



Universidad Nacional Autónoma de México

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES IZTACALA

**“ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS EFECTOS
CAUSADOS POR AUXINAS Y COMPUESTOS
FENOLICOS SOBRE LA FORMACION DE RAICES
ADVENTICIAS EN ESTACAS DE FRIJOL MUNGO
(Phaseolus aureus Roxb)”.**

T E S I S

Que para obtener el título de:

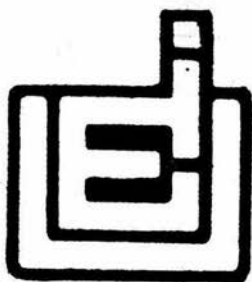
B I O L O G O

P r e s e n t a :

MARGARITA MORENO RAMIREZ

México, D. F.

1985





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 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.

A: mis:

Padres

Virginia y Joaquín

Hermanos

Ismael

Tómas

Jesús

Armando

Sergio

Compañeros del Plan Modular

Mi más sincero agradecimiento a todas las personas que hicieron posible la realización del presente trabajo, de manera especial al M. en C. Ignacio -- Peñalosa Castro.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Bio-regulación (L-511) de la Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala, bajo la dirección del M. en C. Ignacio Peñalosa Castro.

I N D I C E

	Pág.
Introducción y Antecedentes	1
Material y Métodos	7
Resultados	11
Discusión	25
Conclusiones	41
Bibliografía	42

INTRODUCCION

México cuenta en su territorio con una gran variedad de climas y suelos, permitiendo que un número de especies comercialmente importantes se desarrollen, tal es el caso de los árboles frutales como: aguacate, ciruela, durazno, guayaba, higo, lima, limón agrio y manzana, entre otros.

En 1982 estos frutales son cultivados en una superficie de 293 000 hectáreas, obteniéndose 2 753 000 toneladas de producción global con valor de 22 810 millones de pesos. Sin embargo aunque el número de hectáreas dedicadas al cultivo de ciruela, durazno, guayaba y manzana se ha aumentado o al menos mantenido, la producción ha disminuido en relación a 1981 (I. N.E.G.I., 1984).

Los métodos que actualmente se utilizan para aumentar la producción están basados en la aplicación de fertilizantes y plaguicidas en gran escala, las cosechas presentan alta contaminación con esos productos y esto repercute en la salud de los consumidores (Bovey y Young, 1980).

Una forma de solucionar estos problemas es la propagación asexual de aquellas plantas que presentan características de resistencia a plagas y gran adaptación a determinadas condiciones ambientales.

Al propagar una especie de forma vegetativa se tiene una mayor probabilidad de mantener las características genéticas

de la planta madre observándose además el mismo comportamiento bajo condiciones climáticas y edáficas similares, lográndose - de esta forma, una producción alta y uniforme. Este tipo de propagación se puede realizar por medio de hijuelos, estolones, estacas, esquejes, acodos y por cultivo de tejidos.

La reproducción asexual por medio de estacas es un método importante en la regeneración de grandes cantidades de materia les vegetales (Davis, Lazarte y Joiner, 1982).

La formación de raíces adventicias es el proceso de mayor relevancia durante la propagación por estacas. La capacidad de una planta para producir dichas raíces depende de diversos factores como: "...exceso de agua (Wample y Reid, 1975), nivel de oxígeno (Went, 1938), cantidad de nitratos (Drew et al. , 1975), carbohidratos (Veierskov et al., 1976), fenoles (Hess, 1962) y de los reguladores del crecimiento (Torrey, 1965; Street, 1969 y Hartman y Kester, 1975)..." (Fabijan, Yeung y Reid, 1981).

Dentro de los reguladores del crecimiento, las auxinas se consideran de forma general, responsables de la formación de - raíces adventicias (Haissig, 1970 y Wightman y Thimann, 1980) Sin embargo existen estacas de especies vegetales que no son - capaces de formarlas o lo hacen de manera tan limitada (Malo, 1970 y Bansal y Nanda, 1981) que no se pueden propagar vegeta tivamente aún después de aplicarles auxinas en dosis óptimas.

Esto aunado al poco conocimiento que se tiene acerca del

proceso por medio del cuál ocurre, ha impedido que la reproducción por estacas se desarrolle plenamente.

En la medida que se aumente el número de investigaciones sobre sustancias diferentes de auxinas capaces de inducir el enraizamiento y se conozca el mecanismo por medio del cuál actúan, los obstáculos que se presentan en la propagación por estacas serán superados.

En la literatura hay trabajos que reportan la existencia de sustancias extraídas de plantas de fácil enraizamiento que promueven la formación de raíces adventicias, algunas de estas sustancias parecen tener naturaleza fenólica (Heusser y Hess, 1972 y Peñalosa, 1980).

Los compuestos fenólicos constituyen el mayor grupo de productos secundarios vegetales, presentan gran variedad de estructuras, desde compuestos que contienen un simple anillo aromático hasta sustancias poliméricas complejas como taninos y ligninas (Wong, 1973). Una función de estos compuestos es, al menos en los estudios realizados in vitro, la regulación del crecimiento. Ya sea como inhibidores; por modificar el metabolismo de regeneración de energía en mitocondrias, reducir la tasa respiratoria y afectar el control respiratorio (Demos, Woolwine, Wilson y Mc Millan, 1977); promotores por presentar cierta similitud estructural con las auxinas (Wain y Taylor, 1965 y Farrimond. Elliott y Clack, 1980), promotores en siner

gismo con el ácido indol acético (AIA), inhibiendo o retrasando la actividad de la ácido indol acético oxidasa (AIA oxidasa) (Sondheimer y Griffin, 1963 y Lee, Starratt y Jevnikar, 1982) o bien favoreciendo la síntesis de AIA a partir de tripófano (Henderson y Nitsch, 1962).

La literatura con respecto a la actividad de un mismo compuesto es contradictoria pues puede actuar como inhibidor o --promotor del crecimiento, dependiendo de la concentración, especie y parte de la planta en estudio (Welander y Huntrieser, 1981).

Los compuestos fenólicos como cumarina (Jansson y Svensson, 1980), floroglucinol, cloridzina, floretina, ácido florético (James y Thurbon, 1981), catecol, ácido p-hidroxibenzoico, pirogalol, ácido salicílico, ácido cafeico, ácido antrañílico, ácido vainillico, fenol, α -naftol y β -naftol (Hess, -1962 y Roy y Roychoudhum, 1976 citados en Kling y Meyer, 1983) promueven la formación de raíces adventicias en diversas especies y sitios como: explantes de Glycine max, Malus pumila M9 y M26, segmentos de tallo de Phaseolus aureus, Acer saccharinum y Acer griseum.

Por otro lado, recientemente se ha manifestado que la formación de raíces adventicias involucra una serie de fases de diferenciación. Girouard, 1967 reconoce cuatro fases:

- 1.- Dediferenciación o remeristemación
- 2.- Organización de grupos de células (iniciales de raíz)

3.- Diferenciación de primordios de raíz y

4.- Elongación de raíces.

Y cada fase tiene diferentes requerimientos de sustancias del crecimiento (Davis y Joiner, 1980). También se tienen evidencias de que las auxinas provocan cambios metabólicos tales como: aumento en la síntesis de ácido desoxirribonucleico (ADN) (Melason y Trewavas, 1982) y de proteínas (Zurfluh y Guilfoyle, 1980). Estos son procesos necesarios para la reiniciación de la división celular.

Se sabe que la regulación del crecimiento ejercida por los compuestos fenólicos presenta algunas similitudes con la que realizan las auxinas en aspectos como: promoción de crecimiento, antagonizan el efecto inhibitorio (del crecimiento) causado por el ácido abscísico (ABA) (Ray et al., 1979) y promueven la formación de raíces adventicias.

Sin embargo no se ha esclarecido, en este último punto, el modo de acción de dichos compuestos, no se sabe si compuestos fenólicos con diferente estructura molecular son capaces de inducir de igual manera la formación de raíces adventicias, si afectan las mismas fases de diferenciación y provocan cambios metabólicos similares a los evocados con la aplicación de auxinas.

Con base en lo anterior, se intenta probar si: compuestos fenólicos como: ácido salicílico, difenilamina, difeniltiocarbazol, fenol, floriglucinol, hidroquinona, p-metilaminofenol--

sulfato, β -naftol, resorcinol y vainillina son capaces de promover la formación de raíces adventicias en el bioensayo con el frijol mungo (Phaseolus aureus Roxb). Si lo hacen, observar en qué fases de diferenciación actúan; los posibles cambios cuantitativos de ADN y proteínas, además en los patrones electroforéticos de las proteínas extraídas de estacas tratadas con los compuestos fenólicos. Y comparar estos efectos con los provocados con la aplicación de dos auxinas AIA y ácido indol butírico (AIB). Con el objetivo de contribuir al conocimiento sobre el mecanismo por medio del cuál actúan en el proceso de formación de raíces adventicias.

