

# GIBERELINAS BIOLÓGICAMENTE ACTIVAS EN TEJIDO FLORAL DE MANZANO (*Malus domestica* Borkh.)

H. Ramírez-Rodríguez<sup>†</sup>; A. Benavides-Mendoza; M. Galván-Estrada; E. A. Rangel-López.

Departamento de Horticultura, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. (<sup>†</sup>Autor responsable).

## RESUMEN

Con el propósito de conocer la existencia de actividad biológica de giberelinas en la flor de manzano, se realizó un análisis cuantitativo de esas hormonas endógenas en pétalos y saco embrionario de flores en los cultivares Golden Delicious, Rome Beauty y Red Delicious utilizando la prueba biológica del hipocotilo de la lechuga. Con base en la técnica utilizada, se encontró, que la actividad de giberelinas está presente tanto en los pétalos como en el saco embrionario en diferentes cantidades; se determinó, que en los cultivares Golden Delicious, Rome Beauty y Red Delicious, el nivel de giberelinas en los pétalos fue de 0.78, 14.47 y 1.8  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de peso seco, respectivamente, mientras que en el saco embrionario fue de 0.4, 0.18 y 10.8  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de peso seco, en la misma secuencia. Los resultados permiten concluir que la presencia y niveles de giberelinas varían entre partes florales y entre cultivares.

**PALABRAS CLAVE ADICIONALES:** Fitohormonas, frutal templado, análisis biológico.

## BIOLOGICALLY ACTIVE GIBBERELLINS IN FLORAL TISSUE OF APPLE (*Malus domestica* Borkh.)

## SUMMARY

To study the biological activity of endogenous gibberellins in the apple flower, a quantitative analysis of these hormones in petals and embryo sac was performed in the cultivars Golden Delicious, Rome Beauty and Red Delicious, using lettuce hypocotyl bioassay. It was found that gibberellin activity is present in both petals and embryo sacs. However, the concentration varies within floral tissue and among cultivars. The level of these hormones in petals was 0.78, 14.47, and 1.8  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , dry weight for Golden Delicious, Rome Beauty, and Red Delicious, respectively, whereas, in the embryo sac it was 0.4, 0.18, and 10.8  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  dry weight in the same order. The results show that the presence and levels of gibberellins vary among floral parts and cultivars of apple.

**ADDITIONAL KEY WORDS:** Plant hormones, temperate fruit, bioassay.

## INTRODUCCIÓN

La formación de un fruto de manzano, es el resultado del ensanchamiento del ovario ocasionado por un estímulo interno cuando se realiza la fecundación del óvulo en una flor polinizada. Sin embargo, existen diversos factores que pueden modificar e incluso nulificar, que esta etapa de desarrollo sea llevada a cabo. La temperatura, luz, humedad y condiciones apropiadas del suelo integradas a los factores genéticos y fisiológicos, son determinantes, para un desarrollo óptimo de flor y fruto, cuyo reflejo se verá en la producción (Heins *et al.*, 2000; Khanizadeh *et al.*, 1994).

Poco se conoce de los pétalos, se sabe que son aparentemente un atractivo para las abejas por su color, aroma y néctar que desprenden pero que tal vez, la conexión que los une con el saco embrionario en la base

floral, pueda intervenir en el envío de sustancias nutritivas u hormonas endógenas, que participen en el desarrollo del fruto (Goldwin, 1994).

Los biorreguladores en la fruticultura moderna, están siendo empleados para modificar y manejar la fisiología de la planta y poder acelerar o retrasar los estadios fenológicos para obtener los resultados deseados. Las giberelinas, como parte de ellos, participan o intervienen, induciendo alargamiento del tallo, partenocarpia y buen desarrollo del fruto (Bangerth, 1997).

Por tanto, los objetivos de la presente investigación fueron: determinar la presencia de giberelinas en los pétalos y saco embrionario de las flores de manzano, y conocer cuantitativamente el contenido de ellas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se llevó a cabo en los laboratorios de Horticultura de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro en Saltillo, Coahuila, México.

