

## Determinación de giberelina A4 y trans zeatina ribósido en diferentes órganos de *Dasyilirion cedrosanum*\*

## Determination of gibberellin A4 and trans zeatine roboside in diferente organs of *Dasyilirion cedrosanum*

Erika Nohemi Rivas Martínez<sup>1</sup>, Rahim Foroughbakhch Pournavab<sup>1</sup>, Manuel Humberto Reyes Valdés<sup>2</sup> y Adalberto Benavides Mendoza<sup>2§</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma de Nuevo León- Departamento de Botánica, Av. Pedro de Alba, s/n, cruz con Av. Manuel L. Barragán. CP. 66450, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México. Tel. (52)818-114-3465. (rahimforo@hotmail.com; erikanohemi257@gmail.com). <sup>2</sup>Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro- Departamento de Fitomejoramiento y Horticultura. Calzada Antonio Narro. Núm. 1923, Col. Buenavista CP. 25315. Saltillo, Coahuila, México. Tel. 52 84 44 11 ext. 0296. (mathgenome@gmail.com). <sup>§</sup>Autor para correspondencia: abenmen@gmail.com.

### Resumen

*Dasyilirion cedrosanum* es una planta dioica de importancia comercial en la industria de las bebidas alcohólicas, de la cual se desconoce su composición bioquímica y fisiología hormonal. Debido a la importancia fisiológica que tienen las fitohormonas en la formación, desarrollo y diferenciación de tejidos se consideró la cuantificación de la giberelina A4 (GA4) y trans zeatina ribósido (tZR) en diferentes órganos de plantas estaminadas y pistiladas de *D. cedrosanum*. La cuantificación de ambas hormonas se realizó en hojas, corona e inflorescencia de plantas de *D. cedrosanum* colectadas en el 2013 en General Cepeda, México. Los valores más altos de GA4 fueron encontrados en las hojas ( $0.10 \pm 0.02$  mg g<sup>-1</sup> PS y  $0.15 \pm 0.03$  mg g<sup>-1</sup> PS) sin observarse diferencias entre sexos. El mayor contenido de tZR fue cuantificado en las coronas ( $0.09 \pm 0.01$  mg g<sup>-1</sup> PS y  $0.10 \pm 0$  mg g<sup>-1</sup> PS) de plantas estaminadas y pistiladas, así como en las hojas de plantas estaminadas ( $0.09 \pm 0.01$  mg g<sup>-1</sup> PS). Solo el promedio global de GA4 denotó diferencias, presentándose el valor más alto en las plantas estaminadas. Los niveles cuantificados en cada órgano son un punto de partida para establecer las bases fisiológicas de las respuestas hormonales en *Dasyilirion cedrosanum*.

### Abstract

*Dasyilirion cedrosanum* is a dioecious plant of commercial importance in the industry of alcoholic beverages, of which its biochemical composition and hormonal physiology is unknown. Due to the physiological importance of plant hormones in the formation, development and tissue differentiation, it was considered the quantification of gibberellin A4 (GA4) and trans zeatin riboside (tZR) in different organs of staminate and pistillate plants of *D. cedrosanum*. Quantification of both hormones was performed on leaves, crown and inflorescences of *D. cedrosanum* plants collected in 2013 in General Cepeda, Mexico. The highest values of GA4 were found in the leaves ( $0.10 \pm 0.02$  mg g<sup>-1</sup> DW and  $0.15 \pm 0.03$  mg g<sup>-1</sup> DW) with no differences between sexes. The highest content of tZR was quantified in the crowns ( $0.09 \pm 0.01$  mg g<sup>-1</sup> DW and  $0.10 \pm 0$  mg g<sup>-1</sup> DW) of staminate and pistillate plants, thus in leaves from staminate plants ( $0.09 \pm 0.01$  mg g<sup>-1</sup> DW). Only the global average of GA4 denoted differences, presenting the highest value in staminate plants. Quantified levels in each of the organs are a starting point to establish the physiological basis of hormonal responses in *Dasyilirion cedrosanum*.

