Bioagro 20(3): 167-176. 2008

EFECTO DE LA APLICACIÓN DE ÁCIDO INDOL-ACÉTICO E INHIBIDORES DE AUXINA SOBRE EL DESARROLLO INICIAL DEL FRUTO DE *Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Salustiana

Libia E. Laskowski[1], Consuelo Monerri[2], Amparo García-Luis[2] y José Luis Guardiola[2]

RESUMEN

Se estudió el efecto de la aplicación de auxina (AIA) y de sustancias inhibidoras de la actividad (PCIB) y el transporte de auxina (TIBA, NPA y HFCA) en el desarrollo del tejido vascular del pedicelo y el crecimiento del fruto de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Salustiana. Se emplearon frutos de 19 y 30 mm de diámetro (a los 55 y 65 días luego de antesis) y se aplicaron las sustancias directamente al pedicelo. El NPA provocó una disminución en el crecimiento de los frutos sin alterar el desarrollo del pedicelo y no se observó efecto significativo al aplicar la antiauxina PCIB o el inhibidor del transporte TIBA. El inhibidor HFCA afectó la diferenciación del xilema, los frutos tratados fueron significativamente más pequeños, y el efecto fue mayor cuando se aplicó a frutos de menor diámetro. La aplicación de la auxina AIA inhibió el desarrollo del tejido vascular del pedicelo y afectó significativamente el crecimiento del fruto. Los resultados ratifican la vinculación entre las auxinas, el desarrollo del tejido vascular del pedicelo y el crecimiento del fruto.
Palabras clave adicionales: Naranja, reguladores de crecimiento, xilema

ABSTRACT

Effect of applications of IAA and auxin inhibitors on initial fruit development of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Salustiana
The effect of application of IAA, antiauxin (PCIB), and auxin transport inhibitors (HFCA, TIBA and NPA) on vascular development of pedicel and fruit growth was studied in *Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Salustiana. Substances were applied on pedicels of fruits having 19 and 30 mm in diameter (55 and 65 days after anthesis). NPA depressed fruit growth although no effect was detected on pedicel development. No effect was observed on pedicel or fruit growth after TIBA and PCIB applications. The inhibitor HFCA altered the vessel differentiation pattern and fruits were significantly smaller, being higher the effect on the smaller fruits. IAA applications caused inhibition of pedicel vascular tissue development, and induced formation of smaller fruits. These results confirmed the relationship among auxins, pedicel vascular tissue development, and fruit growth.
Additional key words: Fruit development, pedicel vascular development, auxin inhibitors

INTRODUCCIÓN

En el género *Citrus* se ha demostrado que la aplicación de auxinas sintéticas promueve el crecimiento del fruto, dependiendo principalmente de la naturaleza y concentración de la auxina aplicada, de la época de aplicación y de las condiciones climáticas (Guardiola y García-Luis, 2000; Agusti et al., 2002). Sin embargo, no se ha establecido contundentemente si el efecto de las auxinas es directo, incrementando la demanda del fruto, o indirecto debido a su acción en el desarrollo del tejido vascular, o ambos (Mesejo et al., 2003).

En el estudio del efecto de las auxinas sobre la diferenciación del tejido vascular del pedicelo se han empleado tanto métodos que incluyen la aplicación de auxinas (Yang-Tao et al., 1996; Mesejo et al., 2003) como el uso de inhibidores del transporte polar de auxina (Drazeta et al., 2004; Else et al., 2004) encontrándose en ambos casos una estrecha relación entre la aplicación de esos compuestos y el desarrollo o inhibición del tejido vascular, respectivamente.

Entre los compuestos conocidos como inhibidores del transporte polar de auxina se incluyen el ácido N-1-naftiltalámico (NPA); el ácido 2,3,5 tri-iodobenzoico (TIBA) y el 2-cloro-

Recibido: Septiembre 12, 2007 Aceptado: Mayo 23, 2008
[1] Dpto. de Cs. Biológicas, Decanato de Agronomía, Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado". Apdo. 400. Barquisimeto. Venezuela. e-mail: llaskowski@ucla.edu.ve
[2] Dpto. de Biología Vegetal, ETSIA, Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España.

9-hidroxifluorene-9-carboxílico (HFCA), los cuales al ser diferentes estructuralmente actúan de forma distinta y poseen sitios de unión específicos en determinados tejidos dianas (Hironori y Syono, 1997). Otros tipos de inhibidores, como el ácido 2-(p-clorofenoxi)-2-metilpropiónico (PCIB) son conocidos como antiauxinas y actúan compitiendo por los receptores de la auxina (Hironori y Syono, 1997; Oono et al., 2003).

De acuerdo con Else et al. (2004), la aplicación del inhibidor del transporte de auxina TIBA sobre los pedicelos de frutos de ciruela provocó una disminución del 98 % en la capacidad de transporte polar de auxina, pero no afectó la expansión del fruto. Por su parte, Drazeta et al. (2004) demostraron que la interrupción del flujo de auxina en pedicelos de manzana, al aplicar altas concentraciones del inhibidor del transporte NPA al pedicelo, afectó la formación de los vasos del xilema dando como resultado un fruto pequeño y menos competitivo.

