



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS



**BIBLIOTECA
INSTITUTO DE ECOLOGIA
UNAM**

**INTRODUCCION AL ESTUDIO DE CITOCININAS ENDOGENAS EN
YEMAS FLORALES DEL MANZANO EN EL
ESTADO DE CHIHUAHUA**



**EXAMENES
PROFESIONALES**

T E S I S

Que para obtener el título de:

B I O L O G O

P r e s e n t a n :

IRMA GUADALUPE ALONSO SAMPEDRO

FEDERICO GABRIEL VALDOVINOS CHAVEZ

México, D. F.

1980



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A NUESTROS PADRES Y HERMANOS

A RODRIGO

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos sinceramente a todos aquellos que con su consejo y coordinación nos ayudaron durante nuestros estudios, así como también a los que nos brindaron facilidades para realizar este trabajo en la Comisión Nacional de Fruticultura, entre los que se encuentran el Dr. Antonio Carmona Alcántara y muy especialmente a la M. en C. Susana Ochoa de la Torre por su acertada dirección.

También quedamos agradecidos con las personas que ce laboraron como Comisión Dictaminadora para la presentación de este trabajo:

M. en C. Nicolás Aguilera Herrera

Dra. Beatriz Gómez Lape

Quím. Susana Ochoa de la Torre

Biol. Agustín García Rivera

Biol. Angelina Martínez Yrizar

CONTENIDO

- I RESUMEN
- II INTRODUCCION
- III EL MANZANO
- IV CITOGININAS
 - a) Antecedentes
 - b) Fórmula química
 - c) Efectos
 - d) Localización de su biosíntesis
 - e) Su posible mecanismo de acción
- V BIOENSAYOS
- VI JUSTIFICACION DEL TRABAJO. PROBLEMATICA DEL MANZANO
- VII OBJETIVOS
- VIII MATERIAL Y METODOS
 - a) Descripción de las variedades Golden Delicious y Rome Beauty
 - b) Extracción y purificación parcial de las citocininas
 - c) Partición líquido/líquido
 - d) Cromatografía
 - e) Bioensayo
- IX RESULTADOS
- X DISCUSION
- XI CONCLUSIONES Y ESTUDIOS FUTUROS
- XII BIBLIOGRAFIA

I RESUMEN

El objetivo general de este trabajo fue el de comparar los niveles endógenos de citocininas en yemas florales de manzano con y sin problema de producción debido a variaciones en el régimen de horas frío en diferentes regiones del estado de Chihuahua, y cuantificar su actividad.

Para alcanzar este objetivo se hizo:

- 1) Una revisión bibliográfica relacionada con:
 - a) los aspectos del cultivo
 - b) la fisiología de las citocininas
 - c) su método de extracción y purificación a partir de extractos vegetales
 - d) pruebas biológicas para cuantificar su actividad
- 2) Se trabajó experimentalmente:
 - a) para montar la metodología más adecuada de extracción y purificación de las citocininas
 - b) realizando bioensayos para detectar actividad promotora o inhibidora de citocininas con diferentes concentraciones

De este trabajo se pudo concluir:

- 1) Que la metodología empleada fue satisfactoria para los objetivos perseguidos
- 2) Ciudad Guerrero es una zona apta para la variedad Golden

Delicious, observándose gran actividad de citocininas

- c) El Sauz presentó baja actividad de citocininas en la variedad Golden Delicious, siendo por otra parte, una zona no apta
- d) El cambio de contenido de citocininas no sólo depende de diferencias climatológicas, sino también de la fenología del árbol
- e) El nivel de citocininas influye de una manera definitiva en la producción del manzano cuando las demás condiciones son óptimas.

II INTRODUCCION

Las plantas, como seres vivos que son, tienen un patrón de desarrollo complejo en donde intervienen agentes endógenos y exógenos. El equilibrio de estos agentes permite a la planta desenvolverse dentro de un medio que plantea constantemente diversas alternativas de vida, y de no ser por los variados mecanismos homeostáticos de las plantas, las posibilidades de supervivencia no existirían; tales mecanismos, comprenden procesos químicos, fisiológicos, físicos y genéticos que vienen a determinar el crecimiento y desarrollo.

Las presiones de selección del medio, como son el clima, la orografía, características químicas del suelo, y otras, actúan a diversos niveles sobre la planta, y ésta, a su vez, ha logrado una especialización mediante una serie de adaptaciones como una respuesta a sus necesidades específicas. Así pues, las células no tienen una pared celular fortuita, ni la latencia es casual, sino que son respuestas específicas. Detrás de estos fenómenos existe un genotipo que se manifiesta mediante vías metabólicas como fenotipo de la planta. Algunos de los intermediarios de comunicación son las Hormonas Vegetales.

Aún cuando se ha avanzado en el conocimiento de estas sustancias, no se han podido explicar muchos fenómenos vegetales, y es sólo por medio de la investigación que han -

quedado claros algunos de ellos. Este tipo de investigación puede proporcionar resultados de aplicación práctica, como por ejemplo, criterios para lograr obtener una mayor producción comercial, como es el caso del manzano, en donde el conocimiento de los procesos fisiológicos que lo afectan, relacionados con floración, crecimiento, latencia, fructificación, etc., aplicados en la agronomía pueden auxiliar al manejo de este cultivo.

Los Reguladores del Crecimiento Naturales u Hormonas Vegetales, son sustancias elaboradas en un lugar de la planta y trasladadas a otro; en este segundo sitio, ellas actúan bajo determinados caminos a muy bajas concentraciones, para controlar el metabolismo de esa planta, ya sea por inhibición o promoción de los fenómenos fisiológicos. Sin embargo es importante anotar que no siempre hay un traslado de estas hormonas, pudiendo actuar en el sitio mismo de su biosíntesis. (Bidwell, 1974). La clasificación de hormonas promotoras o inhibidoras se basa en la función de la hormona en sí, ya que dependiendo de la concentración, una hormona puede dar un efecto, y al variar la concentración, llega a presentar una actividad tóxica. Asimismo una hormona puede presentar un comportamiento, y al actuar junto a otra, manifestar un comportamiento diferente (Hill, 1977).

III EL MANZANO

El manzano es un árbol caducifolio que pertenece a la familia de las rosáceas. Se conocen cierto número de especies procedentes del hemisferio boreal, vegetando en estado silvestre desde América del Norte hasta Manchuria (Juscafresa, 1973).

En nuestro continente se cultivan únicamente las especies del Pyrus malus, las del Malus acerba, Malus paradisica lutea y sus híbridos localizados todos como injertos siendo las variedades de mayor importancia comercial: Golden Delicious, Rome Beauty, Red Delicious, Doble Delicious, Jonathan Arkansas Black, Scarlet, Gravenstein, Yellow Newton, Starking, Winesap y Winter Banana (Juscafresa, 1973).

Características Morfológicas. La abundancia y forma del follaje en huertos establecidos depende mas bien del sistema de poda que de las características propias del árbol, (Figura 1), debido a que este sistema permite una mejor explotación del mismo (Juscafresa, 1973). El tamaño de las hojas y el número y dimensión de las lenticelas indican la gran exigencia del agua, tanto en el suelo como en la atmósfera.

Los botones florales contienen a las inflorescencias; la cual es un corimbo formado por 8 y hasta 11 flores; cada botón floral tiene en su base 2 yemas de madera. Los bo-



Figura 1.- Forma típica de un árbol de manzano en El Sauz, Chihuahua, en el mes de abril

tones florales pueden ocupar una posición terminal en la ramilla o una posición lateral sobre la madera del año. El desborde de estos botones florales axilares es más tardío que el de los terminales (Coutanceau, 1970). Las flores son hermafroditas, cortamente pedunculadas, sentadas en las ramas, siendo las de algunas variedades autocompatibles, y las más autoincompatibles, por lo que exigen una polinización cruzada. Durante el periodo de formación de las yemas todas son vegetativas (Coutanceau, 1970).

El fruto tiene 5 alveolos y el endocarpio es cartilaginoso. En cada carpelo se encuentran las semillas; el pedúnculo es de longitud variable, adherente, y a menudo está inserto en una depresión más o menos regular y poco profunda; el cáliz es persistente y forma una depresión - (Coutanceau, 1970).

Requisitos del Cultivo. Para establecer un huerto de manzana deben ser considerados las siguientes condiciones - (Guía para la Asistencia Técnica Agrícola. Área de Influencia del Campo Agrícola Experimental. Sierra de Chihuahua, SARH. México, 1977. 33-37.):

- a) Ubicación (situación geográfica, topografía y altitud).
La altura óptima de cultivo en México va de los 100 a los 300 metros s.n.m.
- b) Posibilidad de obtener buenos medios de comunicación y transporte.
- c) Suelos. Las mejores condiciones edáficas son:

textura: migajón arcilloso, arenoso o franco

compactación: baja o nula

drenaje: bueno o eficiente

manto freático: no menos de 2 mts.

pH: de 6 a 7.5

No salinos

fertilidad: de regular a alta

Los suelos aconsejables para el cultivo del manzano son las tierras permeables, ligeras, franco limosas y franco arenosas. Debido a que el manzano presenta una abundante fructificación, es necesaria la aportación de buenos fertilizantes, que contengan Nitrógeno, Fósforo y Potasio durante los primeros años y posteriormente otros micronutrientes (Hierro, Cobre, Manganeso, Zinc, Boro, Molibdeno y Cloro) (Bidwell, 1974).

Por proceder de climas muy fríos los manzanos resisten temperaturas hasta de -10°C sin ser afectados, pero al descender por debajo de los 15°C se llegan a perder algunas yemas florales. Los botones florales de todas las variedades soportan temperaturas de -3.9°C ; sus flores abiertas los -2.5°C y los frutos recién formados, hasta los -1.6°C . Sin embargo con un descenso mayor de temperatura se puede perder la cosecha (Juscáfresa, 1973).

Las temperaturas altas ponen fin al periodo de repo-

so de las yemas y las temperaturas que apenas están sobre el punto de congelación son por lo común las mejores para esta fase del ciclo del árbol.

El requerimiento promedio de temperatura a $\leq 7^{\circ}\text{C}$ es:

mínimo --500 a 600 hrs. frío

regular --600 a 700 hrs. frío

largo --700 a más hrs. frío

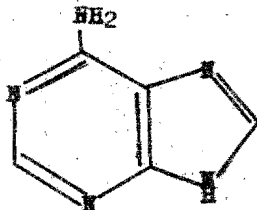
IV CITOCININAS

a) Antecedentes.

Esta clase de hormonas vegetales se descubrieron al hacer estudios del crecimiento de células de tabaco en condiciones estériles sobre medios nutritivos de origen sintético, en donde las células del tallo crecían en el cultivo solo si había auxinas y estaban presentes los tejidos vasculares. Más adelante, se demostró que el DNA, activaba el crecimiento celular, es decir, que los compuestos con adenina pueden modificar el crecimiento celular. (Fox, 1969). Skoog y Miller en 1964, lograron aislar la 6-furfuril-amino purina (cinetina) del DNA de espermatozoos de arenque; a partir de entonces se inició el estudio de lo que hoy se conoce como citocininas (Hill, 1977).

b) Fórmula química.

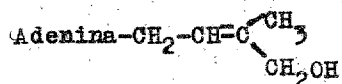
Todas las citocininas están formadas por un núcleo de adenina con diferentes radicales en el N⁶ (Takeshi, 1976):



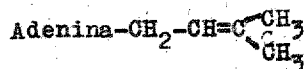
Adenina

Algunas de las citocininas naturales más importantes son (Weaver, 1976):

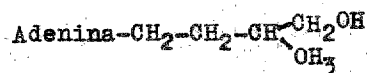
a) Zeatina



b) Isopentenil adenina

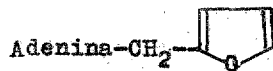


c) Dihidrozeatina

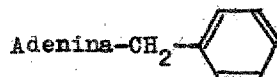


Algunos ejemplos de citocininas sintéticas son (Weaver, 1976):

a) Cinetina



b) Bencil Adenina



c) Efectos.

