



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales
IZTACALA

B013/80 E.1

Biología

“ INFLUENCIA DE EXTRACTOS DE PLANTAS
DE FACIL Y DIFICIL ENRAIZAMIENTO SOBRE
LA FORMACION DE RAICES EN ESTACAS ”

T E S I S

Que para obtener el Título de:
B I O L O G O
p r e s e n t a
IGNACIO PEÑALOSA CASTRO



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.



**REVISTA DE ESTUDIOS
PROFESIONALES DE MEXICO**

A la memoria de mi padre

A mi madre

A Martha y Aldir

A mis hermanos:

Javier

Eduardo

Gustavo

Alejandro

Dolores

Isabel

A mis familiares y amigos

Mi más sincero agradecimiento a todas las personas que de alguna manera contribuyeron a la realización de este trabajo.

Este trabajo fue realizado en la Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala bajo la dirección del Biol. Sergio González Moreno.

INDICE

	PAG
INTRODUCCION	1
MATERIAL Y METODOS	15
RESULTADOS	20
DISCUSION Y CONCLUSIONES	31
BIBLIOGRAFIA	41

Introducción

La historia del hombre es en amplia medida una crónica del dominio de su medio ambiente. La eficiencia de su control se manifiesta en su civilización y cultura. En gran parte, el control del medio ambiente significa el control de la vida de las plantas. Las dificultades para proveer un alto nivel de vida a la población, en los países subdesarrollados, están generalmente asociadas con un sistema ineficiente para la producción y distribución de cosechas (17). La producción y el manejo de plantas útiles, es la base principal de nuestra civilización.

En México, la evolución de la agricultura ocupa un lugar intermedio, en comparación a la de los demás países del mundo y aunque durante los últimos 30 años ha hecho notables progresos en cuanto a su capacidad para producir alimentos, aún subsisten muchos y graves problemas.

Entre los años 1930-1945, la producción de alimentos estaba estancada, importándose entre el 15 y el 20% de cereales; en 1960, habían desaparecido los déficits de productos alimenticios y en 1964-1969, se satisfacía la demanda interna y además se exportaban cantidades considerables de productos agrícolas (5.4 millones de toneladas de maíz, 1.8 millones de toneladas de trigo y 339 000 toneladas de frijol). Sin embargo, a principios de la década de los 70, volvía a importar entre el

15 y el 20% de los cereales básicos, debiéndose este fenómeno a la interacción de tres problemas principales(37):

1)La naturaleza dual de la agricultura mexicana. Por un lado un pequeño sector moderno y avanzado que da la mayoría de los productos agrícolas comercializados y por el otro un amplio sector agrícola semicomercial y de subsistencia.

2)La escasez e irregularidad en el suministro de agua para cultivos en las principales áreas agrícolas.

3)La dispersión de investigadores competentes.

Nicolás Ardito Barletti ha intentado valorar los beneficios sociales producidos por la investigación y, según sus cálculos, la inversión realizada a partir de 1945, en todo tipo de investigaciones, proporcionaba dividendos del 300% anual en 1965, de aquí que aunque estas ganancias tan elevadas se debían en parte al estado primitivo de la agricultura, es evidente que la investigación desempeñó un papel decisivo en la obtención de tales beneficios(37).

En vista de la importancia que representa el cultivo de vegetales en un país, y de acuerdo al primordial papel que juega la investigación en la eficiencia de producción vegetal, es necesario realizar mayor número de estudios que conduzcan al conocimiento de la vida de los vegetales y las condiciones en que crecen mejor, para que de éstos, surjan nuevas técnicas

de cultivo y se perfeccionen las ya existentes, tratando siempre de encontrar aquellas que garanticen mayor producción, en menor tiempo y de mayor calidad.)

(Entre los problemas que se pueden relacionar con la producción y calidad de los cultivos, puede destacarse la dificultad que existe para la propagación rápida y eficiente de algunos vegetales.)

La propagación por medio de semillas es la más utilizada para plantas de autopolinización y también se usa bastante en la propagación de plantas de polinización cruzada, sin embargo, aunque tiene ciertas ventajas:

a) Generalmente es el método más barato de propagación.

b) Las semillas permiten almacenar plantas durante largos períodos de tiempo.

c) En condiciones apropiadas su viabilidad puede mantenerse por mucho tiempo.

se presentan tres desventajas importantes(17):

a) Segregación genética de las plantas heterocigóticas.

b) El gran intervalo de tiempo que se necesita en algunas plantas para que se alcance la madurez a partir de semillas.

c) La baja viabilidad de algunas semillas.

En los casos en que estas desventajas se presenten, el método a elegir es la propagación vegetativa, que permite obtener plantas genotípicamente idénticas, con lo que plantas

heterocigóticas pueden ser perpetuadas sin alteración; es más fácil y rápida que la propagación por semillas, el estado de madurez se alcanza más rápido y además se pueden perpetuar clones de plantas sin semillas(17)

→ En estudios fisiológicos, los efectos de un tratamiento dado se oscurecen por variación genética entre plantas; una alternativa a este problema es la utilización de estacas, que reduce considerablemente esta variación(6); por esta razón y por ser un medio de propagación vegetativa, es conveniente explotar la utilización de estacas, e investigar a fondo el proceso de enraizamiento y los factores involucrados en él, siendo este proceso la principal limitante en el cultivo de estacas.)

Anteced. [Antes de que se descubrieran las auxinas, Sachs(1882) y Went(1933) postulaban ya que existían sustancias en las hojas, yemas y cotiledones de las plantas, que se desplazaban hacia las raíces estimulando el enraizamiento; dichos autores denominaron a esta sustancia como rizocalina(in 36). Curtis(1918) y Zimmerman y colaboradores(1933) proponían, respectivamente, que el permanganato y el monóxido de carbono incrementaban el enraizamiento de estacas(in 36). Sin embargo, en 1934, Thimann y Went (31) señalan que son las auxinas las que ejercen el control primario en la formación de raíces. Se han realizado varios trabajos a partir de este descubrimiento, encontrándose en la mayoría de los casos, un incremento en el número de raíces forma-

das, al tratar estacas de plantas con auxinas(11).

Al descubrirse que las auxinas desempeñaban un importante papel en la formación de raíces, se supuso que las estacas que no enraizan fácilmente, no lo hacen porque carecen de niveles adecuados de auxinas y que al proporcionarles la cantidad de auxina faltante, deben enraizar. La lista de plantas que responde ante la aplicación de auxinas, es ahora bastante grande (Chadwick, 1937; Cooper, 1935, 1938; Gocolasvili y Maximov, 1937; Hitchcock y Zimmerman, 1936; Lajbach y Fischnich, 1935; Muller, 1935; Poesch, 1938; Pearse y Garner, 1937; Pearse, 1938; Traub, 1938; Went, 1934) (31).

Se ha estudiado la dosis óptima de auxina en muchas plantas, variando las concentraciones óptimas de especie a especie (32, 33). Se han estudiado muchas sustancias que se comportan como auxinas; ácido indolacético (IAA), ácido indolpropiónico (IPA), ácido indolbutírico (IBA), ácido naftalenacético (NAA) y ácido benzofurano acético (BzFAA). De ellos, los más usados han sido el IAA, el IBA, y el NAA, estos últimos tienen la ventaja de ser más estables que el primero(1, 33).

Se piensa que las auxinas funcionan sobre todo en los primeros estadios de diferenciación para la formación de primordios de raíces. Haissig(1970) encuentra que al aplicar IAA marcado con ^{14}C , las células de los primordios de raíz lo incorpo

ran, sobre todo en la fase más temprana de la iniciación de raíces(10). Smith y Thorpe(1975, 1976) encuentran en cortes histológicos, que las auxinas promueven sobre todo, la formación de los primeros estadios de diferenciación(27, 28, 29).