En el periodo inicial de primavera en 1998, se colectaron flores en estado de botón floral de los cultivares Red Delicious, Golden Delicious y Rome Beauty. Estas muestras se tomaron de árboles de manzano de 20 años de edad injertados en MM 106 de un huerto localizado en Huachichil, municipio de Arteaga, Coahuila, México (25° 15' N).

Las flores fueron transferidas inmediatamente a nitrógeno líquido. Una vez en el laboratorio, se liofilizaron y, separaron en pétalos y saco embrionario para posteriormente determinar su peso seco y prepararlas enseguida para su análisis giberélico, utilizando la técnica reportada por Ramírez (1994). El diseño que se empleó fue completamente al azar con tres repeticiones por cultivar.

### Análisis hormonal de giberelinas

#### Extracción

Cada muestra consistente en 1.0 g de peso seco se colocó en un matraz Erlenmeyer y se agregó 50 ml de metanol (80 %), conservándose durante 15 h a temperatura de -12 °C. Posteriormente, se filtró en papel Whatman 1. El residuo del filtrado fue procesado en dos ocasiones con igual cantidad de metanol (100 %) durante 3 h a la misma temperatura. Los tres filtrados integrados en un matraz bola fueron evaporados a temperatura de 50 °C en evaporador rotativo con baño maría.

#### Purificación

Al matraz bola conteniendo la muestra se le agregó 100 ml de solución buffer con pH 8.0 y la solución transferida a un embudo de separación. Para la partición, se agregó 50 ml de éter de petróleo (97 %) y se agitó la mezcla durante 30 segundos. Una vez separada la fase de éter de petróleo del solvente, ésta fue eliminada. La purificación se repitió con 50 ml de acetato de etilo (98 %). Inmediatamente después se filtró la muestra en papel Whatman 1 y se ajustó a pH 2.5 con ácido clorhídrico. Esta solución se mezcló con 150 ml de acetato de etilo (98 %) en un embudo de separación para obtener en este último las giberelinas.

#### Cromatografía

Se utilizó la cromatografía de capa fina (CCF) con sílica gel GF254 en 70 ml de agua destilada. Luego del lavado de las placas cromatográficas, se procedió a la

aplicación de las muestras; utilizando 0.1 ml de acetona (98 %) - metanol (98 %) en la proporción 50:50 (v:v) por gramo de muestra. Posteriormente se introdujeron las placas en un tanque de CCF conteniendo una solución de isopropanol (97 %) - amoníaco (98 %) - agua en una proporción de 10:1:1 (v:v:v) y se conservaron durante 3 horas en el tanque a temperatura de 20 °C. En este tiempo ocurrió el ascenso capilar, y se logró una separación de giberelinas en la muestra. Inmediatamente después, las placas fueron retiradas del tanque de CCF y se permitió que se secaran por completo a la misma temperatura. Se delimitó en cada placa diez R<sub>f</sub>, para lo cual se utilizó un patrón graduado de acuerdo a distancias definidas entre los mismos. Se procedió después a raspar la sílica de las placas y transferida a un tubo de ensayo de acuerdo al número de R<sub>f</sub>, repetición y muestra correspondiente. Las giberelinas se separaron de la sílica con 0.1 ml de acetona-metanol en la proporción ya señalada.

### Pruebas biológicas

Se utilizó el bioensayo del hipocotilo de la lechuga (Ramírez, 1994), que consistió en germinar semillas de lechuga cv. Mesa 659 durante 24 horas a una temperatura de 25 °C bajo luz fluorescente (120 mmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>). Las muestras de extractos fueron transferidas a cajas petri de 5 cm de diámetro, conteniendo papel filtro. Luego de permitir la evaporación total de acetona-metanol, se agregó 1 ml de agua destilada, colocando inmediatamente después 10 semillas germinadas en cada una. Se prepararon soluciones estándar de AG<sub>3</sub> a concentraciones de 1, 0.1, 0.01 y 0.001 M incluyendo un testigo con agua; en estas soluciones también se realizó lo mismo. Pasadas 48 horas bajo las condiciones señaladas se evaluó el crecimiento del hipocotilo de la lechuga, utilizando una tabla con cuadrícula milimétrica.

