

**PROHEXADIONA DE CALCIO MODIFICA EL CONTENIDO DE
GIBERELINAS, VITAMINA C, CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y
ACTIVIDAD ENZIMATICA EN MANZANO**

PAOLA CECILIA LEZA HERNANDEZ

T E S I S

Presentada como Requisito Parcial para
Obtener el Grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

INGENIERIA DE SISTEMAS DE PRODUCCION



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"**

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.
Junio, 2011

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO

SUBDIRECCION DE POSGRADO

**PROHEXADIONA DE CALCIO MODIFICA EL CONTENIDO DE
GIBERELINAS, VITAMINA C, CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y
ACTIVIDAD ENZIMATICA EN MANZANO**

TESIS POR

PAOLA CECILIA LEZA HERNANDEZ

Elaborada bajo la supervisión del comité particular de asesoría y aprobada como
requisito parcial, para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS
INGENIERIA DE SISTEMAS DE PRODUCCION**

COMITÉ PARTICULAR

ASESOR PRINCIPAL: 
Dr. Homero Ramírez Rodríguez

ASESOR: 
Dr. Adalberto Benavides Mendoza

ASESOR: 
Dr. Martín Cadena Zapata


Dr. Fernando Ruiz Zarate
Subdirector de Postgrado

Buenavista, Saltillo, Coahuila, Junio de 2011

INDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	i
DEDICATORIAS.....	iii
COMPENDIO.....	iv
ABSTRACT.....	vi
INTRODUCCIÓN.....	1
Objetivo.....	4
Hipótesis.....	4
REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
Generalidades del manzano.....	5
Fenología.....	6
Fase vegetativa.....	7
Inducción floral.....	7

Iniciación floral.....	8
Diferenciación floral.....	9
Biorreguladores de crecimiento.....	13
Giberelinas.....	14
Retardantes de crecimiento.....	15
Prohexadiona de calcio.....	16
Antioxidantes.....	19
Vitamina C.....	20
Actividad enzimática.....	21
Peroxidasa.....	22
Catalasa.....	24
ARTICULO “Prohexadione-Ca Modifies Content Of Gibberellins, Vitamin C, Antioxidant Capacity And Enzymatic Activity In Apple”.....	25
CONCLUSIONES.....	36
LITERATURA CITADA.....	37

AGRADECIMIENTOS

Primeramente a *Dios* por darme la gracia de vivir y por todas las bendiciones que día a día puso en mi camino.

A mi *Alma Mater* por brindarme una vez más la oportunidad de superarme y por todas las facilidades para mi desarrollo académico.

Con todo respeto al *Dr. Alejandro Zermeño González* por la oportunidad de ingresar al programa ISP y por la amistad y apoyo que me ofreció.

Al *Dr. Homero Ramírez Rodríguez*, por la oportunidad y todo el valioso tiempo y apoyo que me brindo tanto para el desarrollo de este trabajo, como para mi formación académica, humana y profesional; de todo corazón y con todo mi respeto muchas gracias.

Al *Dr. Adalberto Benavides Mendoza* por la oportunidad y apoyo dado durante mi proceso académico, pero sobre todo por compartir sus conocimientos. Gracias.

A todo el *Núcleo Académico* de ISP, que apporto de gran manera en mi formación académica y profesional, por compartir sus experiencias y conocimientos, Gracias.

Al *Cuerpo Administrativo* que me brindo su apoyo, confianza y amistad durante mi estancia en la institución.

Sin olvidar a mis compañeros y amigos *Claudia, Javier, Sandino, Arturo, Sasirot, Beto, Benito, Martel, Fernando, Omar, Luis, Froy, Rebeca, Juan Manuel, Obet y Toño* por su amistad, compañerismo y apoyo durante este tiempo. Pero sobre todo a mis amigas *Candy, Nelly y Karys* por la hermandad que creamos durante este todo este tiempo. Mil gracias por estar ahí.

Pero principalmente le agradezco a mi *Familia*, por estar siempre a mi lado en las buenas y en las malas, por darme su amor, confianza y apoyo en todo momento, por ser parte de mi vida, pero sobre todo por hacerme parte de la suya, *Los Amo.*

DEDICATORIAS

A mi *Hijo Nathán*, por ser el motor de mi vida, el motivo por el cual soy y estoy. Gracias Peque por ser la luz que ilumina mi camino.

A mis padres *Jesús María y Norma Leticia* por darme la oportunidad y el apoyo de seguir superándome, por su amor, comprensión y confianza.

A mis hermanos *Anayantzin, Jesús y Bernardo* por su amor y apoyo en todo momento, gracias por ser parte de mi vida.

Pero principalmente se la dedico al *Señor* por haberme dado vida, salud y la oportunidad de concluir una meta más en mi vida y seguir superándome no solo como profesional si no como persona.

COMPENDIO

**PROHEXADIONA DE CALCIO MODIFICA EL CONTENIDO DE GIBERELINAS,
VITAMINA C, CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y ACTIVIDAD ENZIMATICA EN
MANZANO**

POR

PAOLA CECILIA LEZA HERNANDEZ

MAESTRIA EN CIENCIAS

INGENIERIA DE SISTEMAS DE PRODUCCION

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA

ANTONIO NARRO

Buenavista, Saltillo, Coahuila. Junio de 2011

Dr. Homero Ramírez Rodríguez. – Asesor –

Palabras claves: Manzano, P-Ca, antioxidantes, vitamina C

La presente investigación se realizó con el objetivo de ampliar el conocimiento de prohexadiona de calcio (P-Ca) sobre los cambios de giberelinas en el ápice; y en el comportamiento de los antioxidantes y enzimas en frutas maduras de manzano.

P-Ca fue asperjado en dos ocasiones durante la primavera de 2009, a árboles de manzano cv. Red Delicious/MM106 de dieciséis años de edad cuando el crecimiento apical alcanzó 5 cm. Las dosis del retardante de crecimiento fueron 0 (testigo), 125, 175 y 200 mg·L⁻¹.

El análisis de cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS) de las muestras experimentales mostraron la presencia de giberelinas A₉ y A₂₀ en ápices tratados con P-Ca, mientras que las giberelinas A₁, A₄ y A₇ se identificaron en las muestras del testigo.

La capacidad antioxidante total durante la maduración de frutos fue alta en cualquier concentración de P-Ca. También se observó el mismo patrón cuando se midieron los contenidos de vitamina C y de las enzimas catalasa y peroxidasa.

ABSTRACT

**PROHEXADIONE-CA MODIFIES CONTENT OF GIBBERELLINS, VITAMIN C,
ANTIOXIDANT CAPACITY AND ENZYMATIC ACTIVITY IN APPLE**

BY

PAOLA CECILIA LEZA HERNANDEZ

MASTER OF SCIENCE

PRODUCTION SYSTEMS ENGINEERING

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA

ANTONIO NARRO

Buenavista, Saltillo, Coahuila. June 2011

Dr. Homero Ramírez Rodríguez. – Adviser –

Key words: Apple, P-Ca, antioxidant, vitamin C

The present research was conducted with the purpose to extend the learning on the effects of prohexadione-ca (P-Ca) on the gibberellin changes at the apex and on the antioxidants and enzyme behaviour on ripening fruits of apple.

