

DETERMINACION DEL ACIDO ABSCISICO EN PAPA (*Solanum* sp.) COMO RESPUESTA A BAJAS TEMPERATURAS

Abscisic acid determination in potato (*Solanum* sp.) as a response to low temperature

Luz Yineth Ortiz¹, Alejandro López.¹, Clemencia Gómez de Encizo² y Víctor Julio Flórez.³

RESUMEN

En Colombia, existen importantes áreas con amplio potencial agrícola, las cuales presentan restricciones ambientales para su utilización durante determinadas épocas del año, a causa de las heladas que provocan las bajas temperaturas. Éste es el caso del Altiplano Cundiboyasence, en el cual el fenómeno en mención afecta, drásticamente, los cultivos hasta ocasionar disminución del rendimiento o pérdidas totales. El presente trabajo tuvo como finalidad detectar la presencia de Acido Abscísico (ABA) en las siguientes variedades de papa de la especie *Solanum* sp.: 'Capiro', 'Única', 'Chitagá', 'Morita', 'Pastusa', 'ICA-Zipa' y 'Nativa' (silvestre). El análisis se hizo en el estadio de prefloración bajo condiciones de temperatura ambiente (~20°C) y expuestas a una simulación de helada (-4°C). Para la extracción de ABA, se recolectaron hojas del tercio superior de la planta y se sometieron a extracción Líquido-Líquido y, para su cuantificación, se utilizó el bioensayo de la inhibición del coleóptilo de trigo (*Triticum tensa vulgare* L.), el cual se realizó por cromatografía de capa fina. Entre las variedades estudiadas, se obtuvieron dos grupos de respuesta: susceptibles y tolerantes, las cuales están asociadas con la posible ausencia o presencia de ABA. En las variedades 'ICA-Zipa' y 'Chitagá' no se detectó la presencia de ABA, como tampoco, se observó tolerancia a las bajas temperaturas. En las variedades 'Capiro', 'Pastusa', 'Nativa', 'Única' y 'Morita', se observó mayor tolerancia a las bajas temperaturas.

Palabras claves: Heladas, ABA, bioensayo, cromatografía.

SUMMARY

There are many important geographical areas in Colombia with a high agricultural potential. They have environmental constrains, however, to be used in certain periods during the year because of the low temperature. This happens in the Cundiboyasence plateau, in which, this phenomenon affects dramatically the growing of potato crops up to the point of causing a decrease in production or total loss. The purpose of this trial was to determine the presence of ABA in the following varieties of *Solanum* sp.: 'Capiro', 'Única', 'Chitagá', 'Morita', 'Pastusa', 'ICA-Zipa' and 'Nativa'. The analysis was carried out in the pre-flowering period under an average environmental temperature of 20°C and exposed to simulated freezing conditions of -4°C. For the ABA extraction, leaves were

collected, and subjected to liquid-liquid extraction and to thin layer chromatography technique. For the quantification, the length inhibition of wheat coleoptile (*Triticum tensa vulgare* L.) bioassay was used. In the study there were two kinds of response: susceptible and tolerant varieties. The varieties 'ICA-Zipa' and 'Chitagá' form the first group in which tolerance to frost stress was not observed. The varieties of the second group: 'Capiro', 'Pastusa', 'Nativa', 'Única' and 'Morita' showed tolerance to low temperature.

Key Words: Frost, ABA, chromatography, bioassay.

INTRODUCCION

En Suramérica, el cultivo de papa se originó en la Cuenca del Lago Titicaca (3.810 msnm), pero, aún, se desconoce su antigüedad. Actualmente, la papa se cultiva para obtener el máximo rendimiento de tubérculos de alta calidad, es decir, con el objetivo final de producir tubérculos con el mayor contenido de masa seca (carbohidratos), depositada, en forma de almidón, el cual representa de 70 a 85% del peso del tubérculo.

La papa es uno de los alimentos más importantes en el mundo y es un producto de consumo doméstico en los países productores. En Colombia, la papa es el principal cultivo de producción de clima frío, ubicado en la región Andina entre los 2000 y 3200 metros de altitud, la cual corresponde a los altiplanos fríos y a los páramos localizados, principalmente, en los departamentos de Cundinamarca, Boyacá, Nariño y Antioquía. En estas regiones, las bajas temperaturas son uno de los factores limitantes. Además de la exclusión de extensas áreas para uso agrícola, cuando se presenta el fenómeno de la helada éste ocasiona pérdidas parciales o totales de las cosechas.

