

2ej  
54



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**

VARIACION DEL CONTENIDO DE ACIDO INDOLACETICO,  
ACIDO GIBERELICO Y ACIDO ABSISICO, DURANTE LA  
GERMINACION DEL MAIZ

**T E S I S**

Que para obtener el título de  
Químico Farmacéutico Biólogo  
p r e s e n t a

**Samuel Hernández Reyes**



México, D. F.

1986



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **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.

## I N D I C E

	Página.
I. INTRODUCCION	1
II. ANTECEDENTES:	3
1. Germinación y Latencia.	
2. Las Hormonas en la Germinación.	
3. Auxinas.	
4. Giberelinas.	
5. Acido Abscísico.	
6. Métodos para el análisis de sustancias reguladoras del crecimiento en plantas.	
III. OBJETIVOS.	23
IV. MATERIALES Y METODOS	24
V. RESULTADOS Y DISCUSION	31
VI. RESUMEN Y CONCLUSIONES	47
VII. BIBLIOGRAFIA.	48

## INTRODUCCION

La actividad metabólica de las semillas durante la latencia y la germinación está regulada principalmente por las fitohormonas. Un balance exacto entre las hormonas de inhibición y las promotoras del crecimiento es fundamental para el control de estos procesos.

Este trabajo puede ser la primera etapa de un estudio amplio de los cambios que sufren los fitorreguladores durante todos los procesos metabólicos de las plantas durante su desarrollo. El objetivo inicial de este trabajo, fue determinar el contenido de ácido giberélico ( $GA_3$ ), ácido 3-indolacético (AIA) y ácido abscísico (ABA) durante la germinación de semillas de maíz (*Zea mays*).

Se propone un método para determinar los tres biorreguladores simultáneamente. Se estudiaron los parámetros que influyen en la extracción y separación de estos compuestos mediante cromatografía de intercambio iónico; se establecieron los límites de detección de los fitorreguladores por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y se midió su contenido en los genotipos H-30 y H-32 (descritos como resistentes a la germinación prematura), en el genotipo H-139 (descrito como susceptible a la germinación prematura) (1), así como en maíz en proceso de maduración.

Los contenidos de ácido indolacético y ácido giberélico en maíz en proceso de maduración son altos, mientras que en semillas latentes y durante la germinación los contenidos de estos biorreguladores están por debajo de los límites de detección de este método.

## ANTECEDENTES

## LATENCIA Y GERMINACION

La latencia y la germinación son dos estados fisiológicos en el ciclo de vida de los vegetales que están íntimamente relacionados. La latencia es una fase en la cual los vegetales detienen su desarrollo bajo la forma de semillas o en algún otro órgano de la planta, como respuesta de adaptación a condiciones ambientales desfavorables (2). La germinación se ha definido como la fase en la cual da término el estado de latencia, con la aparición de la radícula a través de la cutícula de la semilla (3). El paralelismo que hay entre los diferentes órganos de la planta durante el periodo de latencia, sugiere un mecanismo común involucrado en este estado. Se han propuesto dos hipótesis para explicar el estado de la latencia: la primera hipótesis asume que la regulación de la latencia es principalmente hormonal y la segunda dice que se debe a una disminución en el intercambio gaseoso. Se tienen evidencias de que los altos requerimientos de oxígeno de ciertas semillas se debe a los inhibidores de la germinación, por lo que se han relacionado estas dos hipótesis (2).

Los factores más importantes que afectan los estados de latencia y germinación son: luz, temperatura, humedad y aereación. La luz y la temperatura afectan en diferente



forma la latencia y la germinación de las semillas: en algunas el efecto es positivo, tal es el caso de las semillas de climas tropicales; sin embargo en semillas de plantas de climas templados tienen un efecto contrario. La captación del oxígeno y del agua por las semillas está determinada por la naturaleza de la cutícula que recubre a la semilla y éste depende de la especie de que se trate, por ejemplo las semillas de las leguminosas presentan una cubierta muy impermeable al agua y al oxígeno y necesitan un periodo bastante largo en el suelo húmedo para que se rompa la cutícula bajo la acción de los microorganismos del suelo o mecánicamente para poder captar estos elementos (2).

Las semillas tienen un bajo contenido de agua y necesitan cantidades considerables para iniciar la germinación, por lo que absorben agua por imbibición; esta característica se debe a la presencia de sustancias coloidales en las semillas, principalmente proteínas y almidones (2), la imbibición de agua hidrata la semilla activándose de esta forma los sistemas metabólicos que inician el crecimiento del embrión (4). Uno de los cambios más notables que ocurren cuando las semillas están en condiciones favorables para la germinación es un incremento rápido en la respiración durante las primeras horas.

Debido a una baja concentración de oxígeno que existe en

las semillas, parece haber respiración anaeróbica, glucólisis anaeróbica y fosforilación glucolítica, ésto se observa por la incorporación de fosfato inorgánico del medio (2). Otro hallazgo es el hecho de que en semillas secas de frijol el ATP esta ausente y aparece rápidamente después de la imbibición, así también aparece la respiración aeróbica la cual no está activa en semillas secas, pero incrementa gradualmente con el progreso de la germinación.

Se ha demostrado que la vía de las pentosas, la cual es una ruta alternativa en el metabolismo de los carbohidratos está activa en semillas de frijol en las primeras horas de imbibición.

Aunque la actividad de ciertas enzimas se ha podido demostrar en semillas secas, en general hay un marcado incremento en la actividad enzimática durante la germinación. Para algunas enzimas el incremento en su actividad se debe a la conversión de una forma inactiva a una forma activa, también es claro que hay una síntesis de novo de muchas enzimas tal como lo demuestran los efectos de los inhibidores de la síntesis protéica, ejemplo, el cloramfenicol. También se mostró que la formación de  $\alpha$ -amilasa es inhibida por la cicloheximida (interfiere en la síntesis protéica) y por la actinomicina D

(interfiere en la síntesis de RNA) (2).

En resumen, al penetrar el agua a la semilla se desencadenan los procesos bioquímicos que cubrirán las necesidades nutricionales del embrión: activación de enzimas que metabolizarán sustratos almacenados en el endospermo, síntesis de proteínas y de ácidos nucleicos para la expresión genética del embrión.

## LOS REGULADORES DEL CRECIMIENTO EN LA GERMINACION

Se han reconocido cinco clases de hormonas en las plantas: citocininas, auxinas, etileno, giberelinas y ácido abscísico (5). En el presente trabajo solo se estudiaron el  $GA_3$ , AIA y ABA, por tener la propiedad de ser ácidos, lo que determina la posibilidad de ser analizados simultáneamente mediante un mismo método.

En diferentes estudios se ha mostrado el papel de cada uno de estos compuestos en relación con la latencia y la germinación. Las auxinas, citocininas, giberelinas y etileno actúan como promotores y el ácido abscísico como inhibidor de la germinación. Las giberelinas y el ácido abscísico parecen ser los más importantes en el control de este proceso (5).

Se ha demostrado (6), (3), que el AIA mantiene el estado de latencia y que las citocininas revierten este estado, promoviendo la germinación, estos experimentos se realizaron incubando semillas de lechuga con kinetina (citocinina sintética), a  $32^\circ C$ , observándose una mayor cantidad de semillas germinadas que en preparaciones con agua destilada, este número se incrementó aun más al agregar  $GA_3$  y etileno al medio, con lo que se concluyó que estos compuestos están íntimamente

relacionados con el proceso de la germinación. Se observó que la kinetina promueve la producción endógena de etileno (7), el cual estimula la germinación de las semillas almacenadas de avena, aunque el mecanismo por medio del cual funciona todavía es muy discutido (8), (9). En otros experimentos se demostró que el etileno incrementa la síntesis de la enzima  $\alpha$ -amilasa en aleuronas de avena y que esta actividad se eleva aun más cuando se adiciona  $GA_3$  al medio (10), (11).

En este trabajo se determinó la variación del ácido indolacético, giberelinas y ácido abscísico, durante la germinación, como una aportación al conocimiento básico de este proceso; lo que se discutirá más adelante.

