

ESTUDIO COMPARATIVO DE LA ABSCISION PRECOZ DE FRUTOS DE TORONJA 'MARSH' Y NARANJA 'VALENCIA' EN LAS CONDICIONES TROPICALES DE CUBA. II. ASPECTOS ENDOGENOS

Pozo, L.; Ma. del C. Pérez; H. Oliva; C. Noriega

Estación Nacional de Frutales. Instituto de Investigaciones de Cítricos. Cuba.

RESUMEN. Al estudiar el fenómeno de la abscisión precoz de frutos de toronja 'Marsh' (*Citrus paradisi* Macf.) y naranja 'Valencia' (*Citrus sinensis* L. Osbeck) bajo las condiciones tropicales cubanas, se comprobó la existencia de máximos de actividad de giberlinas y enzimas celulasas en la zona de abscisión distal (C) de los frutos. Se identificaron diferencias entre las dos especies, dadas por desfase en los picos de actividad giberélica, que se produjeron a los 93.7 días después de la antesis (DDA) en toronja 'Marsh', durante la etapa inicial de la fase de crecimiento exponencial de los frutos, y a los 40.8 DDA en naranja 'Valencia', coincidiendo con la etapa final de la fase de crecimiento logarítmico de las estructuras reproductivas correspondientes.

El pico de actividad giberélica en la naranja 'Valencia' precedió al correspondiente de la actividad celulásica; en toronja 'Marsh', en cambio, este último se produjo con una marcada anticipación en relación al máximo giberélico. Por otra parte, en 'Marsh' se identificaron altos contenidos de ácido abscísico libre y conjugado, y de ácido jasmónico libre en ambas capas de abscisión, coincidiendo con altos índices de desprendimiento de frutillos por las mismas.

Estos resultados podrían sugerir la existencia de relaciones de tipo causa-efecto entre el estado endógeno en la zona de abscisión pedúnculo-fruto, y la prolongada abscisión precoz de frutos característica de la toronja 'Marsh'.

PALABRAS CLAVE: Caída de frutos; cuaje o cuajado; abscisión postfloración; abscisión fisiológica; giberelinas; ácido abscísico; ácido jasmónico; celulasas.

A COMPARATIVE STUDY OF EARLY FRUIT ABSCISSION ON 'MARSH' GRAPEFRUIT AND 'VALENCIA' ORANGE UNDER CUBAN TROPICAL CONDITIONS. II. ENDOGENOUS APPROACH.

SUMMARY: When studying early fruitlet abscission on 'Marsh' grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.) and 'Valencia' orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) under Cuban Tropical conditions, gibberellin as well as cellulase peak activities in distal (C) abscission layer were found. Furthermore, differences between 'Marsh' and 'Valencia' were also identified, consisting of gibberellin peak delay up to 93.7 days after anthesis (DAA) in 'Marsh' grapefruit, at which time fast, exponential fruit growth was already taking place. Peak activity in 'Valencia' distal zone appeared at as early date as 40.8 DAA, when logarithmic fruit growth was coming to an end. Gibberellins peaked in 'Valencia' distal zone prior to cellulases. In contrast, maximal cellulase activity levels in 'Marsh' distal abscission zone displayed long before gibberellin peak values. On the other hand, high contents of free and conjugated abscisic acid, as well as free jasmonic acid were also found in distal and proximal abscission layers of 'Marsh' grapefruit at early stages of fruit development. At the same time, fruitlet abscission through both distal and proximal abscission zones still showed high levels.

Whole results obtained could suggest some cause-effect relationships between endogenous status along fruit pedicel (Gibberellin and cellulase activities, abscisic and jasmonic acid contents, cellulase activity) and delayed 'Marsh' fruitlet abscission as compared to 'Valencia' orange under Cuban tropical conditions.

KEY WORDS: Fruit drop; postblooming abscission; physiological abscission; gibberellins; abscisic acid; jasmonic acid; cellulases.

INTRODUCCION

En la regulación endógena de los procesos de floración y cuajado de los cítricos participa un balance de reguladores del crecimiento que interactúa con sistemas enzimáticos. Se acepta que el estado hormonal endógeno constituye un factor influyente sobre la fructificación, y en particular sobre los fenómenos de re-

tención y abscisión de frutos asociados a la misma. (Abbott, 1986).

Por su complejidad e interacción con factores bióticos y abióticos (nutrición, ambiente, etc.) la regulación endógena de la fructificación de los cítricos, y en particular de la abscisión de las estructuras reproductivas no se encuentra totalmente esclarecida, aunque se han

propuesto algunos modelos como el que relaciona la presencia de auxinas, los niveles de ácidos abscísico, la biosíntesis de etileno, la intensificación de la actividad de enzimas celulasas y finalmente el desprendimiento de estructuras reproductivas (Rasmussen, 1974; Addicott, 1970).

