

Dormición en yemas de *Prosopis chilensis* (Mol.) St. Morfogénesis y niveles de ácido abscísico.

J.A. Argüello; E. Milanesi; A.L. Pascualides

RESUMEN

Los objetivos del presente trabajo fueron el estudio, en el contexto de las modificaciones fenológicas, del comportamiento de las yemas de *Prosopis chilensis* durante la dormición en relación a: a) Las variaciones de la actividad Peroxidasa (Px) y el contenido de ácido ascórbico (AA) como indicadores de la morfogénesis, b) Las variaciones estacionales del ácido abscísico (ABA).

Las bajas temperaturas tanto como el fotoperíodo, fueron determinantes en la dormición de yemas, produciéndose hacia el final del mismo, la caída de las hojas. Los resultados indicaron que el comportamiento de la actividad Px registró un incremento importante a mediados del invierno y que se mantuvo unos 20 días, lo que sugiere que en la etapa de dormición se producirían cambios metabólicos previos, relacionados probablemente con la diferenciación de primordios foliares. Posteriormente se produjo un aumento de ácido ascórbico que coincidió con los cambios en los meristemas de las yemas, de la forma vegetativa a la reproductiva. El ABA, que durante el inicio de la dormición invernal tuvo valores relativamente bajos, hacia el final de dicha etapa, observó un importante incremento, que podría relacionarse con la caída de las hojas. El ABA no jugaría un rol importante en la dormición de yemas de *P. chilensis*, sino que intervendría en la brotación, ya que la precede.

Palabras clave: Dormición, *Prosopis*, ácido ascórbico, fenología, yemas, ácido abscísico, actividad peroxidasa.

J. A. Argüello; E. Milanesi; A.L. Pascualides, 1992. Dormancy in *Prosopis chilensis* (Mol.) St. buds. Morphogenesis and abscisic acid levels. Agriscientia IX N° 2 : 97-102.

ABSTRACT

The aim of the present work was to study within the framework of phenological modifications, the behavior of *Prosopis chilensis* buds during dormancy,

and related to:

a) Peroxidase activity variations and Ascorbic Acid content as morphogenesis indicators; b) Seasonal variations of Abscisic Acid.

Both low temperature and photoperiod were related with dormancy of buds, with leaf fall at the end of this period.

Evidences indicate that peroxidase activity had an important rise during winter and it was maintained about 20 days. This finding suggests that in dormancy, early metabolic changes occur probably related to leaf primordia differentiation. After that, Ascorbic Acid increased as meristem buds changed from vegetative to reproductive form. At the beginning of the winter dormancy, Abscisic Acid had relatively low values, but when this stage was over an important rise was observed that would be related with the fall of leaves. Abscisic Acid would not play, during dormancy of *Prosopis chilensis* buds, an important role, but it might be an outbreak promoter, preceding it.

J.A. Argüello; E. Milanesi; A.L. Pascualides. Laboratorio de Fisiología Vegetal y Botánica Agrícola. Dpto. Biología Aplicada. Fac. Cs Agropecuarias. U. N. C. CC. 509. 5000 - Córdoba. Argentina.

INTRODUCCION

En *Prosopis flexuosa* y *Prosopis caldenia* se han observado yemas en dormición en otoño-invierno, es decir en el período fenológico comprendido entre las fases vegetativa y de senescencia foliar (Distel y Peláez, 1985). Los factores ambientales que modifican dicho comportamiento fenológico son la temperatura y el fotoperíodo, no siendo afectada la dormición por las precipitaciones y la disponibilidad de agua en el suelo (Karlin y Díaz, 1984). Sin embargo no hay información respecto a los mecanismos fisiológicos que rigen la dormición en yemas de *Prosopis* arbórea. En yemas de otras especies, se han observado diferentes modificaciones morfológicas durante la dormición (Argüello, 1987; Luna *et al.*, 1990 a, b; Tizio, 1982). Además se han utilizado, la actividad peroxidasa y el contenido de ácido ascórbico, como patrones predictivos de la morfogénesis. Así en tabaco (Thorpe *et al.*, 1978, Gaspar *et al.*, 1977), en *Arabidopsis* (Negruiti *et al.*, 1979), caña de azúcar (Kevers *et al.*, 1981) y ajo (Argüello, 1987), se ha observado que la actividad Px precede a la morfogénesis. Respecto al ácido ascórbico, también citado como indicador de la morfogénesis en maíz, en el ápice caulinar se lo encontró asociado con una activa división celular, organogénesis y diferenciación de tejidos (Chinoy *et al.*, 1973). Inclusive se lo ha relacionado con cambios en los meristemas de las yemas de la forma vegetativa a la reproductiva (Chinoy, 1962). En base a lo anterior se