### Análisis estadístico

Para llevar a cabo el análisis estadístico del trabajo, se utilizó el método de Ramírez (1994). Se empleó la siguiente fórmula para obtener la diferencia estadística:

$$DMS = \frac{F_c \times \Sigma}{\text{Núm. de repeticiones}}$$

Donde:

DMS = diferencia mínima significativa al 5 %

F<sub>c</sub> = factor crítico (0.47)

Σ = suma de límites entre repeticiones

Los valores obtenidos fueron transformados a µg de giberelinas por gramo de peso seco con la curva de calibración obtenida de los estándares de AG<sub>3</sub>.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados analizados estadísticamente indican que el contenido de giberelinas, varía en cantidad en las diferentes muestras.

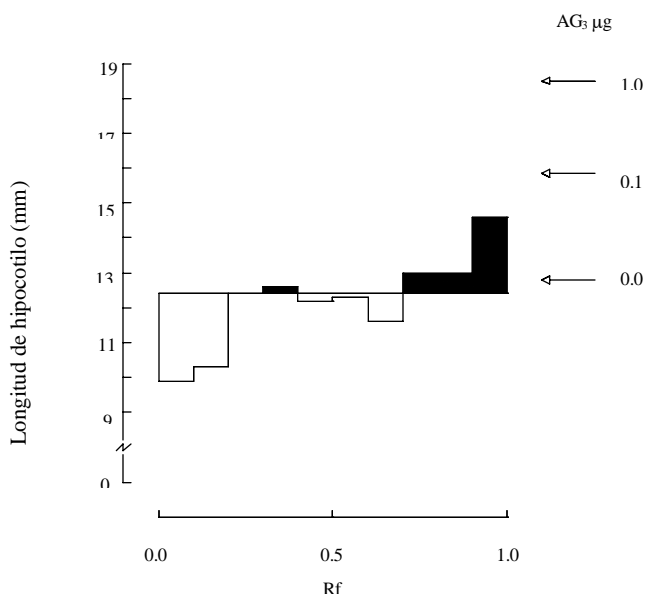
En la muestra de pétalos del cv. Golden Delicious, se encontró que la actividad biológica inicia en el Rf 0.4 únicamente en cantidades bajas con base en el crecimiento mostrado por el hipocotilo de la lechuga, para después presentarse de una manera más homogénea en los Rf 0.8 a 1.0 (Figura 1). Lo anterior representa equivalencia 0.78  $\mu\text{g}$  de  $\text{AG}_3$  por gramo de peso seco (Figura 7). En cambio en los pétalos del cv. Rome Beauty, la actividad giberélica se presentó en casi toda la placa (Figura 2) y cuya referencia reflejó 14.47  $\mu\text{g}$  de  $\text{AG}_3$  por cada gramo de peso seco de tejido (Figura 7). En la muestra de pétalos del cv. Red Delicious, la actividad en cuanto a Rf se refiere, fue similar de la del cv. Golden Delicious, ya que se presentó en el Rf 0.6 primeramente, y luego en forma continua en los Rf 0.8 – 1.0 (Figura 3). Lo anterior con referencia a un contenido de 1.8  $\mu\text{g}$  de  $\text{AG}_3$  por gramo de peso seco.

La diferencia en giberelinas encontrada en pétalos entre los cultivares estudiados (Figura 7), fortalece los reportes de Looney (1996) quien ha mencionado que la presencia de hormonas varía en contenido en el mismo órgano entre cultivares de una misma especie. En este trabajo se obtuvo una diferencia significativa ( $P \leq 0.01$ ) del cultivar Rome Beauty con 'Golden Delicious' y 'Red Delicious'. Este hecho puede estar relacionado con la condición hormonal que se encuentre en los pétalos de acuerdo a su madurez fisiológica como resultado de la brotación de yema floral en primavera. La flor en 'Red Delicious' y 'Golden Delicious' abre con diferencia de 8 a 10 días entre ellas; sin embargo, en 'Rome Beauty' ocurre en promedio 30 días posteriores a floración plena de ambos (Ramírez, 2000). Es probable que esta característica fisiológica refleje el estado de giberelinas en el tejido y por lo tanto marque la diferencia observada entre los cultivares estudiados. La presencia e importancia de pétalos en la flor de manzano está bien documentada por su contribución en el proceso de polinización y cuajado del fruto. Además de ser atractivos y aromáticos para las abejas, en años recientes se ha analizado su sistema vascular que los conecta directamente al interior del saco embrionario (Goldwin, 1994). Con esta base, sería de interés futuro conocer si las giberelinas encontradas en los pétalos de los cultivares estudiados en este trabajo son trasladadas a ese órgano u otro.