## AUXINAS

Se ha discutido mucho sobre el papel que juegan las auxinas en el proceso de la germinación de semillas, principalmente se ha estudiado el ácido 3-indolacético (AIA) fig. 1 y compuestos conjugados de este ácido tales como indolacetilinositales y ésteres formados con azúcares como la arabinosa y galactosa (12). Se ha demostrado que el AIA está presente en todos los tejidos vegetales, principalmente en órganos de mayor crecimiento. El AIA se encuentra en dos formas, libre y conjugada, siendo la forma libre la activa y la conjugada la forma inactiva, esto sugiere un mecanismo de regulación para la liberación de la cantidad de hormona requerida para determinada fase de crecimiento de la planta, se ha propuesto un mecanismo de hidrólisis enzimática para la regulación del AIA, otro mecanismo puede ser la degradación por oxidación enzimática o por foto-oxidación, dando como producto el 3-metilenoxindol el cual es inactivo (13).

La acción biológica de las auxinas endógenas se manifiesta como la estimulación de la elongación celular, observándose crecimiento de los tejidos de los diferentes órganos de toda planta (2). Epstein (14) observó que los compuestos conjugados del AIA se forman cuando las semillas están madurando y

son hidrolizados durante el proceso de la germinación con lo cual pudo demostrar que las formas libres son las activas. En estudios sobre la variación en el contenido de AIA durante la germinación de semillas de maíz, se encontró que la concentración del AIA se eleva durante las primeras horas después de colocar las semillas en un ambiente húmedo, alcanzando una concentración máxima después de 32 horas de incubación volviendo a disminuir después de este periodo, concluyendo que el AIA tiene un papel muy importante en el control de la germinación de las semillas (15). Otros experimentos demuestran que el contenido de AIA en semillas de maíz varía durante la fase de maduración del grano, observándose una marcada elevación en el mes de septiembre, disminuyendo lentamente después de este periodo (16).

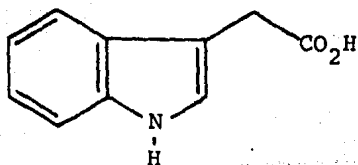


Fig. 1. (AIA)

## GIBERELINAS

Se ha propuesto que las giberelinas son los fitorreguladores más importantes en la regulación de la germinación (17), se conocen cincuenta y dos giberelinas diferentes (18), que se designan por un número suscrito ( $GA_1 \dots GA_{52}$ ), algunas fueron aisladas del hongo *Fusarium heterosporum* también llamado *Gibberella fujikuroi* y otras de plantas superiores (2). Todas las giberelinas tienen actividad biológica similar, aunque los bioensayos y otros estudios se realizan regularmente con  $GA_3$  fig. 2, por ser la giberelina más comercial (17). Una serie de estudios sobre las giberelinas han demostrado algunas de sus funciones en el metabolismo de las plantas y semillas, estas son algunas de ellas: activan las hidrolasas especialmente la  $\alpha$ -amilasa, activan las proteasas y la RNA polimerasa, e interrumpen el estado de latencia en las semillas (19). Otros estudios demostraron que en el endospermo de las semillas de cebada se produce la enzima  $\alpha$ -amilasa en respuesta a la adición de  $GA_3$ , esto confirma que el almidón que contienen las semillas, se degrada por acción de esta enzima para ser utilizado en la producción de energía necesaria para el proceso de la germinación, concluyendo que  $GA_3$  es un inductor de la germinación. Jarvis y col., encontraron que la adición de  $GA_3$  a



las semillas causa un incremento en la incorporación de fosfato radiactivo ( $P^{32}$ ) en el RNA por acción de la RNA polimerasa, esto concuerda con la hipótesis de que la latencia es un estado de represión genética (20). En otro experimento se observó que  $GA_3$  promueve la síntesis proteica después de cuatro horas de imbibición, esto favorece la germinación de las semillas, también se vio que al agregar ABA se reduce este aumento disminuyendo así la capacidad de germinar (3).

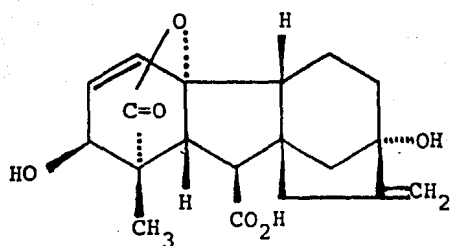


Fig. 2. ( $GA_3$ )

## ACIDO ABSCISICO

El ácido abscísico (ABA) fig. 3 es una hormona natural de las plantas, e inhibe su crecimiento. Fue aislado primero de plantas de algodón y posteriormente se ha identificado en más de treinta especies de vegetales (17). Se ha observado el efecto que produce el ABA sobre el proceso de la germinación en semillas de *Eragrotis curvula*, encontrándose los siguientes resultados: inhibe la germinación de las semillas, prolonga el estado de latencia, inhibe la síntesis de la enzima  $\alpha$ -amilasa e incrementa la actividad de las enzimas aspartatoaminotransferasa (GOT) y la alaninaminotransferasa (GPT), manteniéndose constante la actividad de la peroxidasa; todas estas enzimas están relacionadas con la germinación (21). En otros estudios se determinó el coeficiente de velocidad de germinación en semillas maduras de lechuga y se encontró que este coeficiente disminuye cuando se incubaron las semillas con el ABA, también observaron que la concentración del ABA disminuye conforme maduran las semillas, incrementándose así la capacidad para germinar (22). En otros trabajos se determinó la variación del contenido de ABA en semillas de frijol durante su desarrollo, en el periodo de maduración y en el proceso de germinación. El desarrollo de las semillas, el cual dura aproximadamente cuatro semanas y media, se caracterizó

por un incremento en el peso fresco, peso seco y, un aumento en la concentración de ABA libre, el cual se calculó en ng ABA/semilla o en ng por gramo de peso fresco, en este periodo se imbibieron las semillas y no hubo germinación debido a la alta concentración de ABA. La fase de maduración de las semillas se caracterizó por que presentaron peso seco constante y una disminución gradual en el contenido de ABA libre, aumentando paralelamente la capacidad de germinación. Posteriormente en el proceso de la germinación, hubo un descenso acelerado en el contenido de ABA durante la fase Lag (esta se define como la relación que hay entre la madurez de la semilla, el contenido de ABA libre y el tiempo necesario para germinar). Además se vio que bastaba separar las semillas maduras de la vaina para activar el catabolismo del ABA en los cotiledones, ya que es en esta parte donde se encuentra el 95% del ABA libre, 2.5 % en la cubierta y menos de 0.1 ng fue detectado en el embrión (23).

Los efectos inhibitorios del ABA durante la germinación son revertidos por  $GA_3$  y kinetina, este estudio se realizó en semillas de lechuga intactas y en el embrión con un tratamiento previo con ABA, observándose en ambas parte que la adición de  $GA_3$  y kinetina revertía la inhibición del crecimiento radicular y expansión de los cotiledones, producida por el ABA (24).

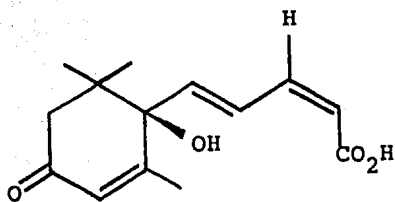


Fig. 3. (ABA)

METODOS PARA EL ANALISIS DE SUSTANCIAS REGULADORAS  
DEL CRECIMIENTO EN PLANTAS

BIOENSAYOS

Los bioensayos han sido esenciales en el descubrimiento y la subsecuente identificación de los biorreguladores. Pero, debido a su limitada sensibilidad y selectividad, estos métodos no pueden ser usados como análisis precisos. Estas desventajas los hace inadecuados para una determinación rápida y cuantitativa de pequeñas cantidades de biorreguladores en extractos de plantas (25).