Las giberelinas podrían desempeñar un papel importante en la regulación del cuajado y la abscisión precoz de frutos (Moss, 1972; Agustí *et al.*, 1982). Se ha demostrado la existencia de vínculos entre los contenidos de las giberelinas A₁, A₂₀ y A₂₉ en brotes reproductivos de *Citrus sinensis* y la conversión de las flores en frutos (Talón *et al.*, 1990a); la presencia de semillas en los frutos podría influir en el protagonismo de giberelinas o auxinas en la regulación de estos procesos (García-Papi y García-Martínez, 1984). La participación del ácido abscísico, en cambio, parece constituir un elemento mucho más general en el balance endógeno comprometido con este fenómeno (Talón *et al.*, 1990b).

En las condiciones de Cuba, la abscisión precoz de frutos cítricos es un fenómeno prolongado e intenso, que repercute sobre la expresión del potencial productivo de los árboles, y que aparece relacionado con la actividad de las enzimas celulasas (Oliva y Pérez, 1985; Oliva *et al.*, 1993). Se ha comprobado que la presencia de giberelinas endógenas (Pozo *et al.*, 1995a) así como los suministros endógenos de estos reguladores (Pozo *et al.*, 1995b) favorece la retención y desarrollo de los frutos en estadios precoces.

Considerando las premisas anteriores, en el presente trabajo se han tratado de esclarecer las posibles relaciones entre las actividades de promotores giberélicos, inhibidores del tipo de los ácidos abscísico y jasmónico, y enzimas celulasas, y la abscisión precoz de frutos de toronjas y naranjas, bajo las condiciones climáticas de Cuba.

MATERIALES Y MÉTODOS

- Material vegetal.

Secciones liofilizadas de zonas de abscisión proximal (A) y distal (C) de frutos en desarrollo de toronja 'Marsh' (*Citrus paradisi* Macf.) y naranja 'Valencia' (*Citrus sinensis* L. Osbeck) de 20 a 10 años, injertadas sobre *Citrus macrophylla* y *Citrus aurantium*, respectivamente, y pertenecientes a una plantación experimental en suelo ferralítico rojo de la Estación Nacional de Frutales en Alquizar, Cuba. Las muestras de obtuvieron mensualmente en el período comprendido entre 0 y 120 días después de la antesis (DDA).

- Procedimiento de extracción de giberelinas y ácidos abscísico y jasmónico.

Se aplicó un esquema extractivo que incluyó liofilización y pulverización del material vegetal, extracción con metanol 80%, concentración hasta residuo acuoso y partición frente a acetato de etilo en medio alcalino. La fase acuosa se ajustó a pH ácido, se reextrajo con acetato de etilo y la fase orgánica se evaporó a sequedad; el crudo obtenido contenía los reguladores endógenos en forma libre. La fase orgánica inicial se evaporó a sequedad, se hidrolizó en medio ácido y se reextrajo con acetato de etilo, evaporando este último hasta sequedad; el crudo correspondiente contenía los reguladores endógenos inicialmente conjugados.

-Purificación cromatográfica.

Los crudos anteriores se cromatografiaron en columnas rellenas con DEAE Sephadex A-25 eluidas con soluciones de concentración creciente de ácido acético en metanol 80%, según describieron Grabner *et al.* (1975).

-Determinación de la actividad de giberelinas libres.

Se aplicaron los bioensayos de inducción de biosíntesis de alfa amilasa y de estimulación del crecimiento de plántula de arroz enano cv. Tan Ginbozu, descritos por Jones y Varner (1967) y Sembdner *et al.* (1976) respectivamente.

- Determinación de ácido abscísico libre y conjugado.

Se aplicó un procedimiento de cromatografía de gases utilizando detector de captura de electrones. Las condiciones cromatográficas fueron: columnas de vidrio de 2 m x 4 mm rellenas con GASCHROM Q 125 mesh; fase estacionaria OV-225. 3%; temperaturas de columna, inyector y detector de 200, 250 y 210°C, respectivamente; gas portador nitrógeno, con flujo de 40 ml·min⁻¹.

- Determinación de ácido jasmónico libre.

Se aplicó el radioinmunoensayo descrito por Bruckner (1986) y Miersch *et al.* (1987).

- Determinación de la actividad de enzimas celulasas.

Se aplicó el método viscosimétrico descrito por Radner *et al.* (1969).

- Procesamiento estadístico.

