, L., Cao, J. & Jiang, W. (2015b). The effect of exogenous salicylic acid on antioxidant activity, bioactive compounds and antioxidant system in apricot fruit. *Scientia Horticulturae*. 181, 113-120.
- Wanke, M., Skorupinska-Tudek, K. & Swiezewska, E. (2001). Isoprenoid biosynthesis via 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate/2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (DOXP/MEP) pathway. *Acta Biochimica Polonia*. 48, 663-672.
- Wasternack, C. & Kombrick, E. (2010). Jasmonates: structural requirements for lipids-derived signals active in plant responses and development. *ACS Chemical Biology*. 5, 63-77.
- Wasternack, C. (2007). Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals of Botany*. 100, 681-697.

- Wasternack, C. & Hause, B. (2002). Jasmonates and octadecanoids: signals in plant stress responses and development. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. 72, 165-221.
- Went, F.W. (1942). Growth, auxin, and tropisms in decapitated *Avena* coleoptiles. *Plant Physiology*. 17, 236-249.
- Werner, T. & Schmülling, T. (2009). Cytokinin action in plant development. *Current Opinion in Plant Biology*. 12, 527-538.
- Werner, T., Motyka, V., Laucou, V., Smets, R., Van Onckelen, H. & Schmülling, T. (2003). Cytokinin deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *Plant Cell*. 15, 2532-2550.
- Werner, T., Motyka, V., Strnad, M. & Schmulling, T. (2001). Regulation of plant growth by cytokinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 98, 10487-10492.
- Woodward, A.W. & Bartel, B. (2005). Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of Botany*. 95, 707-735.
- Xie, R., Gel, T., Zhang, L., Pan, X., Ma, Y., Yi, S. & Zheng, Y. (2018). The molecular events of IAA inhibiting citrus fruitlet abscission revealed by digital gene expression profiling. *Plant Physiology and Biochemistry*. 130, 192-204.
- Xiong, L. & Zhu, J.K. (2003). Regulation of abscisic acid biosynthesis. *Plant Physiology*. 133, 29-36.

- Xu, L., Yue, Q., Xiang, G., Bian, F. & Yao, Y. (2018). Melatonin promotes ripening of grape berry via increasing the levels of ABA, H₂O₂, and particularly ethylene. *Horticulture Research*. 5, 41.
- Yabuta, T. & Sumiki, Y. (1938). On the crystal of gibberellin, a substance to promote plant growth. *Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan*. 14, 1526.
- Yamaguchi, S. (2008). Gibberellin metabolism and its regulation. *Annual Review of Plant Biology*. 59, 225-251.
- Yan, J., Li, S., Gu, M., Yao, R., Li, Y., Chen, J., Yang, M., Tong, J., Xiao, L., Nan, F. & Xie, D. (2016). Endogenous bioactive jasmonate is composed of a set of (+)-7-*iso*-JA-amino acid conjugates. *Plant Physiology*. 172, 2154-2164.
- Yao, H. & Tian, S. (2005). Effects of pre- and post-harvest application of salicylic acid or methyl jasmonate on inducing disease resistance of sweet cherry fruit in storage. *Postharvest Biology and Technology*. 35, 253-262.
- Zhang, C. & Whiting, M. (2012). Plant growth regulators improve sweet cherry fruit quality without reducing endocarp growth. *Scientia Horticulturae*. 150, 73-79.
- Zhang, C. & Whiting, M.D. (2011). Improving 'Bing' sweet cherry fruit quality with plant growth regulators. *Scientia Horticulturae*. 127, 341-346.
- Zhang, C., Lee, U. & Tanabe, K. (2008). Hormonal regulation of fruit set, parthenogenesis induction and fruit expansion in Japanese pear. *Plant Growth Regulation*. 55, 231.

- Zhang, C., Tanabe, K., Tamura, F., Itai, A. & Yoshida, M. (2007). Roles of gibberellins in increasing sink demand in Japanese pear fruit during rapid fruit growth. *Plant Growth Regulation*. 52, 161-172.
- Zhang, J., Shi, Y., Zhang, X., Du, H., Xu, B. & Huang, B. (2017). Melatonin suppression of heat-induced leaf senescence involves changes in abscisic acid and cytokinin biosynthesis and signaling pathways in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Environmental and Experimental Botany*. 138, 36-45.
- Zhang, M., Leng, P., Zhang, G. & Li, X. (2009). Cloning and functional analysis of 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED) genes encoding a key enzyme during abscisic acid biosynthesis from peach and grape fruits. *Journal of Plant Physiology*. 166, 1241-1252.
- Zhang, Y., Butelli, E. & Martin, C. (2014). Engineering anthocyanin biosynthesis in plants. *Current Opinion in Plant Biology*. 19, 81-90.
- Zhao, H., Su, T., Huo, L., Wei, H., Jiang, Y., Xu, L. & Ma, F. (2015a). Unveiling the mechanism of melatonin impacts on maize seedling growth: sugar metabolism as a case. *Journal of Pineal Research*. 59, 255-266.
- Zhao, H., Xu, L., Su, T., Jiang, Y., Hu, L. & Ma, F. (2015b). Melatonin regulates carbohydrate metabolism and defenses against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 infection in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Pineal Research*. 59, 109-119.
- Zhao, Y., Collins, H.P., Knowles, N.R. & Oraguzie, N. (2013). Respiratory activity of ‘Chelan’, ‘Bing’ and ‘Selah’ sweet cherries in relation to fruit traits at green, white-pink, red and mahogany ripening stages. *Scientia Horticulturae*. 161, 239-248.

Z rcher, E., Liu, J., di Donato, M., Geisler, M. & M ller, B. (2016). Plant development regulated by cytokinin sinks. *Science*. 353, 1027-1030.