\* Recibido: junio de 2016  
Aceptado: julio de 2016

**Palabras clave:** dioecia, fitohormonas, reguladores del crecimiento, sotol.

**Keywords:** dioecious, growth regulators, plant hormones, sotol.

## Introducción

Dentro de las plantas dioicas con importancia comercial encontramos a las del género *Dasyilirion*, el cual recientemente ha sido ubicado dentro de la familia *Asparagaceae* (APG III, 2009) y cuya distribución comprende la región del desierto Chihuahuense y la Región Árida del Norte de América (Martorell y Ezcurra, 2002). La importancia de las plantas de este género radica en que algunas de sus especies como lo son: *D. duranguense*, *D. wheeleri* y *D. cedrosanum* son empleadas para la elaboración de una bebida alcohólica conocida con el nombre de “sotol” (NOM-159-SCFI-2004; De La Garza *et al.*, 2008;). La elaboración artesanal de esta bebida y la escasa información sobre la biología, bioquímica y características de reproducción de este género han contribuido a un mal manejo de las poblaciones naturales, por lo cual, es de gran importancia aportar información básica para mejorar el manipulación de la especie.

En el caso del género *Dasyilirion* no existen reportes sobre las características bioquímicas o fisiológicas de las plantas, es decir, se carece de información básica que en cierto momento pudiera adquirir importancia práctica para la implementación y el manejo de viveros que contribuyan a la conservación de las especies de este género. La evaluación de la composición hormonal es fundamental debido a las funciones que cumplen en la planta, como la formación, desarrollo y especificación de órganos, aportación de resistencia frente a cambios climatológicos o infecciones patológicas, entre otras (Santner *et al.*, 2009).

Dentro de las fitohormonas más estudiadas se encuentran las giberelinas y citocininas. Las giberelinas es un grupo amplio de moléculas que pertenecen a la familia de los diterpenoides tetracíclicos, dentro de las giberelinas con mayor actividad biológica se encuentran la GA1, GA3, GA4 y GA7, las cuales juegan un papel en diversos procesos del crecimiento de las plantas que incluyen, desarrollo de la semilla, elongación de los órganos, y control del tiempo de la floración (Yamaguchi, 2008; Santner *et al.*, 2009). Por otro lado, las citocininas son fitohormonas móviles que desempeñan un papel crítico en el crecimiento y desarrollo de las plantas mediante la regulación de la senescencia de la hoja (Kim *et al.*, 2006), la dominancia apical (Tanaka *et al.*, 2006), la proliferación de

## Introduction

Within dioecious plants of commercial importance are those from the genre *Dasyilirion*, which recently has been located within the *Asparagaceae* family (APG III, 2009) and whose distribution includes the region from the Chihuahuan desert and Arid Region of North America (Martorell and Ezcurra, 2002). The importance of this genus lies in some species such as: *D. duranguense*, *D. wheeleri* and *D. cedrosanum* which are used for the production of an alcoholic drink known as “Sotol” (NOM 159-SCFI-2004; De La Garza *et al.*, 2008). The craftsmanship of this drink and scarce information about the biology, biochemistry and reproduction characteristics of this genre has contributed to poor management of natural populations; therefore, it is of great importance to provide basic information to improve the handling of the species.

For *Dasyilirion* there are no reports on the biochemical or physiological characteristics of plants, i.e., it lacks basic information that at some point could acquire practical importance for the implementation and management of nurseries that contribute to the conservation of species of this genus. The evaluation of the hormonal composition is essential because of the role it plays in the plant, such as formation, development and body specification, provision of resistance to climate changes or pathological infections, among others (Santner *et al.*, 2009).

Within the most studied plant hormones are gibberellins and cytokinins. Gibberellins are a large group of molecules belonging to the family of tetracyclic diterpenoid, within gibberellins with increased biological activity are GA1, GA3, GA4 and GA7, which play a role in different processes of plant growth including, seed development, organs elongation, and flowering time control (Yamaguchi, 2008; Santner *et al.*, 2009). Furthermore, cytokinins are mobile phytohormones that play a critical role in plant growth and development through the regulation of leaf senescence (Kim *et al.*, 2006), apical dominance (Tanaka *et al.*, 2006), root proliferation (Werner *et al.*, 2001), phyllotaxis (Giulini *et al.*, 2004), reproductive competition (Ashikari *et al.*, 2005) and nutritional signaling (Takei *et al.*, 2002). Among the bioactive cytokinins are trans zeatin (Z) and trans zeatin riboside (tZR) (Neuberg *et al.*, 2011).

la raíz (Werner *et al.*, 2001), filotaxis (Giulini *et al.*, 2004), la competencia reproductiva (Ashikari *et al.*, 2005) y la señalización nutricional (Takei *et al.*, 2002). Dentro de las citocininas bioactivas se encuentran la trans zeatina (Z) y la trans zeatina ribósido (tZR) (Neuberg *et al.*, 2011).

