

# Bioensayo para detectar ácido giberélico en hipocotilos de pepino (*Cucumis sativus*), var Ingles<sup>1</sup>

Yolanda Hamuy<sup>2</sup>, Ida Latorre<sup>2</sup> y María Licuime<sup>2</sup>

## INTRODUCCION

Se ha descrito en la literatura un gran número de ensayos biológicos para detectar giberelinas, basados en sus efectos fisiológicos (Spicer y Dione, 1967). Algunos de estos ensayos se fundamentan en el efecto que tienen estos compuestos sobre el aumento de longitud de tejidos de diferentes especies (Brian, Hemming y Lewe, 1962) (Brian y Hemming, 1957, 1961) (Cleland *et al.*, 1968) (Frankland y Wareing, 1960) (Kato, 1956) (Kaufman, Ghosheh e Ikuma, 1968) o bien en la propiedad de retardar la senectud en hojas de *Rumex obtusifolius* (White y Lucwill, 1966).

Otros autores han desarrollado técnicas basadas en la acción de las giberelinas de estimular las enzimas hidrolíticas del endospermo de los granos de cereales (Nicolls y Paleg, 1963) (Paleg, 1965), como también han ensayado su determinación aprovechando la propiedad que tienen estos compuestos de acelerar la germinación de determinadas semillas (Paleg, 1965).

Nuestro trabajo se basa en la acción que

tienen las giberelinas de producir extensión del hipocotilo de pepino; difiere de otros bioensayos por el hecho de practicarse en secciones de hipocotilos provistos de sus respectivos cotiledones.

Se estudió:

a) La sensibilidad del método, para lo cual se practicaron bioensayos con soluciones de diferentes concentraciones de ácido giberélico;

b) La especificidad, efectuando en forma paralela ensayos con ácidos giberélico (AG), beta indol acético (AIA) y furfural amino purina (cinetina);

c) La influencia de los cotiledones sobre el crecimiento de los hipocotilos, practicando las determinaciones con trozos de hipocotilos con y sin cotiledones, y

d) El tiempo y temperatura óptimos como también el tamaño más adecuado de las plántulas para obtener el máximo de sensibilidad en el crecimiento.

## MATERIALES Y METODOS

Se remojaron semillas de pepino en agua destilada durante dos horas y luego se sembraron en aserrín húmedo, previamente esterilizado por ebullición. Las semillas se dejaron germinar en la oscuridad, en ambiente hú-

<sup>1</sup>Recepción originales: 14 de diciembre de 1970.

<sup>2</sup>Químicos farmacéuticos. Departamento de Química Farmacológica, Facultad de Química y Farmacia, Universidad de Chile, Casilla 233, Santiago, Chile.

medo a 25°C. Después de 4 a 5 días se seleccionaron las plántulas cuyas longitudes fluctuaban alrededor de 3 cm. Se cortaron 10 mm de la parte superior de los hipocotilos con sus respectivos cotiledones y se distribuyeron en placas de Petri (10 trocitos en cada una) que contenían soluciones de ácido giberélico que variaban de  $1 \times 10^{-4}$  a  $1 \times 10^{-8}$  g/ml, y un control con agua destilada. Se dejaron durante 48 horas en la oscuridad a 25°C y después de este período de incubación, se midieron nuevamente los hipocotilos y a éstos se les restó el aumento de extensión de los hipocotilos del control.

### RESULTADOS

a) Se comprobó que la mínima concentración necesaria para obtener aumento de crecimiento fue de  $1 \times 10^{-9}$  g/ml y la óptima para un máximo de crecimiento fue  $1 \times 10^{-5}$  g/ml. Concentraciones mayores resultaron tóxicas;

b) Los ensayos realizados para estudiar la especificidad del método, nos indicaron que los hipocotilos respondieron en forma específica al ácido giberélico; con ácido indol acético prácticamente no hubo crecimiento; con cinetina se observó un escaso crecimiento con soluciones de concentraciones  $1 \times 10^{-7}$  y  $1 \times 10^{-8}$  g/ml, con soluciones más diluidas la extensión de los hipocotilos fue nula y soluciones más concentradas resultaron tóxicas (Cuadro 1);

c) Al efectuar estos ensayos con hipocotilos sin sus cotiledones, prácticamente no se obtuvo crecimiento, de lo que se deduce que la

presencia de estos órganos es indispensable para que actúe el ácido giberélico (Cuadro 2). Según Brian y Hemming (1957), la acción del ácido giberélico sobre el crecimiento lineal de secciones de tallos no se ejerce más que en presencia de auxina, la cual, en este caso, provendría de los cotiledones.

