

Rej  
6-A



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**DETERMINACION DE LA CONCENTRACION  
NECESARIA DE UN PROMOTOR DE  
CRECIMIENTO PARA ROMPER EL REPOSO  
INVERNAL EN YEMAS DE MANZANO**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A :  
MARTHA PATRICIA ARIYAMA RUIZ**

México, D. F.

1989

**FALLA DE ORIGEN**



## **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 está 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

I N T R O D U C C I O N	1
A N T E C E D E N T E S	
- G E N E R A L I D A D E S D E L M A N Z A N O	6
- D E S C R I P C I O N D E L A V A R I E D A D	8
- R E Q U E R I M I E N T O S D E H O R A S F R I O	10
- E S T R U C T U R A D E L A Y E M A	17
- G I B E R E L I N A S	22
- R E P O S O	38
P A R T E E X P E R I M E N T A L	45
R E S U L T A D O S	52
D I S C U S I O N	65
C O N C L U S I O N E S	70
B I B L I O G R A F I A	72

## I N T R O D U C C I O N

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 o reguladores del crecimiento, y son sustancias que tomas parte en la coordinación de las funciones entre las distintas partes de la planta. Son, por lo regular, sustancias químicas específicas, las cuales son activas en concentraciones muy pequeñas. Las hormonas estimuladoras del crecimiento, se clasifican en auxinas, giberelinas, citocininas y etileno. Las sustancias inhibidoras, el ácido abscísico y otros compuestos con gran diversidad de estructuras químicas principalmente de tipo fenólico (Villiers/1970).

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 reposo. Durante el reposo 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, disponibilidad de agua y temperatura (Villiers/1970).

En el fenómeno de descanso en yemas de manzano, el factor climático que interviene más directamente en el reposo de sus yemas, es la temperatura, específicamente las bajas temperaturas. Así pues, el manzano se encuentra listo para florecer cuando haya recibido cierta cantidad de frío. Esta necesidad de frío, se conoce como requerimiento de horas frío. (Salas/1974).

Las sustancias endógenas del crecimiento, juegan un importante papel en la regulación del reposo en las yemas, puesto que existe una correlación entre los cambios estacionales en el periodo de reposo de algunas especies y las variaciones correspondientes a los niveles de los inhibidores endógenos dentro de las yemas, ya que hay una reducción gradual del descanso de las yemas durante el invierno, esto está asociado con una disminución en el nivel de los inhibidores endógenos. (Wareing/1978).

El efecto de los reguladores del crecimiento en la inducción y rompimiento del reposo en las yemas, establece que la temperatura tiene poco efecto en inducir el reposo, pero tiene una gran influencia en inducir la síntesis de sustancias promotoras, las cuales rompen el reposo. Sin embargo, aunque la relación de promotores e inhibidores se correlaciona generalmente con el periodo de reposo, el efecto de tal relación no es muy bien conocida. (Wareing/1978).

El reposo de yemas en árboles está gobernado por las condiciones ambientales, las cuales afectan el nivel de las sustancias reguladoras, las cuales a su vez controlan los cambios metabólicos para que se induzca o se rompa el reposo. (Villiers/1970).

El manzano es una especie frutal que se originó en regiones de clima templado, éstos se han introducido a regiones con climas subtropicales y tropicales, lo cual ha originado problemas de adaptación. Las regiones subtropicales y tropicales se caracterizan por presentar inviernos irregulares y benignos, días relativamente cortos y pequeñas diferencias en la longitud de día a través del año. Bajo estas condiciones los frutales caducifolios, no presentan un período de reposo definido durante la estación del invierno debido a la falta de frío invernal. Esta deficiencia de frío, ocasiona que se manifiesten una serie de anomalías en el desarrollo de estas especies, a las cuales en conjunto se les denomina síntomas de "reposo prolongado", los síntomas más comunes del reposo prolongado son los siguientes: retraso en la brotación de yemas, dominancia apical, crecimiento vigoroso de brotes, formación reducida de espolones en el manzano, caída de yemas, fructificación tardía en árboles jóvenes y reducción severa de la cosecha. En las regiones productoras de manzano en Méxi-

co se observan la mayoría de los síntomas anteriormente descritos. (Ruck/1975).

La solución al problema de adaptación de los frutales caducifolios en áreas subtropicales y tropicales se ha enfocado principalmente a través de dos caminos:

- A).- Uso de sustancias químicas para interrumpir el reposo prolongado de las yemas.
- B).- Mejoramiento genético para el requerimiento del frío. (Ruck/1975).

En México el uso de sustancias químicas ha mostrado ser conveniente para incrementar la brotación y la producción en el manzano.

Sin embargo, el uso de estos compuestos químicos presentan algunos inconvenientes, tales como el incremento en los costos de producción, además de que su utilización puede ser riesgosa, cuando no se emplea correctamente y probablemente el uso consecutivo por varios años pudiera llegar a generar efectos secundarios no deseados. (Ruck/1975).

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 el reposo

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 pueden ser correlacionados con el reposo de las yemas. Es por esto, que el presente trabajo tiene como objetivo el analizar la relación entre la concentración de las giberelinas en las yemas de manzano y la cantidad de horas frío recibidas por el árbol durante el invierno.

## MANZANO

### - Generalidades.

La planta del manzano se encuentra ubicada taxonómicamente de la siguiente manera (Juscafresca/1973; Tamaro/1974):

División:	Embryophyta Siphonogama
Subdivisión:	Angiospermas
Clase:	Dicotyledoneae
Subclase:	Dialipetala
Familia:	Rosaceae
Subfamilia:	Pomoideae
Género:	Malus
Especie:	comunis

La manzana es una especie frutícola introducida al continente Americano por los misioneros españoles durante la época de la conquista. Una de las primeras variedades que trajeron a México fue la Blanza de Asturias, variedad que se adaptó muy bien a determinadas regiones del país en las que aún se cultiva, aunque ha sufrido diversas mutaciones y adoptado distintos nombres, entre otros los de perón, perón cristalino y perón de Canatlán.

Las regiones tradicionalmente manzaneras de México se ubicaron en las áreas de mayor influencia española, encontrando posteriormente otras regiones aptas ecológicamente para un mejor desarrollo de esta especie en los estados de Chihuahua, Durango, Coahuila, Puebla y Querétaro; entidades en las cuales se han ido introduciendo gradualmente variedades seleccionadas, principalmente norteamericanas.

Las variedades que generalmente se cultivan en México son: Red Delicious, Doyle Red Delicious, Golden Delicious, Jonathan, Rome Beauty, Winesap, Starking Delicious, Winter Banana, Arkansas Black, Stayman, Scarlet, Rayada de Zacatlán y de tipo Spur: Starkrimson, Delicious y Golden. (Fábregas/1964; Tamaro/1974).

- Descripción de la variedad.

Golden Delicious (D'Esclapon/1970):

Origen: esta variedad procede de semilla y se encontró en EE.UU., por casualidad, en los huertos de A.H. Mullins en Windfield, West Virginia. La firma Stark Brother's, de Louisiana, Missouri, la comercializó en 1916.

Brother's, un viverista, en 1963 ofreció al mercado una mutación de tipo Spur, que denominó Starkspur Golden Delicious Gilbert Strain. Esta mutación es originaria del Distrito Yakima, cerca de Parker, Washington.

- Descripción del árbol:

- A) Porte: erguido a semierguido.
- B) Vigor: mediano.
- C) Fructificación: abundante a muy abundante.
- D) Formas recomendables: libres, semilibres.

- Descripción del ramaje:

Es largo, delgado, color verde, con un poco de marrón.

- A) Lenticelas: pequeñas, alargadas, muy numerosas y bien visibles, color claro.

- B) Yemas: pequeñas a medianas, aplastadas, triangulares y poco tomentosas.
- C) Hojas: limbo: mediano a grande, alargado, relativamente ancho, con dientes bastante regulares.  
peciolo: mediano, grueso, verde; coloreado de rojo en su cara inferior y en su base.
- D) Flores: medianas, color rosa.
- E) Epoca de floración: de fines de marzo a mediados de mayo según clima y altitud.

- Descripción del fruto: de mediano a grande, alargado de forma cilindro-cónica.

- A) Piel: fina, lisa, algunas veces rugosa a causa del russeting, verde y coloreada de amarillo o de rojo en la parte solcada, con numerosos puntos visibles (lenticelas).
- B) Carne: blanca a verdosa, fina, tierna, fundente, azucarada, poco acidulada, dulce y muy jugosa.
- C) Calidad: muy buena.

- Valor comercial: muy bueno, además resiste al transpor-

te y se conserva perfectamente en cámara frigorífica.

Esta es ciertamente la mejor variedad. Se adapta a todos los climas y es fértil, incluso demasiado, por lo que es necesario ralea los frutos.

- Requerimientos de horas frío.

El manzano es un frutal de hoja caduca, a este tipo de frutales se les conoce como árboles caducifolios, que en una época determinada del año, tiran todas sus hojas y entran a lo que se conoce como latencia o período de reposo (D'Esclapon/1970).

El período de reposo es el tiempo durante el cual las yemas no brotan aunque las condiciones externas tales como temperatura sean favorables. Si una variedad de manzano no recibe suficiente frío durante el invierno para romper el período de reposo o latencia, su crecimiento se retrasa en la primavera siguiente.

Los requerimientos de frío de los árboles de hoja caduca están determinados genéticamente en cada yema, ya sea floral o vegetativa.

Los requerimientos de frío se expresan por el término "hora frío" la cual se entiende como una hora en que la yema estuvo expuesta a una temperatura cercana a 7°C. El número total de horas frío se obtiene sumando todas las horas frío que se presentan en un determinado período de tiempo, y para que tengan un valor confiable debe ser el promedio de por lo menos 10 años, para efectos de establecimientos de nuevas huertas. Puesto que las horas frío pueden presentarse durante el día o durante la noche, ya sea de manera ininterrumpida, alternada, de sólo unas cuantas horas frío, e incluso en algunas ocasiones no presentarse ninguna durante varios días (Alvarez/1974; Calderón/1977; Westwood/1978), la mejor manera de cuantificar las horas frío, es utilizar un termógrafo; pero como un aparato de esta naturaleza es poco probable que lo pueda tener un agricultor, se han desarrollado otros métodos, que generalmente son una fórmula de regresión utilizando la temperatura media, (Hinojosa/1979).

Método de H.H. Weinberger. Este método se basa en una correlación entre el número de horas frío y el promedio de la temperatura de diciembre y enero. Weinberger (Hinojosa/1979), de acuerdo a observaciones realizadas y a correlaciones encontradas, formuló una tabla, en la cual se evalúa el promedio de los dos meses antes mencionados.

Método de Da Mota. Este procedimiento se basa en un estudio de correlación entre la temperatura media mensual y el número de horas frío. Hay que hacer notar que se usan los datos del 15 al 30 de noviembre, todo diciembre y enero y del 1 al 15 de febrero, de acuerdo a esto, Da Mota obtuvo la siguiente ecuación para el cálculo de las horas frío:

$$H.F. = 485.1 - 28.52 X$$

Donde:

H.F. = Horas frío mensuales.

X = Temperatura media mensual en °C.

Método de Sharpe. Para este método no se usan fórmulas, pero se emplea una tabla preparada de antemano por el doctor Sharpe (Hinojosa/1979). En esta tabla se indica el número de H.F. correspondientes a cada una de las temperaturas medias mensuales de los dos primeros y últimos meses del año (Tabla 1).

Método de Crossa-Raynaud. Este método se basa en las temperaturas máximas (M) y mínimas (m) que diariamente ocurre, o sea que las H.F. presentes, se determinan necesariamente por día. En este caso, el 7 que aparece en la fórmula, se refiere a un número de grados centígrados límite, considerando para la cuantificación real de horas frío.

En este método se usa la fórmula siguiente:

$$\text{H.F.} = \frac{7 - M \times 24}{M - m}$$

Donde:

H.F. = Horas frío diarias.

M = Temperatura máxima diaria en °C.

m = Temperatura mínima diaria en °C.

Se usan las temperaturas de los meses de noviembre, diciembre, enero y febrero.

Tabla 1.

Horas frío acumuladas en función de las temperaturas medias de los meses de invierno, según el Dr. Sharpe.

T. media °C por mes	H. F. acumuladas
7.8	395
8.9	353
10.0	311
11.1	270
12.2	230
13.5	190
14.4	152
15.6	115
16.7	79
17.8	47
18.9	23
20.0	0

Método del huerto fenológico. Este es el método patrón y es la única forma para llegar a determinar las horas frío con precisión. Consiste en establecer una plantación de observación que cuente con una serie de especies y variedades de requerimiento conocido y con un rango de necesidades de frío suficientemente amplio, escalonado preferentemente cada 50 horas-frío.

De hecho, fue utilizando un huerto fenológico como referencia, que se establecieron los métodos antes descritos. Es importante aclarar que de acuerdo con Muñoz Santamaría (Hinojosa/1979), la fórmula que mejor se adapta al altiplano mexicano es la de Da Nota.

Diversas investigaciones realizadas en Israel por Erez y Leavee han determinado que cuando en el día la temperatura sube arriba de los 18°C se contrarrestan las horas frío acumuladas durante la noche, por lo que no se avanza en el rompimiento del reposo. Esta variación tan grande es típica de los climas desérticos y semidesérticos. Este fenómeno también es común en los inviernos del altiplano mexicano, (Hinojosa/1979).

Para dar solución al problema de la insuficiencia de frío en los países donde se cultivan frutales caducifolios bajo condiciones de inviernos benignos se ha hecho uso de

sustancias químicas que sustituyen el efecto del frío para el rompimiento del reposo en las yemas (Mendez/1981).

En México, esta práctica también ha sido usada con resultados satisfactorios por Rumayor (1973) en la región de Saltillo, Coah., con aspersiones a base de mezclas de aceite mineral y hormox (dinitro ortho secundario butil fo nol) durante el invierno (Mendez/1981).

Las dosis y épocas de aplicación de estas sustancias varían de acuerdo con las condiciones ecológicas prevalentes, la especie y el cultivar de que se trate.

## Estructura de la yema.

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, (Villiers/1970).

Una yema vegetativa o floral cualquiera se forma y diferencia durante un período vegetativo; de forma que, al llegar al otoño y el período de reposo, las yemas están bastante diferenciadas y evolucionadas. Al llegar la primavera las yemas, vegetativas o florales, inician su crecimiento. Este procedimiento se pone de manifiesto en principio por el engrosamiento de la yema, la apertura de escamas y bracteas. 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 las yemas. Los arboricultores los describen de la siguiente manera (Gil-Albert/1980):

- 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) don de 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 período 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 un 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

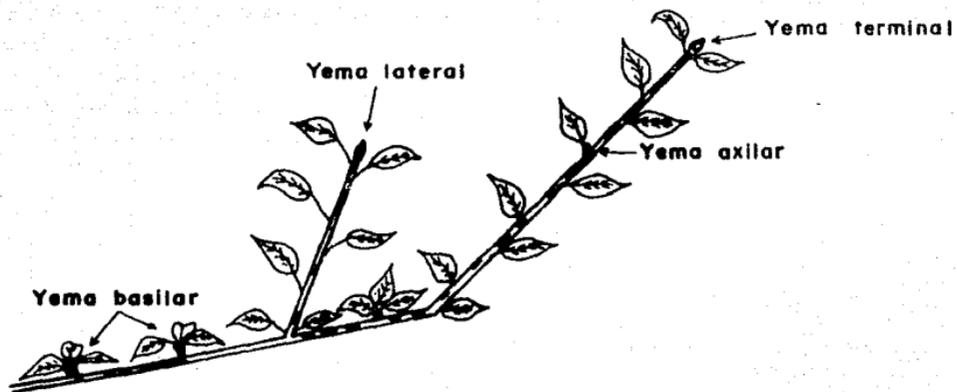


Fig. 1. Diagrama de una rama de manzano mostrando las yemas (Abbott, 1970).

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 acti  
vas.

- Yemas latentes: son las que están inhibidas en su crecimiento por factores del medio ambiente o por control endógeno, permaneciendo anglobadas en sus escamas durante, a veces, años.

- Yema floral.

La estructura de la yema floral del manzano fue estudiada por Abbott, (1970), 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 un primordio floral y en las axilas de las 3 brácteas y de las 3 hojas distales se encuentran los primordios florales laterales (Abbott/1970).