La determinación del contenido de giberelina A4 (GA4) y trans zeatina ribósido (tZR) en diferentes órganos de plantas pistiladas y estaminadas de *D. cedrosanum* puede contribuir al conocimiento de la composición bioquímica y fisiología hormonal de la especie, considerando la gran importancia que tienen las giberelinas y citocininas en la diferenciación, desarrollo y formación de las estructuras vegetales.

La evaluación de los niveles de giberelina A4 (GA4) y trans zeatina ribósido (tZR) se realizó en los meses de abril y mayo del 2013 en hojas, corona e inflorescencia de plantas adultas con flores pistiladas y estaminadas de *D. cedrosanum*, las cuales fueron colectadas en la región de General Cepeda, Coahuila, México en las coordenadas 25° 18' 43.5" latitud norte, 101° 45' 26.5" longitud oeste, a una altura de 1986 ± 15.63 msnm. La región cuenta una precipitación promedio anual 300 a 400 mm, una temperatura media anual de 18 a 20 °C y un clima semiárido (BSh) según la clasificación de Köppen. El muestreo de las hojas, corona e inflorescencia se realizó bajo un esquema de muestreo sistemático en donde las plantas seleccionadas cumplieron con la característica de poseer una inflorescencia que iniciaba la emergencia. El muestreo de estos órganos se realizó en cuatro plantas pistiladas y cuatro plantas estaminadas, mismas que fueron muestreadas repetidamente una vez por semana desde el inicio de la aparición de la inflorescencia hasta que éste se secó completamente, transcurridas cinco semanas después de la emergencia de la inflorescencia.

Para minimizar el daño en la planta, las muestras de tejido fueron obtenidas con ayuda de un sacabocados que colectaba de 2 a 5 gramos de tejido fresco de la corona e inflorescencia, teniendo cuidado de que la muestra no sobrepasara más de una tercera parte del diámetro de la inflorescencia. En el caso de las hojas, con ayuda de una navaja fueron cortadas desde la base dos de las hojas más jóvenes con desarrollo completo que estuvieran cercanas al sitio de la emergencia de la inflorescencia, las cuales fueron cortadas en trozos de 2 cm para posteriormente ser almacenadas. Cada muestra obtenida fue colocada en su respectivo recipiente de plástico previamente etiquetado e inmediatamente fue sumergida en nitrógeno líquido, donde permaneció hasta ser almacenada en un ultracongelador (SANYO modelo MDF-U53VA) a -80 °C.

The determination of gibberellin A4 (GA4) and trans zeatin riboside (tZR) content in different organs from pistillate and staminate plants of *D. cedrosanum* can contribute to knowledge of the biochemical composition and hormonal physiology of the species, considering the great importance that gibberellins and cytokinins have in the differentiation, development and formation of plant structures.

The evaluation of gibberellin A4 (GA4) and trans riboside zeatin (tZR) levels, took place in the months of April and May 2013 in leaves, crown and inflorescence of adult plants with pistillate and staminate flowers of *D. cedrosanum*, which were collected in the region from General Cepeda, Coahuila, Mexico at coordinates 25° 18' 43.5" north latitude, 101° 45' 26.5" west longitude at an altitude of 1986 ± 15.63 masl. The region has an annual average rainfall of 300-400 mm, an average annual temperature of 18 to 20 °C and a semiarid climate (BSh) according to Köppen's classification. Leaves and crown and inflorescence sampling was made under a scheme of systematic sampling where selected plants met the characteristic of having an inflorescence that initiated emergence. Sampling of these organs was performed in four pistillate and four staminate plants, same that were sampled repeatedly once a week since the beginning of inflorescence emergence until it completely dry, after five weeks from inflorescence emergence.