Se efectuó análisis de varianza factoriales y comparación de medias aplicando la prueba de Rango Múltiple de Duncan, con niveles de significación 0.01 y

0.001. Los procesamiento estadísticos de ejecutaron mediante el programa computacional CW Basics.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las Figuras 1 y 2 tipifican las dinámicas de actividad de giberelinas libres en ambos cultivares para un ciclo natural de fructificación. Se encontraron picos de actividad en la zona C a los 40.8 (naranja 'Valencia') y 93.7 (toronja 'Marsh') DDA sucedidos por la inversión del gradiente correspondiente a lo largo del pedúnculo. Esto significa que el pico de actividad giberélica en la zona distal de frutos de naranja ocurrió durante la fase II o fase de crecimiento logarítmico y diferenciación de estructuras de éstos, en tanto que en los frutos de toronja dicho fenómeno se produjo durante la fase II o fase de crecimiento exponencial de los frutos por alargamiento celular (Bain, 1958; Nuñez, 1986; García *et al.*, 1985).

La actividad de enzimas celulasas aparece caracterizada en las Figuras 3 y 4. La misma presentó máximos en la zona de abscisión C, a los 58.2 DDA (naranja 'Valencia') y 73.8 DDA (toronja 'Marsh') seguidos por la inversión de los gradientes correspondientes a lo largo del pedúnculo, comprobándose el retraso de estos eventos enzimáticos en los frutos de toronja 'Marsh' en relación a los de naranja 'Valencia', aunque de forma menos acentuada que el comportamiento similar encontrado para la actividad de giberelinas. Estos resultados coincidieron con los informados con anterioridad para ambas especies en las condiciones de Cuba (Pozo *et al.*, 1989; Oliva *et al.*, 1993; Pérez *et al.*, 1989; Pérez *et al.*, 1992; Pozo *et al.*, 1995a).

En los frutos de toronja, el máximo de actividad celuláica precedió con considerable anticipación (alrededor de 20 días) al pico de actividad giberélica, mientras que en los frutos de naranja el máximo de actividad giberélica antecedió en unos 8 días al correspondiente a la actividad de enzimas celulasas.

Estas secuencias inversas podrían atribuirse a diferencias de carácter varietal o asociadas a la especie. Resultan evidentes las analogías entre el periodo ininterrumpido y más prolongado de abscisión precoz de frutos de toronja, (Pozo *et al.*, 1996) y la secuencia y localización en el tiempo de los máximos de actividad giberélica y celuláica en la zona de abscisión C, identificados en el presente trabajo; las posibles relaciones entre la actividad de las enzimas celulasas y la abscisión precoz de frutos, por otra parte, coinciden con resultados anteriores obtenidos también en las condiciones de Cuba para los mismos cultivares (Oliva y Pérez, 1986).

En las Figuras 5 y 6 se representan los perfiles de actividad de giberelinas libres durante los máximos correspondientes a la toronja 'Marsh' (93 DDA) y la naranja 'Valencia' (52 DDA). Se comprobó que las fracciones más contribuyentes a la actividad total en toronja fueron 2-5 y 7-10, mientras que en naranja la mayor contribución recayó sobre las fracciones 7-10 y 11-14, abarcando un intervalo más elevado de polaridades. Estos resultados podrían estar indicando la existencia de diferentes balances de polaridades de las giberelinas activas en ambas especies. La variación de la naturaleza estructural de las giberelinas presentes en estructuras reproductivas durante el desarrollo de éstas es una característica del género *Citrus*, para el que se ha identificado un número considerable de compuestos de este tipo, cubriendo un intervalo amplio de polaridades (Talón *et al.*, 1990b).

Se comprobó que el contenido de ácido abscísico libre (ABA) en los frutos en desarrollo de toronja 'Marsh' (Figura 7) estuvo en correspondencia con los resultados obtenidos para la actividad de enzimas celulasas en las zonas de abscisión peduncular consideradas; se encontraron contenidos máximos de ABA a los 30 DDA (zona A) y 50 DDA (zona C), que coincidieron con desprendimientos mayoritarios de estructuras reproductivas por las mismas zonas (Pozos *et al.*, 1996). El contenido de ácido abscísico conjugado, reserva metabólica del ABA libre, presentó un comportamiento similar, aunque menos acentuado (Figura 8).

Los contenidos elevados de ABA libre en la zona de abscisión C presidieron al máximo de actividad de enzimas celulasas, durante un periodo de elevada abscisión de frutillos, patrón que se ajusta al modelo planteado por Rasmussen (1974), Addicott (1970) y Goren (1981) acerca de la regulación de la senescencia y abscisión de estructuras según la secuencia ABA-etileno-celulasas. En los frutos cítricos se han obtenido resultados que sugieren la existencia de relaciones entre el balance de giberelinas y ácido abscísico y el crecimiento y retención de frutos en estadios precoces de su desarrollo (Hoffman, 1988).