La yema basilar está extremadamente limitada en su crecimiento (fig.3), el eje se extiende únicamente a una corta distancia con la producción de una roseta de unas cuantas hojas (A), pero en la lateral (B) o en el líder (C) ocurre un cultivo vegetativo antes de la formación de la yema terminal. Es menos frecuente que una yema se forme directamente en la axila de una hoja (D) sin ningún cultivo vegetativo preliminar en el eje. Parece no existir una diferencia fundamental entre estos tipos de yemas, únicamente existe una diferencia en el tiempo de las diferentes etapas del desarrollo, (Abbott/1970).

La formación de una yema de manzano ha sido descrita



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

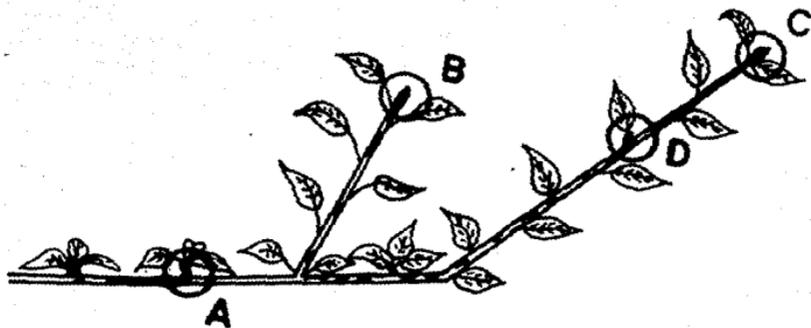


Fig. 3. Posiciones de los brotes de la fruta.

por Abbott (1970) para la variedad de manzano Lord Lambourne. La primera indicación para la formación de la yema es la abscisión de la lámina y peciolo del octavo primordio foliar del meristemo apical, la base de la hoja se convierte en la escama exterior (primera escama) de la yema.

Similarmente 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, para que este proceso se lleve a cabo es necesario que el balance de promotores e inhibidores del crecimiento se desplace hacia los promotores.

## 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, 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 (Kurosawa/1926) demostraron que el filtrado estéril de un extracto libre de células del hongo Fusarium Heterosporum que infectaba a la planta del arroz, también podía disimular 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, designó como giberelina A al principio activo, asimismo él fue el primero en purificar parcialmente y cristalizar a este compuesto.

En 1935, Stodola en los Estados Unidos, purificó también al principio activo de G. Fujikuroi, llamándolo giberelina X. Entretanto, en Inglaterra, Curtis y Cross, en 1954, lo aislaron y en vista de que era un ácido orgánico le llamaron ácido giberélico.

Una reinvestigación dirigida por Stodola de la giberelina A japonesa, demostró que se trataba de una mezcla de tres giberelinas y que 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 esta giberelina ( $GA_3$ ).

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

Estas giberelinas han sido aisladas de organismos inferiores, principalmente del hongo Gibberella fujikuroi, así como también de algunas plantas superiores, dentro de las que se encuentra la planta de manzano. (Dennis/1976).

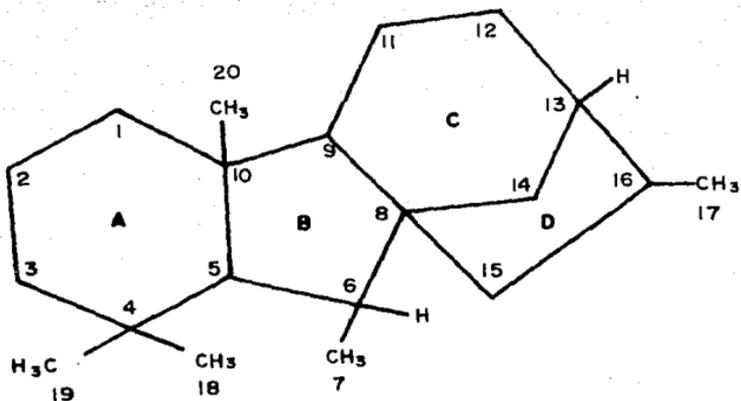
El aumento en el número de giberelinas se debe en gran parte al progreso en las técnicas de identificación y purificación de compuestos químicos.

## Giberelinas: estructura química y nomenclatura.

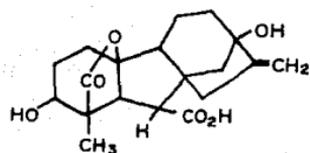
Las giberelinas son de naturaleza isoprenoide y pertenecen a la clase de compuestos llamados diterpenos. Los terpenos tienen un esqueleto carbonado construido con unidades de isopreno unidas entre sí de un modo regular. Las giberelinas constan de cuatro unidades de isopreno, generalmente arregladas para formar tres anillos. La unidad isoprénica 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 aislan de fuentes vegetales.

La nomenclatura empleada en las giberelinas, se basa en el esqueleto del giberelano (Fig.4). 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 biosíntesis de las giberelinas. Las estructuras de algunas giberelinas se muestran en la Fig. 5.

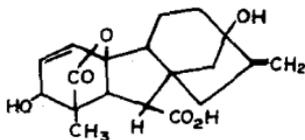
Dentro de las giberelinas, existen dos grandes diferencias: una de ellas es el número de átomos de carbono, unas poseen 19 y otras poseen 20, la otra es la presencia o ausencia de grupos hidróxilo (-OH) en las posiciones 3 y 13.



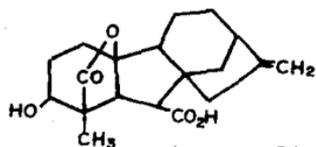
**Fig. 4. Esqueleto del giberelano, mostrando los anillos y la numeración empleada en la nomenclatura de las giberelinas.**



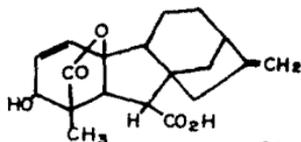
GA<sub>1</sub>



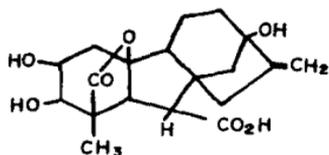
GA<sub>3</sub>



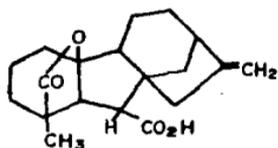
GA<sub>4</sub>



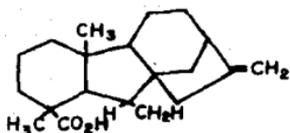
GA<sub>7</sub>



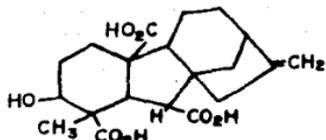
GA<sub>8</sub>



GA<sub>9</sub>



GA<sub>12</sub>



GA<sub>14</sub>

Fig. 5. Fórmulas estructurales de algunas giberelinas. GA<sub>1</sub> en su metabolismo da lugar a GA<sub>3</sub>; GA<sub>3</sub> es el ácido giberélico; GA<sub>4</sub>, GA<sub>7</sub> y GA<sub>9</sub> se han identificado en semillas de manzano; GA<sub>8</sub> y GA<sub>12</sub> se consideran como las primeras giberelinas formadas en la biosíntesis y por tanto, posible precursoras de todas las demás giberelinas.

Otra diferencia, también importante entre las giberelinas, es que las de 20 átomos de carbono presentan grupos carboxilo (-COOH) en las posiciones 7 y 18 y en algunas ocasiones también en la posición 20, mientras que otras tienen un grupo aldehído en esta última posición.

Todas las giberelinas de 19 carbonos son ácidos monocarboxílicos, con el grupo -COOH en la 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 las posiciones 3 y 13, en las giberelinas de 20 carbonos, parece señalar una diferencia entre aquellas giberelinas que se presentan en Gibberella fujikuroi y aquéllas que están tanto en el hongo como en las plantas superiores o sólo en estas últimas (Lang/1970). Las giberelinas presentes en el hongo que poseen un grupo hidróxilo, lo presentan siempre en posición 3, mientras que las giberelinas de las plantas superiores lo presentan en la posición 13.

## Giberelinas: Biosíntesis.

La biosíntesis de las giberelinas incluye la formación de todos los compuestos intermediarios, desde el mevalonato hasta el aldehído del GA<sub>12</sub> (Graebe et al/1972).

La mayor parte de la información acerca de la síntesis de las giberelinas 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 las síntesis de las giberelinas en las plantas superiores sigue el mismo esquema encontrado en G. fujikuroi.

Birch y Colaboradores (Birch et al/1958), fueron los primeros en sugerir una posible vía de síntesis, ya que demostraron que el acetato, marcado radiactivamente, se incorporaba a las giberelinas a través del ácido mevalónico. La fig. 6 muestra los principales pasos en la formación del aldehído del GA<sub>12</sub>.

Las principales reacciones para la síntesis de las giberelinas son:

- 1.- Ciclización de los grupos de isopentenil pirofosfato para formar el geranil-geranil pirofosfato.

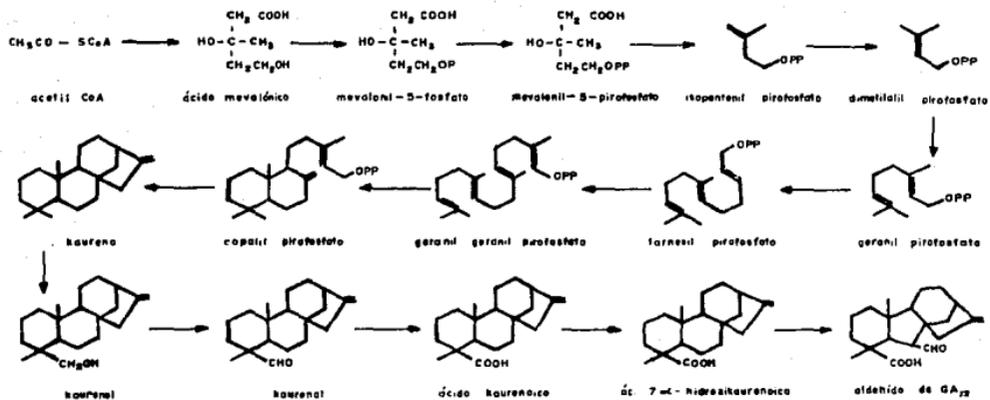


Fig. 6 Esquema de la vía biosintética seguida en la formación del aldehído de GA<sub>12</sub>, intermediario en la biosíntesis de giberelinas.

- 2.- Ciclización para formar el primer intermediario cíclico, o sea el kaureno.
- 3.- Diferentes pasos de oxidación, incluyendo la ciclización del anillo B del ácido 7  $\alpha$ -hidroxikaurenico, para formar el aldehído del GA<sub>12</sub>.

La transformación del mavelonato hasta copalilpirofosfato, es mediada por enzimas que están presentes en la fracción soluble de extractos celulares vegetales, y que requieren cofactores como iones metálicos divalentes: Mg<sup>2+</sup> ó Mn<sup>2+</sup> y ATP. El aislamiento y purificación de la enzima geranyl pirofosfato sintetasa fue logrado por Ogura y Colaboradores en 1972. Esta enzima es capaz de catalizar las condensaciones: a) del isopentenil pirofosfato con farnesil pirofosfato y, b) la del isopentenil pirofosfato con el dimetilalil o el geranyl pirofosfato. Así que cataliza la elongación de la cadena desde 5 carbonos a 10, 15 y 20 carbonos sin acumulación de intermediarios. El Mn<sup>2+</sup> es un requerimiento absoluto para esas reacciones, mientras que el Mg<sup>2+</sup> es mucho menos efectivo.

El siguiente paso en la síntesis del aldehído del GA<sub>12</sub> 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 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  $Mg^{2+}$  y  $Mn^{2+}$ , 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, kaurenal y finalmente a ácido kaurenico. A partir de éste, se forma el ácido 7 $\alpha$ -hidroxikaurenico (Ceccarelli et al/1981). Las enzimas en vueltas 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, (Stoddart/1969).

El ácido 7 $\alpha$ -hidroxikaurenico es el último derivado del kaureno y la condensación de su anillo B, da por resultado la formación del aldehído de GA<sub>12</sub>, (Stoddart/1969).

## Giberelinas: metabolismo.

El metabolismo de las giberelinas se refiere a la serie de transformaciones que sufre el aldehído del GA<sub>12</sub> para dar:

a) Giberelinas biológicamente activas, conocidas también como giberelinas primarias.

b) Giberelinas biológicamente inactivas. La pérdida de la 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. 7 muestra el metabolismo de las giberelinas de 20 átomos de carbono, la fig. 8 muestra el de las de 19 carbonos y las fig. 9 y 10 muestran las fórmulas estructurales de las giberelinas.

Las diferentes vías que sigue el aldehído del GA<sub>12</sub> depende de la capacidad de cada especie vegetal para hidroxilar la posición 3 ó la 13. La posición de la hidroxilación influye marcadamente en la actividad biológica y en la capacidad para subsecuentes hidroxilaciones y reacciones de conjugación.

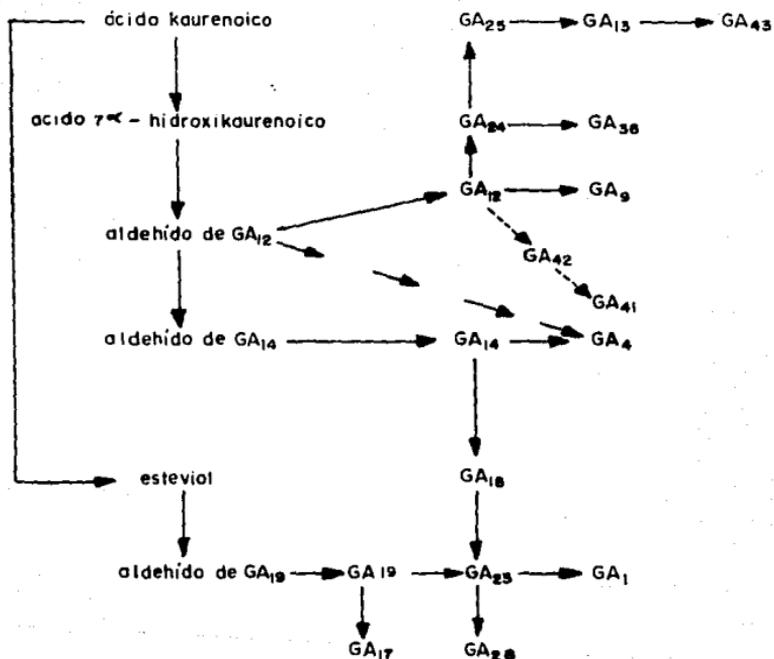


Fig. 7. Esquema del metabolismo que siguen las giberelinas de 20 átomos de Carbono.

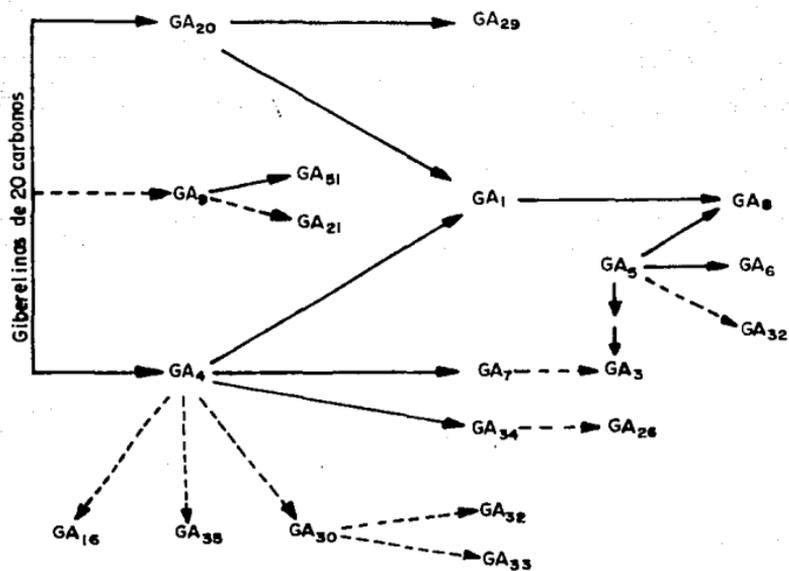


Fig. 8 Esquema del metabolismo que siguen las giberelinas que poseen 19 átomos de carbono.