Considerando que en los vegetales se tienen algunas respuestas metabólicas similares con las auxinas y compuestos fenólicos probablemente por presentar estructuras moleculares parecidas, se puede pensar que, de los compuestos anteriormente mencionados, solo algunos inducirán la formación de raíces adventicias, dependiendo del mecanismo implicado en este proceso, si de alguna manera los fenoles interactúan con moléculas receptoras, enzimáticas o aumentando el nivel endógeno de AIA, la presencia de los grupos radicales, por los cuales pueden interactuar con dichas moléculas será determinante.

Con respecto a su efecto sobre las fases de diferenciación si están implicados en los mismos procesos que las auxinas, estimularán las primeras fases de diferenciación, de no ser así --afectarán fases posteriores.

Si los compuestos fenólicos actúan como las auxinas, aumentarán el contenido de ADN y proteínas, en extractos de estacas tratadas con los mismos y serán capaces de cambiar el patrón electroforético de dichas proteínas.

MATERIAL Y METODOS

Bioensayo

Semillas de frijol mungo (Phaseolus aureus) obtenidas de fuente comercial son esterilizadas superficialmente con hipoclorito de sodio al 20 % (solución comercial) durante 20 min, lavadas con agua corriente 24 hrs y germinadas en la oscuridad a 25°C.

Después de este tiempo las plántulas se decapitan inmediatamente por debajo de los cotiledones, pasadas 24 hrs se toman segmentos de 7 cm de longitud medidos desde en punto de decapitación (estos segmentos de hipocotilo, en el presente trabajo, se denominarán estacas aunque no exista desarrollo secundario) y se utilizan en los diferentes tratamientos (Modificado de Hess, 1961).

Los tratamientos consisten en la aplicación de auxinas o compuestos fenólicos a las siguientes concentraciones (en solución acuosa, exceptuando difenilamina que es insoluble en agua y se aplica en etanol al 1 %):

Acido indol acético	1×10^{-5}
Acido indol butírico	1×10^{-4}

Acido salicílico	}	$1 \times 10^{-3} - 1 \times 10^{-6}$
Difenilamina		
Difeniltiocarbazol		
Fenol		
Floroglucinol		
Hidroquinona		
p-Metilaminofenolsulfato		
β -Naftol		
Resorcinol		
Vainillina	}	

El lote control consiste en estacas tratadas con agua desti-
lada

Las estacas son puestas en tubos de vidrio de 1×10 cm, 4 es-
tacas por tubo con 4 ml de solución, cubriendo de 4 - 4.5 cm de
su zona basal. 40 estacas son utilizadas por tratamiento y re-
petidos al menos dos veces.

Después de 24 hrs con el tratamiento, las estacas se lavan
y mantienen con agua destilada por cinco días, pasados los cuã-
les se cuentan las raíces y/o primordios de raíz.

Cortes histológicos

De las estacas tratadas con los compuestos capaces de indu-
cir la formación de raíces adventicias, se toman tres por trata-
miento cada 24 hrs y su zona basal es fijada en FAA (formol:agua:

ácido acético; alcohol, 19:35:5:50), deshidratadas en series de alcohol (70, 80, 90, 96 y 100 %) y embebidas en parafina.

Se obtiene por medio de micrótomo, tanto secciones transversales como longitudinales que son teñidas con safranina y -verde rápido (Berlyn y Myksche, 1977) y se observan en un microscopio óptico Zeiss 10/0.20/60/ con lente X10, determinandóse en que fases de diferenciación se encuentran las estacas a los diferentes tiempos, de acuerdo a las establecidas por -- Girouard, 1967.

Patrones electroforéticos.

Extracción de proteínas. Los lotes de estacas tratadas con los compuestos fenólicos capaces de inducir el enraizamiento se homogenizan en un mortero con buffer Tris-HCl 50 mM pH 8.3 (1:1 p/v) (Jacobsen, 1982). El extracto es filtrado y centrifugado a 17 000 rpm por 2 hrs a 4°C, en una centrifuga ---- IEC B-20 A.

Las proteínas contenidas en el sobrenadante son dializadas contra agua destilada durante 24 hrs y cuantificadas por el método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando un espectrofotómetro SP 8-100 Pye unicam.

Electroforesis en geles de poliacrilamida. La electroforesis se realiza en tubos de vidrio de 12X0.5 cm, acrilamida al 2.62 % para el gel concentrador y de 7.5 % para el resolutivo y 100 μ m de pr-oteína por tubo, con una fuente de poder CAMAG.

En un sistema de corrida que contiene buffer Tris-glicina 0.1 M pH 8.3, como indicador azul de bromofenol y una corriente de - 2 mA hasta que el indicador llega al gel resolutivo, después se aumenta a 4 mA por tubo. Terminada la electroforesis los gels son removidos de los tubos y las proteínas fijadas con ácido tricloroacético (TCA) al 12 % por una hora, teñidos con una mezcla de azul de Coomassie al 1 % y TCA al 12 % 1:20 durante 12 hrs y desteñidos con lavadas de TCA al 10 % a 40°C (González y Peñalosa, 1984).

Extracción de ADN.

10 grs de estacas de cada tratamiento son maceradas en -- frío con mortero, en una solución amortiguadora que contiene - Tris-oxalato de amonio 0.01 M, sacarosa 0.03 M, MgCl 0.005 M y mercaptoetanol 0.005 M.

El homogenizado se congela 10 min, se descongela a chorro de agua y se filtra. El filtrado es centrifugado a 3 000 rpm durante 5 min y la pastilla resuspendida en 5ml de Tris 0.4 M pH 8.5, 5 ml de lauril sulfato de sodio al 2 %. 0.5 ml de EDTA salino, 1 ml de CSC (citrato de sodio 0.15 M y Na Cl 1,5 M), se homogeniza y se pasa a etanol frío, el ADN precipitado es -- redissuelto en 40 ml de una dilución de CSC 1: 1 000, se agrega NaCl suficiente para alcanzar una concentración 1 M, se añaden 40 ml de solución Savag (cloroformo-alcohol isoamílico 24:1) y se agita durante 15 min, la mezcla se centrifuga a 3 000 rpm

durante 5 min (Facultad de química, 1982), el ADN contenido en la interfase se disuelve en ácido perclórico y se cuantifica por medio de la reacción con difenilamina tal como describen - GILES y MYLERS (1965), usando ADN de timo de carnero en la elaboración de la curva patrón.

RESULTADOS

El número promedio de raíces formadas por efecto de la aplicación de AIA 1×10^{-5} M, AIB 1×10^{-4} M (estas concentraciones son reportadas como óptimas para esta especie por Jarvis y----- Booth, 1981 y Kling y Meyer, 1983) y los compuestos fenólicos - en un rango de concentraciones de 1×10^{-3} - 1×10^{-6} M se presentan en la figura I. En estos últimos el mayor número de raíces se obtiene a una concentración de 1×10^{-4} y 1×10^{-5} M, exceptuando fenol y floroglucinol (cuadro 1). A concentraciones más altas generalmente se produce necrosis de estacas.

El número promedio de raíces que se forman a la concentración donde se presenta mayor enraizamiento y su desviación estándar se presentan en la figura II.

En relación al lote control, floroglucinol, resorcinol, - hidroquinona y β -naftol promueven el enraizamiento en más de un 50 % lo mismo ocurre en estacas tratadas con la auxina AIB. Sin embargo p-metilaminofenolsulfato, difenilamina, difeniltiocarbazol y 2,4-dinitrofenol inhiben el enraizamiento entre un

10 a 80 % (ver figura III).

Se observa que existe cierta relación entre la estructura molecular de los compuestos fenólicos y el número de raíces -- que forman las estacas tratadas con los mismos. Los compuestos que presentan al menos dos grupos hidroxilos, (exceptuando β -naftol el cuál a su vez posee dos anillos aromáticos), - promueven el enraizamiento en más de un 50 %. Fenol y vainillina con un solo grupo promueven en un 30 y 60 % (ver cuadro 2).

Cuando los resultados del número de raíces formadas por estacas en cada tratamiento se someten a análisis de varianza con un nivel de significancia de 5 % se encuentran diferencias significativas entre el lote control, los lotes de estacas tratadas con las auxinas y los compuestos fenólicos.

Por medio de pruebas entre medias a postpriori se encuentran diferencias significativas entre: las dos auxinas; fenol, β -naftol y vainillina (un solo grupo hidroxilo) e hidroquinona y resorcinol (dos grupos hidroxilo).

Cortes histológicos.