ENSAYOS INMUNOLOGICOS

Las técnicas inmunológicas por tener alta sensibilidad, alta selectividad y requerir de una mínima purificación de las muestras, se pueden comparar con el mejor método fisicoquímico. Estos métodos requieren de la formación previa de un anticuerpo dirigido al compuesto de interés. Al igual que las hormonas animales, las fitohormonas son de peso molecular muy bajo para poder ser reconocidas por el sistema inmunológico de algún animal huésped y estimular la formación de anticuerpos específicos, necesariamente se tienen que unir covalente-

METODOS PARA EL ANALISIS DE SUSTANCIAS REGULADORAS  
DEL CRECIMIENTO EN PLANTAS

BIOENSAYOS

Los bioensayos han sido esenciales en el descubrimiento y la subsecuente identificación de los biorreguladores. Pero, debido a su limitada sensibilidad y selectividad, estos métodos no pueden ser usados como análisis precisos. Estas desventajas los hace inadecuados para una determinación rápida y cuantitativa de pequeñas cantidades de biorreguladores en extractos de plantas (25).

ENSAYOS INMUNOLOGICOS

Las técnicas inmunológicas por tener alta sensibilidad, alta selectividad y requerir de una mínima purificación de las muestras, se pueden comparar con el mejor método fisicoquímico. Estos métodos requieren de la formación previa de un anticuerpo dirigido al compuesto de interés. Al igual que las hormonas animales, las fitohormonas son de peso molecular muy bajo para poder ser reconocidas por el sistema inmunológico de algún animal huésped y estimular la formación de anticuerpos específicos, necesariamente se tienen que unir covalente-

mente a una molécula grande y pesada, usualmente protefnas. En los estudios inmunológicos para determinar fitohormonas se ha utilizado protefnas de origen animal, principalmente albúmina sérica bovina (BSA) (26), (27) y albúmina sérica humana (HSA) (28), para conjugarlas con las fitohormonas. En todos los casos las fuentes productoras de anticuerpos han sido conejos.

La posición en la que se une la protefna a la fitohormona es determinante para la selectividad del anticuerpo formado. En unos trabajos se preparo el complejo AIA-BSA uniendo la albúmina en el grupo carboxilo del AIA, el anticuerpo formado mostró baja sensibilidad requiriendo más de 1.0 µg de AIA para poder reaccionar. En contraste con otros experimentos en los que se unió la BSA al átomo de nitrógeno del indol, se obtuvieron anticuerpos con mayor sensibilidad para reaccionar con 0.2 ng de AIA. Estos ensayos inmunológicos ofrecen un método altamente sensible para el análisis de las fitohormonas, su principal desventaja es el largo proceso para la obtención de los anticuerpos específicos (25).

#### METODOS FISICOQUIMICOS

La cromatografía de gases, la espectrometría de masas, en ensayo espectrofluorométrico (específico para AIA) y la

cromatografía de líquidos de alta presión, son los métodos que actualmente están haciendo grandes contribuciones al estudio de las hormonas vegetales (29).

#### CROMATOGRAFIA DE GASES (CG)-DETECTORES

La cromatografía de gases es una técnica en la que necesariamente se tiene que formar un derivado volátil de los fitorreguladores; es un método eficaz y seguro para el análisis de estas sustancias. En la CG se han utilizado dos tipos de columnas: las columnas capilares recubiertas y las columnas empacadas convencionalmente. Las columnas capilares recubiertas proporcionan eficiencias de 10 mil a 100 mil platos teóricos, dependiendo de la longitud de estas, este tipo de columnas se han utilizado para el análisis de AIA y ABA metilados (30), (31).

Las fases estacionarias no polares más utilizadas son: SE 30, OV-1, OV-101; de polaridad intermedia: OV-17, todas usadas para la separación de las fitohormonas (32). Los límites de detección utilizando esta técnica depende mucho del tipo de detector que se utilice.

Detector de ionización de flama. Estos detectores identifican cualquier compuesto que se ionice sobre una flama,



por lo que son poco selectivos. La capacidad de detección es de 1.0 ng aproximadamente.

Detector de captura de electrones. Este tipo de detector solo responde a aquellos compuestos con átomos electronegativos, por ejemplo: compuestos halogenados y ciertos hidrocarburos aromáticos. Es un detector altamente selectivo y muy sensible, en columnas empacadas puede detectar de 5 a 10 pg por inyección de Met-ABA (33), y en columnas recubiertas se puede detectar hasta 0.3 pg. Otros fitorreguladores han sido derivados con halógenos en el grupo carboxilo para poder ser detectados por CG-CE, estos son algunos de los derivados: Tricloroetil ester AIA (34), heptafluorobutiril AIA metil ester (35), (36), indol-3-pentafluorobencil ester (37), trifluoroacetil ester metil GA<sub>3</sub> (38). La derivatización con compuestos halogenados de los fitorreguladores incrementa la sensibilidad pero disminuye la selectividad del detector.

#### CROMATOGRAFIA DE GASES-ESPECTROMETRIA DE MASAS

##### (CG-EM)

El espectrómetro de masas es el detector más selectivo que puede ser acoplado al cromatógrafo de gases. La unión del CG y el EM combina el poder de separación del CG y la de-

tección selectiva del EM. Los compuestos se inyectan en el espectrómetro y se fragmentan en iones pequeños por medio de impacto electrónico, con electrones de alta energía, estos fragmentos ionizados se separan y se analizan en base a su masa y carga eléctrica, la presencia de fragmentos específicos y sus concentraciones relativas proporcionan un espectro de masas el cual es específico para determinado compuesto. Un espectro puede ser comparado con otro de referencia de un compuesto conocido para identificar la sustancia problema (39).

Esta técnica requiere de muestras altamente puras y volátiles, todas las fitohormonas excepto etileno deben ser derivados en compuestos volátiles para ser analizados por CG-EM.

#### CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS A ALTA PRESION (HPLC)

Los primeros informes sobre el análisis de fitohormonas utilizando la técnica de HPLC, muestran las ventajas que ofrece: gran poder de resolución, capacidad para separar cantidades de muestra, se recupera una buena cantidad de muestra y la gran rapidez con la que se obtienen las separaciones (menos de 30 min). La tecnología de los equipos de HPLC ha avanzado rápidamente al grado de que se obtienen eficiencias de más de 50 mil platos teóricos de resolución. Existe una gran variedad de empaques utilizados en las columnas cromatográficas,

los cuales determinan la forma de separación de las fitohormonas. La HPLC en fase reversa ha sido adoptada como método para el análisis de los fitorreguladores. El material más utilizado para empacar las columnas es octadecilsilano (ODS ó C18), el cual consiste en una cadena de dieciocho carbonos unida a micropartículas de sílice (25). Algunas publicaciones describen el uso de otros tipos de empaques tales como C2 (40) para citocininas; grupos fenilos para citocininas (41) y ABA (42); grupos amino para ABA (43); y grupos nitrilo para derivados de giberelinas (44). Se han usado otras formas de HPLC en el análisis de las fitohormonas, por ejemplo, cromatografía de exclusión, que se basa en el tamaño de las moléculas; intercambio iónico, usado para el análisis de AIA (43), (45), ABA (46) y citocininas (47). Desafortunadamente los empaques de las columnas de intercambio iónico no son estables como otros empaques utilizados en HPLC. Otra modalidad es la cromatografía por adsorción, la cual utiliza sílica gel, este método se ha usado para el análisis de ABA en extractos de plantas altamente purificadas (43) y para estándares de citocininas (40); Se han descrito algunas separaciones de giberelinas utilizando sílice modificada por sililación (con cloruro de trimetilsilano) o argentación (tratamiento de la sílice con  $\text{AgNO}_3$ ) (48), (49).

Detectores utilizados en HPLC. El detector de UV es el más comunmente usado. Si se usa este tipo de detector se debe

considerar la selectividad parcial del método, debido a que a la longitud de onda a la que absorben las fitohormonas también absorben muchos otros compuestos. Los límites de detección que se han publicado para ABA a 254 nm están en el intervalo de 0.5 a 5.0 ng por inyección (43), 4 ng de citocininas a la misma longitud de onda (50) y de 5 a 20 ng de AIA a 280 nm (45). El uso de columnas más eficientes amplía el intervalo de detección. Las giberelinas absorben radiación ultravioleta solo abajo de 220 nm, por lo que se han hecho derivados que absorben a 254 nm, detectándose 5 ng del derivado. Un problema asociado con la derivatización de las giberelinas, es que otros compuestos presente en la muestra también reaccionan con el reactivo interfiriendo con el análisis.