To minimize damage to plant, tissue samples were obtained using a punch that collected 2 to 5 grams of fresh tissue from crown and inflorescence, taking care that the sample did not exceed more than a third of the diameter of the inflorescence. As for leaves, with the help of a knife were cut from the base two of the youngest leaves with full development that were near the site of the inflorescence emergence, which were cut into pieces of 2 cm to be stored. Each sample was placed in their respective pre-labeled plastic container and was immediately immersed in liquid nitrogen, where it remained until being stored in a deep freezer (SANYO MDF-U53VA) at -80 °C.

Subsequently water from each of the samples was removed through a lyophilizer (LABCONCO Model 2.5L) with a vacuum of 0.25 mBar and -40 °C. Finally, the samples were pulverized in a mortar and stored at room temperature in containers containing silica gel and sealed.

For the extraction of GA4 and tZR, 50 mg of each sample were weighed into a microfuge tube and 1 mL of extraction solution (methanol 20% (v/v) was added, diluted in formic

Posteriormente a cada una de las muestras se les eliminó por completo el agua mediante un liofilizador (LABCONCO Modelo 2.5 L) con un vacío de 0.25 mBar y una temperatura de  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Finalmente, las muestras fueron pulverizadas en un mortero y almacenadas a temperatura ambiente en recipientes que contenían sílica gel y con sellado hermético.

Para la extracción de GA4 y tZR se pesaron 50 mg de cada muestra dentro de un tubo para microcentrífuga y se añadió 1 mL de la solución de extracción (metanol al 20% (v/v) diluido en ácido fórmico al 0.1% (v/v)). La mezcla se sometió al vortex (GENIE 1 Tocuh Mixer Modelo SI-0136) por 30 segundos y a sonicación (BRANSON Modelo 1510R-DTH) por 10 min. Después las muestras fueron centrifugadas a 12 000 rpm durante 10 min a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  y trasladadas a un congelador de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para dejarse incubando durante 12 h. Transcurrido este tiempo las muestras volvieron a sonicarse por 10 min, y fueron centrifugadas por segunda vez a 12 000 rpm durante 10 min a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Finalmente, el sobrenadante obtenido fue filtrado mediante membranas de  $0.45\text{ }\mu\text{m}$  de diámetro de poro y transferidas a viales para su inyección en el cromatógrafo de líquidos.

La identificación y cuantificación de GA4 y tZR se realizó en un cromatógrafo de líquidos (Marca VARIAN Modelo 920LC), utilizando como fases móviles ácido acético a una concentración de 100 mM (Fase A) y acetonitrilo al 100% (Fase B). La determinación de GA4 se realizó con una columna C18 (POLARIS 5 C18-A, 250 mm x 4.5 mm,  $5\text{ }\mu\text{m}$ ), utilizando proporciones de fase 50:50 (v/v) (fase A: B) y un flujo isocrático de  $0.8\text{ mL min}^{-1}$ . Para la cuantificación de tZR se utilizó una columna C18 (AQUASIL C18, 250 mm x 4.6 mm,  $5\text{ }\mu\text{m}$ ), con proporciones de fase de 80:20 (v/v) (Fase A: B) y un flujo isocrático de  $0.3\text{ mL min}^{-1}$ . El volumen de inyección del extracto vegetal para ambas determinaciones fue de  $50\text{ }\mu\text{L}$ .

La detección de la molécula de GA4 se realizó a 205 nm, mientras que tZR se detectó a 268 nm. El tiempo de retención de la GA4 fue de  $7.8\pm 0.2$  min y el de tZR fue de  $15.4\pm 0.25$  min. Para la conversión de unidades de absorbancia a ppm se realizan curvas patrón con soluciones estándar de GA4 y tZR (Marca SIGMA). Los resultados de los cromatogramas obtenidos fueron evaluados mediante el software Galaxie Versión 1.9.302.530 (Marca VARIAN).

Para el análisis estadístico se utilizó un ANOVA con mediciones repetidas para el análisis estadístico de los datos de la cuantificación de GA4 y tZR. La prueba de diferencia mínima significativa (DMS) fue utilizada para la comparación de medias de las variables que mostraron

acid 0.1% (v/v). The mixture was subjected to vortex (GENIE1 Tocuh Mixer Model SI-0136) for 30 seconds and sonicated (BRANSON Model 1510R-DTH) for 10 min. Afterwards the samples were centrifuged at 12 000 rpm for 10 min at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  and transferred to a freezer at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  to be left incubating for 12 h. After this time the samples were sonicated again for 10 min, and centrifuged for a second time at 12 000 rpm for 10 min at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Finally, the supernatant obtained was filtered through  $0.45\text{ }\mu\text{m}$  membrane pore diameter and transferred to vials for its injection into liquid chromatograph.