(La aplicación de IBA determina que los meristemas en Salix fragilis puedan formar primordios de raíz, que en su ausencia forman parénquima(10).

Se ha propuesto la participación de otras hormonas vegetales en el enraizamiento. Brian y colaboradores(1960) encuentran que las giberelinas se oponen a la iniciación de raíces; Meredith y colaboradores(1970) encuentran que las citocininas, en bajas concentraciones, estimulan la iniciación de raíces(21); Bachelard y Stowe(1963), encuentran que dependiendo del lugar de aplicación de citocininas, se estimulará o se inhibirá la iniciación de raíces en estacas(1).

✓ A pesar de todos estos descubrimientos, quedan aún muchas incógnitas por resolver; sobre todo las que surgen a partir del hecho de que no todas las estacas de plantas tratadas con auxinas, son capaces de formar raíces. Muchas de las plantas más resistentes, que de ordinario no se propagan por estacas, no forman raíces cuando se tratan con auxinas. Evidentemente la falla de estas estacas para formar raíces, no se debe, en primera instancia, a un contenido auxínico deficiente; puesto que

se sabe que las auxinas están presentes en todas las plantas, al menos en primavera y durante el período de crecimiento(31).

[Hay varios factores que influyen sobre el enraizamiento de estacas(1):

— 1) La edad de la planta de donde se toma la estaca (Thimann y Delisle, 1939; Heitmuller, 1952).

— 2) La posición que ocupa la estaca en la planta de donde es tomada (Snow, 1938; Edgerton, 1944).

— 3) El tipo de estaca usada (suculenta o leñosa) (Nienstaedt, et al, 1958).

— 4) La época del año en que las estacas son tomadas (Snow, 1938; Heitmuller, 1952; Enright, 1958).

— 5) El sexo de la planta de donde se toman las estacas (Snow, 1942; Edgerton, 1944).

— 6) El estado nutricional de la estaca (Nienstaedt, et al, 1958; Cohen, 1978).

② 7) Las condiciones ambientales en que enraizan las estacas (Nienstaedt, 1958).

De éstos, algunos pueden estar relacionados con el o los compuestos, ajenos a las auxinas, que determinan que las estacas enraicen o no. Sobre todo si tomamos en cuenta que las auxinas son incapaces de restablecer el desarrollo de raíces en las estacas expuestas a estos factores(1).

Se ha propuesto la existencia de factores que promueven la formación de raíces. Thimann y Delisle; por medio de sus experimentos se dan cuenta que la capacidad para formar raíces de una estaca, se pierde con la edad y el tratamiento con auxinas no elimina dicho efecto; sugieren que existe un compuesto diferente de las auxinas, que promueve la formación de raíces y cuya síntesis puede disminuir con la edad de la planta de donde se toman las estacas(31).

En 1939, Kaiser, S. y Albaum, H.G. proponen que existen factores además de las auxinas que pueden existir en niveles limitantes, y por ello se dificulta el enraizamiento de las estacas de algunas plantas, aún cuando se tratan con auxinas (18).

Se reporta también la existencia de cofactores, que en combinación con las auxinas, ayudan a que las estacas formen raíces; la fuente de esos cofactores son por lo común las hojas; entre estos cofactores figuran materiales nitrogenados y azúcares(25); también hay pruebas de que ciertos compuestos fenólicos interactúan con las auxinas al inducir la iniciación Tomaszewski, 1964; Hackett, 1970 (in 3f).

Las yemas que no se encuentran en reposo, parecen ser los lugares de síntesis de factores que estimulan el enraizamiento. Con experimentos de anillado o eliminación de yemas

se ha demostrado que algunas sustancias se desplazan hacia abajo, a través del floema y hasta la base de la estaca, donde se estimula el enraizamiento (36). Mohammed, S. (1975), encuentra que en estacas de chícharo, los factores estimuladores de la formación de raíces, que se producen en las yemas y meristemas apicales, son esenciales durante los primeros 3 días de desarrollo de las estacas (22).

En 1974, Eggens, J.L., Hilton, R.J. y Loughheed, E.C. reportan que la variación que existe en algunas estacas de fácil enraizamiento en cuanto a la capacidad de formar raíces en función de la época del año en que estas sean tomadas (31), podría atribuirse a variaciones en la síntesis de compuestos activadores del enraizamiento, llevándose a cabo la síntesis de estos compuestos en las yemas (7) y siendo el enraizamiento, al menos en algunas plantas, bajo en predormancia, muy bajo en dormancia y alto en post-dormancia (3).. ? ?

Hess (1964) reporta la presencia de 4 áreas con actividad promotora del enraizamiento, a partir de extractos etanólic_o de hiedra inglesa juvenil (Hedera helix). La forma madura, que es difícil de enraizar, contuvo menos actividad de este tipo (14).

Heuser y Hess (1972), aislan tres compuestos lipídicos que promueven la formación de raíces, a partir de la forma

juvenil de la hiedra inglesa, de fácil enraizamiento; no establecen su estructura química, pero por análisis espectroscópicos, determinan la presencia de grupos alcohol y nitrilo en estos compuestos(15), pudiendo corresponder a compuestos como el mandelonitrilo encontrado por Bove, C. y Conn, E.E. en 1961(4).

[Tognoni y Lorenzi(1972), encuentran que la fase ácida de extractos metanólicos de tejido de Picea glauca (planta de difícil enraizamiento) contiene sustancias que estimulan la producción de raíces, que retardan el crecimiento, y que se encuentran en menor cantidad en Chamaecyparis lawsoniana (planta de fácil enraizamiento) (35). Parecería contradictorio que las plantas que difícilmente enraizan, posean mayor contenido de sustancias que promueven el enraizamiento; sin embargo, Tizio (1968), sugiere que el enraizamiento surge del balance de sustancias de crecimiento, más que de la presencia de una de ellas (35). En un trabajo posterior(1977), Tognoni, Kawase y Alpi, identifican tentativamente a la sustancia que promovía el enraizamiento como ácido abscísico. A excepción de este trabajo, las sustancias promotoras del enraizamiento han sido encontradas en plantas de fácil enraizamiento, mientras que las plantas de difícil enraizamiento, carecen de ellas o las tienen en muy baja cantidad(8, 15).