Se ha comprobado que las citocininas generan los siguientes efectos (Hill, 1977; Leopold, 1964):

- 1) Estimulan la división celular y el alargamiento
- 2) Estimulan la síntesis proteica (o la retardan, según su concentración)
- 3) Promueven la síntesis de lípidos y almidón
- 4) Movilizan los nutrientes a áreas tratadas con estas hormonas
- 5) Inducen la partenocarpia de algunos frutos
- 6) Estimulan la formación del tubérculo en la papa
- 7) Estimulan la formación de órganos en combinación con auxinas
- 8) La Cinetina y la Bencil Adenina (BA) retardan la senescencia en hojas de rábano y avena. Al prevenir la formación de enzimas hidrolíticas como nucleasas y proteasas, interfieren con la ruptura de los polímeros, previniendo los cambios degradativos que provocan las características de la senescencia (Osborne, 1961).
- 9) Activan la formación de yemas en brotes separados de la planta (Skoog and Armstrong, 1970)
- 10) Estimulan el crecimiento en algunas especies de algas (Jennings, 1979)
- 11) Interrumpen el reposo de las yemas (Domanski y Kozlowski, 1968).
- 12) En presencia de tirosina sintetizan betacianinas, y

por lo tanto con este fenómeno las citocininas pueden reemplazar la acción estimulante de la luz (Gautheret, 1968)

d) Localización de su biosíntesis en la planta.

Resultados de comparaciones en los niveles de citocininas en diferentes partes de una planta, indicaron que los frutos tienen más citocininas, mientras que las partes vegetativas tienen menos (Henson and Wareing, 1976), por lo que la mayoría de los estudios se han realizado en frutos (Maheswhari and Prakash, 1967; Maheswhari and Gupta, 1967; Koshimizu, et al 1967 ; Letham and Bollard, 1974), pero aún dentro de los tejidos hay diferencias cualitativas y cuantitativas.

Se ha demostrado (Henson and Wareing, 1976) que las citocininas se producen en la raíz y se dirigen vía xilema, hacia los brotes, hojas, flores, etc. Se cree que las citocininas se mueven hacia la fuente de origen de las auxinas, sin embargo, al aplicarlas directamente sobre las hojas u otro tipo de tejido, no se denotó transporte.

e) Su posible mecanismo de acción.

El mecanismo de acción de las citocininas, no es todavía conocido, pero se ha observado una síntesis de RNA y de proteínas en la célula, asociada con la acción de las citocininas (Weaver, 1976; Hill, 1977).

V BIOENSAYOS

En fisiología vegetal el uso de las pruebas biológicas o bioensayos es un instrumento de gran ayuda que permite evaluar actividad de Reguladores de Desarrollo. Consiste en la aplicación de una sustancia sobre un organismo bajo condiciones controladas, midiendo la magnitud de la respuesta de una planta a la sustancia problema. Estas observaciones permiten elaborar una "curva patrón" de dosis respuesta, a partir de la cual se puede interpolar la dosis que corresponde a "cualquier" magnitud de respuesta, permitiendo evaluar concentraciones desconocidas en equivalencia de efectos bajo esas condiciones (Hill, 1977). El punto clave de un bioensayo se fundamenta en que el regulador produce un gradiente de respuestas de acuerdo a su rango de concentraciones. Es también importante el uso de una sustancia con actividad igual o parecida al regulador para realizar una curva cuyos puntos tengan un valor que se pueda asociar con las diferentes muestras que se trabajen en un bioensayo.

Un bioensayo idóneo es aquél que reúne las siguientes características (Hill, 1977).

- a) Sensibilidad. Aún cuando se trabaje con pequeñas cantidades de hormona se debe obtener una respuesta significativa.

- b) Duración. Es favorable aquél bioensayo donde se obtenga una respuesta en pocas horas o en pocos días
- c) Especificidad. Son más útiles aquellos bioensayos donde haya una respuesta más específica a un solo tipo de hormona
- d) Linealidad de la respuesta. Es más fácil la interpretación de los resultados si la relación dosis-respuesta es de tipo lineal.

Se han observado respuestas específicas con las distintas clases de hormonas, como son:

Auxinas. Elongación de coleóptilo de trigo, inducción a la formación de raíz en plántulas de pepino y fríjol (Hill, 1977).

Giberelinas. Inhibición de crecimiento en hipocótilo de tomate, aumento en longitud de vainas foliares en maíz enano (Mitchell and Livingston, 1976), aumento de los niveles de la alfa-amilasa en endospermo de cebada (Hill, 1977).

Citocininas. Expansión del cotiledón de rabanito y pepino, (Bentley and Reid, 1968), degradación de clorofila en hojas de tabaco (Kasamo, 1976), retraso de la senescencia en hojas de avena (Varga and Buinema, 1973), en callo de tabaco (Yamada, et al, 1972) y en hipocótilo de frijol de soja (Manos and Goldthwaite, 1976).

Inhibidores. No es fácil encontrar pruebas biológicas específicas para determinar hormonas inhibidoras del crecimiento vegetal, pero algunos investigadores han utilizado modifica

ciones de la prueba para auxinas con coleóptilos de avena o de trigo, aún cuando las respuestas son menos satisfactorias que las de hormonas promotoras del crecimiento.

VI JUSTIFICACION DEL TRABAJO. PROBLEMATICA DEL MANZANO

México tiene cultivadas aproximadamente 21, 575 hectáreas de manzano con un promedio de producción de 143,625 toneladas (Dirección General de Economía Agrícola, SARH.1970).

En general, México tiene una producción baja de manzana debido a su orografía, altitud, condiciones agronómicas e hidrológicas, y en un renglón importante, un régimen inadecuado de horas frío. Esta baja producción se debe en parte a que en México al no existir inviernos muy marcados, hacen que el brote de las yemas florales, en primavera sea muy lento, quedando yemas sin brotar, y por ende, disminuyendo el número de frutos.

Chihuahua, tercera entidad productora, tiene cultivadas 3, 200 hectáreas de manzano con un total de 37, 900 toneladas, y aún cuando en producción tiene un 67% más que la entidad de Puebla, se puede considerar que su producción no es óptima, debido a que se presenta una floración deficiente, caída de frutos prematura, falta de coloración en el fruto, desprendimiento de yemas florales, brotación tardía de yemas, forma atípica del fruto en el extremocáliz, fruto pequeño, caída de pétalos, etc. Tales problemas representan pérdidas por un total del 25% de la producción dando un promedio de 6.9 Ton/Ha (Dirección General de Economía Agrícola y Departamento de Estudios Económicos de la CONAFRUT, 1974).

Estos problemas se han relacionado con estudios climatológicos. El problema del frío consiste en la interrupción de ellas por altas temperaturas que activan la brotación de yemas, adelantan la maduración del fruto y anticipan el desarrollo del follaje, provocando sombras y en el peor de los casos la caída de los frutos. Otras veces, cuando el frío continúa, provoca que las yemas se quemen por congelación (Martin and Chikara, 1972; Ramsay and Martin, 1970; Cartwright, 1973).

VII OBJETIVOS

Para comprender el papel de una fitohormona en el crecimiento de una planta, es indispensable conocer la fluctuación de su contenido endógeno durante el desarrollo. Son las hormonas las que juegan un papel primordial en el desarrollo y si se pretende comprender su mecanismo de acción, es necesario conocer su evolución cuantitativa (Onckelen, 1972).

Los objetivos en este trabajo, son:

a) Evaluar los niveles de citocininas endógenas en yemas de mango de las variedades Golden Delicious y Rome Beauty y su relación con el ciclo de desarrollo en donde se colectaron las muestras, siendo en tres regiones del estado de Chihuahua, como sigue: (figura 2)

Zona:	Cd. Guerrero	Matachic	El Sauz
Variedad:	Golden Delicious	Rome Beauty	Golden Delicious

b) Aplicar una metodología para el estudio de las citocininas naturales en laboratorio

c) Detectar las sustancias con actividad de citocinina o de anticitocinina por medio de bioensayo

d) Cuantificar esta actividad en equivalentes a una citocinina conocida

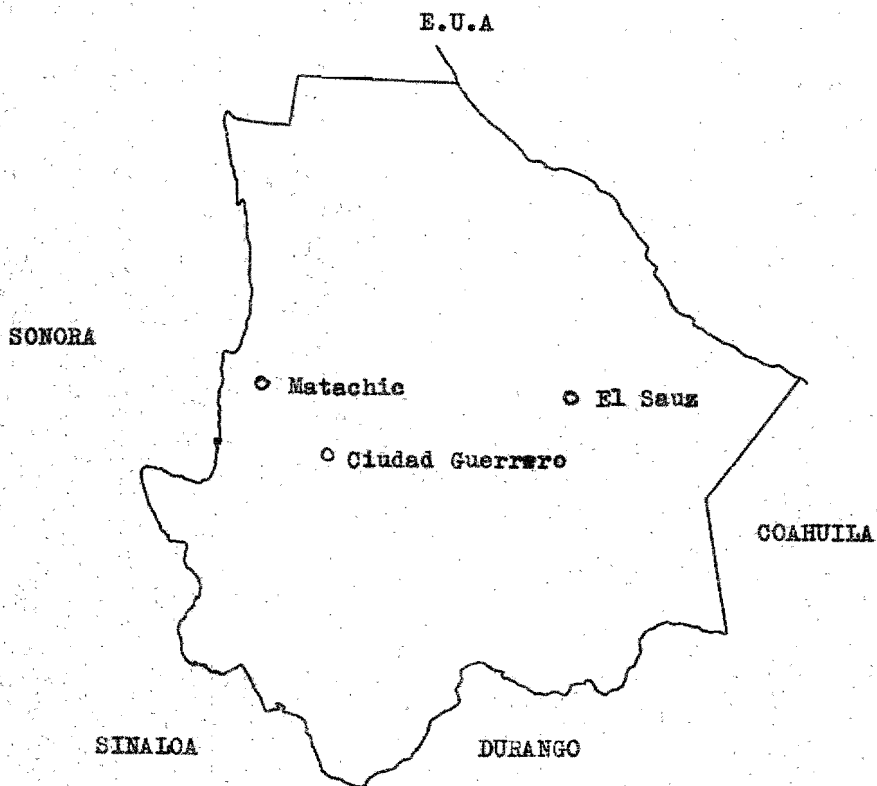


Figura 2.- Mapa del estado de Chihuahua. Se muestran las tres regiones en donde se realizaron los muestreos

e) comparar y discutir los resultados obtenidos de los análisis de yemas de árboles de manzano con y sin problema de brotación en los meses de marzo, abril y noviembre, en diferentes localidades.

VIII MATERIAL Y METODOS

a) Descripción de las variedades Golden Delicious y Rome Beauty en estudio (Esclapon, 1968).

Variedad Golden Delicious (G.D.). El árbol de esta variedad es erguido o semierguido, con una fructificación buena; el follaje es muy abundante, de color verde y un poco marrón; el tronco presenta lenticelas pequeñas, alargadas, muy numerosas, poco visibles y de color claro; las yemas son medianas y triangulares (figuras 3 y 4).

La lámina foliar es grande, alargada, relativamente ancha, con dientes bastante regulares; el pecíolo es mediano, grueso y verde, coloreado de rojo en su cara inferior, y en su base, con estípulas medianas.

Las flores son de color rosa y florecen desde fines de marzo hasta mayo, según clima y altitud (figura 5)

El fruto es grande, alargado, de forma cilindro-cónica el pericarpio es fino, liso, algunas veces rugoso, verde y coloreado de amarillo o de rojo en la parte soleada, con numerosos puntos blancos bien visibles; el cáliz es mediano, inserto en una cavidad ancha, dilatada y regular; la pulpa es blanca-verdosa, fina, tierna, azucarada, poco ácida, dulce y muy jugosa; su calidad es muy buena.

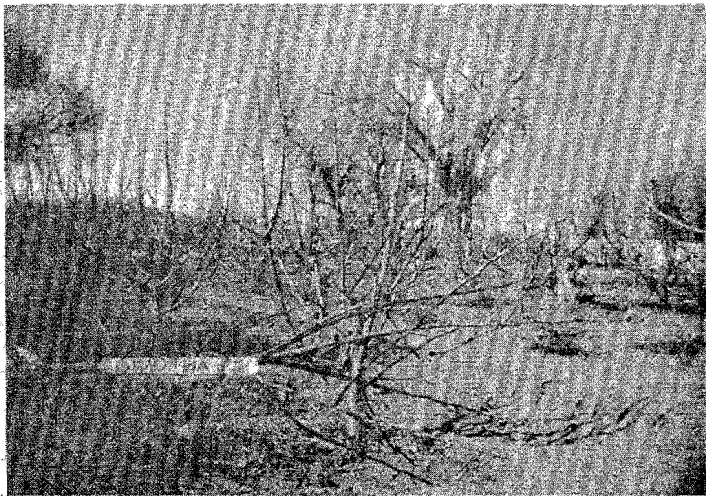


Figura 3.- Arboles de manzano de la variedad Golden Delicious en El Sauz, en los meses de febrero (foto superior) y abril , (foto inferior).



**Figura 4.- Arboles de manzano de la variedad Golden Delicious
en Ciudad Guerrero**



**Figura 5.- Flores y botones del manzano de la variedad Golden
Delicious**

La maduración de recolección es de septiembre a octubre y la de consumo de octubre a marzo.