Patrón de distribución. El patrón de distribución de -- raíces adventicias es altamente uniforme bajo todos los tratamientos y el lote control. Se presentan a lo largo de cuatro líneas situadas alrededor del hipocotilo (esquema 1).

Los cortes muestran que las raíces se forman a partir de células parenquimatosas localizadas entre dos pares de tubos -

de xilema. Alrededor del hipocotilo se presentan ocho de estos pares de tubos. '

El primer signo apreciable de iniciación de formación de raíces adventicias ocurre a las 24 hrs, a este tiempo las células presentan gran afinidad por safranina. Ocurriendo primero divisiones anticlinales seguidas por divisiones periclinales.

A las 48 hrs las células se encuentran ya organizadas como primordios de raíz y a las 72 hrs emergen de la epidermis.

El número de primordios de raíz es mayor en cortes obtenidos de estacas tratadas con AIB y floriglucinol.

Patrones electroforéticos

Se obtuvieron los patrones electroforéticos de las proteínas extraídas de las estacas tratadas con AIA, AIB, fenol, floriglucinol, resorcinol, vainillina y β -naftol, presentando similitud entre sí y con respecto al lote control (ver esquema 2).

Cuantificación de proteínas.

La cantidad de proteínas contenidas en los extractos de estacas tratadas con las auxinas y los compuestos fenólicos capaces de inducir la formación de raíces adventicias, muestran en su mayoría grandes diferencias en relación a la contenida en el extracto del lote control. Fenol y β -naftol duplican la cantidad; AIB, floriglucinol, hidroquinona y resorcinol la triplican (ver cuadro 3).

Cuantificación de ADN.

Contrariamente a lo observado en la cuantificación de proteínas, aquí no existen diferencias significativas en las cantidades de ADN contenido en el lote control y los diferentes tratamientos, lo más que se observa es un aumento de 0.66 mg en el extracto de estacas tratadas con floroglucinol con respecto al lote control. Los demás valores son muy similares (ver cuadro 3).

Relación número de raíces-cantidad de proteínas-cantidad de ADN

De manera general se puede establecer que de los lotes tratados con AIB, floroglucinol, hidroquinona y resorcinol hay un aumento en los parámetros anteriormente mencionados.

No. \bar{x} raíces/estaca

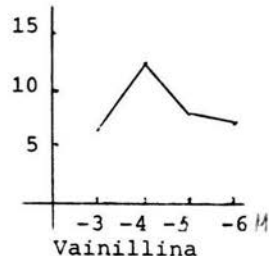
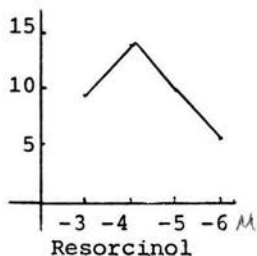
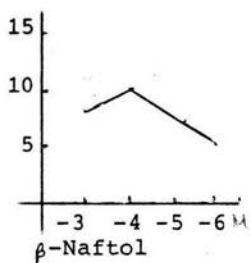
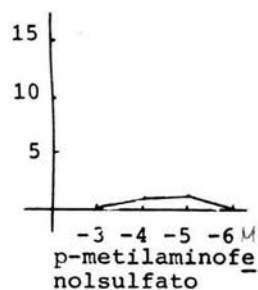
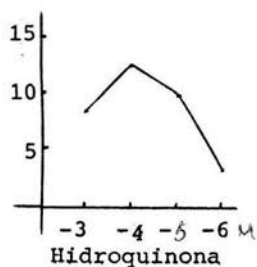
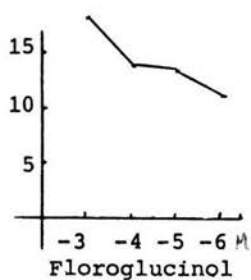
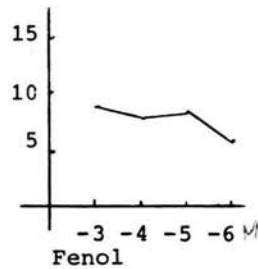
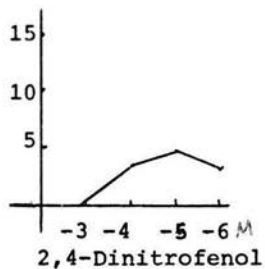
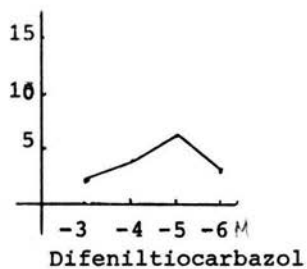
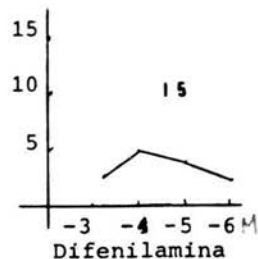
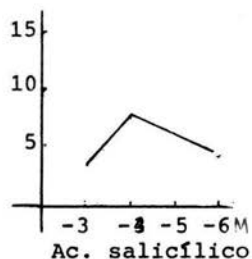
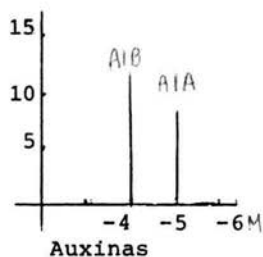


Figura I. Número de raíces promedio formadas/estaca por efecto de la aplicación de auxinas y compuestos fenólicos a varias concentraciones.

Compuesto	Concentración	No. \bar{X} de raíces/ estaca
Ácido indol acético	1×10^{-5} M	9.15
Ácido indol butírico	1×10^{-4} M	11.32
Ácido salicílico	1×10^{-4} M	7.80
Difenilamina	1×10^{-4} M	4.10
Difeniltiocarbazol	1×10^{-5} M	5.19
2,4-Dinitrofenol	1×10^{-5} M	5.90
Fenol	1×10^{-5} M	8.32
Floroglucinol	1×10^{-3} M	16.30
Hidroquinona	1×10^{-4} M	12.52
p-Metilaminofenolsulfato	1×10^{-5} M	1.13
p-Naftol	1×10^{-4} M	10.36
Resorcinol	1×10^{-4} M	14.35
Vainillina	1×10^{-4} M	10.66

Cuadro 1. Concentración óptima de los compuestos usados en este experimento en el enraizamiento de estacas de Phaseolus aureus y el número promedio de raíces formadas por estaca a dicha concentración.

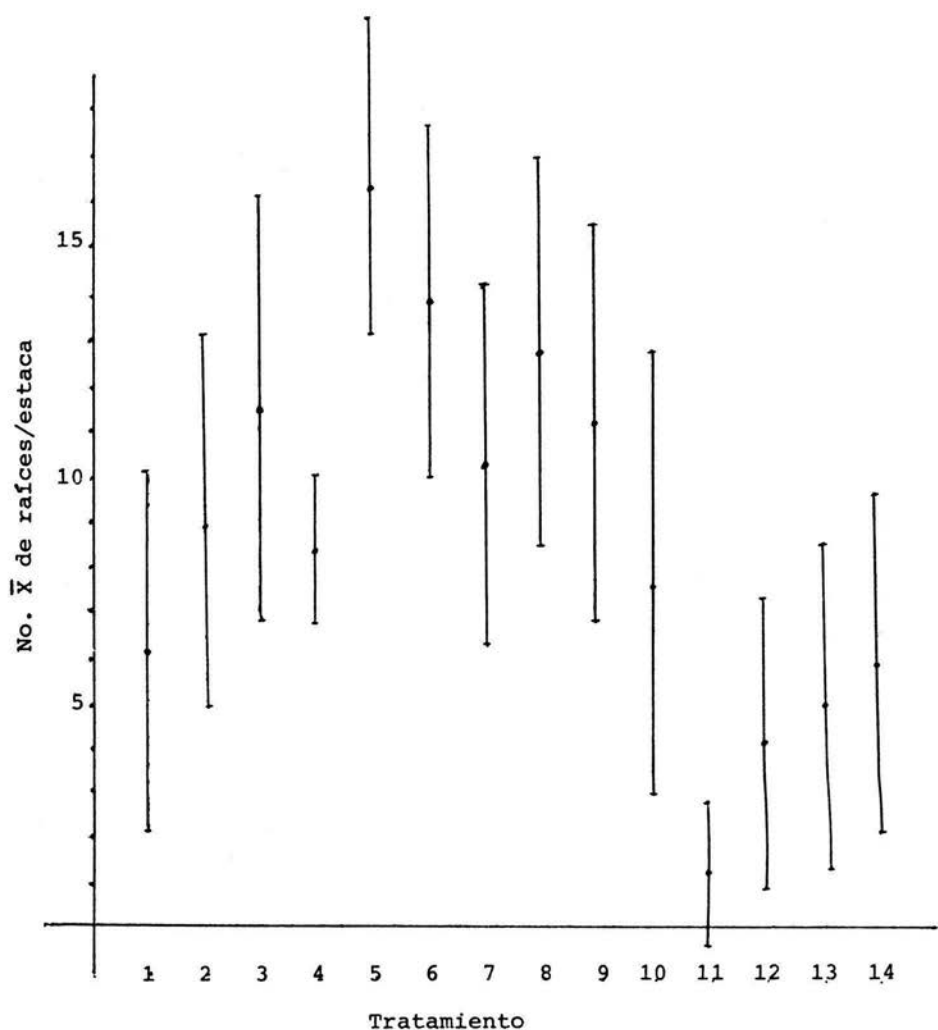


Figura II. El efecto de la aplicación de: 1) control, 2) AIA, 3) AIB, 4) Fenol, 5) Floroglucinol, 6) resorcinol, 7) β -naftol, 8) hidroquinona, 9) vainillina, 10) α -ác. salicílico, 11) p-metilaminofenolsulfato, 12) difenilamina, 13) difeniltiocarbazol, 14) 2,4-dinitrofenol. Observándose el número promedio de raíces/estaca y su desviación estándar.