Fadl y Hartmann(1967), al tomar extractos de estacas de

P. aureus
←
 las variedades de peral "Old Home" y "Bartlett" , de fácil y difícil enraizamiento, respectivamente, fraccionarlos por cromatografía en papel y someterlos al bioanálisis del frijol mungo (Phaseolus mungo), se dan cuenta que hay gran actividad promotora del enraizamiento en los extractos de la variedad "Old Home" y mucha actividad inhibitoria en los extractos de la variedad "Bartlett". Dichos experimentos indican que la presencia o ausencia de sustancias promotoras del enraizamiento , pueden no ser la única causa de que las estacas formen o no raíces. Pueden existir inhibidores de este proceso, que pueden o no estar presentes en las estacas y, dependiendo de esto, habrá o no enraizamiento(8). Spiegel(1954, 1955) encuentra que las estacas de Vitis vinifera, de enraizamiento fácil, al ser sometidas a extractos acuosos de Vitis berlandieri, de enraizamiento difícil, sufren un decremento en la capacidad para formar raíces; si se lixiviaban las estacas de Vitis berlandieri, se fomentaba la formación de raíces; pero las estacas no lixiviadas, poseían un contenido elevado de inhibidores(30). Odom y Carpenter encuentran inhibidores en estacas de alterna tera , coleo, crisantemo, geranio y clavel(36). Meredith y colaboradores(1970) encuentran un inhibidor en las estacas de Feijoa selowiana y el contenido de inhibidor era 5 veces mayor en variedades de difícil enraizamiento, que en variedades de

fácil arraigue(21). Gazit y Blumenfeld(1970) proponen la existencia de inhibidores diferentes al ácido abscísico(36). Smith y Thorpe(1975) encuentran que la cinetina inhibe marcadamente la fase preiniciativa de la formación de raíces en estacas de Pinus radiata(28). Newton(1977) encuentra que el ácido abscísico retarda el alargamiento de raíces en un 60%(23). Como nos damos cuenta, no existe un acuerdo general en cuanto a inhibidores del enraizamiento se refiere. Por un lado se propone al ácido abscísico y la cinetina como inhibidores, pero en otros trabajos se reporta que estos compuestos estimulan la producción de raíces(33). Otro grupo de investigadores encuentra inhibidores de naturaleza química desconocida(8). Todos estos problemas surgen de la falta de entendimiento del proceso de formación de raíces en estacas de plantas.

En cuanto al sitio de producción de inhibidores en las plantas, el trabajo de Iwazaki y Weaver(16) - en el que se encuentra que, al remover las yemas en reposo de la uva "Zinfanel" (Vitis vinífera), se favorece el enraizamiento, y en el que se identifica un inhibidor del crecimiento de raíces como ácido abscísico- sugiere que el principal sitio de síntesis de inhibidores del enraizamiento, son las yemas en reposo.

Existen algunos otros factores que influyen sobre el en-

raice de estacas; Linderman y Call (1977) encuentran que los hongos que forman micorrizas, capacitan a las estacas en el enraizamiento y atribuyen este efecto, entre otras cosas, a la producción y liberación por parte del hongo, de sustancias que promueven el enraizamiento (20).

Todos los experimentos antes citados, conducen primordialmente a descubrir los factores que gobiernan el proceso mediante el cual, las estacas forman raíces; no obstante el gran adelanto que al respecto se ha logrado, no existe un acuerdo general en cuanto a este tópico. La mayoría de los autores sigue considerando a las auxinas como las únicas responsables del proceso de enraizamiento, ya que, aunque las evidencias de que sustancias diferentes de las auxinas son importantes en el enraizamiento se van acumulando, lo que se conoce de estas sustancias hasta el momento es poco, por lo que se necesita investigar la existencia de estos factores y sus efectos, en mayor número de plantas. En función de tal necesidad, el siguiente trabajo persigue los siguientes objetivos: 1) Determinar si en los extractos de violeta africana (Saintpaulia ionantha), de fácil enraizamiento, y aguacate (Persea gratissima), de difícil enraizamiento, existen compuestos no auxínicos, que estimulen la producción de raíces secundarias. 2) Comparar el efecto de estas sustancias, en caso de existir, con el de las auxinas. 3) Determinar si existe algu

na fracción, en los extractos de cualquiera de estas plantas, que inhiba el enraizamiento. 4) Comparar los niveles de inhibidores en las plantas de fácil y difícil enraizamiento trabajadas (si es que existen). 5) Determinar si existe un efecto cooperativo entre auxinas y fracciones promotoras del enraizamiento del extracto de cualquiera de estas plantas (en caso de existir).

Tomando en cuenta que existen plantas de difícil enraizamiento, cuyas estacas no forman raíces a pesar de proporcionarles auxinas(31, 15), que a partir de especies de plantas de fácil enraizamiento se han obtenido promotores no auxínicos potentes para la formación de raíces y la concentración de éstos es muy baja o nula en plantas de difícil enraizamiento(8, 19, 34) y que existen inhibidores de la formación de raíces que actúan en diferentes etapas de este proceso(8, 21, 28, 30, 36) podemos pensar que la dificultad para el enraizamiento en plantas difíciles de arraigar no se debe a una deficiencia de auxinas, pero sí puede ocurrir que disminuyan los niveles de sustancias no auxínicas que promueven el enraizamiento, que deben encontrarse en niveles adecuados en plantas de fácil enraizamiento; o que en las plantas de difícil enraizamiento se presenten altas concentraciones de inhibidores que contrarresten la acción de sustancias que promueven la formación de raíces secundarias

Material y Métodos

El material vegetal utilizado para este trabajo fue obtenido a partir de hojas de violeta africana (Saintpaulia ionantha) y hojas de aguacate (Persea gratissima C.) tomadas de árboles de 8 años de edad en Abril de 1980. Las hojas se obtuvieron por cortes con navaja en la base del pecíolo. Los procesos de aislamiento y purificación se realizaron evitando en lo máximo posible la exposición a luz y temperatura, para minimizar la descomposición de los compuestos estimuladores del enraizamiento (15).

Extracción de hojas de violeta africana y purificación.

Se pesaron 181g de material fresco, se homogeneizaron en 724 ml de una mezcla de metanol-cloroformo (8:2 v/v) con una licuadora. Se filtró y el residuo se extrajo 3 veces con 550 ml de mezcla metanol-cloroformo (8:2 v/v).

Se combinaron los filtrados y se redujeron a un volumen de 200 ml bajo presión reducida, a una temperatura menor de 35°C, en un rotavapor-R (Brinkmann instruments Cantigue road Westbury, N.Y. 11590). Este volumen se extrajo 5 veces con porciones de 50 ml de cloroformo, desechándose la fase acuosa.

Se removió clorofila de la fracción clorofórmica con una columna de carbón-celita (2:1 p/p) de 1.5 cm de diámetro.* Se utilizó 1g de mezcla por cada 25 g de material fresco. La fracción clorofórmica activa eluída de esta columna se mezcló con 10 g de gel de sílice 60, se evaporó a presión reducida en el rotavapor

*No fue posible remover cantidades significativas de clorofila.

(temp. menor de 35°C) y se aplicó a una columna de gel de sílice (30 g) de 1.5 cm de diámetro, previamente preparada en hexano. El gel de sílice se eluyó primero con hexano, hasta que la fracción de color amarillo del eluato alcanzó la base de la columna y después se eluyó con fracciones de 100 ml de mezcla al 5, 10, 20, 40 y 100% de acetato de etilo en hexano. Las mezclas de acetato de etilo en hexano se concentraron en el rotavapor-R bajo presión reducida (temp. menor de 35°C) y el material se disolvió en 3-4 ml de isopropanol. Se obtuvieron así 5 muestras, correspondiendo cada una a una dilución de acetato de etilo en hexano. Las muestras se guardaron en el refrigerador a 4°C hasta que fueron usadas. Método modificado de Heuser y Hess(15).

Bioensayo

Se midió la actividad enraizadora de cada fracción por medio del bioensayo del frijol mungo, modificado de Hess(12). Se obtuvieron semillas de frijol mungo de fuente comercial, se trataron con solución de clorox (hipoclorito de sodio comercial) al 20% durante 20 minutos, se lavaron con agua corriente durante 24 hs y se germinaron en cubas de plástico con vermiculita previamente tratada con fungicida (Bem-late). Se sembraron 1 200 semillas de frijol mungo, 100 semillas en cada cuba de plástico, a una profundidad de 2 cm y fueron germinadas en la oscuridad por 8 días. Se decapitaron(en la base de los cotiledones) al 7° día y al 8° se tomaron

estacas de 7 cm de longitud, medida desde el punto de decapitación. Se colocaron 3 estacas por tubo de ensayo de 1.3 X 10 cm, se agregaron 10 ml de agua destilada y una tira de papel Whatman 1 de 1.5 X 5 cm a cada tubo. Las tiras de papel no llevaban fracción alguna del extracto cuando se aplicaron a los lotes control, pero en los lotes experimentales cada tira se preparó con cantidades variables de fracción del extracto según fuera el caso; así, en cada tubo existía una dosis determinada de una fracción dada del extracto.

