

Efecto de prohexadiona de calcio en los niveles de giberelinas y auxinas en ápices de manzano

Effect of prohexadione-ca on gibberellins and auxins levels in shoot tips of apple

Homero **Ramírez**, Saret **Alonso** y Adalberto **Benavides**

E-mail: homeror@terra.com.mx

Depto. de Horticultura, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo Coah., México. C.P. 25315.

Abstract

This study was conducted with the purpose to learn on the effects of prohexadione-calcium® (P-Ca) in the levels of endogenous gibberellins and auxins in shoot tips. The growth retardant was sprayed on trees early in the spring when shoot growth reached 5 cm in length. The concentration dosages of P-Ca were 0 (control) and 250 mg L⁻¹. The endogenous hormone status was analyzed on apple trees treated with Prohexadione-Ca at 250 mg L⁻¹. The level of gibberellins and auxins in shoot tips was decreased soon after the P-Ca application: In these P-Ca tissues, it was possible to identify gibberellins A₉, A₂₀, A₅₁, A₅₃ and IAA. In control samples, IAA and gibberellins A₁, A₄, A₇, A₉, A₅₁ and A₅₃ were identified.

Key words: P-Ca, apple, endogenous hormones.

Resumen

La investigación se realizó con el propósito de conocer los efectos del retardante prohexadiona de calcio® (P-Ca) sobre los niveles endógenos de giberelinas y auxinas en manzano (*Malus domestica* Borkh) cultivar Royal Gala. El retardante de crecimiento se aplicó en la primavera, cuando el brote alcanzó 5 cm de longitud en concentraciones de 0 (testigo) y 250 mg L⁻¹. La dosis 250 mg L⁻¹ de P-Ca, produjo una reducción en los niveles de giberelinas y auxinas, en los meristemos apicales. En estos tejidos se identificaron las giberelinas A₉, A₂₀, A₅₁ y A₅₃, y el ácido indolacético (AIA). En ápices testigo, además de AIA, se identificaron las giberelinas A₁, A₄, A₇, A₉, A₅₁ y A₅₃.

Palabras clave: P-Ca, manzano, hormonas endógenas.

Introducción

El retardante de crecimiento prohexadiona-Ca (calcio 3-oxido-4-propionil-5-oxo-3- ciclohexano-carboxilato) ha sido reportado como una alternativa para el control adecuado del crecimiento vegetativo en árboles de manzano (Unrath, 1999). Este compuesto se caracteriza por bloquear la biosíntesis de giberelinas en el meristemo

apical, con nula toxicidad en las plantas y con una persistencia extremadamente limitada en los tejidos vegetales (Rademacher *et al.*, 1998). Los efectos de este retardante de crecimiento no han sido relacionados con auxinas en ese tejido. El prohexadiona de calcio (P-Ca), además de reducir el crecimiento vegetativo en manzano, incrementa el cuajado de fruto e induce la formación de yemas florales. Estas experiencias se han obtenido en Estados Unidos y países europeos (Basak y Rademacher, 2000).

Con base a lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue evaluar bajo las condiciones de Arteaga, Coahuila, México, el efecto del retardante de crecimiento prohexadiona de calcio (P-Ca) en los niveles endógenos de auxinas y giberelinas en ápices de ramas, en manzano Royal Gala.

Metodología Experimental

El presente trabajo se llevó a cabo durante 2005, en la huerta Guadalupe, en Huachichil municipio de Arteaga, Coah., México (25° 13' N), y en el laboratorio de horticultura de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Se utilizó un lote de árboles del cultivar de manzana Royal Gala, de 10 años de edad, injertados en MM106, con sistema de líder central, a una densidad de 700 árboles por hectárea.