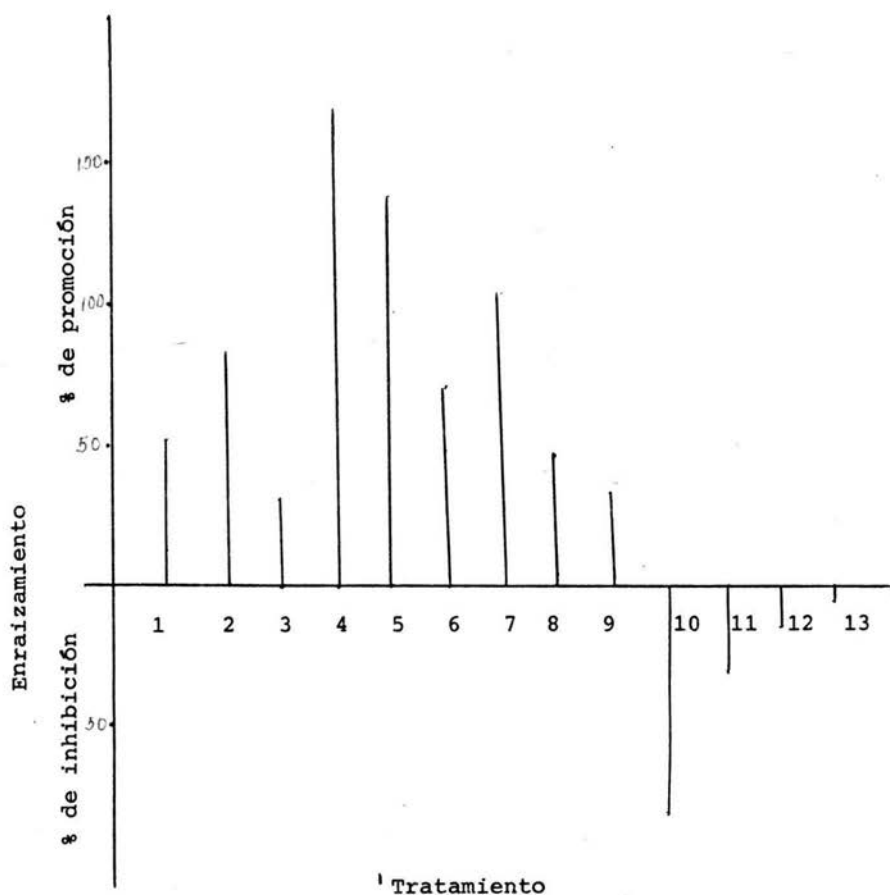
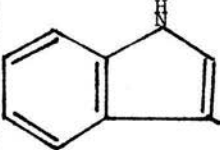

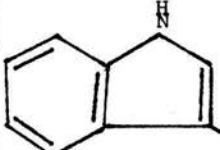
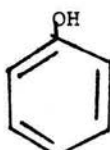
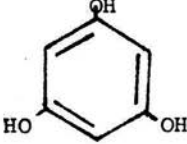
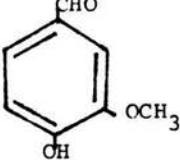
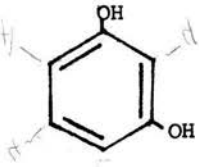
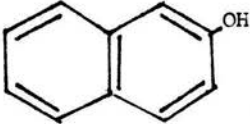
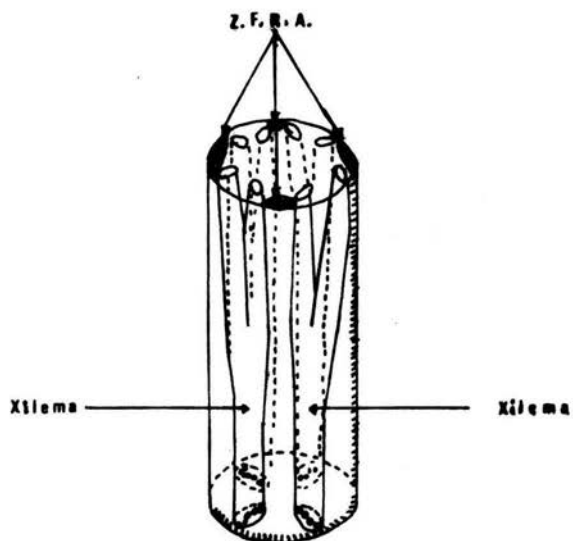


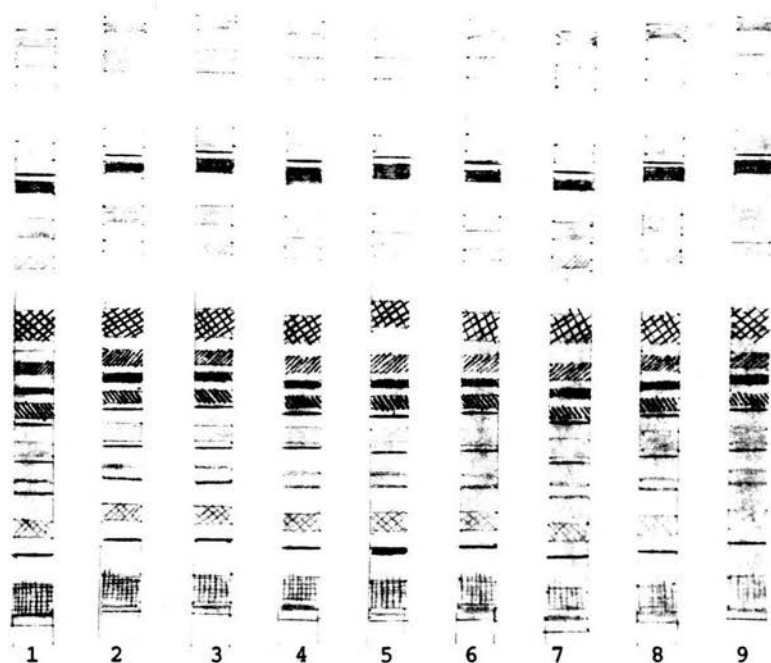
Figura III. Los porcentajes de promoción e inhibición del enraizamiento de estacas de Phaseolus aureus tratadas con: 1) AIA, 2) AIB, 3) fenol, 4) -- floroglucinol, 5) resorcinol, 6) β -naftol, 7) -- hidroquinona, 8) vainillina, 9) ác. salicílico, 10) p-metilaminofenolsulfato, 11) difenilamina, 12) difeniltiocarbazol y 13) 2,4-dinitrofenol, respecto al lote control (representado por la línea horizontal).

	% de enraizamiento		% de enraizamiento
 <p>Acido indol acético</p>	51.26	 <p>Hidroquinona</p>	106.9
 <p>Acido indol butírico</p>	85.45	 <p>Fenol</p>	37.5
 <p>Floroglucinol</p>	169.42	 <p>Vainillina</p>	56.19
 <p>Resorcinol</p>	136.69	 <p>β-Naftol</p>	71.19

Cuadro 2. Relación entre la estructura molecular de 2 auxinas y 6 compuestos fenólicos con el porcentaje de enraizamiento (promoción).