The identification and quantification of GA4 and tZR was performed on a liquid chromatograph (Varian 920LC), using as mobile phase acetic acid at a concentration of 100 mM (Phase A) and acetonitrile 100% (Phase B). GA4 determination was performed with a C18 column (POLARIS 5 C18-A, 250 mm x 4.5 mm,  $5\text{ }\mu\text{m}$ ) using phase proportions 50:50 (v/v) (phase A: B) and an isocratic flow  $0.8\text{ mL min}^{-1}$ . To quantify tZR a C18 column (AQUASIL C18, 250 mm x 4.6 mm,  $5\text{ }\mu\text{m}$ ) was used, with phase ratios 80:20 (v/v) (Phase A: B) and an isocratic flow  $0.3\text{ mL min}^{-1}$ . The injection volume of plant extracts for both quantifications was of  $50\text{ }\mu\text{L}$ .

Molecule detection of GA4 was performed at 205 nm, while tZR was detected at 268 nm. The retention time of GA4 was  $7.8\pm 0.2$  min and of tZR was  $15.4\pm 0.25$  min. For unit's conversion of absorbance to ppm, standard curves with standard solutions of GA4 and tZR (SIGMA) were performed. The chromatograms were evaluated through Galaxie Version 1.9.302.530 (VARIAN) software.

For statistical analysis ANOVA was used with repeated measurements for the statistical analysis of data quantification of GA4 and tZR. The least significant difference test (LSD) was used to compare means of the variables that showed significance in the F test from ANOVA with a statistical significance of  $\alpha \leq 0.05$ . Statistical packages used INFOSAT Version 2014 and IBM SPSS version 22.

The test results from LSD (Table 1) showed a statistical difference ( $p \leq 0.05$ ) only between plant organs of the same sex, highlighting the highest value of GA4 in samples obtained from leaves, while the highest values of tZR were found in the crown of plants of both sexes and in staminate leaves. No significant difference was observed ( $p \leq 0.05$ ) in concentrations of GA4 and tZR when comparing between the same organ of a pistillate and staminate plant.



una significancia en la prueba de F del Anova con un nivel de significancia estadística de  $\alpha \leq 0.05$ . Los paquetes estadísticos usados fueron el INFOSTAT Versión 2014 y el IBM SPSS Statistics Versión 22.

Los resultados de la prueba de DMS (Cuadro 1) mostraron una diferencia estadística ( $p \leq 0.05$ ) solo entre los órganos de plantas del mismo sexo, destacando el valor más alto de GA4 en las muestras obtenidas a partir de hojas, mientras los valores más altos de tZR se encontraron en la corona de plantas de ambos sexos y en las hojas de plantas estaminadas. No se observó diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) en las concentraciones de GA4 y tZR al comparar entre un mismo órgano de una planta pistilada y una estaminada.

La prueba de DMS evidenció una diferencia estadística ( $p \leq 0.05$ ) entre plantas de diferente sexo al analizar el promedio global de GA4, denotándose la mayor concentración de esta fitohormona en plantas estaminadas (Cuadro 2). Para los valores globales de tZR no se observaron diferencias entre sexo. Por tal razón, las diferencias globales de GA4 encontradas entre las plantas pistiladas y estaminadas de *D. cedrosanum* se consideran relevantes ya que pueden constituir un punto de partida para posteriores estudios que permitan distinguir el sexo de las plantas en etapas tempranas de su crecimiento.

LSD test showed a statistical difference ( $p \leq 0.05$ ) between plants of different sex when analyzing the global average of GA4, denoting the highest concentration of this plant hormone in staminate plants (Table 2). For global values of tZR no differences were observed between sexes. For this reason, the overall differences of GA4 found between pistillate and staminate plants of *D. cedrosanum* are considered relevant since this can be a starting point for further studies to distinguish plants sex in early growth stages.

