

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



NIVELES DE GIBERELINAS EN YEMAS FLORALES DE MANZANO CON DIFERENTE NUMERO DE HORAS - FRIO RECIBIDAS



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
PATRICIA DE LA TORRE

1982



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.

C O N T E N I D O

| | |
|-----------------------------|----|
| ANTECEDENTES Y OBJETIVOS | 1 |
| INTRODUCCION | |
| - GENERALIDADES DEL MANZANO | 4 |
| - YEMAS | 7 |
| - GIBERELINAS | 12 |
| - LATENCIA | 30 |
| PARTE EXPERIMENTAL | 36 |
| RESULTADOS | 45 |
| DISCUSION | 56 |
| CONCLUSIONES | 62 |
| BIBLIOGRAFIA | 64 |

ANTECEDENTES

El proceso de desarrollo de una planta, está controlado por un balance entre sustancias estimulantes e inhibidoras del crecimiento vegetal. A estas sustancias se les ha denominado hormonas vegetales. Como hormonas estimuladoras del crecimiento, se conocen las auxinas, las giberelinas, las citocininas y el etileno, y como sustancias inhibidoras, el ácido - abscísico y otros compuestos con una gran diversidad de estructuras químicas, principalmente de tipo fenólico.

La participación directa, la interacción entre los mismos, así como el mecanismo de los diversos procesos que se llevan a cabo en la planta, son poco conocidos, entre esos procesos está el de "latencia". Durante la latencia, el crecimiento de la planta se detiene por efecto de las condiciones climáticas desfavorables, especialmente en lo que se refiere a intensidad luminosa, duración del día, lluvia y temperatura.

Para el árbol del manzano, el factor climático que interviene más directamente en la latencia de sus yemas, es la temperatura, específicamente las bajas temperaturas. Así pues, el manzano, se encuentra listo para florecer cuando haya recibido una cierta cantidad de frío. Esta necesidad de frío, se conoce como requerimiento de horas frío.

De las investigaciones realizadas hasta la fecha, en frutales, se ha llegado a la conclusión de que son las giberelinas las que participan más directamente en la latencia de yemas, y, que es la interacción entre giberelinas y ácido abscísico la que regula este proceso. Sin embargo, es

importante mencionar que, particularmente en el manzano, no se han observado cambios significativos en la actividad inhibitoria, representada principalmente por el ácido abscísico, que puedan ser correlacionados con la latencia de las yemas.

El presente trabajo tuvo como principal objetivo el estudio de los niveles de giberelinas en yemas florales de dos variedades de manzano con diferentes requerimientos de horas frío, que, en uno de los casos este requerimiento no se satisfizo. Cuando éste no es satisfecho, ocasiona una mala floración, y en consecuencia, hay una baja producción de frutos, en este caso, de manzanas.

Este estudio forma parte de un proyecto, cuyo propósito es investigar el equilibrio de sustancias estimulantes e inhibitoras, en diferentes épocas del año, entre manzanos que presentan una buena floración y crecimiento correcto con aquéllos que lo hacen en forma deficiente. Con esto se pretende llegar a proponer, tanto productos como su época adecuada de aplicación, regulando así las diferentes concentraciones hormonales existentes en las yemas, para obtener una buena floración y aumentar el rendimiento de la producción en éstos árboles.

Para la purificación de giberelinas de las yemas florales de manzano, se eligió, en este trabajo, la cromatografía en columna con polivinilpirrolidona (PVP), debido principalmente a que este material es capaz de retener a los compuestos de tipo fenólico.

Para cuantificar la actividad de las giberelinas, se seleccionó el bioensayo de epicotilo de chícharo, en el cual, se determina el incremento en longitud del entrenudo de la plántula en respuesta a las diferentes concentraciones, de ácido giberélico o de la muestra de extractos de yemas, aplicadas.

En el procedimiento de purificación de cada muestra de yemas florales de manzano, se obtuvieron 20 fracciones, y cada una de ellas, se probó a tres concentraciones diferentes en el bioensayo de chícharo. Para la interpretación de los resultados, se formaron 4 grupos denominados como I, II, III y IV, de 5 fracciones cada uno. Cada uno de estos grupos contiene un determinado volumen de elución, así, el grupo I contiene del mililitro 1 al 50, el grupo II del 51 al 100, el grupo III del 101 al 150 y el grupo IV del 151 al 200.

En general, las fracciones del grupo III presentaron una estimulación del crecimiento, en la plántula de chícharo, en los casos en que sí se llenó el requerimiento de horas-frío. En la variedad de manzano que no llenó dicho requerimiento, se observó en general, una actividad inhibitoria al crecimiento de las plántulas de chícharo, principalmente en el grupo IV de fracciones.

Los resultados indican que los niveles de giberelinas varían dependiendo de la variedad de manzano de que se trate, y que, estos niveles son mayores cuando el manzano cumple con sus requerimientos de horas-frío. Se puede pensar en un posible papel del frío en la latencia de yemas, el cual, desplazaría el equilibrio hormonal hacia los estimulantes del crecimiento, específicamente, hacia las giberelinas.

M A N Z A N O

- Generalidades.

El árbol del manzano es originario de las regiones del Cáucaso, Europa y Asia Central. Su introducción en América, específicamente a México, data de la época de la conquista de Tenochtitlan por los españoles, siendo los misioneros quienes introdujeron las primeras variedades de manzano que se adaptaron bien a determinadas regiones del país como: Chihuahua, Durango y Coahuila. Posteriormente, se fueron introduciendo otras variedades, especialmente norteamericanas (22, 57).

La planta del manzano, se encuentra ubicada taxonómicamente de la siguiente manera (32, 57):

División: Embryophyta Siphonogama
Subdivisión: Angiospermae
Clase: Dicotyledoneae
Familia: Rosaceae
Subfamilia: Pomoideae
Género: Pyrus
Especie: Pyrus malus L.

Las variedades de manzano cultivadas actualmente son numerosas, sin embargo, todas tienen su origen en un número de variedades restringido, llamadas también cabezas de familia, que son las siguientes: Delicious, Winesap, Jonathan, Mc. Intosch, Rome Beauty y Golden Delicious.

- Descripción de las variedades.

La variedad Rome Beauty se obtuvo por semilla en 1848 por M.H. Gillet, de Lawrence Country, Ohio, E.U.A. Fue importada a Francia alrededor de 1849 por André Leroy. Esta variedad tiene varios sinónimos: Belleza de Roma, Belle de Rome, Rome, Roman Beauty, Red Rome y Beauté de Rome. El árbol de esta variedad es grande, erguido, con fructificación muy buena, el ramaje es bastante largo de color castaño rojizo con numerosas lenticelas, presentando entrenudos de 25 a 30 mm. El fruto es de forma esférica con piel bastante gruesa, de color rojo cereza más intenso a la insolación y amarillo verdoso con puntos blancos a la sombra. La pulpa del fruto es blanca, firme, poco azucarada, ácida y perfumada, con cierta tendencia a volverse harinosa.

Es una variedad muy productiva, de calidad bastante buena, que produce pronto y se adapta bien a las exigencias de los climas cálidos. Su valor comercial es bueno, gracias a su tamaño, conservación en frío y resistencia al transporte (15, 22, 32).

La variedad Golden Delicious, se encontró por primera vez en el año de 1916 en los huertos de A.H. Mullins, en Windfield, West Virginia, E.U.A. Se considera la mejor variedad porque se adapta a todos los climas y es muy fértil. El árbol de esta variedad presenta una fructificación abundante, su ramaje es largo y delgado con un porte erguido, tiene numerosas lenticelas alargadas de color claro, sus yemas son aplastadas de forma triangular. Presenta entrenudos de 30 a 35 mm. o más, sus flores son de color rosa (15, 22, 32).

- Requerimiento de horas frío.

El manzano es un frutal de hoja caduca, a este tipo de frutales se les conoce también como árboles caducifolios o deciduos, que en una época determinada del año, tiran todas sus hojas y entran a lo que se conoce como "latencia". Para romper la latencia, este tipo de frutales requieren de bajas temperaturas (8).

Las necesidades de frío, se expresan por el término "hora frío", la cual se define como "una hora a una temperatura dada". El número total de horas frío se obtiene sumando todas las horas frío que se presentan en un determinado periodo de tiempo, y para que tengan un valor confiable debe ser el promedio de por lo menos 10 años. Las horas frío pueden presentarse durante el día o durante la noche, ya sea, de manera ininterrumpida, alternada o sólo unas cuantas horas frío, e incluso en algunas ocasiones no presentarse ninguna durante varios días.

Para el caso del manzano se encuentra reportado como hora frío, una hora a temperatura de 7°C o menos (62), siendo el requerimiento mínimo de 500 a 600 horas, el regular de 600 a 700 y el largo de 700 horas frío o más, para que se presente la floración. Las diferencias en las necesidades de horas frío, que pueden presentarse entre los manzanos, se debe a que son determinadas por la variedad de que se trate. Se ha reportado que la variedad Rome Beauty presenta un mayor requerimiento de horas frío que la variedad Golden Delicious (2).

Y E M A S

La yema puede definirse como un renuevo en el tallo en forma de botón escamoso que puede producir hojas o flores. Se forma por una combinación de divisiones anticlinales y periclinales de las capas superficiales y profundas del tejido meristemático, ocasionando la formación de una protuberancia bajo la superficie del tallo, que continúa desarrollándose hasta que se forma por completo la yema (21).

Las yemas de una planta pueden ser vegetativas o florales. A partir de las yemas florales, se producirán las flores y de éstas los frutos. En los manzanos se presentan ciertas formaciones llamadas ramos, los cuales contienen a las yemas. Los arboricultores los describen de la siguiente manera (26):

- Ramo mixto: formación de longitud variable, algunas de sus yemas laterales son florales.
- Chiforna: formación débil y poco desarrollada, su yema terminal es vegetativa y todas las laterales son florales.
- Brindilla coronada: es una rama delgada de menos de 40 cm. de longitud cuya yema terminal es floral
- Ramo de mayo: es como una chiforna acortada, la yema terminal es vegetativa y todas las laterales son florales.
- Dardo coronado: es un ramo muy corto (0.5 cm.) donde la yema terminal se ha convertido en floral.

- Lamburda: es un ramo pequeño (5 a 10 cm.) en vegetación por dos o más años. La yema terminal se ha transformado en floral al final de este periodo vegetativo.

Generalmente, los manzanos adultos fructifican sobre ramos cortos como lamburdas y brindillas.

Las yemas se han clasificado por su posición en la planta y por su evolución.

Por su posición en el ramo (fig. 1), las yemas pueden ser:

- Terminales: ocupan el extremo de una brote o ramo.
- Axilares: ocupan la axila de una hoja.
- Estipulares o de reemplazo: están situadas a los lados de la yema axilar y sirven de sustituto de ésta en caso de accidente o anomalías en su desarrollo.

- Basilares: son las axilares situadas en la base del brote o ramo.

- Laterales: se encuentran en las ramas laterales de los ramos.

Según su evolución las yemas pueden ser:

- Yemas en crecimiento o yemas fisiológicamente activas.
- Yemas latentes o en reposo: son las que están inhibidas en su crecimiento por factores del medio ambiente o por condiciones endógenas, permaneciendo englobadas en sus escamas durante, a veces, años.

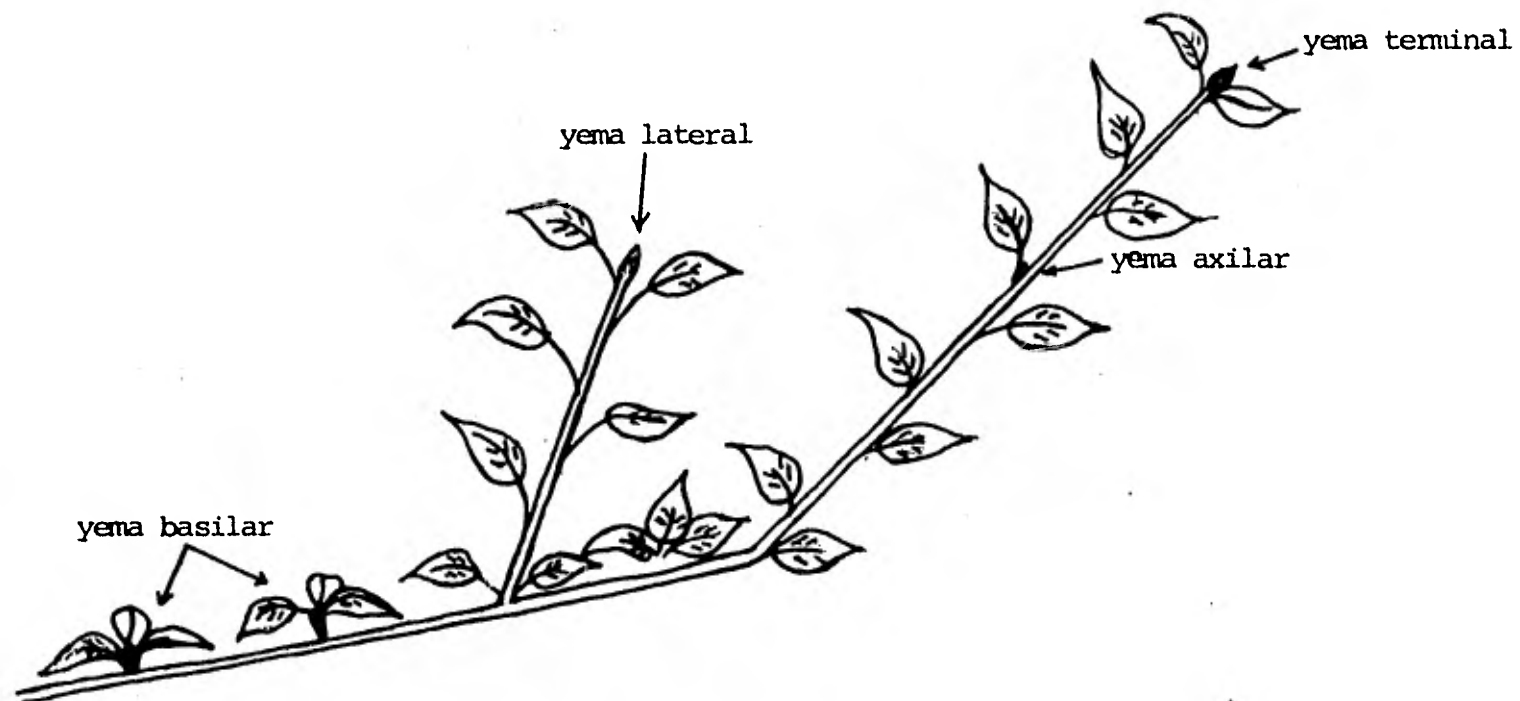


Fig. 1. Diagrama de una rama de manzano mostrando las posiciones de las yemas (Abbott D.L. 1970).