Con respecto al uso de inhibidores de auxina en frutos cítricos, Okuda y Hirabayashi (1998) al estudiar el efecto de la aplicación de TIBA en el pedúnculo de *Citrus unshiu*, encontraron una disminución cercana al 90 % en el flujo de auxina del fruto al pedicelo promoviendo una mayor abscisión. Mientras que Yuan et al. (2003), en naranja Valencia, no encontraron diferencias significativas en la concentración endógena de auxina del pedicelo de frutos maduros al aplicar TIBA, lo cual se explica como resultado de la baja concentración endógena de auxina en la madurez. Mas recientemente, en *C. sinensis* y *C. paradisi* Chen et al. (2006) estudiando la abscisión de frutos asociada a la producción de hormonas por hongos patógenos, encontraron que tanto la aplicación de antiauxinas como el uso de inhibidores del transporte polar provocaron defoliación y un incremento en la retención de los frutos infectados, como consecuencia del desbalance en los niveles de auxina provocado por estos inhibidores.

Estudios sobre la relación entre auxinas, desarrollo del tejido vascular y crecimiento del fruto en *C. sinensis* cv. Salustiana determinaron que la menor concentración endógena de ácido indol-acético (AIA) ocurrió durante el crecimiento exponencial del fruto, coincidiendo además con el desarrollo del tejido vascular secundario del pedicelo (Laskowski, 2005). Estos hallazgos pueden representar una paradoja si se considera que la aplicación de auxinas sintéticas durante el crecimiento inicial puede incrementar el tamaño final del fruto (Guardiola y García-Luis, 2000). Como alternativa para comprender mejor la compleja relación entre las auxinas y los procesos de desarrollo en los cuales se cree participan, se pueden realizar estudios empleando inhibidores específicos de la acción y transporte polar de auxina, (Friml, 2003).

Dado que el incremento del tamaño del fruto en cítricos constituye uno de las metas centrales en su producción, el presente estudio tiene como objetivo modificar los niveles de auxina en el pedicelo mediante la aplicación de AIA e inhibidores del transporte y la actividad auxínica así como determinar su efecto en el desarrollo del tejido vascular y crecimiento inicial del fruto de *C. sinensis* cv. Salustiana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se emplearon plantas de un huerto de naranjo dulce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) cv. Salustiana, injertado sobre patrón citrange Troyer (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf) ubicado en la población de Museros, Comunidad Valenciana, España, a 17 m sobre el nivel del mar. El estudio se realizó durante dos años consecutivos, entre marzo y junio del 2002 y 2003, antes de la caída de frutos que normalmente se produce a principios del verano (caída fisiológica o de junio). Durante el período de estudio, el año 2002 presentó una temperatura máxima media de 29 ºC, mientras que en el año 2003 la temperatura máxima media fue de 32 ºC, en ambos correspondiendo al mes de junio.

En el primer año la aplicación de los tratamientos se realizó en frutos de 65 días luego de antesis (dda) y de 30 mm de diámetro. El día 0 se eligió al azar 10 árboles con similar porte y brotes de estas características y en cada uno se colectó un fruto como testigo (día 0) y se identificaron 4 frutos en la planta. Sobre la zona proximal del pedicelo de cada fruto identificado se aplicó 2 µmol disueltos en 0,1 g de pasta de lanolina de uno de los siguientes compuestos (tratamientos): inhibidor de la actividad auxínica (antiauxina): ácido 2-(p-clorofenoxi)-2-metilpropiónico (PCIB); inhibidores del transporte polar de auxinas: ácido 2,3,5 triiodobenzoico (TIBA) y ácido 2-cloro-9-hidroxifluorene-9-carboxílico (HFCA). Como

testigo se aplicó 0,1 g de lanolina pura. Al cabo de 9 días de tratamiento, antes del pico máximo de abscisión, se recogieron todos los frutos y se trasladaron al laboratorio.

De acuerdo con los resultados del primer experimento, para el segundo año se eligieron frutos más jóvenes, a los 55 días después de antesis y de 19 mm de diámetro. El día 0 se eligieron al azar 29 árboles de similar porte, se tomaron 10 frutos testigos del día 0 y se identificaron 6 frutos en cada árbol. Sobre la zona proximal del pedicelo se aplicó 2 µmol disueltos en 0,1 g de pasta de lanolina de uno de los siguientes tratamientos: auxina: AIA; inhibidor de la actividad auxínica (antiauxina): ácido 2-(p-clorofenoxi)-2-metilpropiónico (PCIB); inhibidores del transporte polar de auxinas: ácido 2,3,5 tri-iodobenzoico (TIBA), ácido 2-cloro-9-hidroxifluorene-9-carboxílico (HFCA) y ácido N-1 naftiltalámico (NPA). Como testigo se aplicó 0,1 g de lanolina pura. Se realizaron tres aplicaciones consecutivas a intervalos de 7 días: el día 0 (inicio del experimento) y los días 7 y 14 de iniciado el estudio. Las reaplicaciones se hicieron en idéntica concentración luego de limpiar con algodón los restos de lanolina. Antes de cada reaplicación se determinó el diámetro de los frutos. El día 14 se colectaron los frutos de la mitad de los 29 árboles tratados y el día 21 se colectó el resto de los frutos.