plantea la hipótesis que durante la dormición en yemas de *Prosopis chilensis*, se producen cambios morfogénicos que son precedidos por un aumento de la actividad Px debiendo además existir correlación entre el contenido de ácido ascórbico y dicha dormición.

Con relación a la regulación hormonal, Walton (1980) y Wright (1975) sugieren que el ABA está involucrado en la inducción, mantenimiento y ruptura de la dormición en yemas en respuesta al estímulo ambiental, mientras que Ross *et al.*, (1983) y Webber *et al.*, (1978) sostienen que el ABA no es la principal sustancia inductora de la dormición en yemas, sino que actuaría como controlador de la misma, Dörffling (1976) y Dumbroff *et al.*, (1979) señalan que en *Acer saccharum* se produce un aumento de ABA previo a la caída de hojas y posteriormente un descenso alcanzando sus valores más bajos inmediatamente antes de la brotación. En base a esto, se plantea la hipótesis que el ABA en las yemas de *Prosopis chilensis* no es un factor determinante de la dormición.

El objetivo de este trabajo fue estudiar en yemas de *Prosopis chilensis* las variaciones de actividad Px, contenido de ácido ascórbico y concentración de ABA durante la dormición, en relación a sus variaciones morfológicas y fenológicas, tomando en consideración algunos datos climáticos.

MATERIAL Y METODO

Material Biológico

Se recolectaron diez ramas de ejemplares de *Prosopis chilensis*, cada quince días en el periodo comprendido de mayo a setiembre, de las cuales se extrajeron los braqui blastos. Las yemas se extrajeron con bisturí y posteriormente se congelaron con aire líquido y se mantuvieron a -20° C hasta las evaluaciones bioquímicas.

Evaluación de la actividad Peroxidasa

Cien miligramos de las yemas provenientes de cada muestreo se homogeneizaron en 10 ml de buffer fosfato 0,05 M, pH 6,5, frío, al que se le agregó 1% de polivinilpirrolidona. Posteriormente se filtró y dicho filtrado se centrifugó dos veces durante 30 minutos a 5000 rpm a 2-4°C. El sobrenadante fue empleado para evaluar la actividad peroxidasa. La misma se midió por triplicado para cada muestra usando bencidina como sustrato (Gregori, 1966). La actividad se expresó como mg de ácido ascórbico oxidado por gr de PF por min.

Contenido de ácido ascórbico

Ciento cincuenta mg de yemas se extrajeron con una solución de ácido oxálico y se cuantificó por el método colorimétrico del indofenol (Ruch, 1969). La unidad de medida fue mg de Acido Ascórbico por gr de PF.

Determinación de ABA

Quinientos mg de yema se molieron en un mortero con aire líquido y se extrajeron con metanol acuoso al 80%. Después de evaporar el metanol acuoso al vacío y a 35°C, se acidificó el agua remanente a pH 3 con ácido clorhídrico 1 N y se particionó por cuatro veces con acetato de etilo, saturado con agua. Las fracciones de la fase ácida acetato de etilo se mezclaron y el agua se congeló y eliminó mediante filtración, evaporándose el acetato de etilo. El residuo seco se retomó con acetato de etilo y se corrió en placa de 20 x 20 para Cromatografía Líquida en Capa Delgada de 0,5 mm de espesor con sílica gel G (Sigma Chemical Co) desarrollada 15 cm con una mezcla de isopropanol, amoníaco y agua (100:14:6) V/V. La zona que Co-cromatografió con ABA puro (Sigma Chemical Co) se raspó y eluyó con metanol y se filtró con filtro de poro 0,45 µ para ser sometida a análisis por HPLC. Se utilizó un equipo Varian 5000 con un inyector "Reodhyne" y una columna de C₁₈ de 3,9 x 300 mm Bondapack en fase rever-

sa. La elución se hizo con metanol al 30% en ácido acético al 1% con un flujo de 2 ml/min. Se acopló a una columna un detector de UV variable Varian 2550, ajustado a 269 nm. El área del pico fue monitoreada con un integrador Varian 300.