Los altos contenidos de ácido jasmónico (JA) libre que se identificaron en las zonas de abscisión A y C (Figura 9) coincidieron con el desprendimiento precoz masivo por ambas zonas (Pozo *et al.*, 1996). La reducción en los niveles de este regulador podría estar relacionada con el fin del periodo de abscisión precoz de frutos; en las condiciones cubanas, se ha comprobado que las aplicaciones de ácido jasmónico provocaron el aumento de la actividad celuláica en la zona de abscisión, seguida de una intensificación considerable de

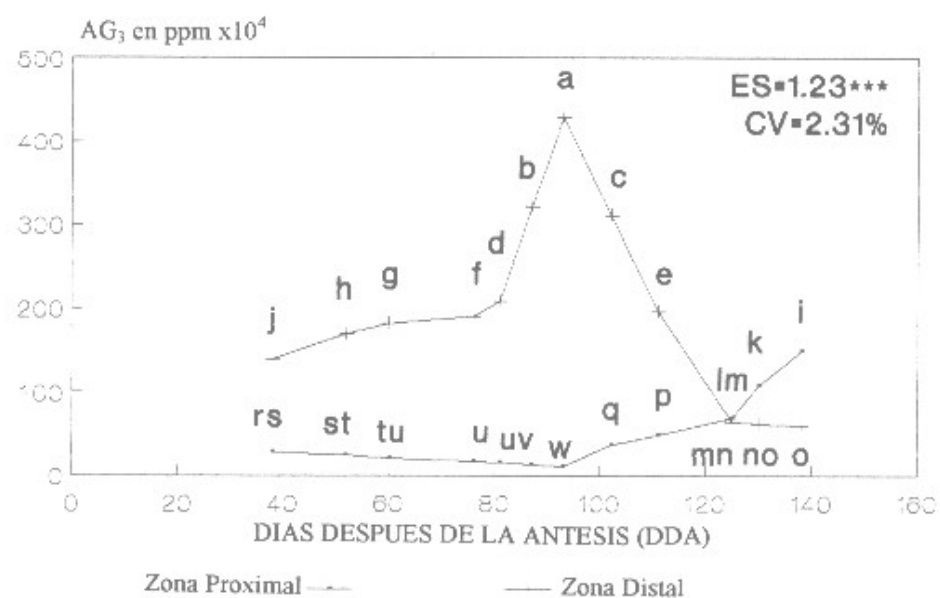


Fig. 1. Actividad de giberelinas libres en toronja 'Marsh'.

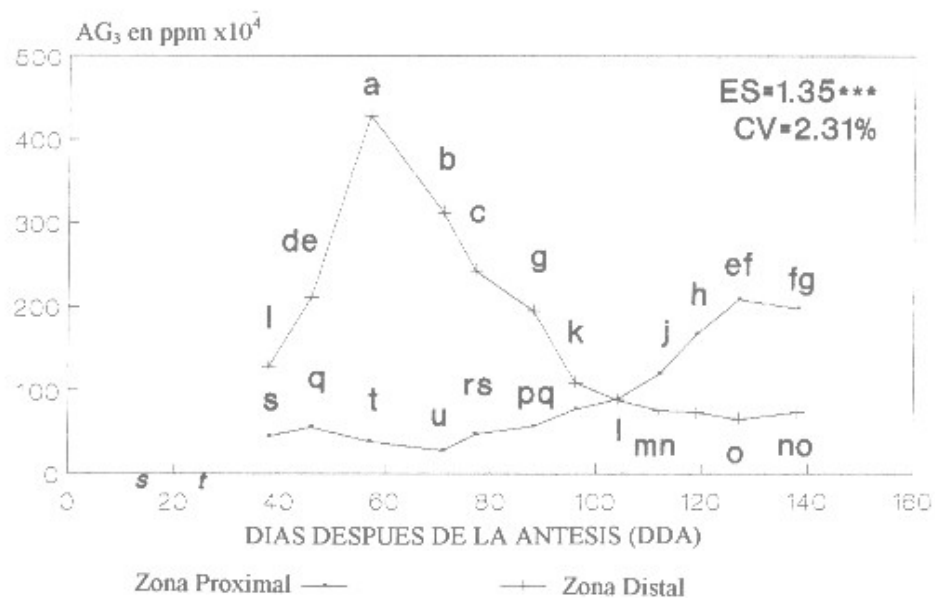


Fig. 2. Actividad de giberelinas libres en naranja 'Valencia'.