Esquema 1 Zona de formación de raíces adventicias (Z.F.R.A.) en estacas de Phaseolus. (tomado de Zamski et al., -- 1979)



Esquema 2. Patrones electroforéticos de las proteínas extraídas de estacas tratadas con:

- 1 Agua
- 2 AIA
- 3 AIB
- 4 Fenol
- 5 Floroglucínol
- 6 Resorcinol
- 7 Hidroquinona
- 8 β -Naftol
- 9 Vainillina

Tratamiento	No. de raíces \bar{X} / estaca	mg de proteína/ extracto	μ g de ADN/ extracto
Testigo	6.05	200	2.66
Ácido indol acético	9.15	540	3.16
Ácido indol butírico	11.32	620	3.26
Ácido salicílico	5.26	385	3.11
Fenol	8.32	400	3.12
Floroglucinol	16.30	630	3.32
Hidroquinona	12.52	625	3.21
β -Naftol	10.36	510	3.18
Resorcinol	14.35	600	3.12
Vainillina	10.66	360	3.02

Cuadro 3. Resumen de los datos obtenidos en este trabajo.

Número promedio de raíces formadas por estaca y cantidades de proteínas y ADN tratadas con: AIA, AIB, Fenol, Floroglucinol, Hidroquinona, β -Naftol y Vainillina a la concentración óptima.

Tratamiento	No. \bar{X} de raíces o primordios de raíz/estaca.	Elongación
Testigo	6.05	+
Ácido indol acético	9.15	-
Ácido indol butírico	11.32	-
Ácido salicílico	5.26	+
Fenol	8.32	+
Floroglucinol	16.30	-
Hidroquinona	12.52	++
β -Naftol	10.36	+
Resorcinol	14.35	++
Vainillina	10.66	+

Cuadro 4. Muestra que las auxinas y el floroglucinol aumentan el número de primordios de raíz, inhibiendo su elongación, mientras que algunos compuestos fenólicos - la favorecen (+ ligeramente y ++ fuertemente).

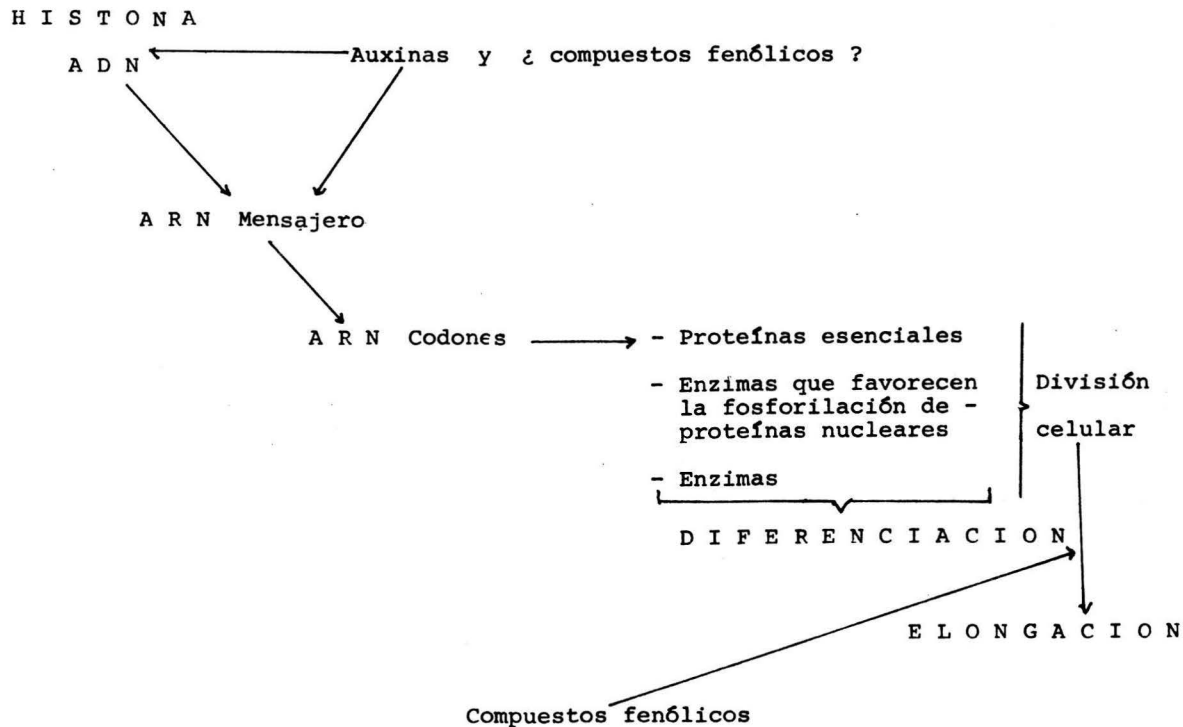


Figura IV. Probable forma de acción de los compuestos fenólicos sobre la formación de raíces adventicias.

DISCUSION

El rango de concentraciones óptimo para promover el crecimiento y el enraizamiento en diversas especies es de 1×10^{-3} M a 1×10^{-5} M según lo reportan varios autores para distintos compuestos fenólicos.

En el enraizamiento, la concentración reportada como óptima para catecol y pirogalol es de 1×10^{-4} M, en estacas de Phaseolus aureus, Acer griseum y Acer saccharinum (Kling y Meyer, 1983), en el presente trabajo se observa que esta concentración es la óptima para hidroquinona, β -naftol, resorcinol y vainillina en el enraizamiento de estacas de Phaseolus aureus; floroquinol actúa óptimamente a una concentración de 1×10^{-3} M en explantes de Malus pumila M9 y M26 y de manzana en fase juvenil (Welandier y Huntrieser, 1981). En el presente trabajo se obtuvo la misma concentración óptima para el enraizamiento de estacas de frijol mungo. Finalmente Ray et al., 1979, determinan el efecto de diversos compuestos fenólicos sobre la actividad inhibitoria del crecimiento producida por el ácido abscisico y observan que los ácidos; trans-cafeico, ferúlico, tánico y cumárico son capaces de antagonizar al máximo a 1×10^{-4} M. Los compuestos fenólicos; chalcona, morina, naringenina, quercetina y rutina lo hacen óptimamente a 1×10^{-5} M y a esta misma concentración, el fenol promueve óptimamente el enraizamiento del frijol mungo.

Se sabe que las auxinas AIA, AIB (en Phaseolus aureus) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (en Prunus avium) a 1×10^{-5} , 1×10^{-4} y 1×10^{-5} M respectivamente, tienen su máximo efecto en el crecimiento y el enraizamiento (Feucht y Schmid, 1980; Jarvis y Booth, 1981 y Kling y Meyer, 1983).

Los compuestos fenólicos promueven el crecimiento y el enraizamiento en las concentraciones que caen en el rango en el que:

- i) Se obtiene la máxima respuesta en bioensayos con auxinas
- ii) Las auxinas se presentan en tejidos vegetales (de Pisum sativum, Triticum aestivum, Zea mayz, Helianthus annuus, Lycopersicon esculentum y Hordeum vulgare)
- iii) Las hormonas presentan el máximo de respuesta fisiológica (Wightman y Lighty, 1982).

Por lo que desde este punto de vista pueden considerarse como hormonas o reguladores del crecimiento.

La similitud en rango de concentraciones donde las auxinas y los compuestos fenólicos tienen significancia fisiológica puede deberse, probablemente, a que esten implicados en eventos metabólicos similares.

Histología de raíces adventicias.

Patrón de distribución de raíces adventicias. Se observa que en la especie usada en este --trabajo, el patrón es altamente uniforme bajo todos los tratamientos (agua, auxinas y com

puestos fenólicos en diferentes concentraciones), sugiriendo - que la dediferenciación de las células y/o su subsecuente dife-
renciación a primordios de raíz ocurre en sitios determina-- dos, la saturación de este tejido con las auxinas y los compues-
tos fenólicos vía sistema vascular únicamente estimula dichas células. La predeterminación debe entenderse como sensibili--
dad de un tejido a compuestos involucrados en el enraizamiento (probablemente por la presencia de receptores para esos com---
puestos en dichos tejidos).

El tejido a partir del cuál las raíces adventicias se origi-
nan varía según la especie. En Lycopersicon esculentum se lo-
caliza entre el xilema y el floema (Byrne et al., 1975); en -
Helianthus annuus se originan a partir de parenquima interfasci-
cular cerca del floema (Fabijan et al., 1981); en el presente
trabajo se observa que las raíces se originan en medio de dos -
pares de tubos de xilema, mismo sitio es reportado para Phaseo-
lus vulgaris (Friedman et al., 1979).

El tiempo necesario para que aparezcan los primeros indi--
cios de formación de raíces adventicias, también es variable de-
pendiendo de la especie. En la especie usada para este expe-
rimento fue de 24 hrs, el mismo tiempo es reportado para otras
dicotiledóneas; hipocotilos de Helianthus annuus (Fabijan et
al., 1981), epicotilos de Vigna angularis (Mitsuhashi-Kato y
Shibaoka, 1981); y en la misma especie por Friedman et al., --
1982. Sin embargo en Lycopersicon esculentum aparecen a los

cinco días.