- Yema floral de manzano.

La estructura de la yema floral del manzano fue estudiada por Bijhouwer (6), dicha estructura se presenta en la fig. 2, en la cual pueden verse 21 formaciones foliares insertadas en el tallo en una secuencia espiral. Las formaciones constan de 9 escamas, 3 hojas de transición, 6 hojas verdaderas y 3 brácteas. La yema termina en una flor primordio y en las axilas de las 3 brácteas y de las 3 hojas distales se encuentran las flores primordio laterales (6).

La formación de una yema de manzano ha sido descrita por Abbott (1) para la variedad de manzano Lord Lambourne. La primera indicación para la formación de la yema es la abscisión de la lámina y peciolo de la octava hoja primordio del meristemo apical, la base de la hoja se convierte en la escama exterior (primera escama) de la yema. Similamente, la lámina y el peciolo del primordio del séptimo nudo comienza a adelgazarse formando la segunda escama. La lámina y las estípulas de los subsecuentes primordios más pequeños mueren y las bases de las hojas se convierten en escamas típicas, con sólo vestigios de las otras estructuras foliares en sus puntas. Este período abortivo de la lámina dura 7 semanas, aunque 5 de las 9 escamas se forman en las primeras 3 semanas (1).



— 0.5 cm. —

Fig. 2. Diagrama del corte transversal de una yema floral de manzano, mostrando: 9 escamas ■, 3 hojas de transición ■■■, 6 hojas verdaderas ■■■■, 6 flores primordio laterales ■■■■, 1 flor primordio en el ápice y las 3 - brácteas.

G I B E R E L I N A S

- Historia

La investigación de este grupo de hormonas vegetales surgió en Japón en 1912 (49), al estudiar la enfermedad del arroz (Oriza sativa) conocida como "bakanae" (plántula loca), caracterizada por una insólita elongación de la planta. Más tarde en 1926, Kurosawa y Sawada (34) demostraron que el filtrado estéril de un extracto libre de células del hongo Fusarium heterosporum, que infectaba a la planta del arroz, también podía estimular el crecimiento de las plántulas. El estado imperfecto del hongo fue identificado posteriormente como Fusarium moniliforme y el estado perfecto como Gibberella fujikuroi. Debido al nombre del hongo, Yabuta, en 1935 (64), le designó como giberelina A a este principio activo, asimismo él fue el primero en purificar parcialmente y cristalizar a este compuesto.

En Estados Unidos, Stodola en 1935, purificó también el principio activo de G. fujikuroi, llamándolo giberelina X (53). Entretanto, en Inglaterra, Curtis y Cross, en 1954, lo aislaron y le llamaron ácido giberélico (14).

Una reinvestigación dirigida por Stodola de la giberelina A japonesa, demostró que se trataba de una mezcla de tres giberelinas y que una de ellas era la misma que la giberelina X de Stodola y el ácido giberélico de Curtis y Cross. Los tres grupos acordaron adoptar el nombre de ácido giberélico para ésta giberelina (GA_3).

En 1965, las giberelinas identificadas eran 13 (42), en 1970, se habían identificado 29 (25), y la cifra reportada en 1978 fue de 52 (47). Para 1981, el número de giberelinas fue de 57 (48).

Estas giberelinas han sido aisladas de plantas inferiores, principalmente del hongo Gibberella fujikuroi, así como también de algunas plantas superiores, dentro de las que se encuentra la planta de manzano (16).

El aumento de giberelinas tan inquietante, se debe en gran parte al progreso en las técnicas de identificación y purificación de estas sustancias.

- Estructura química y nomenclatura.

Las giberelinas son de naturaleza isoprenoide y pertenecen a la clase de compuestos llamados diterpenos. Los terpenos tienen un esqueleto carbonado construido con unidades de isopreno, unidas entre sí de un modo regular. Las giberelinas constan de cuatro unidades de isopreno, generalmente arregladas para formar tres anillos. La unidad isoprélica es uno de los bloques constructivos favoritos de la naturaleza, no solamente aparece en el caucho, sino también en una amplia variedad de compuestos que se aíslan de fuentes vegetales.

La nomenclatura empleada en las giberelinas, se basa en el esqueleto del giberelano (fig. 3). Este compuesto tiene un sistema de numeración que corresponde al de otros diterpenos cíclicos, especialmente al del kaureno, que es un intermediario crucial en la biogénesis de las giberelinas. Las estructuras de algunas giberelinas se muestran en la fig. 4.

Dentro de las giberelinas, existen dos grandes diferencias; una de ellas es el número de átomos de carbono, unas poseen 19 y otras poseen 20, la otra es la presencia o ausencia de grupos hidroxilo (-OH) en posiciones 3 y 13. Otra diferencia, también importante entre las giberelinas, es que las de 20 átomos de carbono presentan grupos carboxilo (-COOH) en posición 7, 18 y en algunas ocasiones también en posición 20, mientras que otras tienen un grupo aldehído en esta última posición.

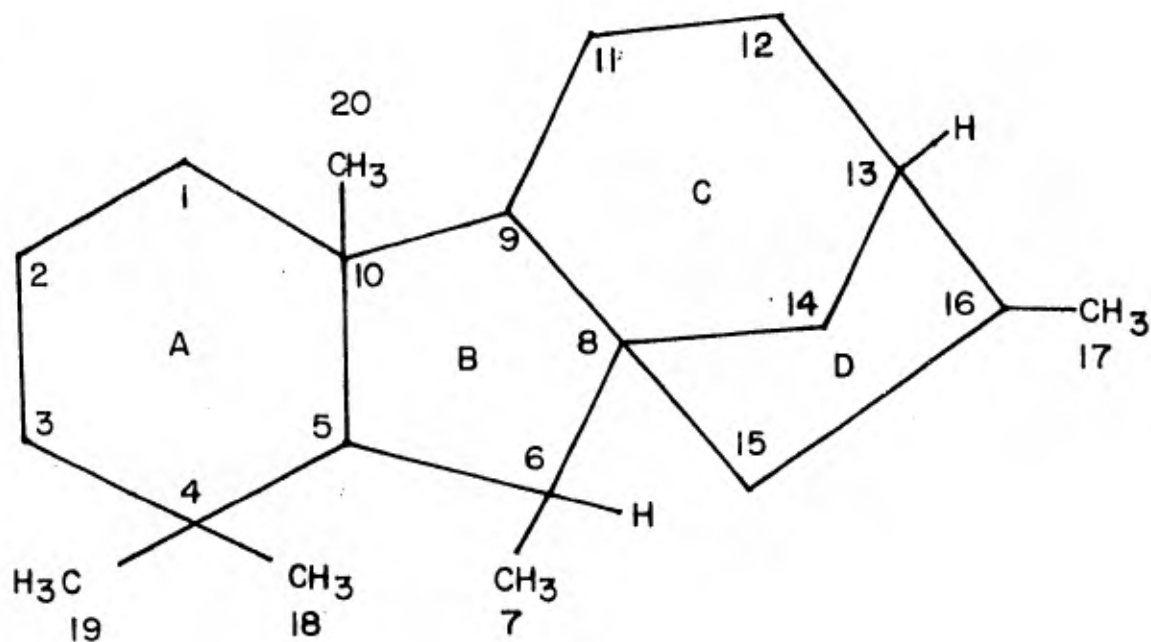


Fig. 3. Esqueleto del giberelano, mostrando los anillos y la numeración empleada en la nomenclatura de las giberelinas.

Todas las giberelinas de 19 carbonos son ácidos monocarboxílicos, con el grupo $-COOH$ en posición 7 y tienen una configuración de lactona en el anillo A, que surge cuando se pierde el átomo de carbono 20.

La presencia o ausencia de hidroxilos en posiciones 3 y 13, en las giberelinas de 20 carbonos, parece señalar una diferencia entre aquellas giberelinas que se presentan en Gibberella fujikuroi y aquellas que están tanto en el hongo como en plantas superiores o sólo en éstas últimas (35). Las giberelinas presentes en el hongo que poseen un grupo hidroxilo, lo presentan siempre en posición 3, mientras que las giberelinas de las plantas superiores lo presentan en la posición 13.

- Biosíntesis.

La biosíntesis de giberelinas incluye la formación de todos los compuestos intermediarios, desde el mevalonato hasta el aldehído de GA₁₂ (28).

La mayor parte de la información acerca de la síntesis ha sido el resultado de estudios llevados a cabo en Gibberella fujikuroi. El conocimiento de las vías biosintéticas en plantas superiores es aún fragmentario, no obstante, las investigaciones indican que la síntesis de giberelinas en plantas superiores sigue el mismo esquema encontrado para G. fujikuroi.

Birch y colaboradores (7), fueron los primeros en sugerir una posible vía de síntesis, ya que demostraron que el acetato, marcado radioactivamente, se incorporaba a giberelinas a través del ácido mevalónico. La fig. 5 muestra los principales pasos en la formación del aldehído de GA₁₂.

Las principales reacciones para la síntesis de giberelinas son:

1. Ciclización de los grupos de isopentenil pirofosfato para formar el geranil geranil pirofosfato.
2. Ciclización para formar el primer intermediario cíclico, o sea, el kaureno.
3. Diferentes pasos de oxidación, incluyendo ciclización del anillo B del ácido 7 α -hidroxikaurenoico, para formar el aldehído de GA₁₂.

La transformación desde el mevalonato hasta copalil pirofosfato, es mediada por enzimas que están presentes en la fracción soluble de extractos celulares vegetales, y que requieren cofactores como iones metálicos divalentes: Mg^{2+} o Mn^{2+} y ATP. El aislamiento y purificación de la enzima geranyl geranyl pirofosfato sintetasa fue lograda por Ogura y colaboradores en 1972 (41), esta enzima, es capaz de catalizar dos condensaciones: a) la de isopentenil pirofosfato con farnesil pirofosfato y b) la de isopentenil pirofosfato con dimetilalil o geranyl pirofosfato. Así que cataliza la consecutiva elongación de cadena desde 5 carbonos a 10, 15 y 20 carbonos sin acumulación de intermediarios. El Mn^{2+} es un requerimiento absoluto para esas reacciones, mientras que el Mg^{2+} es mucho menos efectivo.

El siguiente paso en la síntesis del aldehído de GA_{12} es la formación del kaureno a partir de geranyl geranyl pirofosfato. Esta reacción requiere de dos pasos de ciclización, A y B, que son mediados por la enzima kaureno sintetasa. Esta enzima ha sido purificada de extractos de *G. fujikuroi*, reportándose (23), que sus actividades A y B poseen diferentes valores de pH óptimos, siendo éstos de 7.3 y 6.9 respectivamente. Su actividad depende de la concentración de iones divalentes, especialmente de Mg^{2+} , Mn^{2+} y Ni^{2+} , así como de la presencia de ATP. El intermediario de esas reacciones es el copalil pirofosfato. No ha sido posible separar la actividad catalítica A de esta enzima (conversión de

geranil geranil pirofosfato a copalil pirofosfato) de su actividad catalítica B (conversión de copalil pirofosfato a kaureno).

Una vez formado el último compuesto no cíclico, el geranil geranil pirofosfato, el siguiente paso es la formación del kaureno.

Posteriormente, el kaureno es oxidado sucesivamente a kaurenol, kaurenol y finalmente ácido kaurenico (33, 51). A partir de éste, se forma el ácido 7 α -hidroxikaurenico (9). Las enzimas envueltas en esta serie de oxidaciones se encuentran asociadas a la fracción microsomal de extractos de G. fujikuroi, requieren de un nucleótido de piridina reducido (NADPH) y de oxígeno.

El ácido 7 α -hidroxikaurenico es el último derivado del kaureno, y la contracción de su anillo B, da por resultado la formación del aldehído de GA₁₂.

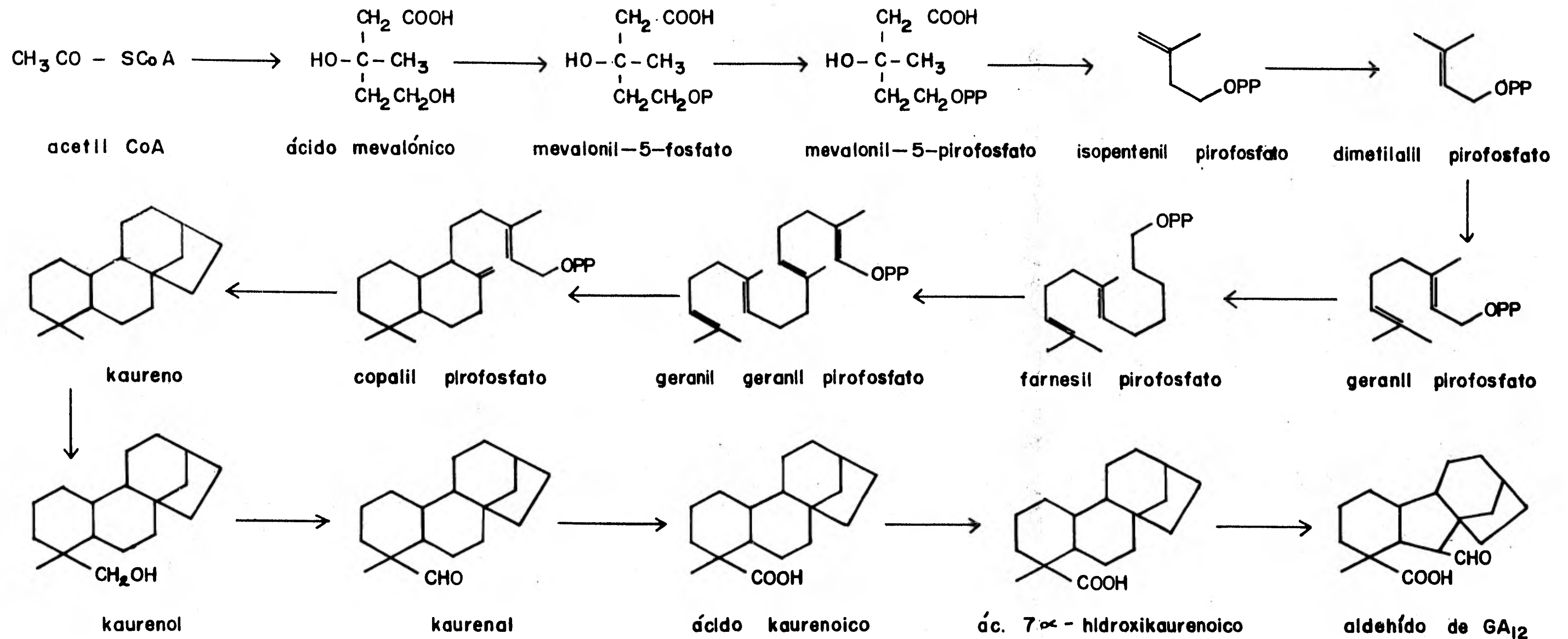


Fig. 5. Esquema de la vía biosintética seguida en la formación del aldehído de GA₁₂, intermediario en la biosíntesis de giberelinas.