La detección de la fluorescencia de los fitorreguladores, especialmente indoles, ofrece gran selectividad, y sensibilidad mayor que en detectores de UV (45), (51). La fluorescencia natural del AIA y otros indoles, permiten la detección sin la necesidad de formar un derivado; este ácido se ha detectado fluorométricamente entre 10 y 20 pg (51). Es posible preparar derivados fluorescentes de las otras fitohormonas para aumentar los límites de detección de estos compuestos. El uso de ester metoxicumarílico de algunas giberelinas facilita su detección en cantidades de 5 pg (25).

## OBJETIVOS

1. Estudiar la posibilidad de cuantificar ácido abscisico (ABA), ácido giberélico ( $GA_3$ ) y ácido 3-indolacético (AIA) simultaneamente mediante un solo experimento utilizando cromatografía de intercambio iónico y cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).
2. Establecer los límites de detección de estos biorreguladores por este método.
3. Utilizar el método para determinar los niveles de biorreguladores en semillas de maíz de los genotipos H-30, H-32 y H-139, durante la germinación.

## MATERIALES Y METODOS

Los reactivos utilizados fueron Q.P. y R.A.

Acido giberélico ( $GA_3$ ) Pfizer, S.A.

Acido 3-indolacético de Sigma Chemical Co.

Acido absfcsico de Sigma Chemical Co.

Polivinil pirrolidona de Quífmica Farmacéutica Latina, S.A.

Dietilaminoetil celulosa de Sigma Chemical Co.

2,6-diterbutil p-cresol de Sigma Chemical Co.

Dietil ditiocarbamato de sodio de Sigma Chemical Co.

Hidróxido de potasio JVC

Hidróxido de sodio JVC

Acido Clorhídrico

Acido acético

Acetato de amonio Técnica Quífmica, S.A.

#### Soluciones

Sol. KOH 0.1 N

Sol. HCl 1 N y 2 N

Sol.  $NH_4OAc$  0.1 M y 0.01 M pH 6.5

Sol.  $CH_3COOH$  1.5 M

Sol. NaOH 0.1 M

#### Aparatos

Balanza analítica Mettler H80



Balanza micronanalítica Perkin-Elmer AD-2Z Autobalance  
Balanza granataria Ohaus  
Centrífuga clínica  
Molino manual  
Agitador magnético  
Potenciómetro  
Bomba de vacío Sargent Welch doble sello  
Estufa de vacío Heraeus  
Cromatógrafo de líquidos Water Assoc. con dos bombas de alta presión, un programador de flujo de solventes M-660, un inyector universal M-U6K y un módulo de compresión radial RCM-100 con una columna Radial-Pak de octadecilsilano (10 cm x 8 mm D.I.)  
Espectrofotómetro UV-VIS-IR Perkin-Elmer LC-55  
Banco de datos SIGMA-10 Perkin-Elmer

#### Material biológico

Se usaron semillas de maíz (*Zea mays*) de los genotipos H-30, H-32 y H-139, donadas por el Dr. Joaquín Ortiz Cereceres del Centro de genética del Colegio de Posgraduados de Chapingo.

#### GERMINACION DE LAS SEMILLAS

En cajas petri se colocaron 50 semillas entre dos capas de papel filtro humedecido con 20 ml de agua destilada, se

incubaron las cajas a 25°C en la oscuridad durante 24 hrs. Se tomaron muestras para hacer las determinaciones a las cero, seis, doce y veinticuatro hrs de germinación.

#### PREPARACION DE LA POLIVINIL PIRROLIDONA (PVP)

La PVP se preparó según el método propuesto por Morris (52). En un vaso de pp. de 400 ml se colocaron 69 g de PVP y se añadieron 50 ml de una solución de HCl 2 M, se homogenizó y se filtró rápidamente en un büchner con papel de filtración rápida, se lavó inmediatamente con 500 ml de agua destilada para eliminar el exceso de ácido. Se adicionaron 40 ml de una sol. de  $\text{NH}_4\text{OAc}$  0.01 M hasta ajustar el pH de la PVP a 6.5.

#### FORMACION DEL ACETATO DE DEAE-CELULOSA (DEAE)

En un vaso de pp. se colocaron 50 g de DEAE-celulosa y se adicionaron 500 ml de una sol. de HCl 1N, se filtró rápidamente en un büchner con papel de filtración rápida, se lavó con 1000 ml de agua destilada para remover el exceso de ácido; se adicionaron 500 ml de una sol. de KOH 0.1N, se homogenizó la suspensión y se filtró rápidamente; se lavó con 1000 ml de agua destilada para eliminar el exceso de base. Este procedimiento se efectuó tres veces y se recomienda que en cada paso sea mínimo el tiempo de contacto entre la DEAE-celulosa y las soluciones. Posteriormente se le adicionaron 250 ml de ácido acético glacial, se filtró y la DEAE-celulosa se lavó tres veces con 300 ml de metanol R.A. para eliminar el exceso de ácido acético (53).

## EMPAcado DE COLUMNAS

Las columnas se hicieron de vidrio según el esquema No. 2. Se empacaron colocando 0.05 g de algodón en la punta. Se hicieron suspensiones con 0.5 g de PVP en 20 ml de una sol. de  $\text{NH}_4\text{OAc}$  (0.01 M, pH 6.5), y 0.5 g de DEAE-celulosa en 20 ml de la misma solución, es muy importante equilibrar la DEAE-celulosa a pH 6.5, por lo que se tuvo que ajustar el pH con una sol. de NaOH 0.1N, dejando reposar la suspensión 30 min. Se pasaron las suspensiones a las columnas lo más uniformemente posible, se agregaron 5 ml más para arrastrar todo el contenido del vaso a la columna. Se colocaron las columnas en serie dejando la de PVP en la parte superior y la de DEAE-celulosa en la parte de abajo, por este sistema se pasaron las soluciones estándar y los extractos del maíz.

## EXTRACCION

Se pesaron 10 g de semillas de maíz y se molieron, se adicionaron 16 ml de metanol q.p., 4 ml de una sol. de  $\text{NH}_4\text{OAc}$  (0.1 M, pH 6.5), 40 mg de 2,6-diterbutil p-cresol (BHT) y 40 mg de dietilditiocarbamato de sodio (DIECA), se homogenizó la mezcla durante tres min., y se centrifugó el homogenizado a 3000 RPM durante tres min., el sobrenadante se separó y se aforó a 25 ml con una sol. de  $\text{NH}_4\text{OAc}$  (0.01 M, pH 6.5) mante-

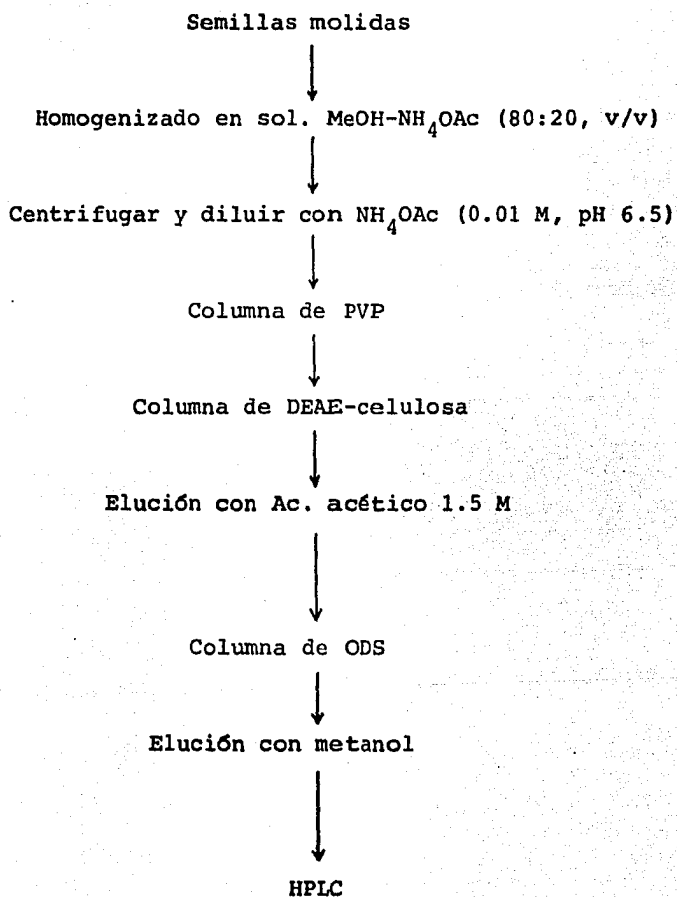
niendo el 20% de metanol en la solución.