El primer indicio de iniciación de primordios de raíz es el aumento de afinidad de los núcleos y citoplasmas de las células diferenciadas por el colorante (Byrne et al., 1975).

Por otro lado, la existencia de varias fases en la formación de raíces adventicias se ha demostrado de diversas maneras:

- A) Por la aplicación de inhibidores metabólicos como la -- 5-bromodesoxiuridina (inhibidor de la incorporación de timidina al ADN) y cicloheximida (inhibidor de la síntesis de proteínas. Anzai (1975), aplica estos compuestos a hipocotilos de Phaseolus mungo y determina la existencia de por lo menos dos fases, una que es sensible a la aplicación de un inhibidor de la síntesis de - ARN y por lo tanto de proteínas y otra fase que es sensible a un inhibidor de la síntesis de ADN.
- B) Por la aplicación de auxinas y ácido giberélico de forma alternativa a varios tiempos (Sircar et al., 1974 en Davis y Joiner, 1980) y.
- C) Por la aplicación de los compuestos que actúan como sinergistas de las auxinas como la actinomicina D y 2,4-dinitrofenol, estos compuestos no incrementan el número raíces por sí mismos pero aumentan el efecto promotivo de las auxinas, por ejemplo favorecen la elongación de los primordios de raíz por inducir divisiones longitudinales (Mitsuhashi-Kato y Shibaoka, 1981).

Con base en los estudios anteriormente mencionados, se ha determinado que las auxinas promueven de manera específica las primeras fases de diferenciación, presentando inhibición en las fases posteriores. Particularmente en la elongación, se sabe que en los tallos y coleoptilos la favorecen, sin embargo en -- frutos, hojas y raíces la inhiben, siendo estas últimas sumamente sensibles a la inhibición (Leopold et al., 1975 y Davis y Joiner, 1980).

Según se muestra en el cuadro 4, existe un aumento en el número de primordios de raíz por estaca cuando éstas son tratadas con la auxina AIB y floriglucinol e inhibición de su elongación. Al parecer el floriglucinol actúa típicamente, como las auxinas, en las primeras fases de diferenciación. En las estacas tratadas con hidroquinona y resorcinol, el número de raíces no fue grande y sin embargo la elongación se estimuló, estos -- compuestos probablemente actúan de forma similar al ácido giberélico o a los sinérgicos de las auxinas pues al igual que ellos aumentan la elongación.

El sinérgico entre las auxinas y los compuestos fenólicos es ampliamente apoyado, las vías que se plantean para dicha interacción son diversas, de manera general, se propone que estos compuestos inhiban o aumenten la destrucción de AIA por la AIA oxidasa, la acción depende básicamente de su estructura molecular, los orto-difenoles inhiben la destrucción, los monofenoles la favorecen y compuestos como el ácido clorogénico incrementan

la producción de AIA a partir de triptófano (Henderson y Nitsch, 1962; Lee, 1980; Lee et al., 1980 y Möhiender y Nanda, 1981).

La relación entre la actividad de la AIA oxidasa y el enraizamiento es reportada por Bansal y Nanda (1981). Ellos utilizan plantas de fácil enraizamiento (Salix tetrasperma Roxb; Populus robusta Shneid e Hibiscus rosa sinensis Linn) y de difícil enraizamiento (Eucalytus citridora Hook) y determinan que S. tetrasperma y P. robusta presentan promoción de enraizamiento y actividad de AIA oxidasa altas, concluyen que la inhibición de esa enzima puede causar inhibición del enraizamiento cuando el nivel endógeno AIA es supraóptimo, pero causar promoción cuando el nivel es óptimo o subóptimo.

Con base en esto se podría considerar que el nivel auxínico endógeno de estacas de Phaseolus aureus es supraóptimo pues algunos de los compuestos usados son monofenoles (fenol, β -naf_{tol} y vainillina) que ayudan a la destrucción de AIA y promueven el enraizamiento. Sin embargo se aplican difenoles y un trifenol y a medida que se aumenta el número de grupos OH en el anillo aromático aumenta el enraizamiento, lo que indica que no todos los difenoles inhiben la actividad de la AIA oxidasa o bien que esta no sea la única vía de acción de los compuestos fenólicos.

No obstante es indudable el hecho de que un factor determinante en el proceso de formación de raíces adventicias es el ba

lance de los reguladores del crecimiento endógenos (Eliasson, 1981).

Cuantificación de proteínas.

El aumento en la síntesis de proteínas como resultado de la aplicación de auxinas a tejidos vegetales es reportada ampliamente (Zurfluh y Guilfoyle, 1980 y 1982). En el presente trabajo se encontró que, en el extracto proteico obtenido de estacas tratadas con la auxina AIB aumentó tres veces la cantidad de proteínas con respecto al extracto del lote control, lo mismo ocurre con los extractos de estacas tratadas con floriglucinol, hidroquinona y resorcinol. Feucht y Schmid, 1980 , determinan un aumento en la cantidad de proteínas en segmentos de brotes de Prunus avium cuando son tratados con catequina y ácido clorogénico, esta observación conduce a pensar que tanto las auxinas como los compuestos fenólicos aumentan la cantidad de proteínas en tejidos vegetales cuando son tratados con ellos. Como ya se mencionó las auxinas promueven la síntesis de proteínas y con respecto a los compuestos fenólicos no se sabe si actúan de la misma forma o si inhiben la proteólisis.

Patrones electroforéticos

La lista de artículos que mencionan la capacidad de las auxinas para cambiar el patrón de las proteínas sintetizadas por los tejidos vegetales tratados con las mismas es grande:

Melason y Trewavas, (1982), aplican 2,4-D a secciones de tubérculos de Helianthus tuberosus y encuentran un aumento en la síntesis de las proteínas nucleares y citoplasmáticas, en las primeras también se observa la aparición de nuevas proteínas -- fosforiladas, este evento tiene gran importancia en la división celular. En algunos embriones se observa que cuando aparecen nuevas proteínas fosforiladas la división aumenta (Trewavas, - 1979 y Chapman et al., 1974 en Melason y Trewavas, 1982) aquí también se reporta una estrecha relación entre la presencia de una proteína fosforilada y la inhibición de crecimiento en Lemna. Además por medio de electroforesis bidimensional en geles de -- poliacrilamida determinan la presencia, en tejidos tratados, - de una proteína con pI aproximado de 5.1 y pm de 110 000 daltons esta no aparece en tejidos sin tratamiento, a medida que se aumenta el tiempo de tratamiento las diferencias se van acentuando, cuando éste dura 21 hrs (a este tiempo la síntesis de ADN empieza) surgen hasta 40 proteínas nuevas.

En el trabajo anteriormente citado se concluye que las diferencias se presentan en proteínas nucleares mientras que en las citoplasmáticas no.

Zurfluh y Guilfoyle (1980), también reportan diferencias en los patrones electroforéticos de las proteínas presentes en hipocotilos de Glycine max como resultado de la aplicación de 2,4-D, ellos dividen los hipocotilos en tres secciones: basal, intermedia y superior. Cuando utilizan la técnica de electro-

foresis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio no encuentran diferencias en las proteínas extraídas de los segmentos basales y superiores de hipocotilos tratados y no tratados, mientras que en los segmentos intermedios determinan la presencia de varias diferencias, especialmente en el rango de 80 000-100 000 daltons (pm aproximado al citado en el primer trabajo).

Meyer et al., 1981 mencionan la posibilidad de que las auxinas provoquen la aparición de polipéptidos específicos, repriman algunos otros o bién modifiquen su carga.

Se han observado algunos cambios en el patrón electroforético de las proteínas sintetizadas como resultado de la aplicación de compuestos fenólicos a tejidos vegetales por Feucht y Schmid (1980), ellos por medio de la técnica de enfoque isoeléctrico encuentran la aparición de nuevas proteínas en segmentos de Prunus avium tratados con catequinas y ácido clorogénico, -- principalmente en el rango de pH 4.5-5.5 (5.1 es el reportado para la nueva proteína sintetizada por la aplicación de 2,4-D).

En el presente trabajo no se encuentran diferencias en los patrones electroforéticos de las proteínas extraídas de estacas tratadas con auxinas, compuestos fenólicos y lote control, los resultados (aparentemente contradictorios) obtenidos se deben a que :

- a) En los trabajos anteriores usan técnicas electroforéticas como enfoque isoeléctrico y en algunos casos bidi--

- mensional, en este trabajo se uso electroforesis en geles de poliacrilamida en una dimensión, la cuál no tiene gran poder resolutivo (Zurfluh y Guilfoyle, 1980).
- b) Los tejidos que utilizan presentan alta actividad mitótica. Como mencionan Melason y Trewavas, los cambios metabólicos durante la división celular no son evidentes pues ocurren únicamente en células específicas, cuando se usa todo el tejido las diferencias no se detectan pues predomina un panorama de no división (aquí se realizó el extracto toda la estaca). Y
- c) Las grandes diferencias se observan principalmente en -- proteínas nucleares y no en las citoplasmáticas y en el presente trabajo se uso una técnica de extracción para proteínas citoplasmáticas.