- Metabolismo.

El metabolismo de las giberelinas se refiere a la serie de transformaciones que sufre el aldehído de GA₁₂ para dar:

a) giberelinas biológicamente activas, conocidas también como giberelinas primarias (29).

b) giberelinas biológicamente inactivas. La pérdida de actividad biológica se lleva a cabo principalmente por reacciones de hidroxilación y de conjugación. Las giberelinas conjugadas pueden ser éteres o ésteres de glucósidos. Generalmente, estas reacciones se efectúan al final de las vías biosintéticas.

La fig. 6 muestra el metabolismo de las giberelinas de 20 átomos de carbono y la fig. 7 muestra el de las de 19 carbonos.

Las diferentes vías que sigue el aldehído de GA₁₂ depende de la capacidad de cada especie vegetal para hidroxilar la posición 3 o la 13. La posición de la hidroxilación influye marcadamente en la actividad biológica y en la capacidad para subsecuentes hidroxilaciones y reacciones de conjugación.

Parece que hay dos diferentes vías para las conversiones, de giberelinas, en las plantas superiores, uno de esos caminos es idéntico con la ruta realizada por el hongo G. fujikuroi, caracterizada por una hidroxilación inicial en la posición 3, la otra vía es única para plantas superiores, con una hidroxilación inicial en la posición 13.

Se presume que la contracción del anillo B del ácido 7 α -hidroxikau-
renoico, es previa a la eliminación del carbono 20 con la consecuente
formación de la lactona formada entre el carbono 19 y el carbono 20, ca-
racterística de las giberelinas de 19 carbonos. Esto lleva a la especu-
lación de que las giberelinas de 20 carbonos pueden servir como interme-
diarios en la síntesis de las de 19 carbonos. Se ha reportado que tanto
GA₁₂ como GA₁₄ (giberelinas con 20 carbonos) pueden ser precursores para
las giberelinas de 19 carbonos. (12).

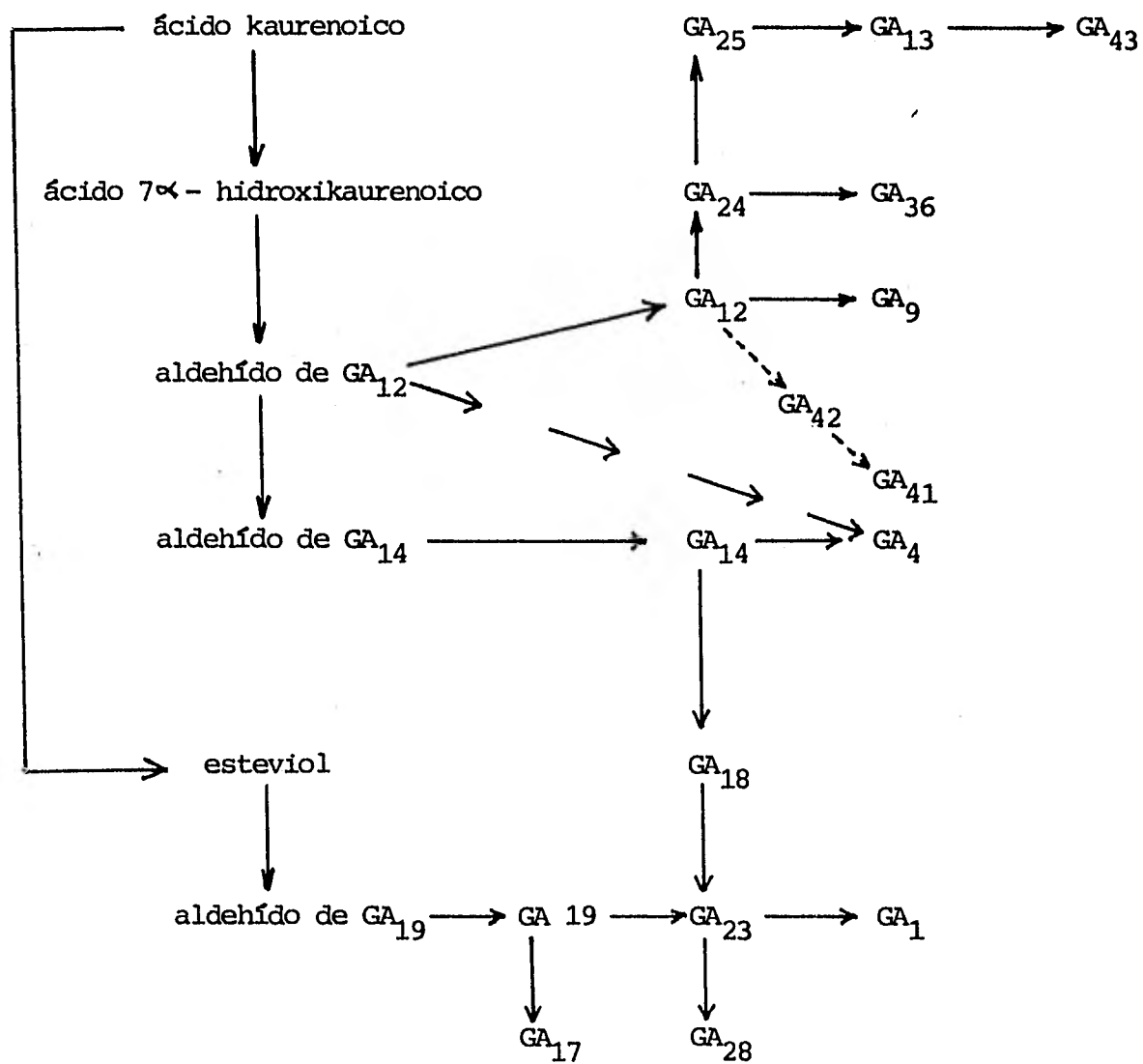


Fig. 6. Esquema del metabolismo que siguen las giberelinas de 20 átomos de carbono.

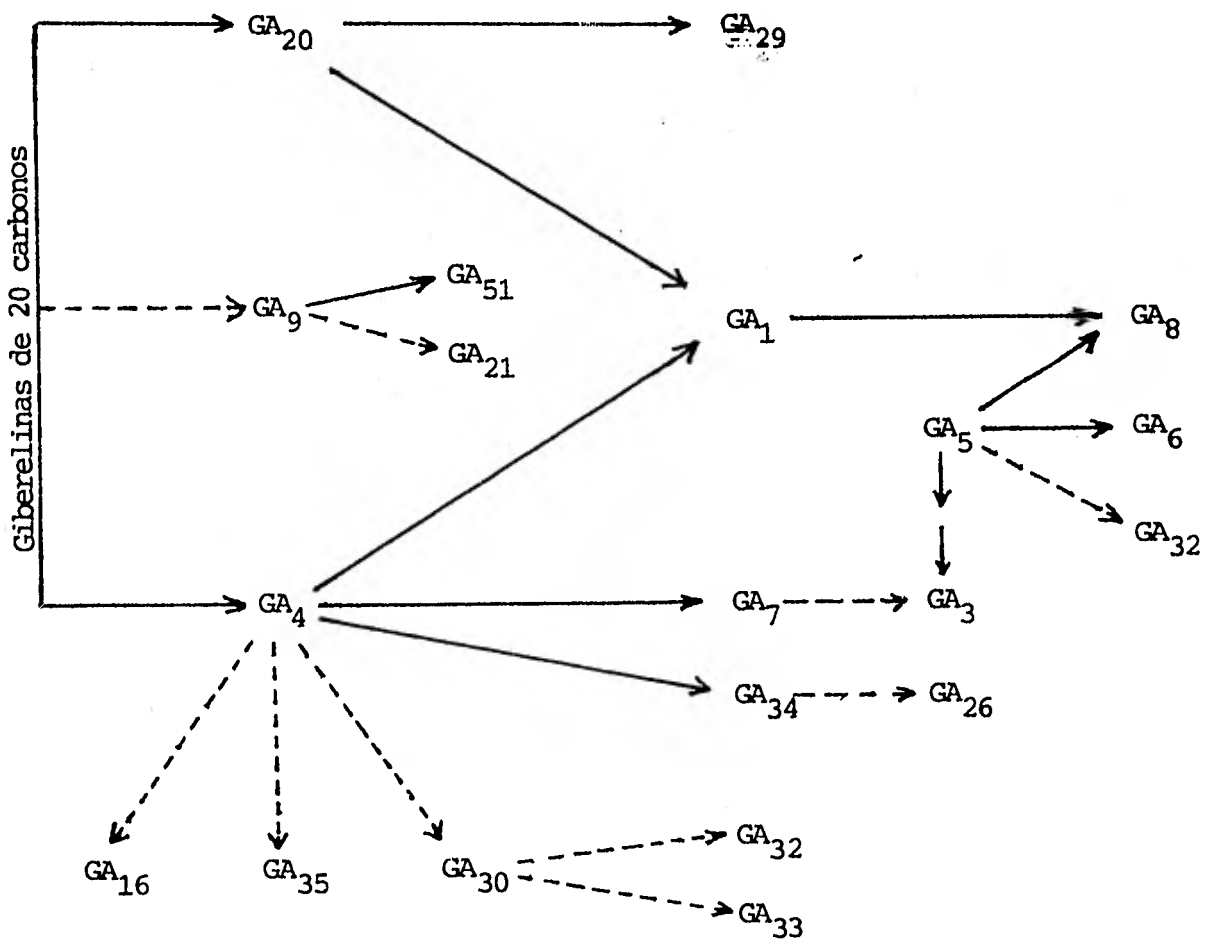


Fig. 7. Esquema del metabolismo que siguen las giberelinas que poseen 19 átomos de carbono.

- Regulación de los niveles de giberelinas en la planta.

Se ha propuesto (47) que la regulación de giberelinas en la planta, se lleva a cabo básicamente por dos mecanismos:

1. Por reacciones de hidroxilación y conjugación de las giberelinas, lo cual dá como resultado la formación de giberelinas inactivas.

2. Por la compartimentalización celular de las giberelinas. Dicha compartimentalización desempeña un papel muy importante en la biosíntesis, metabolismo y liberación de las giberelinas.

Nadeau y Rappaport (39), estudiaron el metabolismo de GA_1 encontrando que los únicos productos formados eran GA_8 , que se forma por hidroxilación de GA_1 (44), y el glucósido de GA_8 , no encontraron GA_3 o su glucósido. Por tanto, parece ser que hay una hidroxilación directa sin envolver intermediarios y sugieren que las enzimas que transforman a GA_1 , pueden servir para mantener a GA_1 en un nivel adecuado para el desarrollo normal de la planta. Las enzimas que transforman a GA_1 no son específicas, no obstante, la reacción está bajo impedimento estérico y requiere de NADPH y de oxígeno, siendo favorecida por la presencia de Fe^{2+} . La hidroxilación más importante es la que se efectúa en la posición 2. Alteraciones en la estereoquímica del hidroxilo en posición 3 causan inhibición de la hidroxilación en posición 2, así como también la metil esterificación del carboxilo en posición 7 o rearrreglo de los anillos C y D o deshidratación del grupo metileno en posición 16.

En cultivos de G. fujikuroi sí se ha logrado obtener GA_3 a partir de GA_1 , por lo tanto, parece que la hidroxilación en la posición 2 es común para plantas superiores, no así para el hongo. Estas aparentes diferencias en las vías del metabolismo de GA_1 pueden ser por el hecho de que las giberelinas son metabolitos sin función aparente en el hongo, mientras que para las plantas superiores son hormonas esenciales (43).

La reacción de conjugación más común es por una glucosilación, que también se efectúa en el hidroxilo en posición 3. Esta reacción se ha estudiado principalmente para GA_1 , que produce el glucósido de GA_8 y el glucósido de GA_1 (52, 55).

Las investigaciones de las diversas enzimas y de los factores que regulan su producción, es actualmente una de las líneas de investigación de mayor enfoque, ya que ayudaría al conocimiento profundo del papel de las giberelinas en la regulación del crecimiento y desarrollo vegetal.

Los estudios a nivel de membrana surgieron al encontrar que, aparte de los efectos a largo plazo (horas, días, meses) producidos por giberelinas, existían otros a corto plazo (minutos) en los cuales debían estar envueltos cambios en las membranas.

- Efectos producidos por giberelinas aplicadas.

Se ha encontrado que hay estimulación e incremento de la floración con giberelinas aplicadas, en muchas especies de coníferas (45) y en manzano (19). El ácido giberélico (GA_3), en combinación con monofenoles no sólo acelera la iniciación floral sino también incrementa la producción de yemas florales (50). La aplicación de GA_{4+7} en manzano de la variedad Golden Delicious causa partenocarpia y dá un mejor control sobre el color moreno que, a veces, se presenta en las manzanas (19).

Se ha reportado que en hojas, las giberelinas, alteran su forma y tamaño, volviéndolas más simples en forma y más elongadas, y posiblemente induzca fase juvenil en hojas adultas (24).

Un efecto producido por giberelinas que no parece envolver división celular, es la inducción de síntesis y secreción de enzimas, estudiándose esto, principalmente en aleurona de cebada. En esta semilla, se ha encontrado que las giberelinas estimulan la secreción de α -amilasa (42), ribonucleasa (10), proteasa (30), peroxidasa (46) y β -1,3-glucanasa (5). Asimismo, se ha encontrado en esta misma semilla, una proliferación de retículo endoplásmico (56), que parece ser una preparación para la síntesis y secreción subsecuente de las enzimas inducidas por las giberelinas.

- Función de las giberelinas.

Las giberelinas son hormonas que participan en los diferentes procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas. Leopold (36) hace una descripción de los efectos de estas hormonas en los diferentes procesos del ciclo de vida de una planta. Entre las funciones propuestas, están: latencia, etapa juvenil, crecimiento, iniciación floral, determinación del sexo, amarre, crecimiento y maduración del fruto, tuberización, abscisión, enraizamiento y senectud. Sin embargo, a pesar de la diversidad de efectos encontrados para las giberelinas, su intervención en la regulación del crecimiento, es básicamente por efectos en división celular y en alargamiento celular.

Los mecanismos de acción de estas hormonas, han sido examinados en sistemas más simples que los mencionados anteriormente, y resultados experimentales han permitido concluir que la acción reguladora de las giberelinas puede implicar síntesis de novo, activación o liberación de enzimas.