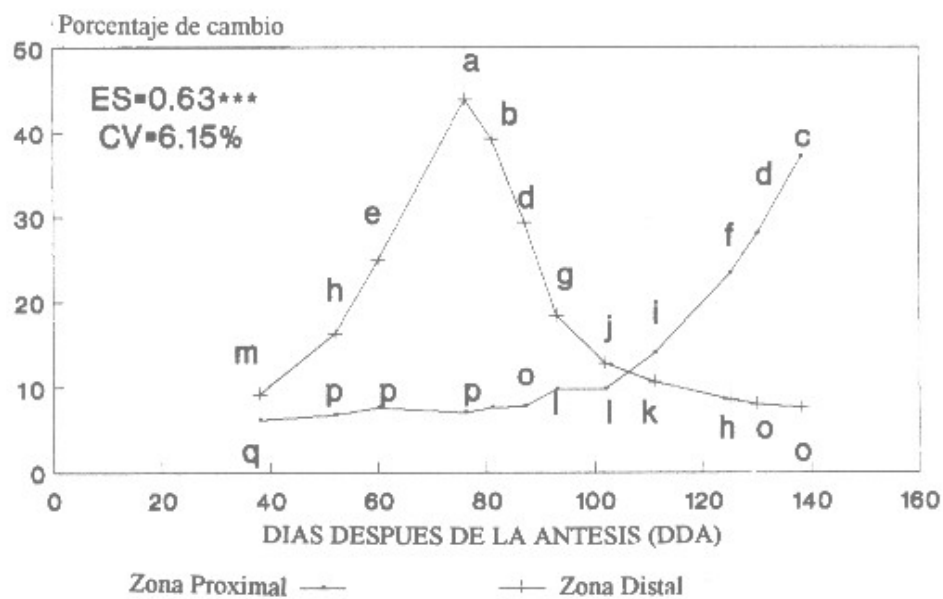


Fig. 3. Actividad de enzimas celulasas en toronja 'Marsh'.

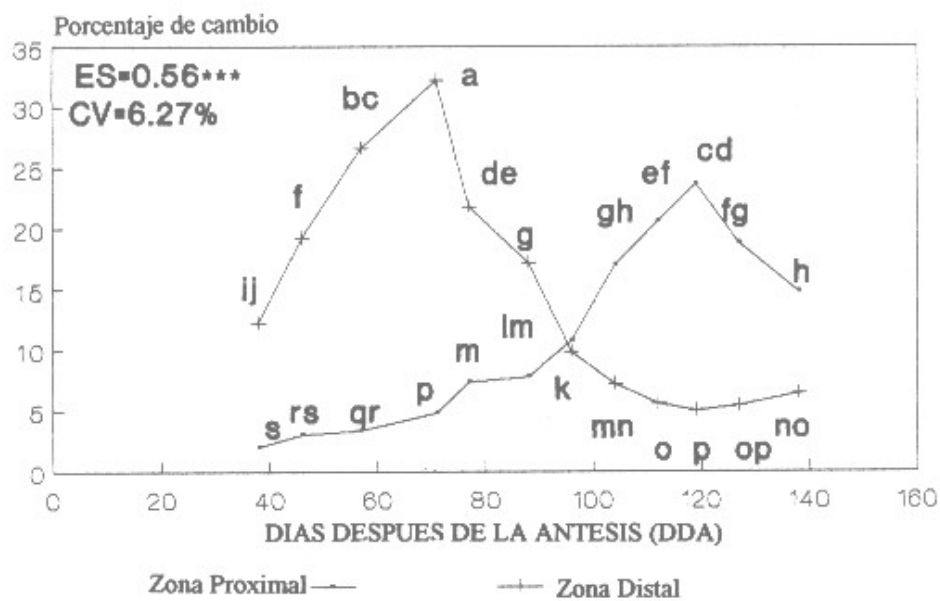


Fig. 4. Actividad de enzimas celulasas en naranja 'Valencia'.