P-Ca was sprayed twice in the spring of 2009 on sixteen years old 'Red Delicious'/ MM106 apple trees when shoot growth reached 5 cm in length. The concentration dosages of the growth retardant were 0 (control), 125, 175 and 200 mg·L⁻¹.

The GC-MS analysis of experimental samples showed the presence of gibberellins A₉ and A₂₀ in P-Ca treated shoot tips; whereas gibberellins A₁, A₄, and A₇ were identified in control samples.

The total antioxidant capacity in ripening fruits was increased with any concentration of P-Ca. The same increment pattern was also observed in these fruits when vitamin C, catalase and peroxidase enzymes content were measured.

INTRODUCCION

A nivel mundial una de las especies más cultivadas dentro de los frutales caducifolios es el manzano. En México, este frutal fue introducido en la época de la colonización y por los años '40 se establecieron los cultivares Red Delicious y Golden Delicious, los cuales tomaron gran importancia. Durante los años '80 el número de huertos establecidos ocupaban una superficie total de 10,450 hectáreas con una producción de 16,712 toneladas (Ramírez y Benavides, 2003).

En el año 2001 México se encontraba en el 22º lugar de producción a nivel mundial con 457,889 toneladas anuales (F.A.O., 2001). En la actualidad existe una superficie total de 7,308 hectáreas, con una producción de 57,694.50 toneladas; lo que equivale a un rendimiento de 7.9 toneladas por hectárea (Oeidruss Coahuila, 2006).

El cultivo del manzano en Coahuila se ha visto afectado en su producción y calidad de fruto, debido a las condiciones climatológicas que se han presentado en los últimos años en la región manzanera.

En Coahuila, el cultivo del manzano representa una actividad de gran importancia frutícola. Una cosecha competitiva en el mercado de plantaciones jóvenes depende entre otros factores, del manejo en el equilibrio vegetativo y reproductivo. Lo ideal en una huerta joven es que esta, pase rápidamente al estado productivo (Ramírez, 2000).

Un buen control vegetativo permite mantener una producción competitiva con buena calidad de frutos cosechados y vida productiva de la planta (Owens, 1999). Para controlar la altura en los árboles, debe existir un balance entre el crecimiento vegetativo y reproductivo. Este fenotipo se logra con la utilización de portainjertos enanizantes, sin embargo, el cambio climático ha impactado este comportamiento. Lo anterior se refleja en crecimientos muy vegetativos, situación que ocasiona menos producción y calidad de frutos. Una alternativa de solución a esta adversidad es el uso de retardantes del crecimiento (Greene, 1991; Evans *et al.*, 1997, 1999).

Se han utilizado productos inhibidores de la biosíntesis de giberelinas (Rademacher *et al.*, 1998) mostrando una buena acción en la elongación del tallo (Edgerton, 1986), pero con la gran desventaja de permanecer en la parte comestible por periodos prolongados y por lo tanto ser un riesgo para la salud humana (Owens y Stover, 1999). Esta situación prohíbe el uso de biorreguladores como alar y paclobutrazol.

Prohexadiona de calcio (P-Ca), es un retardante de crecimiento que ha sido reportado como una alternativa para el control del crecimiento vegetativo en manzano (Unrath, 1999). Este retardante se caracteriza por bloquear la biosíntesis de giberelinas en el meristemo apical con nula toxicidad y permanencia limitada en tejidos vegetales (Rademacher *et al.*, 1998).

OBJETIVO

Evaluar el efecto de prohexadiona de calcio sobre el contenido de giberelinas, vitamina C; la capacidad antioxidante y la actividad enzimática en manzano.

HIPOTESIS

Prohexadiona de calcio modifica el contenido de giberelinas y vitamina C; la capacidad antioxidante y la actividad enzimática.

REVISION DE LITERATURA

Generalidades del manzano

El manzano pertenece al género *Malus*, de la familia *Rosaceae*. Es un árbol caducifolio distribuido principalmente en las zonas templadas en latitudes de 35 a 55°, en donde se tiene suficiente frío en invierno. Investigaciones recientes han permitido extender el cultivo a regiones con condiciones menos propicias de explotación, gracias a la utilización de cultivares con bajas necesidades de frío y a sustancias hormonales en armonía con la naturaleza como los biorreguladores.

El manzano presenta flores grandes, sésiles con pedúnculos cortos; las cuáles son hermafroditas y de un color rosa pálido o blanco, se agrupan de 3 a 8 flores para formar un corimbo. Las flores son de tipo pentámero con estambres insertados en la parte alta del pistilo, ovario con 5 alvéolos con 2 óvulos en cada uno de ellos. Cada botón floral tiene en su base 2 yemas de madera, pudiendo ocupar una posición terminal en la ramilla o una posición lateral sobre la madera del año.

Fenología

Calvo (1996), describió la fenología como el estudio de las relaciones entre el clima y los estudios de la vida animal y vegetal. Además, hace una descripción del fenotipo como el resultado de la interacción entre el genotipo de un individuo y el medio ambiente; equivalente al conjunto de caracteres en él.

Villalpando (1982), menciona que para llevar a cabo el registro de la fenología de un árbol, es necesario distinguir las fases por las que atraviesa.

Ramírez y Cepeda (1993), citan que el ciclo del manzano inicia con la caída de las hojas a mediados del mes de octubre hasta mediados del mes de noviembre; posteriormente comienza el reposo individual del árbol, prolongándose hasta el mes de febrero; seguido por el desborre en el mes de marzo, cuando se renueva la actividad vegetativa; presentándose a inicios de abril, la floración, la aparición de las primeras hojas y amarre del fruto a finales del mismo mes. Posteriormente, de mayo a septiembre, inicia el periodo de máxima vegetación en el cual se da lugar al desarrollo de las hojas o frutos, así como la reserva nutritiva para el próximo ciclo. La cosecha comienza a finales de agosto y se prolonga hasta finales de septiembre, en algunas regiones, para que posteriormente el árbol se prepare para la senescencia y eventualmente entre en su periodo de reposo invernal.

Fase vegetativa

La fase vegetativa, es la etapa juvenil comprendida desde la emergencia de la planta en la que no puede producir flores por ningún método conocido (Zammerman, 1973). La planta debe pasar por una etapa de transición previa a la formación de yemas florales en condiciones naturales y durante esta etapa los nutrientes son utilizados por la planta para el crecimiento y desarrollo vegetativo (Grenne, 1981).

Ryugo (1993), describe la floración como una manifestación de la característica que difiere entre una planta madura de una planta joven. Mientras que Kramer *et al.* (1983), mencionan que la floración es el instante o el estado de desarrollo en que el árbol puede dar por primera vez flores y caracteriza el paso del periodo juvenil al adulto en una planta obtenida por semilla.

Inducción floral

Luckwill (1970), estableció que la inducción floral en brotes del manzano está regulada por un balance entre giberelinas sintetizadas en la región apical de los brotes y las citocininas presentes en el flujo del xilema. Para que la inducción floral ocurra se requiere que desaparezca el efecto inhibitorio de las giberelinas y, al mismo tiempo que las citocininas continúen presentes.