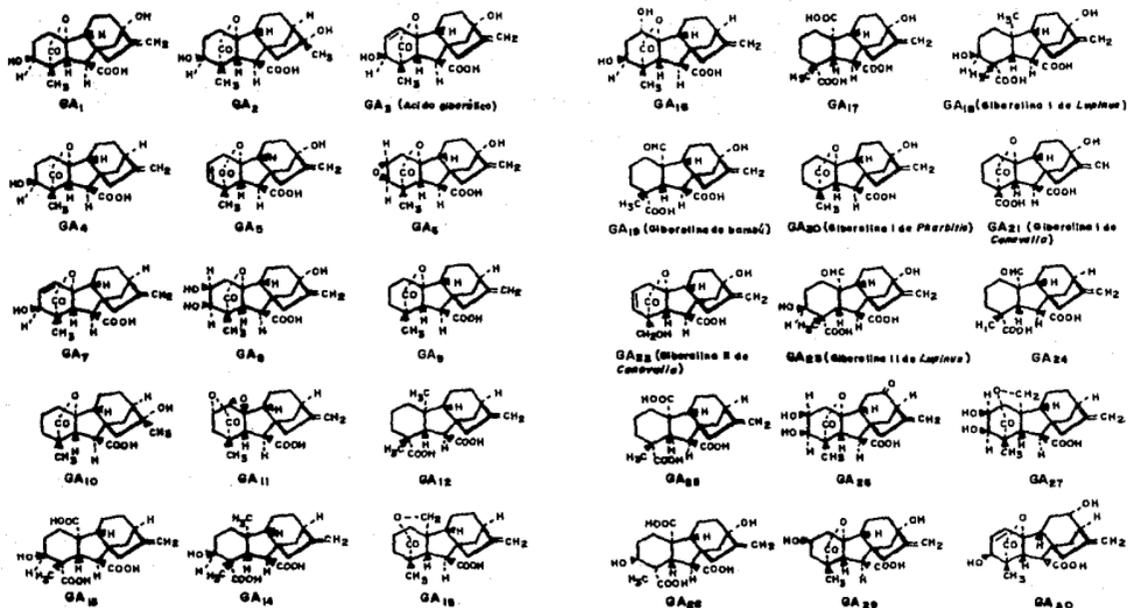


Fig. 9. Fórmulas Estructurales de Gibberelinas.

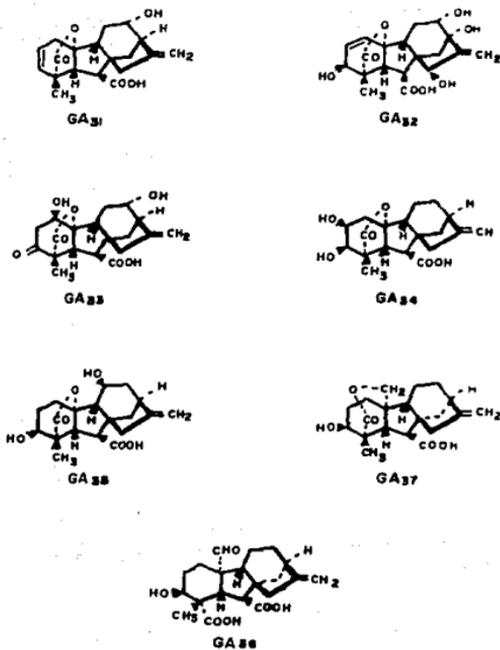


Fig. 10. Fórmulas Estructurales de Gibberelinas.

Parece que hay dos diferentes vías para la 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 las plantas superiores, con una hidroxilación inicial en la posición 15.

Se presume que la condensación del anillo B del ácido 7  $\alpha$ -hidroxikaurenoico, es previa a la eliminación del carbono 20 con la consecuente formación de la lactona formada entre el carbono 19 y el carbono 20, característica de las giberelinas de 19 carbonos. Esto lleva a la especulación de que las giberelinas de 20 carbonos pueden servir como intermediarios en la síntesis de las de 19 carbonos. Se ha reportado que tanto GA<sub>12</sub> como GA<sub>14</sub> (giberelinas de 20 carbonos), pueden ser precursores para las giberelinas de 19 carbonos.

## Regulación de los niveles de giberelinas en las plantas

Se ha propuesto (Rappaport y Adams/1978) que la regulación de los niveles de las giberelinas en las plantas, se lleva a cabo básicamente por dos mecanismos:

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

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

Nadeau y Rappaport (Rappaport y Adams/1978), estudiaron el metabolismo del  $GA_1$ , encontrando que el único producto formado era el  $GA_8$ , que se forma por hidroxilación del  $GA_1$  (Patterson et al/1975), y el glucósido del  $GA_8$ , no encontraron  $GA_3$  o su glucósido. Por tanto, parece ser que hay una hidroxilación directa sin involucrar intermediarios y sugieren que las enzimas que transforman al  $GA_1$ , pueden servir para mantenerla en un nivel adecuado para el desarrollo normal de la planta. Las enzimas que transforman al  $GA_1$  no son específicas, no obstante, la reacción está bajo impedimento estérico y requiere de NADPH y oxígeno, siendo favorecida por la presencia de  $Fe^{2+}$ .

La hidroxilación más importante es la que se efectúa en la posición 2. Las alteraciones en la estereoquímica del hidróxilo en posición 3 causan inhibición en la hidroxilación de la posición 2, así como también la metil esterificación del carboxilo de la posición 7 ó el rearrreglo de los unillos C y D o la deshidratación del grupo metileno en la posición 16.

En los cultivos de G. fujikuroi se ha logrado obtener GA<sub>3</sub> a partir de GA<sub>1</sub>, por lo tanto, parece que la hidroxilación en la posición 2 es común en las plantas superiores, no así en el hongo. Estas aparentes diferencias en las vías del metabolismo del GA<sub>1</sub> pueden deberse al hecho de que las giberelinas son metabolitos sin función aparente en el hongo, mientras que para las plantas superiores son hormonas esenciales (Patterson y Rappaport/1974).

La reacción de conjugación más común es por una glucosilación, que también se efectúa en el hidróxilo de la posición 3. Esta reacción se ha estudiado principalmente para el GA<sub>1</sub>, que produce el glucósido del GA<sub>8</sub> y al glucósido del GA<sub>1</sub> (Stoddart et al/1974 y Stolp et al/1977).

Los estudios a nivel de membrana surgieron al encontrarse que, aparte de los efectos a largo plazo (horas,

dfas, meses) producidos por las giberelinas, existían otros a corto plazo (minutos) en los cuales debían estar involucrados cambios en las membranas.

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

Efectos producidos por giberelinas aplicadas exógenamente.

Se ha encontrado que se produce un incremento de la floración cuando las giberelinas son aplicadas exógenamente, en muchas especies de coníferas (Pharis/1975) y manzano (Eccher y Boffelli/1981). El ácido giberélico ( $GA_3$ ), en combinación con los monofenoles no sólo acelera la floración (Sood y Nanda/1979) sino que también produce otros efectos. La aplicación de  $GA_{4+7}$  en manzano de la variedad Golden Delicious causa partenocarpia y da un mejor control sobre el encorchado que a veces se presenta en la manzana (Eccher y Boffelli/1981).

Se ha reportado que cuando se aplica en las hojas, las giberelinas alteran su forma y tamaño, volviéndolas más simples en forma y más elongadas, y posiblemente inducen una fase juvenil en hojas adultas.

Un efecto producido por las giberelinas, que no parece envolver división celular, es la inducción de la síntesis y secreción de enzimas; esto se encontró, principalmente en aleurona de cebada. En esta semilla, se ha encontrado que las giberelinas estimulan la secreción de la  $\alpha$ -amilasa, la ribonucleasa, proteasas, peroxidasa y la  $\beta$ -1,3-gluconasa (Bennet y Chrispeels/1972). También

se ha encontrado una proliferación del retículo endoplásmico que parece ser una preparación para la síntesis y secreción de las enzimas inducidas por las giberelinas (Tair y Starks/1977).

## Función de las giberelinas.

Las giberelinas son hormonas vegetales que participan en los diferentes procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas. Leopold (Taiz y Starks/1977), 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: estimula el reposo, la etapa juvenil, el crecimiento, la iniciación floral, el amarre, el crecimiento y maduración del fruto, la abscisión, el enraizamiento y la 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 la división y elongación celular.

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

Recientemente se han relacionado (Taiz y Starks/1977) 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.

## R E P O S O

En las zonas templadas existen variaciones en las condiciones climáticas, especialmente en lo que se refiere a intensidad lumínica, duración del día, temperatura y lluvia. Como consecuencia, hay una alternancia de estaciones favorables 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 al período de frío invernal, las plantas han desarrollado un mecanismo de adaptación que se caracteriza por un crecimiento detenido o reducido de la planta durante el invierno. Durante este período, los reñuevos se rodean de escamas, formando las yemas, este estado se conoce como reposo o latencia.

Westwood/1978, definió varias clases de reposo:

Quiescencia: cuando las yemas están en estado de reposo como consecuencia de condiciones externas desfavorables para el crecimiento. Se conoce también como reposo impuesto o forzado.

Inhibición correlativa: cuando el crecimiento de la

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

Reposo: cuando la yema está en reposo por impedimento fisiológico 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 reposo innato, espontáneo, verdadero reposo o reposo 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 el invierno, las yemas permanecen en estado de reposo. En este período se presenta la acumulación de frío necesario para romper el reposo, y así, las yemas reanudan su crecimiento en primavera. Si después del invierno no se reestablecen las condiciones favorables para el crecimiento, las yemas pueden fallar en reiniciar su crecimiento aunque hayan completado su requerimiento de frío, es decir entran

otra vez en quiescencia.

Si las plántulas, por algún motivo, no entran en estado de reposo y continúan creciendo ya entrado el otoño, son susceptibles de dañarse por heladas tempranas o fríos invernales. 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 del reposo. (Leopold/1975).

Para el caso específico del manzano, hasta la fecha, no se ha encontrado el mecanismo por el cual se induce el reposo. Este árbol no es fotoperiódico, posiblemente tiene un método más simple y primitivo para la inducción del reposo que las especies fotoperiódicas. (Abbott/1970).

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 el reposo. 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. (Abbott/1970).

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 del reposo y en el inicio del mismo este equilibrio se desplaza hacia los inhibidores. Como principal inhibidor se ha propuesto al ácido abscísico (ABA) y como principal estimulante a las giberelinas y a las citocininas. (Devling/1970).

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

A) Observación de los efectos producidos por la aplicación de hormonas exógenas.

B) Investigación sobre hormonas endógenas, especialmente para establecer si existe correlación entre los niveles de hormonas y el estado de reposo de las yemas.

Por estos estudios, se ha encontrado que tanto el

ácido giberélico ( $GA_3$ ) como las citocininas, son capaces de revertir el reposo de yemas, tubérculos y otros órganos en reposo. También se ha demostrado que hay un aumento en la actividad de sustancias similares a giberelinas, al finalizar el reposo, así mismo, se ha encontrado que la actividad de las giberelinas alcanza su máximo algunas semanas antes del término del reposo (Wareing y Saunders/1971).

Se ha demostrado que otra hormona, el etileno, es capaz de revertir el reposo inducido por el ABA en semillas de lechuga, pero sólo en presencia de  $GA_3$  o luz (Dunlap y Morgan/1977).

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  $\alpha$ -amilasa inducida por giberelinas.

Se cree que esta inhibición es debida a que el ABA incrementa marcadamente el metabolismo de las giberelinas, por tanto, su conversión a formas biológicamente inactivas, reduciendo a las giberelinas libres (activas) disponibles (Nadeau y Rappaport/1972; Stolp et al/1973; Stolp et al/1977).

El reposo en yemas de plantas leñosas puede vencerse

por aplicación de giberelinas, citocininas o etileno, mismas que también son activas en romper el reposo de semillas. Se ha observado que los niveles de giberelinas se incrementan con tratamientos de frío y que, en la mayoría de los casos, la aplicación de la hormona, sustituye parte pero no elimina ni sustituye todo el requerimiento de frío y en algunos casos sustituyen los requerimientos de fotoperíodos largos. Las especies que responden mejor a giberelinas aplicadas, incluyen aquéllas que normalmente presentan requerimientos de bajas temperaturas o de luz (Alvarez/1974).

Wareing y Saunders/1971 han sugerido que el efecto primario de la baja temperatura podría ser eliminar un bloqueo en la biosíntesis de las giberelinas y que el incremento de este grupo de hormonas es el resultado, es vez de la causa, de la eliminación del reposo.

Asimismo, se indica la posibilidad de que el ABA tenga un papel importante en el bloqueo de la síntesis de las giberelinas durante la inducción de latencia, porque se ha observado que ABA reduce los niveles de giberelinas en coleóptilo de maíz y otros tejidos, sugiriendo una posible interacción del ABA con las giberelinas, debido a que la aplicación de esta última puede romper el reposo en jitomate y plantas leñosas.

Durante el reposo también ocurren cambios a nivel molecular, por ejemplo, la cromatina de las yemas latentes muestra una capacidad disminuida para sintetizar RN in vitro, reflejando, quizá una represión de los genes. Por otra parte, se demostró que el ácido giberélico promueve ligeramente la síntesis del DN y del RN y que el ABA bloquea dicha síntesis en yemas latentes de jitomate (Clegg y Rappaport/1970).

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

Los estudios sobre el reposo en semillas, muestran que hay un incremento en la cantidad de aminoácidos y en la síntesis de proteínas durante el rompimiento del reposo mediante la aplicación de GA<sub>3</sub> (Edwart/1976).

En la mayoría de los árboles, al aproximarse el fin del reposo, disminuyen los niveles de los inhibidores, principalmente el ABA. Sin embargo, no se han observado cambios en la actividad inhibitoria que puedan ser correlacionados con el fin del reposo de las yemas para el caso del manzano (Wareing y Saunders/1971).

## PARTE EXPERIMENTAL

### Muestra vegetativo:

Las muestras de yemas florales que se usaron en este trabajo, se obtuvieron de una variedad hortícola de manzano (Golden delicious ya que es la de mayor volumen de producción) del huerto particular de Leopoldo Garduño en Amealco, Gro.

### DATOS DE LAS MUESTRAS:

VARIEDAD	ZONA DE MUESTREO	FECHA DE COLECTA
Golden D.	Amealco, Gro.	22 de nov. 1982
Golden D.	Amealco, Gro.	13 de dic. 1982
Golden D.	Amealco, Gro.	4 de enero 1983
Golden D.	Amealco, Gro.	25 de enero 1983
Golden D.	Amealco, Gro.	18 de feb. 1983

Todos los árboles fueron provenientes de viveros comerciales. Las yemas se colectaron de las ramas del árbol conocidas como lamburdas y brindillas coronadas, con una altura máxima de 2 metros. La edad de los árboles era de 20 años.

## 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 (Barendse et al/1968). 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.

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 el ácido carboxílico de las giberelinas.

Se dejó en refrigeración (4°C) durante 15 horas, después se filtró por papel Whatmann No.4 para eliminar las partículas insolubles.

Con este filtrado se realizó la partición líquido-líquido (Fig.11) de acuerdo al método seguido por Barendse et al/1968. Este método separa a los ácidos carboxílicos de los compuestos no ácidos, aprovechando la solubilidad y la insolubilidad de estos últimos en diferentes disolventes (Durley y Pharis/1972).

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 ma-

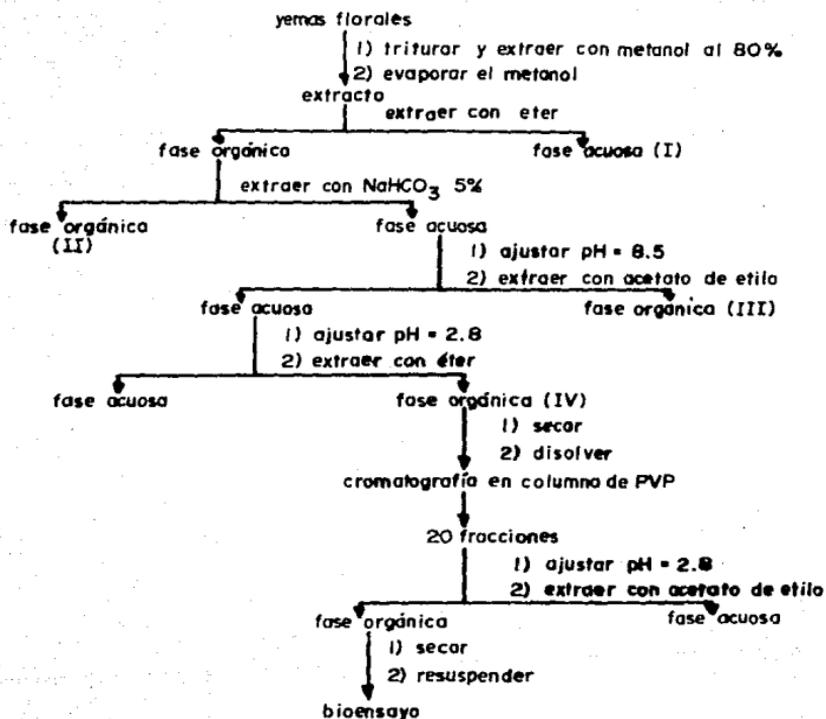


Fig. II. Esquema del procedimiento seguido en la extracción y purificación de giberelinas libres de yemas florales de manzano.

terial 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 et al/1972. 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 abscisico.