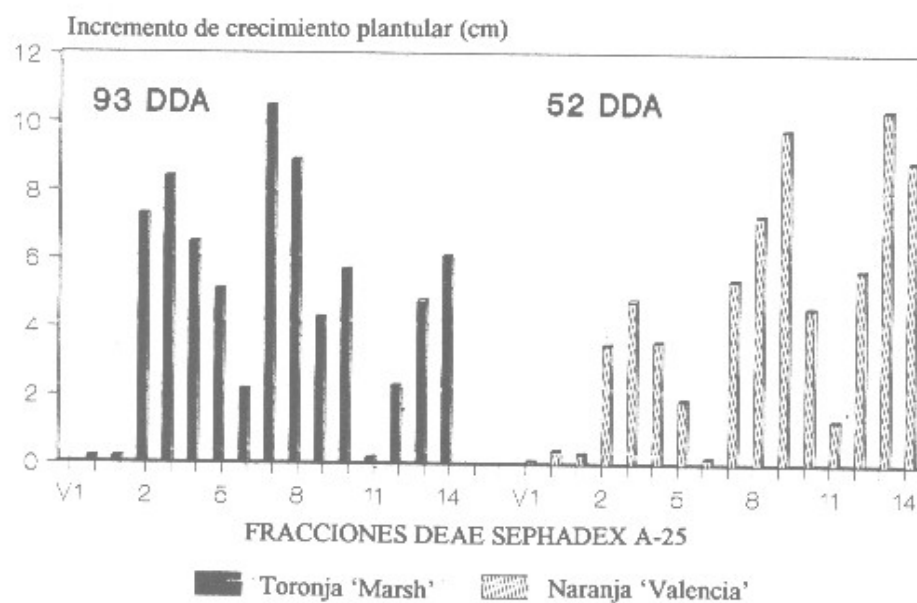


Fig. 5. Histograma de actividad de giberelinas libres.

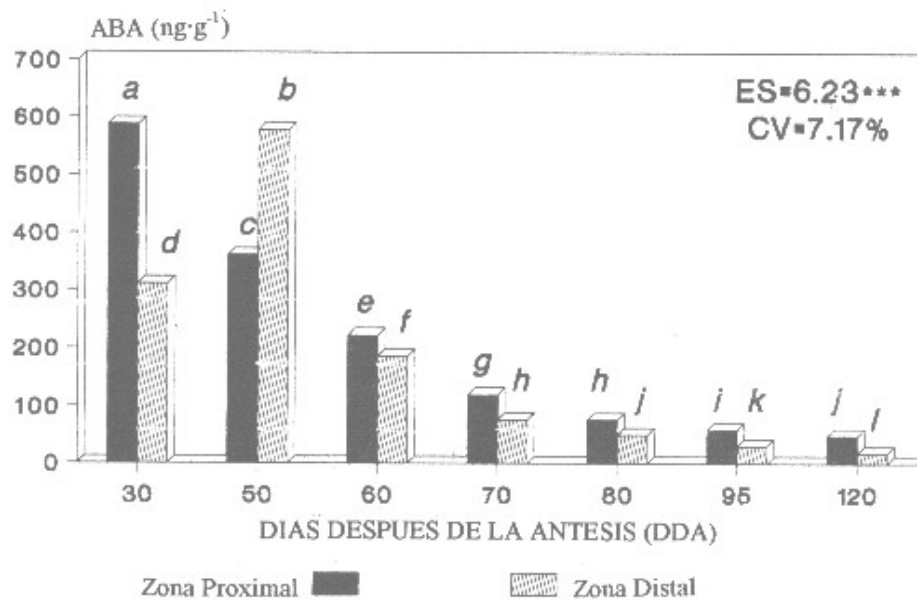


Fig. 6. Acido abscisico libre en toronja 'Marsh'.

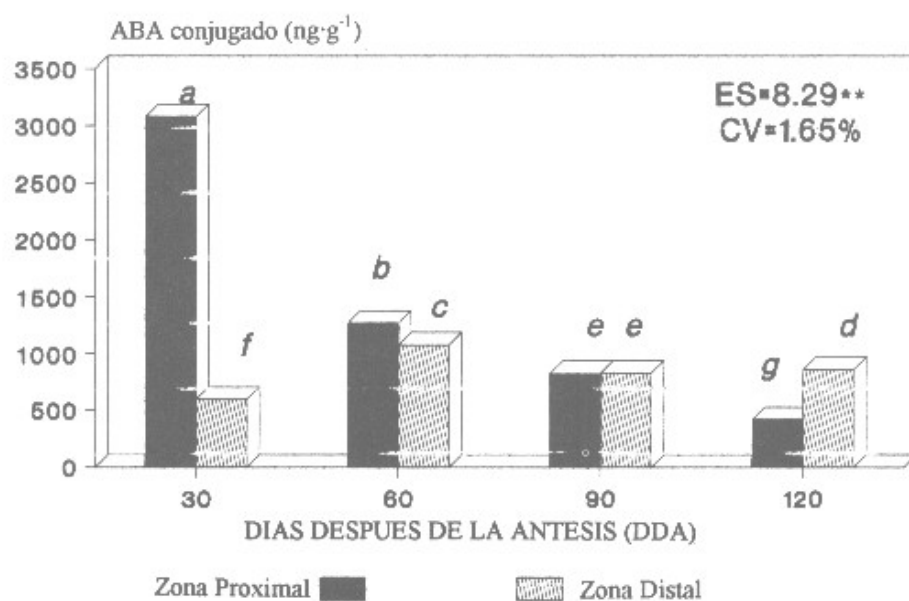


Fig. 7. Acido abscísico conjugado en toronja 'Marsh'.