En la huerta referida, en la primavera de 2005, se seleccionaron 16 árboles del cultivar ya descrito y se ordenaron estadísticamente en dos grupos con un diseño completamente al azar y cuatro repeticiones. Un grupo de ocho árboles se identificó como testigo, mientras que el segundo se asperjó el 8 de abril de 2005, con 250 mg L⁻¹ de P-Ca mezclado con el dispersante polioxietilenopoliopro-poxipropanol (1 mg L⁻¹ de agua).

Para relacionar el efecto de P-Ca con los niveles de hormonas en el ápice de la rama, se realizaron colectas de 50 ápices en cada muestra, 0, 1, 2, 3, 4, 10, 17, 24, 31, 38, 45 y 52 días después del tratamiento. Cada muestra se transfirió a nitrógeno líquido, tan pronto se desprendió de la planta. Las muestras se llevaron al laboratorio del Departamento de Horticultura, donde fueron liofilizadas y pulverizadas previo a su análisis hormonal.

Giberelinas

En cada ocasión se utilizó una muestra consistente en un gramo de peso seco, se colocó en un matraz Erlen Meyer, al cual se le agregaron 50 mL de metanol (80 %). Las muestras obtenidas se conservaron durante 24 horas en congelación (-15 °C). Posteriormente, se filtraron en papel Wathman 1, a temperatura de 24 °C. Esta actividad se repitió con el filtrado en dos ocasiones, con igual cantidad de metanol (100 %), cada cuatro horas y a la misma temperatura. Los tres filtrados integrados en un matraz bola de 250 mL, se evaporaron a temperatura de 50 °C, con un equipo de evaporación rotativa con baño maría, para separar la muestra del metanol. Enseguida se procedió a la purificación de las muestras, a través de la separación de impurezas,

para lo que se emplearon cápsulas Sep Pack C18 para separación rápida de hormonas con sílica gel. Lo anterior se realizó utilizando la técnica previamente reportada por Ramírez *et. al.* (2001). Enseguida, las muestras se sometieron a cromatografía de capa fina (CCF) utilizando sílica gel GF254; y como eluyente, la mezcla de isopropanol-amoniaco-agua (10:1:1) (v:v.v) durante cuatro horas, a temperatura de 20 °C. Como referencia se utilizó giberelina A_{4/7}, la cual se localizó en los R_f 0.5-0.7 con luz ultravioleta. De cada muestra, por los R_f, las giberelinas se separaron y acondicionaron para su medición analítica. Cada muestra purificada se metiló con diazometano preparado *in situ*. El contenido de giberelinas se analizó al inyectarse 0.1 mL de la solución a un cromatógrafo líquido de alta resolución, con detector de captura de electrones, modelo Finnigan TSQ 7000, equipado con nitrógeno como gas y una columna Ultrasep Es 100 RP-18 de 1 m de largo por 0.43 mm de diámetro interno, empacada con acetonitrilo: agua que contiene 0.2 % de ácido acético en proporción 50:50 (v:v), con un flujo de 70 mL min⁻¹. La giberelina A_{4/7} se utilizó como referencia analítica durante el programa de corridas por determinación cuantitativa de las giberelinas presentes en el tejido estudiado, a través de la generación de la curva de calibración correspondiente, utilizando también 0.1 mL a concentraciones de 1, 10 y 100 ng de AG_{4/7} diluidos en acetona-metanol (50:50) (v:v). Las muestras de CCF con mayor contenido de giberelinas se prepararon para identificar el tipo de giberelinas presentes, para lo cual se utilizó la técnica de cromatografía de gases (CG) con detector de ionización por flama y espectrometría de masas (EM). Un gramo de peso seco de la muestra referida fue disuelta en 0.1 mL de acetona (98 %)-metanol (98 %) en la proporción 50:50 (v:v) y metilado con diazometano. Una proporción del extracto metilado se disolvió en 0.1 mL de piridina, tratado con 0.1 mL de trimetil clorosilano y hexametildisilazano. Las alícuotas fueron examinadas con un separador de membrana de silicón Pye 104 CLC acoplado a un espectrómetro de masas AEI MS30. En este equipo se instalaron columnas de vidrio salinizadas (213 x 0.2 cm), con 2 % de Se-33, en 88-100 de gas chrom Q. La proporción de flujo fue de 25 mL min⁻¹ y la temperatura de la columna se programó entre 180 a 280 °C a 2 °C min⁻¹. La espectrometría de masas se determinó a 24eV en una fuente de temperatura de 190 °C y una velocidad de búsqueda de 6.5 s por década de masa. El espectro se registró por una computadora Dec Lin 8. La identificación se condujo por comparación del Índice de Retención Kovats (KRI) de la muestra con la referencia, así como por el patrón de fragmentación de los derivados sililatos con las muestras originales en el espectro de EM (Ramírez *et. al.*, 2001).