Welsilov *et al.* (1978), reportaron que el contenido de ácido indolacético (AIA) en yemas donde se han diferenciado primordios florales fue mucho más bajo que en aquellos que permanecieron vegetativos, sugiriendo que esta reducción favorece la transformación de yemas vegetativas en florales.

La inducción floral consta de dos fases fundamentales: una reversible, durante la cual la interrupción de los factores inductores anula la programación reproductiva de las yemas, y otra irreversible, en la cual la evolución endógena no podría ser alterada, aunque, eventualmente, sucesivos cambios de los mecanismos fisiológicos que controlan el proceso podrían modificarla, sobre todo en lo referido a la expresión de la sexualidad. La inducción se hace irreversible unas cuatro a cinco semanas antes de iniciarse el cambio morfológico o diferenciación floral. El primer signo corresponde a un aplanamiento del ápice meristemático, al cual le sigue una fase caracterizada por la aparición de los primordios de sépalo, período en el cual el ápice adquiere una característica cóncava. Las etapas posteriores del proceso morfogenético consisten en la diferenciación de los últimos primordios de pétalo, estambre y, por último, del carpelo.

Iniciación floral

Cambios que ocurren en el meristemo que esté receptivo al estímulo floral, y que permiten determinar que ese meristemo vegetativo se ha transformado ya a

reproductivo. Los requerimientos para la iniciación floral parecen ser factores internos y externos y varían entre especies (Westwood, 1978). Esta puede ser afectada por factores ambientales. En los frutales caducifolios es ampliamente aceptado que el factor dominante es de origen interno (Hillman, 1963; Luckwill, 1970; Wareing y Philips, 1978; y Westwood, 1978).

En el proceso de iniciación floral, el meristemo apical pasa de una fase de desarrollo determinado, debido a la formación de la flor (Esau, 1977). En esta etapa, el ápice vegetativo pierde su función plastocrómica y experimenta una transformación hacia una estructura potencial reproductiva (Luis, 1982).

Diferenciación floral

El comienzo del proceso de formación floral es siempre referido a la inducción, la cual es un cambio cualitativo, que de acuerdo con algunos, tiene lugar a través de un cambio de balance hormonal (Luckwill, 1974) y de acuerdo con varios autores, es llevado a cabo por medio de un cambio en la distribución de nutrientes dentro del meristemo apical (Sachs, 1977; y Williams, 1981). También se considera como un periodo en que se genera los procesos fisiológicos que estimulan la iniciación de la fase reproductiva lo cual provoca una modificación en el desarrollo de las células, con el fin de iniciar la formación de primordios florales.

La diferenciación es el proceso que ocurre desde la iniciación hasta la antesis (Durner y Barlay, 1985). Este proceso considera los cambios histológicos y morfológicos en el ápice, que resulta en el desarrollo de los primordios florales y más tarde, las partes distinguibles de la flor completa (Buban y Faust, 1981). También se considera como el cambio de la planta hacia la formación exclusiva o permanentemente de yemas florales, de flores y de frutos (Calderon, 1983).

La diferenciación floral ocurre usualmente en brotes cortos denominados dardos, de una longitud de 5 cm aproximadamente, originando una inflorescencia que puede tener de 5 a 6 flores (Westwood, 1978); aunque, un dardo de mayor vigor puede producir un corimbo con 6 o 7 flores bien desarrolladas (Ferre, 1981).

La organogénesis floral inicia en verano y continúa durante el otoño e invierno (Childers, 1978), evitando de esta manera la coincidencia entre el crecimiento vegetativo y el reproductivo, reduciéndose la competencia por nutrientes entre ambos tipos de crecimiento (Garza, 1982). Los cambios histológicos que llevan a la formación del meristemo floral, se presentan 3 a 6 semanas después de floración.

Se ha encontrado variación en el tiempo de diferenciación para diferentes localidades geográficas y entre cultivares (Luis, 1982; y Bradford, 1919). Por otro lado se ha observado que el inicio de la yema floral no tiene relación directa con el portainjerto en el que está injertado el cultivar correspondiente (Buban y Faust, 1981).

Abbott (1976), argumentó que cuando la inducción ocurre relativamente tarde en la estación, las yemas frutales son fisiológicamente “jóvenes” y abren como un grupo reducido de flores con pedúnculos alargados, mostrando un pobre amarre de fruto. Por el contrario, cuando la iniciación de flor es temprana, origina flores fisiológicamente “viejas” produciendo grupos de flores compactas con hojas primarias pequeñas y flores casi sésiles, las cuales en contraste amarran bien.

El tiempo entre el comienzo de diferenciación de yema y floración, puede ocurrir 8 a 10 semanas bajo situaciones geográficas especiales (Zeller, 1973). En frutales caducifolios, el periodo de tiempo entre iniciación floral y antesis es de aproximadamente 7 a 8 meses (Garza, 1982). No todas las yemas florales son diferenciadas simultáneamente, aun en el mismo árbol (Goff, 1899).

El desarrollo de la yema ocurre en brotes cortos y en yemas de brotes largos. La formación de yemas en brotes largos tiene importancia solo en árboles jóvenes (Zeller, 1961). El vigor del brote es expresado en longitud (Feucht, 1961) y la posición de la yema en el brote son factores importantes en la diferenciación floral. La iniciación ocurre en ocasiones en la parte media del brote. Yemas desarrolladas en entrenudos largos, son menos probables de diferenciar flores que las desarrolladas en entrenudos más cortos (Jackson y Sweet, 1972).

Se ha observado que aunque unas yemas diferencian más temprano, las tardías desarrollan comparativamente más rápido, por ello no existe mucha diferencia a un determinado tiempo en el desarrollo de ambos (Eliseeva, 1970).

También se han encontrado diferencias entre espolones viejos y espolones jóvenes. En climas fríos donde la iniciación es en junio en espolones terminales y más tarde en laterales, las yemas laterales nunca terminan su desarrollo. En contraste en climas más moderados, hay tiempo para el desarrollo de yemas laterales por que la estación de crecimiento es más larga (Buban y Fasut, 1981).

Algunos investigadores mencionan que la acumulación de carbohidratos en yemas foliares, es un factor que suprime ciertos compuestos fotosintéticos, lo cual favorece la formación de partes florales. También se conoce que la posible función de los carbohidratos en la iniciación floral esta dado por una particular situación bioquímica, la cual es frecuentemente asociada con altos niveles de estas substancias.

Biorreguladores de crecimiento

Los biorreguladores en general actúan modificando el crecimiento y desarrollo de las plantas a través de su acción sobre vías y procesos fisiológicos y bioquímicos específicos (Jankiewicz, 2003).

En la actualidad, las hormonas vegetales o biorreguladores ofrecen una magnífica oportunidad para manejar los sistemas de producción hortícola. Estas sustancias tienen la característica de ser absorbidas por el tejido vegetal y transportadas a un sitio de reacción antes de inducir un efecto deseado (Ramírez, 2003).