El polycar AT se pasó 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 fracciones 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 conocido de una mezcla de agua: etanol (4:1).

#### Bioensayo en 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.

Se eligió el bioensayo de epicotilos de chícharo, por su sencillez y facilidad de manejo, además se obtuvo una buena germinación de las semillas, el crecimiento de las plántulas fue rápido, sin problemas de contaminación y las respuestas de las plántulas hacia giberelinas fueron buenas.

## Obtención de las plántulas de chícharo.

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

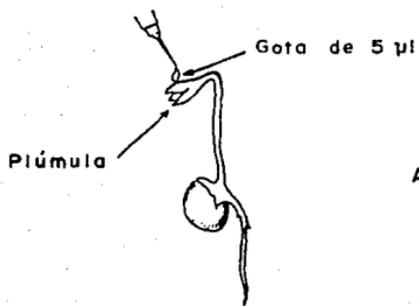
La latencia de las semillas se rompió exponiéndolas durante 8 días a la luz difusa. Después se remojaron en agua corriente por 24 horas, al final de las cuales, se escurrieron y se pusieron en agua con detergente durante 5 minutos, se enjuagaron y se dejaron en una solución de clocales (1:20), agitándolas 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 período, se seleccionaron las plántulas con altura de 2.5 a 2.7 cm para realizar el bioensayo.

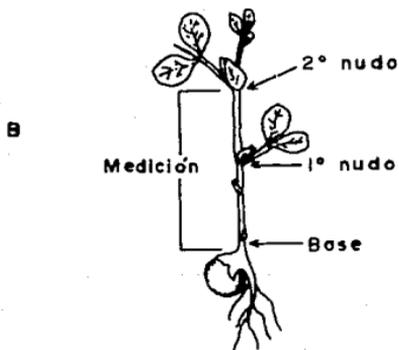
### Procedimiento.

La técnica (Wareing y Phillips/1978), consistió en aplicar una gota de 5  $\mu$ l de la muestra en la parte de la plántula de chícharo conocida como plómula (Fig.12 A); colocar a las plántulas en una cámara con iluminación roja obtenida con lámparas incandescentes General Electric de 10 watts (pintadas de rojo), 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.12 B). Cada una de las 20 fracciones que se obtuvieron por cromatografía, se probó a 3 diferentes concentraciones con 9 ó 10 plántulas por tratamiento.

Para lograr cuantificar la actividad biológica equivalente a ácido giberélico ( $\text{GA}_3$ ), se empleó una curva estándar que relaciona el porcentaje de incremento en longitud de la plántula (% long) con la concentración de  $\text{GA}_3$  aplicada en ellas. Se usaron las siguientes concentraciones de  $\text{GA}_3$ : 2, 20 y 200 mg/l. Se usó giberelina  $\text{A}_3$  (ácido giberélico) grado III, 95% min  $\text{GA}_3$  para bioensayo. Sigma (pfs).



A



B

Fig. 12. Esquema 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 13 a 17 se presentan los resultados graficados de los bioensayos de epicotilo de chícharo para cuantificar la actividad de las giberelinas en yemas de manzano de la variedad Golden Delicious con diferentes cantidades de horas-frío acumuladas. 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 el incremento en longitud de epicotilo de chícharo ( $\frac{1}{2}$  long.), 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. Para mayor claridad de la gráfica.

En las figuras 18 a 22 se muestra el tipo de curva estándar que se obtuvo en cada tipo de bioensayo.

En las figuras 23 a 27 se muestran en donde se presenta tendencia de crecimiento a la actividad de giberelinas.

En las figuras 28 a 32 se muestran en donde se pre-

senta tendencia de decremento a la actividad de giberelinas.

En la fig. 13 se presentan los resultados de las 20 fracciones que se obtuvieron con la muestra de yemas florales con fecha de colecta del día 22 de noviembre de 1982 con cero horas frío.

Grupo I. Las fracciones 3 y 4 presentaron un máximo de actividad estimulante en la concentración mayor, que equivale a 1000 mg de peso seco de las yemas, con incrementos de 268.04 y 258.76%. La fracción 2 presentó menor actividad estimulante al crecimiento.

Grupo II. Las fracciones 8 y 9 estimularon el crecimiento desde la menor concentración, siendo ésta de 50 mg de peso seco de las yemas con un incremento de 84.53 y 93.81% respectivamente. La fracción 10 presentó menor actividad estimulante al crecimiento.

Grupo III. Se presentó una estimulación del crecimiento con la mayor concentración 1000 mg de peso seco, en las fracciones 11, 14 y 15, con incrementos de longitud de 160.82, 192.70 y 260.30% respectivamente.

Grupo IV. Hubo mayor estimulación del crecimiento

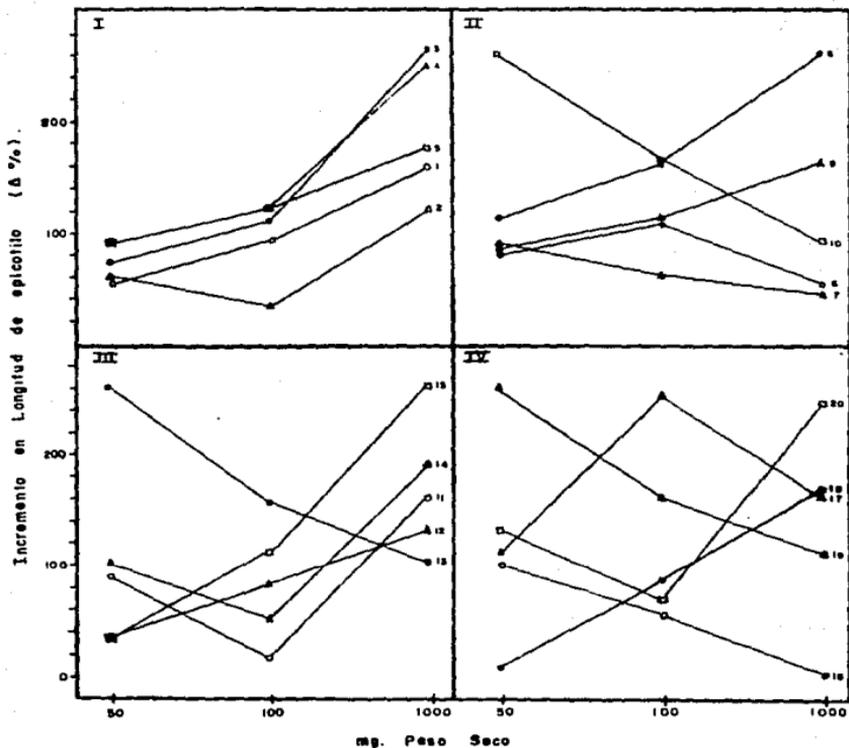


Fig. 15. Respuesta de plántulas de chícharo para determinar actividad de giberelinas a diferentes concentraciones de la muestra, representada por el peso seco de yemas florales de mameño var. Golden Delicious, colectadas el 22 de Noviembre con cero horas frío acumuladas. La muestra se purificó por cromatografía en columna de PVP, obteniendo 20 fracciones, las cuales se dividieron en 4 grupos de 5 fracciones, para mayor claridad de las gráficas. Cada valor representa el promedio de 9 a 10 réplicas.

con la fracción 17 a la concentración de 100 mg de peso seco de las yemas, con un incremento de 258.76%. La mayor actividad inhibitoria del crecimiento se obtuvo con la fracción 16 a concentración de 1000 mg de peso seco.

En la fig. 14 se presentan los resultados obtenidos con la muestra de yemas florales con fecha de colecta del 13 de diciembre de 1982. Con 174.23 horas frío acumuladas.

Grupo I: La fracción 5 presentó un mayor estímulo en el crecimiento, de 301.36% a la concentración de 1000. La fracción 2 presenta una actividad menor al crecimiento de 59.36%.

Grupo II. La mayor actividad estimulante del crecimiento se presentó con la fracción 8, siendo ésta de 396.80% a la concentración mayor o sea 1000 mg de peso seco. La fracción 7 también a esa concentración inhibió el crecimiento en un 96.35% respectivamente.

Grupo III. Todas las fracciones presentes en este grupo mostraron estimulación al crecimiento, siendo más marcada en las fracciones 12 y 15 con incremento de 251.59 y 273.97% a la mayor concentración de peso seco.

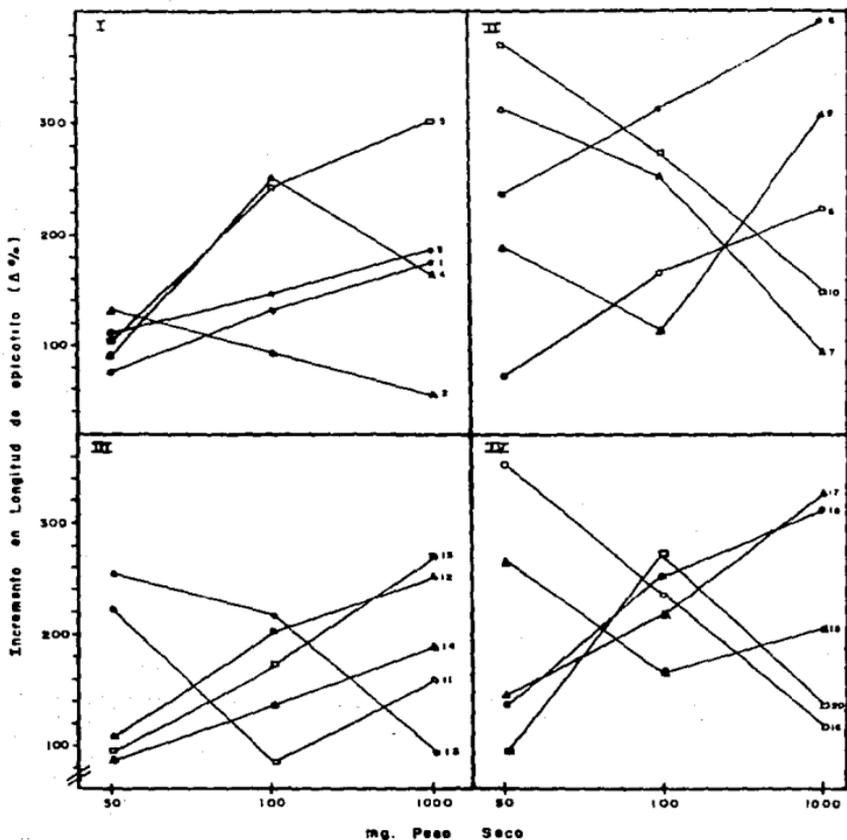


Fig. 14. Respuesta de la plúmula de chichara para determinar actividad de giberelinas a diferentes concentraciones de la muestra, representada por el peso seco de yemas florales de manzano con fecha de colecta del día 13 de Diciembre con 174.23 horas frío acumuladas. La muestra es purificada por cromatografía en columna de PVP, obteniendo 20 fracciones, las cuales se dividen en 4 grupos de 5 fracciones, para mayor claridad de la gráfica. Cada valor representa el promedio de 9 a 10 réplicas.

Grupo IV. En este grupo la única fracción que estimuló el mayor crecimiento fue la 16, con un incremento de 352.05% a la concentración de 50 mg de peso seco. La fracción 20 da una mayor actividad al crecimiento a la concentración que es de 50 mg de peso seco provocando un 93.15% de inhibición.

La fig. 15 presenta los resultados de las 20 fracciones de la muestra de yemas florales de manzano con fecha de colecta del día 4 de enero de 1983, con 356.73 horas frío acumuladas.

Grupo I. La fracción 1 estimula el crecimiento en un 386.66% con la concentración mayor, de 1000 mg de peso seco. La fracción 5 también estimula el crecimiento en un 357.77% con la concentración de 1000 mg de peso seco. La fracción 3 presentó una menor actividad al crecimiento de 141.77% a la concentración de 100 mg de peso seco.

Grupo II. Las fracciones 7, 9 y 10 estimularon el crecimiento en forma muy semejante entre sí, con incrementos entre 375.11%, 353.33% y 334.66%, a la mayor concentración, 1000 mg de peso seco.

Grupo III. Las fracciones 12 y 15 fueron las que estimularon el crecimiento a la concentración de 1000 mg de

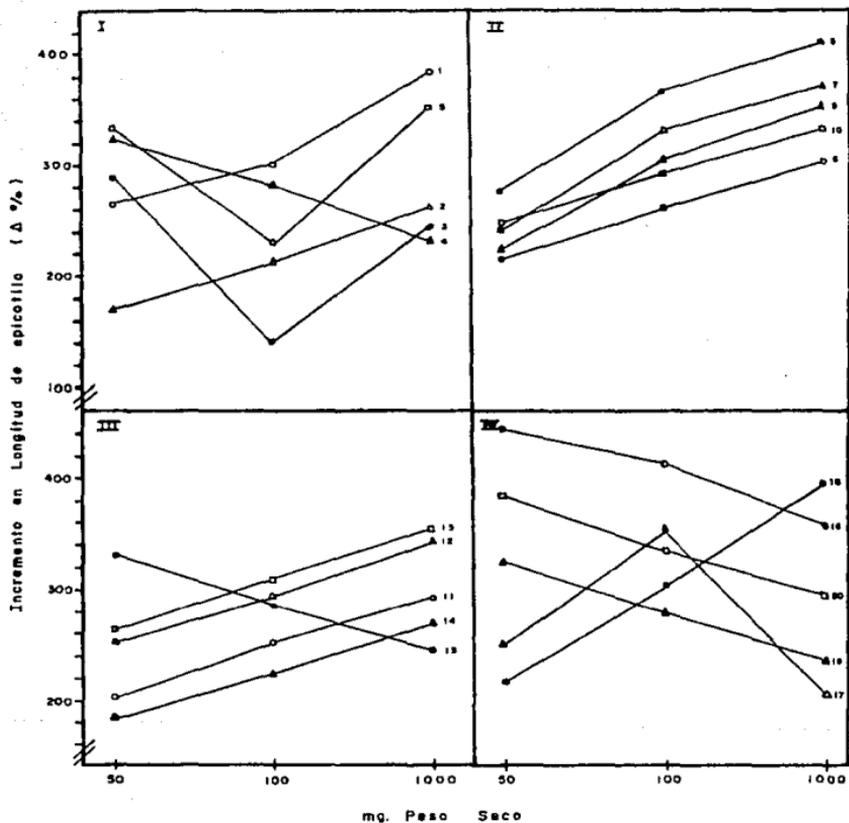


Fig. 15. Respuesta de la plúmula de chicharo para determinar actividad de giberelinas a diferentes concentraciones de la muestra, representada por el peso seco de yemas florales de manzano con fecha de colecta del día 4 de Enero con 356.73 horas frío acumuladas. La muestra se purificó por cromatografía en columna de PVP, obteniéndose 20 fracciones, las cuales se dividieron en 4 grupos de 5 fracciones, para mayor claridad de la gráfica. Cada valor representa el promedio de 9 a 10 réplicas.

peso seco, con incrementos de longitud de 340.88% y 352.88% respectivamente.

Grupo IV. Las fracciones 16, 17 y 20 fueron las que estimularon más el crecimiento, con incrementos de 440.44%, 322.66% y 380.44% respectivamente, a la concentración de 50 mg de peso seco. La fracción 18 estimuló el crecimiento en un 395.55% a la concentración de 1000 mg de peso seco.

En la fig. 16 se presentan los resultados de las 20 fracciones que se obtuvieron con la muestra de yemas florales del día 25 de enero de 1983, con 581.23 horas frío acumuladas.

Grupo I. Las fracciones 1 y 5 presentaron un estímulo en el crecimiento de 258.14% y 340.08% a la concentración de 1000 mg de peso seco. La fracción 2 presenta menor actividad estimulante al crecimiento, a la concentración de 50 mg de peso seco.

Grupo II. La mayor actividad estimulante del crecimiento se presentó con las fracciones 8 y 9 siendo éstas de 354.18% y 309.25% a la concentración mayor, o sea de 1000 mg de peso seco. La fracción 6 a esa concentración presenta una actividad menor al crecimiento de 162.11%.