### PURIFICACION

Para purificar los extractos, se pasaron a través de las columnas de PVP, DEAE-celulosa y de octadesilsilano. Las soluciones obtenidas se inyectaron en el cromatógrafo de líquidos para separar y cuantificar el AIA, GA<sub>3</sub> y ABA.

Todas las manipulaciones deben hacerse en ausencia de luz y la menor concentración de oxígeno, para evitar la fotooxidación.

Este procedimiento se aplicó a mezclas de estándares y a semillas adicionadas de los estándares.



Esquema I: Ilustración del proceso que se siguió para la extracción de GA<sub>3</sub>, AIA y ABA.

## RESULTADOS Y DISCUSIONES

Para evaluar la posibilidad de determinar simultáneamente los tres biorreguladores ácidos ( $GA_3$ , AIA y ABA), se establecieron en primer lugar las condiciones cromatográficas para lograr una separación óptima de estos compuestos. Se utilizó una columna de octadecilsilano (ODS) y diferentes mezclas de metanol-agua y acetonitrilo-agua, encontrándose una separación adecuada con una mezcla de 70% de agua y 30% de metanol. Se estableció así mismo una óptima velocidad de flujo de 1.5 ml/min., esto es, una máxima resolución en un mínimo de tiempo.

Se uso un detector de UV a una longitud de onda de 254 nm.

Con estas condiciones cromatográficas se obtuvo un cromatograma como el que se muestra en la fig. No. 4.

Para determinar los límites de detección de los biorreguladores con las condiciones mencionadas, se preparó una solución con una mezcla de estándares: 4 mg de  $GA_3$ , 3 mg de AIA y 0.6 mg de ABA en 10 ml de metanol.

Tomando como límite de detección una respuesta igual al doble del tamaño del ruido obtenido en el cromatograma, se obtuvieron los resultados que se muestran en la tabla No. 1.



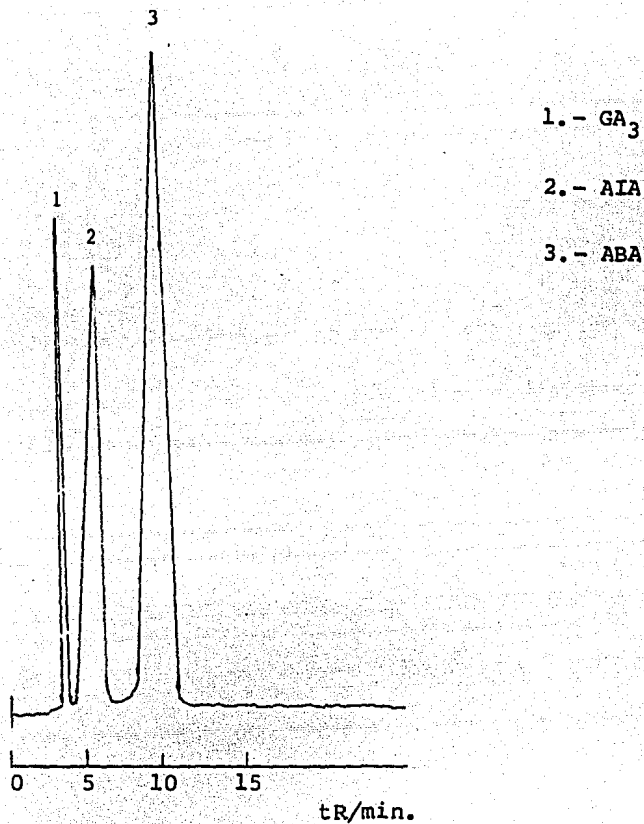


Fig. 4

Muestra: Sol. estandar de ácido giberélico,  
abscísico e indolacético, (25  $\mu$ l).

Columna: Radial-Pak C18 (8mm x 10 cm).

Fase móvil: MeOH:H<sub>2</sub>O -30:70

Flujo: 1.5 ml/min.

Detector: ultravioleta, 254nm.

Tabla No. I

Concentración en I $\mu$ l		Volumen inyectado
GA <sub>3</sub>	400 ng/ $\mu$ l	2.5 $\mu$ l
AIA	300 ng/ $\mu$ l	0.5 $\mu$ l
ABA	60 ng/ $\mu$ l	1 $\mu$ l

---

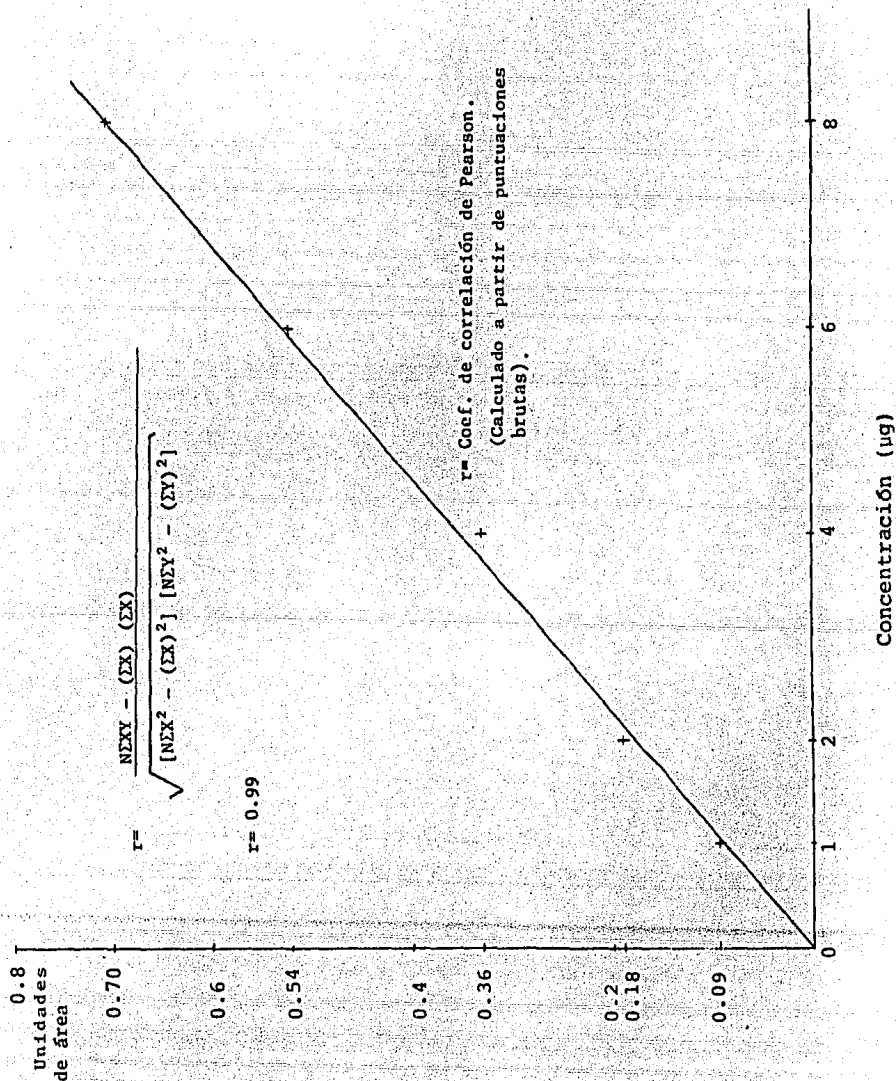
Concentración final (límite detectado)