Se mantuvieron las estacas de frijol mungo en los tubos de ensayo por nueve días y después de este tiempo se contó el número de raíces en cada estaca. Las estacas de las plántulas etioladas se desarrollaron en ausencia de luz.

Se utilizaron extractos a la semana, 2 semanas y 4 semanas de obtenidos, para determinar el grado de inactivación de las sustancias activadoras e inhibitorias de la formación de raíces secundarias a través del tiempo, por medio del bioensayo del frijol mungo.

Para observar el efecto de la concentración de las fracciones activas sobre el desarrollo de raíces secundarias en las estacas, se utilizaron 0.1 $\mu\text{l/ml}$, 0.3 $\mu\text{l/ml}$, 0.5 $\mu\text{l/ml}$ y 1 $\mu\text{l/ml}$ de esta fracción en isopropanol.

Para comparar el efecto del extracto con el de las auxinas y determinar si existía un efecto cooperativo entre determi-

nada fracción del extracto y auxinas, se prepararon tubos con la dosis óptima de la fracción promotora de la formación de raíces secundarias (0.3 μ l/ml), tubos con esta fracción en dosis óptima + auxinas, y tubos con auxinas únicamente (IAA o IBA en solución (5 mg/l)).

Cromatografía en capa fina para la identificación de los componentes del extracto.

Se realizó cromatografía en capa fina de las fracciones del extracto (5, 10, 20, 40 y 100%) corriendo al mismo tiempo muestras de auxinas (IBA e IAA). Se utilizaron placas metálicas impregnadas con gel de sílice Merck (Kieselgel F₂₅₄) de 20 X 20 cm y 0.2 mm de espesor. Se aplicaron las fracciones del extracto y las auxinas, y se corrieron por cromatografía ascendente en una cámara cromatográfica con una mezcla de solventes cloroformo-acetato de etilo (9:1 v/v) hasta que el frente del solvente alcanzó 15 cm. se evaporó el solvente y se reveló con el reactivo de p-anisaldehído-ácido sulfúrico(15).

Extracto de hojas de aguacate.

Siguiendo el método de Tognoni y Lorenzi(35), se pesaron 400g de hojas de aguacate, se homogeneizaron en una licuadora y se extrajeron con 800ml de metanol al 80% por 24 hs a 2°C. El extracto se redujo a un volumen de 20-25 ml bajo presión reducida en un rotavapor-R (temp. menor de 40°C) y se guardó en refrigeración en frasco ámbar a 4°C, hasta que fue utilizado.

Cromatografía en papel

Se fraccionó el extracto de hojas de aguacate por cromatografía descendente, en papel cromatográfico Whatman 3. Se usaron tiras de papel de 47 X 19 cm y la mezcla de solventes utilizada fue isopropanol-agua (10:1 v/v). Los cromatogramas se corrieron en forma unidireccional durante 14 hs (hasta que el frente del solvente alcanzó a recorrer 30 cm a partir del origen. Se secaron los cromatogramas y se recortaron transversalmente en tiras de 3 cm. Cada una de las 10 tiras de papel se sometió al bioensayo del frijol mungo, de la misma manera que se describió en el ensayo de las fracciones de la violeta africana. Se utilizaron tiras de papel sin muestra para los lotes control. El extracto crudo también fue sometido al bioensayo del frijol mungo. Los pasos hasta aquí seguidos, corresponden al método que utilizaron Fadl y Hartmann, modificado. (8).

Resultados

Violeta africana:

Al someter las estacas de frijol mungo a las diferentes fracciones del extracto de hojas de violeta africana (acetato de etilo en hexano al 5, 10, 20, 40 y 100%) se observa (ver figura 5) que la fracción de acetato de etilo en hexano al 5%, de consistencia oleosa y color amarillo claro, tiene actividad promotora de la formación de raíces secundarias, siendo la dosis óptima de 0.3 μ l/ml (figura 3). La fracción de acetato de etilo en hexano al 10%, líquido oleoso y de color amarillo intenso, tiene actividad inhibitoria de la formación de raíces secundarias (ver figura 5), siendo máxima a una dosis de 1 μ l/ml (figura 4) dentro de las concentraciones trabajadas. Las demás fracciones no presentan diferencias significativas con respecto a los lotes control (figura 5). Todos estos resultados a un valor de α menor de 0.01, por análisis de varianza.

Según se observa en la figura 1, a medida que aumenta el tiempo a partir de la obtención de las fracciones del extracto, disminuye el número de raíces por estaca en el lote que contiene la fracción que estimula el enraizamiento; fenómeno que no ocurre en la fracción inhibitoria (figura 2).

Al combinar la fracción que estimula la formación de raíces con soluciones conteniendo 5 mg/l de IAA o IBA (dosis

Óptima de auxinas para estacas de frijol mungo (2)) se observa que decae el número de raíces formadas por estaca, en comparación con las estacas tratadas con la fracción estimuladora únicamente. Sin embargo, el número de raíces por estaca se incrementa en comparación con los lotes tratados únicamente con IAA o IBA en las mismas dosis (ver tabla 2).

Al correr la cromatografía en capa fina se determinaron los Rfs del IAA, IBA y componentes de las fracciones al 5, 10, 20, 40 y 100% de acetato de etilo en hexano. Los resultados se muestran en la figura 2 y según estos, el IAA y el IBA no aparecen en ninguna de las fracciones del extracto.

Aguacate:

Como se puede apreciar en la tabla 1, el extracto metanólico de las hojas de aguacate, no produjo incremento ni inhibición significativa del enraizamiento (α menor de 0.01 por análisis de varianza).

Las tiras de papel cromatográfico correspondientes a los Rfs 0 a 1 no incrementan significativamente el número de raíces formadas con respecto a los lotes control; tampoco es apreciable ningún efecto inhibitorio, como puede verse en la figura 6. En ningún Rf hay incremento o decremento significativo en el número de raíces formadas.

Tratamiento	El medio del número de raíces/estaca. (\pm S)	Número de estacas	Concentración usada
Agua destilada	2.8 \pm 2.5	127	-
Aguacate	2.8 \pm 2.7	38	1 μ l/ml
IAA	2.8 \pm 2.7	34	5mg/l
IBA	3.1 \pm 1.9	34	5mg/l
Acetato de etilo/hexano	5%	21 \pm 4.4	0.3 μ l/ml
	10%	1.1 \pm 1.1	1 μ l/ml
	20%	2.8 \pm 2.4	1 μ l/ml
	40%	2.9 \pm 2.9	1 μ l/ml
	100%	3.1 \pm 3.1	61

Tabla 1. Efecto de las fracciones del extracto de hojas de violeta africana, extracto metanólico de hojas de aguacate, y auxinas (IAA e IBA) sobre el enraizamiento de estacas de frijol mungo.