The results obtained are different from those reported by Zanewich (1993), who found that higher levels of gibberellin A1 (GA1), gibberellin A19 (GA19) and gibberellin A20 (GA20) in outbreaks of *Brassica napus* with an age of 28 days (values between 10 and 20 ng g<sup>-1</sup> dry weight). A lower concentration of the three gibberellins were found in stems, hypocotyl, and finally, in roots, the latter with the lowest levels of GA1, GA19 and GA20 (values below 2.5 ng g<sup>-1</sup> dry weight). The same author in a sampling at 64 days analyzed other organs, such as inflorescence stalk, stem, leaves, roots and flowers; finding the highest levels in flowers (values between 3 and 6 ng g<sup>-1</sup> dry weight), followed by leaves, stems and inflorescence stalks, while the lowest contents were quantified in roots (values below 1 ng g<sup>-1</sup> dry weight). Gibberellin values found in the different organs

**Cuadro 1. Promedios de las concentraciones de GA4 y tZR en tres órganos de plantas estaminadas y pistiladas de *D. cedrosanum*.**

**Table 1. Average concentrations of GA4 and tZR in three organs from staminate and pistillate plants of *D. cedrosanum*.**

Sexo	Órgano	GA4 (mg g <sup>-1</sup> ps)	tZr (mg g <sup>-1</sup> ps)
Pistilada	Inflorescencia	0.02 ± 0 c	0.06 ± 0 c
Estaminada	Inflorescencia	0.07 ± 0.04 bc	0.06 ± 0.01 c
Pistilada	Hoja	0.1 ± 0.02 ab	0.07 ± 0.01 bc
Estaminada	Hoja	0.15 ± 0.03 a	0.09 ± 0.01 ab
Pistilada	Corona	0.02 ± 0 c	0.09 ± 0.01 a
Estaminada	Corona	0.05 ± 0.02 bc	0.1 ± 0 a

Las medias de una misma columna seguidas por letras diferentes son significativamente diferentes por la prueba de DMS de Fisher a un nivel de significancia de  $\alpha \leq 0.05$ . mg g<sup>-1</sup> ps = indica los mg de GA4 o tZR encontrados en 1 g de peso seco del órgano correspondiente.

**Cuadro 2. Promedios de las concentraciones de GA4 y tZR en plantas estaminadas y pistiladas de *D. cedrosanum*.**

**Table 2. Average concentrations of GA4 and tZR in staminate and pistillate plants of *D. cedrosanum*.**

Sexo	GA4 (mg g <sup>-1</sup> ps)	tZr (mg/g ps)
Pistilada	0.05 ± 0.01 b	0.07 ± 0 a
Estaminada	0.09 ± 0.02 a	0.08 ± 0.01 a

Las medias de una misma columna seguidas por letras diferentes son significativamente diferentes por la prueba de DMS de Fisher a un nivel de significancia de  $p \leq 0.05$ . mg g<sup>-1</sup> ps = Indica los mg de GA4 o tZR encontrados en 1 g de peso seco del órgano correspondiente.

Los resultados obtenidos son diferentes a los reportados por Zanewich (1993), quién encontró que los mayores niveles de giberelina A1 (GA1), giberelina A19 (GA19) y giberelina A20 (GA20) en los brotes de *Brassica napus* con una edad de 28 días (valores entre 10 y 20 ng g<sup>-1</sup> de peso seco). Una menor concentración de las tres giberelinas se encontró en los tallos medios, el hipocotiledón, y finalmente, las raíces, estas últimas con los niveles más bajos de GA1, GA19 y GA20 (valores por debajo de los 2.5 ng g<sup>-1</sup> de peso seco). El mismo autor en un muestreo realizado a los 64 días analizó otros órganos, tales como, los tallos de las inflorescencias, el tallo, las hojas, las raíces y las flores; encontrando los niveles más altos en las flores (valores entre 3 y 6 ng g<sup>-1</sup> de pesos seco), seguido de las hojas, los tallos y los tallos de las inflorescencias, mientras los contenidos más bajos se cuantificaron en las raíces (valores por debajo de 1 ng g<sup>-1</sup> de peso seco). Los valores de giberelina encontrados en los diferentes órganos de *Dasyilirion cedrosanum* son mayores a los reportados para *Brassica napus*, ya que podemos encontrar valores desde 20 000 ng g<sup>-1</sup> ps (0.02 mg g<sup>-1</sup> ps en inflorescencias de plantas pistiladas) hasta los 150 000 ng g<sup>-1</sup> ps (0.15 mg g<sup>-1</sup> ps hojas de plantas estaminadas).