Estudios morfológicos

Los braquiblastos extraídos en cada muestreo se conservaron en FAA. Posteriormente se proce-

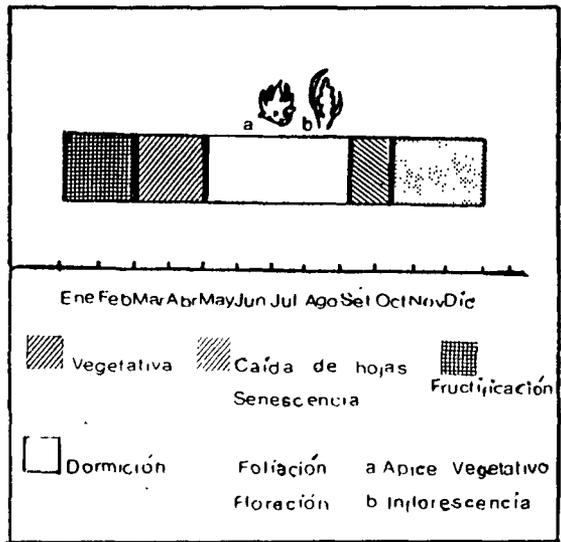
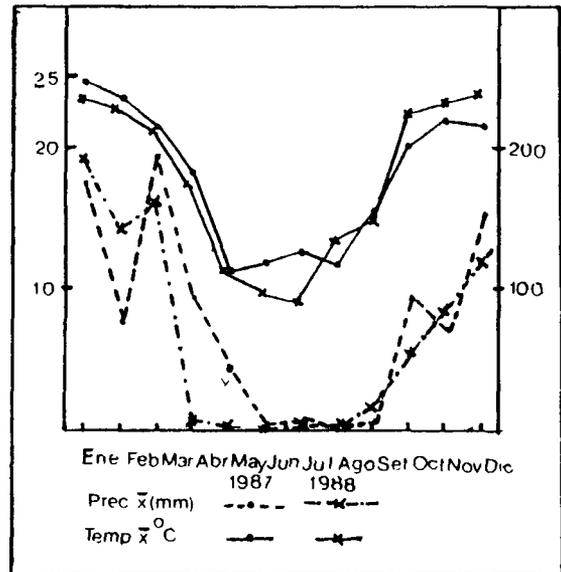


Figura 1A. Variaciones medias mensuales de Temperatura y Precipitación. Lat. 31° 18' S, Long. 64° 13' W.G.
Figura 1B. Sucesión de estadios fenológicos de *P. chilensis*.