---

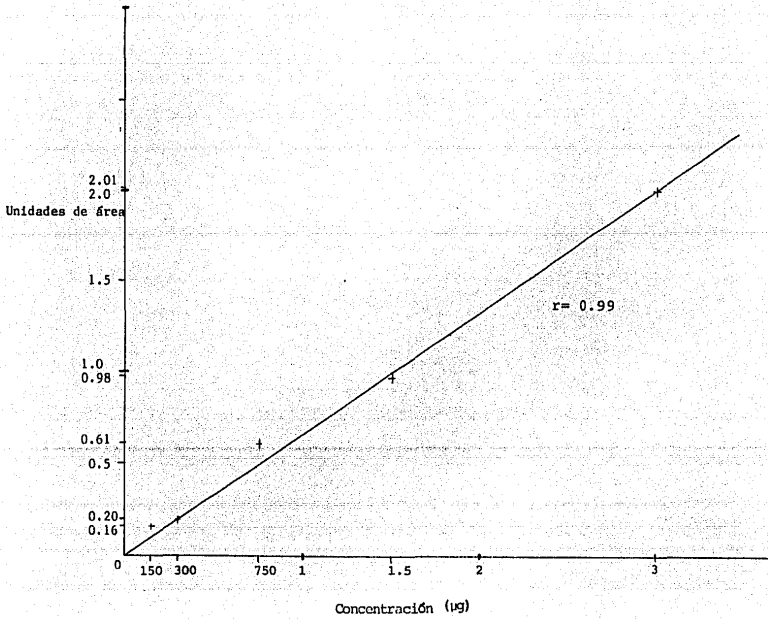
GA <sub>3</sub>	1 $\mu$ g
AIA	150 ng
ABA	60 ng

---

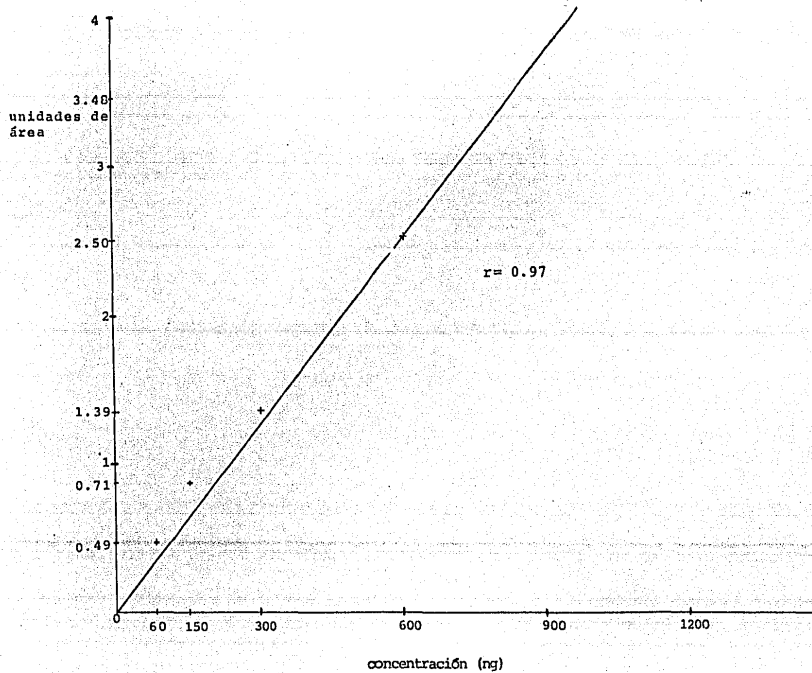
Para hacer cuantitativo el método se construyó una curva estándar para cada uno de los ácidos, y utilizando el método de calibración externa se determinó la concentración de estos compuestos en los extractos.

Curva estándar de  $GM_3$ 

Curva estandar de AIA



Curva estandar de ABA



Una vez establecidas las condiciones cromatográficas necesarias para la separación y cuantificación de los biorreguladores ácidos, hubo que estudiar el aislamiento de estos del material biológico.

### EXTRACCION

Para extraer los ácidos del material biológico, se trataron las semillas molidas con una mezcla de metanol-NH<sub>4</sub>OAc (0.1 M, pH 6.5) 80:20 v/v. Los tres ácidos son solubles en metanol y el acetato de amonio asegura un pH adecuado para mantener los ácidos en forma ácida (pKa del GA<sub>3</sub> = 4.0 y pKa del AIA = 4.75), y además precipita las proteínas presentes en el extracto.

Uno de los principales problemas en la extracción, es la pérdida de los ácidos por oxidación de los dobles enlaces, principalmente AIA y ABA, ya sea por estar en contacto con el medio ambiente o por oxidación enzimática endógena, ya que al destruir las células las oxidasas pueden estar presentes; para prevenir esta oxidación se adicionaron los antioxidantes 2,6-diterbutil p-cresol (BHT) (55) y dietilditiocarbamato de sodio (DIECA) el cual protege al AIA de la oxidación enzimática, debido a que es inestable en soluciones ligeramente ácidas:

$(C_2H_5)_2NCSSH \longrightarrow (C_2H_5)_2NH + COS + H_2S$ , y sus productos de descomposición actúan como inhibidores de la enzima citocromo oxidasa (56).

El tiempo de extracción es determinante en el rendimiento, por lo que se debe centrifugar el homogenizado inmediatamente; se ha observado que un tiempo prolongado puede producir la hidrólisis de las formas conjugadas de los ácidos (54).

El extracto metanólico contiene además de los biorreguladores, otros compuestos ácidos y neutros solubles en metanol entre ellos tenemos compuestos flavonoides y sus derivados como ácido gálico y caféico y otros compuestos fenólicos que están en concentraciones muy altas y pueden interferir en la determinación cuantitativa de componentes celulares que están en concentraciones muy bajas.

#### PURIFICACION

Se ha sugerido el uso de una columna de polivinilpirrolidona para eliminar los compuestos fenólicos de extractos vegetales.

De los estudios de Loomis (57) se ha propuesto que se forman puentes de hidrógeno entre la unión peptídica de la PVP y los fenoles. Se han hecho estudios sobre la variación de la adsorción en relación con el pH y se ha encontrado que 7 y 7.5 es el más adecuado (59). También se ha propuesto que la oxidación de los fenoles para formar quinonas y la interacción de estas con las proteínas es irreversible pero que esta simple oxidación no es suficiente, haciendose necesaria la eliminación de estos com-

puestos de los extractos.

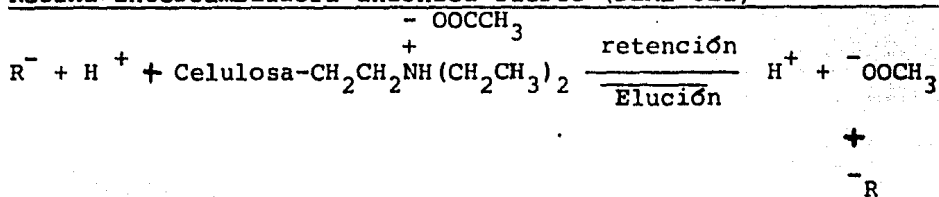
Gleen y Kuo (58) estudiaron el comportamiento de la PVP en presencia de extractos vegetales, pues se había demostrado que no solo compuestos con grupos -OH aromáticos se unían a la PVP sino también grupos carboxilo y enoles puede unirse al polímero. En tratamientos a pH 8 y 6.5, estos autores encontraron una recuperación cuantitativa de ácido giberélico.

Se encontró también que es el ácido indolacético el que más se retiene en las columnas, sin embargo los autores lograron eluir totalmente las hormonas de la columna y considerando estos resultados, en este trabajo se hizo un tratamiento inicial con una columna de PVP. En la tabla No. 2 se muestran los resultados de recuperación que se obtienen de este tratamiento: 90% de GA<sub>3</sub>, 85% de AIA y 88% de ABA, empleando 0.5 g de polivinilpirrolidona.

La cromatografía por intercambio iónico se basa en un equilibrio iónico entre la fase móvil y la muestra iónica con los sitios o grupos activos de una resina intercambiadora de iones. En este trabajo el equilibrio se puede representar de la siguiente forma:



Resina intercambiadora aniónica fuerte (DEAE-CEL)



R= GA<sub>3</sub><sup>-</sup>, AIA<sup>-</sup> y ABA<sup>-</sup>

Celulosa-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub><sup>+</sup>NH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>

La DEAE-celulosa contiene residuos de amina que a pH= 6.5 (pH del buffer que se utiliza para estabilizarla), están parcialmente como sales. El pKb de las aminas es de 9.7 aproximadamente, por lo tanto el pKa= 4.3 similar al pKa de los ácidos (pKa GA<sub>3</sub>= 4.0, PKa AIA= 4.75), debido a ésto se logra la retención de los ácidos, por el equilibrio que se establece entre los diferentes aniones.