Auxinas

La extracción de auxinas se obtuvo con el procedimiento giberélico. Su purificación se realizó con la técnica de partición con cloroformo como solvente y cromatografía de capa fina, reportada anteriormente. Las muestras después de ser derivadas como ocurrió con citocininas, se analizaron con cromatografía líquida de alta resolución y cromatografía de gases y espectrometría de masas ya referida en la sección de giberelinas. Se utilizó ácido indol acético (AIA) como referencia de auxinas a concentraciones de 1, 10 y 100 ng, como se indicó anteriormente.

Resultados y Discusión

Los tratamientos con prohexadiona de calcio originaron una reducción significativa ($P<0.05$) en los niveles endógenos de giberelinas en los ápices analizados de manzano, entre 2 y 17 días después del tratamiento (Figura 1). La recuperación de estas hormonas en el tejido vegetativo ocurrió después de esta fecha, y adquirió su máximo nivel 24 días después del tratamiento. A partir de esta fecha y hasta el día 52, los niveles de giberelinas de la dosis 259 mg L^{-1} fueron mayores que en los ápices de las plantas testigo.

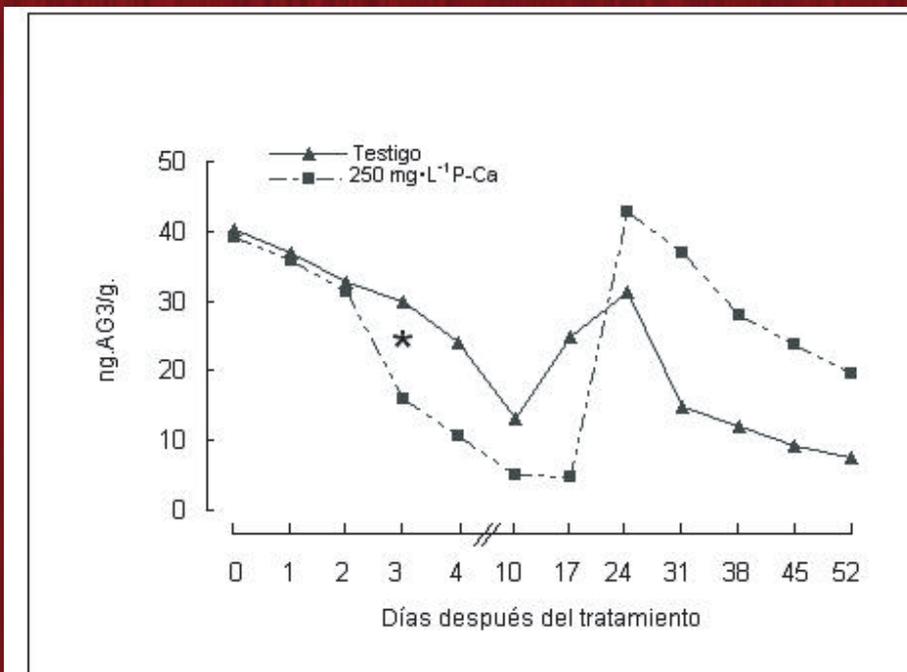


Figura 1. Efecto de prohexadiona de calcio sobre el contenido de giberelinas en ápices de manzano cv Royal Gala * $P<0.05$.

