

VASCULARIZACIÓN DEL PEDICELO Y CRECIMIENTO DEL FRUTO DE *Citrus sinensis* var. *Salustiana* Y SU RELACIÓN CON EL CONTENIDO DE ÁCIDO INDOLACÉTICO

Libia E. Laskowski¹, Consuelo Monerri², Amparo García-Luis² y José Luis Guardiola²

RESUMEN

El estudio tuvo como objetivo establecer el proceso de vascularización del pedicelo y el crecimiento inicial del fruto de *Citrus sinensis* L. Osbeck var. *Salustiana* en relación con el contenido de ácido indolacético. Se emplearon plantas de un huerto ubicado en Museros, provincia de Valencia, España. Desde la antesis hasta 118 días después de antesis (dda) se colectaron estructuras reproductivas y en el laboratorio se determinaron los cambios anatómicos y el crecimiento de la superficie en sección transversal del pedicelo y el incremento en masa seca del fruto. Simultáneamente se cuantificó el ácido indolacético (AIA) en estos órganos empleando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El incremento en la superficie transversal del pedicelo estuvo determinado por el aumento en superficie en la sección transversal del xilema y el floema, con mayor tasa a partir de los 62 dda, debido a la actividad del cambium vascular. El xilema y el floema continuaron desarrollándose hasta el final del estudio, pero a partir de los 76 dda la superficie del floema activo se mantuvo constante debido al desarrollo de capas internas de fibras. Durante el período de crecimiento estudiado, la concentración de AIA tanto en los pedicelos como en el fruto fue marcadamente superior durante la post-antesis y luego disminuyó abruptamente. Los máximos niveles de AIA coincidieron con los procesos de división celular y diferenciación en el pedicelo y con la fase lenta de crecimiento del fruto. Las cinéticas de crecimiento del pedicelo y fruto fueron muy similares, observándose una mayor tasa de incremento en materia seca del fruto durante el período de mayor desarrollo del tejido vascular secundario, principalmente del xilema.

Palabras clave adicionales: Naranja, AIA, anatomía del pedicelo

ABSTRACT

Pedicel development and fruit growth in *Citrus sinensis* 'Salustiana' and their relation with indol-acetic acid content

Experiments were performed in fruits collected from *Citrus sinensis* (L.) Osbeck var. *Salustiana* with the objective to establish the relationship between indol-acetic acid content and, fruit and pedicel development during the initial growth stage. Reproductive structures of different trees from an orchard in Museros (Valencia, Spain) were collected periodically, from anthesis to 118 days after anthesis and used to determine cross-sectional area of pedicel, anatomical changes, dry mass of fruit, and indol-acetic acid (IAA) content using HPLC. The increase in cross-sectional area of pedicel was related to the increase in cross-sectional area of xylem and phloem, with greater rate from the 62 dda, due to the activity of the vascular cambium. Xylem and phloem continued developing until the end of the study (118 dda), but from the 76 dda the active phloem area remained constant due to the development of internal fiber layers. During the period of study the concentration of AIA in the pedicel as in the fruit was noticeably superior during postanthesis, and soon it diminished sharply. The maximum levels of IAA fitted with processes of cellular division and differentiation in pedicel and with the slow phase of growth of the fruit. Growth kinetic of pedicel and fruit were noticeably similar, being observed a greater rate of increase in fruit dry mass during the period of greater development of the secondary vascular tissue, mainly of xylem.

Additional key words: Orange, AIA, anatomy of pedicel

INTRODUCCIÓN

La relación entre el desarrollo del tejido vascular del pedicelo y el crecimiento, de los frutos en *Citrus* ha motivado diversos estudios

pues se considera que la tasa de acumulación de nutrientes en el fruto puede estar potencialmente limitada por la capacidad del sistema vascular (Bustan et al., 1995; Guardiola y García-Luis, 2000). Esta suposición conlleva a la posibilidad

Recibido: Agosto 21, 2007

Aceptado: Diciembre 28, 2007

¹ Dpto. de Ciencias 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

teórica de incrementar el tamaño final del fruto si ocurre una mayor vascularización del pedicelo, por lo que la literatura sobre el tema incluye además de los aspectos de crecimiento, los relacionados con el efecto de la aplicación de auxina debido a su efecto en la inducción del tejido vascular (Aloni, 1995 y 2001).

De acuerdo con Bustan et al. (1995) el desarrollo del pedicelo en pomelo es concomitante al incremento del tejido vascular y ambos anteceden al crecimiento exponencial del fruto. En este mismo sentido, Sachs (2000) sostiene que ha medida que ocurre el crecimiento del fruto éste ajusta su conexión al tallo promoviendo, a través de la producción de ácido indolacético (AIA), el desarrollo del tejido vascular. Sin embargo, García-Luis et al. (2002) han demostrado que la acumulación de materia seca en *Citrus clementina*, aunque no está limitada por la capacidad de transporte del floema, existe una relación entre la tasa de crecimiento del fruto y la formación de xilema. Por su parte, Mesejo et al. (2003) encontraron en mandarina Satsuma que a pesar de existir una estrecha relación entre aplicación exógena de auxinas al pedicelo y su vascularización, este efecto no se tradujo en un incremento significativo en el tamaño final del fruto.