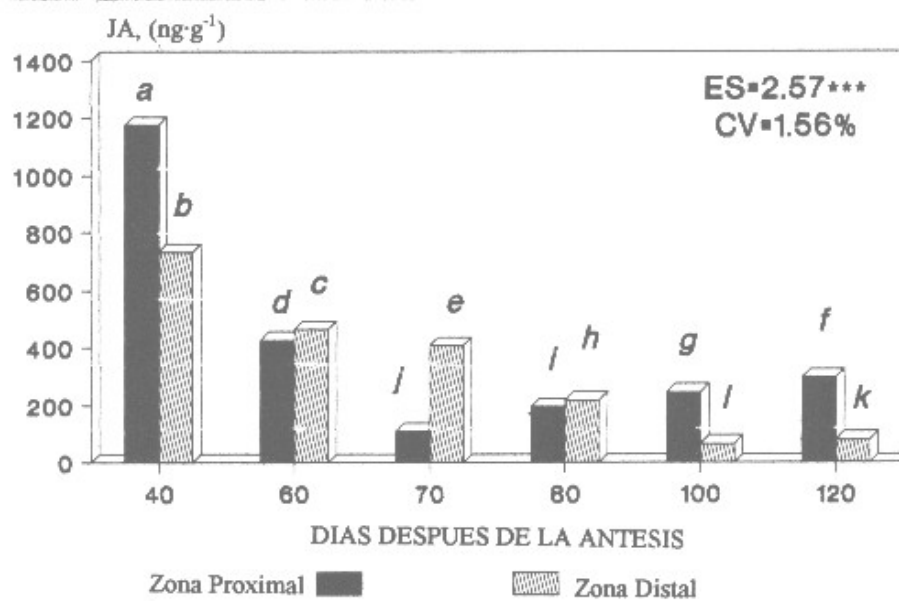


Fig. 8. Acido jasmónico libre en toronja 'Marsh'.

desprendimiento de estructuras reproductivas, a través de un patrón semejante al identificado para el etileno (Oliva y Pérez, 1986), lo que podría confirmar el compromiso de JA con un balance endógeno favorable a la abscisión precoz de frutos en árboles cítricos.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se han puesto de manifiesto eventos endógenos que se producen en la zona de abscisión de los frutos cítricos durante estadios precoces de su desarrollo, y que parecen indicar la participación efectiva de las giberelinas y los ácidos abscísico y jasmónico en la dinámica de la regulación de la abscisión precoz de estas estructuras. Las características varietales de este balance, y las peculiaridades del fenómeno de abscisión precoz de frutos identificados para los mismos cultivares y especies, podrían constituir un punto de partida para el esclarecimiento de las relaciones de tipo causa-efecto entre el desprendimiento de estructuras reproductivas jóvenes y los componentes del estado hormonal y enzimático en la zona de abscisión en las condiciones climáticas para las que estos estudios fueron conducidos.