El contenido de auxinas endógenas en los ápices de manzano que recibieron el tratamiento de P-Ca mostró cambios en los niveles de concentración. A partir del inicio de evaluación, las auxinas en este tratamiento fueron menores. Se pudo observar que el retardante de crecimiento indujo una disminución significativa en el contenido de auxinas ($P<0.05$) en los días 24, 31 y 38 después del tratamiento, que llegó a su nivel mínimo a los 52 días posterior al tratamiento con P-Ca (Figura 2).

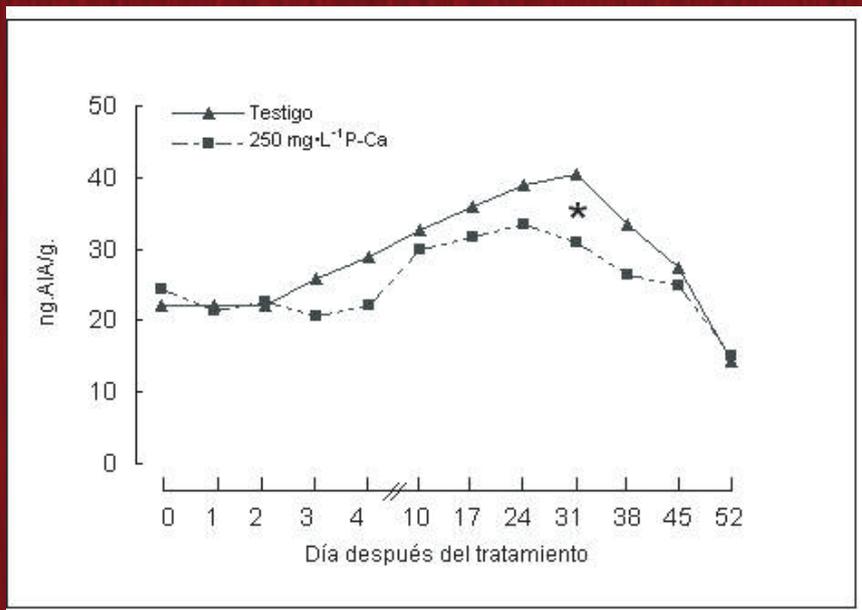


Fig. 2. Efecto de prohexadiona de calcio sobre el contenido de auxinas en ápices de manzano cv Royal Gala *P0.05.

Los resultados de los análisis de cromatografía de gases y espectrometría de masas permitieron identificar en las muestras de ápices tratados con el retardante de crecimiento las giberelinas A₉, A₂₀, A₅₁, A₅₃ Y AIA (Cuadro 1). Los ápices testigo mostraron la presencia de las giberelinas A₁, A₄, A₇, A₉, A₅₁, A₅₃.

Cuadro 1. Giberelinas, y auxinas presentes en ápices de manzano cv Royal Gala. Identificadas por CGEM

Hormonas	KRI ^a	Iones principales e intensidad relativa (%)
Giberelinas		
GA ₁	2651	[506(100), 448(14), 377(15), 375(18)]
GA ₄	2488	[418(21), 403(2), 400(12), 386(25), 284(100)]
GA ₇	2416	[416(10), 193(12), 179(5), 155(13)]
GA ₉	2295	[330(5), 217(37), 183(19), 159(45)]
GA ₂₀	2468	[418(100), 403(17), 387(6), 375(82), 359(19)]
GA ₅₁	2507	[418(4), 403(3), 386(15), 371(3), 358(1)]
Auxinas		
Ácido Indol Acético	2017	[175(59), 130(29), 103(43), 77(38), 51(21)]