En ambos experimentos los frutos y pedicelos se separaron en el laboratorio con un bisturí. Los frutos fueron pesados individualmente utilizando una balanza digital de 0,001 g de apreciación, mientras que los pedicelos fueron divididos en dos partes iguales (aproximadamente de 0,5 cm): la parte distal se preservó en formalina-ácido propiónico-etanol (FPA) en una proporción de 1:1:18 para su estudio anatómico y, en el experimento del año 2003, la parte distal de los pedicelos tratados con AIA y HFCA se congelaron con nitrógeno líquido para la posterior cuantificación de los niveles de AIA, debido al efecto observado en el crecimiento del fruto.

A fin de conocer el efecto de los tratamientos sobre la vascularización del pedicelo se determinaron las siguientes variables: descripción histológica del tejido vascular; determinación de la superficie en sección transversal (SST) del pedicelo y tejido vascular, y cuantificación del contenido de AIA (año 2003). En el fruto, el efecto de los tratamientos se evaluó registrando la masa fresca y el diámetro ecuatorial.

Estudio anatómico: De los pedicelos en FPA se tomaron al azar 10, los cuales fueron rehidratados en serie descendente de etanol hasta agua y con micrótomo de congelación Microm HM440E se realizaron al menos 10 secciones transversales de 20 micras de cada pedicelo, iniciando a 0,5 cm luego del cáliz. De acuerdo con recomendaciones de Johansen (1940), los cortes fueron teñidos con safranina-verde luz y preservados en glicerina. Considerando al pedicelo compuesto por tejidos dispuestos en un círculo, se calculó su superficie en sección transversal a partir de la medición de los respectivos radios (espesor) de todas las secciones realizadas, empleando para ello un microscopio óptico. De las preparaciones se tomaron microfotografías con una cámara digital Nikon Coolpix 990 adaptada a un microscopio NIKON. Los resultados fueron comparados entre sí y con los obtenidos en trabajos previos relacionados con la evolución anatómica de los pedicelos durante su crecimiento (Laskowski, 2005).

Extracción, purificación y cuantificación del AIA: El material se dividió en dos muestras independientes, se pulverizó y se procedió a la cuantificación del contenido de ácido indol-acético (AIA) utilizando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). De acuerdo con las recomendaciones generales de Hedden (1993) se estableció el siguiente protocolo de análisis: Para la extracción del AIA a las muestras pulverizadas se añadieron a 35 mL de metanol al 80 % conteniendo 100 $mg \cdot L^{-1}$ de hidroxitoluenobutilado y se agitaron en frío (4 ºC) durante 20 horas. El extracto fue evaporado, resuspendido en 10 mL de acetato amónico 10 mM, centrifugado y el sobrenadante se recogió en botellas color topacio para su prepurificación a través de una columna de PVPP (Polyvinylpolypyrrolidona, Sigma, St. Louis, MO, USA) de 20 mL de volumen (3,5 g de PVPP), eluida con 50 mL de acetato amónico 10 mM. El extracto obtenido se reforzó con 200 ng de ácido indol-propiónico (AIP) para el cálculo de las pérdidas durante el proceso y se procedió a su purificación utilizando un sistema de columnas incluyendo dos cartuchos de intercambio aniónico (QMA de Waters) conectados en serie, y a continuación dos purificaciones a través de

cartuchos Sep-Pak C18 (Waters). La muestra purificada se eluyó con 3 mL de éter y se evaporó con corriente de nitrógeno. La fracción de auxina se resuspendió con 0,2 mL de metanol al 50 % en agua mili Q y se filtró con millipore tipo HV de 0,45 µ en tubos de Eppendorf. La separación del AIA y AIP se realizó a través de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) utilizando una columna Kromasil 100 C18 (25*0,46 cm) equipada con precolumna ODS. De cada muestra se tomaron dos réplicas de 20 µL conteniendo entre 1 y 5 ng de auxina, eluídas con un flujo de 1 $mL \cdot min^{-1}$ usando un gradiente de metanol en agua a pH 3,5. La identificación se realizó con un detector de fluorescencia Perkin-Elmer 3000. Para la cuantificación se empleó el programa de procesamiento de datos cromatográficos Millennium 32 (Water Associates) y fue corregida en base a la recuperación del AIP utilizado como patrón interno. Esta recuperación osciló entre el 40 y 60 % según la muestra. Los resultados fueron comparados entre sí y con los obtenidos en trabajos previos relacionados con la cuantificación endógena del AIA en pedicelos (Laskowski, 2005).

RESULTADOS

Efecto sobre las características histológicas del tejido vascular del pedicelo

Frutos de 30 mm de diámetro: Al momento de la aplicación (día 0) el corte transversal del pedicelo mostró una organización histológica propia del crecimiento secundario con una disposición en cilindro del tejido vascular, floema con abundantes fibras y xilema del tipo poroso-difuso, características que se mantuvieron al cabo de los 9 días de tratamiento en el pedicelo testigo (Figura 1A). En relación a la aplicación de la antiauxina PCIB y el inhibidor del transporte TIBA, luego de 9 días de tratamiento no se observó efecto alguno en las características histológicas del pedicelo, siendo similares a las descritas para el testigo (Figura 1A). De acuerdo con los resultados, la aplicación del inhibidor del transporte HFCA si afectó las características anatómicas del pedicelo, específicamente del xilema (Figura 1B), observándose en los pedicelos tratados una menor diferenciación de vasos en el xilema reciente debido al desarrollo de una franja estrecha de fibras, junto a la zona cambial.