Esta variedad es muy fértil, de alto valor comercial, y ocupa actualmente el 80% del total de las plantaciones reservadas a las variedades americanas de manzana.

Variedad Rome Beauty (R.B.). El árbol de esta variedad es grande y erguido, con muy buena fructificación; el follaje es de color castaño rojizo. El grosor del tronco, es mediano, presenta lenticelas medianas, muy numerosas, redondas y de color gris claro; las yemas son medianas y de forma triangular.

La lámina foliar es grande y oval; el peciolo es mediano y las estípulas pequeñas y anchas. Las flores son medianas y florecen en la segunda quincena de abril, según el clima y altitud.

El fruto es grande, de forma esférica y muy regular; el pericarpio es grueso de color rojo cereza, volviéndose más intenso con insolación y amarillo verdoso con sombra. El cáliz es pequeño, inserto en una cavidad dilatada poco profunda y regular, el pedúnculo es largo y delgado, y la pulpa es blanca, poco azucarada, ácida, dulce y perfumada, con cierta tendencia a volverse harinosa. Su calidad es bastante buena.

La maduración de recolección es a finales de Octubre y la de consumo es de Diciembre a Febrero.

Esta variedad es muy productiva y se adapta bien a las exigencias de los climas cálidos. Su valor comercial es bastante bueno.

b) Extracción y purificación parcial de las citocininas

El muestreo de las yemas y de la corteza se realizó en los huertos de El Sauz, Ciudad Guerrero y Matachic en el Estado de Chihuahua de distintos árboles escogidos al azar, y colocándo las muestras en frascos ámbar con metanol al 96% para su conservación (Henson and Wareing, 1976).

El trabajo se realizó con las siguientes muestras:

Yemas florales: variedad R.B. procedentes de Matachic, Chihuahua, colectadas el 9 de abril de 1979

- variedad G.D. procedentes de Guerrero, Chihuahua, colectadas el 9 de abril de 1979

- variedad G.D. procedentes de Guerrero, Chihuahua colectadas el 15 de noviembre de 1979

- variedad G.D. procedentes de El Sauz, Chihuahua, colectadas el 13 de noviembre de 1979

Corteza: variedad G.D. procedentes de Guerrero, Chihuahua colectadas 15 días antes de la floración, el 29 de marzo de 1979

- Variedad G.D. procedentes de Guerrero Chihuahua colectadas 8 días después de la floración, el 18 de Abril de 1979.

Uno de los puntos más relevantes en el estudio de las citocininas son los métodos de purificación, pues existen otras sustancias que muestran interferencia en el momento de su cuantificación mediante un bioensayo.

El método se muestra en la figura 6.

Las muestras se homogeneizaron y se filtraron con papel Whatman del No. 3. El filtrado se evaporó al vacío con un rotavapor Büchi a una temperatura $\leq 50^{\circ}\text{C}$ (Jennings , 1969; Henson and Wareing, 1976).

c) Partición líquido/líquido.

Ya eliminado el metanol, el extracto se llevó a un pH de 2.5 con HCl y se dejó reposar durante 24 horas en refrigeración para ser fraccionada posteriormente con éter etílico (4x1 vol), quedando las citocininas en la fracción acuosa, mientras que los componentes neutros y ácidos, entre los cuales se encuentran giberelinas, auxinas, ácido abscísico, etc. quedaron en la fracción etérea (ésta fracción se almacenó para otros estudios de reguladores) (Maheshwari and Gupta, 1967). De la solución acuosa se toma -

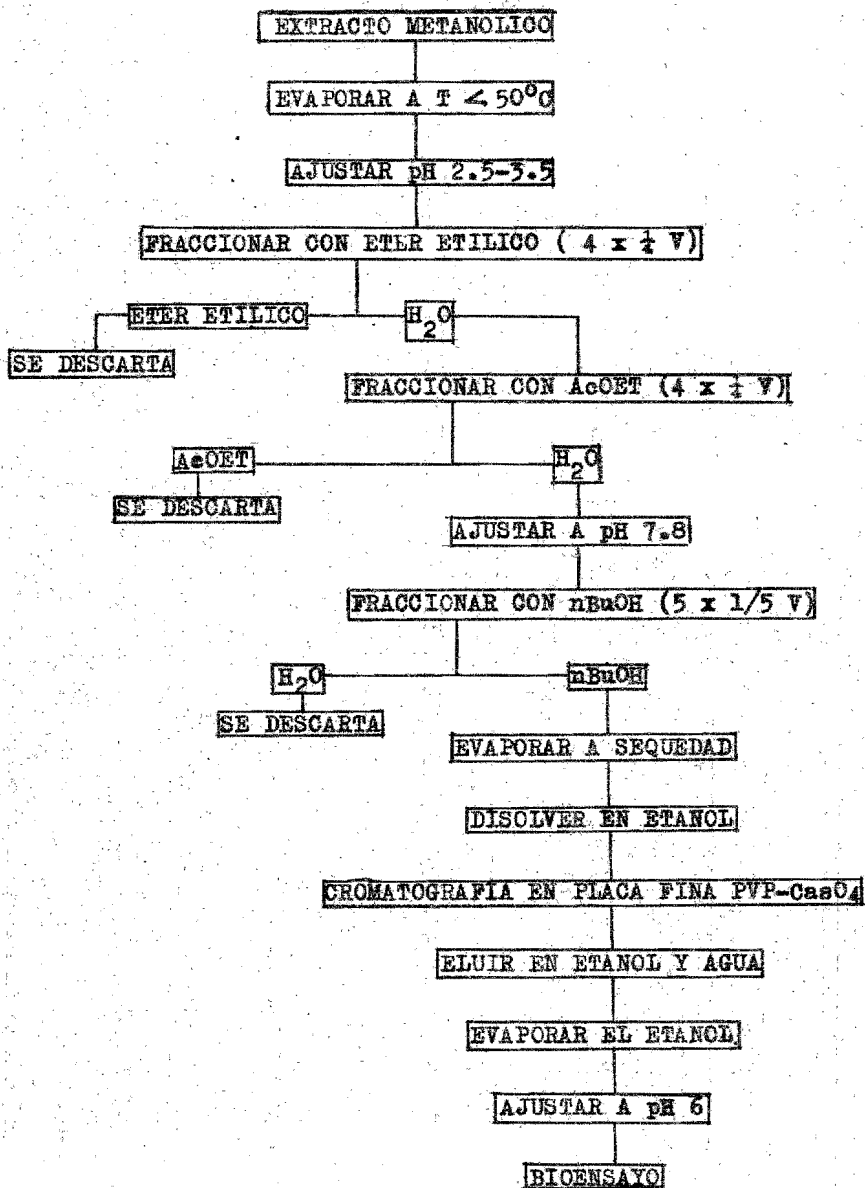


Figura 6.- Diagrama de extracción y purificación de citoquinas a partir de extractos vegetales

ron pequeñas alicuotas para sacar un espectro de UV y asegurarse que en la fracción acuosa efectivamente se encuentran las citocininas, las cuales absorben en una región cercana a 270 nm. (Biddington and Thomas, 1973).

La fracción acuosa se evaporó en el rotavapor nuevamente para eliminar cualquier resto de éter (Miller, 1975). Se llevó a un pH de 7.8 con NaOH y se fraccionó nuevamente con n-butanol (5 x 1/5 vol) (Menhenett and Carr, 1973).

La fracción butanólica contiene a las citocininas; esto se llevó a sequedad total con el rotavapor; el sólido fué disuelto en una cantidad mínima de metanol y se aplicó a cromatoplasmas de polivinil-pirrolidona - sulfato de calcio (Biddington and Thomas, 1973; Glenn, et al., 1972; Thomas, et al., 1975).

d) Cromatografía

Por las características de los extractos y los objetivos para este trabajo se seleccionó la cromatografía en capa fina con polivinil-pirrolidona-sulfato de calcio (PVP-CaSO₄.2H₂O).

En la cromatografía se utilizaron placas de vidrio de 20 x 20 cm; a cada una se le agregó 25 g. de una pasta de PVP-CaSO₄.2H₂O (40 : 100 peso/peso), disuelto en 55 ml. de agua destilada (Thomas et al., 1975)

Debido a que pH del sistema de solventes para desarrollar la cromatografía tiene una gran influencia en la formación de puentes de hidrógeno entre el PVP y las sustancias del extracto (Biddington and Thomas, 1976), se llevó un control del pH. Como sistema de disolventes se usó una solución amortiguadora (KH_2PO_4 0.013 M) a pH 6.4 con acetona al 25% (Thomas et al, 1975); esta mezcla mueve a las citocininas al centro de la placa. Aún cuando las sales de fosfato son empleadas a baja molaridad, pueden representar un problema en el bioensayo como se discutirá al final.

El extracto se aplicó con micropipetas y las placas se introdujeron en cajas herméticas de vidrio con la mezcla de disolventes; se desarrollaron en la oscuridad alrededor de 3 ó 4 horas hasta que el frente del solvente llegó unos 2 cm. abajo del extremo de la placa. Después se secaron y se observaron bajo luz UV para revelar y separar los productos de cada banda, los cuales se eluyeron con etanol al 70% caliente, se filtraron y se llevaron al rotavapor (Thomas et al , 1975).

e) Bioensayo

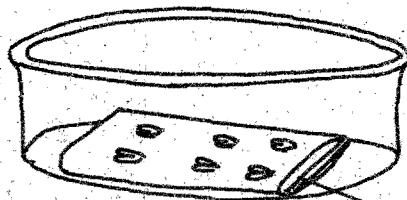
En este trabajo se utilizó una citocinina sintética para la curva patrón: la 6-bencil-amino purina (BA), obtenida comercialmente de Nutritional Biochem Co. debido a que se reporta en varios trabajos (Dumbroff and Brown, 1976), y a su fácil obtención.

Para el bioensayo se pusieron a germinar semillas de

de la variedad Cherry Belle (obtenidas en PRONASE) en la oscuridad durante 48 horas a una temperatura de $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$, verificando la humedad a las 24 horas (Bentley and Reid, 1968) a cada plántula se le extrajo el cotiledón interno y se pusieron en lotes de 6 cotiledones en cajas de petri sobre portaobjetos cubiertos con papel filtro (figura 7); se les agregó 1.5 ml. del extracto y 1.5 ml. de la solución amortiguadora a pH 5.8 - 6.0. Se hicieron lotes de 4 cajas con concentraciones diferentes. La curva de RA se realizó con concentraciones desde 0.5 mg/lt hasta 10 mg/lt (Dumbroff and Brown, 1976; Letham, 1972).

Las cajas se cerraron y se acomodaron al azar en una cámara de condiciones controladas bajo luz continua y temperaturas de $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$, haciendo lecturas del peso fresco de cada lote a los tres y cinco días (72 y 120 horas respectivamente). Durante estos lapsos se les agregó a todas las cajas 2 ml. de agua destilada en dos dosis.

Las citocininas, como promotores del crecimiento, actúan a nivel celular, y por ello otro parámetro de actividad es la medición celular al microscopio; para ello se prepararon laminillas de cortes transversales de los cotiledones de la curva de RA de uno de los bioensayos (Pearson and Robertson, 1952) a los 5 días y se montaron con la técnica de verde rápido. Se tomaron medidas en 43x con ocular de 10x considerando el diámetro más grande de la célula visto en -

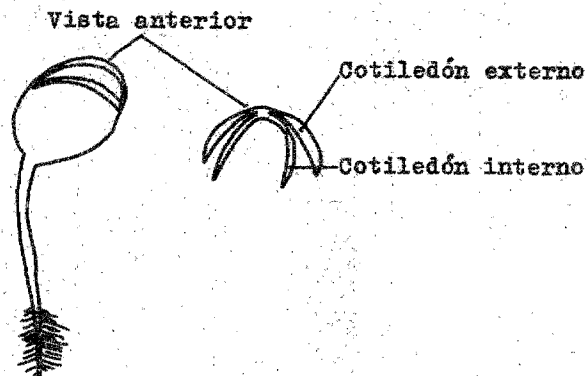


Das placas de vidrio
envueltas en papel
filtro



Nivel de la solución
en la caja

Caja con un lote de cotiledones



Plántula de rábano

Figura 7.- Diagrama de caja y cotiledones utilizados en el bioensayo

plano paralelo al objetivo del microscopio. Se utilizó un ocular de campo grande de relación calibrado con un milímetro dividido en 100 fracciones de 10 micras, todo el equipo Karl Zeiss Jena. Se eligieron diez células al azar, que se midieron y se obtuvo el diámetro promedio.