Para comprender el complejo efecto de la aplicación de auxina en la diferenciación del tejido vascular se debe considerar que éste depende tanto de la concentración como de la distribución de la hormona en el tejido en un momento dado (Aloni, 2001), y que la modificación del gradiente de auxina entre el fruto y el pedicelo puede provocar importantes alteraciones fisiológicas y anatómicas, ya que durante los procesos de desarrollo el flujo de AIA está rigurosamente bajo control homeostático (Drazeta et al., 2004).

De acuerdo con Bangerth (1997), realizar estudios para identificar sustancias de crecimiento endógenas y relacionar su concentración con los procesos de desarrollo en los cuales se cree participan es relevante en biotecnología. En relación a los cítricos Goldschmidt (1976) sostiene que el ácido indolacético es la principal auxina en el género *Citrus*, presente en altos tenores en el ovario y frutos pequeños. El-Otmani et al. (1995) también han recopilado información sobre niveles endógenos de AIA en la flor y fruto de diversas

especies de cítricos, mientras que Okuda y Hirabayashi (1998) y Yuan et al. (2003) aportan datos sobre el contenido de AIA en pedicelos de mandarina y naranja en relación a la abscisión. Sin embargo, estos trabajos no proporcionan información sobre los procesos de diferenciación y crecimiento del fruto, en los cuales se conoce intervienen las auxinas (Aloni, 2001; Drazeta et al., 2004). En este sentido, el objetivo del presente trabajo fue determinar el contenido endógeno de ácido indolacético durante el crecimiento del pedicelo y fruto de *Citrus sinensis* var. Salustiana y establecer su relación con los procesos de vascularización del pedicelo y crecimiento inicial del fruto en esta especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en 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 Valencia, España, a 17 msnm, bajo condiciones climáticas propias del mediterráneo, con riego, fertilización y control fitosanitario considerados como adecuados. Dentro de la plantación se seleccionaron 25 árboles al azar con características similares en vigor y nivel de floración. En estos árboles se etiquetaron un total de 152 brotes uniflorales con 4 a 5 hojas, recién en antesis, para ser utilizados como patrón de referencia del estado de desarrollo del fruto durante el estudio. Se realizaron nueve muestreos de órganos reproductivos con su pedicelo desde antesis hasta 118 días después de antesis (dda), en intervalos entre 10 y 14 días. Para el estudio anatómico se tomaron al azar diez órganos reproductivos en cada fecha de colecta, mientras que para la determinación del contenido endógeno de AIA el tamaño de la muestra varió a medida que ocurrió el crecimiento del fruto. El día 0 se colectaron 300 flores en antesis y luego del cuajado la muestra varió de 150 a 40 frutos y se dividió en dos repeticiones independientes.

A fin de conocer el proceso de crecimiento y desarrollo inicial del pedicelo se emplearon variables microestructurales y bioquímicas, consistentes en: i) descripción de los cambios anatómicos; ii) determinación de la evolución de la superficie en sección transversal (SST) del pedicelo y tejido vascular y iii) cuantificación del

contenido de AIA. El crecimiento inicial en el fruto se determinó con base a variables macroestructurales y bioquímicas consistentes en: i) evolución en la masa seca y ii) cuantificación del contenido de AIA.

Estudio anatómico

En el laboratorio se separaron con bisturí los pedicelos del fruto a una distancia de 0,5 mm del cáliz, se cortaron a igual distancia del tallo y se preservaron en FPA (formalina-ácido propiónico-etanol, 1:1:18). Para su estudio fueron rehidratados en serie descendente de etanol hasta agua y se obtuvieron secciones transversales de 30 μm de espesor empleando un micrótopo de congelación (Microm HM 440 E). Diez secciones de cada uno de los diez pedicelos colectados fueron teñidas con safranina-verde luz, deshidratadas en serie ascendente de etanol hasta tolueno y montadas permanentemente con Entellán sobre láminas portaobjeto (Jonhansen, 1940). En base a la observación de las secciones al microscopio óptico (Nikon-Alpha Phot-2), se realizó la descripción histológica de los pedicelos y se calculó la superficie en sección transversal de sus componentes a partir de la media de los diámetros medidos en sección transversal con un micrómetro, asumiendo al pedicelo como una estructura formada por tejidos continuos dispuestos en forma concéntrica. Durante el desarrollo temprano del pedicelo, cuando el tejido vascular formaba haces, la superficie del xilema y floema fue medida utilizando sus imágenes digitalizadas en computadora, a través del programa Soft Imaging System Analysis.

A partir del inicio del crecimiento secundario la superficie en sección transversal del floema se calculó de dos maneras: i) considerando el total de tejido desarrollado y ii) excluyendo los estratos de fibras con el objeto de considerar sólo el floema funcional (conductor), de acuerdo con terminología empleada por Schneider (1968). Los resultados fueron promediados y se calculó el error estándar.