La retención y la selectividad de los ácidos está determinado por su coeficiente de distribución, el cual está determinado por la naturaleza de cada uno de ellos, los grupos iónicos de la fase estacionaria y otras variables tales como la estructura de la resina, pH, fuerza iónica y la temperatura.

El coeficiente de distribución o de partición (K) se representa por:

$$K = \frac{\text{cantidad de muestra/mililitro de fase estacionaria}}{\text{cantidad de muestra/mililitro de fase móvil}}$$

Posteriormente se eluyeron los ácidos de la columna con ácido acético 1.5, pH= 2, porque en estas condiciones hay más iones acetato que desplazan a los ácidos de la resina.

Durante el trabajo se hicieron experimentos variando el pH de la resina, y se observó que a pHs más ácidos los biorreguladores no se retienen, mientras que a pHs básicos la elución es imposible.

También es importante mantener la concentración de metanol en límites que no excedan de 20%, puesto que la adsorción de los ácidos en la columna, no se logra a mayores concentraciones.

El último paso de la separación de los ácidos fue adsorberlos en una pequeña columna de octadecilsilano para eliminar el ácido acético del eluido, de esta columna se eluyó la mezcla de biorreguladores con metanol (52).

Para estimar la recuperación con este método se trató una solución de estándares de GA<sub>3</sub>, AIA y ABA y un extracto adicionado de éstos.

Se obtuvo una mayor recuperación a partir de una solución de estándares, que en el extracto adicionado de éstos, esto se debió probablemente a que en el extracto parte de los ácidos se

ocluyeron en los sólidos y fueron arrastrados al centrifugar el homogenizado o de alguna manera reaccionaron con otras sustancias y uniéndose a éstas, no es posible recuperarlas.

Tabla No. 2  
Recuperación de una mezcla de estándares

Etapa del proceso	% recuperado		
	GA <sub>3</sub>	AIA	ABA
solución de est.	100	100	100
↓			
columna de PVP	90	85	88
↓			
columna de DEAE-cel.	85	80	82
↓			
columna de ODS	55	72	78

Recuperación de extractos adicionados de estándares

Experimento 1

Etapa del proceso	% de recuperación		
	GA <sub>3</sub>	AIA	ABA
a) homogenizado + estándares	89	82	87
b) columna de PVP	80	69	75
c) columna de DEAE-cel.	54	48	49
d) columna de ODS	34	26	31

## Experimento 2

etapa del proceso	% de recuperación		
	GA <sub>3</sub>	AIA	ABA
a)	87	83	89
b)	78	72	83
c)	49	40	48
d)	36	26	28

## Experimento 3

etapa del proceso	% de recuperación		
	GA <sub>3</sub>	AIA	ABA
a)	90	86	88
b)	79	66	76
c)	47	56	38
d)	32	32	30

De los resultados obtenidos en cada uno de los experimentos se calculó un promedio para tomarlo como patrón, una vez establecido, se trabajaron las muestras de semillas.

Tabla No. 3  
Valores promedio

etapa del proceso	% recuperado ( $\bar{X}$ )		
	GA <sub>3</sub>	AIA	ABA
homogenizado + est.	89	84	88
columna de PVP	79	69	78
columna de DEAE-cel.	50	48	45
columna de ODS	34	28	30

Aunque hay pérdida considerable de los ácidos, los datos son reproducibles, por lo que se consideró un método adecuado para la extracción de éstas sustancias.

Con los resultados hasta aquí obtenidos, se procedió a efectuar las determinaciones en semillas de maíz de las variedades H-30 y H-32 que se consideran resistentes y H-139 descrito como susceptible a la germinación prematura, este maíz es de la cosecha 1984-1985, y se había previsto que los niveles de ácido abscísico serían altos, mientras que los niveles de ácido indolacético y geberélico serían muy bajos. En un trabajo anterior, utilizando un método de fluorescencia se había observado que el ácido indolacético, que tiene niveles muy altos durante la maduración del grano, disminuye en la semilla seca hasta niveles que no son detectables por el método que se utilizó (60).

En este trabajo se encontró que las semillas secas contienen niveles de biorreguladores que se encuentran por debajo de los límites de detección del método. Estos resultados fueron sorprendentes, sin embargo considerando que se había previsto un aumento de los biorreguladores promotores de la germinación, se hicieron germinar las semillas, poniéndolas en condiciones de alta humedad. Después de 24 horas de imbibición, durante los cuales deben haber germinado (61), se determinaron nuevamente los biorreguladores y los niveles se mantuvieron todavía por debajo de los límites de detección.

Cuando se usó una muestra de 100 g de semillas, cantidad 10 veces mayor que la utilizada originalmente, se tuvieron todavía niveles tan bajos que no se pudieron detectar.

Para comprobar la efectividad del método se determinaron los niveles de los biorreguladores en maíz en estado "lechoso" que se ha determinado previamente por otro método, obteniéndose los resultados que se indican en la tabla No. 4.

Tabla No. 4

Niveles de biorreguladores en semillas de maíz en estado "lechoso"

µg/g en peso fresco (formas libres)		
GA <sub>3</sub>	AIA	ABA
0.206	167	-

Los niveles de AIA obtenidos concuerdan con los encontrados previamente (60).

## RESUMEN Y CONCLUSIONES



Se desarrolló un método para la extracción simultánea de ácido giberélico, 3-indolacético y abscísico en semillas de maíz durante la germinación. La técnica es una modificación del método propuesto por Morris (52) para la extracción de AIA.

La extracción y purificación consistió en hacer un extracto con una mezcla de metanol-acetato de amonio. El extracto se pasó por una columna de PVP, para eliminar los fenoles, y por otra de DEAE-celulosa, para adsorber los ácidos. De esta columna se eluyeron con ácido acético y el eluido se pasó a través de una columna de ODS para retener los ácidos y eliminar el ácido acético, los ácidos se eluyeron con metanol y se efectuó la separación y cuantificación por cromatografía de líquidos a alta presión.

Pese a que el método puede usarse para la determinación simultánea de los tres biorreguladores, no se logró detectar ninguno de ellos en las muestras de maíz en estado de madurez comercial ni durante la germinación, por estar en una concentración menor al límite de detección.

Los resultados obtenidos en semillas de maíz en estado "lechoso", demuestran que el método es bueno y puede ser aplicado para extraer estos ácidos en otros tejidos vegetales.

## BIBLIOGRAFIA

## BIBLIOGRAFIA

1. CP-UNAM Informe de actividades 1979-1983, agosto 1983.
2. Wilkins M.B. (1969). Physiology of plant grow & development. McGraw-Hill. London. pags. 605-644.
3. Fountain D.W. (1976). Lettuce seed germination modulation of pregermination protein synthesis by gibberelic acid, abscisic acid and cytokinin. Plant Physiol. 58: 530-536
4. Chen S.S.C. (1973). Hormones and seed dormancy. Seed Sci. & Technol. 1: 325-338.
5. Varner J.E. (1973). Hormones and seed dormancy. Seed Sci. & Technol. 1: 325-338.
6. Dunlap J.R. (1977). Reversal of induced dormancy in lettuce by ethylene, kinetin, and gibberelic acid. Plant Physiol. 60: 222-224.
7. Aharoni N. (1979). Production and action of ethylene in senescing leaf discs. Plant Physiol. 64: 805-809.
8. Adkins S.W. (1981). The role of ethylene in breakage and germination of wildoat seeds. Plant Physiol. 67: 358-362.
9. Ketring D.L. (1969). Ethylene as a component of the emanation from germination peanut seeds and it's effect on dormant Virginia-type seeds. Plant Physiol. 44: 326-330.
10. Eastwell K.C. (1982). Modes of action in the release of  $\alpha$ -amilase through cell walls of barley aleurone layers. Plant. Physiol. 69: 563-567.