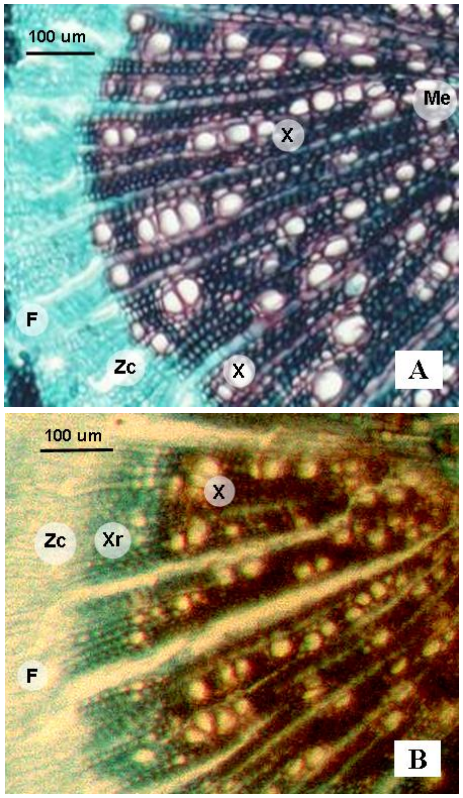

Figura 1. Efecto del HFCA al pedicelo de frutos de 30 mm de diámetro luego de 9 días. A. Sección transversal del pedicelo testigo mostrando el arreglo del tejido vascular. B. Sección transversal del pedicelo tratado con HFCA. Leyenda: F=floema, Me=médula, X=xilema, Xr=xilema reciente, Zc=zona cambial

Frutos de 19 mm de diámetro: El estudio anatómico del pedicelo testigo mostró al inicio del experimento (día 0) un desarrollo anatómico caracterizado por presentar un estado de tránsito entre el crecimiento primario y el secundario, con tejido vascular formado por haces colaterales abiertos muy unidos entre sí (Figura 2A). Luego de 21 días de tratamiento (tres aplicaciones), la sección transversal del pedicelo testigo mostró un mayor desarrollo del tejido vascular, dispuesto en cilindro continuo, con xilema poroso-difuso y floema interrumpido por capas de fibras, características del crecimiento secundario (Figura 2B). De acuerdo con los resultados de este experimento, la aplicación de la antiauxina PCIB y los inhibidores del transporte de auxina NPA y TIBA no afectaron la anatomía del pedicelo, mostrando ser similares al testigo. Por el

contrario, en los pedicelos tratados con el inhibidor del transporte HFCA se observó una drástica alteración en las características histológicas del xilema en comparación al testigo.

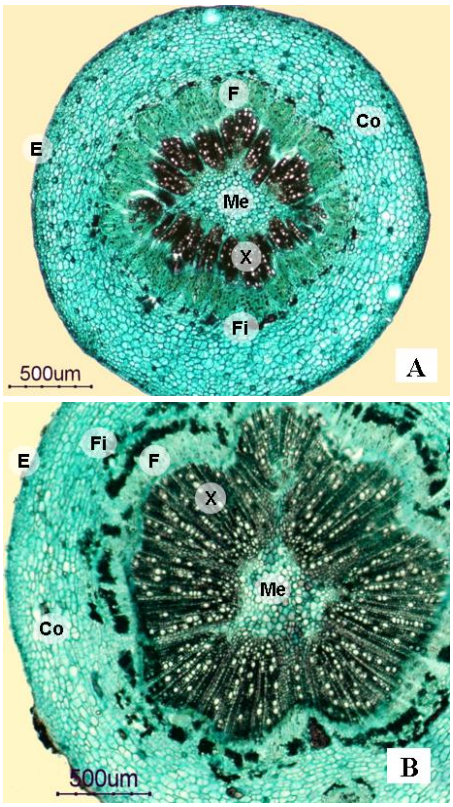

Figura 2. Desarrollo anatómico del pedicelo de *C. sinensis* cv.. Salustiana A. Sección transversal del pedicelo testigo en frutos de 19 mm de diámetro (55 dda). Inicio del experimento (día 0). B. Sección transversal del pedicelo testigo luego de 21 días (76 dda). Leyenda: E=epidermis, Co=córtex, F=floema, Fi=fibras, Me= médula, X= xilema

De acuerdo con los resultados (Figura 3), al cabo de 21 días el xilema de los pedicelos tratados con HFCA en vez de mostrarse poroso difuso como el testigo, mostraron ser poroso anular, caracterizados por la presencia de tres franjas de células de lumen pequeño que alternaron con dos o tres franjas con desarrollo de abundantes vasos (Figuras 3A y 3C). El número de las franjas de tejido con poco o ningún desarrollo de vasos coincidió con las tres aplicaciones realizadas, mientras que las franjas con vasos mostraron notables diferencias, siendo la más interna la de mayor cantidad de vasos mientras que la más externa exhibió el menor número y se presentó sólo en algunas muestras. Característicamente, los pedicelos tratados con HFCA mostraron una zona cambial ancha y el floema no se observó alterado (Figura 3).