Por otro lado, Battal y Tileklioğlu, (2001) evaluaron el contenido de citocininas en plantas de *Zea mays* L. sometidas a diferentes medios de crecimiento, se observó que la mayor concentración de zeatina ribósido estaba en tallos (5.72 µg g<sup>-1</sup> pf a 7.67 µg g<sup>-1</sup> pf), seguida de hojas (3.3 µg g<sup>-1</sup> pf a 4.98 µg g<sup>-1</sup> pf) y finalmente, en flores femeninas (1.55 µg g<sup>-1</sup> pfa 2.2 µg g<sup>-1</sup> pf), comportamiento que fue similar en todos los tratamientos. Los valores de trans zeatina ribósido cuantificados en la corona 0.09 mg g<sup>-1</sup> ps y 0.1 mg g<sup>-1</sup> ps (equivalentes a 90 µg g<sup>-1</sup> ps y 100 µg g<sup>-1</sup> ps), hojas 0.1 mg g<sup>-1</sup> ps (equivalentes a 100 µg g<sup>-1</sup> ps y 150 µg g<sup>-1</sup> ps) e inflorescencias pistiladas y estaminadas 60 mg g<sup>-1</sup> ps (equivalentes a 60 µg g<sup>-1</sup> ps, en ambos casos) de *D. cedrosanum* fueron mayores a los reportados para *Zea mays* L. en órganos similares; aunque las concentraciones de GA4 y tZR en los diferentes órganos de *D. cedrosanum* son mayores a las encontradas en órganos similares de otras especies hay una tendencia similar entre especies en la acumulación de fitohormonas en los diferentes órganos.

## Conclusiones

La mayor concentración de GA4 y tZR en *Dasyilirion cedrosanum* se encontró en las hojas y la corona, respectivamente, sin observarse alguna diferencia entre

de *Dasyilirion cedrosanum* are higher than those reported for *Brassica napus*, since we can find values from 20 000 ng g<sup>-1</sup> dry weight (0.02 mg g<sup>-1</sup> dw in inflorescences of pistillate plants) to 150 000 ng g<sup>-1</sup> dry weight (0.15 mg g<sup>-1</sup> dry weight leaves from staminate plants).

Furthermore, Battal and Tileklioğlu, (2001) evaluated cytokinins content in *Zea mays* L. plants under different growth mediums, in which they found that the highest concentration of zeatin riboside was in stems (5.72 µg g<sup>-1</sup> fresh weight to 7.67 µg g<sup>-1</sup> fresh weight), followed by leaves (3.30 µg g<sup>-1</sup> fresh weight to 4.98 µg g<sup>-1</sup> fresh weight) and finally, female flowers (1.55 µg g<sup>-1</sup> fresh weight to 2.2 µg g<sup>-1</sup> fresh weight), behavior that was similar in all treatments. The values of trans zeatin riboside quantified in crown 0.09 mg g<sup>-1</sup> dry weight and 0.1 mg g<sup>-1</sup> dry weight (equivalent to 90 µg g<sup>-1</sup> dry weight and 100 µg g<sup>-1</sup> dry weight), leaves 0.1 mg g<sup>-1</sup> dry weight (equivalent to 100 µg g<sup>-1</sup> dry weight and 150 µg g<sup>-1</sup> dry weight) and pistillate and staminate inflorescences 60 mg g<sup>-1</sup> dry weight (equivalent to 60 µg g<sup>-1</sup> dry weight, in both cases) of *D. cedrosanum* were higher than those reported for *Zea mays* L. in similar organs. It is important to note that although the concentrations of GA4 and tZR in different organs of *D. cedrosanum* are greater than those found in similar organs from other species, there is a similar trend among species in the accumulation of plant hormones in the different organs.

## Conclusions

The highest concentration of GA4 and tZR in *Dasyilirion cedrosanum* was found in leaves and crown, respectively, without observing any difference between staminate and pistillate plants. Global averages of these hormones showed that only GA4 levels were different between sexes. The differences in GA4 concentrations found in the same organ from plants of different sex constitute a starting point for further studies focused to detect plants sex of *Dasyilirion cedrosanum* in early growth stages. Likewise, hormonal differences between the various organs analyzed are basic inputs to determine the sampling organ when conducting a hormonal monitoring of some of the two hormonal species studied in this work (GA4 and tZR).