Para determinar si existen diferencias en las proteínas sintetizadas por las estacas de frijol mungo, cuando son tratadas con auxinas y compuestos fenólicos entre si y con respecto al lote control, es necesario usar alguna de las técnicas ya mencionadas, los extractos proteícos deben realizarse de ser posible, del tejido que se diferencia en raíces y ser de tanto proteínas nucleares como citoplasmáticas.

Por otro lado, la síntesis de proteínas por tejidos vegetales como resultado de la aplicación de auxinas, tiene gran relevancia fisiológica, se han sugerido varios procesos metabólicos involucrados: Zurfluh y Guilfoyle, (1980) sugieren que es

tas proteínas puedan ser limitadoras o esenciales para el crecimiento. Trewavas, (1980) demuestra, aplicando 2,4-D a secciones de tubérculos de alcachofa, la unión de auxinas de forma específica con una fracción cruda de membrana y este evento conduce a la aparición de proteínas con elevada afinidad por las auxinas, dichas proteínas se asocian a la cromatina y disparan la transcripción de genes particulares, induciendo la división celular. Y por último, Melason y Trewavas, (1982) citan la importancia de la fosforilación de las proteínas nucleares por efecto de la aplicación de 2,4-D (mencionadas anteriormente).

Cuantificación de ADN

Las auxinas inducen el crecimiento y la división celular vía dos procesos bien definidos, evocando:

- 1.-Una respuesta rápida mediada por la secreción de protones al espacio existente entre la membrana y la pared celular, originando la degradación de los polimeros de esta última (Terry y Jones, 1981 y Prat y Goldberg, 1984). Y.
- 2.-Una respuesta a largo plazo y de gran duración para la cuál se requiere de la de la síntesis de ácidos nucléicos y como consecuencia de proteínas (Schuster y Davis, 1983 y Veluthambi y Polvaiah, 1984).

Yajima et al., 1980 y Melason y Trewavas, 1982 reportan un aumento en la síntesis de ADN por efecto de la aplicación de 2,4-D a discos de tubérculos de Helianthus tuberosus. En el -

presente trabajo no se observaron diferencias en la cantidad de ADN extraído de las estacas tratadas con auxinas y compuestos fenólicos con respecto al extraído de las estacas del lote control, lo más probable es que la técnica usada para la extracción no tenga gran rendimiento por que exista pérdida durante su aplicación. Además el extracto se realizó de todo el tejido y el que se encuentra en mitosis es mínimo.

Patrón de distribución de raíces adventicias.

En hipocotilos de Phaseolus vulgaris existen cuatro líneas a lo largo de las cuáles se forman las raíces adventicias este tejido presenta gran afinidad por las auxinas (Friedman et al., 1979). En el presente trabajo también se observa que este tejido origina las raíces adventicias en estacas de Phaseolus aureus y no solo es sensible a las auxinas sino también a algunos compuestos fenólicos como floroglucinol, hidroquinona y resorcinol. Trewavas, (1981) menciona que el término sensibilidad se refiere a la capacidad de un tejido para responder a una hormona y se caracteriza por saturarse cuando se aumenta la concentración de forma logarítmica (de la hormona), en este trabajo se observa que los compuestos fenólicos tienen un efecto promotivo sobre el enraizamiento a la concentración en la cuál el AIA lo tiene (este último es considerado como una fitohormona). Las bases moleculares de la sensibilidad se desconocen pero se observa la existencia de proteínas específicas capaces de actuar

como receptores de hormonas en los tejidos sensibles. Diversos reportes en la literatura mencionan la existencia de proteínas que unen de forma específica auxinas *in vitro*, estas proteínas se han aislado de membrana (en coleoptilos de maíz, Kende y Gardner, 1976; Hertel et al., 1971; Hertel et al., 1972; 1980, en raíces de avena, Bhattachatyia et al., 1980, tabaco, Oostrom et al., 1975 citados en Rubery, 1981).

El hecho de observar la existencia de proteínas capaces de unir específicamente auxinas conduce a pensar que estas últimas deben tener ciertas características estructurales que les permitan interactuar con los receptores. Se han propuesto algunas teorías acerca de la relación estructura molecular-actividad auxínica. Thimann y Leopold, (1955 citados en leopold et al., 1975) proponen que exista unión del sitio activo del receptor y el anillo aromático. Thimann y Leopold, (1955 citados en Katar, 1979) postulan que la unión se lleva a cabo por la presencia en la auxina, de una carga negativa y otra positiva separadas 5.5 Å una de otra, en el caso del AIA la carga negativa está dada por el grupo carboxilo ionizado y la positiva por el grupo amino. Sin embargo Wightman y Lighth, (1982) demuestran la existencia de moléculas como el ácido fenilacético que tiene actividad auxínica superior al AIA y no es una auxina indólica, - demostrando que el indol no es necesario, (además también existen diversas auxinas sintéticas no indólicas como el 2,4-D) y si el anillo aromático, pero la actividad depende principalmen-

te de los grupos unidos al mismo (Wain y Taylor, 1965).

En el presente trabajo se observa que al aumentar el número de grupos hidroxilo en el anillo aromático, el porcentaje de enraizamiento aumenta, si suponemos que este efecto se deba a la interacción de estos compuestos con moléculas receptoras, se puede pensar que existen algunos compuestos fenólicos que pueden actuar como hormonas. Trewavas, (1981) cita la existencia de dos requisitos para considerar a una molécula como hormona:

- 1.- La biosíntesis de la sustancia reguladora ocurra a distancia del lugar de acción.
- 2.- El control esta dado por cambios en la concentración.

Algunos de los datos que muestran la posibilidad de que los compuestos fenólicos actuen como hormonas son: la biosíntesis ocurre en los brotes (Feucht y Schmid, 1980) y tienen efecto en hipocotilos; presentan el máximo de enraizamiento a la -- concentración que lo hacen las auxinas (consideradas como hormonas por Haissig, 1979) y son capaces de antagonizar el efecto de la hormona que inhibe el crecimiento (ABA), según se sabe, dicho efecto solo lo presentan las hormonas promotoras del crecimiento (Ray et al., 1979).

De las proteínas receptoras, no se sabe si; sirvan de acarreadoras, si el complejo auxina-receptor tenga valor en la replicación (Roy y Biswas, 1977) o ambas cosas. Pero se sabe que existe una estrecha relación entre las auxinas-síntesis de

proteínas-diferenciación celular-división celular-elongación.

Se han propuesto algunos mecanismos que explican el efecto de las auxinas en la diferenciación celular, los cuáles pueden tener similitud con el efecto de algunos compuestos fenólicos - pues ambos son capaces de influir de igual manera en diversos eventos metabólicos (promueven el crecimiento, inducen la formación de raíces adventicias y contra-restan el efecto inhibito--rio del crecimiento causado por ABA).

Yajima et al ., 1980 proponen que las auxinas disocian el complejo ADN-histona, ellos reportan que el 2,4-D a concentraciones relativamente altas solubilizan la cromatina de tejidos de Helianthus tuberosus in vitro. Las histonas se acidifican permitiendo la disociación. Se plantea que el complejo ADN-histona tenga acción represora de ciertos genes implicados en la dife--renciación celular, cuando el complejo se disocia aumenta la --síntesis de ADN.

Otros autores plantean que las auxinas actúan sobre el ARN adhiriendóse a un locus particular de la cadena y de esta forma tiene valor en la replicación (Rojas, 1980).

Cualquiera que sea la forma inicial de acción de las auxi--nas, el resultado es la síntesis de proteínas, efecto similar al causado por algunos compuestos fenólicos.

En la figura IV se muestra la posible relación entra las auxinas y probablemente los compuestos fenólicos, en la diferen--ciación celular.

Con los resultados obtenidos en el presente trabajo no se puede determinar si los compuestos fenólicos actúan sobre el ADN, se puede suponer que sí pues se observa un aumento en la cantidad de proteínas presentes en los extractos obtenidos de estacas tratadas con los mismos pero no se puede afirmar ya que podrían estar implicados en un mecanismo que impida su degradación.

Por otro lado, el efecto de los compuestos fenólicos sobre el enraizamiento puede realizarse a través de otros eventos como son:

- 1.- Regulando el nivel auxínico endógeno vía AIA oxidasa (Bansal y Nanda, 1981).
- 2.- Facilitando el paso de agua y otras moléculas a través de la membrana (por medio de la unión de sus grupos hidrofílicos a la membrana y de esta manera incrementar la permeabilidad pasiva) (Feucht y Schmid, 1980).
- 3.- Formando conjugados con el AIA endógeno, biológicamente más activos que AIA (Cohen y Bandvski, 1982).