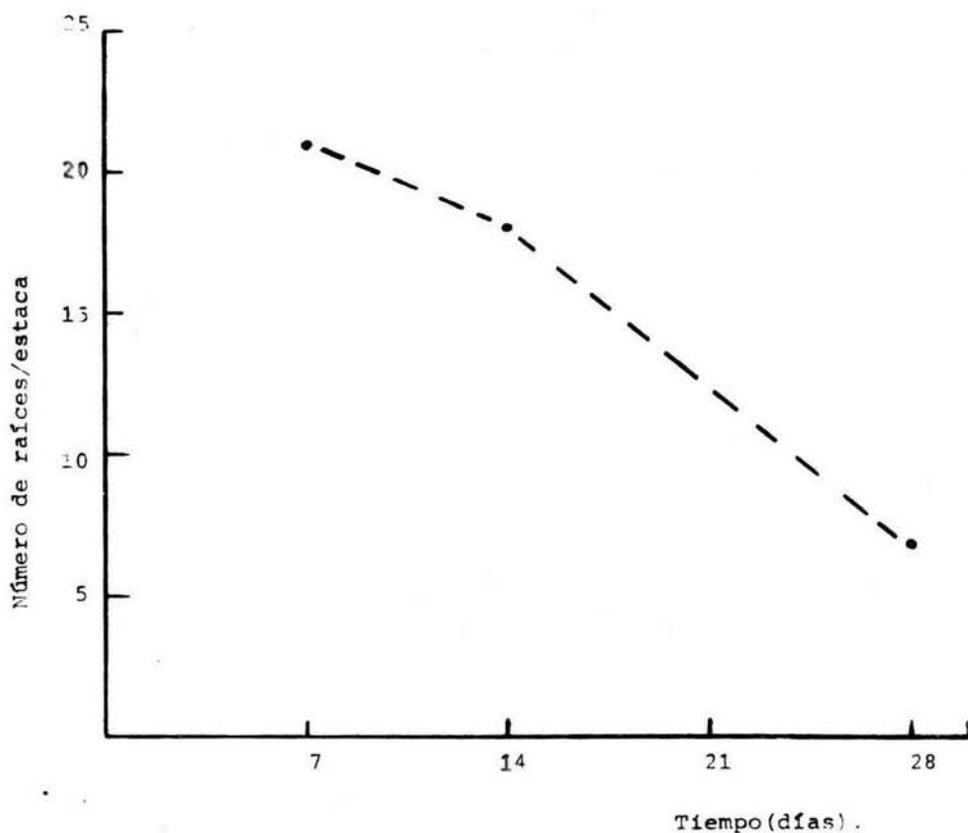


Figura 1. Variación en el número de raíces formadas en las estacas de frijol mungo tratadas con la fracción de acetato de etilo en hexano al 5% del extracto de violeta africana en función del tiempo transcurrido desde la obtención de ésta.

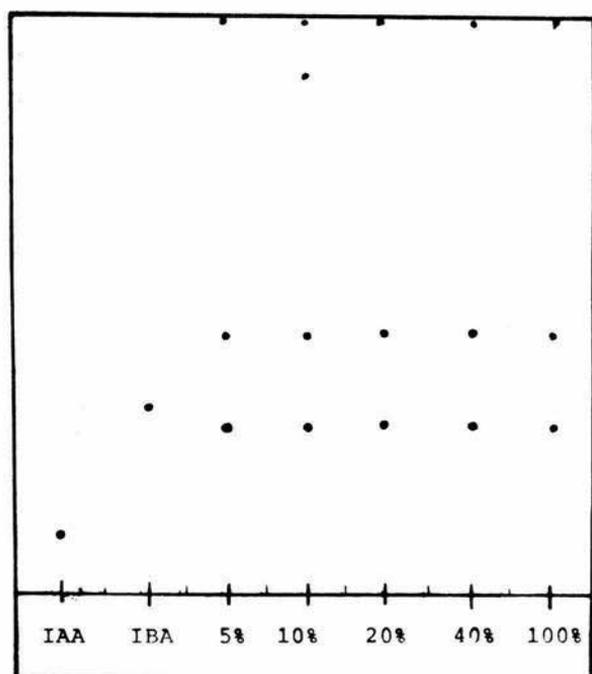


Figura 2. Cromatograma esquemático de las diferentes fracciones del extracto de hojas de violeta africana, IAA e IBA mostrando la ausencia de auxinas en cualquiera de las fracciones del extracto. Cloroformo-acetato de etilo (9:1 v/v).

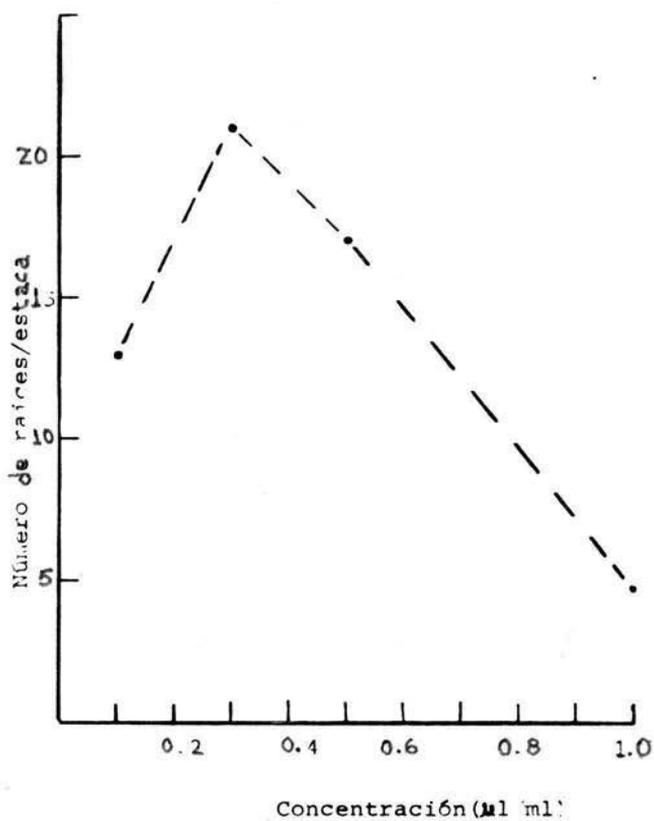


Figura 3. Influencia de la concentración de la fracción al 5% de acetato de etilo en hexano del extracto clorofórmico de hojas de violeta africana sobre el enraizamiento de estacas de frijol mungo.

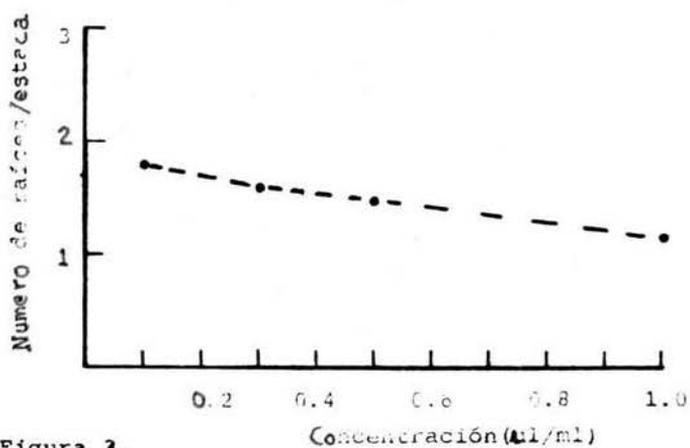


Figura 4.

Influencia de la concentración de la fracción al 10% de acetato de etilo en hexano del extracto clorofórmico de hojas de violeta africana sobre el enraizamiento de estacas de frijol mungo.