Determinación del contenido de ácido indolacético en frutos y pedicelos

En el laboratorio, los pedicelos provenientes de cada muestreo (entre 150 y 40 dependiendo de la fecha) se cortaron entre el cáliz y el tallo y a los frutos se le eliminó el estilo y el cáliz, utilizando

un bisturí. A partir del día 76 dda, los frutos fueron además discriminados entre corteza y vesículas. Todo el material vegetal se liofilizó durante 24-48 horas y para cada fecha de colecta se determinó la masa seca de las dos repeticiones utilizando una balanza de precisión. Las muestras de pedicelos y frutos fueron pulverizadas y guardados en congelador a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para la posterior determinación de los niveles de ácido indolacético (AIA) libre utilizando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Para la extracción, 1 g de peso seco de cada muestra fue homogenizado en 35 mL de metanol al 80 % con $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BHT (hidroxitoluenobutilado) a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20 horas. El extracto fue centrifugado y re-extraído dos veces por 3 horas. El extracto total (85 mL) fue centrifugado, evaporado a sequedad y resuspendido con 10 mL de acetato amónico 10 mM. A continuación, el extracto se prepurificó en columnas de PVPP (polyvinylpolypyrrolidona, Sigma) de 20 mL, utilizando como medio de elución 50 mL de acetato amónico 10 mM. La fracción correspondiente a las auxinas (30 mL finales) se reforzó con 200 ng de ácido indolpropiónico (AIP) para el cálculo de las pérdidas durante el proceso.

La purificación de la fracción auxinas se realizó en tres fases sucesivas, utilizando para cada muestra cartuchos de purificación conectados a jeringas desechables de 20 mL. En la primera fase de purificación se utilizaron dos cartuchos en serie de intercambio aniónico (QMA de Waters). Estos fueron cargados lentamente con los 30 mL de extracto y se eluyó con 12 mL de ácido acético 0,2 M. En una segunda fase, el extracto se incorporó a un cartucho C18 Sep-Pack (Waters) y su separación se realizó con 5 mL de metanol 50 % en ácido acético 0,1 M. Se recogió el eluato en tubos de fondo cónico de 25 mL y se procedió a su evaporación utilizando corriente de nitrógeno hasta quedar aproximadamente 1-2 mL. Esta fracción se resuspendió con 5 mL de ácido acético 0,1 M y se utilizó en la tercera fase de purificación. Para ello se conectó un cartucho C18 Sep-Pack (Waters) a una jeringa de vidrio, se cargó la muestra y se eluyó con 3 mL de éter. A continuación se procedió a evaporar el éter con corriente de nitrógeno hasta completa sequedad. La fracción de auxina resultante se resuspendió con 0,2 mL de metanol al 50% en agua mili Q, se

filtró utilizando un millipore tipo HV de 0,45 μm y se guardó en el congelador en tubos de Eppendorf para su cuantificación por HPLC.

La separación de las auxinas por HPLC se llevó a cabo en una columna Kromasil 100 C18 (25 x 0,46 cm) de 5 μm de tamaño de partícula equipada con precolumna ODS. En 20 μL de extracto conteniendo entre 1 a 5 ng de AIA se eluyó con un flujo de 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ usando 60 % de metanol durante 10 minutos. A continuación, se utilizó un gradiente de 30 a 60 % de metanol en 40 minutos. La identificación se realizó con un detector de fluorescencia bajo condiciones de 280 nm de excitación y 350 nm de emisión.

Para la cuantificación del AIA las áreas de los perfiles cromatográficos de al menos dos repeticiones de las muestras procesadas se compararon con los perfiles obtenidos con patrones de AIA y AIP. Las pérdidas durante el procesamiento se calcularon a través de la cuantificación del ácido indolpropiónico añadido durante la purificación del extracto, obteniéndose una recuperación final entre el 40 y 60 % del AIP.

El cálculo y análisis de los resultados se realizó utilizando el programa de procesamiento de datos cromatográficos Millennium 32 (Water Associates). Los resultados de las dos repeticiones se promediaron y se calculó el error estándar.

RESULTADOS

Características anatómicas del pedicelo durante su desarrollo

Los pedicelos durante la antesis se caracterizaron anatómicamente por presentar una epidermis uniestrata de células pequeñas; seguidamente el córtex se observó de forma irregular por la presencia de trazas foliares y formado por dos tipos de células parenquimáticas: más pequeñas y en división por debajo de la epidermis y de mayor tamaño a continuación. Dentro del córtex, en contacto con la epidermis, se observaron glándulas oleíferas en desarrollo. El tejido vascular se observó dispuesto en 10 a 12 haces vasculares colaterales abiertos, pequeños, en círculo irregular, separados entre sí por 1 a 4 filas de células (Figura 1A), observándose vasos en desarrollo entre el xilema y floema, característicamente con paredes poco lignificadas y células muy pequeñas y en división, dando inicio a la diferenciación del cambium fascicular

(Figura 1B). En la parte central de estos pedicelos se observó una médula parenquimática de células pequeñas dispuesta en forma circular (Figura 1A).

Durante el desarrollo inicial del fruto los pedicelos mostraron características morfológicas y anatómicas similares a la de antesis, con variaciones principalmente en el tejido vascular. En pedicelos de 11 dda se observaron haces con mayor desarrollo de xilema y floema con respecto a la antesis y la diferenciación del cambium fascicular (Figura 1C), mientras que la diferenciación del cambium interfascicular fue observable entre los 21 y 34 dda. (Figura 1D).