CONCLUSIONES

Algunos compuestos fenólicos son capaces de inducir la formación de raíces adventicias en el bioensayo con frijol mungo. La concentración a la que tienen un efecto promotivo es la reportada como óptima para las auxinas. Existe una estrecha relación entre el número de grupos hidroxilo presentes en el anillo aromático de los compuestos fenólicos y la promoción del enraizamiento, a mayor número de grupos OH mayor enraizamiento.

No todos los compuestos fenólicos intervienen en las mismas fases de diferenciación, el floroglucinol estimula las primeras fases de diferenciación, mientras que hidroquinona y resorcinol favorecen la elongación.

Los compuestos fenólicos aumentan la cantidad de proteínas contenidas en los extractos de estacas tratadas con ellos, (dato similar se observa con la auxina AIB) pero no se sabe si es producto de síntesis o únicamente evitan su degradación.

Una forma de determinar cuál es el mecanismo implicado sería observar cambios en los patrones electroforéticos de las proteínas extraídas de las estacas tratadas con agua, auxinas y compuestos fenólicos, sin embargo las técnicas usadas no permitirían realizar esta observación, por lo que es necesario se realicen más estudios usando técnicas de mayor poder resolutivo además de realizar la extracción del tejido que se diferencia.

B I B L I O G R A F I A

- 1.-ANZAI, T.; 1975. J. Exp. Bot., 26: 580-588.
- 2.-BANSAL, N. y K.K. NANDA; 1981. Experientia, 37: 1273-1274.
- 3.-BERLYN, Y. y MIKSCHKE; 1977. Press The Iowa State University, Ames Iowa; pp. 97-98.
- 4.-BOVEY, R. y YOUNG; 1980. Ed. John Wiley & Sons USA pp. 75-87.
- 5.-BRADFORD, M.; 1976. Anal. Biochem., 72: 284-256.
- 6.-BYRNE, J., COLLINGS. P.F. CASHAU y L.H. AUNG; 1975. Amer. J. Bot., 62: 731-737.
- 7.-COHEN, J., y R.S. BANDVSKI; 1982. Ann. Rev. Plant Physiol., 13: 731-737.
- 8.-DAVIS, F. jr y J.L. JOINER; 1980. J. Amer. Soc. Hort Sci., 105: 91-95.
- 9.-DAVIS, F. Jr, J.E. LAZARTE y J.L. JOINER; 1982. Amer. J. Bot., 69: 804-811.
- 10.-DEMOS, E., M. WOOLWINW, R.H. WILSON y McMILLAN; 1975. Amer. J. Bot., 62: 97-103
- 11.-ELIASSON, L.; 1981. Physiol. Plant. 51: 23-26.
- 12.-FABIJAN, D., E. YEUNG, I. MUKHERJEE y D.M. REID; 1981. --
Physiol. Plant. 3:578-588.
- 13.-FACULTAD DE QUIMICA; 1982. U.N.A.M.
- 14.-FARRIMOND, J., M.C. ELLIOTT y D.W. CLACK; 1980. Phytochemistry, 19: 367-371.

- 15.-FEUCHT, W. y P.P&S. SCHMID; 1980. Physiol. Plant., 50: 309-313.
- 16.-FRIEDMAN, R., S. ALTMAN y E. ZAMSKI; 1979. J. Exp. Bot., -- 30: 769-777.
- 17.-FRIEDMAN, R., S. ALTMAN y V. BACHARACH, 1982. Plant. Physiol.,
- 18.-GIROUARD, R.; 1967. Can. J. Bot., 45: 1877-1881.
- 19.-GLILES, K. y A. MYLERS; 1965. Nature, (4979): 43.
- 20.-GONZALEZ, S. e I. PEÑALOSA; 1984. E.N.E.P. Iztacala, U.N.A. M.
- 21.-HAISSIG, B.; 1970. Planta, 95: 27-35.
- 22.-HAISSIG, B.; 1979. Physiol. Plant., 47: 29-33.
- 23.-HENDERSON, J. y S.P. NITSCH; 1962. Nature, 196: 780:782.
- 24.-HESS, Ch.; 1961. Proc. Plant Physiol Meed 36 sup. xxi.
- 25.-HEUSER, Ch. y Ch. HESS; 1972. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 97
- 26.-I.N.E.G.I.; 1984. Ed. Tallers de la Dirección General de -- Integración y Análisis de Información. México. p. 8-9.
- 27.-JACOBSEN, H-J; 1982. Physiol. Plant. 56: 161-167.
- 28.-JAMES, D. e I. THURBON; 1981. Z Pflanzen. Physiol., 105: 2265-2271.
- 29.-JANSSON, E. y S-B. SVENSSON; 1980. Physiol. Plant., 48: -- 486-490.
- 30.-JARVIS, B. y A. BOOTH; 1981. Physiol. Plant. 53: 312-218.
- 31.-KATEKAR, G. ; 1979. Phytochemistry, 18: 223-233.
- 32.-KLING, G. y M. MEYER; 1983. Hort Science, 18: 352-354.
- 33.-KUCH, D. y R. WILSON; 1977. Ann. Bot., 21: 1041-1042.

- 34.-LEE, T.; 1980. Plant. Physiol., 50: 107-112.
- 35.- A.N. STARRATT y J.J. JEVNIKAR. 1982. Phytochemistry, 21: 517-523.
- 36.- y STOESSL. 1980. Phytochemistry, 19: 2277-2280.
- 37.-LEOPOLD, A. y P.E. KRIEDEMANN; 1975. McGraw-Hill. Nueva York. pp. 108-135 y 145-222.
- 38.-MALO, S.; 1970. Prop. Trop. Reg. XVIII Ann. Mtg. Am. Sci.- 14: 165-173.
- 39.-MELASON, D., y TREWAVAS; 1982. Plant Cell Environment, 5: 53-64.
- 40.-MEYER, Y. y Y. CHARTIER; 1981. Plant Physiol., 68:11276- 1278.
- 41.-MITSUHASHI-KATO, M. y H. SHIBAOKA; 1981. Plant Cell Physiol,
- 42.-MOHIENDER y NANDA; 1981. Physiol. Plant., 53: 540-542.
- 43.-PEÑALOSA, I.; 1980. Tesis U.N.A.M., E.N.E.P. Iztacala.
- 44.-PRAT, R. y R. GOLDBERG; 1984. Physiol. Plant. 61: 52-57.
- 45.-RAY, S., K.N. GURUPRASAD y M.M. LALORAYA; 1979. J. Exp. Bot., 31: 1651-1656.
- 46.-ROJAS, M.; 1980. 2 ed. Mc. Graw Hill. p. 158-175.
- 47.-ROY, P. y B.B. BISWAS; 1977. Biochem. Biophys. Research Comm. Comm., 74: 1579-1616.
- 48.-RUBERY, P.; 1980. Ann. Rev. Plant. Physiol., 32: 569:596.
- 49.-SCHUSTER, A. y E. DAVIS; 1983. Plant. Physiol., 73: 822 - 827.

- 50.-SONDHEIMER, E. y D. GRIFFIN; 1963. Science, 131: 672. -
- 51.-TERRY, M. y R.L. JONES; 1981. Physiol. Plant., 68: 59-64.
- 52.-TREWAVAS, A.; 1980. Phytochemistry, 19: 1303-1308.
- 53.-TREWAVAS, A.; 1981. Plant Cell Enviroment, 4: 203-228.
- 54.-VELUTHABMI. K. y B.W. POLVAIAH; 1984. Plant Physiol., ----
75: 349-373.
- 55.-WAIN, R. y H. TAYLOR; 1965. Nature, 207: 167-169.
- 56.-WELANDER, M. e I. HUNTRIESER; 1981. Physiol. Plant., 53: --
- 57.-WIGHTMAN, F. y D.L. LIGHTY; 1982. Physiol. Plant., 55: 17-24.
- 58.-WIGHTMAN, F. y K. THIMANN; 1980. Physiol Plant., 49:13-20.
- 59.-WONG, E.; 1973. Vol. 1 Academ. Press. Londres. pp. 265-322.
- 60.-YAJIMA, Y., T. YASUDA y Y. YAMADA; 1980. Physiol. Plant.,
- 61.-ZURFLUH, L. y T. GUILFOYLE; 1980. Proc. Natl. Acad. Sci.,
USA, 77 358-361.
- 62.-ZURFLUH, L. y T. GUILFOYLE; 1982. Plant. Physiol.,69: 332-
337.