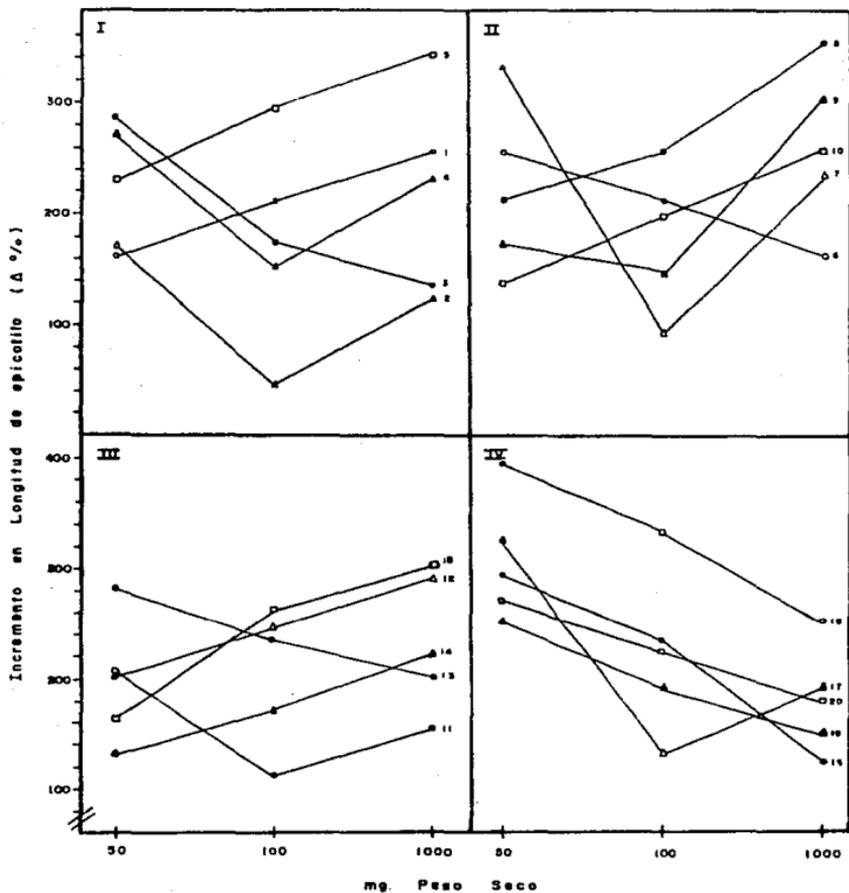


Fig. 16. Respuesta de la plúmula de chicharo para determinar actividad de giberelinas a diferentes - concentraciones de la muestra, representada por el peso seco de yemas florales de manzana con fecha de colecta del día 25 de Enero con 581.25 horas frío acumuladas. La muestra se purificó por - cromatografía en columna de PVP, obteniendo 20 fracciones, las cuales se dividieron en 4 grupos de 5 fracciones, para mayor claridad de la gráfica. Cada valor representa el promedio de 9 a 10 réplicas.

Grupo III. En este grupo, las fracciones 12 y 15 fueron las que estimularon el crecimiento a la concentración de 1000 mg de peso seco, con incrementos de 292.51% y 304.85% respectivamente.

Grupo IV. Todas las fracciones presentes en este grupo mostraron poca actividad al crecimiento, siendo más marcada en las fracciones 18 y 19 con un incremento de 126.87% y 155.50%, a la mayor concentración de peso seco.

Fig. 17 se representan los resultados de las 20 fracciones que se obtuvieron con la muestra de yemas florales con fecha de colecta del día 18 de febrero de 1983, con 758.6 horas frío acumuladas.

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

Grupo I. Las fracciones 1 y 5 estimularon el crecimiento a la mayor concentración, siendo ésta de 1000 mg de peso seco de las yemas, con incrementos de 475.77% y 398.23% respectivamente. La fracción 4 presentó menor crecimiento.

Grupo II. Se presentó una estimulación del crecimiento

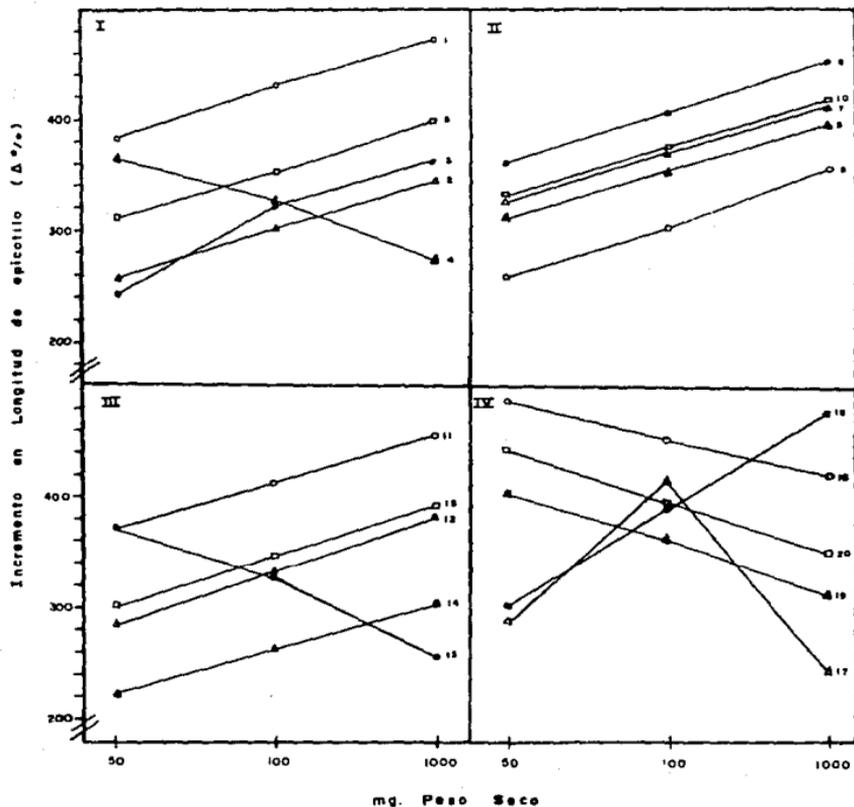


Fig.17. Respuesta de la plántula de chícharo para determinar actividad de giberelinas a diferentes concentraciones de la muestra, representada por el peso seco de yemas florales de manzano con fecha de colecta del día 18 de Febrero de 1953 con 755.6 horas frío acumuladas. La muestra se partió por cromatografía en columna de PVP, obteniendo 20 fracciones, las cuales se dividieron en 4 grupos de 5 fracciones, para mayor claridad de la grafica. Cada valor representa el promedio de 8 a 10 réplicas.

to con la mayor concentración, 1000 mg de peso seco, en las fracciones 7, 8, 9 y 10 con incrementos de longitud de 414.92%, 451.10%, 399.11% y 418.94% respectivamente.

Grupo III. Hubo mayor estimulación del crecimiento con la fracción 11 a la concentración de 1000 mg de peso seco de las yemas, con un incremento de 459.03%. La menor actividad al crecimiento se obtuvo con la fracción 13 a la concentración de 1000 mg de peso seco y provocó un incremento de longitud al crecimiento de 259.91%.

Grupo IV. Las fracciones 19 y 20 presentaron poca actividad al crecimiento. La fracción 17 presentó un máximo de actividad estimulante en la concentración intermedia que equivale a 100 mg de peso seco de las yemas, con un incremento de 419.82%. La fracción 18 presentó su máximo de actividad estimulante a la concentración mayor, o sea, 1000 mg de peso seco. Con un incremento en la longitud del epicotilo de 479.29%.

En la fig. 33 se presenta el contenido de giberelinas equivalentes a  $GA_3$  en las diferentes fracciones de las muestras de yemas florales de manzano. Se observa que de las 20 fracciones con fecha de colecta del día 22 de noviembre, estimuló más el crecimiento en las fracciones 3,4, 8,10,13,15,17,19 y 20. La muestra con fecha de colecta

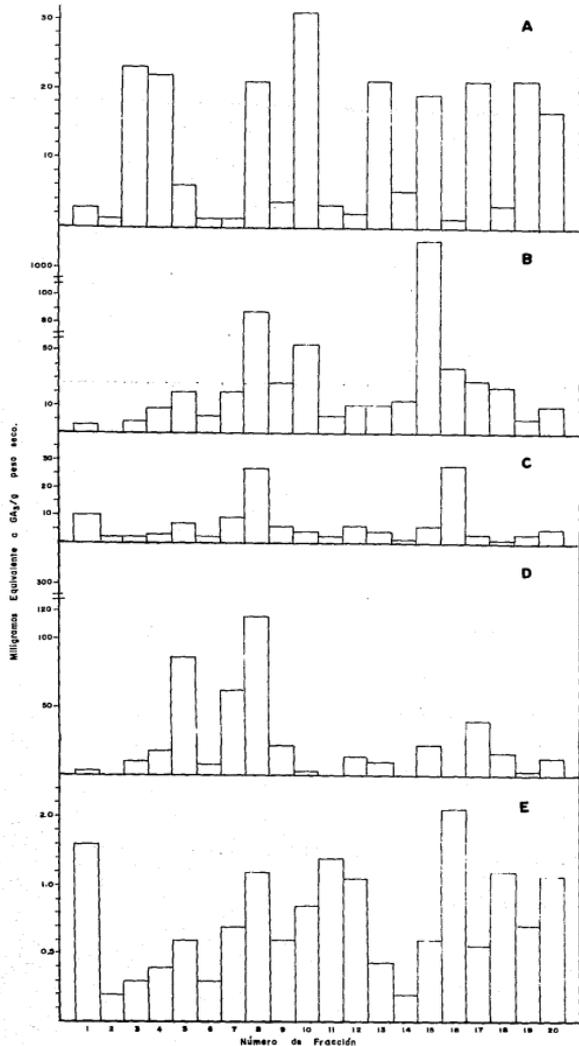


Fig. 33. contenido de Equivalentes de GA<sub>3</sub> en cada una de las fracciones obtenidas por cromatografía en columna de PVP en muestras de ramas floradas de manzana que estimularon el crecimiento en el bioensayo de epicotila de cafézaro.

- A.** Colecta del día 22 de Noviembre, con H.F. de cero  
**B.** " " " 13 de Diciembre, con H.F. de 174.25  
**C.** " " " 4 de Enero, con H.F. de 356.73  
**D.** " " " 25 de Enero, con H.F. de 581.23  
**E.** " " " 18 de Febrero, con H.F. de 758.6

del día 13 de diciembre, sólo estimuló el crecimiento en las fracciones 8 y 15, en las demás fracciones presentaron menor actividad al crecimiento. Los resultados obtenidos con la muestra del día 4 de enero, estimuló más el crecimiento en la fracción 8 y 16 y casi todas las fracciones de los grupos III y IV se observó poco crecimiento. La siguiente muestra con fecha de colecta del día 25 de enero, presentó como fracciones más activas en estimular el crecimiento a las fracciones 5, 7 y 8. Por último, la muestra con fecha de colecta del día 18 de febrero, se estimuló más el crecimiento en todas las fracciones de los grupos II, III y IV.

En la tabla 2, vemos que las yemas florales de la primera colecta contiene 6.97mg equivalentes a  $GA_3/g$  peso seco, en la segunda colecta contiene 8.55 mg de eq.  $GA_3/g$  peso seco, de yemas florales. La tercera colecta presenta 25 mg eq.  $GA_3/g$  peso seco. La muestra cuarta presentó 131 mg de  $GA_3/g$  peso seco. La última muestra presentó la menor concentración de giberelinas: 0.23 mg equivalentes a  $GA_3/g$  peso seco, siendo ésta menor que la concentración encontrada para las demás colectas.

Para lograr cuantificar las horas frío se utilizó el método correspondiente, a continuación se exponen los cálculos efectuados.

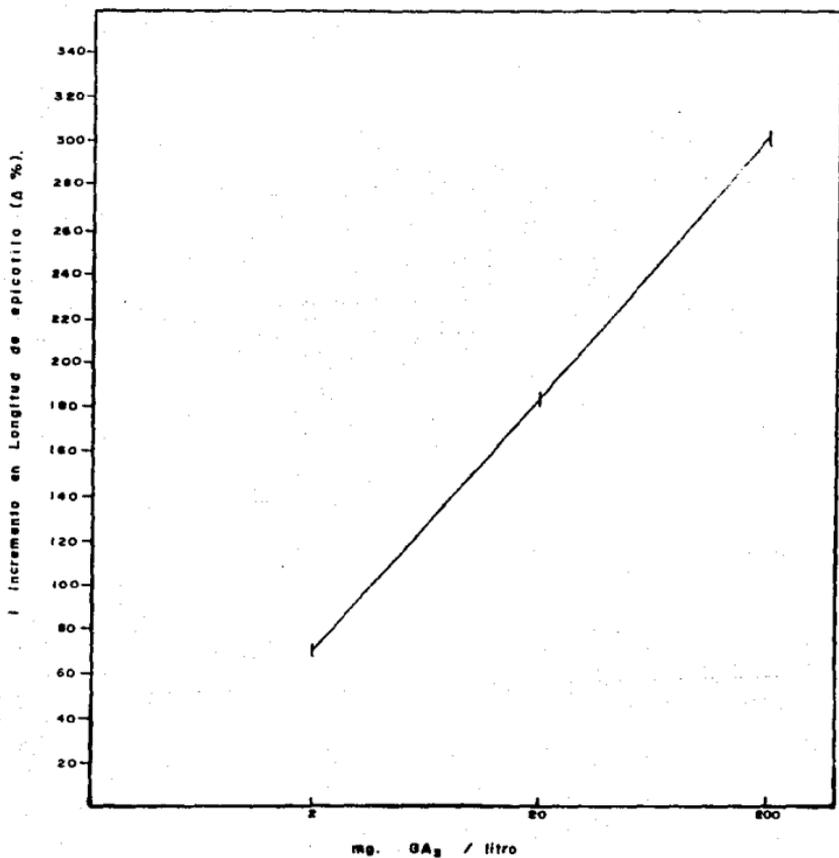


Fig. 18. Curva estándar (semilogarítmica) para el bioensayo de chícharo del día 22 de noviembre, que relaciona el incremento en longitud de epicotilo (Δ %) con diferentes concentraciones de ácido giberélico aplicadas en las plúmulas de chícharo.

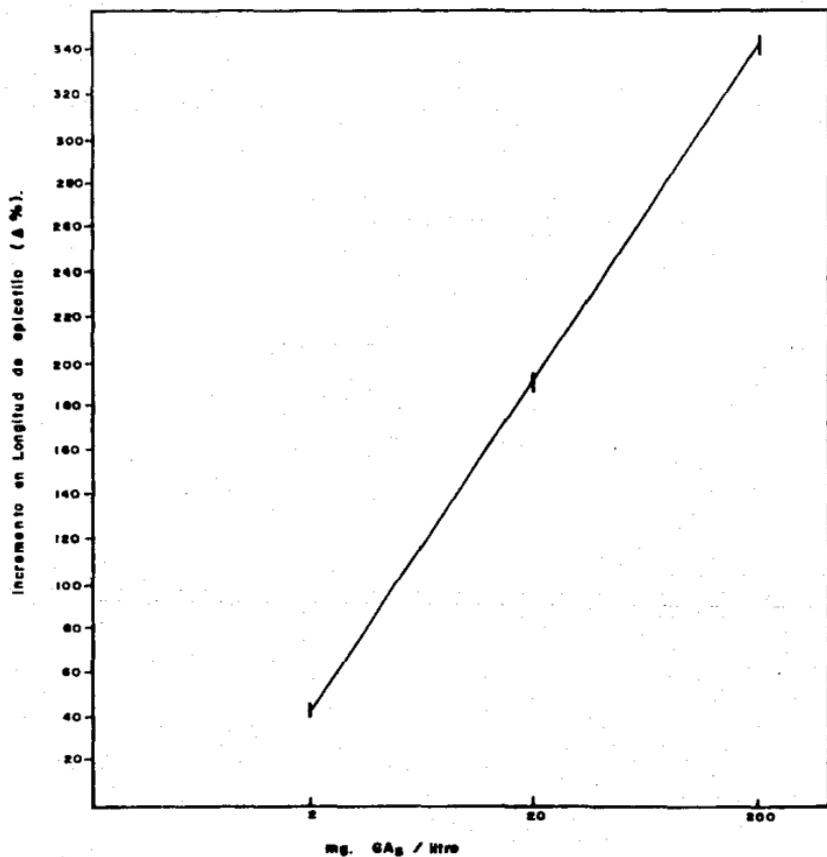


Fig. 19. Curva estándar (semilogarítmica) para el bioensayo de chícharo del día 13 de diciembre, que relaciona el incremento en longitud de epicotilo (Δ %) con diferentes concentraciones de ácido giberélico aplicadas en las plántulas de chícharo.