Recientemente, se han relacionado (36) los efectos de las giberelinas con los componentes estructurales de las membranas, como son los fosfolípidos y las proteínas. Estos efectos son básicamente los de alteración de las funciones de permeabilidad de la membrana.

L A T E N C I A

En las zonas templadas existen variaciones en las condiciones climáticas, especialmente en lo que se refiere a intensidad luminosa, duración del día, temperatura y lluvia. Como consecuencia, hay una alternación de estaciones favorables y desfavorables para el crecimiento de las plantas. Así, la necesidad de soportar bajas temperaturas durante el invierno, es uno de los problemas que el medio ambiente desfavorable presenta a las plantas.

Para sobrevivir el periodo de frío invernal, las plantas han desarrollado un mecanismo de resistencia. Esta resistencia se caracteriza por un crecimiento detenido o reducido de la planta durante el invierno. Durante éste periodo, los renuevos se rodean de escamas, formando las yemas, éste estado se conoce como latencia.

Westwood (63), definió varias clases de latencia:

- Quiescencia: cuando las yemas están en estado de latencia como consecuencia de condiciones externas desfavorables para el crecimiento. Se conoce también como latencia impuesta o forzada.

- Inhibición correlativa: cuando el crecimiento de la yema está impedido por influencias inhibitorias de otra parte de la misma planta. Por ejemplo, la latencia en yemas laterales que se presenta debido al crecimiento activo de la región apical principal de la planta. Se conoce también como latencia de verano o pre-latencia.

- Reposo: cuando la yema está en latencia por impedimentos fisiológicos internos que obstaculizan el crecimiento aún bajo condiciones externas ideales para el crecimiento, este reposo sólo puede romperse por efectos de las bajas temperaturas. Se llama también latencia innata, espontánea, verdadera latencia o latencia de invierno.

Generalmente, las yemas florales comienzan a diferenciarse en verano, al aproximarse el otoño entran en estado de quiescencia, más tarde, comienza el reposo progresivamente más profundo, hasta que la transición quiescencia-reposo se completa generalmente a fines de otoño. Durante todo el invierno, las yemas permanecen en estado de reposo. En este periodo se presenta el enfriamiento necesario para romper la latencia, y así, las yemas reanudan su crecimiento en primavera. Si después del invierno no se reestablecen las condiciones de clima cálido, las yemas pueden fallar en reiniciar su crecimiento.

Si las plántulas, por algún motivo, no entran en estado de latencia, y continúan creciendo ya entrado el otoño, son susceptibles de dañarse por heladas tempranas.

Muchas especies de árboles, pueden determinar la proximidad del invierno, registrando el acortamiento de los días y las bajas temperaturas, a través de sus hojas, lo que provoca la inducción de la latencia (60, 36).

Para el caso específico del manzano, hasta la fecha, no se ha encontrado el mecanismo por el cual se induce a la latencia. Este árbol no es fotoperiódico, posiblemente tiene un método más simple y primitivo para inducción de latencia que las especies fotoperiódicas (1).

Cuando el requerimiento de horas frío del manzano no es satisfecho, hay desprendimiento de yemas, tanto vegetativas como florales, si llegara a presentarse la floración ésta es tardía e irregular y los pocos frutos que se produjeran serían alcanzados por las heladas de otoño, si esto continúa, el árbol se debilita en extremo.

Se han tratado de dar numerosas explicaciones para la latencia. Desde el punto de vista físico se han postulado como posibles causas de este fenómeno, cambios en las propiedades coloidales del protoplasma en cuanto a su viscosidad y densidad. Bioquímicamente, se ha demostrado que la latencia se acompaña por cambios en los niveles de las hormonas que regulan el crecimiento (1).

Se ha postulado que en la latencia de yemas, existe un balance entre sustancias estimulantes e inhibitoras. Este balance se encuentra desplazado hacia las estimulantes al final de la latencia, y en el inicio de la misma este equilibrio se desplaza hacia los inhibidores. Como principal inhibidor se ha propuesto al ácido abscísico (ABA) y como principal estimulante a las giberelinas (59).

En vista del posible papel de las hormonas en el control de la latencia de yemas y semillas, el estudio de este problema se ha enfocado principalmente hacia dos líneas de investigación:

1. Observación de los efectos producidos por la aplicación de hormonas.
2. Investigación sobre hormonas endógenas, especialmente para establecer si existe correlación entre los niveles de hormonas y el estado de reposo en yemas.

Por estos estudios, se ha encontrado que tanto el ácido giberélico - (GA_3) como las citocininas, son capaces de revertir la latencia de yemas, tubérculos y otros órganos en reposo (59). También se ha demostrado que hay un aumento en la actividad de sustancias similares a giberelinas, en extractos de tubérculos de jitomate, al finalizar la latencia, y que este contenido baja con tratamientos que eliminan la latencia, asimismo, se ha encontrado que la actividad de giberelinas alcanza su máximo algunas semanas antes del término del reposo (61).

Se ha demostrado que otra hormona, el etileno, es capaz de revertir la latencia inducida por el ABA en semillas de lechuga, pero sólo en presencia de GA_3 o luz (17).

La hipótesis de que existe una interacción entre las diferentes hormonas se refuerza por el hecho de que, en semillas de cebada, el ABA inhibe la producción de α -amilasa inducida por giberelinas.

Se cree que esta inhibición es debida a que el ABA incrementa marcadamente el metabolismo de giberelinas, por tanto, su conversión a formas biológicamente inactivas, reduciendo a las giberelinas libres (activas) disponibles (38, 54, 55).

La latencia en yemas de plantas leñosas puede vencerse por aplica - ción de giberelinas, citocininas o etileno, mismas que también son acti - vas en romper la latencia de semillas. Se ha observado que los niveles de giberelinas se incrementan con tratamientos de frío y que, en la ma - yoría de los casos, la aplicación de la hormona, elimina el requerimiento de frío y en algunos casos sustituye los requerimientos de fotoperiodos largos. Las especies que responden mejor a giberelinas aplicadas, in - cluyen aquéllas que normalmente presentan requerimientos de bajas temperaturas o de luz (62).

Wareing y Saunders (61), han sugerido que el efecto primario de la baja temperatura podría ser eliminar un bloqueo en la biosíntesis de gi - berelinas y que el incremento de éste grupo de hormonas es el resultado, es vez de la causa, de la eliminación de la latencia. Asimismo, se in - dica la posibilidad de que el ABA tenga un papel importante en el blo - queo de síntesis de giberelinas durante la inducción de latencia, por - que se ha observado que ABA reduce los niveles de giberelinas en coleóp - tilo de maíz y otros tejidos, sugiriendo una posible interacción de ABA con giberelinas, debido a que la aplicación de ésta última puede romper la latencia de jitomates y plantas leñosas.

Durante la latencia también ocurren cambios a nivel molecular, por ejemplo, la cromatina de yemas latentes muestra una capacidad disminuida para sintetizar RNA in vitro, reflejando, quizá una supresión de los genes. Por otra parte, se demostró que el ácido giberélico promueve ligeramente la síntesis de DNA y RNA y que el ABA bloquea dicha síntesis en tubérculos de yemas latentes de jitomate (11, 58).

Pearson y Wareing sugieren que es posible que el ABA promueva inhibición en la síntesis del DNA durante la inducción de latencia y que las giberelinas revierten este efecto al romper la latencia.

Los estudios sobre la latencia de semillas, muestran que hay un incremento en aminoácidos y síntesis de proteína durante el rompimiento de latencia mediante aplicación de GA_3 (20).

En la mayoría de los árboles, al aproximarse el fin de la latencia, disminuyen los niveles de inhibidores, principalmente el ABA. Sin embargo, no se han observado cambios en la actividad inhibitoria que puedan ser correlacionados con el fin de la latencia de yemas para el caso del manzano (61).

P A R T E E X P E R I M E N T A L

- Colecta de la muestra.

Las muestras de yemas florales, que se usaron en este trabajo, se obtuvieron de dos variedades hortícolas de manzano, con diferentes cumplimientos de horas frío, recolectadas en dos localidades del estado de Chihuahua.

Datos de las muestras

| variedad | <u>Rome</u> | <u>Beauty</u> | <u>Golden</u> <u>Delicious</u> |
|----------------------------------|--------------|---------------|--------------------------------|
| zona de muestreo en Chihuahua | Cd. Guerrero | Matachíc | Cd. Guerrero |
| fecha de colecta (1981) | 16 nov. | 17 nov. | 16 nov. |
| cumplimiento de horas frío | no | sí | sí |

Todos los árboles fueron provenientes de viveros. Las yemas se colectaron de las ramas del árbol conocidas como lamburdas y brindillas coronadas, con altura máxima de 2 metros. La edad de los árboles fue de 13 años.

Las muestras fueron proporcionadas por el Ing. Alberto Gameros. Provinieron de las huertas del Sr. Armando Terán (Cd. Guerrero) y del Sr. José Luis Chávez (Matachíc).

- Extracción de las hormonas vegetales.

Después de la colecta, las muestras de yemas florales se colocaron en metanol al 90% en frascos ámbar, forrados con papel aluminio.

Las yemas se contaron y se molieron en mortero usando metanol al 80% como solución de extracción (4), también se empleó arena para ayudar a la trituración de las yemas. Este extracto se unió al líquido donde se encontraba la muestra, se filtró por papel Whatmann no. 1. El residuo se secó en el horno a 110°C durante 7 horas y se pesó, tomando en cuenta la cantidad de arena empleada.

Del líquido filtrado se tomó una alícuota que se llevó a sequedad por evaporación al vacío en rotavapor, y se pesó. Se obtuvo así, el peso seco del residuo, el peso seco del filtrado y el peso seco total de la muestra.

- Purificación de las giberelinas.

a) Partición líquido - líquido.

El extracto metanólico se concentró, usando para ello, la destilación al vacío en rotavapor, a una temperatura menor de 50°C. Conforme se eliminaba el metanol, se añadía agua destilada hasta eliminar por completo el metanol y dejar a la muestra en agua destilada. Se ajustó el pH de la solución acuosa a 2.7 con HCl 5N para tener libre al ácido carboxílico de las giberelinas.

Se dejó en refrigeración (4°C) toda la noche, después se filtró por papel Whatmann no. 4 para eliminar las partículas insolubles.

Con éste filtrado se realizó la partición líquido - líquido (fig. 8), de acuerdo al método seguido por Barendse (4) con algunas modificaciones. Este método separa a los ácidos carboxílicos de compuestos no ácidos, aprovechando la solubilidad y la insolubilidad de éstos últimos en diferentes disolventes (18).

Después de la partición, se llevó a sequedad por evaporación al vacío en rotavapor, la fracción, en que, de acuerdo a la literatura, se encuentran las giberelinas (fracción IV). Dejándola así, lista para la cromatografía en columna de afinidad.

b) Cromatografía de afinidad.

Para la cromatografía en columna, se empleó el polímero polivinilpirrolidona (PVP), cuya forma insoluble se conoce comercialmente como Polyclar AT (Merck). Este material es efectivo en la purificación de sustancias con estructura semejante al giberelano, como son las giberelinas. El procedimiento que se siguió en esta purificación es el mismo descrito por Glenn en 1972 (27). Este método purifica a las giberelinas de extractos vegetales por eliminación selectiva de compuestos fenólicos y probablemente otros ácidos orgánicos, asimismo, es posible la separación de algunas giberelinas y también del ácido abscísico.

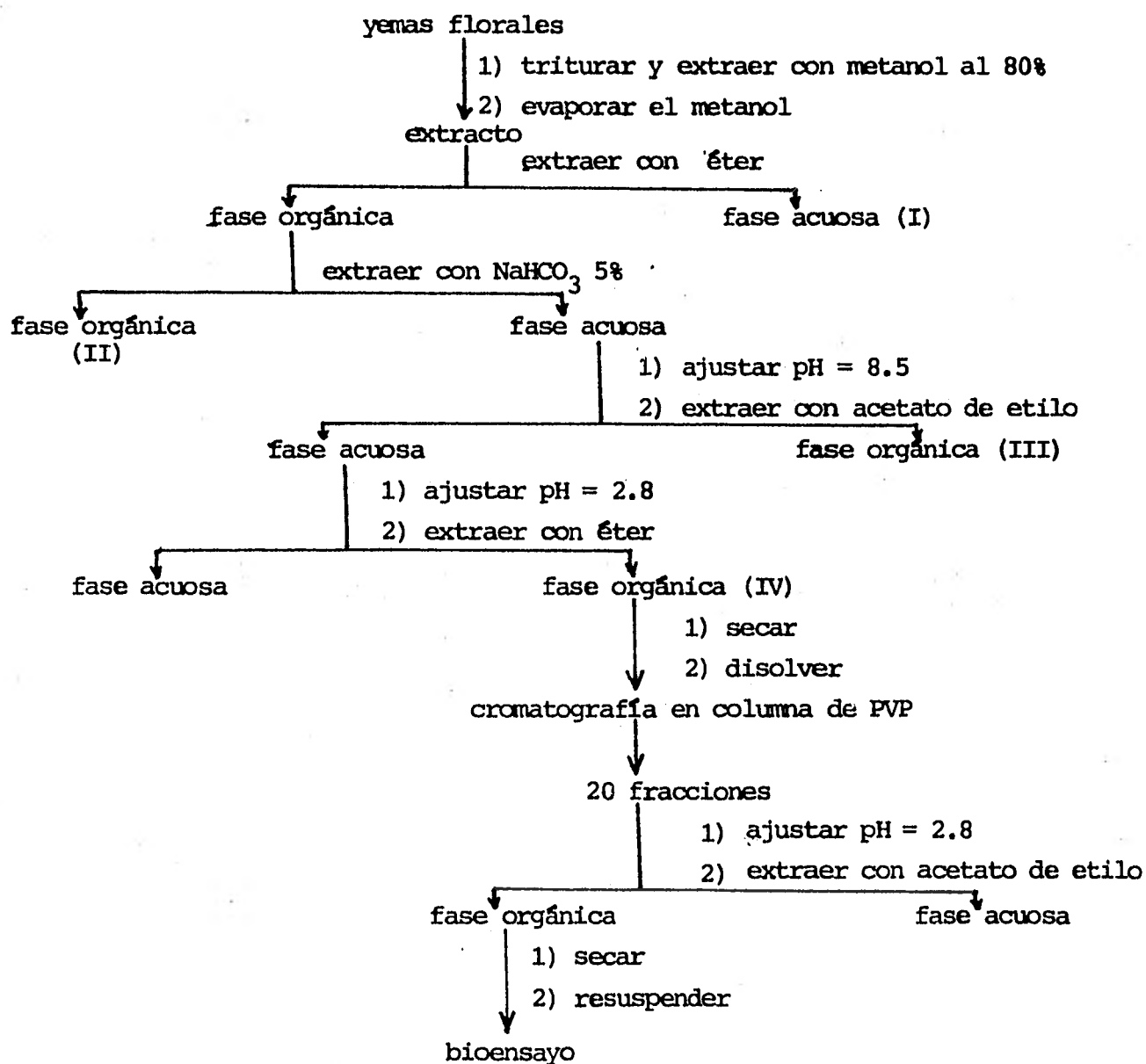


Fig. 8. Esquema del procedimiento seguido en la extracción y purificación de giberelinas libres de yemas florales de manzano.