El medio ambiente juega también un papel muy importante ya que puede modificar la acción de las mismas. Normalmente sus efectos están regulados por los mecanismos internos que tienen las plantas. Estas hormonas son sintetizadas en muy bajas concentraciones en los cloroplastos y se trasladan a otras regiones de la planta en donde influyen en su crecimiento y desarrollo (Yañez, 2002).

Giberelinas

Las giberelinas (GAs) son hormonas naturales que regulan el crecimiento y la floración de las plantas entre otras actividades fisiológicas. Estas sustancias se encuentran a nivel de trazas en las plantas pero su aplicación exógena produce resultados espectaculares por lo que tienen un gran interés en la agricultura intensiva y la industria de la cerveza.

Se han caracterizado más de 130 giberelinas entre las cuales la GA3, también conocida como ácido giberélico, se ha considerado tradicionalmente la más utilizada en plantas. Estudios recientes han mostrado que la GA1 tiene una importante actividad biológica, incluso superior a GA3 en plantas como el arroz, el tomate, el cerezo o el guisante (Roemmelt, *et. al.*, 1999).

Las giberelinas, bajo condiciones de baja y alta temperatura incrementan la síntesis de enzimas de hidrólisis (beta y alfa amilasa, proteasas, lipasas entre otros), las cuales a su vez inducen la conversión de las reservas energéticas en reservas metabólicas para producir mayor energía en corto tiempo lo que se traduce en una rápida brotación, floración, crecimiento y desarrollo de la planta (Kamara, 2001).

Retardantes de crecimiento

Los retardantes de crecimiento actúan inhibiendo o promoviendo ciertos procesos en biosíntesis, transporte, percepción o transducción de señales relacionadas con hormonas vegetales (Jankiewicz, 2003). Estas sustancias reducen la división y elongación celular de los ápices, regulando de esta forma la altura de las plantas de manera fisiológica, sin provocar malformaciones en las hojas o los tallos (Rademacher, 2000).

Existen productos que inhiben la biosíntesis de giberelinas, tales como paclobutrazol, entre otras (Rademacher *et al.*, 1998); pero han mostrado un efecto tóxico en el hombre (Owens y Stover, 1999).

La utilización de retardantes de crecimiento favorece al cuajado de frutos, debido a que inhiben la biosíntesis de giberelinas. Los retardantes se deben de aplicar a las hojas cuando se busca un retraso en el crecimiento de otras partes de la planta y de esta forma los asimilados son utilizados por las flores. Y otros órganos florales (Rademacher, 2004).

Recientemente se ha reportado a la Prohexadione de Calcio (P-Ca) como un retardante de crecimiento muy prometedor. Su mecanismo de acción aun no es definido totalmente desde el punto de vista hormonal endógeno.

Prohexadiona de Calcio

Prohexadiona de calcio (P-Ca) es un retardante del crecimiento de recién desarrollo. BAS 125 W es el código experimental de P-Ca. Su nomenclatura química es calcio 3 – oxido – 4 – propionil – 5 – oxo – 3 ciclohexano – carboxilato. Siendo su fórmula $C_{10}H_{10}CaO_5$. (Rademacher *et al.*, 1998).

La P-Ca inhibe la biosíntesis de las giberelinas A_1 , A_4 y A_7 , reduciendo con esto los brotes de crecimiento (Nakayama *et al.*, 1990; Nakayama *et al.*, 1992). El efecto de P-Ca es la hidroxilación de 3β , y como consecuencia de ello, el reducir los niveles de AG_1 (altamente activo), causando una acumulación inmediata del precursor AG_{20} la cual, es inactiva (Rademacher, 1993). Se ha sugerido que P-Ca puede intervenir en rutas biosintéticas de metabolitos secundarios e impactar positivamente el estatus antioxidante (Fernando y Jones, 1999).

Se ha reportado que P-Ca tiende a aumentar los niveles de citocininas en tejidos como meristemos apicales y semillas inmaduras (Evans *et al.*, 2008). Este efecto ha sido relacionado con el estímulo en la formación de flores y

consecuentemente el rendimiento de diversas especies hortícolas (Ramírez *et al.*, 2008).

El conocimiento sobre la influencia de P-Ca en la fisiología vegetal de varios cultivos Hortícolas, permite considerar a este retardante de crecimiento como un biorregulador que puede contribuir a controlar el crecimiento vegetativo – reproductivo de varias especies hortícolas (Ramírez, *et al.*, 2005).

La P-Ca en las plantas se degrada en pocas semanas. Después de la asimilación y del partimiento de su anillo, ocurre naturalmente el ácido propano 1, 2, 3-ticarbocílico o ácido tricarbárico, el cual es introducido al metabolismo de la planta. En los suelos se descompone principalmente en dióxido de carbono, con una vida aproximada de 7 días. En el agua, este retardante se degrada por fotólisis a dióxido de carbono y otros productos naturales, y en los mamíferos es rápidamente absorbido y después excretado (Francois y Rademacher, 2009).

Prohexadiona de calcio no es mutagénico, carcinogénico o teratogénico. No tiene efectos sobre pájaros, peces, abejas o en los microorganismos del suelo. P-Ca es absorbido foliarmente; es transportado acropetalamente a los puntos individuales de crecimiento. Los movimientos basipétalos son mínimos. Su persistencia en las plantas es nula (Evans *et al.*, 1999).

Prohexadiona de calcio produce cambios importantes en el metabolismo de los flavonoides del manzano; inhibe las dioxigenasas implicadas en la biosíntesis

de giberelinas (Rademacher *et al.*, 1998). Se ha mostrado un incremento en el rendimiento del manzano ya que aumenta el cuajado del fruto. Tiene efectos sobre la calidad de fruto, produciendo una homogeneidad en el tamaño y el diámetro, un bajo contenido de sólidos solubles totales, un mayor peso y firmeza del fruto.

En estudios realizados se demostró que prohexadiona de calcio (250 o 500 mg·L⁻¹) retrasa la aparición de retoños de limón (*Citrus limon* L.) por alrededor de 2 semanas; por el contrario P-Ca (250 y 500 mg·L⁻¹) estimulo el rebrote en naranja ombligona (*Citrus sinensis* L.). En aplicaciones foliares de P-Ca (250 y 1000 mg·L⁻¹) sobre aguacate Hass (*Persea americana*) en plena floración, no se tuvo efecto alguno en el brote vegetativo apical ni en los brotes florales (Rademacher *et al.*, 1998).

Uno de los efectos que prohexadiona de calcio ha hecho evidente es la reducción en la incidencia de plagas y enfermedades. En manzano se ha mostrado una reducción en la incidencia de tizón de fuego (*Erwinia amylovora*), la roña (*Venturia inaequalis*) y el moho gris (*Botrytis cinerea*). En ensayos realizados en cultivos de pera con Regalis[®] (3x 100 g/ha), se redujo la incidencia de *Psylla pyri* en aproximadamente un 70% (Garner *et al.*, 2009).

Antioxidantes

Un antioxidante es una sustancia sintética o natural que en pequeñas concentraciones previene el deterioro por acción del oxígeno ambiental. Este protege biológicamente a los tejidos del daño por radicales libres, transformándose en radicales libres no tóxicos.

Los antioxidantes consisten de una cadena de proteínas. En este grupo se identifican las vitaminas C y E, tocofenoles, carotenoides, flavonoides y polifenoles.