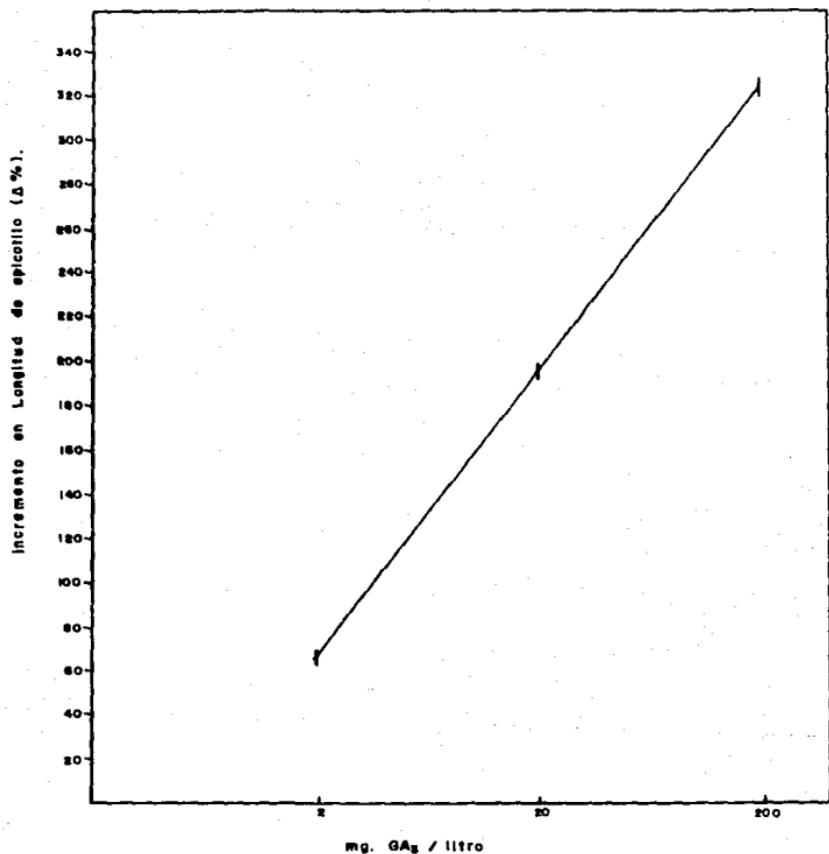


Fig. 20. Curva estándar (semilogarítmica) para el bioensayo de chícharo del día 4 de enero, que relaciona el incremento en longitud de epicotilo (Δ%) con diferentes concentraciones de ácido giberélico aplicadas en las pléculas de chícharo.

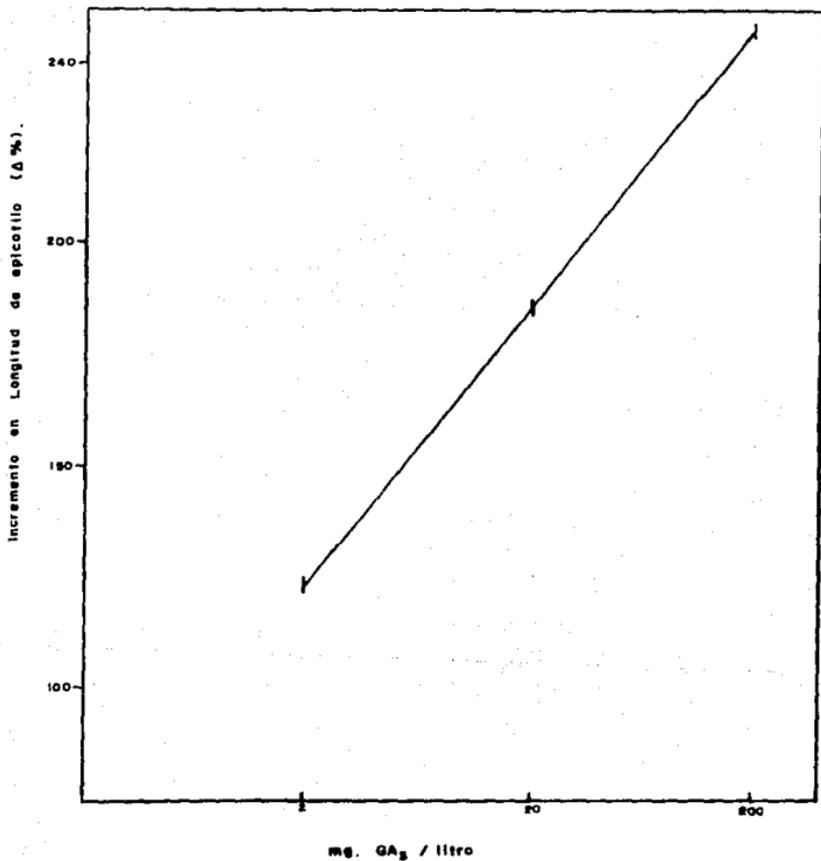


Fig. 21. Curva estándar (semilogarítmica) para el bioensayo de chícharo del día 25 de enero, que relaciona el incremento en longitud de epicotilo (Δ%) con diferentes concentraciones de ácido giberélico aplicadas en las plúmulas de chícharo.

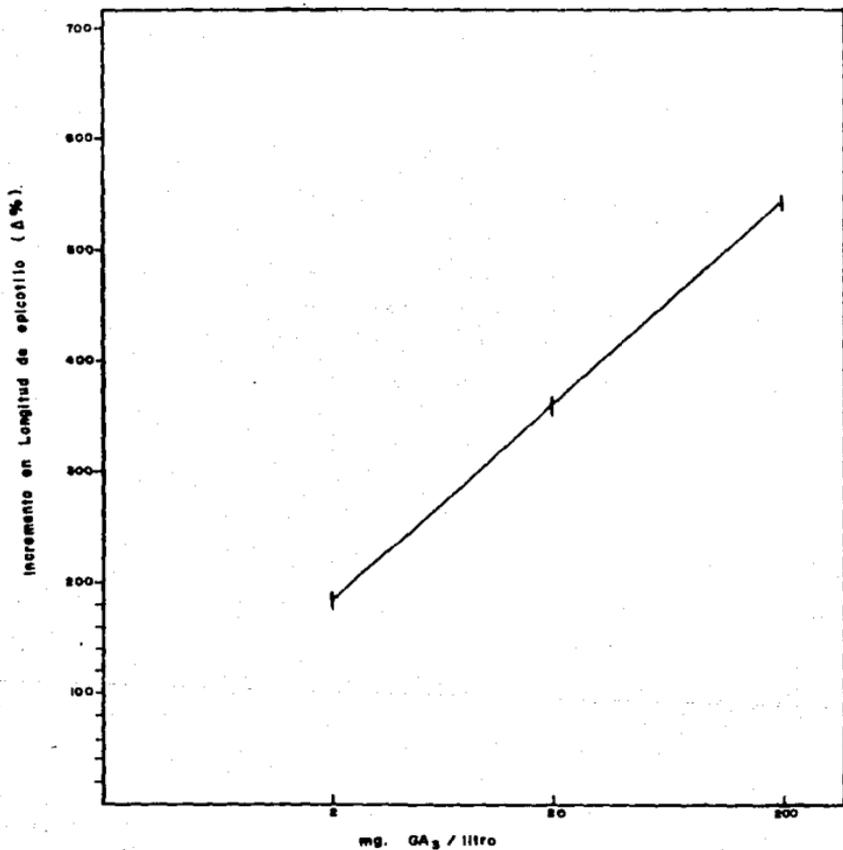


Fig.22. Curva estándar (semilogarítmica) para el bioensayo de chícharo del día 18 de febrero, que relaciona el incremento en longitud de epicotilio (Δ%) con diferentes concentraciones de ácido giberélico aplicadas en las plántulas de chícharo.

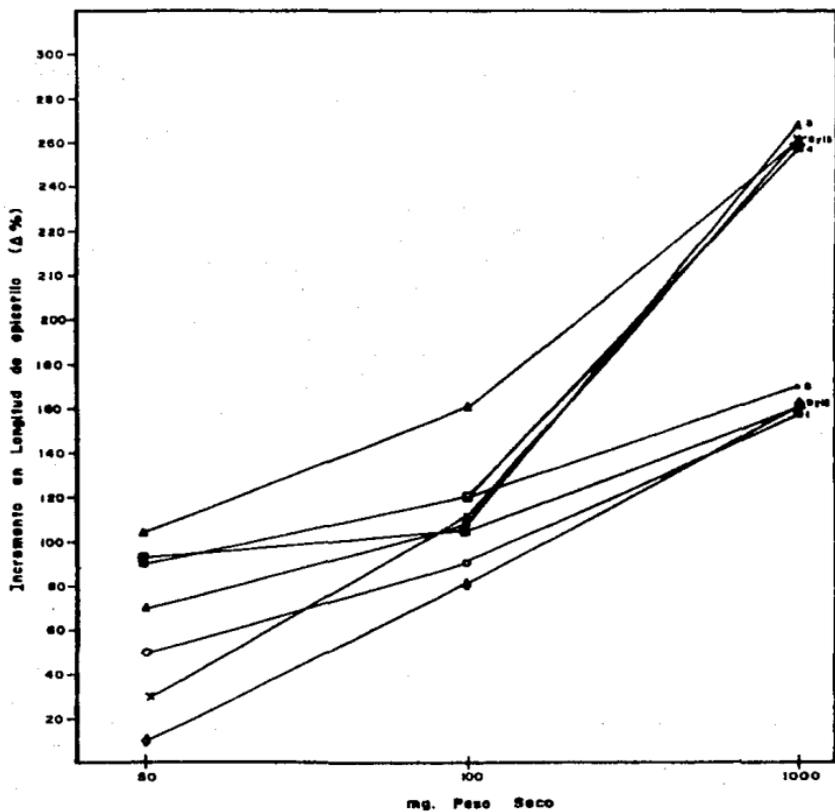


Fig. 23. Respuesta de plúmulas de chicharo en donde se presenta Tendencia de crecimiento a la actividad de giberelinas a diferentes concentraciones, colectadas el 22 de Noviembre.

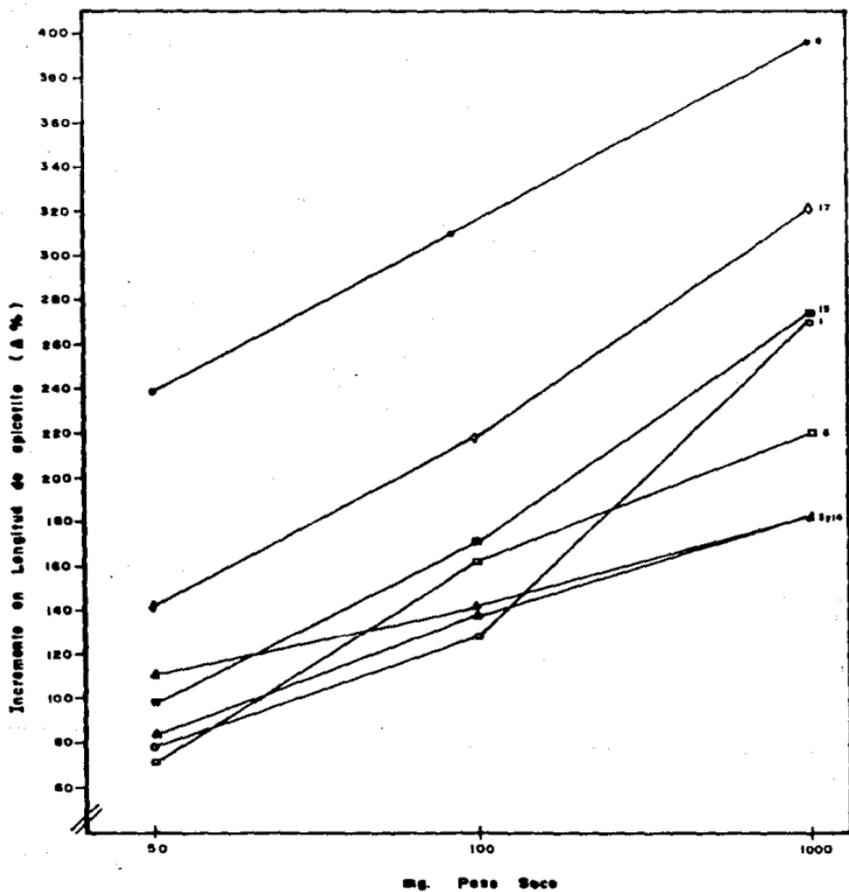


Fig. 24. Respuesta de plúmulas de chícharo en donde se presenta Tendencia de crecimiento a la actividad de giberelinas a diferentes concentraciones, colectados el 13 de Diciembre.

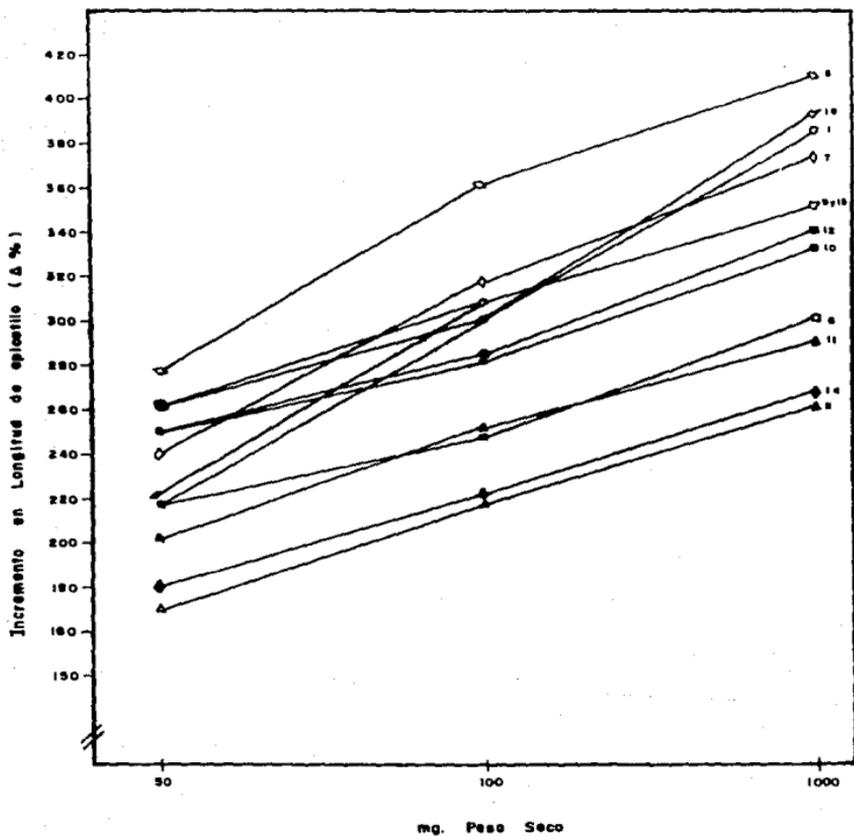


Fig. 25. Respuesta de plúmulas de chícharo en donde se presenta Tendencia de crecimiento a la actividad de giberelinas a diferentes concentraciones, colectadas el 4 de Enero.