El polyclar AT se procesó a través de una serie de mallas, la primera con un diámetro de poro de 250 nm., y la segunda con un diámetro de 200 nm. Se seleccionaron las partículas con un diámetro en el intervalo de 200 - 250 nm.

Se lavaron 20 gramos de estas partículas con agua destilada (1:5 - v/v), 7 veces, decantando las partículas finas cada 15 min. Se hizo un último lavado con solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M pH = 8, misma que se empleó como solución eluyente en la cromatografía.

Las dimensiones de la columna de cromatografía fueron de 30 x 2.5 cm. La velocidad de flujo fue de 250 ml/hora.

Para aplicar la muestra (fracción IV) a la columna, ésta se disolvió en 1 ml. de la solución amortiguadora, se aplicó a la columna y se llevó a cabo la cromatografía, obteniéndose 20 fracciones de 10 ml. cada una.

Las 20 fracciones se acidificaron individualmente con HCl 5N a un pH de 2.8. Cada una de las fracciones se extrajo con acetato de etilo (5:3 v/v) 5 veces. Las 5 fases orgánicas de cada fracción se juntaron y se llevaron a sequedad por evaporación al vacío en el rotavapor, para su posterior determinación de actividad biológica.

La preparación de estas fracciones para ser probadas en el bioensayo consistió en recuperar a cada una de ellas en un volumen igual de una mezcla de agua:etanol (8:2).

- Selección del bioensayo para giberelinas.

La facilidad con que las hormonas de extractos vegetales pueden detectarse por bioensayo, a llevado a ampliar su uso para la estimación - cuantitativa de estos compuestos, además de que dan indicación del comportamiento de la hormona sobre el crecimiento y desarrollo de la planta. Se han desarrollado diversos bioensayos para giberelinas, sin embargo, el comportamiento de este grupo de hormonas en los diferentes bioensayos no es igual, es decir, existen giberelinas más activas que otras en un bioensayo determinado.

En este trabajo se experimentaron diferentes bioensayos para giberelinas: el de hipocótilos de lechuga variedad G.L.-659 (25); el de plántulas de arroz var. Navolato (40); el de endospermos de cebada var. Celaya (31); y el de epicótilos de chícharo var. Early Perfection (37).

Los bioensayos de lechuga y arroz se descartaron, porque tanto la germinación como el crecimiento de estas plántulas fueron muy lentos, causando problemas de contaminación, principalmente por hongos. El bioensayo de endospermos de cebada dió buenos resultados, sin embargo, no fue posible procesar todas las muestras en un tiempo corto, para evitar grandes variaciones en los resultados. Se eligió el bioensayo de epicótilos de chícharo, por su sencillez y facilidad de manejo, además se obtuvo una buena germinación de las semillas (80% de germinación), el crecimiento de las plántulas fue rápido, sin problemas de contaminación y las respuestas de las plántulas hacia giberelinas fueron buenas.

- Bioensayo de epicotilos de chícharo.

El fundamento de este método consiste en la capacidad que presentan las giberelinas de revertir el efecto de inhibición del crecimiento que provoca la luz roja sobre plántulas de chícharo.

Obtención de las plántulas de chícharo.

Las semillas de chícharo (Pisum sativum var. Early Perfection) fueron adquiridas en PRONASE (Productora Nacional de Semillas).

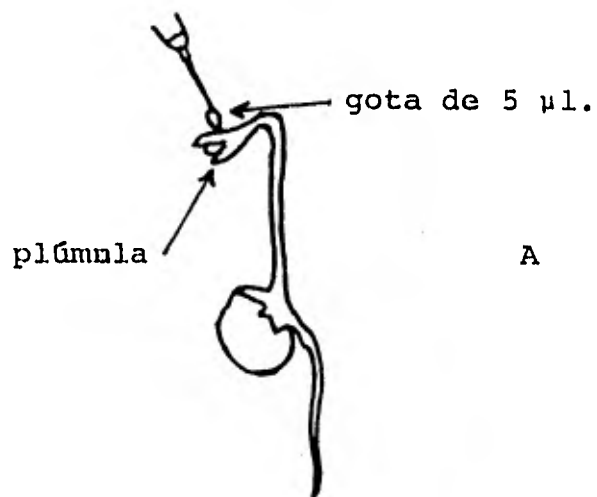
La latencia de las semillas se rompió exponiéndolas durante 8 días a la luz difusa. Después se remojaron en agua corriente por 24 horas, al final de las cuales, se escurrieron y se pusieron en agua con detergente durante 5 minutos, se enjuagaron y se dejaron en una solución de cloralex (1:20), agitándolas suavemente durante 15 minutos. Después se enjuagaron muy bien con agua destilada.

Las semillas se sembraron en charolas de aluminio de 40 x 20 cm. forradas con plástico, conteniendo una capa de agrolita húmeda previamente lavada y esterilizada, de un grosor de 1.5 cm., más o menos. Se cubrieron, las semillas, con otra capa de agrolita igual a la anterior. Las charolas se cubrieron con plástico para mantener húmedas a las semillas, y se mantuvieron en la obscuridad en una estufa de incubación con temperatura constante de $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, por 6 días aproximadamente. Al fin de este periodo, se seleccionaron las plántulas con altura de 2.5 a 2.7 cm. para realizar el bioensayo.

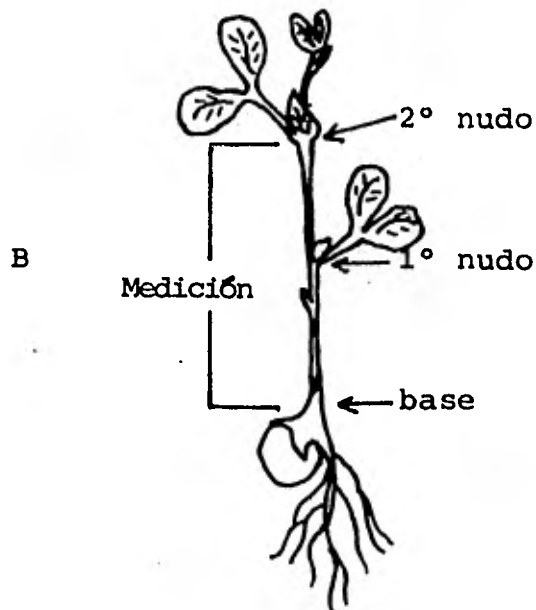
Procedimiento.

La técnica consistió en aplicar una gota de 5 μ l de la muestra en la parte de la plántula de chícharo conocida como plúmula (fig. 9A); colocar a las plántulas en una cámara con iluminación roja, obtenida con lámparas incandescentes General Electric de 10 watts, a una altura de 50 cm. con respecto a las plántulas manteniéndolas a una temperatura constante de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$; medir al quinto día a cada una de las plántulas, desde la base hasta el segundo nudo (fig. 9B). Cada una de las 20 fracciones, que se obtuvieron por cromatografía, se probó a 3 diferentes concentraciones con 8 ó 9 plántulas por tratamiento.

Para lograr cuantificar la actividad biológica equivalente a ácido giberélico (GA_3), se empleó una curva estándar que relaciona el porcentaje de incremento en longitud de la plántula ($\% \Delta \text{long.}$) con la concentración de GA_3 aplicada en ellas. Se usaron las siguientes concentraciones de GA_3 ; 2, 20 y 200 mg/l. Se usó giberelina A_3 (ácido giberélico) grado III, 90% mín. GA_3 para bioensayo. Sigma (pfs).



A



B

Fig. 9. Esquemas mostrando, A: aplicación de la muestra purificada de yemas florales en la plántula de chícharo, de 5 días de edad, B: medición para cuantificar giberelinas por medio del incremento en longitud de la sección de la plántula comprendida entre la base y el segundo nudo.

R E S U L T A D O S

En las figuras 10 a 12 se presentan los resultados graficados de los bioensayos de epicotilo de chícharo para cuantificar la actividad de las giberelinas libres en yemas florales de diferentes manzanos con distintos cumplimientos de horas frío. En el procedimiento de purificación, de cada muestra, se obtuvieron 20 fracciones de la misma, y cada una de ellas se probó a tres concentraciones diferentes. Las gráficas relacionan inhibición o estimulación en el crecimiento, representado por incremento en longitud de epicotilo de chícharo (% Along.), contra diferentes concentraciones del peso seco que se empleó de la muestra de yemas florales. En todos los casos, se formaron 4 grupos denominados como I, II, III y IV de 5 fracciones cada uno. Cada uno de estos grupos contiene determinados volumenes de elución, así, el grupo I contiene del mililitro 1 al 50, el grupo II del 51 al 100, el grupo III del 101 al 150 y el grupo IV del 151 al 200.

En la fig. 13 se muestra el tipo de curva estándar que se obtuvo en este tipo de bioensayo.

En la fig. 10, se presentan los resultados de las 20 fracciones que se obtuvieron con la muestra de yemas florales var. Rome Beauty, Matachic, que sí llenó los requerimientos de horas frío.

En general, las 20 fracciones, mostraron un efecto tendiente a estimular el crecimiento de las plántulas de chícharo.

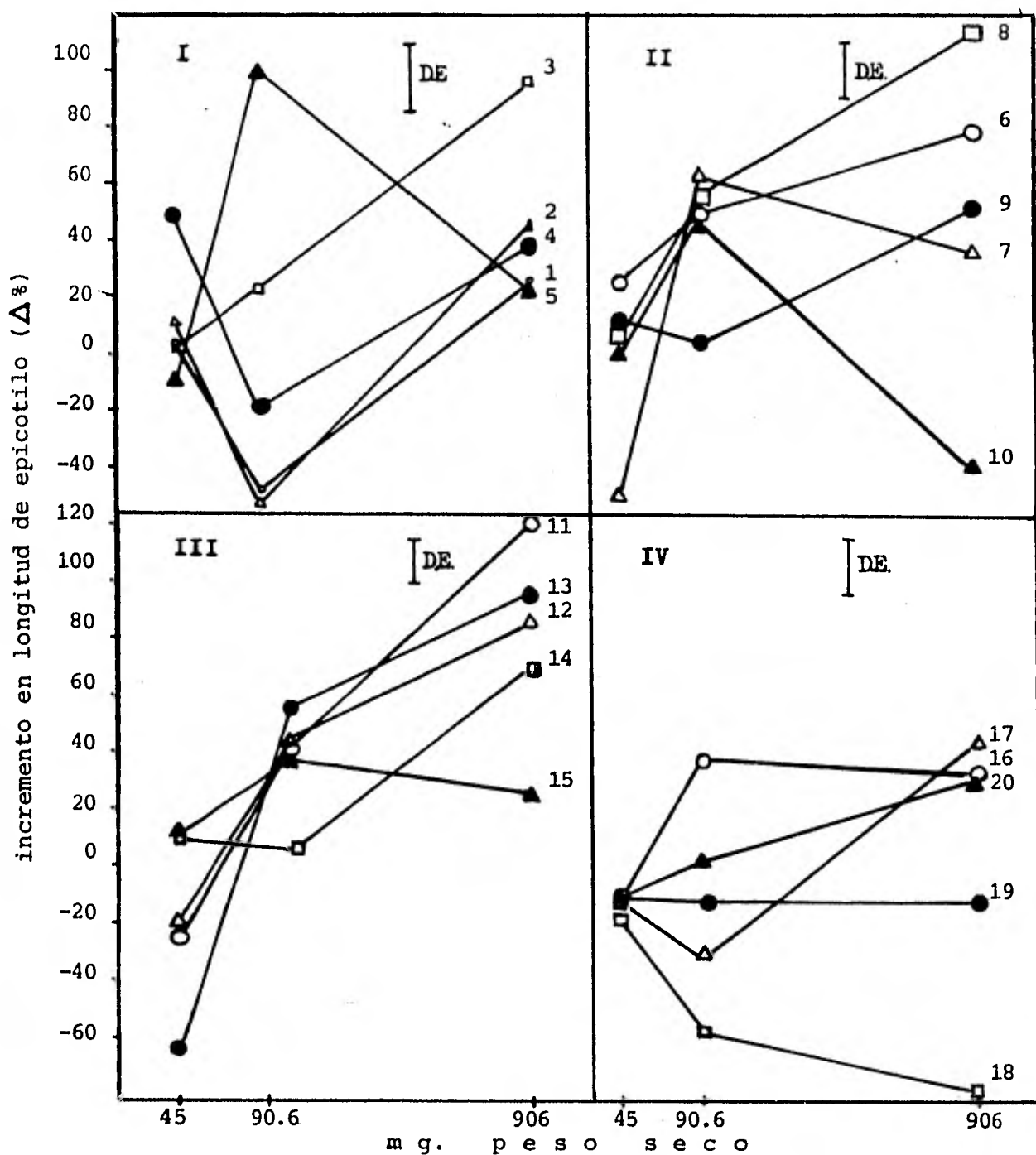


Fig. 10. Respuesta de plántula de chícharo para determinar actividad de giberelinas a diferentes concentraciones de la muestra, representada por el peso seco de yemas florales de manzano var. Rome Beauty, Matachic, con cumplimiento de horas-frío. La muestra se purificó por cromatografía en columna de PVP, obteniendo 20 fracciones, las cuales se dividieron en 4 grupos de 5 fracciones. Cada valor representa el promedio de 8 a 9 réplicas.

Grupo I. Las fracciones 1 y 2 presentaron inhibición al crecimiento. La fracción 5 presentó un máximo de actividad estimulante en la concentración intermedia, que equivale a 91 mg de peso seco de las yemas, con un incremento de 100.59%. La fracción 3 presentó su máximo de actividad estimulante a la concentración mayor, o sea, 906 mg peso seco, con un incremento en la longitud del epicotilo de 96.15%.

Grupo II. Las fracciones 6 y 8 estimularon el crecimiento a la menor concentración, siendo ésta de 45 mg de peso seco de las yemas, con incre -mentos de 78.11% y 114.38% respectivamente. La fracción 10 presentó inhi -bición del crecimiento.