Entre las moléculas antioxidantes, los flavonoides juegan un papel único en la planta. Los carotenoides y tocofenoles se integran al metabolismo de plantas y en humanos. Los flavonoides no parecen tener funciones como antioxidantes en plantas; sin embargo los flavonoides pueden tener una contribución en la dieta humana, ya que son benéficos en la salud (Prior y Cao, 2000).

Vitamina C

El ácido L-ascórbico es un compuesto abundante en los tejidos verdes, el cual depura al peróxido de hidrógeno en los cloroplastos y favorece la eficiencia fotosintética. Es esencial en los procesos metabólicos en el crecimiento y en la diferenciación floral.

Las variaciones en el contenido de vitaminas depende del tipo de cultivar, estado madurez, manejo de la planta y el clima.

El ascorbato funciona como un reductor de radicales libres minimizando el daño oxidativo e inhibiendo la formación de nitrosamina carcinogénica; también, estimula el sistema inmunológico, la absorción de hierro, calcio y aminoácidos.

El ácido L-ascórbico parece ser sintetizado a partir de las hexosas, convirtiendo la D-glucosa en ascorbato (Ramírez, *et al.*, 2006).

Actividad Enzimática

Las enzimas son moléculas de naturaleza proteica que catalizan reacciones químicas, siempre que sea termodinámicamente posible. Casi todos los procesos de las células necesitan enzimas para que ocurran a unas tasas significativas.

Debido a que las enzimas son extremadamente selectivas con sus sustratos y su velocidad crece solo con algunas reacciones, el conjunto de enzimas sintetizadas en una célula determina el tipo de metabolismo que tendrá cada célula (Gosh *et al.*, 2003).

La actividad enzimática se determina por su estructura tridimensional, la cual viene a su vez determinada por la secuencia de aminoácidos. Sin embargo, aunque la estructura determina la función, predecir una nueva actividad enzimática basándose únicamente en la estructura de una proteína es muy difícil.

La actividad de las enzimas puede ser afectada por otras moléculas. Los inhibidores enzimáticos son moléculas que disminuyen o impiden la actividad de las enzimas, mientras que los activadores son moléculas que incrementan dicha

actividad. Asimismo, gran cantidad de enzimas requieren de cofactores para su actividad.

Algunas enzimas son usadas comercialmente, por ejemplo, en la síntesis de antibióticos y productos domésticos de limpieza. Además, son ampliamente utilizados en diversos procesos industriales, como son la fabricación de alimentos, dentición de jeans o producción de biocombustibles.

Las enzimas presentan una amplia variedad de funciones en los organismos vivos. Son indispensables en la transducción de señales y en procesos de regulación. También son capaces de producir movimiento (Ramírez, *et al.*, 2005).

Peroxidasa

Prácticamente todas las peroxidasas son hemoproteínas (a excepción de la glutatión peroxidasa, que es una selenoproteína) y tienen como sustrato común el H_2O_2 o peróxido de hidrógeno. La gran afinidad por este sustrato hace que se pueda unir al hierro del grupo hemo por los dos planos del centro activo, el superior y el inferior, dando lugar a una inhibición por exceso de sustrato ya que cuando ambas posiciones están ocupadas por el peróxido de hidrógeno no es posible la unión del otro sustrato (Froyer *et al.*, 1997).

Respecto a ese otro sustrato, su naturaleza y su estructura química puede ser muy distinta, tanto si nos referimos a los oxidados "*in vivo*" como si lo

hacemos a los que se emplean “*in vitro*” con objeto de detectar esta actividad enzimática. Entre ellos se incluyen fenoles, aminas aromáticas, moléculas orgánicas complejas como el ABTS (catión radical 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato)), o el ioduro y el glutatión antes citados. Esta pobre especificidad para el sustrato reductor hace que la afinidad sea también pequeña (Miller *et al.*, 1993).

Las ascorbato peroxidasas (APXs) son las mas importantes enzimas atrapadoras de H₂O₂ que operan tanto en el citosol como en el cloroplasto. Estas enzimas usan el ácido ascórbico como sustrato reductor y forman parte de un ciclo, conocido como el ciclo del ascorbato-glutatión o Halliwell-Asada (Shigeoka *et al.*, 2002). La expresión génica de ascorbato peroxidasa es rápidamente inducida por varias condiciones de estrés, como la aplicación de paraquat, ácido absisico, sequía y alta temperatura, sugiriendo un papel importante en la tolerancia al estrés del tipo abiótico y xenobióticos (Benavides, 2002). En vegetales, es de destacar a la peroxidasa de rábano, que tiene grandes aplicaciones en técnicas inmunoquímicas y de diagnostico clínico debido a su gran estabilidad, facilidad de conjugación y sencillez para detectarla por métodos colorimétricos utilizando un gran numero de reactivos. Otras peroxidasas, como la glutatión peroxidasa, esta ampliamente distribuida en diversos tejidos con fines diferentes, pero relacionados con una función antioxidante (Pastori y Foyer, 2002).

Catalasa

Es una enzima con un grupo prostético hemo que cataliza la dismutación del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno (Del Río *et al.*, 2002), se encuentra en todos los eucariotas aerobios y es importante en la remoción del peróxido de hidrógeno generado durante el ciclo del glioxilato en la fotorespiración, la β -oxidación de lípidos en los peroxisomas y el catabolismo de la purina. Las catalasas son tetrámeras de peso molecular mayor a 220,000 (Acevedo y Scandios, 1991).

**PROHEXADIONE-CA MODIFIES CONTENT OF GIBBERELLINS, VITAMIN C,
ANTIOXIDANT CAPACITY AND ENZYMATIC ACTIVITY IN APPLE**

H. Ramírez, P.C. Leza-Hernández, A. Benavides, C. Amado-Ramírez, A. Martínez-Osorio and C.E. Rivera-Cruz.

Departamento de Horticultura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.
Buenavista, Saltillo 25315, Coahuila, México

Keywords: apple, prohexadione-Ca, antioxidant, vitamin C, *Malus xdomestica*

ABSTRACT

The present research was conducted to better understand the effects of prohexadione-Ca (P-Ca) on the gibberellin changes at the apex and on the antioxidants and enzyme behavior on ripening fruits of apple (*Malus xdomestica*). Pca was sprayed twice in the spring of 2008 on sixteen-year old 'Red Delicious'/M.106 apple trees when shoot growth reached 5 cm in length. The concentration dosages of the growth retardant were 0 (control), 125, 175 and 200

mg·L⁻¹. The GCMS analysis of experimental samples showed the presence of gibberellins A9 and A20 in P-Ca treated shoot tips; whereas gibberellins A1, A4, and A7 were identified in control samples. The total antioxidant content in ripening fruits was increased with any concentration of P-Ca. A similar pattern was also observed in those fruits when vitamin C, catalase and peroxidase enzymes content were measured.