A los 48 dda el tejido vascular aunque muy desarrollado formaba todavía haces vasculares y se completó la diferenciación del cambium vascular, dando inicio al crecimiento secundario, observable claramente en pedicelos de 62 dda (Figuras 2A), con tejido vascular dispuesto radialmente. Para esta fecha se observó la presencia de grupos de fibras perifloemáticos de 2 a 4 células de espesor y la presencia de fibras en proceso de diferenciación dentro del floema primario, mientras que el xilema se caracterizó por el desarrollo continuo de elementos de los vasos (Figura 2B).

Entre los 76 y 118 dda continuó la diferenciación radial de xilema y floema secundario. Este período se caracterizó además por la formación de lenticelas en un súber incipiente y la esclerotización del floema primario, con continua formación de grupos de fibras a partir de elementos conductores, progresando hacia el interior del cilindro vascular (Figura 2C).

Al final del período en estudio, a los 118 dda, la zona cambial presentó 4 a 6 filas de espesor; el xilema se observó del tipo poro-difuso, con gran cantidad de fibras y escaso parénquima, mientras que el floema se mostró formado por dos o tres estratos de fibras (elementos no conductores) que alternaron con igual número de estratos de células cribosas y de parénquima (floema activo) en contacto con la zona cambial (Figura 2D).

Cambios en la superficie en sección transversal del pedicelo y el tejido vascular

Tras la antesis y hasta aproximadamente 34 dda el crecimiento en superficie transversal del pedicelo fue baja y a partir de ese momento se incrementó, con un crecimiento lineal a partir de 62 dda hasta el final del estudio, a los 118 dda

(Figura 3).

El crecimiento del tejido vascular siguió la misma cinética sigmoideal del pedicelo (Figura 3). Tanto el xilema como el floema mostraron un crecimiento lento tras la antesis hasta aproximadamente los 34 dda. A continuación y hasta el final de las determinaciones experimentales, se incrementó a mayor velocidad la superficie transversal ocupada por ambos tejidos, a mayor tasa el xilema. A partir de los 76 dda se observó que mientras la superficie del floema en su conjunto se incrementó progresivamente hasta los 118 dda, el floema funcional (con exclusión de las capas de fibras) mantuvo una superficie transversal constante durante ese período de tiempo (Figura 3).

A final del estudio el xilema alcanzó una

superficie transversal media de $2,6 \pm 0,1 \text{ mm}^2$, 60 veces mayor que la mostrada en antesis, mientras que la superficie transversal del floema alcanzó $1,4 \pm 0,4 \text{ mm}^2$, aproximadamente 30 veces mayor que la observada durante la antesis (Figura 3).

En general, la proporción de los tejidos componentes del pedicelo se modificó durante su crecimiento. Desde antesis hasta aproximadamente 34 dda el tejido vascular representó el 23 % de los tejidos del pedicelo, mientras que el resto constituyó el tejido fundamental. A partir de esa fecha esta proporción se invirtió por el rápido desarrollo del tejido vascular, de tal manera que al final del período de estudio el xilema y floema ocuparon el 59 % de la superficie en sección transversal del pedicelo, con una mayor proporción de xilema (39 %) que de floema (20 %).

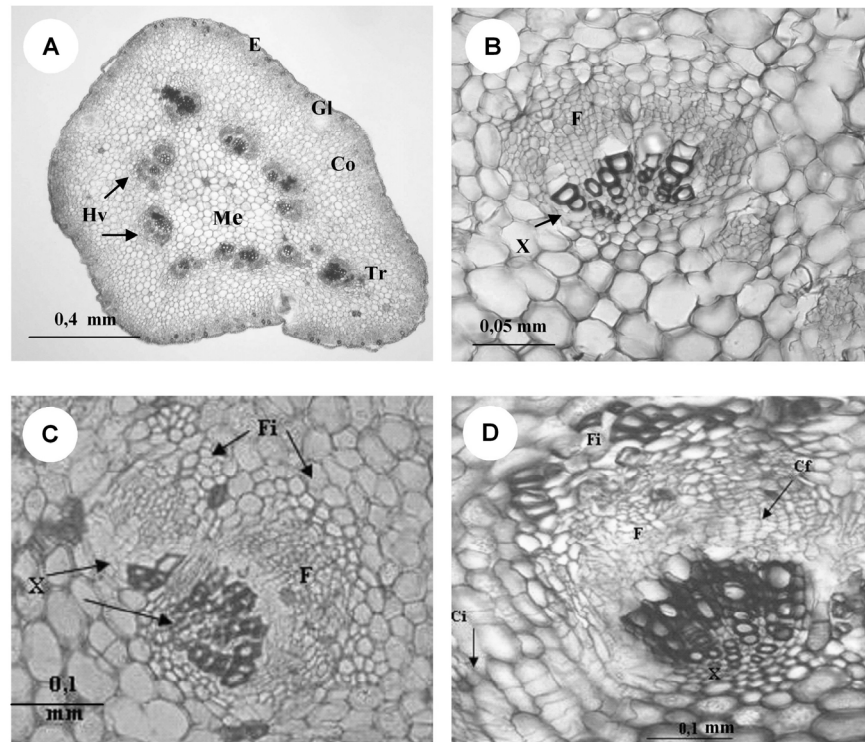


Figura 1. A. Organización histológica del pedicelo de la flor en antesis. B. Detalle de un haz vascular del pedicelo de la flor en antesis. Se observa el desarrollo del floema y xilema a partir de células del procambium: Los vasos del metaxilema presentan paredes en proceso de lignificación. C. Detalle del tejido vascular a 11 dda. Se observan dos haces vasculares con diferente grado de diferenciación del floema y xilema. D. Detalle de un haz vascular a los 21 dda. El haz presenta mayor grado de desarrollo de floema y xilema. Se observa el inicio de la diferenciación del cambium con la división periclinal de células situadas entre el xilema y floema y en el parénquima interfascicular (señalado con flechas). Leyenda: Co = Córtex, E = epidermis, F = floema, Fi = fibras, Gl = glándula, Hv = haz vascular, Me = médula, Tr = traza foliar, X = xilema.