*End of the English version*



plantas estaminadas y pistiladas. Los promedios globales de estas hormonas mostraron que solamente los niveles de GA4 fueron diferentes entre sexos. Las diferencias en la concentración de GA4 encontradas en un mismo órgano de plantas de diferente sexo constituyen un punto de partida para estudios posteriores enfocados a detectar el sexo de las plantas de *Dasyilirion cedrosanum* en etapas tempranas de su crecimiento. Así mismo, las diferencias hormonales entre los distintos órganos analizados son aportaciones básicas para determinar el órgano de muestreo al realizar un monitoreo hormonal de algunas de las dos especies hormonales estudiadas en el presente trabajo (GA4 y tZR).

## Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico prestado por medio del proyecto 154682 “Análisis comparativo de caracteres genéticos y fisiológicos hipotéticamente relacionados con la determinación sexual en sotol (*Dasyilirion cedrosanum*)”.

## Literatura citada

- APG III. 2009. An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. Bot. J. Linn. Soc. 161:105-121.
- Ashikari, M.; Sakakibara, H.; Lin, S.; Yamamoto, T.; Takashi, T.; Nishimura, A.; Angeles, E. R.; Qian, Q.; Kitano, H. and Matsuoka, M. 2005. Cytokinin oxidase regulates rice grain production. Science. 309:741-745.
- Battal, P. and Tileklioglu B. 2001. The effects of different mineral nutrients on the levels of Cytokinins in Maize (*Zea mays* L.). Turk. J. Bot. 25:123-130.
- De La Garza, H. T.; Martínez, M.; Lara, L.; Rodríguez, R. H.; Rodríguez, J. M. and Aguilar, C. N. 2008. Production of a Mexican alcoholic beverage: sotol. Res. J. Biol. Sci. 3(6):566-571.
- Giulini, A.; Wang, J. and Jackson, D. 2004. Control of phyllotaxy by the cytokinin-inducible response regulator homologue ABPHYL1. Nature. 430:1031-1034.
- Kim, H. J.; Ryu, H.; Hong, S. H.; Woo, H. R.; Lim, P. O.; Lee, I. C.; Sheen, J.; Nam, H. G. and Hwang, I. 2006. Cytokinin-mediated control of leaf longevity by AHK3 through phosphorylation of ARR2 in *Arabidopsis*. Proceedings of National Academy of Sciences, USA. 103:814-819.
- Martorell, C. and Ezcurra, E. 2002. Rosette scrub occurrence and fog availability in arid mountains of Mexico. J. Veg. Sci. 13:651-662.
- Neuberg, L. M.; Pavlíková, D.; Žižková, E.; Motyka, V. and Pavlík, M. 2011. Different types of N nutrition and their impact on endogenous cytokinin levels in *Festulolium* and *Trifolium pretense* L. Plant Soil Environ. 57(8):381-387.
- Norma Oficial Mexicana. 2004. (NOM-159-SCFI-2004). Bebidas alcohólicas-sotol-especificaciones y métodos de prueba.
- Santner, A.; Calderon, V. L. I. A. and Estelle, M. 2009. Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. Nat. Chem. Biol. 5(5):301-307.
- Takei, K.; Takahashi, T.; Sugiyama, T.; Yamaya, T. and Sakakibara, H. 2002. Multiple routes communicating nitrogen availability from roots to shoots: a signal transduction pathway mediated by cytokinin. J. Exp. Bot. 53:971-977.
- Tanaka, M.; Takei, K.; Kojima, M.; Sakakibara, H. and Mori, H. 2006. Auxin controls local cytokinin biosynthesis in the nodal stem in apical dominance. Plant J. 45:1028-1036.
- Werner, T.; Motyka, V.; Strnad, M. and Schmülling, T. 2001. Regulation of plant growth by cytokinin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98:10487-10492.
- Yamaguchi, S. 2008. Gibberellin metabolism and its regulation. Annu. Rev. Plant Biol. 59:225-251.
- Zanewich, K.P. 1993. Vernalization and gibberellin physiology of winter canola. Master of Science Thesis. Lethbridge University. Lethbridge, Alberta, Canada. 43-46 pp.