Para observaciones de rugosidad y distribución de pigmentación se utilizó una lupa de disección.

IX RESULTADOS

En un bioensayo se observó que en la curva de BA (figura 8B y 8D) se generó el mayor crecimiento a la concentración de 4 mg/lt, y el mínimo con 8 y 10 mg/lt aún por debajo de la línea testigo, como se ve claramente en las figuras 8A y 8C. Esta línea testigo es una útil referencia para los histogramas y para determinar si hay crecimiento, o inhibición; sin embargo se considera que crecimientos muy cercanos a esta línea en realidad no son diferentes, sino producto de desviación del bioensayo, debido a algunos factores que se discutirán más adelante. (figura 8C).

En la muestra de corteza 15 días antes de la floración (figura 9), se nota una ligera actividad en los Rf 0.54 a la concentración aproximada de 2 mg/lt (figura 9A) y en el 0.66 a la concentración de 8 mg/lt (figura 9B) a los tres días del bioensayo; en la evaluación a los cinco días se alcanza a notar con 2 mg/lt actividad en los Rf 0.54 0.66 y 0.84 (figura 9C), y con 8 mg/lt en los Rf 0.54 y 0.66 (figura 9D). La máxima inhibición se observó en el Rf 0.06 para todos los casos.

La muestra de corteza 8 días después de la floración (figura 10) demostró que en ninguna de las dos concentraciones probadas hubo actividad, y en cambio se nota la

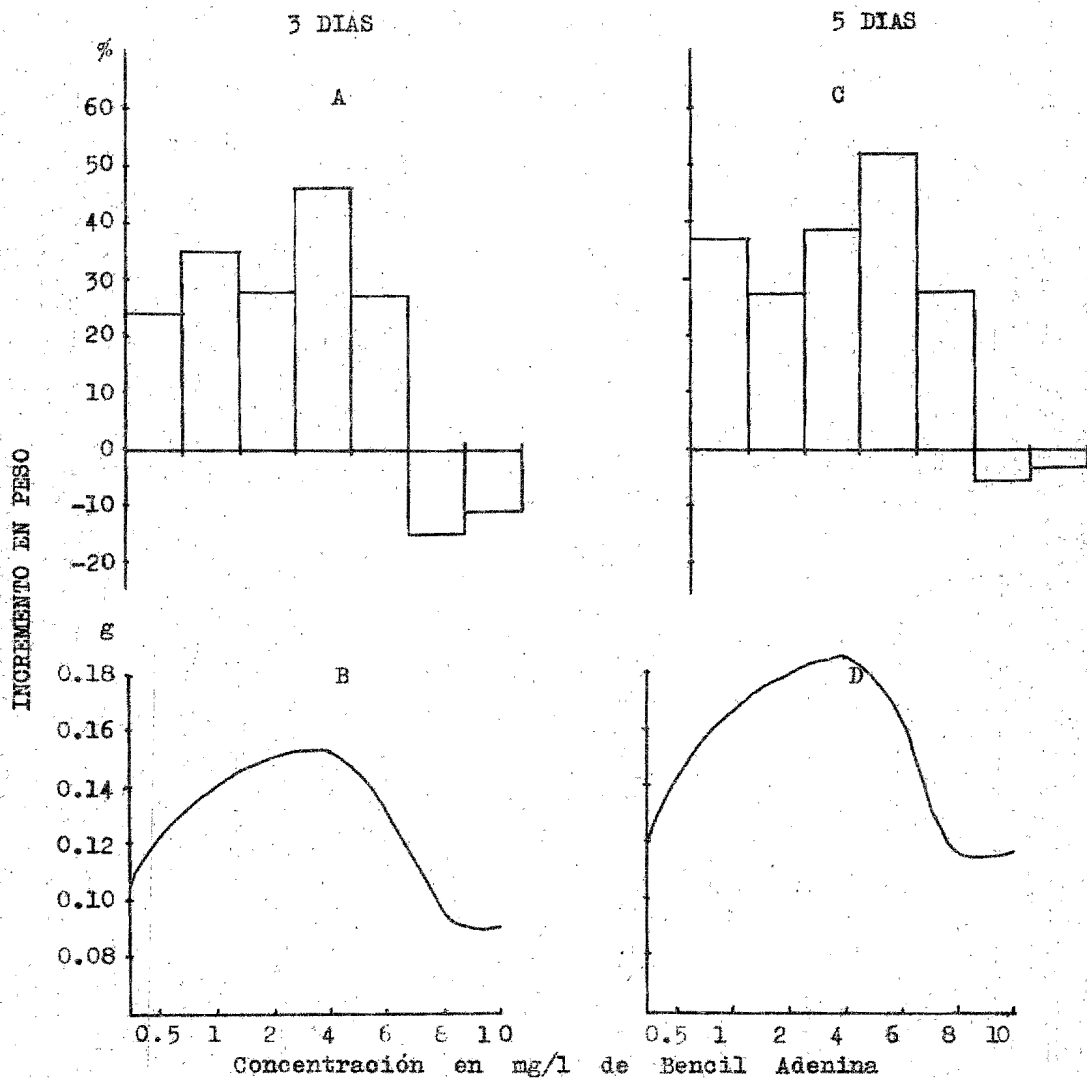


Figura 8.-Curva de BA. En A y C se presentan histogramas de porcentaje de incremento en peso como respuesta a la concentración de BA; B y D son curvas correspondientes a su figura superior en donde el valor del incremento de peso se tomó en gramos. Los valores en A y B fueron tomados a las 72 hrs. y C y D a las 120 hrs. del bioensayo.

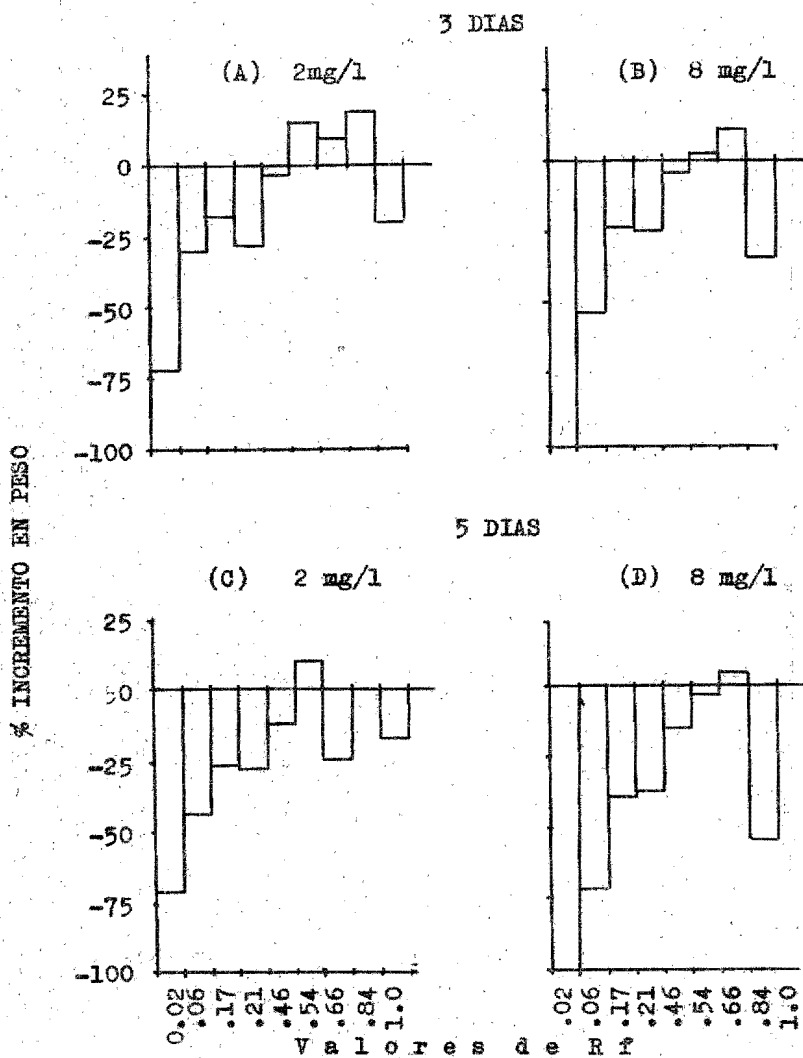


Figura 9.--Resultados obtenidos a los 3 y 5 días de bioensayo para la muestra de corteza de manzano var. Golden Delicious colectada 15 días antes de la floración en Cd. Guerrero Chih. Las concentraciones hipotéticas se señalan al calce de cada histograma

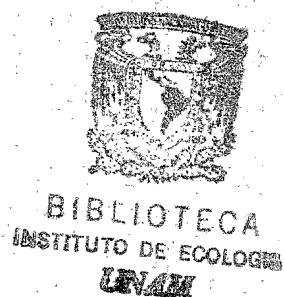
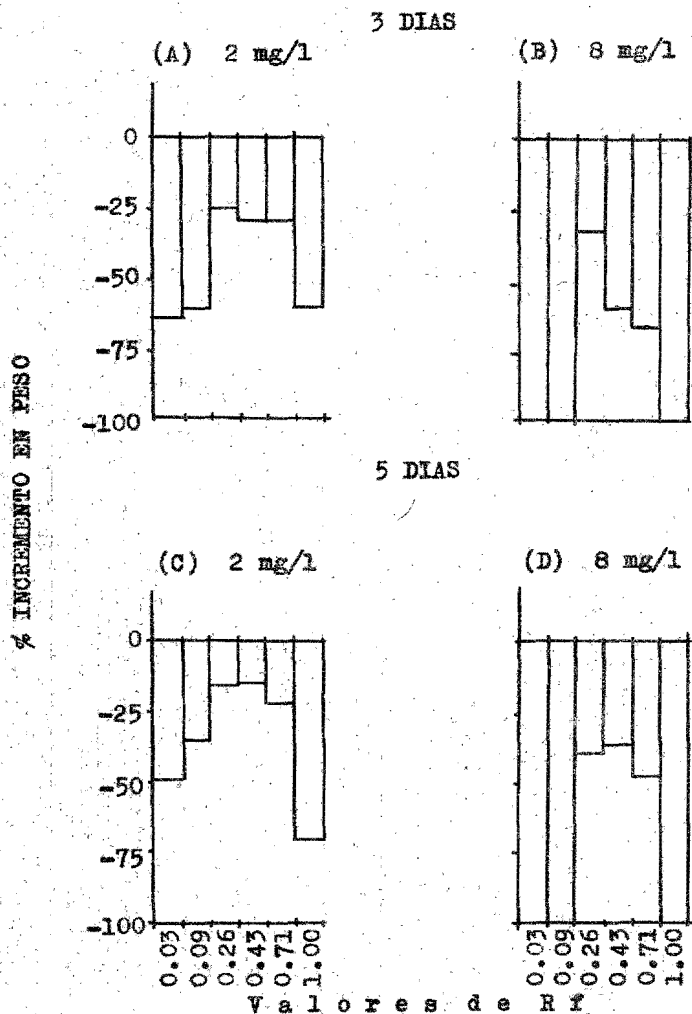


Figura 10.-Resultados obtenidos a los 3 y 5 días de bioensayo para las muestras de corteza de manzano var. Golden Delicious colectada 8 días después de la floración en Cd. Guerrero, Chih. Las concentraciones hipotéticas se señalan en cada histograma.

gran inhibición que se presenta en los Rf cercanos a cero y a uno; en los Rf medios hay menos inhibición, pero no llega siquiera a igualar la actividad del testigo. En la concentración de 2 mg/lt (figura 10 A y 10 C), sin embargo, se nota menor inhibición que en la de 8 mg/lt (figura 10 B y 10 D), llegando a una inhibición del 100% en los Rf 0.03 0.08 y 1 (figura 10B y 10D) tanto en la lectura a los tres días como en la de cinco días, fenómeno que también se presentó en la muestra de corteza de 15 días antes de la floración a la misma concentración para el Rf 0.02 (figura 9B y 9D).

En otro bioensayo se encontró el punto máximo a la concentración de 3 mg/lt en la curva de BA (figura 11B y 11D), tanto en la lectura de tres días como en la de cinco días. Sin embargo, hubo una pequeña diferencia, y es que a los tres días la concentración de 9 mg/lt estuvo muy cercana a la línea del punto testigo (figura 11A), mientras que a los cinco días ésta misma concentración mostró un crecimiento 10% arriba del testigo (figura 11C). El fenómeno de inhibición se volvió a repetir en concentraciones altas.