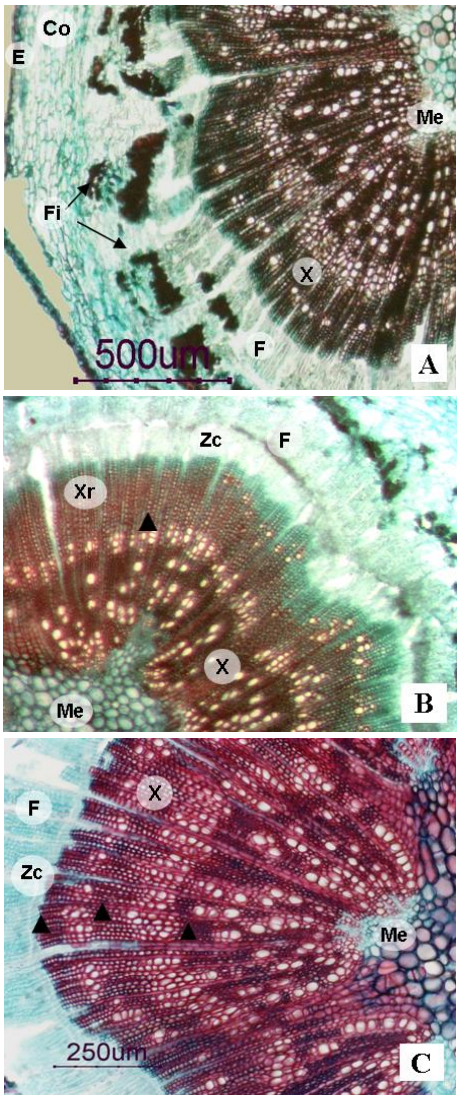

Figura 3. Efecto del HFCA sobre las características anatómicas del pedicelo de frutos de 19 mm de diámetro. A. Sección transversal del pedicelo tratado con HFCA a los 21 días. B. Detalle del tejido vascular a los 14 días. C. Detalle del tejido vascular a los 21 días. Leyenda: Co=Córtex, E=epidermis, F=floema, Fi=fibras, Me=médula, X = xilema, Xr=xilema reciente, Zc=zona cambial. Los triángulos negros señalan las secciones de xilema afectadas por la aplicación de HFCA

El efecto descrito coincidió con las observaciones realizadas luego de dos aplicaciones de HFCA (Figura 3B). En este caso, los pedicelos mostraron un xilema reciente formado por dos franjas de fibras interrumpidas por una franja intermedia con abundantes vasos. La segunda franja de fibra se mostró mucho más desarrollada que la primera y en algunos casos se observó inicio de diferenciación de vasos en contacto con el floema (Figura 3B).

En relación a la aplicación consecutiva de la auxina AIA, luego de 21 días de tratamiento los pedicelos no presentaron cambios en su estructura anatómica con respecto a la observada en el testigo a los 9 días (Figura 1A), con tejido vascular dispuesto en haces muy unidos entre si, con poco desarrollo de fibras en el interior del floema y xilema poroso-difuso.

Efecto sobre el crecimiento del pedicelo

En los frutos de 30 mm de diámetro, la aplicación de la antiauxina PCIB y los inhibidores del transporte TIBA y HFCA no tuvieron efecto sobre el crecimiento en superficie transversal del pedicelo ni en su tejido vascular (Cuadro 1), los cuales mostraron incrementos medios similares al testigo ($P>0,05$).

En los frutos de 19 mm de diámetro, luego de 21 días de tratamiento no se observó efecto significativo ($P>0,05$) de la aplicación de PCIB, TIBA, NPA y HFCA sobre el crecimiento en superficie transversal del pedicelo y el tejido vascular, mientras que debido a la aplicación de AIA la superficie de los pedicelos con este tratamiento presentó una fuerte reducción en su tasa de crecimiento (Figura 4). Así, los pedicelos tratados con AIA luego de 21 días mostraron valores medios de superficie transversal, floema y xilema inferiores al testigo ($P\leq0,05$).

Efecto sobre el crecimiento del fruto

En los frutos de 30 mm de diámetro, la aplicación de la antiauxina PCIB y los inhibidores del transporte TIBA y HFCA aplicados al pedicelo no afectaron de manera significativa ($P>0,05$) el incremento en diámetro y masa fresca de los frutos después de 9 días de tratamiento (Cuadro 1).

Cuadro 1. Efecto de la aplicación de PCIB, TIBA y HFCA al pedicelo de frutos de 30 mm de diámetro sobre el crecimiento del pedicelo y fruto de *C. sinensis* cv. Salustiana

	Pedicelo			Fruto	
	SST Total	SST Xilema	SST Floema	Diámetro	Masa fresca
	(mm^2)			(mm)	(g)
Día 0	3,82	1,02	0,77	30,00	12,58
Testigo*	4,74	1,44	0,87	34,80	18,70
PCIB*	4,68	1,41	0,87	34,23	18,21
TIBA*	4,58	1,43	0,85	34,61	17,44
HFCA*	4,65	1,40	0,90	33,60	17,39
Significancia	ns	ns	ns	ns	ns

SST= superficie en sección transversal. *=Mediciones realizadas luego de 9 días de tratamiento (n=10)

En los frutos de 19 mm de diámetro, luego de 21 días del experimento, los frutos testigos exhibieron un importante crecimiento. El diámetro mostró un aumento de 6 mm por semana hasta alcanzar una media de 36,2 mm (Figura 5), mientras que la masa fresca se mostró creciente, con un incremento de 9 g durante los primeros 14 días, y de 10 g entre los días 14 y 21 del experimento (Figura 6). Los resultados muestran además que hubo diferencias entre la tasa de crecimiento de los frutos, dependiendo del tratamiento aplicado al pedicelo.