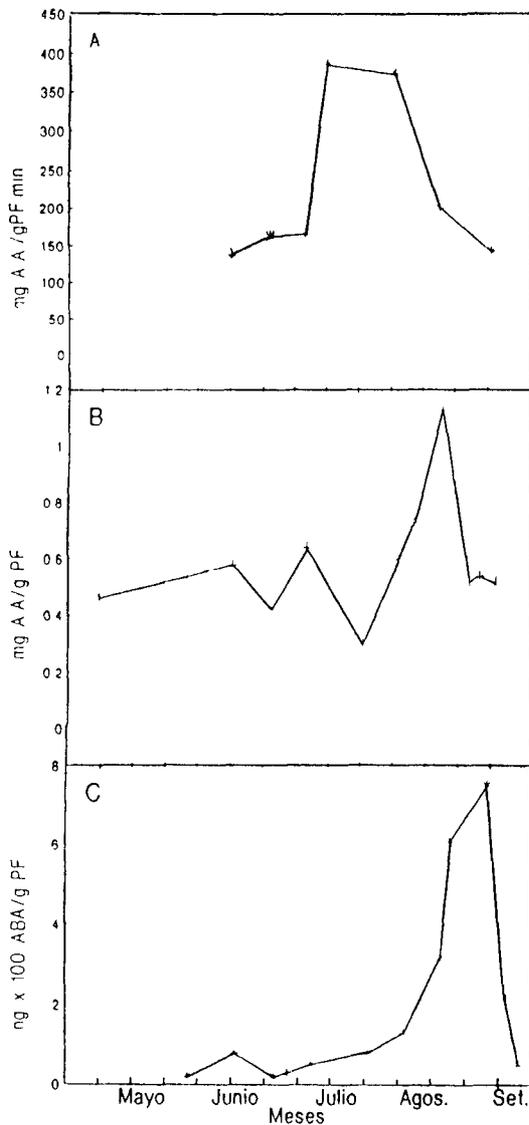


Figura 2. Variaciones estacionales durante la dormición de (A) Actividad Peroxidasa, (B) Contenido de Ácido Ascórbico, y (C) Contenido de ABA

dió a la deshidratación en series de alcohol etílico y terbutanol. Las yemas así deshidratadas fueron incluidas en "Paramat" realizándose secciones microtómicas seriadas transversales de 10 a 15 micrones, realizándose preparados permanentes utilizando la técnica descrita por Johansen (1940). La tinción se realizó con safranina y verde rápido (Gurr, 1965; Tolbert, 1962). Las fotomicrografías se tomaron con un microscopio óptico Zeiss, con cámara fotográfica incorporada.

Observaciones fenológicas

Se realizaron sobre ejemplares adultos de la especie y se tuvo en cuenta la clave fenológica propuesta por Everett *et al*, 1980. Se relacionaron estas fases fenológicas con las precipitaciones y temperaturas medias mensuales, datos aportados por la Estación Meteorológica del Aeropuerto Internacional Córdoba, Fuerza Aérea Argentina.

RESULTADOS Y DISCUSION

El comportamiento fenológico de *P. chilensis* demostró que las yemas se encuentran en reposo desde mayo a setiembre (Fig. 1 B) entre la fase vegetativa y de senescencia foliar, lo que es coincidente con los resultados de Distel y Peláez (1985). Se encontró una correlación positiva en-

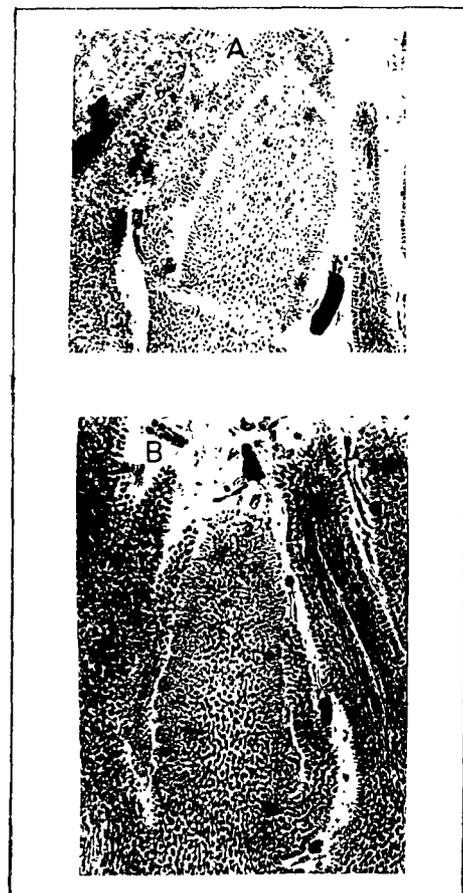


Figura 3. Fotomicrografía de cortes longitudinales de braquistos de *Prosopis chilensis*. A. Apice vegetativo (fines de julio) y B. Apice reproductivo (fines de agosto).