En la muestra de El Sauz (figura 12), se observó que a los tres días, bajo la concentración de 0.2 mg/lt no hubo crecimiento relativo (figura 12A-y 12 D) al igual que en la concentración de 8 mg/lt, sin embargo no se observó

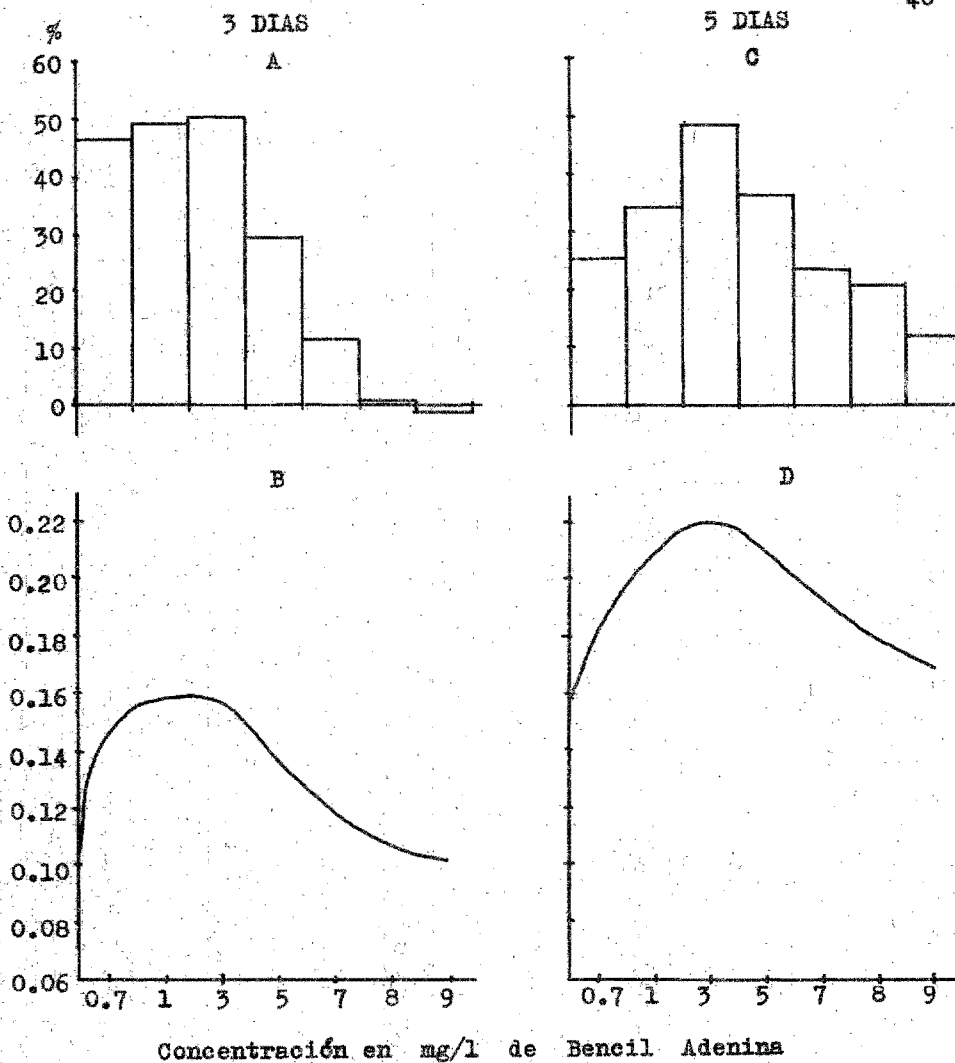
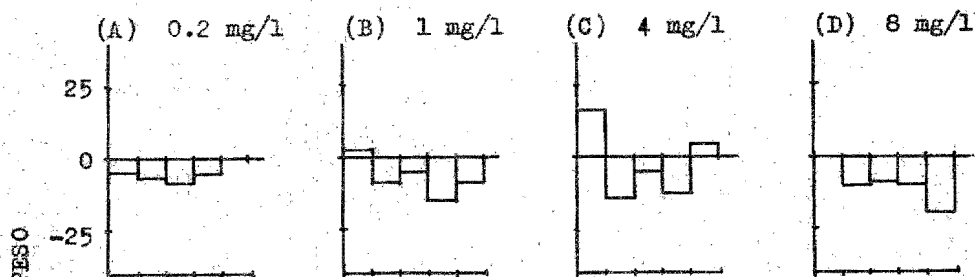


Figura 11.-Curva de BA. En A y C se presentan histogramas de porcentaje de incremento en peso como respuesta a la concentración de BA; B y D son curvas correspondientes a las figuras superiores, tomando el valor del incremento de peso en gramos.

3 DIAS



5 DIAS

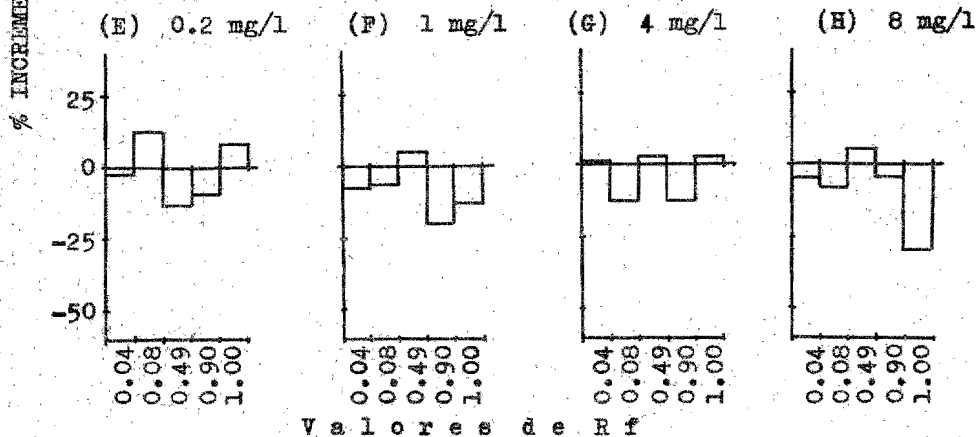
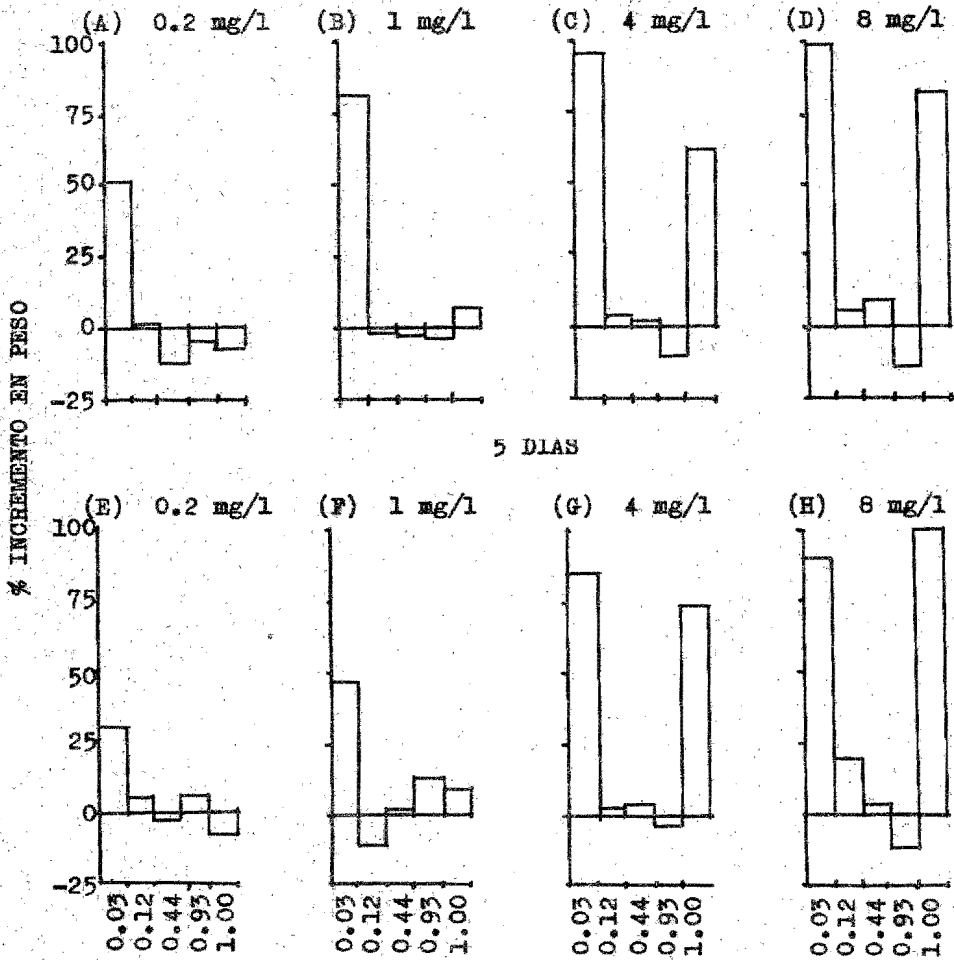


Figura 12.- Resultados obtenidos a los 3 y 5 días de bioensayo para la muestra de yemas florales de manzano var. Golden Delicious colectada durante el mes de noviembre en un huerto de El Sauz, Chih. Las concentraciones hipotéticas se señalan en cada histograma.

una inhibición fuerte. En la figura 12B para la concentración de 1 mg/lt se nota una ligera actividad en el Rf 0.04, pero casi insignificante. En la concentración de 4 mg/lt, (figura 12C) se detectó una mayor actividad, manifestándose ésta en los Rf de los extremos (0.04 y 1). Por lo que respecta a las lecturas de los cinco días se notó un ligero incremento en la actividad en varias concentraciones, pero sólo en algunos Rf, en tanto que en otros, en varias concentraciones se hace más patente una inhibición como es el caso de las concentraciones 1 y 8 mg/lt (figura 12F y 12H). En la figura 12E para la concentración de 0.2 mg/lt, se encontró la única actividad más o menos clara. Para las concentraciones de 1 y 8 mg/lt (figura 12F y 12H respectivamente), se observó un ligero desplazamiento de la actividad de los Rf del centro, mientras que la inhibición se presenta aparentemente más hacia los extremos, situación no encontrada en las concentraciones de 0.2 y 4 mg/lt (figura 12E y 12G), aunque bien podría tomarse esta actividad relativa como una desviación del procedimiento. Para esta misma lectura se encontró en la concentración de 8 mg/lt la tasa de inhibición más alta en el Rf 1 (figura 12H).

En la muestra de yemas variedad G.D. de Guerrero (figura 13), se encontró en todos los casos, mayor actividad en el Rf 0.03, excepto en el caso de la lectura de cinco días, concentración de 8 mg/lt (figura 13H); asimismo para



VALORES DE Rf

Figura 13.-Resultados obtenidos a los 3 y 5 días de bioensayo para la muestra de yemas florales de manzano var. Golden Delicious colectada durante el mes de noviembre en un huerto de Cd. Guerrero, Chih. Las concentraciones hipotéticas se señalan en cada histograma.

todos los casos en los Rf 0.12 0.44 y 0.93 se encontró un balance de actividad cercano a cero. En el caso de las concentraciones de 0.2 y 1 mg/lt el Rf1 no presentó actividad (figura 13A, 13B, 13E y 13F). Es notorio también que al igual que la muestra de El Sauz, las yemas de G.D. de Guerrero casi no presentan actividad inhibitoria.

Con respecto a la medición del tamaño celular (figura 14), se encontró que las mayores dimensiones celulares están asociadas junto con los incrementos en peso en la curva de BA a la concentración de 3 mg/lt (figura 14A y 14B), hacia ambos extremos de la curvase encontró una tendencia a la disminución del tamaño celular.

En otra curva de BA (figura 15), se encontró nuevamente el pico más alto de actividad en la lectura a los tres días, localizada en la concentración de 3 mg/lt de BA; sin embargo, a los cinco días el punto más alto se desplazó a los 5 mg/lt.