Cuadro 2. Efecto de la aplicación de AIA y HFCA al pedicelo de frutos de 19 mm de diámetro sobre la concentración endógena de AIA

Tratamiento	Concentración de AIA ($ng \cdot g^{-1}$)		
	Día 0	Día 14	Día 21
Testigo	526 ± 70	78 a	34
HFCA	-	77 a	39
AIA	-	162 b	167

Valores con letras distintas en la misma columna difieren estadísticamente a $P\leq0,05$ de acuerdo con la prueba de Duncan (n=4)

Los frutos cuyos pedicelos fueron tratados con PCIB, TIBA y NPA mostraron valores de diámetro y masa fresca similares al testigo (P>0,05). En el caso del NPA, luego de 21 días de tratamiento (tres aplicaciones) la masa fresca presentó un valor inferior al testigo (P≤0,05) (Figura 6). Por el contrario, la aplicación del inhibidor del transporte HFCA afectó el crecimiento del fruto desde la primera aplicación (P≤0,05). De acuerdo con estos resultados, luego de 21 días los frutos tratados con HFCA presentaron el menor diámetro entre los tratamientos, con 8 mm de diferencia respecto al testigo (Figura 5), mientras que la masa fresca fue inferior en 9 g en comparación al testigo (Figura 6).

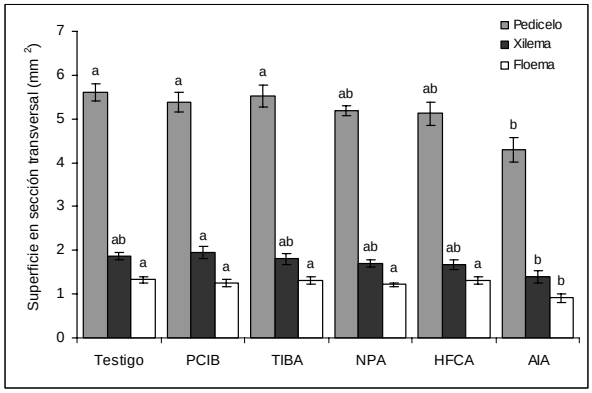

Figura 4. Efecto de tres aplicaciones de PCIB (antiauxina), TIBA, NPA HFCA (inhibidores del transporte de auxina) y AIA al pedicelo de frutos de 19 mm de diámetro sobre la superficie en sección transversal del pedicelo y sus regiones anatómicas. Tratamientos con letras distintas difieren según la prueba de Duncan (P≤0,05)

En relación al tratamiento con AIA, luego de tres aplicaciones se afectó significativamente el crecimiento del fruto, expresado tanto en diámetro (Figura 5) como en masa fresca (Figura 6), con medias inferiores al testigo (P≤0,05). Transcurridos 21 días de experimento, el diámetro de los frutos registró una media de 30 mm, 6 mm menos que el grupo testigo, del cual difirió además en 10 g de masa fresca (Figuras 5 y 6). Este efecto de la aplicación de AIA sobre el crecimiento del fruto no se observó luego de una y dos aplicaciones, con medias similares al testigo (P>0,05).

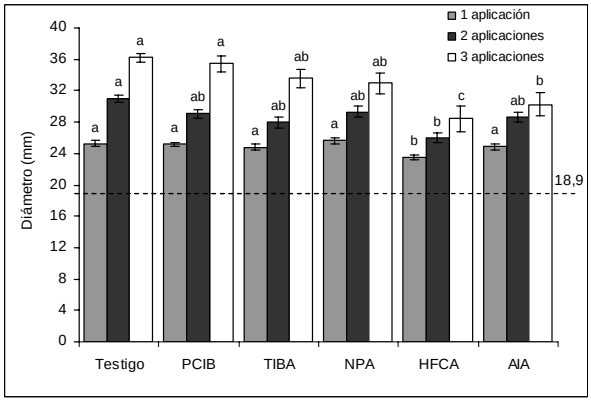

Figura 5. Efecto de tres aplicaciones al pedicelo de PCIB (antiauxina), TIBA, NPA, HFCA (inhibidores del transporte de auxina) y AIA sobre el crecimiento en diámetro del fruto de 19 mm de diámetro. La línea punteada horizontal es el diámetro inicial (día 0). Tratamientos con letras distintas difieren según la prueba de Duncan (P≤0,05)