tre temperatura y comportamiento fenológico (Fig. 1A y 1B) Esto no fue afectado por las precipitaciones o disponibilidad de agua en el suelo (Distel y Peláez, 1985). Las bajas temperaturas (Fig. 1A) fueron determinantes en la dormición de yemas tanto como el fotoperíodo (Karlin y Díaz, 1984), produciéndose concomitantemente, la caída de las hojas (Fig. 1B). Para corroborar la hipótesis que durante el período de dormición de yemas de *P. chilensis* se producen profundos cambios morfogénicos, se propusieron la actividad Px (Thorpe *et al.*, 1978, Gaspar, 1977, Kevers *et al.*, 1981, Argüello, 1987) y el contenido de AA (Chinoy *et al.*, 1973) como indicadores bioquímicos de la morfogénesis. Las evidencias indican que el comportamiento de la actividad peroxidasa (Fig. 2A) registra un incremento importante a mediados del período invernal el que se mantiene durante 20 días. Tal hallazgo también se observó durante la diferenciación de yemas en otros materiales como tabaco (Gaspar *et al.*, 1977, Thorpe *et al.*, 1978, Thorpe y Gaspar, 1979), caña de azúcar (Kevers *et al.* 1981) y ajo (Argüello 1987). El aumento de actividad peroxidasa en yemas de *P. chilensis* (Fig. 2A), sugeriría que en la etapa de dormición, se producen cambios metabólicos previos relacionados probablemente con la diferenciación de primordios foliares. A medida que disminuye esta actividad peroxidasa, se observa un aumento en el contenido de ácido ascórbico (Fig. 2B) llegando éste a valores máximos (agosto) hacia el final del período de dormición.

Respecto al aumento del ácido ascórbico en yemas de maíz se sugirió que estuvo asociado con una activa división celular (Chinoy *et al.*, 1979). La alta concentración de ácido ascórbico también se ha correlacionado con los cambios de las yemas de formas vegetativas a reproductivas (Chinoy, 1962). En base a ello, los resultados obtenidos en *P. chilensis* registran también un aumento antes de la brotación, lo cual sugiere una importante actividad morfogénica. En tal sentido las evidencias experimentales aquí presentadas (Fig. 3) sugieren que la diferenciación de yemas vegetativas a reproductivas se produciría hacia el final de la dormición previo a la brotación (Fig. 1B).

Respecto al ABA libre en yemas, durante la dormición de *P. chilensis* se observa que hasta mediados de invierno, los valores son relativamente bajos (Fig. 2C). Hacia el final de la dormición se observa un aumento de la concentración de ABA, llegando a un máximo, seguido de caída de hojas, luego cae abruptamente llegando a sus valores más bajos inmediatamente antes de la brotación. Estas evidencias avalan parcialmente la

hipótesis planteada, ya que el ABA se correlaciona con las últimas fases de la dormición invernal, no así en las primeras fases. Resultados semejantes fueron encontrados por Dumbroff *et al.*, 1979 en *Acer saccharum* y por Dörfling, 1976 en *Acer pseudoplatanus* y *Syringa vulgaris*. El ABA no juega un rol importante en la dormición de yemas de *P. chilensis* y el mismo no sería como inhibidor, sino más bien que intervendría en la brotación, ya que la precede.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Dr. Roberto Gil de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba y a la Ing. Agr. Selva Beatriz Núñez de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, por la valiosa colaboración prestada en diferentes etapas del desarrollo de este trabajo.