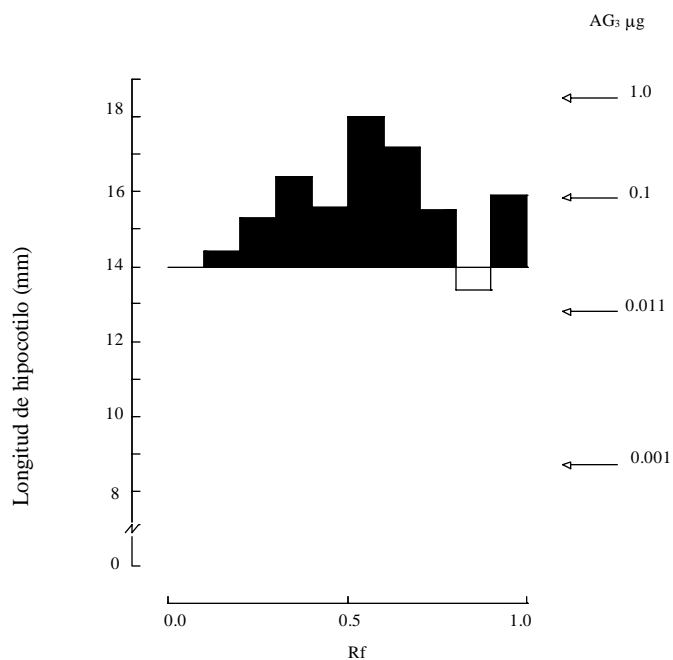
La actividad de giberelinas en el saco embrionario de los cultivares estudiados también fue variable. En el cv. Golden Delicious fue observada esta actividad solamente en el Rf 0.9 (Figura 4) con un contenido de 0.4  $\mu\text{g}$  de  $\text{AG}_3$  por gramo de peso seco (Figura 7). El cv. Rome Beauty mostró actividad giberélica en el Rf 0.3 (Figura 5), equivalente a 0.18  $\mu\text{g}$  de  $\text{AG}_3$  por gramo de peso seco. La

mayor actividad de giberelinas se presentó en el cv. Red Delicious en los Rf 0.2 a 1.0 (Figura 6), con un nivel de 10.8  $\mu\text{g}$  de  $\text{AG}_3$  por gramo de peso seco (Figura 7). Esta cifra fue estadísticamente superior a los cultivares Golden Delicious y Red Delicious ( $P \leq 0.01$ ).