INTRODUCTION

Modern pomology, seeks alternatives in order to improve the fruit quality. Among them are: biotechnology, new plant management systems and the use of plant bioregulators. Prohexadione calcium (P-Ca) is a growth retardant which has been proven to be a useful tool for the control of excessive vegetative growth and to improve fruit quality in apple, pear and cherry trees. P-Ca inhibits the biosynthesis of the biological active gibberellins A1, A4, and A7 (Rademacher, 2000). It has been suggested that P-Ca may participate in secondary metabolite pathways linked to antioxidant status in edible fruits (Rademacher *et al.*, 2006), as well as through modifying the enzyme system activity. Therefore, the purpose of this work was to evaluate the effects of P-Ca on the gibberellin content at the apex of 'Red Delicious' apple trees, and on the total antioxidant content, vitamin C, catalase and peroxidase activity in ripen fruits.

MATERIALS AND METHODS

Randomly selected 16 year-old 'Red Delicious' apple trees, grafted onto MM106 rootstocks growing in an open field at Huachichil, Coahuila, were used in this study. P-Ca (10% a.i.) was applied with a back pack sprayer to run-off on trees early in the spring of 2008 when shoot growth had reached 5 cm in length. The concentration dosages of P-Ca were 0 (control), 125, 175 and 200 mg·L⁻¹. A second application of P-Ca was done early in July. All P-Ca solutions included 0.1% v/v Regulaid® as a surfactant. A randomized factorial design with four trees replicates for treatment was used. Significance was calculated using Tukey's least significant difference. Shoot apex samples from control trees and P-Ca 200 mg·L⁻¹ treated trees were collected four days after the first application of the growth retardant and were analyzed for gibberellin identification using the GC-MS technique described previously by Ramírez *et al.* (2005). Fruit samples for analysis were collected from experimental trees during at the normal harvest time. The total antioxidant level was determined using the (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity TEAC) assay described in Miller *et al.* (1993). The concentration of vitamin C was determined using the technique reported by Padayatt *et al.* (2001). The catalase activity was quantified with the method described by Masia (1998), and peroxidase was determined by the technique reported by Kar and Mishra (1976).

RESULTS AND DISCUSSION

Endogenous Gibberellins

The endogenous gibberellins present in shoot apex were identified by GC-MS analysis. Table 1 shows that in the control samples GA1, GA4 and GA7 were present. Those hormones were absent in P-Ca treated tissue; whereas GA9 and GA20 were detected. Changes in the endogenous gibberellin status in response to the application of growth retardants in apple trees are well documented (Rojas and Ramírez, 1996). P-Ca has been classified as an inhibitor of the synthesis of gibberellins GA1, GA4 and GA7 which are biologically active (Rademacher, 2000). These data supports the findings which may explain the reduction in shoot growth observed in fruit trees soon after P-Ca was sprayed.

Antioxidants

It can be seen in Figure 1 that all P-Ca treatments promoted an increase in total antioxidant levels in ripe apple fruits. This effect seems to reflect that P-Ca is a promoter of the antioxidant system of apple as it has previously reported in tomato fruits by Jimenez *et al.* (2002). They showed an increase in the level of the total antioxidants at the glutathione-ascorbate phase during fruit ripening. Disegna *et al.* (2002) found a higher content of total antioxidants in grape berries when plants were treated with P-Ca at 200 mg·L⁻¹. Figure 2 shows that any P-Ca treatment increased the content of vitamin C in ripen fruits. The highest concentration of this antioxidant was observed with P-Ca at 125 mg·L⁻¹. Similar effects were reported in peach, broccoli and tomato when P-Ca at 150 mg·L⁻¹ was applied on these

horticultural crops (Rademacher, 2000; Rademacher and Kober, 2003). Vitamin C (ascorbic acid) is an antioxidant which plays an important role in detoxification of activated oxygen and reacts directly with reactive oxygen molecules in plum (Khan and Singh, 2008). Application of P-Ca resulted in higher vitamin C content as compared with control. This increment of vitamin C may be due to an increase in enzyme activity linked to the synthesis of the antioxidant through the cytochrome activity (Rocha *et al.*, 1995). The increment of total antioxidant activity of P-Ca treatment may be due to the ability of this growth retardant to inhibit the production of cellular free radicals which are normally produced during catabolic respiratory climacteric as it has been proposed by MacLean *et al.* (2003).

Enzymes

The application of P-Ca at any concentration significantly increased the peroxidase (Fig. 3) and catalase (Fig. 4) activity. Ramírez *et al.* (2006) reported in ripe tomato fruits an increase in the activity of both enzymes when plants were sprayed with P-Ca at 150 mg·L⁻¹. It is possible that the increase of these enzymes activity may contribute to the process of vitamin C synthesis (Khan and Singh, 2008).

CONCLUSIONS

Prohexadione-Ca applied to apple trees inhibits synthesis of GA1, GA4 and GA7 in shoot apex; increases total antioxidant capacity, content of vitamin C and catalase and peroxidase activity in ripe fruit.

LITERATURE CITED

- Disegna, E., Boido, E., Carrau, F., Fariña, L., Medina, K., Méndez, M., Rodríguez, P. and De La Cassa, E. 2006. Efectos de la aplicación del regulador del crecimiento 3,5- dioxo-4-propionilciclohexancarboxilato de calcio (BAS 125) en la producción de uvas, composición del vino y aroma del cv. "tannat". <http://www.inia.org.uy/eventos/M&E-9.pdf>
- Jimenez, A., Creissen, G., Kular, B., Firmin, J., Robinson, S., Verhoeyen, M. and Mullineaux, P. 2002. Changes in oxidative processes and components of the antioxidant system during tomato fruit ripening. *Planta* 214:751-758.
- Kar, M. and Mishra, D. 1976. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiol.* 57:315-319.
- Khan, A.S. and Singh, Z. 2008. 1-MCP application affects ethylene production, storage life and quality of 'Tegan Blue' plum. *Acta Hort.* 771:143-150.
- MacLean, D.D., Murr, D.P. and Deell, J.R. 2003. A modified total oxyradical scavenging capacity assay for antioxidants in plant tissue. *Postharvest Biol. Technol.* 29:183-194.

- Masia, A. 1998. Superoxide dismutase catalase activities in apple fruit during ripening and post-harvest and with special reference to ethylene. *Physiol. Plant.* 104:668-672.
- Miller, N.J., Rice-Evans, C., Davies, M.J., Gopinathan, V. and Milner A. 1993. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinic Sci.* 84:407-412.
- Padayatt, S.J., Daruwala, R., Wang, Y., Eck, P.K., Song, J., Koh, W.S. and Levine, M. 2001. Vitamin C: From molecular actions to optimum intake. p.117-145. In: E. Cadenzas and L. Packer (eds.), *Handbook of Antioxidants*. 2nd Ed. Washington. CRC Press.
- Rademacher, W. 2000. Growth retardants: Effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. *Ann. Rev. Plant Physiol. and Mol. Biol.* 51:501-531.
- Rademacher, W. and Kober, R. 2003. Efficient use of prohexadione–ca in pome fruits. (*European J. Hort. Sci.* 68:101-107.
- Rademacher, W., Spinelli, F. and Costa, G. 2006. Prohexadione-Ca: Modes of action of a multifunctional plant biorregulator for fruit trees. *Acta Hort.* 727:97-106.
- Ramírez, H., Peralta, M.R.M., Benavides, M.A., Sanchez, L.A., Robledo, T.V. and Hernández, D.J. 2005. Efecto de prohexadiona-ca en tomate y su relación con la variación de la concentración de giberelinas y citocininas. *Rev. Chapingo Serie Hort.* 11:283-290.