Grupo III. Se presentó una estimulación del crecimiento con la mayor concentración, 906 mg de peso seco, en las fracciones 11, 12 y 13, con incre -mentos de longitud de 121.94%, 87.39% y 96.89% respectivamente.

Grupo IV. Hubo mayor estimulación del crecimiento con la fracción 16 a la concentración de 91 mg de peso seco de las yemas, con un incremento -de 45.95%. La mayor actividad inhibitoria se obtuvo con la fracción 18 a la concentración de 906 mg de peso seco y provocó una inhibición al cre -cimiento de 80.14%.

En la fig. 11 se presentan los resultados obtenidos con la muestra -de yemas florales var. Rome Beauty, Cd. Guerrero, cuyo requerimiento de ho -ras frío no se satisfizo.

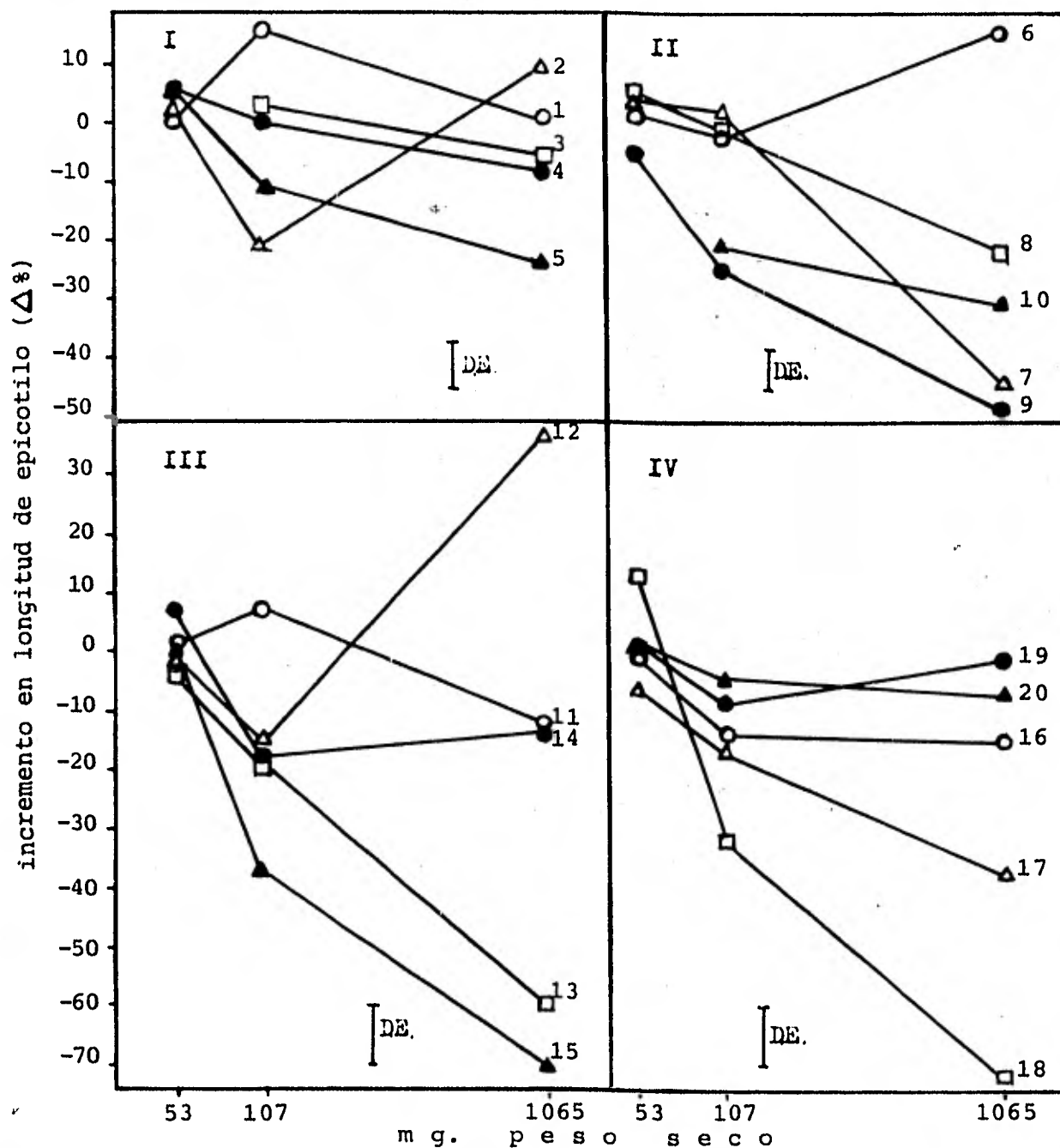


Fig. 11. Respuesta de la plántula de chícharo para determinar actividad de giberelinas a diferentes concentraciones de la muestra, representada por el peso seco de yemas florales de manzano var. Rome Beauty, Cd. Guerrero, sin cumplimiento de horas frío. La muestra se purificó por cromatografía en columna de PVP, obteniendo 20 fracciones, las cuales se dividieron en 4 grupos de 5 fracciones. Cada valor representa el promedio de 8 a 9 réplicas.

Se observa que en las 20 fracciones existe una tendencia a ejercer un efecto de inhibición al crecimiento más que de estímulo.

Grupo I. Las fracciones 1 y 2 presentaron un ligero estímulo en el crecimiento, de 16.61% y 10.13%, a las concentraciones de 107 y 1066 mg, respectivamente. La fracción 5 presenta una inhibición de 24.84% al crecimiento.

Grupo II. La mayor actividad estimulante del crecimiento se presentó con la fracción 6, siendo ésta de 16.91% a la concentración mayor, o sea, 1066 mg de peso seco. Las fracciones 7 y 9 también a esa concentración inhibieron el crecimiento en un 44.33% y 48.70%, respectivamente.

Grupo III. En este grupo, la única fracción que estimuló el crecimiento fue la 12, con un incremento de 37.09% a la concentración de 1066 mg de peso seco. Las fracciones 13 y 15 dan una marcada inhibición al crecimiento a la concentración mayor que es de 1066 mg de peso seco, provocando una inhibición de 59.99% y 69.99% respectivamente.

Grupo IV. Todas las fracciones presentes en este grupo mostraron inhibición al crecimiento, siendo más marcada en las fracciones 17 y 18 con inhibiciones de 38.15% y 72.56%, a la mayor concentración de peso seco.

La fig. 12 presenta los resultados de las 20 fracciones de la muestra de yemas florales de manzano var. Golden Delicious, Cd. Guerrero, cuyo requerimiento de horas frío sí se llenó.

En este caso, se observa que las respuestas de las fracciones tienden a estimular el crecimiento de las plántulas de chícharo.

Grupo I. La fracción 4 estimula el crecimiento en un 29.25%, con la concentración mayor, de 1580 mg de peso seco. La fracción 5 también estimula el crecimiento en un 58.12% con la concentración de 316 mg de peso seco. La fracción 3 presentó una inhibición del crecimiento de 41.25% a la concentración de 316 mg de peso seco.

Grupo II. Las fracciones 6, 7, 8 y 10 estimularon el crecimiento en forma muy semejante entre sí, con incrementos entre 36.58% y 46.52%, a la mayor concentración, 1580 mg de peso seco.

Grupo III. Las fracciones 11 y 13 fueron las que estimularon más al crecimiento, con incrementos de 183.88% y 133.21% respectivamente, a la concentración de 1580 mg de peso seco. Las fracciones 12 y 15 también estimularon el crecimiento en un 53.32% y 33.09% respectivamente, a la concentración de 1580 mg de peso seco.

Grupo IV. Las fracciones 16 y 18 fueron las que estimularon el crecimiento a la concentración de 1580 mg de peso seco, con incrementos de 47% y 41.29% respectivamente.

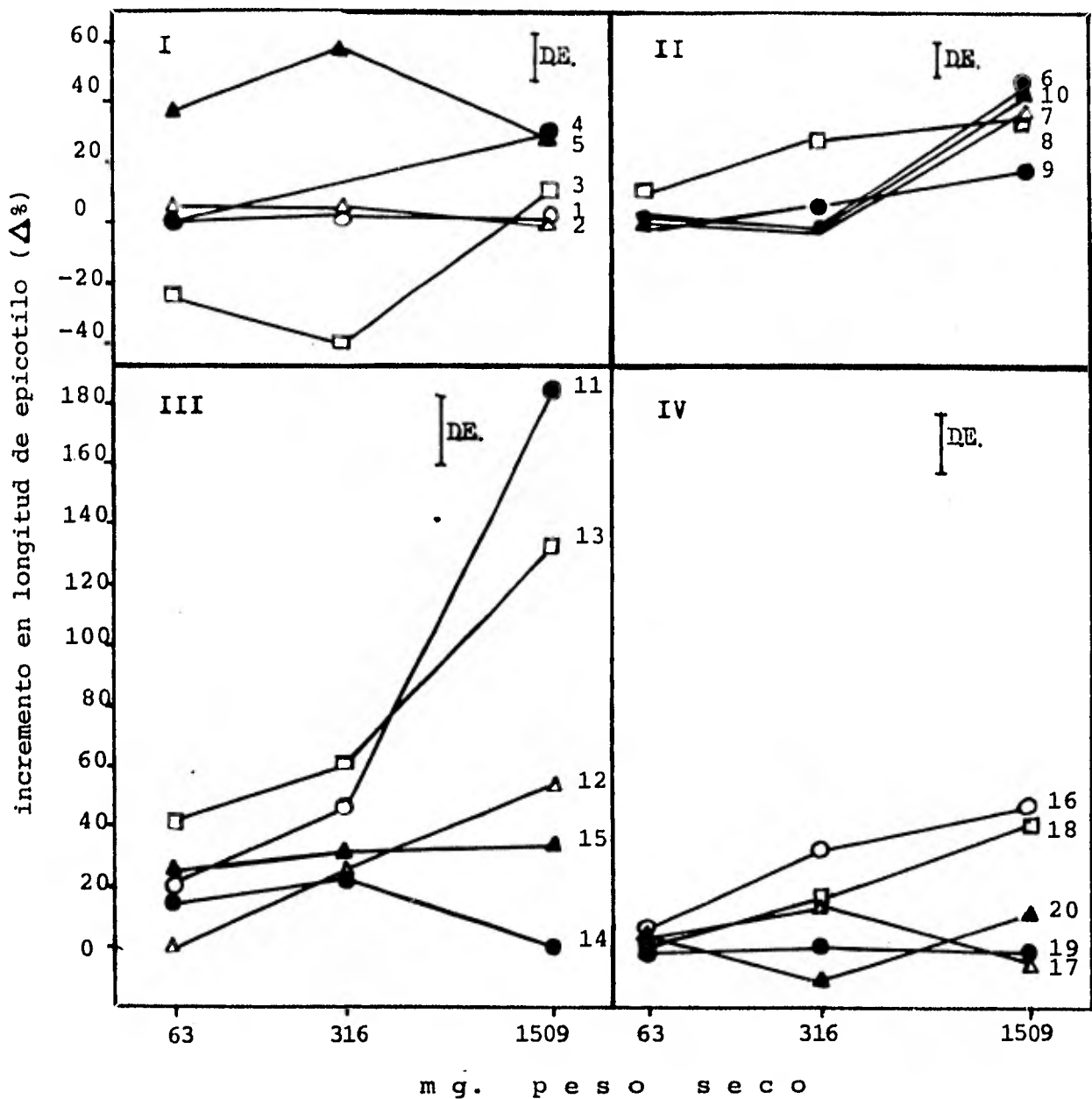


Fig. 12. Respuesta de plántula de chícharo para determinar actividad de giberelinas a diferentes concentraciones de la muestra, representada por el peso seco de yemas florales de manzano var. Golden Delicious, Cd. Guerrero, que sí cumplió con su requerimiento de horas frío. La muestra se purificó por cromatografía en columna de PVP, obteniéndose 20 fracciones, las cuales se dividieron en 4 grupos de 5 fracciones. Cada valor representa el promedio de 8 a 9 réplicas.

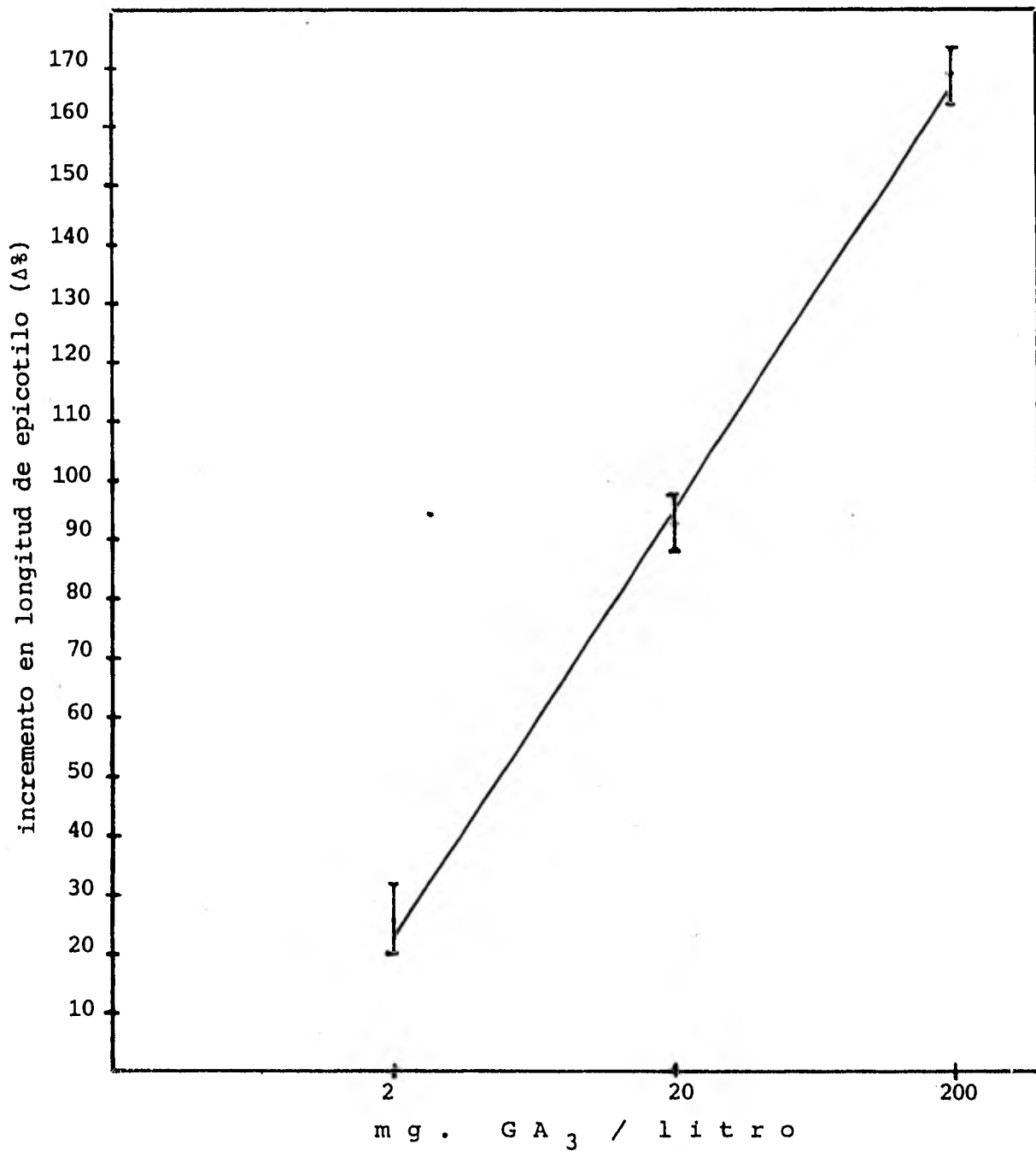


Fig. 13. Curva estándar para el bioensayo de chícharo, que relaciona el incremento en longitud del epicotilo (Δ%) con diferentes concentraciones de ácido giberélico aplicada en las plántulas de chícharo.