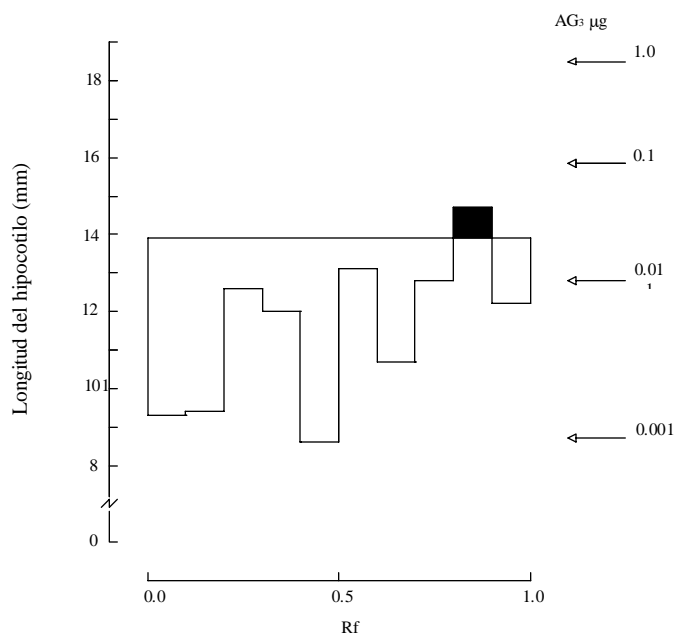
Los resultados observados en el saco embrionario también muestran al igual que en los pétalos, diferencias entre los genotipos investigados. El mayor contenido de giberelinas localizado en el saco embrionario del cv. Red Delicious pudiera relacionarse a su precocidad, en comparación a los otros dos cultivares (Ramírez, 2000). El origen de giberelinas presentes en el saco embrionario de flores de varias especies frutales se ha relacionado con los pétalos (Goldwin, 1994; Moore y Ecklund, 1992), paredes del saco embrionario (Goldschmidt *et al.*, 1997) o raíces (Bangerth, 1997). En la presente investigación, el hecho de haber encontrado en el cv. Red Delicious mayor contenido de giberelinas en el saco embrionario que en los pétalos al compararse con el cv. tardío 'Rome Beauty' (Figura 7), quizá se pudiera considerar como origen de esas hormonas en los mismos pétalos de ese órgano floral. Lo anterior quedaría elucidado al analizar el traslado de giberelinas marcadas de pétalos a saco embrionario. La presencia de giberelinas en el saco embrionario de la flor de manzano, indudablemente contribuye en el desarrollo inicial del fruto (Greene, 1993; Mander *et al.*, 1995; Ramírez, 2000), por tanto, ampliar el conocimiento de la fisiología de esas hormonas en la flor permitirá conocer más sobre su posible mecanismo de acción.



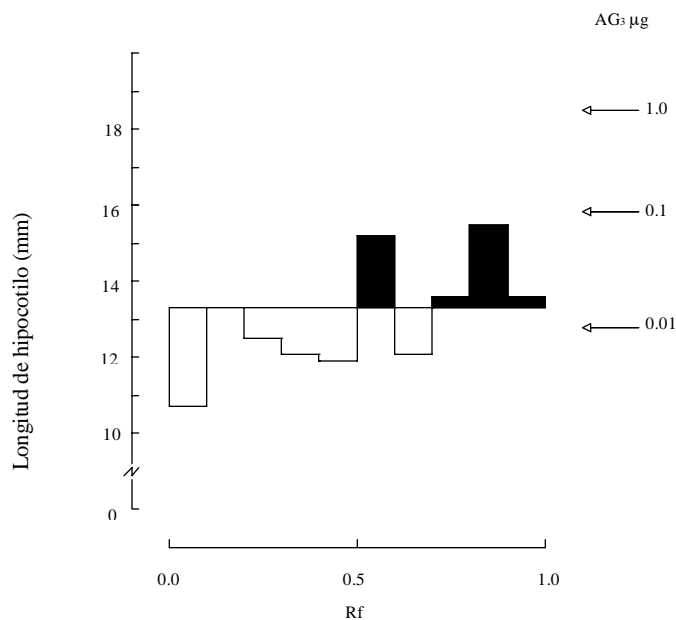
**Figura 1.** Actividad biológica giberélica mostrada con la prueba del hipocotilo de lechuga en pétalos de manzano del cv. Golden Delicious en un gramo de peso seco. La parte sombreada representa la actividad estadísticamente significativa. Se muestra el valor de las soluciones estándar de  $\text{AG}_3$ .