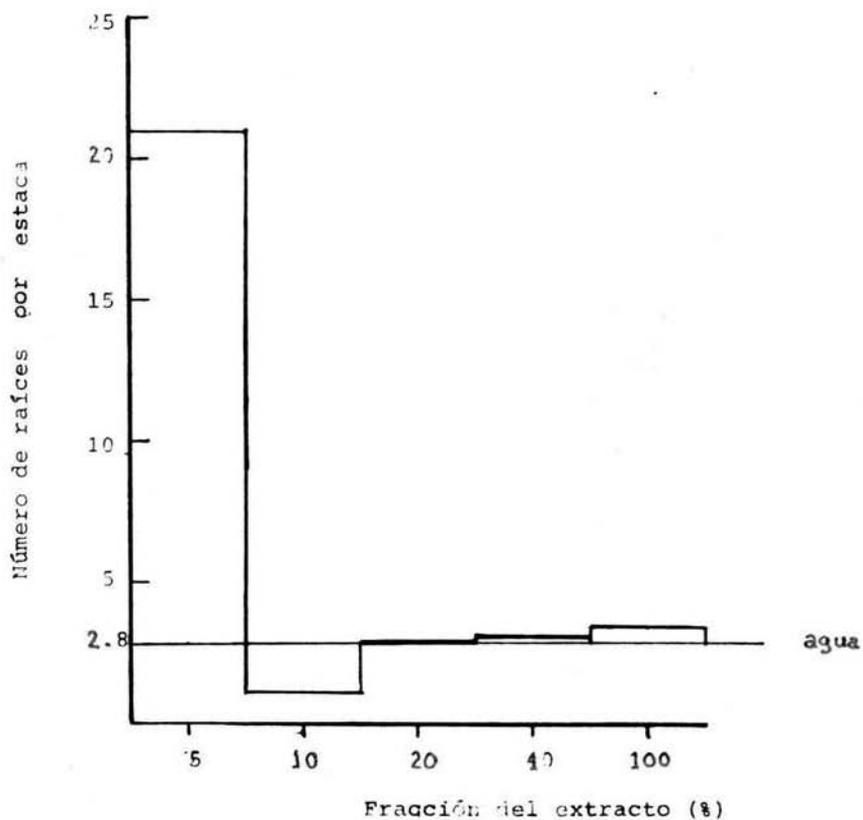


Figura 5. Influencia de diferentes fracciones del extracto clorofórmico de las hojas de violeta africana sobre el enraizamiento de estacas de frijol mungo.

Tratamiento	Promedio del número de raíces/estaca (\pm S)	Número de estacas	Concentración usada
IAA	2.7 \pm 2.7	30	5 mg/l
IBA	2.9 \pm 2.0	30	5 mg/l
IAA+5%	4.5 \pm 3.2	30	IAA=5mg/l 5%=0.3 μ l/l
IBA+5%	4.9 \pm 2.5	30	IBA=5mg/l 5%=0.3 μ l/l
5%	17.5 \pm 4.1	30	0.3 μ l/l

Tabla 2. Efecto de la fracción estimuladora del extracto de hojas de violeta africana combinada con auxinas sobre el enraizamiento de estacas de frijol mungo.

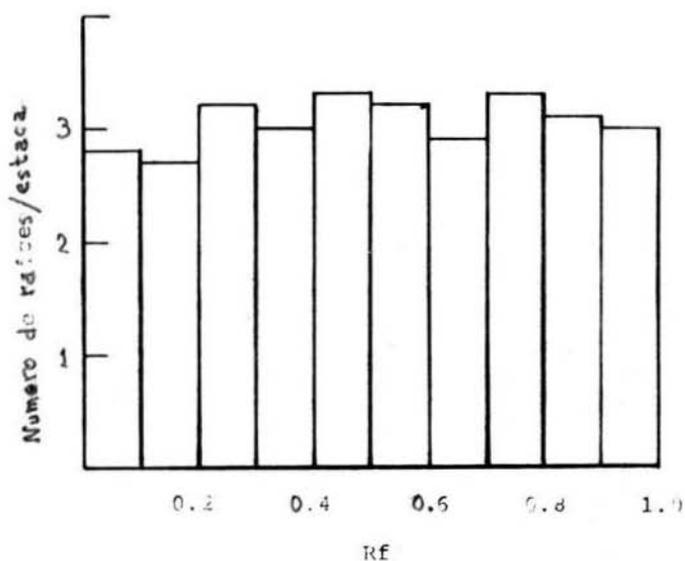


Figura 6. Relación entre el número de raíces formadas por las estacas de frijol mungo y las fracciones cromatográficas obtenidas del extracto metanólico de hojas de aguacate.

Material Vegetal utilizado	Fracción de acetato de etilo en hexano donde se recuperan los compuestos activos.	Revelado con p-anisaldehído ac. sulfúrico.	Rf
Hiedra inglesa juvenil	20%	colores café, negro y negro-morado	0.78-0.9
Violeta africana	5%	No se observan manchas con estas características	No aparecen manchas con este Rf.

Cuadro 1. Cuadro comparativo que muestra las características de los compuestos aislados por Heuser y Hess a partir de la hiedra inglesa juvenil (15) y los compuestos aislados en este trabajo de la violeta africana.

Discusión y Conclusiones

Los resultados obtenidos en la tabla 1 indican marcadamente, al someterlos al análisis de varianza y cuando $\alpha=0.01$, la existencia de uno o más factores que estimulan la formación de raíces en estacas de frijol mungo, en la fracción de acetato de etilo en hexano al 5%. Tomando en cuenta que el extracto proviene de una especie como la violeta africana y que tiene efecto sobre una especie tan diferente de ésta, se propone que estos factores deben ser sintetizados por diferentes especies vegetales, tal vez posean estructura química semejante y puedan ser activos sobre cierto número de plantas, lo que permite la posibilidad de que, una vez conocida su estructura química, sean sintetizados químicamente y utilizarlos para propagar vegetales cuyas estacas no forman fácilmente raíces y que no responden al tratamiento con auxinas.

En la figura 1 se puede observar que mientras más tiempo se mantuvo la fracción activadora del enraizamiento (5%) en refrigeración, se formaron menos raíces por estaca; este fenómeno sugiere que el o los factores aislados son de naturaleza inestable (característica semejante a la de los compuestos aislados por Heuser C.W. y Hess C.E. en 1972 (15)), probablemente sufran oxidación aún a temperaturas de 4°C y por este fenómeno se degradan, por lo que sería recomendable mantener los extractos a tem-

peraturas menores y encontrar aquella temperatura en que la actividad se mantenga a través del tiempo.

Si se observan los resultados de las cromatografías realizadas (figura 2), se puede notar que en ninguna fracción del extracto clorofórmico de la violeta africana aparecen ácido indol acético o ácido indol butírico, lo que indica que el o los factores que estimulan el enraizamiento no son, al menos, estas auxinas. Si se asocia esta observación con los resultados de la tabla 1, se puede decir que la fracción que promueve la formación de raíces secundarias no lo hace en función de que posea auxinas en niveles óptimos, ya que en las estacas de frijol mungo tratadas con auxinas a concentraciones óptimas (2) no hay un aumento significativo en el número de raíces formadas con respecto a los lotes control según el análisis de varianza a un nivel de significancia de 0.01. Si además de lo anterior consideramos el reporte de Hess C.E., 1961 (12) en donde se afirma que las auxinas no estimulan significativamente la formación de raíces en las estacas de frijol mungo, razón por la cual estas estacas pueden utilizarse para investigar la actividad promotora del enraizamiento de compuestos diferentes a las auxinas, podemos estar seguros que en el extracto de la violeta africana, los factores responsables del incremento en el enraizamiento no son auxinas.