11. Ho T.D. (1982). Effect of ethylene on the release of  $\alpha$ -amylase through cell walls of barley aleurone layers Plant Physiol. 69: 1128-1131.
12. Schneider E.A. (1974). Metabolism of auxin in higher plants. Ann. Rev. of Plant Physiol. 25: 487-513.
13. Cohen J.D. Bandurski R.S. (1982). Chemistry and Physiology of the bound auxins. Ann. Rev. of Plant Physiol. 33: 403-430.
14. Epstein E. (1980). Concentration and metabolic turnover of indoles in germinating kernels of Zea mays L. Plant Physiol. 65: 415-421.
15. Tilberg E. (1977). Indolacetic acid levels in Phaseolus, Zea and pinus during seed germination. Plant Physiol. 60: 317-319.
16. Routchenko W. (1972). Causes de la germination sur plante de grain de maïs. Ann. Agron. 23 (4): 445-459.
17. Wittwer S.H. (1978). Phytohormones and chemical regulators in agriculture. Phytohormones and related compounds. A comprehensive treatise. Vol. 2, Editors: Letham Goodwin and Higgins.

18. McMillan, J. and Pryce, R.J. (1973). Chemical of the gibberelins. Phytochemistry, 13: 1413-1417.
19. Thiman K.V. (1974). Fifty years of plant hormone research Plant Physiol. 54: 450-453.
20. Paleg L.G. (1960). Physiological effects of gibberelic acid: I. On carbohydrate metabolism and amylase activity of barley endosperm. Plant Physiol. 35: 293-299.
21. Goleniowski M.E. (1976). Efecto del ácido abscísico sobre la germinación de *Eragrostis curvula*. Interacción con otros reguladores del crecimiento y sus efectos sobre diferentes enzimas. PHYTON 34 (2): 169-177.
22. Eeuwens C.J. (1975). Seed and pod wall development in *Pisum sativum*, L. in relation to extracted and applied hormones, J. Exp. Bot. 26 (90): 1-14.
23. Onckelen H.V. (1980). Metabolism of abscisic acid in developing seeds of *Phaseolus vulgaris* L. and it's correlation to germination and  $\alpha$ -amilase activity. J. Exp. Bot. 31 (123): 913-920.

24. Takeba G. (1979). Measurement of growth potential of the embryo in New York Lettuce seed under various combinations of temperature, red light and hormones. Plant Cell Physiol. 20 (1): 51-61.
25. Brenner M.L. (1981). Modern methods for plant growth substance analysis. Ann. Rev. Plant Physiol. 32: 511-538.
26. Daie J. (1980). Elisa: A new technique for the quantification of abscisic acid. Plant Physiol. 65: 94 (suppl).
27. Weiler E.W. (1980). Radioimmunoassays for the trans-zeatin and related cytokinins. Planta, 149: 155-162.
28. Weiler E.W. (1979). Radioimmunoassays for the determination of free and conjugated abscisic acid. Planta. 144: 255-63.
29. Sweetser P.B. (1978). Indole-3-acetic acid levels of plant tissue as determined by a new high performance liquid chromatographic method. Plant Physiol. 61: 254-258
30. Hofinger M. (1979). Identification by GC-MS of 4-chloro-indolylacetic acid and its methyl ester in immature *Vicia faba* seeds. Phytochemistry. 18: 653-654.

31. Andersson B. (1978). Identification of abscisic acid in shoots of *Picea abies* and *Pinus sylvestris* by combined GC-MS. A versatile method for cleanup and quantification. J. Chromatogr. 157: 303-10.
32. Hillman J.R. (1978). Isolation of plant growth substances. Cambridge: Cambridge Univ. Press. pg. 79-95.
33. Seeley S.D. (1970). Electron capture-gas chromatography for sensitive assay of abscisic acid. Annal. Biochem. 35: 530-33.
34. Bittner S. (1975). A GLC procedure for determining subnanogram levels of indol-3-yl acetic acid. Phytochemistry, 14: 2455-57.
35. Hofinger M. (1980). A method for the quantitation of indole auxins in the picogram range by high performance gas chromatography of their N-heptafluorobutyrylmethyl esters. Phytochemistry 19: 219-222.
36. Rivier L. (1974). Indolyl-3-acetic acid in cap and apex of maize roots: Identification and quantification by mass fragmentography. Planta. 120: 107-112.

37. Epstein E. (1980). Microscale preparation of indole-3-acetyl-pentafluorotoluene for capture electron detection-gas chromatography. Plant. Physiol. 65: 76 (suppl.).
38. Durley R.C. (1978). Analysis of abscising and 3-indolyl-acetic acid in leaves of *Sorghum bicolor* by high performance liquid chromatography. Can. J. Bot. 56: 157-161.
39. Bridges I.G. (1973). Identification and localization of auxin in primary roots of *Zea mays* by mass spectrometry. Planta. 115: 189-192.
40. Horgan R. (1979). High performance liquid chromatography of cytokinins. J. Chromatogr. 176: 263-270.
41. Summons R.E. (1980). Regulator of cell division in plant tissues. XXVIII. Metabolites of zeatin in sweet-corn kernels: Purification and identification using high-performance liquid chromatography and chemicals-ionization mass spectrometry. Planta, 147: 422-34.
42. Belke C.J. (1980). Metabolism and phloem transport of (2-<sup>14</sup>C)-ABA in tomato leaves. Plant Physiol. 65: 94 (suppl.).



43. Ciha A.J. (1977). Rapid separation and quantification of abscisic acid from plant tissues using HPLC. Plant Physiol. 59: 821-26.
44. Morris R.O. (1978). 4-bromophenacyl esters of gibberellins, useful derivatives for high performance liquid chromatography. Anal. Lett. 11: 73-83-
45. Ver. Ref. 29.
46. Sweetser P.B. (1976). High performance liquid chromatographic analysis of abscisic acid in plant extracts. Anal. Biochem. 71: 68-68.
47. Challice J.S. (1975). Separation of cytokinins by high performance liquid chromatography. Planta 122: 217-20.
48. Yamaguchi I. (1979). High pressure liquid chromatography of conjugated gibberellins. Phytochemistry. 18: 1699-1702.
49. Heftmann E. (1978). Argentation high pressure liquid chromatography and mass spectrometry of gibberellin esters. J. Chromatogr. 156: 71-77.
50. Kannangara T. (1978). High Performance liquid chromatographic analysis of cytokinins in *Sorghum bicolor* leaves.

Plant Physiol. 44: 295-99.

51. Crozier A. (1980). Analysis of picogram quantities of indole-3-acetic acid by HPLC-fluorescence procedure. Planta. 150: 366-370.
52. Morris R.O. Comunicación Personal.
53. Rousser G. (1969). Diethylaminoethyl and triethylaminoethyl cellulose column chromatographic procedures for phospholipids, glycolipids and pigments. Methods in enzymology. XIV. 272-300.
54. Hemberg T. (1980). The influence of the extraction procedure on yield of indole-3-acetic acid in plant extracts. Physiol. Plant. 50: 176-182.
55. Lino M. (1980). Improved procedure for the estimation of nanogram quantities of indole-3-acetic acid in plant extracts using the indole- $\alpha$ -pyrone fluorescence method. Plant Physiol. 66: 1099-1105.
56. Tomaszewski M. (1966). Interactions of Phenolic acid, Metallic ions and Chelating agents on auxin-induced growth. Plant Physiol. 41: 1443-1454.

57. Loomis W.D. (1966). Plant Phenolic compounds and the isolation of plant enzymes. Phytochem. 5: 423-238.
58. Gleen J.L. (1972). Use of insoluble polyvinylpyrrolidone for purification of plant extracts and chromatography of plant hormones. Phytochem. II: 345-351.
59. Andersen R.A. (1968). Optimum conditions for bonding of plant phenols to insoluble polyvinylpyrrolidone. Phytochem. 7: 293.
60. Rodríguez Cornejo R. (1984). Tesis de Licenciatura. Variación en el contenido de ácido indolacético en granos de maíz durante la maduración. Facultad de Química, UNAM.
61. Sánchez Jiménez, Estela de. Comunicación Personal.