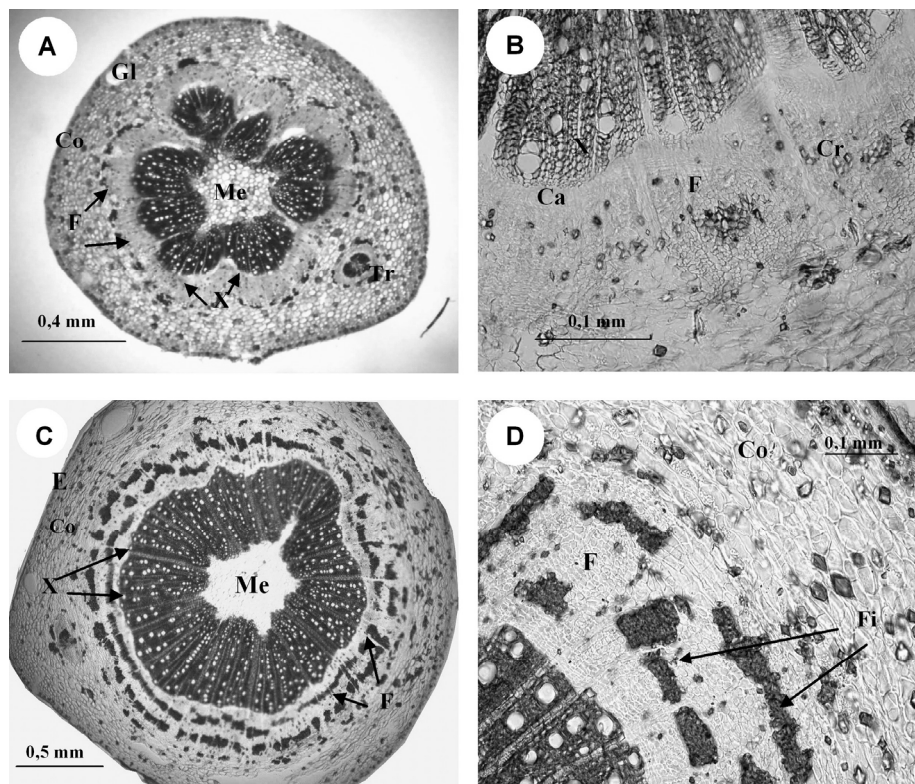


Figura 2. Características anatómicas del crecimiento secundario del pedicelo durante la fructificación de *C. sinensis* var. Salustiana. **A.** Sección transversal mostrando el arreglo histológico del pedicelo a los 62 dda. El tejido vascular dispuesto en cilindro irregular, con fibras alrededor del floema en anillo discontinuo. **B.** Detalle del cilindro vascular a 62 dda. Se observa la zona cambial y el xilema y floema de reciente diferenciación. En el metafloema se observan abundantes cristales y algunas fibras (señaladas con flecha). **C.** Arreglo histológico del pedicelo a los 118 dda, con el tejido vascular en cilindro continuo y nuevos desarrollos de fibras en el floema. **D.** Detalle del cilindro vascular a los 118 dda donde se muestra el xilema secundario, la zona cambial y el floema constituido por dos a tres capas separadas entre si por anillos de fibras. Leyenda: Ca= cambium, Co= Córtex, Cr= cristales, E= epidermis, F= floema, Fi= fibras, Gl= glándula, Me= médula, Tr= traza foliar, X= xilema

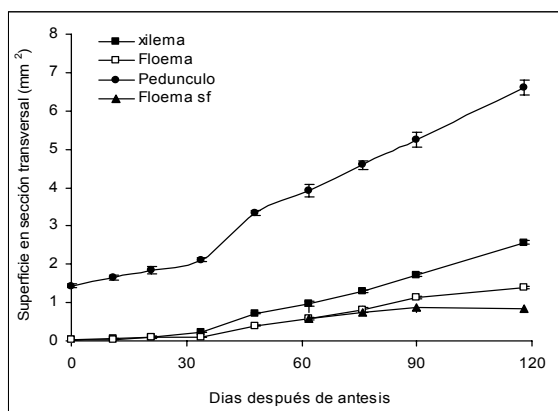


Figura 3. Crecimiento de la superficie en sección transversal del pedicelo de *C. sinensis* var. Salustiana durante la fructificación