Los resultados de la figura 3 indican que la fracción activa que promueve la formación de raíces secundarias (5%) actúa óptimamente a una concentración de 0.3 μ l/ml y por arriba o por abajo de ésta se obtiene un efecto menor, lo que hace a él o los compuestos activos funcionalmente semejantes a las auxinas, que también tienen una concentración óptima en la que actúan y aunque el sitio de acción pueda ser diferente entre las auxinas y estos compuestos, el mecanismo de acción debe ser similar.

Por otro lado, y a diferencia de la fracción estimuladora de la formación de raíces secundarias, la fracción de acetato de etilo en hexano al 10% tiene un efecto inhibitorio sobre la formación de raíces en las estacas de frijol mungo, siendo su efecto tal, que a mayor concentración de esta fracción se obtiene mayor inhibición; al menos dentro de los límites trabajados aquí (concentraciones de 0 a 1 μ l/ml).

El efecto obtenido en la fracción inhibitoria de la formación de raíces secundarias indica un mecanismo de acción diferente al de las auxinas o la fracción de acetato de etilo en hexano al 5%, por el hecho de no existir un nivel óptimo de acción, sino un incremento en ésta al incrementarse los niveles de la fracción de acetato de etilo en hexano al 10%.

La fracción del extracto de violeta africana que promueve la formación de raíces secundarias es semejante, en su consistencia oleosa y en su color amarillo, a las fracciones obtenidas a partir de peral Bartlett por Fadl M.S. y Hartmann H.T. (8) y por Hess C.E. (13) y Heuser C.W. y Hess C.E. (15) de hiedra inglesa. Sin embargo, la fracción de acetato de etilo en hexano en donde se recupera en este trabajo (5%) es diferente a la encontrada por Heuser C.W. y Hess C.E. (20%).

En cuanto a las propiedades cromatográficas, los compuestos aislados por estos autores son semejantes, mientras que el compuesto o los compuestos presentes en la fracción activa del extracto de violeta africana es diferente de ellos, como se puede observar en el cuadro 1; y aunque no se caracterizó el Rf del compuesto o compuestos activos aislados de la violeta africana, la evidencia de que son diferentes estriba en el hecho de que los compuestos caracterizados por Fadl M.S. y Hartmann H.T., Hess C.E. y Heuser C.W. y Hess C.E. no aparecen en el cromatograma.

La disminución en el número de raíces formadas por esta ca en los lotes tratados con auxinas (ácido indol acético o ácido indol butírico) + la fracción activa estimuladora del extracto con respecto a los lotes tratados únicamente con la fracción estimuladora, sugieren la participación de las auxinas como uno de los reguladores del proceso de formación de raíces se

cundarias, y tal vez en estos términos pueda explicarse la existencia de una concentración óptima de auxinas para cada planta. Tomando en cuenta que el proceso de formación de raíces secundarias involucra varias etapas (27), diferentes compuestos pueden influir sobre el desarrollo de cada etapa, y solo cuando todas ellas sean favorecidas, se formarán raíces; lo que a su vez depende de la existencia de estos compuestos en proporciones adecuadas. Si consideramos que en las fases de desarrollo de un primordio de raíz está involucrado el fenómeno de diferenciación celular que conduce a la formación de loci meristemáticos y meristemoides (primeros estadios en la formación de primordios de raíz) (27) y que para éste es fundamental la existencia de auxinas que favorecen el establecimiento de estos dos estadios (28); parece razonable pensar que al combinar la fracción activa del extracto con auxinas como el IAA (ácido indol acético) o el IBA (ácido indol butírico), se pudieron alterar las proporciones endógenas auxina:sustancia(s) activa(s) óptimas para la formación de raíces adventicias y así provocar un efecto semejante al observado por Smith D.R. y Thorpe T.A. en 1975, en Pinus radiata (28), donde los meristemoides proliferaron tanto, al ser tratados con auxinas en concentraciones supraóptimas, que se fusionaron, dificultándose así la organización para formar primordios de raíz. Por este efecto se concluye que la sustancia o sustan-

cias activas extraídas de la violeta africana no se comportan como los compuestos con núcleo fenólico que al combinarse con los núcleos indólicos de las auxinas, actúan sinérgicamente, como lo plantea Gorter C.J. en 1962(9); en este sentido podría establecerse semejanza con los cofactores que plantean Porlingis I.C. y Therios I. en 1976(24) o los compuestos aislados por Heuser C.W. y Hess C.E. en 1972(15) en donde se reporta la ausencia de núcleos fenólicos en las sustancias activadoras del enraizamiento. Con todo, sería recomendable determinar la presencia o ausencia de núcleos fenólicos en el o los compuestos aislados de la violeta africana por espectrofotometría.

En la tabla 1 se puede notar que además de existir sustancias que promueven el enraizamiento en el extracto de la violeta africana, existe una fracción (acetato de etilo en hexano al 10%) que inhibe la formación de raíces en las estacas de frijol mungo. La existencia de esta fracción puede obedecer a las siguientes razones:

La violeta africana es una planta de fácil enraizamiento que al parecer posee compuestos no auxínicos que inducen la formación de raíces secundarias. Si no existieran inhibidores en esta planta, la formación de raíces secundarias se verificaría continuamente y aparecerían éstas sin necesidad de cortar estacas, como ocurre en algunas plantas, como los álamos(36); pe-

ro en la violeta africana, este fenómeno no ocurre, tal vez porque los inhibidores que posee lo evitan; sin embargo, al cortar una estaca, al cabo de 4 a 6 semanas, ésta forma raíces secundarias. Este fenómeno puede deberse a que, de alguna manera, las raíces de la planta intacta produzcan algún compuesto que induzca a las hojas a formar este inhibidor. Cuando se corta la estaca, al no existir raíces, las hojas no producen el inhibidor y la estaca puede formar raíces secundarias, que dejan de formarse cuando el tejido radicular es suficiente como para formar una cantidad tal de compuesto que haga que las hojas sinteticen inhibidor en cantidades óptimas para evitar la formación excesiva de raíces secundarias. Para verificar el planteamiento anterior sería necesario comparar los niveles de inhibidor en extractos realizados a diferentes tiempos después de la obtención de la estaca y se esperaría un decremento en estos inhibidores a medida que transcurriera el tiempo. Aunado a esto se podrían eliminar raíces de la planta y realizar extractos de las hojas de ésta a diferentes tiempos de la eliminación de raíces y a diferentes cantidades de tejido radicular eliminado, esperándose el mismo efecto al aumentar la cantidad de tejido radicular eliminado o el tiempo de haberlo eliminado. En función del planteamiento anterior, algunos tipos de plantas difíciles de arraigar, pueden presentar dicha característica por la existencia de

niveles elevados de inhibidores semejantes a los aislados en este trabajo, como lo sugieren Fadl M.S. y Hartmann H.T. en 1967 (8), Meredith y colaboradores en 1970 (21), Tognoni F. y Lorenzi P. (35), Porlingis I.C. y Therios I. en 1976 (24) y Spiegel, P. en 1955 (30)

La fracción de acetato de etilo en hexano al 5% muestra estimulación significativa del proceso de formación de raíces secundarias; y aunque en el trabajo de Fadl M.S. y Hartmann H.T. se reportan incrementos del orden de 36 raíces por estaca y en el de Heuser y Hess de 30 raíces por estaca ambos en estacas de frijol mungo; y en la fracción activa de la violeta africana el incremento es menor (21.0 raíces por estaca); esto puede indicar que la potencia de la sustancia aislada en este trabajo es menor a la de dichos autores y/o que las condiciones experimentales en este trabajo no fueron las óptimas y/o que las fracciones activadora e inhibidora no se separaron completamente, tomando en cuenta que su solubilidad es semejante (una es más soluble en acetato de etilo en hexano al 5%; la otra en esta mezcla al 10%).