En la fig. 14 se presenta el contenido de giberelinas equivalentes a GA_3 en las diferentes fracciones de las muestras de yemas florales de manzano. Se tomaron en cuenta sólo las fracciones que produjeron incrementos en crecimiento mayores al 15% en el bioensayo de chícharo. Se observa que la variedad Rome Beauty, Matachic, estimuló más el crecimiento en las fracciones 5, 7 y 16, y casi todas las fracciones de los grupos II y III también lo estimularon. La variedad Rome Beauty, Cd. Guerrero, sólo estimuló el crecimiento en las fracciones 6 y 12, en las demás fracciones se observó inhibición al crecimiento. Por último, la variedad Golden Delicious, Cd. Guerrero, presentó como fracciones más activas en estimular el crecimiento, a las fracciones 5, 11 y 13. La concentración total de las giberelinas encontrada para esta variedad fue la mayor en comparación con las otras dos variedades. La variedad con el contenido más bajo fue la Rome Beauty, Cd. Guerrero, que no llenó su requerimiento de horas frío.

En la tabla 1, vemos que las yemas florales de la variedad Rome Beauty, Matachic, que sí llenó su requerimiento de frío, contiene 474 ± 90 ng equivalentes a GA_3/g peso seco, en cambio, la misma variedad pero de Cd. Guerrero que no cumplió con sus horas frío, presentó 28 ± 7 ng equivalentes a GA_3/g peso seco de yemas florales. La variedad Golden Delicious de Cd. Guerrero que sí llenó su requerimiento de horas frío, presentó la mayor concentración de giberelinas: 1458 ± 267 ng equivalentes a GA_3/g peso seco, siendo ésta más alta que la concentración encontrada para la variedad Rome Beauty de Matachic, que también cumple con su requerimiento de horas frío.

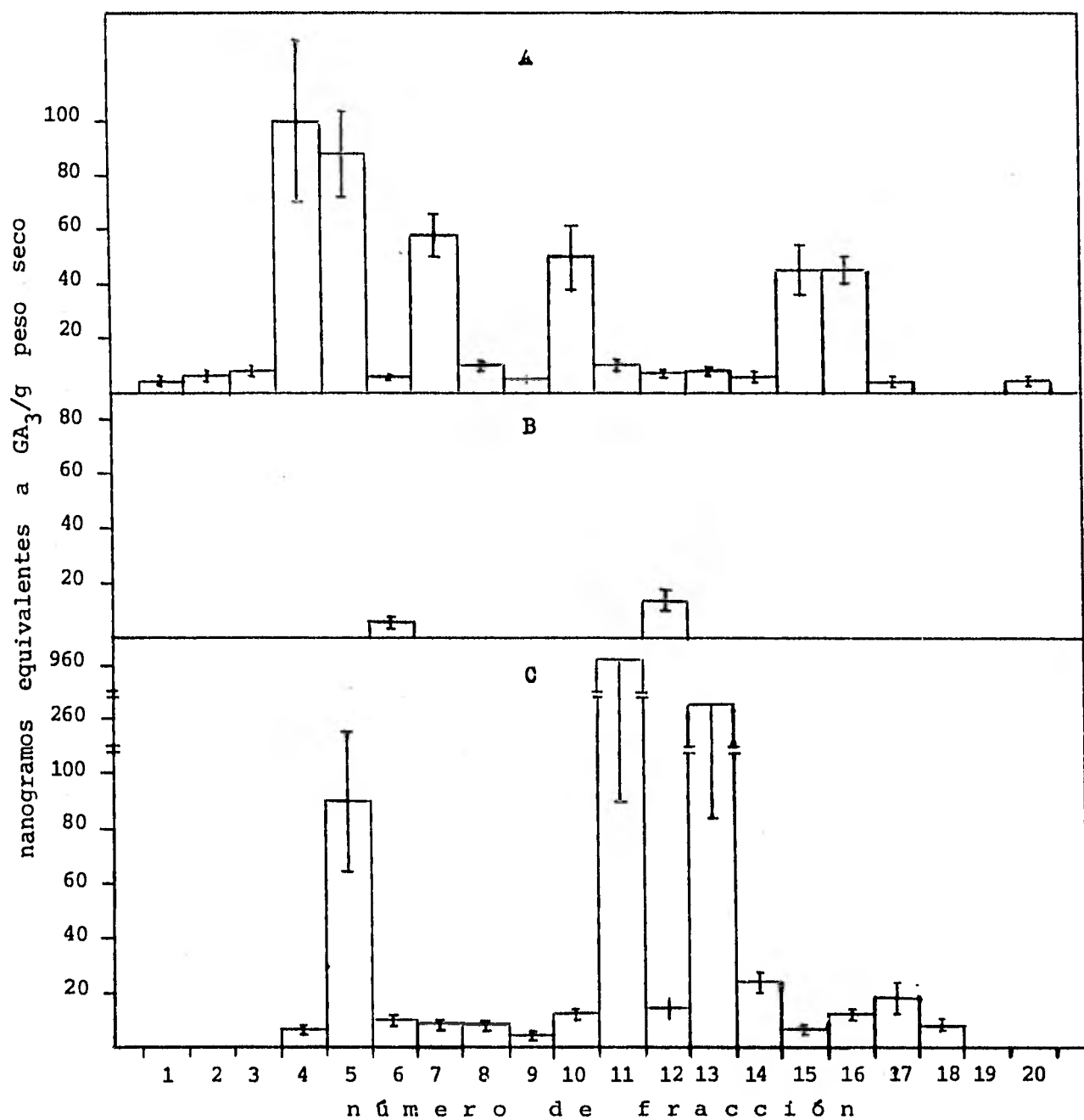


Fig. 14. Contenido de equivalentes de GA₃ en cada una de las fracciones obtenidas por cromatografía en columna de PVP de muestras de yemas florales de manzano que estimularon el crecimiento más del 15% en el bioensayo de epicotilo de chícharo. A: var. Rome Beauty, Matachic, con cumplimiento de horas frío. B: var. Rome Beauty, Cd. Guerrero, que no llenó su requerimiento de horas frío. C: var. Golden Delicious, Cd. Guerrero, que sí cumplió sus horas frío.

Tabla 1. Número, peso seco y contenido equivalente a GA₃ (determinado por bioensayo de chícharo) de yemas florales de tres variedades de manzanos con diferentes cumplimientos de horas - frío.

| variedad | R o m e Matachic | B e a u t y Cd. Guerrero | Golden Delicious Cd. Guerrero |
|--|---------------------|-----------------------------|----------------------------------|
| cumplimiento de horas frío | sí | no | sí |
| número de yemas | 587 | 443 | 535 |
| peso seco total (gramos) | 13.3 | 11.8 | 16.9 |
| peso seco/yema (mg) | 23 | 27 | 32 |
| eq GA ₃ /g peso seco (nanogramos) | 474 ± 90 | 28 ± 7 | 1458 ± 267 |
| eq GA ₃ /yema (nanogramos) | 10.9 | 0.76 | 46.66 |

D I S C U S I O N

- Purificación.

Los extractos de tejidos vegetales, empleados en el estudio de hormonas vegetales, contienen una mezcla de hormonas, como son las auxinas, giberelinas, citocininas, ácido abscísico y otras sustancias inhibidoras como son los compuestos de tipo fenólico, que pueden interferir en el estudio de la hormona deseada, por ésto, es necesario recurrir a procedimientos que permitan la purificación de las diferentes hormonas. Con los métodos de purificación empleados en este trabajo, se logró obtener fracciones purificadas de las muestras de yemas florales de manzanos, que presentaron actividad de giberelinas en el bioensayo de epicotilo de chícharo.

La técnica inicial empleada para purificar las giberelinas libres, fue la partición entre disolventes acuosos y orgánicos, lo que permitió la eliminación de algunas hormonas, como citocininas y auxinas, así como de glucósidos de las mismas giberelinas. Esta técnica, aprovecha, las propiedades de solubilidad que presentan las giberelinas en los disolventes a diferentes valores de pH, permitiéndo reducir el peso del extracto para emplearlo en una purificación posterior, como es la cromatografía.

En este trabajo, se empleó la cromatografía de afinidad en columna, usando como fase estacionaria al polímero polivinilpirrolidona (PVP), este material, por su elevada afinidad por compuestos fenólicos, ha contribuido en gran parte a la purificación de las giberelinas, debido a que un gran porcentaje de la actividad inhibitoria, presente en extractos vegetales, es debida a compuestos fenólicos. En virtud de que la polivinilpirrolidona, separa a las sustancias en base a la polaridad de éstas, es posible separar de entre sí a algunas giberelinas, además de eliminar a los inhibidores de tipo fenólico.

Las fracciones obtenidas de muestras de yemas florales de manzano, por este tipo de cromatografía, presentaron el mayor estímulo al crecimiento en el bioensayo de chícharo, en el volumen de elución 100 a 150 ml. (grupo de fracciones III).

Ya que se han reportado hasta la fecha 57 giberelinas (48), se siguieron ciertos criterios para una selección preliminar de las posibles giberelinas presentes en yemas de manzano. Los criterios son los siguientes:

1. Eliminar a las giberelinas de 20 átomos de carbono que presentan una hidroxilación única en posición 13, ya que ésta sólo se ha reportado para el hongo G. fujikuroi (35). En esta clase, tenemos a las giberelinas:

GA_{13} , GA_{14} y GA_{36} .

2. Eliminar a las giberelinas que se han reportado únicamente en G. fujikuroi y no en plantas superiores, como son las giberelinas: GA_{10} , GA_{11} , GA_{12} , GA_{15} y GA_{16} (35).

3. Rearreglar las 48 giberelinas restantes en vase a la presencia o ausencia del grupo hidroxilo en posición 13, ya que, de este grupo depende el volumen de elución de las giberelinas de la columna de cromatografía (27). Por lo tanto, las primeras giberelinas en eluirse serían las que sí poseyeran el grupo -OH en posición 13, y serían: GA₁, GA₂, GA₃, GA₅, GA₆, GA₈, GA₁₇ a GA₂₃, GA₂₈, GA₂₉, GA₃₂, GA₃₈, GA₄₄, GA₅₃ y GA₅₅ a GA₅₇. Las giberelinas que se eluirían después serían las que no tuvieran el grupo -OH en dicha posición, y serían: GA₄, GA₇, GA₉, GA₂₆, GA₂₇, GA₃₀, GA₃₁, GA₃₃ a GA₃₇, GA₃₉ a GA₄₃, GA₄₅ a GA₅₂ y GA₅₄.

4. Comparar los volúmenes de elución de las giberelinas obtenidas, por cromatografía en columna, con los intervalos de detección reportados por otros autores para giberelinas.

Glenn, determinó el volumen de elución para 8 giberelinas en las mismas condiciones experimentales, empleadas en este trabajo, encontrando los siguientes volúmenes de elución e intervalos de detección (27):

| giberelina | vol. elución | intervalo de detección |
|---|--------------|------------------------|
| GA ₈ , GA ₁₃ | 85 ml. | 60 - 110 ml. |
| GA ₁ , GA ₃ , GA ₅ | 90 ml. | 70 - 120 ml. |
| GA ₉ | 110 ml. | 80 - 140 ml. |
| GA ₄ , GA ₇ | 120 ml. | 90 - 160 ml. |

El volúmen de elución en el que se encontró una mayor actividad de giberelinas, en los extractos de yemas de manzano, fue el interválo de 100 a 150 ml, que es semejante al reportado por Glenn para algunas giberelinas (27).

Como resultado de los criterios seguidos, se puede pensar que, entre las posibles giberelinas presentes en las yemas de manzano, estarían GA₁, GA₃, GA₅, GA₄, GA₇ y GA₉. Como puntos de apoyo a esta primera selección es importante mencionar, que, en estudios hechos con semillas de manzano (16), se ha encontrado la presencia de GA₄, GA₇ y GA₉. Aunque es probable que estas mismas giberelinas puedan no encontrarse en yemas, debido a que las giberelinas van sufriendo interconversiones durante el ciclo de vida de una planta.

- Giberelinas y cumplimiento de horas - frío.

El fenómeno de latencia implica un equilibrio entre sustancias estimulantes e inhibitoras, como lo han sugerido Wareing y Saunders (6). La forma en que el frío podría intervenir en ese equilibrio sería: a) eliminar algún bloqueo existente en la biosíntesis de giberelinas y/o b) inducir la interconversión de giberelinas conjugadas hacia giberelinas libres (activas). También se ha pensado en una posible movilización de las giberelinas hacia el sitio donde actúan.

- Comparación de los niveles de giberelinas en yemas de manzano.

Se ve que las yemas florales de la variedad Rome Beauty, Matachic, (tabla 1) que sí cumplió con su requerimiento de horas frío, contiene más equivalentes de GA_3/g peso seco, que la misma variedad, pero de Cd. Guerrero, que no llenó con su requerimiento de horas frío. Las yemas de la variedad Golden Delicious, que sí cumplió sus horas frío, presenta un contenido de equivalentes de GA_3/g peso seco, mayor que la variedad Rome Beauty, Matachic.

Analizando los resultados de la misma variedad de manzano, Rome Beauty, con y sin cumplimiento de horas frío, vemos que hay una actividad inhibitoria mayor en la muestra que no llenó sus horas frío (fig. 12), que el otro caso, donde sí se cumplieron (fig. 11). Probablemente, este fenómeno se deba a que las yemas de la variedad Rome Beauty, Cd. Guerrero, - contienen inhibidores de tipo fenólico en gran cantidad, por lo que algunos de ellos logran eluirse de la columna de cromatografía, entre estos inhibidores puede estar el ácido abscísico ya que presenta un volumen de elución muy cercano al de las giberelinas (27).