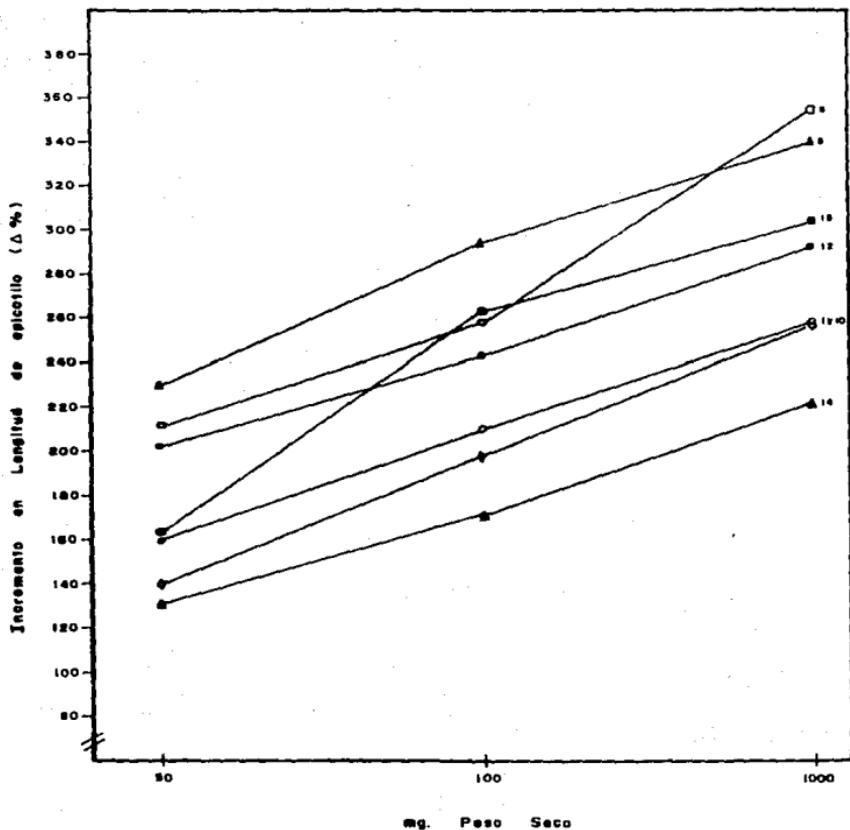


Fig. 26. Respuesta de plúmulas de chícharo en donde se presenta Tendencia de crecimiento a la actividad de giberelinas a diferentes concentraciones, colectadas el 25 de Enero.

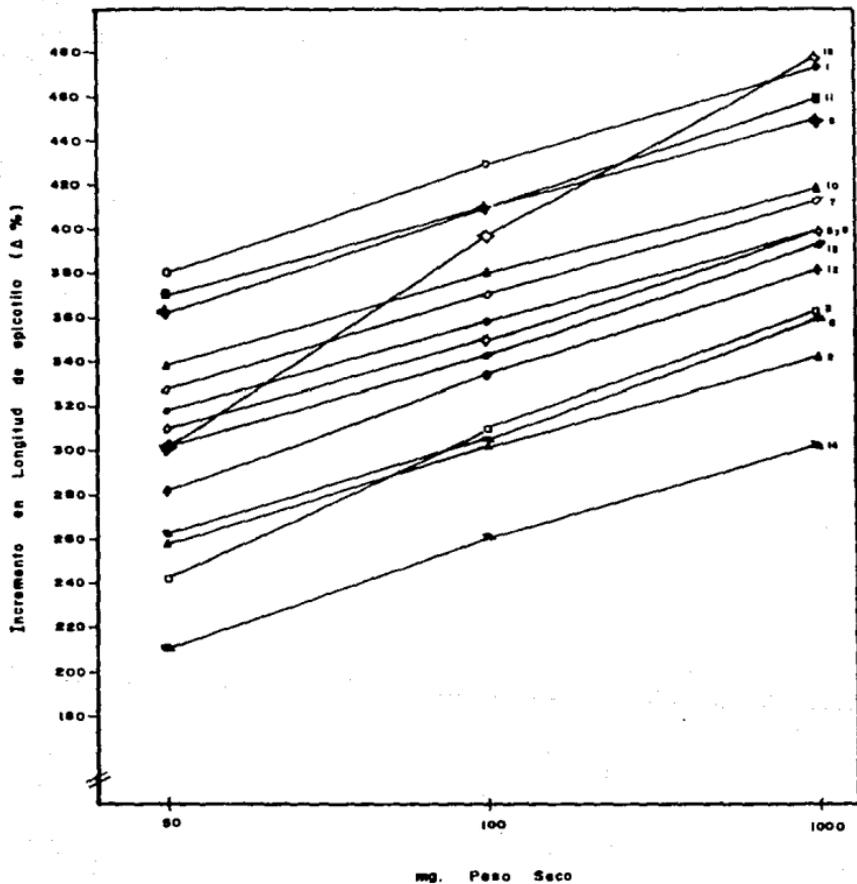


Fig. 27. Respuesta de plúmulas de chícharo en donde se presenta tendencia decreciente a la actividad de giberelinas a diferentes concentraciones, colectadas el 18 de Febrero.

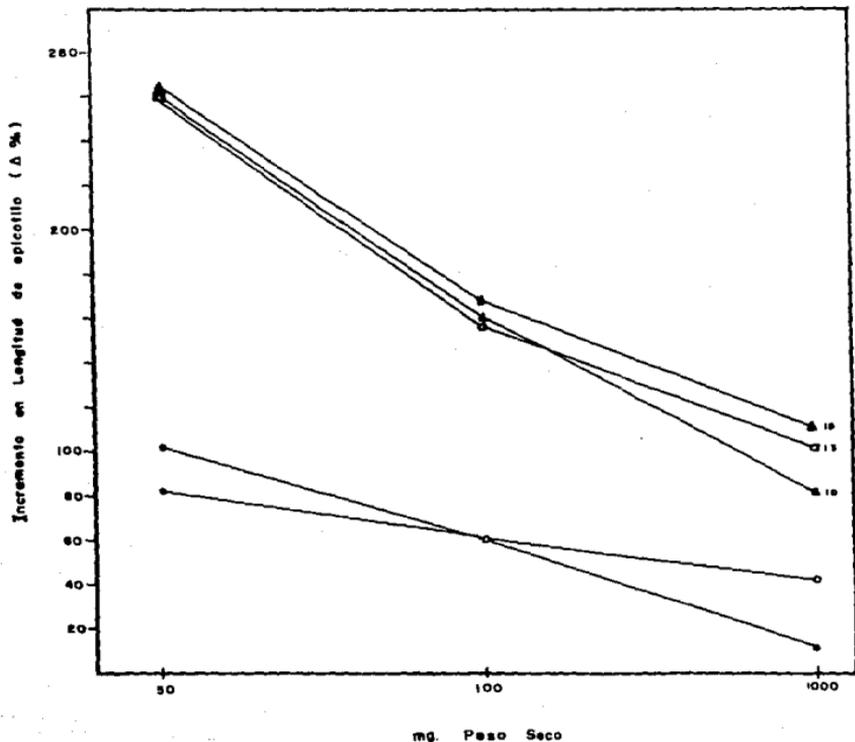


Fig. 28. Respuesta de plúmulas de chícharo en donde se presenta Tendencia de decremento a la actividad de gibberelinas a diferentes concentraciones, colectadas el 22 de Noviembre.

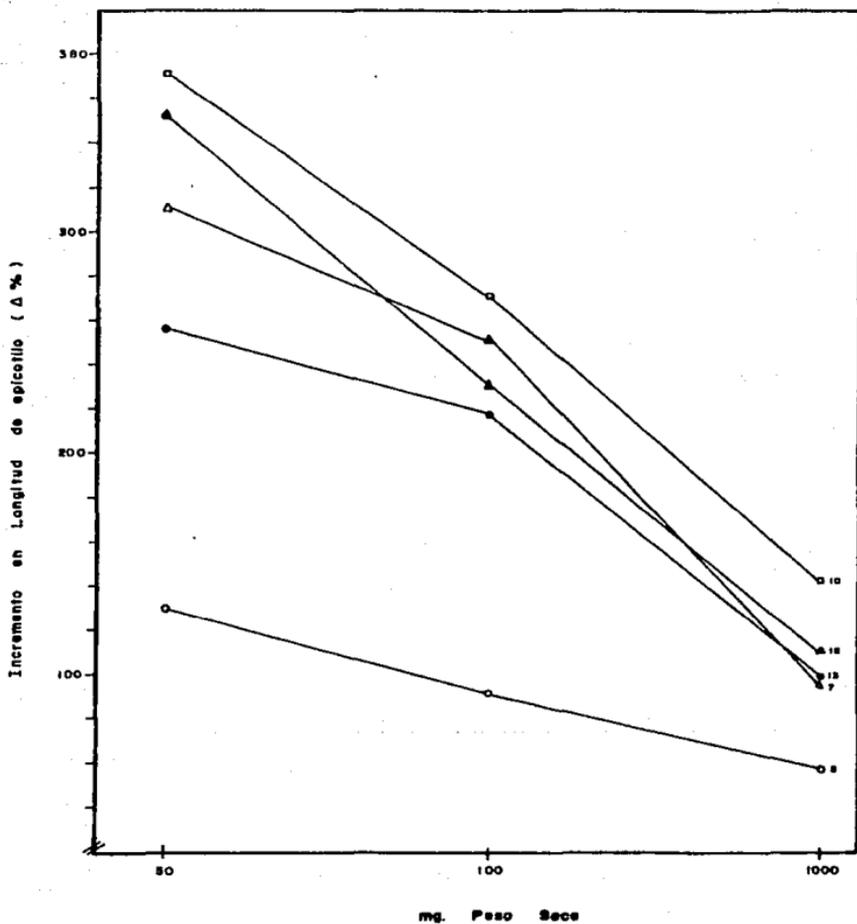


Fig. 29. Respuesta de plúmulas de chícharo en donde se presenta tendencia de decremento a la actividad de giberelinas a diferentes concentraciones, colectadas el 13 de Diciembre.

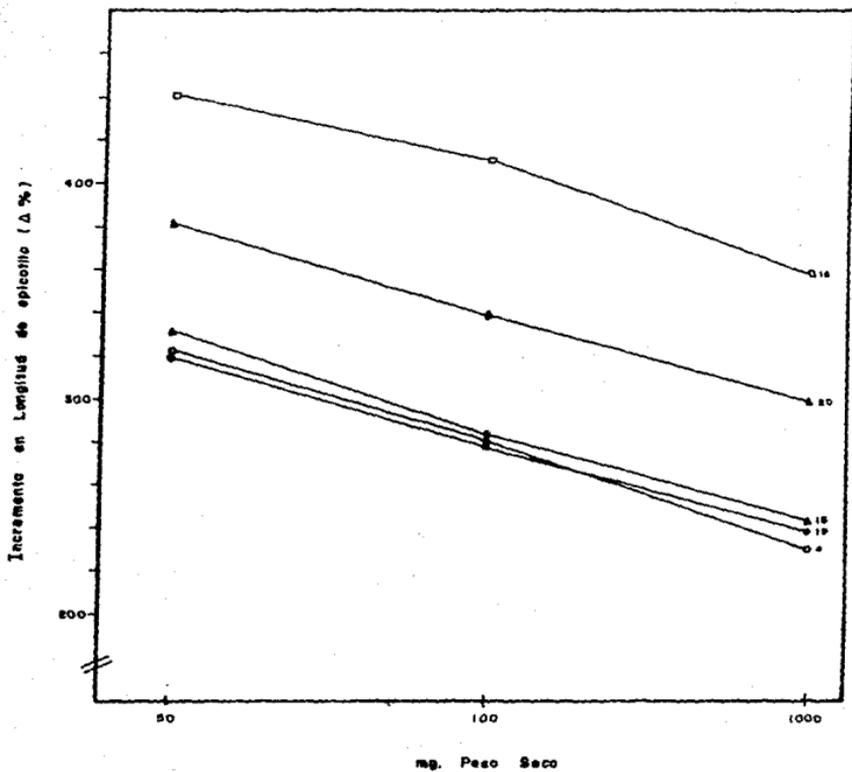


Fig. 30. Respuesta de plúmula de chícharo en donde se presenta tendencia de decremento a la actividad de giberelinas a diferentes concentraciones, colectadas el 4 de Enero.

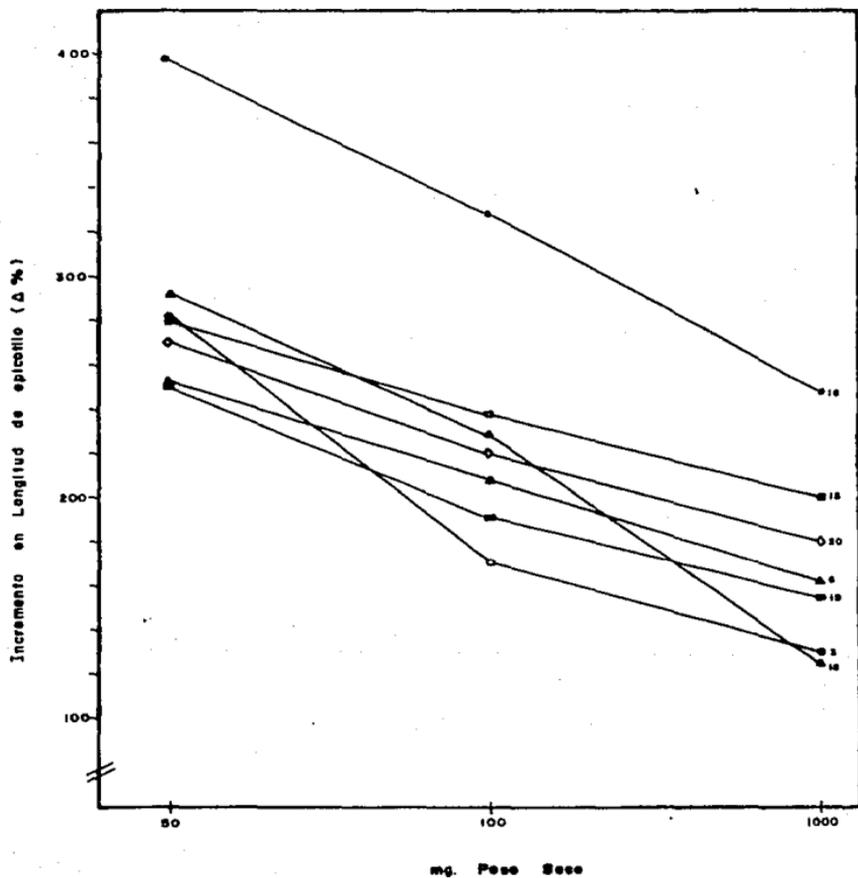


Fig. 31. Respuesta de plúmulas de chícharo en donde se presenta Tendencia de decremento a la actividad de giberelinas a diferentes concentraciones,colectadas el 25 de Enero.

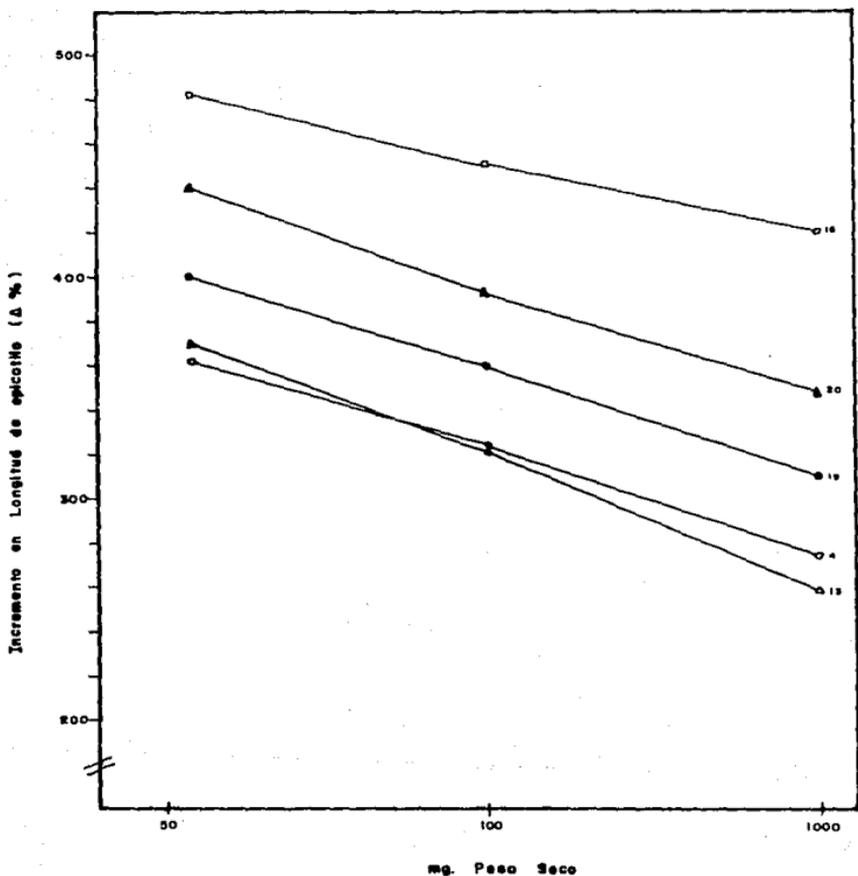


Fig. 32. Respuesta de plúmula de chíchero en donde se presenta Tendencia de decremento a la actividad de giberelinas a diferentes concentraciones,colectadas el 18 de Febrero.

TABLA 2. Número, Peso Fresco y Contenido equivalente a  $GA_3$  (determinado por bioensayo de chícharo) de yemas florales de cinco muestras de Manzano, variedad Golden Delicious (G.D.).