En los histogramas de la muestra de yemas variedad G.D. de Guerrero del mes de abril (figura 16 y 17) se encontró algo notable: en la lectura de tres días, casi no hubo inhibición, aún cuando la actividad estuvo muy repartida. A los cinco días se observa una actividad de crecimiento muy heterogéneo (figura 16C, 16D, 17C y 17D), observándose una ligera inhibición en las concentraciones de 1, 5 y 7 mg/lt

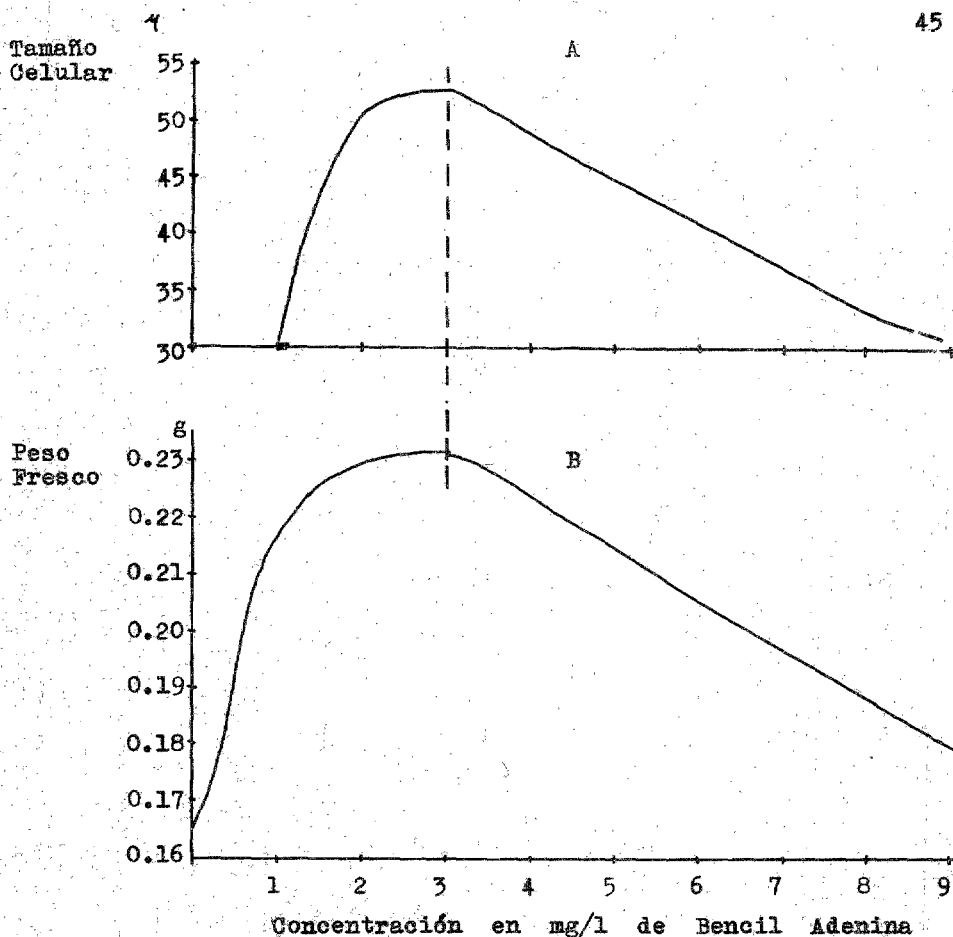
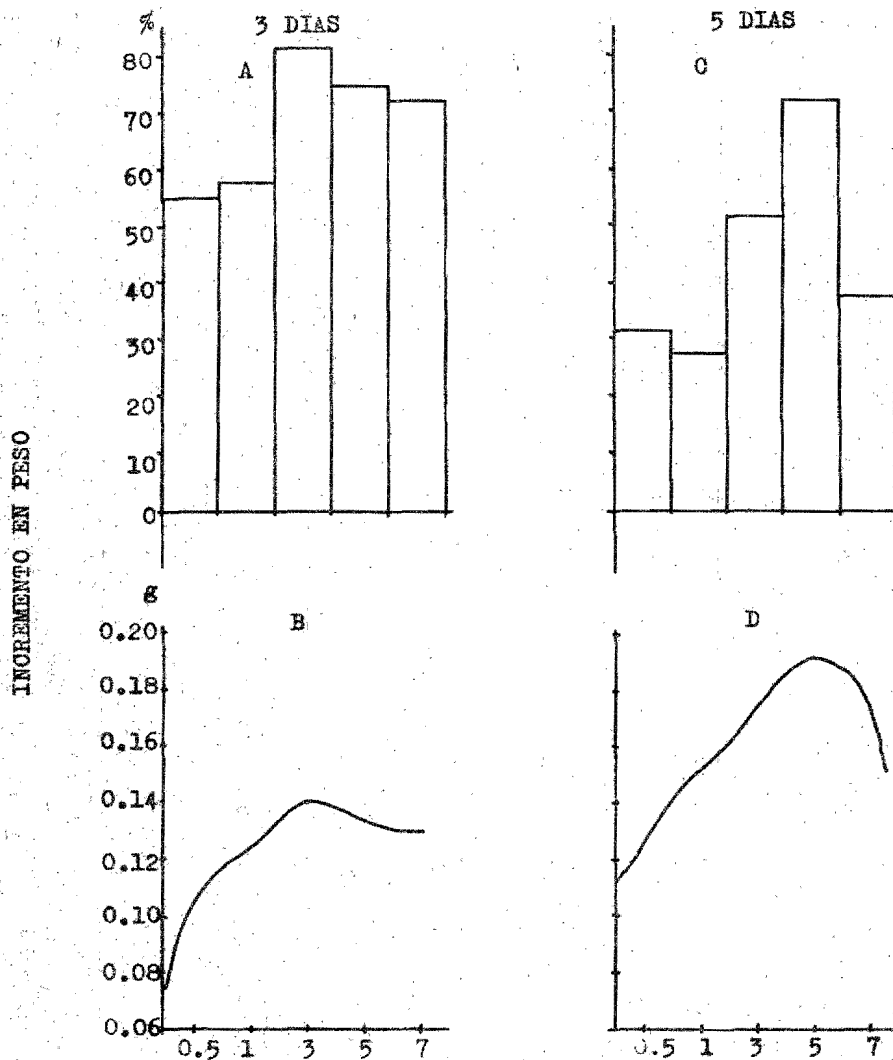


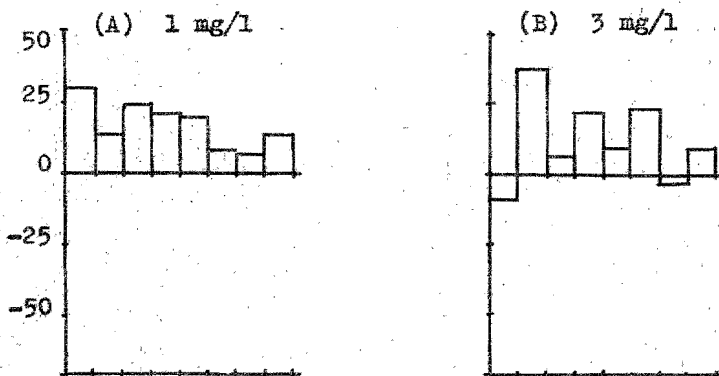
Figura 14.- Medición al microscopio. La curva A de tamaño celular relacionado vs concentración de BA tiene una forma muy similar a la curva B en donde el crecimiento está medido como peso fresco. Se ve también claramente que el máximo para ambas curvas (3mg/l BA) es el mismo.



Concentración en mg/l de Bencil Adenina

Figura 15.- Curva de Bencil Adenina. En A y C se presentan histogramas de porcentaje de peso fresco incrementado como respuesta a la concentración de BA; B y D son curvas correspondientes a las figuras superiores en donde el incremento de peso se tomó en gramos.

3 DIAS



5 DIAS

% INCREMENTO EN PESO

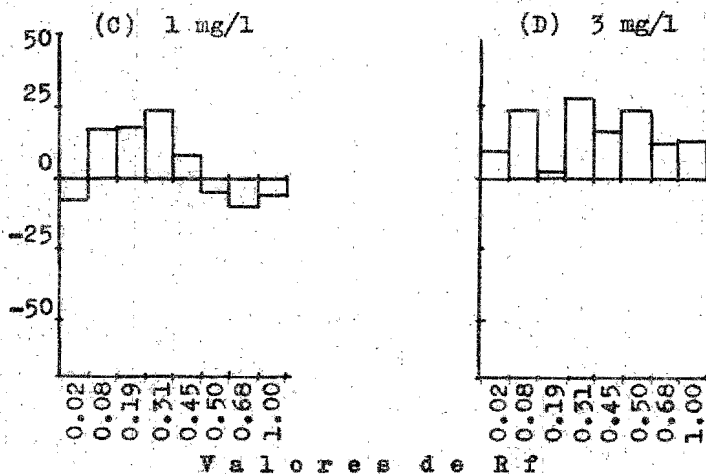


Figura 16.-Resultados obtenidos a los 3 y 5 días de bioensayo para la muestra de yemas florales de manzano var. Golden Delicious colectada en el mes de abril en Cd. Guerrero Chih. Las concentraciones hipotéticas se señalan en cada histograma.

3 DIAS

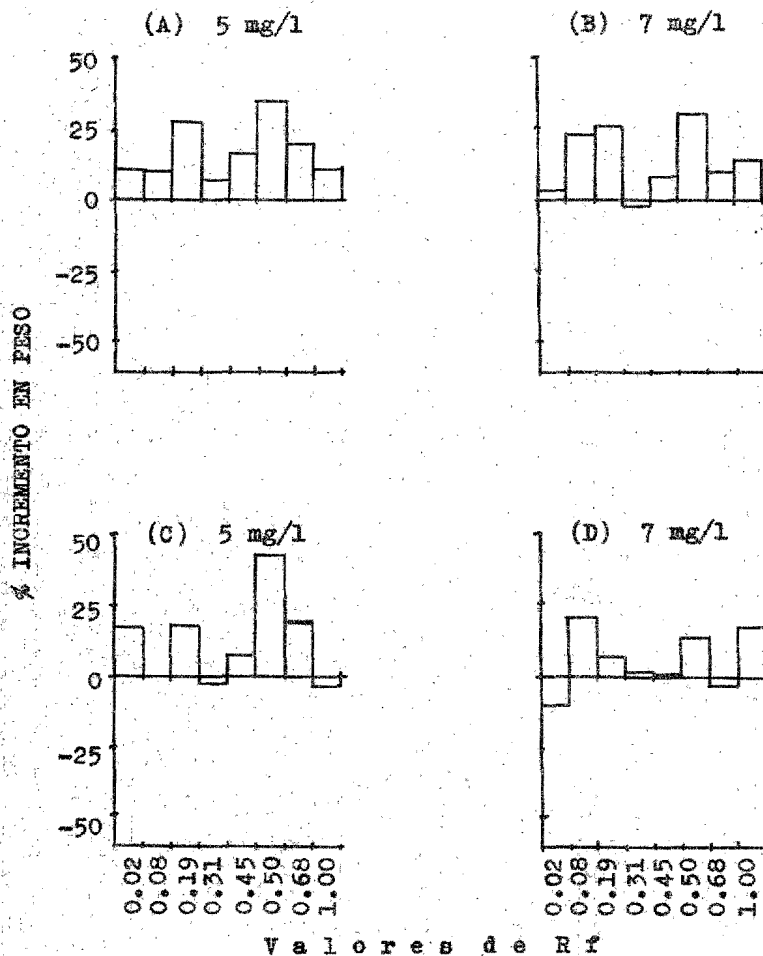


Figura 17.-Resultados obtenidos a los 3 y 5 días de bioensayo para la muestra de yemas florales de manzano var. Golden Delicious colectada en el mes de abril en Cd. Guerrero Chih. Las concentraciones hipotéticas se señalan en cada histograma.

(figura 16C, 17C y 17D), así como también se nota una ligera tendencia de la actividad hacia el centro.

En la última curva de BA que se realizó (figura 18) , se encuentran grandes diferencias entre las lecturas de tres y cinco días, pues a los tres días, concentración de 5 mg/lt (figura 18B) se presentó la máxima promoción, mientras que a los cinco días para esta misma concentración se encuentra un escalón (figura 18D) y, en general, un comportamiento menos predecible, llegando a tener inhibición a la concentración de 0.5 mg/lt de BA.

En la muestra de yemas de Matachic de la variedad R.B. (figura 19), se encontró que la más baja concentración en las dos lecturas presentó únicamente inhibición (figura 19A y 19D), llegando ésta a un máximo de 70% en el Rf 1 a los cinco días del bioensayo (figura 19D). Para la concentración de 3 mg/lt (en donde se extravió el resultado del Rf 0.03) para los Rf medios hubo promoción, aún cuando el Rf 1 también se presentó una inhibición (figura 19B y 19E). Para la más alta concentración (5 mg/lt), se encontró mayor heterogeneidad, pues a los tres días el Rf 0.45 mostró inhibición, mientras que los otros tres Rf mostraron promoción (figura 19 C y 19F). A los cinco días para esta misma concentración, se observó lo contrario, pues solo el Rf 0.06 presentó promoción (figura 19F).