LITERATURA CITADA

- ABBOTT, D.L. 1986. A true physiologist's view of growth regulators. Growth Regulator. Acta Horticulturae 179.
- ADDICOTT, F. I. 1970. Biochemical aspects of the activity of ABA. Plant Growth Substances. Springer-Verlag.
- AGUSTI, M.; F. GARCIA-MARI.; L. GUARDIOLA, J. 1982. Gibberellic acid and fruit set in sweet orange. Scientia Horticulturae 17:257-264.
- BRUCKNER, C. 1986. Radiolimmunologischer nachweis und strukturaufklärung von veränderungen des Jasmonsäuretyps in der Ackerbohne (*Vicia faba* L.). Tesis Doctoral. Instituto de Bioquímica de Halle. Alemania.
- GARCIA, M. E.; O. SAM; M. NUÑEZ. 1985. Cambios anatómicos durante la fase inicial del desarrollo de los frutos de tres cultivares cítricos. Cultivos Tropicales 7(2): 67-76.
- GARCIA PAPI, M.; J. GARCIA-MARTINEZ. 1984. Endogenous plant growth substance contents in young fruits of seeded and seedless 'Clementine' mandarins as related to fruit set and development. Scientia Horticulturae 22:265-274.
- GOREN, R. 1981. Regulating the abscission processes in Citrus by growth substances. Acta Horticulturae No. 20.
- GRABNER, R.; G. SCHNEIDER; G. SEMBDNER. 1975. Gibberellins. XLIII. Mitteilung Fraktionierung von Gibberellinen, Gibberellinenkonjugaten und anderen Phytohormonen durch DEAE Sephadex Chromatographie. J. Chromatograph. 121: 110-115.
- HOFFMAN, P.J. 1988. Absciscic acid and gibberellins in the fruitlet leaves of 'Valencia' orange in relation to fruit growth and retention. Proc. Int. Cit. Cong. pp. 355-364.
- JONES, R.; J. VARNER. 1967. The bioassay of gibberellins. Planta 2: 155-159.
- MIERSCH, O.; A. PREISS; G. SEMBDNER; K. SCHREIBER. 1987. iso-jasmonic acid and related compounds from *Butryodiplodia theobromae*. Phytochem. 26: 1037-1039.
- MOSS, G.I. 1972. Promoting fruit set and yield in sweet orange using plant growth substances. Austr. J. Exp. Agric. and Animal Husbandry 12: 96-102.
- NUÑEZ, M. 1986. Algunas consideraciones acerca del crecimiento y desarrollo de los frutos cítricos. Cultivos Tropicales. Reseña. Ed. INCA - MES. Cuba.
- OLIVA, H.; C. PEREZ. M. 1985. Relación entre la fuerza de retención del fruto y la actividad celulásica en las zonas de abscisión A y C en pomelos y naranjas. Boletín de Reseñas. Serie Cítricos y otros Frutales. Ed. CIDA. La Habana, Cuba.
- OLIVA, H.; PEREZ, M.C. 1986. Evolución de la actividad celulásica natural e inducida con CEPA y JA en cítricos. Simp. Int. Cit. Tropical. Vol. II p. 7-15. La Habana.
- OLIVA, H.; G. ENRIQUE; L. POZO; C. NORIEGA. 1993. Influencia de las celulasas, invertasas y peroxidasas sobre la abscisión temprana en frutos cítricos. Ciencia y Técnica en la Agricultura. Serie Cítricos y otros Frutales (En proceso).
- PEREZ, M.C.; L. POZO; H. OLIVA; E. PRIMO; M. TALON; R. MILLAN. 1989. Evolución del gradiente de giberelinas en zonas de abscisión de la naranja 'Valencia' en Cuba. Ciencia y Técnica en la Agricultura. Serie Cítricos y otros Frutales 12 (1).
- PEREZ, M. C.; L. POZO; R. AÑON; C. NORIEGA; H. OLIVA; M. GORDILLO; M. ARANGUREN; A. MARTINEZ; M. DEL CASTILLO; R. BUSTO; A. BORROTO; O. VENTO; O. YANEZ O. 1992. Growth. Regulators in citrus crop under Cuban tropical conditions. Proc. Int. Soc. Cit. I: 503-509.
- POZO, L.; H. OLIVA; M.C. PEREZ; M. ORTIZ; A. SOTOLONGO; B. VELAZQUEZ. 1989. Relación de las actividades de giberelinas y celulasas con la abscisión de frutos de toronja 'Marsh' en Cuba. Agrotecnia de Cuba 2 (1): 1.
- POZO, L.; M.C. PEREZ; C. NORIEGA; H. OLIVA. 1995a. El control hormonal endógeno de la fructificación de los cítricos I. Simp. Inter. sobre Fruticultura Tropical y Subtropical. Libro de Resúmenes. La Habana, Cuba. 26-29. pp. 44-45.
- POZO, L.; C. NORIEGA; M.C. PEREZ. 1995b. Los reguladores del crecimiento y el cultivo de los cítricos en Cuba. I. Simp. Inter. sobre Fruticultura Tropical y Subtropical. Libro de Resúmenes. La Habana 26-29. pp. 42-43.
- POZO, L.; M.C. PEREZ; H. OLIVA; C. NORIEGA. 1996. Estudio comparativo de la abscisión precoz en frutos de toronja 'Marsh' y naranja 'Valencia' en las condiciones tropicales

- de Cuba. I. Caracterización física. Revista Chapingo. Serie Horticultura. (En proceso).
- RASMUSSEN, G. 1974. Cellulase activity in separation zones of citrus fruit treated with ABA under normal and hypocaric atmospheres. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 99(3): 229-231.
- SEMBDNER, G.; E. BERGMANN; G. SCHNELIDER; H. LIEBISCH; O. MIERSCH; G. ADAM; M. LISCHESKJ; K. SCHREIBER. 1976. Biological activity of some conjugated gibberellins. Planta 132: 249-257.
- TALON, M.; P. HEDDEN; E. PRIMO. 1990a. Gibberellins in *Citrus sinensis*. A comparison between seeded and seedless varieties. J. Plant Growth Regulators 9o. 201-206.
- TALON, M.; L. ZACARÍAS; E. PRIMO. 1990b. Hormonal changes associated with fruit set and development in mandarins differing in their parthenocarpic ability. Physiologia Plantarum 79:400-406.
- TALON, M.; L. ZACARÍAS; E. PRIMO. 1992. Role of gibberellins in parthenocarpic development of seedless mandarins. Proc. Int. Soc. Cit. 1 : 485-488.