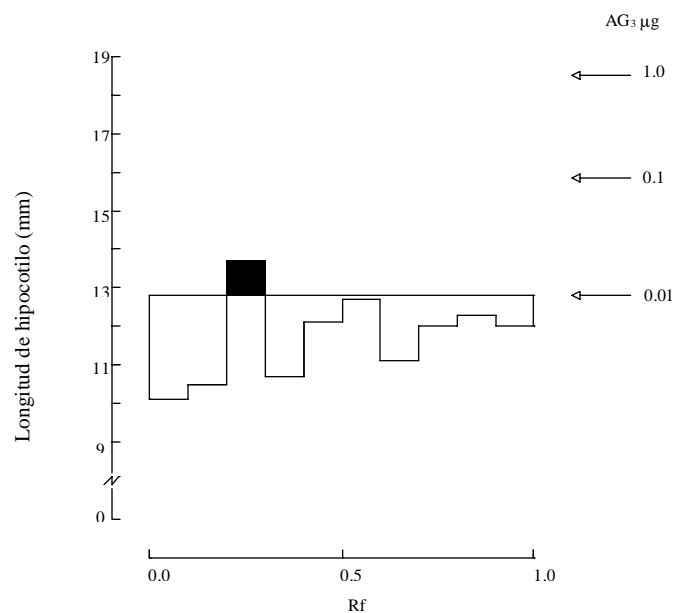
**Figura 2.** Actividad biológica giberélica mostrada con la prueba del hipocotilo de lechuga en pétalos de manzano del cv. Rome Beauty en un gramo de peso seco. La parte sombreada representa la actividad estadísticamente significativa. Se muestra el valor de las soluciones estándar de  $AG_3$ .



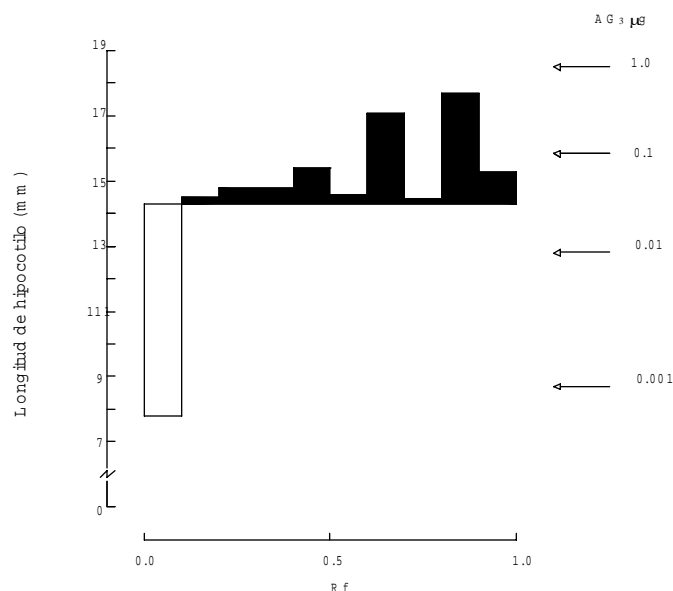
**Figura 4.** Actividad biológica giberélica mostrada con la prueba del hipocotilo de lechuga en saco embrionario de manzano del cv. Golden Delicious en una gramo de peso seco. La parte sombreada representa la actividad estadísticamente significativa. Se muestra el valor de las soluciones estándar de  $AG_3$ .



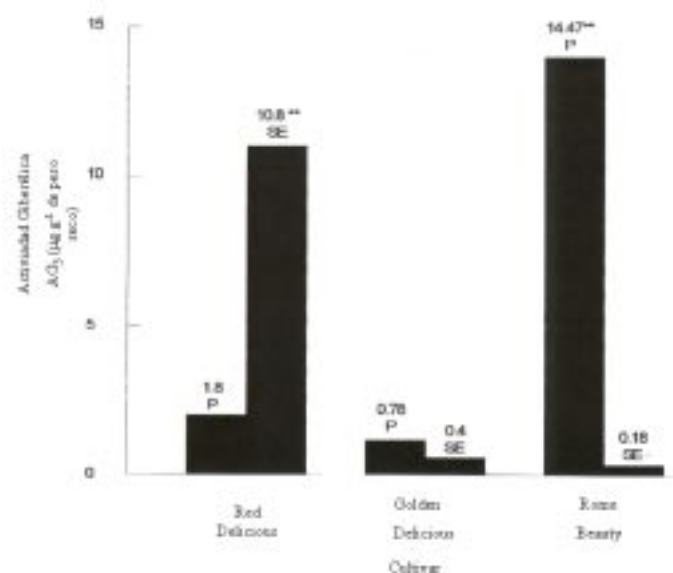
**Figura 3.** Actividad biológica giberélica mostrada con la prueba del hipocotilo de lechuga en pétalos de manzano del cv. Red Delicious en un gramo de peso seco. La parte sombreada representa la actividad estadísticamente significativa. Se muestra el valor de las soluciones estándar de  $AG_3$ .