- Ramírez, H., Rancaño, A.J.H., Benavides, M.A., Mendoza, V.R. and Padron, C.E. 2006. Influencia de promotores de oxidación controlada en hortalizas y su relación con antioxidantes. *Rev. Chapingo Serie Hort.* 12:189-195.
- Rocha, A.M.C.N., Brocado, C.M., Kirby, R. and Morais, M.M.B. 1995. Shelf life of chilled cut orange determined by sensory quality. *Food Cont.* 6:317-322.
- Rojas, M. and Ramírez, H. 1996. Control hormonal del desarrollo de las plantas. Limusa, Press, México.

Tables

Table 1. Gibberellin content in shoot apices of 'Red Delicious' apple trees four days after being sprayed with prohexadione-Ca (200 mg·L⁻¹). Gibberellins were identified by GC-MS.

Gibberellins	KRI^a	Principal ions and % relative intensity of base peak
Control		
GA₁	2651	[506(100), 448(14), 377(15), 375(18)]
GA₄	2488	[418(21), 403(2), 400(12), 386(25), 284(100)]
GA₇	2416	[416(10), 193(12), 179(5), 155(13)]
Prohexadione calcium		
GA₉	2295	[330(5), 217(37), 183(19), 159(45)]
GA₂₀	2468	[418(100), 403(17), 387(6), 375(82), 359(19)]

^aKovats retention index.

Figures

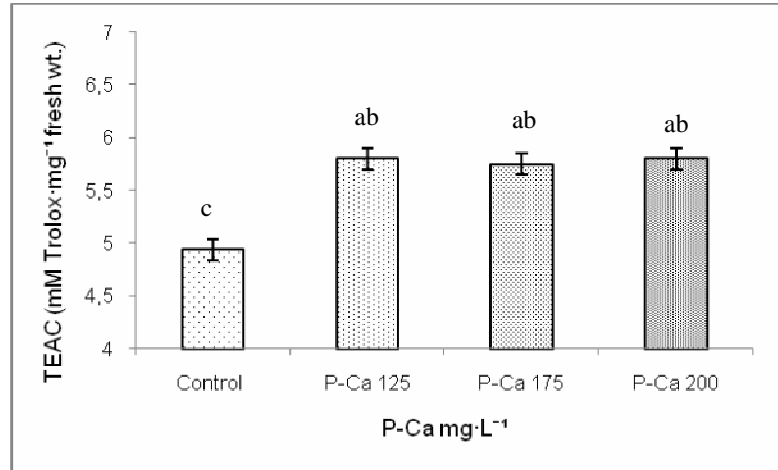


Fig. 1. Effect of prohexadione-Ca on the Trolox equivalent antioxidant capacity in 'Red Delicious' apple fruits. Each value represents the mean of four replications. Means with the same letter are not significantly different (Tukey, $P \leq 0.01$).

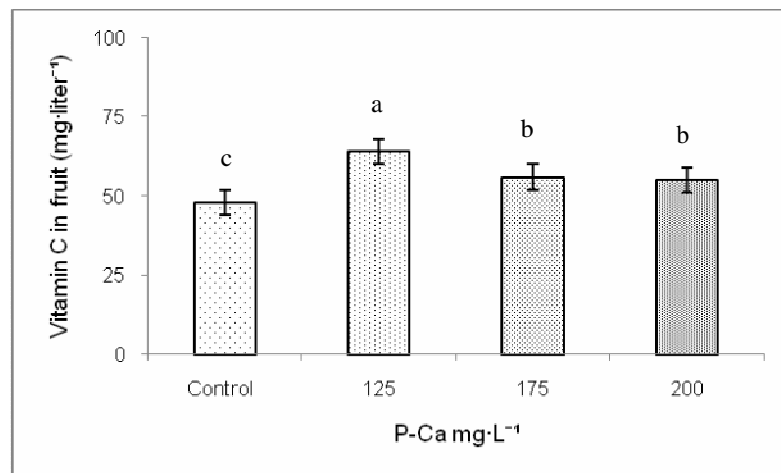


Fig. 2. Effect of prohexadione-Ca at different dosages on the concentration of vitamin C in 'Red Delicious' apple fruits. Each value represents the mean of four replicates. Means with same letter are not significantly different (Tukey, $P \leq 0.01$).

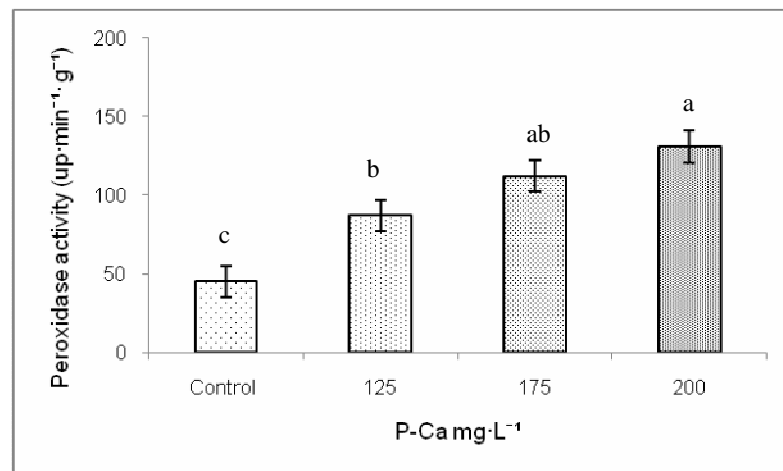


Fig. 3. Effect of prohexadione-Ca on the peroxidase activity in 'Red Delicious' apple fruits. Each value represents the mean of four replicates. Means with the same letter are not significantly different (Tukey, $P \leq 0.01$).

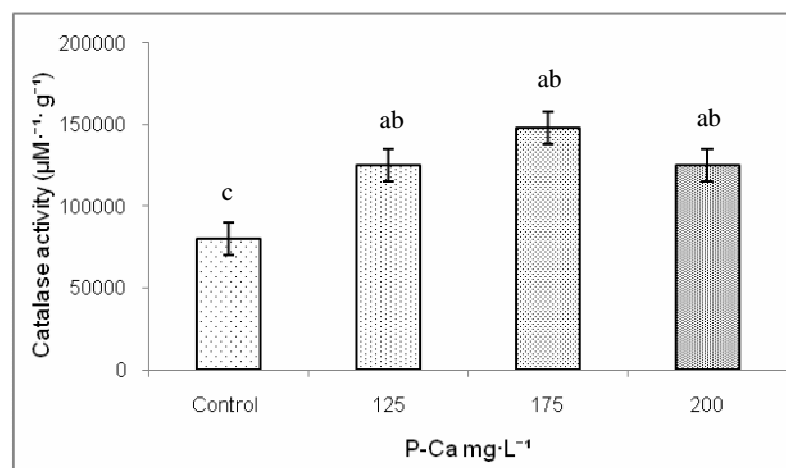


Fig. 4. Effect of prohexadione- Ca on the catalase activity in 'Red Delicious' apple fruits. Each value represents the mean of four replicates. Means with the same letter are not significantly different (Tukey, $P \leq 0.01$).