Cambios en el contenido de AIA en el pedicelo

En la Figura 4 se presentan los cambios en concentración ($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ de materia seca) y contenido (ng por pedicelo) de AIA durante el crecimiento inicial del fruto de Salustiana. Después de la antesis la concentración de AIA aumentó considerablemente hasta alcanzar su valor máximo a los 21 dda ($500 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ de materia seca), luego disminuyó levemente, oscilando entre 420 y $450 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ de materia seca hasta los 48 dda. A partir de esa fecha, la concentración de AIA declinó notoriamente hasta los 76 dda cuando se registró un valor medio de $77 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ de materia seca, la cual se mantuvo aproximadamente constante hasta los 118 dda, significativamente por debajo de los valores medios registrados al

inicio del crecimiento del pedicelo. Paralelamente, el contenido de AIA por pedicelo (inserto en Figura 4) alcanzó un máximo de 4 ng por pedicelo entre los 48 y 62 dda y a continuación disminuyó hasta 2 ng/pedicelo a los 76 dda, valor medio que se mantuvo con pocas variaciones hasta el final del estudio, a los 118 dda.

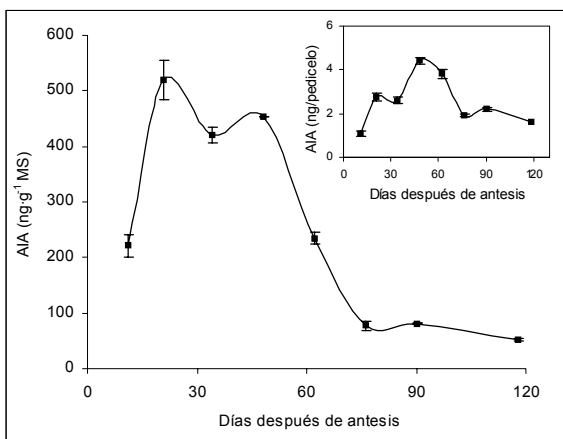


Figura 4. Cambios en los niveles de AIA en pedicelos de *C. sinensis* var. Salustiana

Crecimiento del fruto

De acuerdo con la Figura 5, el crecimiento inicial del fruto se ajustó a las primeras fases de una curva sigmoideal, muy lento desde antesis hasta aproximadamente 48 dda y a continuación se mantuvo exponencial hasta el final del estudio. La tasa de acumulación de materia seca aumentó marcadamente a partir de los 48 hasta 118 dda, con un corto período de ralentización entre los días 62 y 76 después de antesis, durante el cual la tasa fue constante. Al final del estudio la tasa de crecimiento absoluto en materia seca fue equivalente a $0,23 \text{ g} \cdot \text{día}^{-1}$ por fruto (máximo) en comparación a los $0,006 \text{ g} \cdot \text{día}^{-1}$ en promedio registrados durante la fase lenta de crecimiento.

Cambios en el contenido de AIA en el fruto

En la Figura 6 se presentan tanto los cambios en la concentración como el contenido de AIA del fruto de Salustiana durante su crecimiento inicial. La concentración de AIA en el fruto se mantuvo elevado entre antesis y 21 dda, período durante el cual osciló entre 53 y $77 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ de materia seca. A partir de ese momento disminuyó abruptamente hasta los 62 dda fecha a partir de la cual se mantuvo constante, registrándose a los 118 dda una media de $20 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$, correspondiendo

en su totalidad a la porción corteza, ya que entre los 76 y 118 dda no se detectaron niveles significativos de AIA en la porción vesículas, al realizar por separado su cuantificación.

A pesar de la disminución de la concentración del AIA, su contenido en el fruto se incrementó notablemente desde la antesis ($0,7 \text{ ng}$ por ovario) hasta el final del estudio, a los 118 dda (inserto en Figura 6), cuando se registró un valor medio de 150 ng por fruto, correspondiente en su totalidad a la fracción corteza.

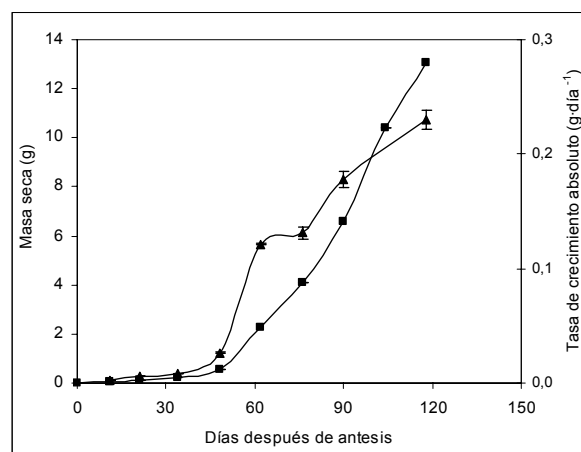


Figura 5. Crecimiento inicial del fruto de *C. sinensis* var. Salustiana

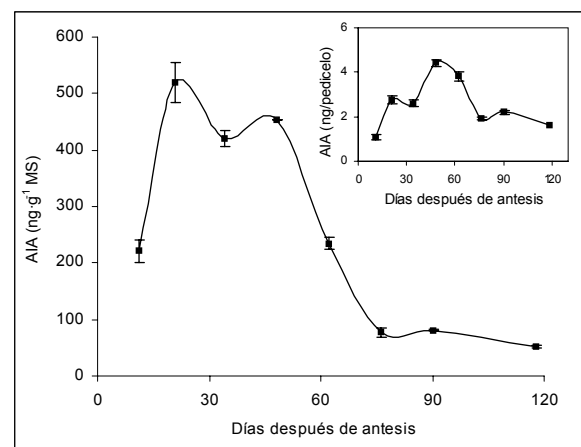


Figura 6. Cambios en los niveles de AIA en frutos de *C. sinensis* var. Salustiana durante su crecimiento inicial