**Figura 5.** Actividad biológica giberélica mostrada con la prueba del hipocotilo de lechuga en saco embrionario de manzano del cv. Rome Beauty en una gramo de peso seco. La parte sombreada representa la actividad estadísticamente significativa. Se muestra el valor de las soluciones estándar de  $AG_3$ .



**Figura 6.** Actividad biológica giberélica mostrada con la prueba del hipocotilo de lechuga en saco embrionario de manzano del cv. Red Delicious en una gramo de peso seco. La parte sombreada representa la actividad estadísticamente significativa. Se muestra el valor de las soluciones estándar de  $AG_3$ .



**Figura 7.** Niveles de giberelinas en pétalos y saco embrionario de tres diferentes cultivares de manzano. Cada valor representa el promedio de 3 repeticiones. \*\*:  $P \leq 0.01$ ; P: Pétalos; SE: Saco Embrionario.

## CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos y bajo las condiciones en que se realizó el estudio, se concluye lo siguiente: Los pétalos y saco embrionario de flores de manzano presentan giberelinas que varían en contenido entre tejido floral y cultivares.

## LITERATURA CITADA

- BANGERTH, F.K. 1997. Can regulatory mechanism in fruit growth and development be elucidated through the study of endogenous hormone concentrations? *Acta Horticulturae* 463: 77-87.
- GREENE, D.W. 1993. Effects of  $GA_4$  and  $GA_7$  on flower bud formation and russet development on apple. *Journal of Horticultural Science* 68: 171-176
- GOLDSCHMIDT, E.E.; TAMIM, M.; GOREN, R. 1997. Gibberellins and flowering in citrus and other fruit trees: A critical analysis. *Acta Horticulturae* 463: 201-208.
- GOLDWIN, G. K. 1994. Hormone induced setting of Cox apple as affected by time of application and flower type. *Journal of Horticultural Science* 56: 345-352
- HEINS, R.D.; LIU, B.; RUNKLE, E.S. 2000. Regulation of crop growth and development based on environmental factors. *Acta Horticulturae* 514: 13-22.
- KHANIZADEH, S.; BUSZARD, D.; ZARCADAS, C.G. 1994. Effect of crop load on seasonal variation in chemical composition and spring frost hardiness of apple flower buds. *Canadian Journal of Plant Science* 69: 1277-1284.
- LOONEY, N.E. 1996. Role of endogenous plant growth substances in regulating fruit tree growth and development, pp. 41-50. *In*: Tree Fruit Physiology: Growth and Development. P.K. Andrews; G.A. Lang; K. Mullinix (eds.). Ed. Good Fruit Grower. Washington State, USA.
- MANDER, L.N.; CAMP, D.; EVANS, L.T.; KING, R.W.; PHARIS, R.P.; SHERBURN, M.; TWITCHIN, B. 1995. Designer gibberellins: The quest for specific activity. *Acta Horticulturae* 394: 45-55.
- MOORE, T. C.; ECKLUND, P. R. 1992. Role of gibberellins in the development of fruits and seeds, pp. 145-182. *In*: Gibberellins and Plant Growth. H.N. Krishnamoorthy (ed.). Ed. Wiley Eastern Limited. New Dehli, India.
- RAMÍREZ, H. 1994. Estimation and identification of apple seed gibberellins in the early stages of fruit development. *Acta Horticulturae* 394: 101-103.
- RAMÍREZ, H. 2000. Physiology of blooming on a low chilling requirement Golden Delicious apple mutant. *Acta Horticulturae* 596 (in print).