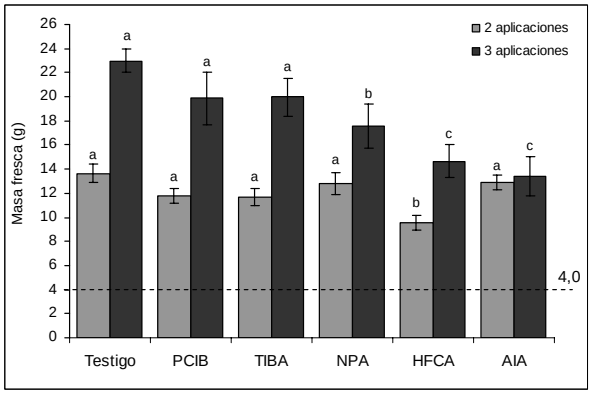

Figura 6. Efecto de la aplicación al pedicelo de PCIB (antiauxina), TIBA, NPA, HFCA (inhibidores del transporte de auxina) y AIA sobre el crecimiento en masa fresca del fruto de 19 mm de diámetro. La línea punteada horizontal es la masa fresca inicial (día 0). Tratamientos con letras distintas difieren según la prueba de Duncan (P≤0,05)

Efecto de la aplicación de HFCA y AIA sobre el contenido endógeno de AIA en el pedicelo

Los frutos de 19 mm de diámetro tratados con HFCA (los cuales mostraron una menor tasa de crecimiento) luego de 14 días presentaron una notable disminución de la concentración de AIA en el pedicelo, al pasar de 526 $ng \cdot g^{-1}$ a una concentración siete veces menor que el valor

determinado el día 0, exhibiendo un comportamiento similar al testigo. Por su parte, la aplicación de AIA produjo un efecto significativo en su concentración endógena ($P \leq 0,05$) la cual fue de 162 $ng \cdot g^{-1}$, aproximadamente el doble de la determinada en los pedicelos testigos (Cuadro 2).

A los 21 días de tratamiento, la concentración de AIA en los pedicelos sólo pudo ser determinada en una de las muestras, en las cuales se observó que tanto el testigo como los pedicelos tratados con HFCA presentaron tenores similares (34 y 39 $ng \cdot g^{-1}$, respectivamente) inferiores con respecto a los días 0 y 14 de tratamiento. Los pedicelos tratados con AIA mostraron una concentración similar con respecto al día 14 (167 $ng \cdot g^{-1}$); sin embargo, estos resultados constituyen sólo una referencia al no poder ser analizados estadísticamente (Cuadro 2).

DISCUSIÓN

Durante el período de estudio los pedicelos testigos tratados con lanolina mostraron características del desarrollo del tejido vascular y concentración de AIA endógenos que concuerdan con los señalados para la especie en similar estado de crecimiento (Laskowski, 2005), lo que permite confirmar que los efectos observados están vinculados a los tratamientos aplicados.

Con relación a los inhibidores del transporte de auxina empleados se puede afirmar que el crecimiento del fruto de Salustiana fue afectado por la aplicación al pedicelo de NPA y HFCA, mostrando este último una capacidad de inhibición significativamente mayor, al provocar una rápida y evidente disminución del crecimiento del pedicelo y el fruto cuando es aplicado en estados tempranos del desarrollo (Figuras 4 a 6).

En relación al NPA no se observaron alteraciones en el desarrollo del tejido vascular del pedicelo que pudieran explicar la menor tasa de crecimiento presentada en el fruto, efecto mostrado en manzana por Drazeta et al. (2004) empleando una mayor concentración. Es posible que la aplicación de 2 µmol de NPA no fue suficiente para alterar el desarrollo del tejido vascular del pedicelo, pero si para provocar un desbalance en la concentración de auxina en el fruto disminuyendo la tasa de crecimiento, efecto transitorio señalado para la aplicación de auxinas de síntesis por Guardiola y García-Luis (2000). Esta explicación puede extenderse a los resultados de los tratamientos con el inhibidor del transporte TIBA y la antiauxina PCIB, los cuales no fueron concluyentes a pesar de mostrar frutos con tendencia a un menor crecimiento.

De forma inequívoca, en nuestro estudio la aplicación de 2 µmol de HFCA al pedicelo de frutos de 30 y 19 mm de diámetro provocó una alteración en la estructura del xilema, aspecto sobre el cual no se encontraron referencias en la literatura revisada. Considerando la estrecha vinculación entre el crecimiento lineal del fruto y el desarrollo del tejido vascular secundario, particularmente con el xilema (García-Luis et al., 2002; Laskowski, 2005), es muy probable que la alteración de la vascularización del pedicelo haya afectado de forma significativa la tasa de crecimiento del fruto, tal como se observó en este estudio como consecuencia de la aplicación de HFCA (Figura 6).

El efecto inhibidor del HFCA en la xilogénesis fue más notable en los pedicelos de los frutos de 19 mm de diámetro (Figura 3) en los cuales, además de poseer tejidos más juveniles, el efecto del HFCA se potenció con las sucesivas reaplicaciones. El efecto inhibitorio del HFCA sobre el desarrollo del tejido vascular encuentra basamento en la interrupción del flujo de auxina que promueve la diferenciación vascular (Aloni, 2001), por lo que se esperaban cambios en la concentración endógena de AIA en los pedicelos tratados con HFCA; sin embargo, ésta mostró ser similar al testigo (Cuadro 2). Se cree que esta cuantificación estuvo afectada por la temporalidad demostrada de la actividad inhibitoria del HFCA. Se puede presumir que las muestras de pedicelos tomados para la detección de AIA correspondieron a períodos de superación del efecto causado por el HFCA sobre el transporte de AIA, es decir, cuando se habían restablecido los niveles endógenos de auxina, de acuerdo con los eventos de xilogénesis observados.