DISCUSIÓN

En el pedicelo de *C. sinensis*, a semejanza de otras especies de *Citrus* (Bustan et al., 1995; Erner y Shomer, 1996; García-Luis et al., 2002), el

crecimiento se caracterizó por un continuo y creciente desarrollo del tejido vascular, con una tasa luego de la diferenciación del cambium vascular, observándose una mayor proporción de xilema frente al floema durante el crecimiento secundario. En particular, el pedicelo de Salustiana se caracterizó por la progresiva esclerificación del floema, evidente desde los 76 dda. De acuerdo con Mauseth (1986) este hecho se relaciona con una disminución de la superficie del floema con capacidad de transporte y un incremento en la función mecánica de sostén.

En relación a la concentración de AIA en el pedicelo de Salustiana, los máximos valores cuantificados durante la post-antesis (Figura 4) coinciden con los reportados por Okuda y Hirabayashi (1998) en Kiyomi tangor para ese mismo período y los valores mínimos observados al final del estudio coinciden con los señalados por Yuan et al. (2003) durante el cuajado final de *C. sinensis*. De acuerdo con la evolución registrada en nuestro estudio, el lapso de mayor concentración de AIA en el pedicelo de Salustiana coincidió con los procesos de división y diferenciación celular que conllevaron a la formación de xilema y floema primarios, y a la formación del cambium vascular todo ello durante la fase de crecimiento lento del pedicelo. A su vez, los menores niveles de AIA se detectaron durante el crecimiento exponencial en superficie transversal del pedicelo como consecuencia del creciente desarrollo del tejido vascular secundario, período donde se observó además la esclerificación del floema. Estos resultados implican una sensibilidad particular de los tejidos en proceso de diferenciación a la variación en el contenido de auxina (Davies, 1995). Así, en el pedicelo de Salustiana altos contenidos de AIA fueron requeridos para la diferenciación temprana del tejido vascular, lo cual concuerda con las propuestas de Sachs (1981; 2000) y Aloni (1995; 2001) sobre el papel de las auxinas en el proceso inicial de vascularización en las plantas.

Por otro lado, el creciente desarrollo de tejido vascular secundario observado en el pedicelo una vez disminuido el contenido de AIA, concuerda con el efecto posicional del AIA propuesto por Ugglia et al. (1998; 2001), según el cual el AIA se concentra o posiona en la zona cambial

dirigiendo su tasa de división, de tal forma que la actividad auxínica sobre el desarrollo del tejido vascular se mantiene a pesar de disminuir la concentración total.

En relación al fruto de Salustiana, su crecimiento simple sigmoidal fue semejante a los descritos para *C. sinensis* por Bain (1958) y, Story y Treeby (1999) mostrando una transición de la fase lenta a la fase exponencial, tiempo crítico en el desarrollo del fruto a los 48 dda (Figura 5). Contrariamente al incremento registrado para la materia seca, la curva de concentración de AIA en el fruto mostró ser decreciente, con niveles máximos posterior a la antesis y luego una brusca disminución (Figura 6), coincidiendo tanto en valores como en su evolución con lo reportado en naranja Valencia por Yuan et al. (2003) y para otras especies de cítricos (Goldschmidt, 1976; El-Otmani et al., 1995).

Sobre la aparente contradicción de bajos niveles de AIA durante la fase exponencial de crecimiento, Kojima (1996) señala que probablemente más que la concentración es el contenido total de AIA el determinante de la aceleración del crecimiento en esta fase. Los resultados del estudio coinciden además en vincular altos contenidos de AIA con procesos de división celular y bajos con procesos de desarrollo histológico (Laskowski et al., 2006), lo cual se explica asumiendo que estos procesos dependen de finos balances hormonales tal como lo señalan Davies (1995) y Drazeta et al. (2004).

En *Citrus sinensis* var. Salustiana se observó un gran paralelismo entre la cinética de crecimiento del pedicelo y el fruto durante el desarrollo inicial de ambos órganos (Figuras 3 y 5), correlación está ya señalada para otras especies de *Citrus* (Bustan et al., 1995; Erner y Shomer, 1996). Durante el período de estudio el crecimiento del fruto de Salustiana coincidió, aunque con un ligero retraso, con el proceso de desarrollo del xilema y floema hasta los 76 dda y a partir de esta fecha mostró una mayor vinculación con el desarrollo del xilema secundario, coincidiendo con lo observado en *Citrus clementina* por García-Luis et al. (2002).

En relación al floema secundario, se puede afirmar que en la naranja Salustiana una superficie constante de floema funcional fue suficiente para sostener el incremento en incorporación de

materia seca durante el crecimiento exponencial del fruto, mientras que la esclerotización de la porción restante se requirió para sostener el fruto en desarrollo.

CONCLUSIONES

En *Citrus sinensis* var. Salustiana existe una estrecha relación entre el crecimiento del fruto y el desarrollo del tejido vascular del pedicelo. Durante el crecimiento secundario del pedicelo el crecimiento del fruto está vinculado principalmente con el desarrollo de xilema debido a la progresiva esclerotización del floema.