En cuanto al extracto metanólico de hojas de aguacate los resultados indican (tabla 1) la ausencia de sustancias que promuevan o inhiban el proceso de formación de raíces secundarias; ya que no existen diferencias significativas entre los lotes control y los lotes tratados con este extracto a un nivel de significancia de 0.01 con el análisis de varianza. Al fraccionar el

extracto metanólico por cromatografía en papel, las fracciones siguen careciendo de efecto sobre el enraizamiento de las estacas de frijol mungo. En función de esto se pueden plantear dos proposiciones:

a) La dificultad que presentan las estacas de aguacate para arraigar puede deberse a la ausencia de uno o más de los factores que activan el proceso de formación de raíces adventicias y tal vez debido a la carencia de sustancias de esta naturaleza, esta planta no necesita sintetizar inhibidores de este proceso o la capacidad para hacerlo depende de los niveles de activadores en la planta; no existiendo éstos, no existirán inhibidores. Aunque existen trabajos que reportan la existencia de inhibidores en plantas que presentan dificultad para arraigar (36), puede ocurrir que las plantas de difícil enraizamiento tengan diferentes mecanismos para regular la formación de raíces; algunas necesitarán sintetizar inhibidores, en función de que sinteticen continuamente activadores y evitar su acción; otras no sintetizarán activadores y por no haber necesidad de contrarrestar la acción de éstos, tampoco formarán inhibidores. La dificultad para formar raíces en las estacas de estas plantas, podría explicarse entonces ya sea por la carencia de activadores o por la presencia de inhibidores, cuya síntesis no pueda modificarse por las variables que están implicadas en la obtención de estacas.

b) La ausencia de activadores o inhibidores del enraizamiento en un extracto metanólico no indica la ausencia de estas sustancias en una planta; pudieran existir esos tipos de compuestos y no ser solubles en metanol; por lo que sería necesario realizar extractos con solventes de diferente polaridad de tal manera que pueda afirmarse con seguridad la presencia o ausencia de estos compuestos en el aguacate.

Además de las posibilidades planteadas en este trabajo, en cuanto a las leyes que rigen el proceso de formación de raíces secundarias, puede ocurrir que las estacas de algunas plantas presenten dificultad para formar raíces, debido a la ineffectividad de sus tejidos para responder a los factores involucrados en el fenómeno, como por ejemplo la síntesis deficiente de proteínas que puedan funcionar como receptores de los factores que estimulan el enraizamiento, tal vez semejantes a los factores proteicos que se unen a las auxinas caracterizados por Ryugo K. y Breen P.J. en 1974(26), o tal vez parecidos a los receptores proteicos encontrados en células animales que retienen las hormonas esteroides en los tejidos de los órganos blanco..

Bibliografia

- 1.- Bachelard, E.P. and Stowe, B.B. (1963) Aust. J. Biol. Sci., 16: 751-767.
- 2.- Bhattacharya, S. Bhattacharya, N.C. and Nanda, K.K. (1978) Physiol. Plant. 42: 391-394.
- 3.- Bhella, H.S. and Roberts, A.N. (1975) J. Amer. Soc. Hort. Sci. 100(6): 643-646.
- 4.- Bove, C. and Conn, E.E. (1961) J. Biol. Chem. 236 (1): 207-210.
- 5.- Cohen, M.A. (1978) J. Amer. Soc. Hort. Sci. 103(4): 483-484.
- 6.- Dorrell, D.G. (1974) Can. J. Plant Sci. 54: 197-201.
- 7.- Eggens, J.L., Hilton, R.J. and Loughheed, E.C. (1974) Can. J. Plant Sci. 54: 107-114.
- 8.- Fadl, M.S. and Hartmann, H.T. (1967 a) Plant Physiol. 42: 541-549.
- 9.- Gorter, C.J. (1958) Physiol. Plant. 11: 1-19.
- 10.- Haissig, B.E. (1970) Planta (Berl.) 95: 27-35.
- 11.- Hartmann, H.T. and Kester, D.E. (1968) Plant Propagation: Principles and Practices, 2nd ed. Englewood Cliffs N.J. Prentice Hall 263-333.
- 12.- Hess, C.E. (1961) Plant. Physiol. 36: (suppl.) xxi.
- 13.- Hess, C.E. (1961) Plant. Physiol. 36: (suppl.) xxi.

- 14.- Hess, C.E. (1964) In Nitsch, J.P., ed., Régulateurs Naturels de la Croissance Végétale, C.N.R.S., Gifs/Yvette. p 517-41.
- 15.- Heuser, C.W. and Hess, C.E. (1972) J. Amer. Soc. Hort. Sci. 97(5): 571-574.
- 16.- Iwazaki, K. and Weaver, R.J. (1977) J. Amer. Soc. Hort. Sci. 102(5): 584-587.
- 17.- Janick, J., Schery, R.W., Woods, F.W. and Ruttan, V. W. (1974) Plant Science. An introduction to world crops., 2nd ed. W.H. Freeman and Co., San Francisco, USA. pp 3-25.
- 18.- Kaiser, S. and Albaum, H.G. (1939) Amer. J. Bot. 26: 749-754.
- 19.- Kawase, M. (1964) Physiol. Plant. 17: 855-865.
- 20.- Lindermann, R.G. and Call, C.A. (1977) J. Amer. Soc. Hort. Sci. 102(5): 629-632.
- 21.- Meredith, W.C., Joiner, J.M. and Biggs, R.H. (1970) J. Amer.Soc. Hort. Sci. 95: 49-52.
- 22.- Mohammed, S. (1975) J. Hort. Sci. 50: 271-273.
- 23.- Newton, R.J. (1977) Amer. J. Bot. 64(1): 45-49.
- 24.- Porlingis, I.C. and Therios, I. (1976) J. Hort. Sci. 51: 31-39.
- 25.- Ricardo, C.P.P. (1976) Phytochemistry 15: 615-617.
- 26.- Ryugo, K. and Breen, P.J. (1974) J. Amer. Soc. Hort.

Sci. 99(3): 247-251.

27.- Smith, D.R. and Thorpe, T.A. (1975) J. Exp. Bot. 26
(91): 184-192.

28.- Smith, D.R. and Thorpe, T.A. (1975) J. Exp. Bot. 26
(91): 193-202.

29.- Smith, D.R. and Thorpe, T.A. (1976) Bot. Gaz. 137(2):
128-132.

30.- Spiegel, P. (1955) Rpt. 14th Int. Hort. Cong., pp 239-
246.

31.- Thimann, K.V. and Delisle, A.L. (1939) J. Arnold Arb.
20: 116-136.

32.- Thimann, K.V. and Delisle, A.L. (1942) J. Arnold Arb.
23: 103-109.

33.- Thimann, K.V. and Schneider, C.L. (1939) Amer. J. Bot.
26: 328-333.

34.- Tognoni, F., Kawase, M. and Alpi, A. (1977) J. Amer.
Soc. Hort. Sci. 102(6): 718-720.

35.- Tognoni, F. and Lorenzi, R. (1972) J. Amer. Soc. Hort.
Sci. 97(5): 574-578.

36.- Weaver, R.J. (1972) Plant Growth Substances in Agri-
culture. 1st ed. W.H. Freeman and Co., San Francisco, USA, pp
143-172.

37.- Wellhausen, E.J. (1976) Investigación y Ciencia 2:97-
109.