De acuerdo con Mesejo et al. (2003), la aplicación de auxinas de síntesis al pedicelo de mandarina Satsuma provocó un mayor desarrollo del tejido vascular, sin incrementar el tamaño del fruto. Contrariamente, en nuestro estudio la aplicación consecutiva de 2 µmol de AIA provocó inhibición del desarrollo secundario del tejido vascular y produjo una disminución del crecimiento del fruto, similar al observado con la

aplicación del inhibidor del transporte HFCA. Esto puede explicarse si se considera que ambos tratamientos coincidieron en alterar el proceso de vascularización del pedicelo: el HFCA modificando el patrón de desarrollo del xilema secundario y el AIA inhibiéndolo.

De acuerdo con los resultados obtenidos con la aplicación de AIA y el inhibidor del transporte de auxina HFCA, se puede afirmar que una alteración del desarrollo secundario del tejido vascular tiene efecto detrimental sobre el crecimiento del fruto durante su fase inicial, corroborando la existencia de una estrecha relación entre el desarrollo del xilema secundario y el crecimiento del fruto observado previamente en *C. sinensis* cv. Salustiana (Laskowski, 2005).

En general, estos resultados contribuyen con el conocimiento sobre el efecto del AIA en la inducción de cambios en la actividad celular que conllevan a la formación de nuevo tejido vascular en las plantas y refrendan la importancia de considerar el estado de desarrollo del tejido y la concentración de auxinas y sus inhibidores cuando éstos se emplean con fines experimentales.

LITERATURA CITADA

1. Agusti M., S. Zaragoza, D.J. Iglesias, V. Almela, E. Primo-Millo y M. Talón. 2002. The synthetic auxin 3,5,6-TPA stimulates carbohydrate accumulation and growth in citrus fruit. Plant Growth Regul. 36(2): 141-147.

2. Aloni, R. 2001. Foliar and axial aspects of vascular differentiation: hypotheses and evidence. J. Plant Growth Regul. 20: 22-24.

3. Chen, H., K. Dekkers, L. Cao, J. Burns, L.W. Timmer y K.R. Chung. 2006. Evaluation of growth regulator inhibitors for controlling postbloom fruit drop (PFD) of *Citrus* induced by fungus *Colletotrichum acutatum.* HortScience 41(5): 1317-1321.

4. Drazeta, L., A. Lang, A.C. Cappellini, A. May y R. Volz. 2004. Vessel differentiation in the pedicel of apple and the effects of auxin transport inhibition. Physiologia Plantarum, 120: 162-170.

5. Else, M., A. Stankiewicz, C. Crisp y C. Atkinson. 2004. The role of polar auxin transport through pedicels of *Prunus avium* L. in relation to fruit development and retention. J. Exp. Bot. 55(405): 2099- 2109.

6. Friml, J. 2003. Auxin transport-shaping the plant. Current Opinion in Plant Biol. 6: 7-12.

7. García-Luis, A., M. Oliveira, Y. Bordón, D. Siquiera, S. Tominaga y J.L. Guardiola. 2002. Dry matter accumulation in Citrus fruit is not limited by transport capacity of the pedicel. Ann. Bot. 90: 755-764.

8. Guardiola, J.L. y A. García-Luis. 2000. Increasing fruit size in *Citrus*. Thinning and stimulation of fruit growth. Plant Growth Regul. 31: 121-132.

9. Hedden, P. 1993. Modern Methods for the Quantitative Analysis of Plant Hormones. Annual Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 44: 107-129.

10. Hironori, F. y K. Syono. 1997. PIS1, a negative regulator of the actino of auxin transport inhibitors in *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal 12(3): 583-595.

11. Johansen, D. 1940. Plant Microtechnique. McGraw-Hill, London.

12. Laskowski, L. 2005. Desarrollo inicial y vascularización del fruto y el pedicelo de *C. sinensis* cv.. Salustiana. Relación con el contenido de auxinas. Tesis. Departamento de Biología Vegetal. Universidad Politécnica de Valencia. 141 p.

13. Mesejo, C., A. Martínez-Fuentes, J. Martínez, V. Almela y M. Agustí. 2003. Vascular tissues development of *Citrus* fruit peduncle is promoted by synthetic auxins. Plant Growth Regul. 39: 131-135.

14. Okuda H. y T. Hirabayashi. 1998. Effect of IAA gradient between the peduncle and branch on physiological drop of *Citrus* fruit (*Kiyomi tangor*). J. Hort. Sci. Biotech. 73(5): 618-621.

15. Oono, Y., Ch. Ooura, A. Arman, E. Aspuria, K. Hayashi, A. Tanaka y H. Uchimiya. 2003. p-Chlorophenoxyisobutyric acid impairs auxin response in *Arabidopsis* root. Plant Physiol. 133: 1135-1147.

16. Yang-Tao, T., P. Davies y J. Reid. 1996. Genetic dissection of the relative role of auxin and gibberellin in the regulation of stem elogation in intact light-grown peas. Plant Physiol. 110: 1029-1034.

17. Yuan, R., W. Kender y J. Burns. 2003. Young fruit and auxin transport inhibitors affect the response of mature 'Valencia' oranges to abscission materials via changing endogenous plant hormones. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 128(3): 302-308.