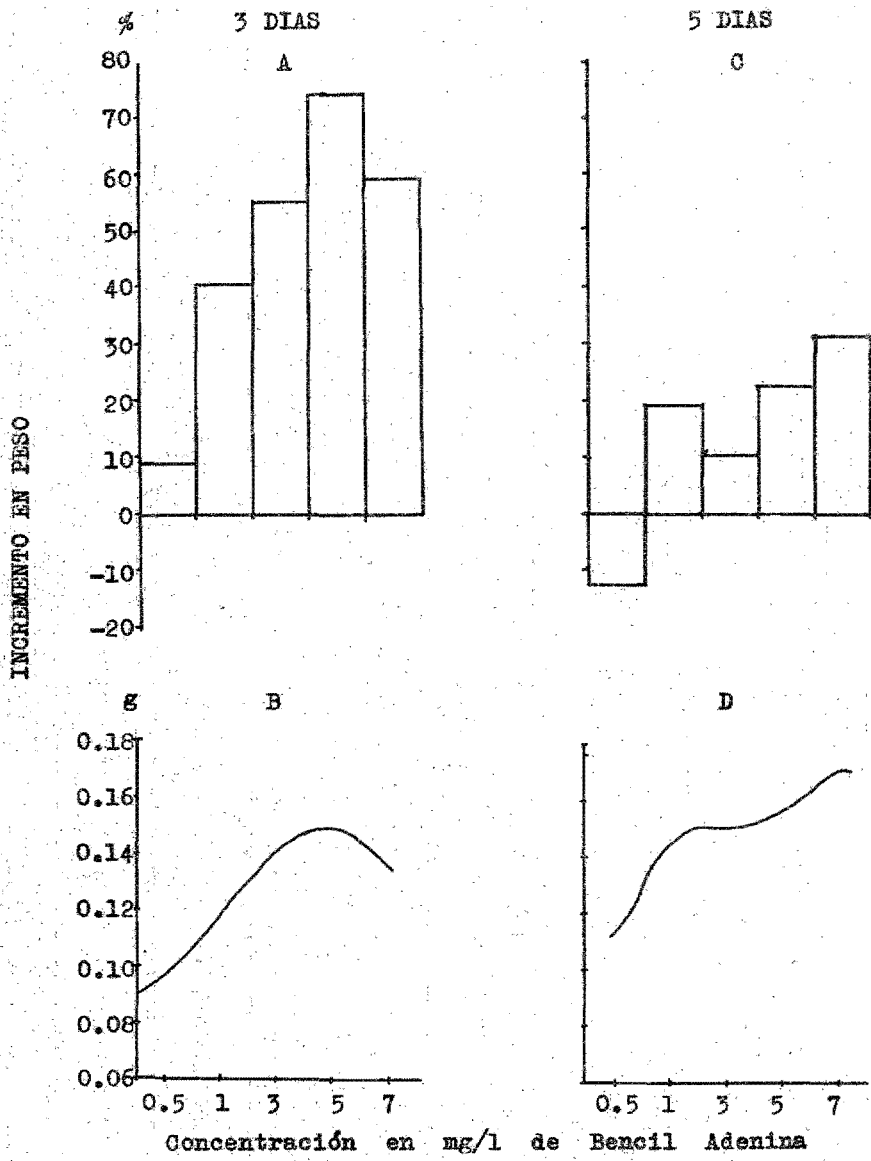


Figura 18.-Curva de BA. En A y C se presentan histogramas de porcentaje de incremento de peso fresco como respuesta a la concentración de BA; B y D son curvas correspondientes a las figuras superiores en donde el incremento de peso se tomó en gramos.

% INCREMENTO EN PESO

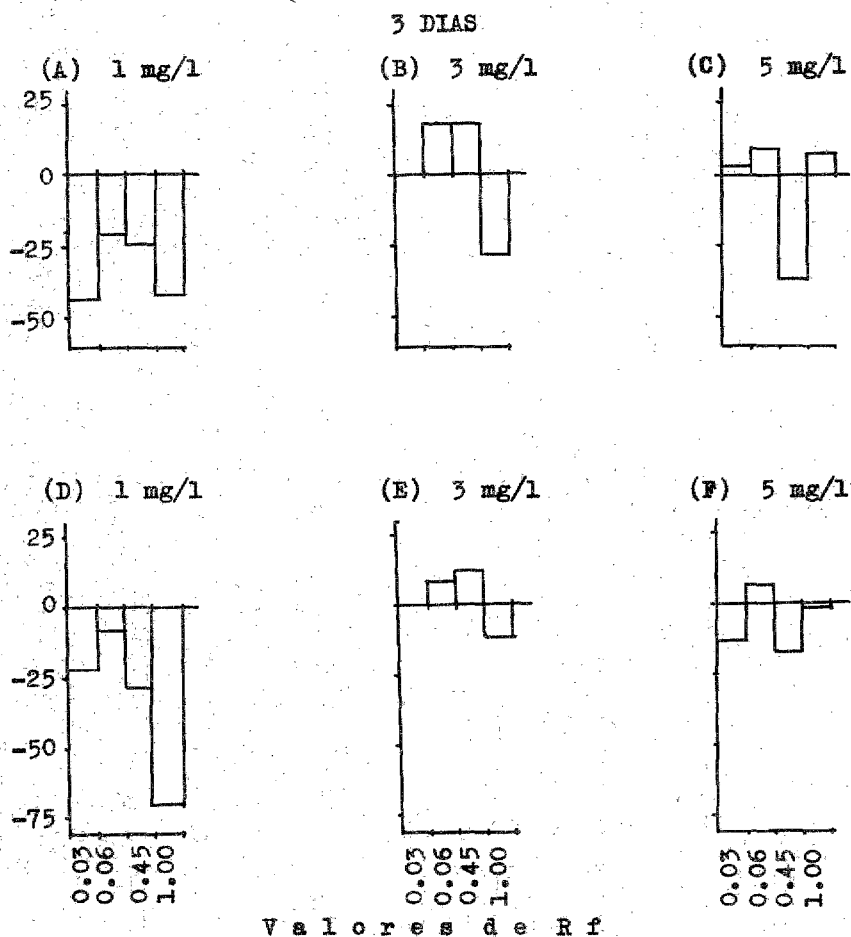


Figura 19.-Resultados obtenidos a los 3 y 5 días de bioensayo para la muestra de yemas florales de manzano var. Rome Beauty colectadas al inicio de la floración en un huerto de la región de Matachic Chih.

Nota.-las dos bandas faltantes en los histogramas de la concentración de 3 mg/l se perdieron al trabajar.

X DISCUSION

Es importante hacer notar los costos que implican los muestreos de yemas de manzano, puesto que los sitios de brotación son fijos, y al muestrear una yema se deja un hueco en la productividad del árbol. Por tanto, al realizarse un trabajo de este tipo, se debe llevar al máximo el aprovechamiento de la muestra. Por esta razón el número y tamaño de muestras con que se trabajó fué limitado.

Para tener seguridad en los resultados fué muy importante poner a las muestras en metanol y protegidas de la luz para evitar la acción de enzimas y de microorganismos, así como la oxidación de la muestra por acción de la luz (Henson and Wareing, 1976).

Ya que algunos autores reportan el uso de temperaturas no mayores de 50°C, logrando así buenos resultados, la temperatura en el rotavapor para reducir el volumen del extracto fué menor a 50°C evitando así su descomposición. (Henson and Wareing, 1976).

Durante la extracción se tuvo que recurrir en varias ocasiones a cambios de pH con HCl y NaOH, por lo cual se agregaba al extracto elementos de los que no se reporta en la literatura ningún efecto de citocinina en el bioensayo probado.

La partición líquido/líquido se utilizó debido a las características de la diferente polaridad a pH's específicos, de las sustancias presentes en los extractos, y al coeficiente de partición de estas sustancias en los diferentes solventes. Así pues, el éter a pH ácido elimina sustancias neutras y poco polares como las clorofilas, giberelinas, auxinas y ácido abscísico; el acetato de etilo elimina otras giberelinas más polares y el n-ButOH a pH 7 disuelve a las citocininas, en especial a la Zeatina y a su ribósido (Onckelen, 1972).

Una de las dificultades del trabajo analítico de reguladores del crecimiento es la pureza requerida, pues es importante que no haya interferencia entre reguladores, ya que sus efectos se contraponen en ciertos casos (Hill, 1977), para en un momento dado establecer en la planta un sistema homeostático funcional. Cuando se realizan pruebas biológicas los efectos buscados pueden ser enmascarados y aún inhibidos por interacción entre reguladores; es por ello que se están probando y modificando constantemente los tipos de cromatografía, pues no existe aún un método establecido y aceptado universalmente para el uso de purificación de hormonas. Las citocininas no son la excepción, por lo que se están utilizando varios tipos de cromatografía, como columnas de intercambio iónico (Koshimizu, et al, 1977), cromatografía de capa fina (Glenn, 1972; Thomas, et al, 1975), cromatografía líquido/líquido a altas presiones (Tudor, et al ,

1975). Tal vez al hacer innovación de equipo y avances tecnológicos sea posible establecer una metodología específica para la purificación de hormonas vegetales.

Para las finalidades de este trabajo es importante señalar que la pureza de los productos de cromatografía con PVP es suficiente, pues aún cuando las técnicas químicas exigen la mayor pureza para evitar interferencias en estudios espectroscópicos (UV), en el bioensayo estas interacciones no ocurren (Glenn, et al, 1972).

Para la cromatografía en capa fina se utilizó polivinil-pirrolidona - sulfato de calcio, pues el PVP forma puentes de hidrógeno con fenoles, separándose de esta manera algunos inhibidores (Glenn, et al, 1972). El pH del solvente de la cromatografía tiene una gran influencia en la cantidad y calidad de la formación de puentes de hidrógeno entre el PVP y la fitohormona. Como se trabajó a un pH de 6.4 las citocininas quedaron separadas en un grupo aislado de los fenoles y sales; de haberse necesitado separar bases libres de sus ribósidos hubiera sido necesario correr otra cromatografía a pH's diferentes (Glenn, et al, 1972).

Algunos autores indican que en este tipo de cromatografía no existe la posibilidad de degradación de las citocininas, como puede suceder durante la separación de cromatografía.

tografía en columna con intercambio iónico (Thomas, et al, 1975). Otra ventaja el PVP es que sólo se utilizan soluciones amortiguadoras muy débiles (0.013 M de KH_2PO_4); la importancia de esta sal en la muestra y su posible interferencia se discute más adelante.

De acuerdo con los objetivos de este trabajo se consideraron otras formas de evaluación de la respuesta, basada en la morfología, pigmentación y organografía. Todas estas evaluaciones dan respuestas de una gran complicación, producto de interacciones que no permiten confiabilidad, es decir, que debido a que los cotiledones del rabanito tienen su propio metabolismo los resultados son confusos (Hill , 1977).

Otra forma de evaluación se basa en el incremento de la división celular, lo que da por consecuencia un mayor número y tamaño celular. Esta forma se ha utilizado como un refuerzo para apoyar criterios, pero resulta complicada (Pearson and Robertson, 1952).

En este trabajo se ensayó con una curva de RA, coincidiendo las máximas dimensiones celulares con la concentración que dió mayor respuesta en la curva evaluada por el incremento en el peso fresco (figura 1^a pero como la medición de la expansión celular es un proceso muy laborioso y proporciona la misma información que el de peso fresco, se des

cartó. En el bioensayo se consideró que la forma más precisa de evaluación fué el parámetro del peso fresco, pues se obtiene una respuesta numérica. No obstante, con esta respuesta se presentan desviaciones debidas a variaciones en la humedad del cotiledón al momento de ser pesad^o; también se pudieron dar diferencias debido a que no hay una uniformidad 100% de la semilla al ser seleccionada para germinación.

La utilización de la solución de fosfato de potasio como amortiguadora en este bioensayo, puede interpretarse como un problema, puesto que tanto el potasio como el fósforo, forman parte estructural de ácidos nucleicos y fosfolípidos y pueden causar una interferencia. En este caso se metieron junto con las muestras del extracto, lotes de cotiledones - testigo que contenían únicamente solución amortiguadora y agua (asimismo, el problema se eliminó al haber evaluado una curva patrón en todos los bioensayos). Así también por tratarse de un estudio comparativo el error es sistemático (Bidwell, 1974).