^a Kovats retention index

Los cambios en el estatus hormonal de plantas causados por la aplicación de retardantes de crecimiento está claramente ilustrada en varias especies hortofrutícolas (Rojas-Garcidueñas y Ramírez, 1996). Prohexadiona de Ca se ha clasificado recientemente como un inhibidor de la síntesis de giberelinas biológicamente activas como la A₁, A₄ y A₇ (Evans *et.al.*, 1997). En el presente trabajo se observó una reducción en la actividad biológica de giberelinas endógenas en los ápices de árboles que recibieron el tratamiento con P-Ca (Figura 1). Esta reducción de actividad biológica refleja la ausencia de las giberelinas A₁ y A₄ en las muestras de esos tejidos (Cuadro 1). Las experiencias observadas en la reducción de crecimiento vegetativo de frutales como durazno, ciruelo y manzano que recibieron aplicaciones de P-Ca (Rademacher, 2004). Lo anterior indica que el retardante de crecimiento aplicado, propicia la reducción del crecimiento vegetativo como resultado de una inhibición temporal en la síntesis de giberelinas A₁, A₄ y A₇.

En la Figura 2 se puede observar que los niveles de auxinas en los ápices de manzano fueron menores en los árboles que recibieron el tratamiento con el retardante de crecimiento. En trabajos con frutales en donde se asperjaron auxinas endógenas como ácido naftoxiácetico, se originaron incrementos modestos en el crecimiento vegetativo (Bangerth, 1997). Sin embargo, cuando se aplicó un retardante de crecimiento como Alar, no se observaron cambios drásticos en las auxinas endógenas de frutales estudiados (Unrath, 1999). Por lo tanto, en la actualidad no existe una certidumbre sobre la importancia directa de los efectos observados con auxinas endógenas.

Los resultados observados en la presente investigación son consistentes con los resultados obtenidos en el desarrollo vegetativo y pomológico señalados, lo que fortalece la hipótesis de que las giberelinas y auxinas tienen una influencia directa en el control del desarrollo de los frutos (Owens *et al.*, 1999)

Conclusiones

La aplicación de Prohexadiona de Ca en la concentración de 250 mg L⁻¹ reduce los niveles de giberelinas y auxinas. La síntesis de giberelinas A₁, A₄, y A₇ son inhibidas por el retardante de crecimiento a la concentración referida.

Literatura Citada

- Bangerth, F. K. 1997. Can regulatory mechanism in fruit growth and development be elucidate the study of endogenous hormone concentration. *Acta Horticultrae* 463: 77-87.
- Basak, A; Rademacher, W. 2000. Growth regulation of pome and stone fruits trees by use of Prohexadione – Ca. *Acta Horticultrae* 514: 41-50.
- Evans, J. R.; Ishida, C.A.; Regusci, C. L.; Rademacher, W. 1997. Mode of action, metabolism and uptake of BAS-125W, prohexadione-calcium. *HortScience* 324: 557-558.

- Owens, L.; Stover, E. 1999. Vegetative growth and flowering of young apple trees in response to prohexadione-calcium. *HortScience* 34: 1194-1196.
- Rademacher, W. 2004. Chemical regulation of shoot growth in fruit trees. *Acta Hort. (ISHS)* 653: 29-32
- Rademacher, W.; Kraus, M.; Hoepfner, P.; Evans, J. R.; Evans, R. R.; 1998. Prohexadione-Ca. A new biorregulator for the control of vegetative growth in Apple. Data Report APE/HF 19984296RAD, BASK Agricultural Center, 67114 Limburgerhof, Germany.
- Ramírez, H.; Hoad, G. V.; Benavides, A.; Rangel, E. 2001. Gibberellins in apple seeds and the transport of [³H]-GA4. *Revista de la Sociedad Química de México* 45(2): 47-50.
- Rojas-Garcidueñas, M.; Ramírez R. 1996. Control hormonal del desarrollo de las plantas. Editorial Limusa. México, D.F. 239 p.
- Unrath, C.R. Prohexadione-Ca: 1999. A promising chemical for controlling vegetative growth of apples. *HortScience* 34(7): 1191-1200.