BIBLIOGRAFIA

- Argüello, J. A. 1987. Fisiología de Post Cosecha en ajo (*Allium sativum* L.). Contribución al mecanismo de dormición y brotación. Tesis Doctoral. Universidad Nacional del Sur. Bahía Blanca. Rep. Argentina.
- Chinoy, J. J. 1962. Formation and utilization of ascorbic acid in the shoot apex of wheat as factors of growth and development. *Indian J. Plant Physiol.* 5: 172-201
- Chinoy, J. J.; C. K. Shah; H. J. Suthar. 1973. Changes in ascorbic acid content of the shoot apex during reproductive differentiation in maize. *Indian J. Plant Physiol.* 7: 7-15.
- Distel, R. A.; D. U. Peláez. 1985. Fenología de algunas especies del distrito del Caldén (*Prosopis caldenia* Burk). IDIA. 441-444 : 35-40.
- Dörfling, K. 1976. Correlative bud inhibition and Abscisic Acid in *Acer pseudoplatanus* and *Syringa vulgaris*. *Physiol. Plant.* 38: 319-322.
- Dumbroff, E. B.; D. B. Cohen; D. P. Webb. 1979. Seasonal levels of Abscisic Acid in buds and stems of *Acer saccharum*. *Physiol. Plant.* 45: 211-214.
- Everett, R. L.; O. T. Tueller; J. B. Davis and A. D. Brunner. 1980. Plant Phenology in Galleta - Shadscale and Galleta - Sagebrush Associations. *Journal of Range Management.* 33 (6): 446-450.
- Gaspar, T.; T. A. Thorpe; M. Tran Thanh Van. 1977. Changes in isoperoxidases during differentiation of cultured epidermal layers. *Acta Hort.* 87: 61-73.
- Gregory, R. P. F. 1966. A rapid assay for peroxidase activity. *Bioch. J.* 101: 582.
- Johansen, D. A. 1940. *Plant Microtechnique*. New York and London Mc. Graw - Hill Book Company. 126-154.

- Karlin, U., R. Díaz 1984. Potencialidad y manejo de algarrobos en el árido subtropical argentino. SECYT 59 pp.
- Kevers, C.; M. Coumans; W. De Greef, M. Jacobs; Th. Gaspar. 1981. Organogenesis in habituated sugarbeet callus. auxins contents and protectors, peroxidase pattern and inhibitors. *Z. Pflanzen Physiol* 101: 79-87
- Luna, V., E. Lorenzo; H. Reinoso; M. C. Tordable; G. Abdala; R. P. Pharis, R. Bottini. 1990. Dormancy in peach (*Prunus persica* L.) flower buds, *Plant Physiology* 93: 20-25
- Luna, V.; H. Reinoso; E. Lorenzo, R. Bottini, G. Abdala. 1990. Dormancy in peach (*Prunus persica* L.) flower buds. II Comparative morphology and phenology in floral and vegetative buds, and the effect of chilling and gibberellin A₃. *Trees*, 5: 244-246.
- Negrutiu, I.; M. Jacobs, T. Gaspar 1979. Leaf formation and peroxidase from *Arabidopsis* callus. *Z. Pflanzen Physiol*. 91: 119-126.
- Ross, S. D., R. P. Pharis; W. D. Binder. 1983. Growth regulators and conifers. Their physiology and potential uses in forestry. *Plant growth regulating chemicals*. II: 35-78.
- Ruck, J. A. 1969. Chemical methods for analysis of fruit and vegetable products. Research Station Summerland B. C. Research Branch. Canadá, Department of Agriculture 25-29.
- Thorpe, T. A.; T. Gaspar. 1978. Changes in isoperoxidases during shoot formation in tobacco callus. *In Vitro*. 14: 522-526.
- Thorpe, T. A., M. Tran Thanh Van; T. Gaspar 1978. Isoperoxidases in epidermal layers of tobacco and changes during organ formation in vitro. *Physiol. Plant* 44: 388-394
- Tizio, R. 1982. Fisiología de la dormición en tubérculos de papa y sus relaciones con el mecanismo de la tuberización. *Revista de Ciencias Agropecuarias* Vol III: 91-105.
- Tolbert, R. J. 1962. Block staining of botanical materials. *Stain Technol.* 37: 165
- Walton, D. C. 1980. Biochemistry and physiology of abscisic acid. *Ann Rev Plant Physiol* 31: 453-489
- Webber, J. E., M. L. Laver; J. B. Zaer, D. P. Lavender 1979. Seasonal variation of abscisic acid in the dormant shoot of *Douglas fir*. *Can. J. Bot.* 57: 534-538.
- Wright, S. T. C. 1975. Seasonal Changes in the levels of free and bound abscisic acid in Black currant (*Ribes nigrum*) buds and Beech (*Fagus sylvatica*) buds. *Journal of Experimental Botany*. Vol. 26 (91) : 161-174.