El hecho de utilizar corteza en este trabajo es un punto muy discutible, ya que no ha sido reportada presencia de citocininas en corteza (Henson and Wareing, 1976), pero si se considera que este trabajo pretende seleccionar y montar una metodología, el estudio de esta muestra se justifica; además se encontraron resultados que arrojan resultados in-

terresantes, pues 15 días antes de la floración, se encontró menos inhibición y más promoción que en la muestra de 8 días después de la floración. Khan, en 1971, propuso que un incremento en niveles de citocininas puede superar los efectos de inhibidores endógenos y llegar a tener un papel importante bajo condiciones naturales en la interrupción de la latencia. Si la hipótesis de Khan es correcta, y debido a que el frío produce un efecto acumulable, la concentración de citocininas debe incrementarse en los brotes un poco antes de que los requerimientos mínimos de frío se satisfagan, es decir, un poco antes de la floración (Dumbroff and Brown, 1976). Probablemente la corteza no sea un tejido adecuado para aseverar esta hipótesis, pero todo parece indicar que esta hipótesis es correcta (Pearson and Robertson, 1952).

La curva de BA (figura 11) presentó su mayor actividad a la concentración de 3 mg/lt, situación muy similar a la figura 8, en donde la concentración de 4 mg/lt fué la óptima para el mayor crecimiento. Algunos autores (Dumbroff and Brown, 1976), reportan que la BA promueve el crecimiento en el rango de 0.01 a 1 mg/lt e inhibe a concentraciones de 10 mg/lt. En este trabajo, y debido a que fué repetitivo, el punto de 3 mg/lt fué el que produjo el crecimiento mayor, como se puede observar en las curvas de BA (Figuras 8, 11, 15), y no muy claramente en la figura 18. Asimismo se puede notar toxicidad a altas concentraciones (8, 9 y 10

mg/lt).

En las muestras de G.D. de El Sauz y de Guerrero colectadas en noviembre, se encontró una notable diferencia (cabe recordar que El Sauz es una zona inadecuada para la variedad G.D.), ya que las muestras de Guerrero generaron una fuerte promoción. Es importante analizar aquí la presencia de estas citocininas en estas zonas durante el mes de noviembre, cuando el período de latencia aún no se ha iniciado. Sin em bargo, no hay que olvidar que las citocininas tienen varias funciones además de romper la latencia, y debido a que el manzano es un árbol caducifolio, durante su latencia requiere de sustancias nutritivas almacenadas como almidones y lípidos, por lo que se puede relacionar con la presencia de citocininas (Hill, 1977).

Otra característica es que los inhibidores observados en este trabajo sólo están presentes durante la latencia. Una de las razones para que no se observe inhibición podría ser una especie de balance en la síntesis proteica y que el efecto del promotor en este caso aculte por completo la acción de los inhibidores (Dumbroff and Brown, 1976). El mecanismo de esto se presenta como la incorporación de aminoácidos en proteínas, lo cual colabora con el desarrollo de la planta (Richmond and Lang, 1957).

En los dos primeros bioensayos de curva (figuras

se observó que a concentraciones mayores de 7 mg/lt de BA, se presentaba toxicidad, es decir, que había un crecimiento menor que en el testigo de agua. Por ello para las dos curvas restantes se utilizaron concentraciones de un máximo de 7 mg/lt.

En la muestra G.D. de Guerrero del mes de abril, se encontró una actividad elevada, considerando el total de actividad. La fecha de recolección de esta muestra fué justamente en el momento de la floración. Esto también apoya la teoría de Khan (Dumbroff and Brown, 1976); además muestra la presencia de citocininas de una variedad en un lugar adecuado en donde al parecer estas sustancias tienen un papel importante.

En la muestra de Matachic de la variedad R.B. se encontró un comportamiento muy irregular, si se toma en cuenta que Matachic es una zona apta para R.B. y que la muestra se colectó en época de floración, por lo que se esperaría una actividad notoria. Esto se puede analizar desde varios puntos de vista: la muestra puede presentar altas concentraciones de citocininas, dando por consecuencia una inhibición otra razón pudo ser alguna variación dentro de las condiciones del bioensayo. Resta para una nueva muestra de este lugar la repetición del bioensayo, trabajando con soluciones menos concentradas.

XI CONCLUSIONES Y ESTUDIOS FUTUROS

De este trabajo, se concluye que:

- 1) La metodología utilizada permite:
 - a) la separación de reguladores y sustancias inhibidoras de las citocininas en los extractos vegetales
 - b) el método de cuantificación del bioensayo por peso fresco fué la forma que demostró mayores ventajas
- 2) Ciudad Guerrero es una zona apta para la variedad Golden Delicious, encontrándose en la muestra de este lugar un nivel alto de citocininas
- 3) En la muestra de El Sauz, que es una zona con problemas de producción para la variedad Golden Delicious se encontró un bajo nivel de citocininas en comparación con las muestras de Guerrero
- 4) El nivel de citocininas tiene una relación definitiva y muy importante en la producción de manzanas cuando las de más condiciones son óptimas
- 5) El cambio del contenido de las citocininas no solamente depende de diferencias climatológicas, sino también de la parte del ciclo estacional del árbol de manzano en estudio.

Estudios Futuros.

- 1) Es necesario utilizar como parámetro de evaluación de bioensayos diferentes citocininas sintéticas para encontrar la que tenga una actividad potencial mayor que la de las citocininas naturales, y de ser posible, que al graficarse, muestre una región lineal.
- 2) Hacer estudios para lograr encontrar una relación entre la actividad de citocininas naturales y sintéticas para que en un momento dado se puedan eliminar deficiencias hormonales en forma práctica por medio de aplicaciones de citocininas o de anticitocininas, según el caso (Gaylan, et al, 1977), en dosis y momentos del ciclo biológico adecuados (Stahly and Williams, 1976).
- 3) Si se llega a demostrar que las citocininas naturales no pueden ser igualadas en potencia de actividad por las citocininas sintéticas (Yamada, et al, 1972), entonces, recurrir a fuentes de citocininas naturales, como podría ser la del agua del coco (Cocos nucifera), ya que por una parte tiene un alto contenido de reguladores (50% más que otros frutos como la ciruela y el durazno y un porcentaje aún mayor que el manzano (Letham and Bollard, 1974) y por otro lado, por encontrarse en solución, es más fácil y más barato para trabajar.

XII BIBLIOGRAFIA

- Bentley, M. and Reid, S. 1968. Investigation of the Radish Leaf Bioassay for Kinetins and Demonstration of Kinetin Like-Substances in Algae. *Amer. Bot. N.S.* 32: 23-32
- Biddington, N. and Thomas, T. 1976. Effect of pH on the Elution of Cytokinins from Polyvinylpyrrolidone Columns. *Jour. of Chrom.* 121: 107-109
- Biddington, N. and Thomas, T. 1973. Chromatography of Five Cytokinins on an Insoluble Polyvinylpyrrolidone Column. *Jour. of Chrom.* 75: 122-123
- Bidwell, R. 1974. *Plant Physiology*. Ed. Mac Millan. 330-347 y 494-514
- Gartwright, P. 1973. *Biological Test and Assays for Plant Growth Regulators*. Agric. Bot. Dept.
- Coutanceau, M. 1970. *Fruticultura*. Ed. Oikos-tau, S.A. Barcelona, España.
- Domanski, R. and Kozlowski, T. 1968. *Can. J. Bot.* 46:397-403
- Dumbroff, E. and Brown, D. 1976. Cytokinin and Inhibitor Activity in Roots and Stems of Sugar Maple Seedling through the Dormant Season. *Can. J. Bot.* 54: 191-197
- Esclapon, R. 1968. *Variedades Americanas de Manzana*. Ed. Oikos-tau, S.A. Barcelona, España. 123-193

Fox, J. 1969. The Cytokinins in the Physiology of Plant - Growth and Development. Ed. Mc.Graw Hill, New York, Toronto, Sydney, Mexico, Johannesburg and Panama.

Gautheret, R. 1968. Action d' adénines substitueés sur la synthèse des bétacyanines dans la plantule d' Amarantus caudatus L Possibilité d' un test biologique de dosage des cytokinines C.R.Acad. Sc.Paris. 266:549-552

Gaylan, et al 1977. A Statistical Method of Determining Chill Unit and Growing Degree Hour Requirements for Deciduous Fruit Trees. Hort Science. 12(4): 347-348

Glenn, K. et al 1972. Use of Insoluble Poluvinylypyrrolidone for Purification of Plant Extracts and Chromatography of Plant Hormones. Phytochemistry 11 :345-351

Henson, I.E. and Wareing, P.F. 1976 Cytokinins in Xanthium strumarium L: Distribution in the Plant and Production in the Root System J. Esp. Bot. 27:1268-78

Hill, T.A. 1977. Hormonas Reguladoras del Crecimiento Vegetal, Omega:21-32 y 59-66

Jennings, R.C. 1969. Cytokinins as Endogenous Growth Regulators in the Algae Ecklonia (Phaeophyta) and Hypnea (Rhodophyta). Aust. J. Biol. Sci. 22:621-627

Juscafresa, B. 1973. Arboles Frutales, Cultivo y Explotación Comercial. Aedos, 230-258

Kasano, K. 1976. The Role of the Epidermis on Kenetin-induced retardation in tobacco Leaf Discs during Senescence. *Plant and Cell Physiol* 17: 1297-1307

Koshimizu, K. et al 1967. Isolation of a Cytokinin (-)-Dihydrozeatin from Immature Seeds of Lupinus luteus. *Tetrahedron Letters*. 14:1317-1320

Letham, D.S. 1972. Cytokinin-activity of compounds related to a zeatin. *Phytochemistry*. 11:1023-1025

Letham, D.S. and Bollard, 1974, E.G. Stimulants of Cell Division in Developing Fruits. *Nature* 191:1119;1120

Maheshwari, S.C. and Gupta G.R. 1967. Kinin Activity of Extracts of Pumpkin Seeds. *Life Sciences* 6:2459-2461

Maheshwari, S.C. and Prakash, R. 1967. Cytokinins in Immature Seeds of Watermelon. *Life Sciences* 6:2453-2458

Manos, P. and Goldthwaite J. 1976. An Improved Cytokinin Bioassay Using Cultures Soybean Hypocotyl Sections. *Plant Physiol*. 57:897

Martin C. and Chikara N. 1972. Levels of Endogenous Growth Regulator in Abscising and Persisting Peach Fruits. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 97(5):561-565

Menhenett R. and Carr D.J. 1973 Cytokinins in etiolated barley leaves. *Aust. J. Biol. Sci.* 26:1073-1080

Miller, O.C. 1975. Revised Methods for Purification of Ribosyl-trans-zeatin from Vinca rosea L. Crown gall tumor tissue Plant Physiol 55:448;449

Mitchell, J. W. and Livingston, G. A. 1973. Metodos para el Estudio de Hormonas Vegetales y Sustancias Reguladoras del Crecimiento. Trillas, México: 54, 48, 136

Onckelen, H. et Verbeek, R. 1972. Analyse critique D' une Technique D' extraction quantitative et du Dosage des Cytokinines dans des extraits de Vegetaux Superieurs. Bull. Soc. Roy. Bot. Bel. 105:(1):57-65

Osborne, D.J., 1961. Rapid Biossay for Kinetin and Kinis using Senescing Leaf Tissue. Plant Physiology:36:219-221

Pearson, J.A. and Robertson, R.N. 1952. The physiology of growht in apple fruits. Aust. J. Biol. Sci. 6:1-20

Ramsay P. and Martin G. 1970. Seasonal changes in Growht Promotors and Inhibitors in Buds of Apricot. J. Amer.Soc. Hort. Sci. 96(5):569-574

Richmond, A. and Lang, A. 1957. Effect of kinetin on protein content and survival of detached Xanthium leaves. Science: 125:650-651

Skoog, T. and Armstrong, D.J. 1970. A Rev. Physiol. 21: 359-384

- Stahly, E. and Williams, M. 1976. Induction of Earlier Fruiting of "anjou" Pear Trees with Growth Regulator. Hort. Science 11(5):502-504
- Takeshi, H. 1976. Cytokinin Activity of O⁶-Substituted Guanine and Hypoxanthine Derivatives. Phytochemistry, 15:1813-1815
- Thomas, T.H. et al 1975. Thin-layer Chromatography of cytokinins on a mixed layer of polyvinylpyrrolidone and calcium sulphate. Journal of Chromatography 103:211-215
- Tudor, H.T. et al 1975. A simple, inexpensive, high pressure liquid chromatographic method for separating Cytokinin in plant extracts. Plant Physiol. 56: 410-414
- Varga A. and Buinsma J. 1973. Effects of Different Cytokinins on the Senescence of Detached Oat Leaves. Planta 111:91-93
- Weaver, J. R. 1976. Reguladores del Crecimiento de las Plantas en Agricultura, Trillas, México
- Wright, S.T. and Hiron, R.W. 1969. Nature, London:224, 719-720
- Yamada Y. et al. 1972. Cytokinin Induced Shoot Formation. Phytochemistry 11:1019-1021