Después de la antesis, la concentración de AIA en los pedicelos alcanzó valores máximos coincidiendo con la diferenciación del cambium vascular. A partir de 62 dda los niveles de AIA en el pedicelo disminuyeron y en consecuencia, el crecimiento secundario se produjo en condiciones de concentración de AIA relativamente bajas.

Los mayores niveles de AIA en el fruto se presentaron luego de la antesis y se relacionaron con la fase lenta de crecimiento, mientras que el aumento en la velocidad de crecimiento del fruto ocurrió en condición de baja concentración pero alto contenido de AIA.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado” por financiar los estudios. Al personal docente y técnico que colaboró con su apoyo personal, de los Departamentos de Biología Vegetal (UPV) y Ciencias Biológicas (UCLA).

LITERATURA CITADA

- Aloni, R. 1995. The induction of vascular tissues by auxin and cytokinin. *In*: P. Davies (ed.). Plant Hormones. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. Kluwer Academic Publishers, London. P. G4.
- Aloni, R. 2001. Foliar and axial aspects of vascular differentiation: hypotheses and evidence. *J. Plant Growth Regulation* 20: 22-24.
- Bain, J.M. 1958. Morphology, anatomical and physiological changes in the developing fruit of the Valencia orange, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. *Austral. J. Bot.* 6: 1-28.
- Bangerth, F. 1997. Can regulatory mechanisms in fruit growth and development be elucidated through the study of endogenous hormone concentration? *Acta Horticulturae* 463: 77-87.
- Bustan, A., Y. Erner y E.E. Goldschmidt. 1995. Interactions between developing citrus fruits and their supportive vascular system. *Annals of Botany* 76: 657-666.
- Davies, P. 1995. The plant hormones: their nature, occurrence and functions. *In*: P. Davies (ed.). Plant Hormones. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. Kluwer Academic Publishers, London. p. A1
- Drazeta, L., A. Lang, C. Cappellini, A.J. Hall, R.K. Volz y P.E. Jameson. 2004. Vessel differentiation in the pedicel of apple and the effects of auxin transport inhibition. *Physiol. Plant.* 120: 162-170.
- El-Otmani, M., C. Lovatt, Ch. Coggins y M. Agustí. 1995. Plant Growth Regulators in Citriculture: factors regulating endogenous in *Citrus* tissues. *Critical Reviews in Plant Science* 14(5): 367-412.
- Erner Y. e I. Shomer. 1996. Morphology and anatomy of stems and pedicels of spring flush shoots associated with citrus fruit set. *Annals of Botany* 78: 537-545.
- García-Luis A., M.E.M. Oliveira, Y. Bordón, D.L. Siquiera, S. Tominaga y J.L. Guardiola. 2002. Dry matter accumulation in citrus fruit is not limited by transport capacity of the pedicel. *Annals of Botany* 90(6): 775-764.
- Goldschmidt, E. 1976. Endogenous growth substances of *Citrus* tissues. *HortScience* 11: 95-99.
- Guardiola, J.L. y A. García-Luis. 2000. Increasing fruit size in *Citrus*. Thinning and stimulation of fruit growth. *Plant Growth Regulation* 31: 121-132.

13. Johansen, D. 1940. Plant Microtechnique. McGraw-Hill. London.
14. Kojima, K. 1996. Changes of abscisic acid, indole-3-acetic acid and gibberellin-like substances in the flowers and developing fruitlets of *Citrus* cultivar Hyuganatsu. *Scientia Hort.* 65: 263-272.
15. Laskowski, L. 2006. Características de la abscisión del fruto de naranja *Citrus sinensis* (L.) Osbeck var. Salustiana. *Bioagro* 18(1): 25-30.
16. Laskowski, L., A. García-Luis y J. Torres. 2006. Desarrollo del fruto del *Citrus sinensis* var. Salustiana. *Bioagro* 18(1): 15-23.
17. Mauseth, J. 1986. Botany. An Introduction to Plant Biology. Saunders College Publishing. London.
18. 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 Regulation* 39: 131-135.
19. 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. Biotechnol.* 73(5): 618-621.
20. Sachs, T. 1981. The control of patterned differentiation of vascular tissues. *Adv. Bot. Res.* 9: 151-262.
21. Sachs, T. 2000. Integrating cellular and organismic aspects of vascular differentiation. *Plant Cell Physiol.* 41(6): 649-656.
22. Schneider, H. 1968. The anatomy of *Citrus*. In: W. Reuther, L.D. Batchelor, H.J. Webber (eds.). *The Citrus Industry*. Vol 2. Riverside: University of California. pp. 1-87.
23. Story, R. y M. Treeby. 1999. Short and long-term growth of navel fruit. *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 74(4): 464-471.
24. Uggla, C., E. Magel, T. Moritz y B. Sundberg. 2001. Function and dynamics of auxin and carbohydrates during early/latewood transition in scots pine. *Plant Physiol.* 125: 2029-2039.
25. Uggla, C., E. Mellerowicz y B. Sundberg. 1998. Indole-3-acetic acid controls cambial growth in scots pine by positional signaling. *Plant Physiol.* 117: 113-121.
26. 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.