CONCLUSIONES

Prohexadiona de calcio aplicada a árboles de manzana cv Red Delicious a dosis de 125, 175 y 200 mg · L⁻¹ inhibe la síntesis de GA₁, GA₄ y GA₇ en el ápice; aumenta la capacidad antioxidante total, el contenido de vitamina C y la actividad de catalasa y peroxidasa en frutos maduros.

LITERATURA CITADA

- Basak, A. 2004. Growth and fruiting of “Elstar” apple trees in response to prohexadione calcium depending on the rootstock. *Acta Hort. (ISHS)* 653:117-125.
- Bazzi, C., Messina, Ch., Tortoreto, L., Stefan, E., Bini, F., Brunelli, A., Andreotti, C., Sabatini, E., Spinelli, F., Costa, G., Hauptmann, S., Stammler, G., Doerr, S., Marr, J. and Rademacher, W., 2003. Control of pathogen incidence in pome fruits and other horticultural crop plants with prohexadione-ca. *European journal of Horticultural Science*. Vol 68 - I 3.
- Calvo, S. M. 1996. *El gran diccionario del medio ambiente y de la contaminación*. Ed. Coediciones Mundi-Prensa. Madrid, México, España.
- Costa, G., Sabatini, E., Spinelli, F., Andreotti, C., Bomben, C. and Vizzotto, G., 2004. Two years of application of prohexadione-ca on apple: effect on vegetative and cropping performance, fruit quality, return bloom and residual effect. *Acta Hort. (ISHS)* 653:35-40.

- Fernando, W. G. D. and Jones, A. L. 1999. Prohexadione calcium – a tool for reducing secondary fire blight infection. *Acta Hort.* (ISHS) 489:597-600.
- Francois, P. and W. Rademacher. 2009. Reduced incidence of *Psylla pyri* in pear trees treated with prohexadione-ca. 11th International Symposium on Plant Bioregulator in Fruit Products. Abstract Book. ISHS. September, 20 – 23, 2009. Bologna, Italy. Pp 186.
- Garner, L. C.; Y. Zheng and C. J. Lovatt. 2009. Prohexadione-ca affects shoot growth of evergreen subtropical woody perennials differently than deciduous temperate zone woody perennials. - *Is it a case of apples and oranges?* 11th International Symposium on Plant Bioregulator in Fruit Products. Abstract Book. ISHS. September, 20 – 23, 2009. Bologna, Italy. Pp 25.
- Gosh, C., Puhl, I., Halbwirth, H., Schlangen, K., Roemmelt, S., Andreotti, C., Costa, G., Fischer, T. C., Treutter, D., Stich, K. and Forkmann, G. 2003. Effect of prohexadione-ca on various fruit crops: flavonoid composition and substrate specificity of their dihydroflavonol 4-reductases. *European Journal of Horticultural Science*. Vol 68 - I 3.
- Ibarra, M. A. 1989. Efecto de reguladores de crecimiento y anillado sobre diferenciación floral en manzano cv. "Golden Delicious". Tesis Licenciatura. UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

- Kamara, K. A. 2001. Nutrición, regulación del crecimiento y desarrollo vegetal. Memoria del Primer Simposio Nacional de Horticultura. Saltillo, Coahuila, México. pp. 1-14.
- Kiessling, C. M., Magaña, J. E., Segovia, A., Obando, A. J. y Villarreal, V. H. 2007. Prohexadiona de calcio como regulador de crecimiento en el manzano (*Malus domestica* Borkh). "Golden Delicious", Ciudad Cuauhtémoc, Chihuahua, México. *Tecnociencia Chihuahua*. Vol 1, No. 3.
- Kramer, S., Achuricht, R. y Frederick, G. 1983. *Fruticultura*. Editorial C. E. C. S. A. Mexico.
- Momol, M. T., Ugine, J. D., Norelli, J. L. and Alwinckle, H. S. 1999. The effect of prohexadione calcium, SAR inducer and calcium on the control of shoot blight caused by *Erwinia amylovora* on apple. *Acta Hort. (ISHS)*. 489:601-606.
- Gómez, R. 2002. Evaluación de prohexadiona de calcio (Apogee) en manzano (*Malus Sylvestris* Mill) bajo condiciones de Arteaga, Coahuila, México. Tesis Licenciatura. UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.
- Rademacher, W., Kraus, M., Hoppner, P., Evans, R. R. 1998. Prohexadione-Ca. A new biorregulator for the control of vegetative growth in apple. Data report

APE/HF 19984296RAD, BASF Agricultural Center, 67114 Limburgerhof, Germany.

Ramírez, H. y Cepeda, M. 1993. El manzano. Editorial Trillas. México.

Ramírez, H., Peralta, M.R.M., Benavides, M.A., Sánchez, L.A., Robledo, T.V., Hernández, D.J. 2005. Efecto de prohexadiona-ca en tomate y su relación con la variación de la concentración de giberelinas y citocininas. Rev. Chapingo Serie Hort. 11(2): 283-290.

Ramírez, H., Rancaño, A.J.H., Benavides, M.A., Mendoza, V.R., Padron, C.E. 2006. Influencia de promotores de oxidación controlada en hortalizas y su relación con antioxidantes. Rev. Chapingo Serie Hort. 12(2): 189-195.

Ramírez, H., Alonso, S. y Benavides, A. 2006. Prohexadiona- Ca modifica el crecimiento y hormonas endógenas en ápice de manzano. Acta Hort. (ISHS). 727:117-124.

Ramírez, C. A. 2009. Prohexadiona-Ca, AG₃, ANOXA, IBA modifican indicadores fisiológicos y bioquímicos en chile mirador. Tesis Maestría en Ciencias. UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

- Roemmelt, S., Treutter, D., Speakman, J. B. and Rademacher, W. 1999. Effects of prohexadione-ca on the flavonoid metabolism of apple with respect to plant resistance against fire blight. *Acta Hort. (ISHS)* 489:359-364.
- Ruehmann, S. and Truetter, D. 2003. Effect of N- nutrition in apple on the response of its secondary metabolism to prohexadione-ca treatment. *European Journal of Horticultural Science*. Vol. 68 – I. 3.
- Ryugo, K. 1993. *Fruticultura, ciencia y arte*. A. G. T. Editors, S. A.
- Sabatini, E., Noferini, M., Fiori, G., Corelli Grappadelli and Costa, G. 2003. Prohexadione-Ca positively affects gas exchanges and chlorophyll content of Apple and pear trees. *European Journal of Horticultural Science*. Vol. 68 – I. 3.
- Villalpando, M. N. 1982. *fruticultura d zona templada*. Ediciones Mundi-Prensa. Versión Española. Castellón 37, Madrid, España.
- Windler, V. W. 1997. Reduced risk concept for prohexadione – calcium, a vegetative growth control plant growth regulator in apples. *Acta Hort. (ISHS)* 451:667-672.