**Cuadro 2 — Influencia de los cotiledones sobre el crecimiento de hipocotilos de pepino por acción del ácido giberélico (AG).**

ACIDO GIBERELICO (AG) g/ml	$1 \times 10^{-5}$	$1 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-7}$	$1 \times 10^{-8}$
Longitud de los hipocotilos con cotiledones	8,9 (0,4)	6,8 (0,4)	2,8 (0,3)	1,9 (0,3)
Longitud de los hipocotilos sin cotiledones	0,7	0,4	0,6	0,1

Promedios de 20 experiencias.

Los resultados se expresan en mm.

Los valores que van entre paréntesis corresponden a las desviaciones estándar.

d) Se practicó el bioensayo en hipocotilos de pepino con temperaturas que fluctuaban entre 20°C y 35°C. La temperatura óptima con la cual se obtuvo el crecimiento máximo fue de 25°C (Cuadro 3). Con otro grupo de

**Cuadro 1 — Acción del ácido giberélico (AG), ácido indolacético (AIA) y furfural amino purina (cinetina) sobre el crecimiento en longitud de hipocotilos de pepino.**

CONCENTRACION SOLUCIONES g/ml	$1 \times 10^{-3}$	$1 \times 10^{-4}$	$1 \times 10^{-5}$	$1 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-7}$	$1 \times 10^{-8}$	$1 \times 10^{-9}$	$1 \times 10^{-10}$
Acido giberélico (AG)	tóxico	6,46 (0,40)	9,26 (0,45)	3,91 (0,40)	1,82 (0,40)	1,60 (0,30)	0,80 (0,35)	0,0
Acido indol acético (AIA)	—	0,06	0,12	0,03	0,0	0,0	0,0	0,0
Furfural amino purina (cinetina)	—	—	—	tóxico	0,65	0,26	0,20	0,0

Promedio de 50 experiencias. Los resultados se expresan en mm. Los valores entre paréntesis corresponden a las desviaciones estándar.

**Cuadro 3 — Influencia de la temperatura sobre el crecimiento de los hipocotilos de pepino por acción del ácido giberélico (AG).**

TEMPERATURA °C	AUMENTO DE CRECIMIENTO DE HIPOCOTILOS (mm) AG $1 \times 10^{-5}$ g/ml
10	1,8 (0,30)
15	3,5 (0,4 )
20	7,3 (0,45)
25	8,6 (0,40)
30	6,8 (0,38)
35	5,2 (0,35)

Promedio de 20 experiencias.  
Los valores que van entre paréntesis corresponden a las desviaciones estándar.

**Cuadro 4 — Influencia del tiempo de incubación sobre el crecimiento de los hipocotilos por acción del ácido giberélico (AG).**

TIEMPO DE INCUBACION (HORAS)	AUMENTO DE CRECIMIENTO DE HIPOCOTILOS (mm) AG $1 \times 10^{-5}$ g/ml
12	1,8 (0,3)
24	5,6 (0,5)
48	7,6 (0,4)
60	7,5 (0,4)
72	7,5 (0,4)

Promedio de 20 experiencias.  
Los valores que van entre paréntesis corresponden a las desviaciones estándar.

experiencias se comprobó que el tiempo óptimo para hacer las mediciones era de 48 horas (Cuadro 4). Finalmente, se observó que el tamaño de las plántulas más apropiado para obtener el máximo de sensibilidad en el crecimiento era de 30 mm (Cuadro 5).

**Cuadro 5 — Influencia del tamaño de las plántulas sobre el crecimiento de los hipocotilos por acción del ácido giberélico (AG).**

TAMAÑO PLANTULAS mm	AUMENTO DE CRECIMIENTO DE HIPOCOTILOS (mm) AG $1 \times 10^{-5}$ g/ml
20	5,2 (0,4)
30	7,2 (0,5)
50	4,1 (0,3)
80	2,3 (0,4)
100	1,5 (0,3)

Promedio de 20 experiencias.  
Los valores que van entre paréntesis corresponden a las desviaciones estándar.