FECHA DE COLECTA	22/XI/82	13/XII/82	4/I/83	25/I/83	18/II/83
Horas frío acumuladas	cero	174.23	356.73	581.23	758.6
Número de yemas	942	1430	1970	2166	2225
Peso fresco del total de yemas (gr)	43.4	53.5	66.1	83.8	86.0
Peso fresco de yemas (gr)	16.6	23.3	27.3	30.0	30.8
Eq. $GA_3$ /gr Peso Seco (miligramos)	6.97	8.55	25	131	2.72
Eq. $GA_3$ /yema (miligramos).	0.40	0.65	2.02	10.9	0.23

CALCULOS DE HORAS FRIO POR EL METODO DE DA MOTA

$$\text{H.F.} = 485.1 - 28.52 \times X$$

DONDE

$X = 10.9^{\circ}\text{C}$  Temperatura media mensual del mes de  
noviembre.

$$\text{H.F.} = 485.1 - 28.52 (10.9)$$

$$\text{H.F.} = 174.23$$

DONDE

$X = 10.61^{\circ}\text{C}$  Temperatura media mensual del mes de  
diciembre.

$$\text{H.F.} = 485.1 - 28.52 (10.61)$$

$$\text{H.F.} = 182.5$$

DONDE

$X = 9.14^{\circ}\text{C}$  Temperatura media mensual del mes de  
enero.

$$\text{H.F.} = 485.1 - 28.52 (9.14)$$

$$\text{H.F.} = 224.5$$

DONDE

$X = 10.79^{\circ}\text{C}$  Temperatura media mensual del mes de febrero.

H.F. =  $485.1 - 28.52 (10.79)$

H.F. = 177.37

Estos resultados se suman entre sí, para darnos un valor - total de 758.6 H.F. acumuladas.

CALCULO PARA EQUIVALENTE DE GA<sub>3</sub>/YEMA.

Sólo se dividió el eq. de GA<sub>3</sub> total.\*

Fecha de Colecta:	Eq GA <sub>3</sub> Total.	* Yemas =.	Resultado.
22/XI/82	584.9	911	0.40
15/XII/82	929.6	1450	0.65
4/I/83	5990.3	1971	2.02
25/I/83	23627.6	2160	10.9
18/II/83	518.6	2225	0.23

\* Obtenido de la extrapolación y el número de yemas.

- CALCULOS PARA EQUIVALENTE DE GA<sub>3</sub>/GRAMOS DE PESO SECO.

Con el incremento en longitud de epicotilo de chícharo (A%) obtenido, se extrapolaren los datos en la curva estándar, obteniendo la cantidad de giberclinas en miligramos dividiéndola con los gramos de peso fresco de yemas. Esto se realizó para cada fecha de colecta.

FECHA DE COLECTA.	EQ. GA <sub>3</sub>	SU PESO FRES CO YEMAS.	RESULTADO OBTENIDO.
22/XI/82	115.8	16.6	6.97
13/XII/82	199.4	23.3	8.55
4/I/83	682.7	27.3	25
25/I/83	3937.4	30	131
18/II/83	85.9	30.8	2.72

## 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, las giberelinas, las citocininas, el ácido abscísico, el etileno y otras sustancias inhibitoras 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 manzano, que presentaron actividad de giberelinas en el bioensayo de epicotilo de chícharo.

La técnica inicial empleada para purificar las giberelinas libres, fue la participación 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 la purificación posterior, como es la cromatografía.

En este trabajo, se empleó la cromatografía de afinidad en columna, usando como fase estacionaria al polímero povidona (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 de hormonas presentes 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 las 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 en un intento de determinar cuáles giberelinas estarían presentes en yemas de manzano, se siguieron ciertos criterios para una selección preliminar. 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 (Lang/1970). En esta clase, tenemos a las giberelinas: GA<sub>13</sub>, GA<sub>14</sub>, y GA<sub>36</sub>.

2.- Eliminar a las otras giberelinas que se han reportado únicamente en G. fujikuroi y no en plantas superiores, como son las giberelinas : GA<sub>10</sub>, GA<sub>11</sub>, GA<sub>12</sub>, GA<sub>15</sub> y GA<sub>16</sub>. (Lang/1970).

3.- Rearreglar las 49 giberelinas restantes en base a la presencia o ausencia del grupo hidróxilo en posición 13, ya que, de este grupo depende el volumen de elución de las giberelinas de la columna de cromatografía (Glenn et al/ 1972). Por lo tanto, las primeras giberelinas en eluirse serían las que sí poseyeran el grupo -OH en posición 13 y serían: GA<sub>2</sub>, GA<sub>4</sub>, GA<sub>7</sub>, GA<sub>9</sub>, GA<sub>26</sub>, GA<sub>27</sub>, GA<sub>30</sub>, GA<sub>31</sub>, GA<sub>33</sub> a GA<sub>35</sub>, GA<sub>37</sub>, GA<sub>39</sub> a GA<sub>43</sub>, GA<sub>45</sub> a GA<sub>52</sub> y GA<sub>54</sub>.

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 (Glenn et al / 1972):

Giberelina	Vol. elución	Intervalo de de tección.
GA <sub>8</sub> , GA <sub>13</sub>	85 ml	60 - 110 ml
GA <sub>1</sub> , GA <sub>3</sub> , GA <sub>5</sub>	90 ml	70 - 120 ml
GA <sub>9</sub>	110 ml	80 - 140 ml
GA <sub>4</sub> , GA <sub>7</sub>	120 ml	90 - 160 ml

El volumen de elución en el que se encontró una mayor actividad de giberelinas en los extractos de yema de manzano, fue el intervalo de 100 a 150 ml que es semejante al reportado por Glenn para las giberelinas mencionadas por él (Glenn et al / 1972). Como resultados de los criterios seguidos, se pueden pensar que, entre las posibles giberelinas presentes en las yemas de manzano, estarían GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>5</sub>, GA<sub>7</sub> y GA<sub>9</sub>. Como puntos de apoyo a esta primera selección es importante mencionar que, en estudios hechos con semillas de manzano (Dennis / 1976), se ha encontrado la presencia de GA<sub>4</sub>, GA<sub>7</sub> y GA<sub>9</sub>. 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 reposo implica un equilibrio entre sus tancias estimulantes e inhibitoras, como lo han sugerido Wareing y Saunders (Westwood/1978). La forma en que el frío podría intervenir en ese equilibrio sería:

A) Eliminar algún bloqueo existente en la biosíntesis de las giberelinas sugiriéndose (Westwood/1978) que podría ser el ácido abscísico. 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, ya que se ha demostrado que el control de la brotación está exclusivamente a nivel de cada yema.

- Comparación de los niveles de giberelinas en yemas.

Se ve que las yemas florales de la tercera muestra, contienen más equivalentes de  $GA_3$ /g peso seco, que la primera. Probablemente este fenómeno se debe a que las yemas de la primera muestra contienen inhibidores 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 (Glenn et al/1972).

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

## CONCLUSIONES.

1.- Las giberelinas están implicadas en la emergencia del reposo, ya que su concentración va en aumento conforme se acumulan horas-frío en el transcurso del invierno.

2.- Si la teoría de que el reposo-brotación están controlados por el balance de un equilibrio entre inhibidores y estimulantes del crecimiento es cierto, las giberelinas juegan el papel de estimulantes.

3.- Se comprueba que el control del fenómeno reposo-brotación en manzano está controlado en cada yema de la planta, que es donde se encuentra la concentración necesaria para vencer el reposo.

4.- Se logró cuantificar a las giberelinas activas (libres) presentes en yemas de manzano, en los diferentes estados de latencia. Aunque no fue posible establecer la estructura química de las mismas.

5.- Se describieron métodos útiles a seguir para la extracción, purificación, detección y cuantificación de las giberelinas.

A) Como métodos de purificación, fueron la partición

líquido-líquido y la cromatografía en columna con polivinilpirrolidona.

- B) Se seleccionó al bioensayo de epicotilo de chícharo como método de detección y cuantificación por su sencillez de manejo y buena respuesta reproducible.

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

- 1.- Abbott, D.F. (1970), "Physiology of tree crops", the role of budscales in the morphogenesis and dormancy of the apple fruit bud, pp 65 - 80. In L.C. Luck will and C.V. Cutting (eds), Academic, London.
- 2.- Alvarez, R.S. (1974), El manzano, 3ª edición. Publicaciones de extensión agrícola. Madrid, España.
- 3.- Barendse, G.W.M., H. Kende and A. Lang (1968), Fate of radioactive GA<sub>1</sub> in maturing and germinating seeds of peas and Japanese morning glory. Plant Physiol., 43: 815 - 822.
- 4.- Bennett, D.A. and M.J. Chrispeels (1972), De novo synthesis of ribonuclease and -1,3-glucanase by aleurone cells of barley. Plant Physiology, 49: 445 - 499.
- 5.- Birch, A.J.R.W. Richards and Smith H., (1958), The role of Gibberelic Acid. Proc. Cham. Soc. 192-3.
- 6.- Calderón, E. (1977), Fruticultura General 1ª edición. Ed. ECA. México.
- 7.- Calderón, E. (1976), La poda de árboles frutales. 2ª edición. Ed. particular del autor. México.
- 8.- Ceccarelli, N., R. Lorenzi and A. Alpi (1981), Kaurene metabolism in cell-free extracts of Phaseolus coccineus suspensors. Plants Science Letters, 21: 325 - 332.

- 9.- Clegg, M.D. and L. Rappaport (1970), Regulation of budrest in tubers of potato *Solanum Tuberosum* L. *Plant Physiol.*, 45: 8 - 13 y 33 - 36.
- 10.- Curtis, P.J. and B.E. Cross (1954), Gibberellic acid, a new metabolite from the filtrates of *Gibberella fujikuroi*. *Chem. Ind.*, 1066.
- 11.- D'Esclapon G. de R. (1970), Variedades americanas de manzan. *Nueva Enciclopedia de Agricultura*. Oikos-Tau ediciones. Barcelona, España.
- 12.- Dennis, F.J. Jr. (1976). Gibberellin-like substances in apple seeds and fruit flesh. *J. Amer.Soc.Hort.Sci.*, 101: 629 - 633.
- 13.- Devling M.R. (1970), *Fisiología Vegetal*. Ed.Omega,S.A. Casanova, Barcelona.
- 14.- Dunlap, J.R. and P.W.Morgan (1977), Reversal of induced dormancy in lettuce by ethylene, kintein and gibberellic acid. *Plant Physiol.*, 60: 222 - 224.
- 15.- Durley, R.C. and R.P. Pharis (1972), Partition coefficients of 23 gibberellins, *Phytochem.*, 11: 317 - 326.
- 16.- Eccher, T. and G.Boffelli (1981), Effects of dose and time of application of GA<sub>4+7</sub> on russetting, fruit set and shape of "Golden Delicious" apples. *Scientia Horticulturae*. 14: 307 - 314.
- 17.- Edwards, M.(1976), Dormancy in seeds of Charlock (*Sinapis Arvensis* L.) *Plant Physiol.*, 58: 626 - 630.

- 18.- Fábregas, J.R. (1964), Cultivo del manzano. Ed. Sintes. Barcelona, España.
- 19.- Gil-Albert V.F. (1980), Trabajo de arboricultura frutal Vol. 1. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid España.
- 20.- Glenn, J.L., C.C.Kuo, R.C. Durley and R.P. Pharis (1972) Use of insoluble polyvinylpirrolidone for purification of plant extracts and chromatography of plant hormones. Phytochem., 11: 345 - 351.
- 21.- Graebe, J.E., D.F. Bowen and J.Macmillan (1972), The conversion of mevalonic acid into gibberellin A<sub>12</sub> al-dehyde in a cell; free system from Cucurbita pepo. Planta, 102: 261 - 271.
- 22.- Hedden, P., J.Macmillan and B.O. Phinney (1978), The Metabolism of the gibberellins. Ann. Rev. Plant Physiol., 29: 149 - 191.
- 23.- Hinojosa Cuellar, (1979), Fenología. Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Irrigación.
- 24.- Juscafresa, B. (1973), Árboles frutales, cultivo y explotación comercial. 4ª edición. Ed. Aedos. Barcelona, España.
- 25.- Kurosawa, E. (1926), Experimental studies on the secretion of Fusarium heterosporum on rice plants. Trans. Nat. Hist. Soc. Formosa, 16: 213 - 227.

- 26.- Lang, A. (1970), Gibberellins: structure and metabolism. Ann. Rev. Plant Physiol., 21: 537 - 570.
- 27.- Leopold, A.C. (1975), Plant growth and development. 2<sup>o</sup> ed. Mc.Graw-Hill Book Co., Inc. New York, U.S.A.
- 28.- Lockhart, J.A. (1956), Reversal of the light inhibition of pea stem growth by the gibberellins. Proc. Natl. Acad. Sci., 42: 841 - 848.
- 29.- Mendez Ledesma Dimas (1981), Aplicaciones de etrel, citrolina y dinitro a la salida del reposo (*malus pumila*) C.V. tropical beauty. Tesis licenciatura. UAC.
- 30.- Nadeau, R. and L. Rappaport (1972), Uptake and metabolism of <sup>3</sup>H gibberellin A<sub>1</sub> by barley aleurone layers; response of abscisic acid. Planta (Berl.), 107: 315-324.
- 31.- Patterson, R.J. and L. Rappaport (1974), The conversion of gibberellin A<sub>1</sub> to gibberellin A<sub>8</sub> by a cell free enzyme system. Planta (berl.), 119: 183 - 191.
- 32.- Patterson, R.J., L. Rappaport and R.W. Breidenbach (1975), Characterization of an enzyme from *Phaseolus vulgaris* seed wick hydroxylates GA<sub>1</sub> to GA<sub>8</sub>. Phytochem. 14: 363 - 368.
- 33.- Pharis, R.P. (1975), Promotion of flowering in conifers by gibberellins. Forestry Chronicle, 51: 6.
- 34.- Pollard, C.J. (1969), Incorporation of Kaurenoic acid

- into gibberellins by chloroplast preparations of *Brassica oleracea*. *Phytochem.*, 8: 831 - 837.
- 35.-Rappaport L. and P. Adams (1978), Gibberellins: synthesis, compartmentation and physiological process. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, 284: 521 - 539.
- 36.-Ruck H.C. (1975), Deciduous fruit tree cultivars for tropical and sub-tropical regions. *Horticultural Review* No. 3, C.A.B. London.
- 37.- Salas Franco Armando (1974), Aplicación de algunas prácticas tendientes a inducir la brotación de manzano (*Malus pumilamill*) bajo condiciones de invierno benigno. Tesis de maestría, Universidad de Chapingo.
- 38.-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.
- 39.-Stoddart, J.L. W. Breidenbach, R Nadeau and L. Rappaport (1974), Selective binding of  $^3\text{H}$  gibberellin  $A_1$  by protein fractions from dwarf pea epicotyls. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 71: 3255 - 3259.
- 40.-Stolp, C.F., R.Nadeau and L.Rappaport (1973), Effect of abscisic acid on uptake and metabolism of  $^3\text{H}$  gibberellin  $A_1$  and  $^3\text{H}$  pseudogibberellin  $A_1$  by barley half-seeds. *Plant Physiol.*, 52: 546 - 548.

- 41.- Stolp, C.F., R. Nadeau and L. Rappaport, Absciscic acid and the accumulation, biological activity and metabolism of four derivatives of  $^3\text{H}$  gibberellin  $A_1$  in barley aleu rone layers. *Plant & Cell Physiol.*, 18: 721 - 728.
- 42.- Taiz, L. and J.E.Starks (1977), Gibberellic acid and enhancement of DNA turnover in barley aleurone cells. *Plant Physiol.*, 60: 182 - 189.
- 43.- Tamaro, D.(1974), *Tratado de fruticultura*. 4°edición, Ed. Gustavo Gil, S.A., Barcelona, España.
- 44.- Villiers Trevor A (1970), *Cuadernos de biologfa "Reposo y supervivencia de las plantas"*. Ed.Omega, S.A., Casanova, Barcelona.
- 45.- Wareing, P.F. and P.F. Saunders (1971), Hormones and dormancy. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 22: 261 - 288.
- 46.- Wareing, P.F. and I. D. J. Phillips (1978), *The control of growth and differentiation in plants*. 2°ed. William Clowes & Sons. Lond.
- 47.- Westwood, M.N. (1978), *Temperate zone pomology*, Ed. W. H. Freeman and Co. S. Fco. U.S.A.