Puede verse que hay relación entre el contenido de giberelinas y la cantidad de frío recibida, ya que esta cantidad es mayor cuando sí se llena el requerimiento de horas frío, y que aumenta la cantidad de inhibidores cuando no se satisface dicho requerimiento.

Comparando las dos variedades de manzano que sí llenaron sus horas frío requeridas, se puede ver claramente que la concentración de giberelinas depende de la variedad de manzano de que se trate. Una posible explicación para esto podría ser que las giberelinas de las yemas florales de manzano variedad Rome Beauty son diferentes a las que contiene la variedad Golden Delicious, por lo que presentan una potencia diferente en el bioensayo de epicotilo de chícharo, ya que, como se mencionó anteriormente, las giberelinas muestran un grado de actividad biológica diferente según el bioensayo en que se prueben, y en un mismo bioensayo, no todas las giberelinas tienen la misma potencia, es más, si en un mismo bioensayo se cambia la variedad vegetal en que se están probando las giberelinas, la respuesta es diferente. Hasta la fecha se han desarrollado 33 bioensayos para giberelinas (3), por lo que para dar resultados más concluyentes acerca de las posibles giberelinas presentes en yemas de manzano, sería conveniente probar estas mismas muestras en otros bioensayos.

CONCLUSIONES

1. Se describieron los métodos a seguir para la extracción, purificación y detección de las giberelinas.

a) Como métodos de purificación, fueron la partición líquido líquido y la cromatografía en columna con polivinilpirrolidona.

b) Se seleccionó un método para detectar la actividad de giberelinas, siendo éste, el bioensayo de epicotilo de chícharo por su sencillez de manejo y buena respuesta.

c) Se estableció la cantidad de tejido vegetal mínimo, para detectar actividad de giberelinas por el método antes citado, siendo ésta de 15 g de peso seco que equivale a 500 yemas aproximadamente.

2. Se logró cuantificar a las giberelinas activas (libres), presentes en yemas de manzanos, con diferente cumplimiento de horas frío. Aunque no fue posible establecer la estructura química de las mismas.

a) La variedad de manzano Rome Beauty, Matachic, presentó 474 ± 90 ng equivalentes a GA_3/g peso seco en sus yemas, en este caso el requerimiento de frío sí se llenó.

b) Las yemas de la variedad Rome Beauty, Cd. Guerrero, cuyo requerimiento de frío no se cumplió, presentó 28 ± 7 ng eq. GA_3/g peso seco. En esta variedad se observó una mayor actividad inhibitoria, en el bioensayo de epicotilo de chícharo.

c) Las yemas de la variedad Golden Delicious, Cd. Guerrero, que sí llenó su requerimiento de horas frío, contuvo 1458 ± 267 ng eq. GA_3/g peso seco.

3. Los niveles de giberelinas presentes en yemas florales parecen estar relacionados directamente con la cantidad de horas - frío que recibe el manzano, ya que se ven incrementados cuando el árbol satisface su requerimiento de horas - frío.

4. El contenido de giberelinas fue diferente entre las dos variedades de manzano estudiadas.

5. En investigaciones futuras sería conveniente seguir la misma metodología descrita y probada aquí, para cuantificar niveles de giberelinas en las mismas yemas de manzano pero en etapas diferentes dentro del mismo estado de latencia, para profundizar más en el estudio de cómo se relacionan los niveles de giberelinas con la cantidad de frío recibida por el árbol y con el rompimiento de latencia.

B I B L I O G R A F I A

1. Abbott, D.L. (1970), The role of budscales in the morphogenesis and dormancy of the apple fruit bud, pp 65 - 80. In L.C. Luckwill and C.V. Cutting (eds), "Physiology of tree crops", Academic, London.
2. Alvarez, R.S. (1974), El manzano, 3° edición. Publicaciones de extensión agrícola. Madrid, España.
3. Bailiss, K.W. and T.A. Hill (1971), Biological assays for gibberellins. Bot. Rev., 37: 437 - 479.
4. Barendse, G.W.M., H. Kende and A. Lang (1968), Fate of radioactive GA₁ in maturing and germinating seeds of peas and Japanese morning glory. Plant Physiol., 43: 815 - 822.
5. Bennett, D.A. and M.J. Chrispeels (1972), De novo synthesis of ribonuclease and β -1,3-glucanase by aleurone cells of barley. Plant Physiology, 49: 445 - 499.
6. Bijhouwer J. (1924), De periodiciteit van de Knopontwikkeling bij den appel. Meded. LandbHoogesch. Weningen, 27: 1 - 64.
7. Birch, A.J., R.W. Richards and H. Smith (1958), The role of gibberellinic acid. Proc. Chem. Soc., 192 - 193.
8. Calderón, E. (1976), La poda de árboles frutales. 2° edición. Ed. particular del autor. México.

9. Ceccarelli, N., R. Lorenzi and A. Alpi (1981), Kaurene metabolism in cell-free extracts of Phaseolus coccineus suspensors, *Plant Science Letters*, 21: 325 - 332.
10. Chrispeels, M.J. and J.E. Varner (1967 a), Gibberellic acid-enhanced synthesis and release of α -amilase and ribonuclease by isolated barley aleurone layers. *Plant Physiol.*, 42: 398 - 406.
11. Clegg, M.D. and L. Rappaport (1970), Regulation of bud rest in tubers of potato *Solanum tuberosum* L. *Plant Physiol.*, 45: 8 - 13 y 33 - 36.
12. Cross, B.E., K. Norton and J.C. Stewart (1968 b), The biosynthesis of the gibberellins, part III. *J. Chem. Soc. C.*, 1054 - 1063.
13. Crozier, A., C.C. Kuo, R.C. Durley and R.P. Pharis (1970), The biological activities of 26 gibberellins in nine plant bioassays. *Can. J. Bot.*, 48: 867 - 877.
14. Curtis, P.J. and B.E. Cross (1954), Gibberellic acid, a new metabolite from the culture filtrates of Gibberella fujikuroi. *Chem. Ind.*, 1066.
15. D'Esclapon G. de R. (1970), Variedades americanas de manzana. Nueva Enciclopedia de Agricultura. Oikos - Tau ediciones. Barcelona, España.
16. Dennis, F.J. Jr. (1976), Gibberellin-like substances in apple seeds and fruit flesh. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 101: 629 - 633.
17. Dunlap, J.R. and P.W. Morgan (1977), Reversal of induced dormancy in lettuce by ethylene, kinetin and gibberellic acid. *Plant Physiol.*, 60: 222 - 224.

18. Durley, R.C. and R.P. Pharis (1972), Partition coefficients of 23 gibberellins, *Phytochem.*, 11: 317 - 326.
19. Eccher, T. and G. Boffelli (1981), Effects of dose and time of application of GA₄₊₇ on russetting, fruit set and shape of "Golden Delicious" apples. *Scientia Horticulturae*, 14: 307 - 314.
20. Edwards, M. (1976), Dormancy in seeds of Charlock (*Sinapis arvensis* L.) *Plant Physiol.*, 58: 626 - 630.
21. Esau, K. (1965), *Plant Anatomy*, 2° ed. Ed. Wiley. New York, U.S.A.
22. Fábregas, J.R. (1964), *Cultivo del manzano*. Ed. Síntes. Barcelona, España.
23. Fall, R.R. and C.A. West (1971), Purification and properties of kaurene synthetase from *Fusarium moniliforme*. *J. Biol. Chem.*, 246: 6913 - 6929.
24. Fisher, J.B. (1976), Induction of juvenile leaf form in a palm (*Caryota mitis*) by gibberellin. *Bull. of the torrey botanical club.*, 103: 153 - 157.
25. Frankland, B. and P.F. Wareing (1960), Effect of gibberellic acid on hypocotyl growth of lettuce seedlings. *Nature*, 185: 255 - 256.
26. Gil-Albert V.F. (1980), *Tratado de arboricultura frutal*, vol I. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España.
27. Glenn, J.L., C.C. Kuo, R.C. Durley and R.P. Pharis (1972), Use of insoluble polyvinylpyrrolidone for purification of plant extracts and chromatography of plant hormones. *Phytochem.*, 11: 345 - 351.

28. Graebe, J.E., D.H. Bowen and J. MacMillan (1972), The conversion of mevalonic acid into gibberellin A₁₂-aldehyde in a cell-free system from Cucurbita pepo. Planta, 102: 261 - 271.
29. Hedden, P., J. MacMillan and B.O. Phinney (1978), The metabolism of the gibberellins. Ann. Rev. Plant Physiol., 29: 149 - 191.
30. Jacobsen, J.V. and J.E. Varner (1967), Gibberellic acid-induced synthesis of protease by isolated aleurone layers of barley. Plant - Physiol., 42: 1596 - 1600.
31. Jones, R.L. and J.E. Varner (1967), The bioassay of gibberellins. Planta, 72: 155 - 161.
32. Juscafresa, B. (1973), Arboles frutales, cultivo y explotación comercial, 4° edición. Ed. Aedos. Barcelona, España.
33. Katsumi, M., B.O. Phinney, P.R. Jeffries and C.A. Hendrick (1964), Growth response of the d-5 and an-1 mutants of maize to some kaurene derivatives. Science, 144: 849 - 850.
34. Kurosawa, E. (1926), Experimental studies on the secretion of Fusarium heterosporum on rice plants. Trans. Nat. Hist. Soc. Formosa, 16: 213 - 227.
35. Lang, A. (1970), Gibberellins: structure and metabolism. Ann. Rev. Plant Physiol., 21: 537 - 570.
36. Leopold, A.C. (1975), Plant growth and development. 2° ed. Mc. Graw-Hill Book Co., Inc. New York, U.S.A.

37. Lockhart, J.A. (1956), Reversal of the light inhibition of pea stem growth by the gibberellins. Proc. Natl. Acad. Sci., 42: 841 - 848.
38. Nadeau, R. and L. Rappaport (1972), Uptake and metabolism of ^3H gibberellin A_1 by barley aleurone layers; response of abscisic acid. Planta (Berl.), 107: 315 - 324.
39. Nadeau, R. and L. Rappaport (1972), Metabolism of gibberellin A_1 in germinating bean seeds. Phytochemistry, 11: 1611 - 1616.
40. Ogawa, Y. (1953), Studies on the conditions for gibberellin assay - using rice seedlings. Plant Cell Physiol., 4: 227 - 237.
41. Ogura, K., T. Shinka and S. Seto (1972), The purification and properties of geranyl-geranyl pyrophosphate synthetase from pumpkin fruit. J. Biochem., 72: 1101 - 1108.
42. Paleg, L.G. (1965), Physiological effects of gibberellins. Ann. Rev. Plant Physiol., 16: 291 - 322.
43. Patterson, R.J. and L. Rappaport (1974), The conversion of gibberellin A_1 to gibberellin A_8 by a cell-free enzyme system. Planta (Berl.), 119: 183 - 191.
44. Patterson, R.J., L. Rappaport and R.W. Breidenbach (1975), Characterization of an enzyme from Phaseolus vulgaris seeds which hydroxylates GA_1 to GA_8 . Phytochem., 14: 363 - 368.
45. Pharis, R.P. (1975), Promotion of flowering in conifers by gibberellins. Forestry Chronicle, 51: 6.

46. Pollard, C.J. (1969), Incorporation of kaurenoic acid into gibberellins by chloroplast preparations of Brassica oleracea, *Phytochem.*, 8: 831 - 837.
47. Rappaport L. and P. Adams (1978), Gibberellins: synthesis, compartmentation and physiological process. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, 284: 521 - 539.
48. Rappaport L. (1981), *Comunicación personal*.
49. Sawada, K. (1912), Diseases of agricultural products in Japan. *Fomosa Agr. Rev.*, 63: 16.
50. Sood, V. and K.K. Nanda (1979), Effect of gibberellic acid and monophenols on flowering of Impatiens balsamina in relation to the number of inductive and non-inductive photoperiodic cycles. *Physiol. Plant*, 45: 250 - 254.
51. Stoddart, J.L. (1969), Incorporation of kaurenoic acid into gibberellin by chloroplast preparations of Brassica oleracea. *Phytochem.*, 8: 831 - 837.
52. Stoddart, J.L., W. Breidenbach, R. Nadeau and L. Rappaport (1974), Selective binding of ^3H gibberellin A_1 by protein fractions from dwarf pea epicotyls. *Proc, Natl. Acad. Sci.*, 71: 3255 - 3259.
53. Stodola, F.H., K.B. Raper, D.I. Fennel, H.F. Conway, V.E. Sohns, C.T. Langford and R.W. Jackson (1955), The microbiological production of gibberellins A and X. *Arch. Biochem. and Biophys.*, 54: 240 - 245.

54. Stolp, C.F., R. Nadeau and L. Rappaport (1973), Effect of abscisic acid on uptake and metabolism of ^3H gibberellin A_1 and ^3H pseudogibberellin A_1 by barley half-seeds. *Plant Physiol.*, 52: 546 - 548.
55. Stolp, C.F., R. Nadeau and L. Rappaport (1977), Abscisic acid and the accumulation, biological activity and metabolism of four derivatives of ^3H gibberellin A_1 in barley aleurone layers. *Plant & Cell Physiol.*, 18: 721 - 728.
56. Taiz, L. and J.E. Starks (1977), Gibberellic acid and enhancement of DNA turnover in barley aleurone cells. *Plant Physiol.*, 60: 182 - 189.
57. Tamaro, D. (1974), *Tratado de fruticultura*. 4^o edición. Ed. Gustavo Gili, S.A. Barcelona, España.
58. Tuan, D.Y.H. and J. Bonner (1964), Dormancy associated with repression of genetic activity. *Plant Physiol.*, 39: 768 - 772.
59. Vegis, A. (1964), Dormancy in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 15: 185 - 224.
60. Wareing, P.F. (1953), A new photoperiodic phenomenon in short-day plants. *Nature*, 181: 614.
61. Wareing, P.F. and P.F. Saunders (1971), Hormones and dormancy. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 22: 261 - 288.
62. Wareing, P.F. and I.D.J. Phillips (1978), The control of growth and differentiation in plants. 2^o ed. Ed. William Clowes & Sons. Lond.

63. Westwood, M.N. (1978), Temperate zone pomology. Ed. W.H. Freeman and Co. S. Fco. U.S.A.

64. Yabuta, T. (1935), Biochemistry of the "bakanae" fungus of rice. Japanese Agr. Hort., 10: 17 - 22.