## CONCLUSIONES

Se ensayó un método biológico específico para determinar ácido giberélico, basado en la propiedad que tiene este compuesto de producir extensión en secciones de hipocotilo de pepino (*Cucumis sativus* var. inglés), provistos de sus respectivos cotiledones.

Como resultado de esta investigación se encontró que este método es específico para el ácido giberélico, siendo prácticamente negativo para la furfural amino purina (cinetina) y el ácido indol acético (AIA).

El máximo de crecimiento se obtuvo con soluciones de ácido giberélico de concentraciones de  $1 \times 10^{-4}$  y  $1 \times 10^{-5}$  g/ml.

La presencia de los cotiledones fue indispensable para producir alargamiento por efecto de esta fitohormona.

El tiempo de incubación más apropiado fue de 48 horas a 25°C. Finalmente, el tamaño de las plántulas más conveniente para obtener el máximo de sensibilidad fue aproximadamente 30 mm.

## RESUMEN

Se describe un método biológico para determinar giberelina ( $AG_3$ ) basado en la propiedad que tienen estos compuestos de producir extensión en secciones de hipocotilos de pepino (*Cucumis sativus* var. inglés) provistos de sus respectivos cotiledones.

Se demuestra que este bioensayo es específico para el ácido giberélico, ya que otras fitohormonas, como la cinetina y el ácido indol acético no producen prácticamente crecimiento. Se estudia, además, la sensibilidad y se concluye que hay respuesta hasta una concentración de  $1 \times 10^{-9}$  g/ml. Finalmente, se determinan las condiciones óptimas de tiempo de incubación, temperatura y tamaño más adecuado de las plántulas para obtener un máximo crecimiento.

## SUMMARY

A biological method for gibberellins determination ( $A_3$ ) was tested. This compound produces the extension of the cucumber hypocotyl segments (*Cucumis sativus* var. Inglés) if their cotyledons are not excised.

This bioassay is specific for gibberellic acid ( $A_3$ ). Kinetins (furfuryl amino purine) and indolacetic acid practically do not induce growth.

The sensibility of the method was studied and it is concluded that is sensitive to a concentration of  $1 \times 10^{-9}$  g/ml G. A.

Investigations were carried out on the effects of temperature, incubation time and seedling length to obtain the maximum growth.

## LITERATURA CITADA

- BRIAN, B. W., and HEMMING, H. G. 1961. Promotion of cucumber hypocotyl growth by two new gibberellins. *Nature*. 189: 74.
- , and LEWE, D. 1962. Relative activity of the gibberellins. *Nature*. 193: 946.
- and —————. 1957. A relation between the effects of gibberellic acid and indolyl acetic acid on plant cell extension. *Nature*. 179: 417.
- CLELAND, R., THOMPSON, M., RAYLE, D. and PURVES, W. 1968. Difference in effect of gibberellins and auxins on wall extensibility of cucumber hypocotyls. *Nature*. 219: 510.
- FRANKLAND, B. and WAREING, P. F. 1960. Effect of gibberellic acid on hypocotyls growth of lettuce seedlings. *Nature*. 185: 256.
- KATO, JIRO. 1956. Effect of gibberellin on elongation, water uptake and respiration of pea stem sections. *Science*. 123: 1132.
- KAUFMAN, P. B., GHOSHEH, N. and IRUMA, H. 1968. Promotion of growth and invertase activity by gibberellic acid in developing avena internodes. *Plant Physiol.* 43: 29.
- NICOLLS, P. B. and PALEG, L. G. 1963. A barley endosperm bioassay for gibberellins. *Nature*. 199: 824.
- PALEG, L. G. 1965. Physiological effects of gibberellins. *Ann. Rev. of Plant Physiol.* 16: 291.
- SPICER, B. P. and DIONNE, H. L. 1967. Use of gibberellins to hasten germination of solanum seed. *Nature*. 189: 327.
- WHITE, P. and LUCWILL, L. C. 1966. A sensitive bioassay for gibberellins based on retardation of leaf senescens in *Rumex obtusifolius*. *Nature*. 210: 1360.