Entre los grupos de hormonas vegetales más estudiados en cuanto a estrés por enfriamiento se refiere, se encuentran el etileno y el ácido abscísico (ABA); este último es una fitohormona que pertenece a los sesquiterpenoides de 15 carbonos, sintetizado por dos vías, una directa que parte del ácido mevalónico, la cual implica la ciclación y oxidación de un precursor de C₁₅ para formar al ABA (Davies, 1995). En la mayoría de las plantas superiores (quizás, en todas) la biosíntesis del ABA se realiza, por vía indirecta, o sea, por degradación de algunos carotenoides (C₄₀) presentes en plastidios. En la parte aérea, los cloroplastos contienen los carotenoides de los cuales se forma el ABA, mientras que en raíces, frutos, embriones de semilla y otras partes del vegetal, los precursores del ABA

¹ Licenciado en Química. Universidad Distrital Francisco José de Caldas. E-mail: yineth_ortiz@latinmail.co

² Corpoica. E-mail: menciso@corpoica.org.co

³ Profesor Asistente - Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, A. A. 14490, Bogotá. E-mail: vjfllorez@bacata.usc.unal.edu.co

se encuentran en otros plastidios (Zeervart y Creelman, 1988; Azcon-Bieto y Talon, 1993). Como, en las demás fitohormonas, la respuesta a ABA depende de su concentración en el tejido, así como de la sensibilidad de éste a la hormona. Los procesos de síntesis, catabolismo, compartimentación y transporte contribuyen a la concentración de la hormona activa en el tejido, en un determinado estadio de desarrollo de la planta (Taiz y Zeiger, 1998). Los efectos que produce el ABA en las plantas son: regulación y apertura estomática, latencia en yemas y semillas, inhibición de las síntesis de RNA y proteínas e inhibición de muchas partes de la planta (coleóptilos, radículas, hojas, raíces, etc).

Las hormonas vegetales se encuentran en concentraciones muy bajas en las plantas y se caracterizan por poseer un bajo peso molecular. Entre las propiedades conocidas del ABA, la dispersión rotatoria (Cornforth *et al.*, 1965) y la espectropolarimetría (Milborrow, 1967) resultan útiles para su identificación en muestras vegetales con bajo contenido de ABA. Para su separación y cuantificación, según Flórez (1997), se utilizan técnicas que en orden creciente de eficiencia son los bioensayos (Ohkuma *et al.*, 1963; Addicott *et al.*, 1964; Larque Saavedra, 1975 y Rodríguez *et al.*, 1997), la cromatografía en sus diferentes modalidades y, en particular, la Cromatografía líquida de Alta Eficiencia (HPLC), siendo la más recomendada (During, 1977; Durlley *et al.*, 1978), los inmunoensayos "Enzyme Likend ImmunoSorbent Assay" (ELISA) (Weiler, 1984 y Gutierrez, 1994), y los radioinmunoensayos (RIA) (Weiler, 1979).

La inducción de la síntesis de ABA es considerada como una adaptación al estrés por frío. En algunas localidades, el cultivo de la papa está expuesto a un estrés por enfriamiento, debido a las bajas temperaturas que producen las heladas, las cuales provocan daños en la planta, presentándose una flacidez en las hojas, debido a la infiltración del espacio intracelular con líquido y la pérdida de turgencia. Algunas variedades son resistentes al frío, es decir, sobreviven a temperaturas de congelamiento inferiores a -4°C . Aunque muchas especies de papa pueden sobrevivir a varios grados bajo cero, aquéllas que mueren a temperaturas de congelamiento inferiores a -4°C son consideradas sensibles al frío.

El presente trabajo se realizó con la finalidad de determinar cuáles variedades de papa (*Solanum sp.*), de las sometidas a estudio, son tolerantes o susceptibles a bajas temperaturas, simulando una helada a -4°C y realizando, posteriormente, la extracción y cuantificación de ABA en plantas de estas variedades.

MATERIALES Y METODOS

El trabajo se realizó, bajo condiciones de casa de malla, en el Centro de Investigaciones de Tibaitatá, CORPOICA, ubicado en el municipio de Mosquera (Cundinamarca) a 2550 msnm, con temperatura promedio anual de 14°C , 657mm anuales de precipitación pluvial, 9 horas de brillo solar de promedio diario y una humedad relativa del 80%. Su ubicación geográfica es de $4^{\circ} 42'$ latitud norte y $72^{\circ} 12'$ longitud oeste.

Material vegetal

Para la extracción de ABA, se utilizaron extractos foliares de las siguientes variedades de papa (*Solanum sp.*): 'Morita',

'Capiro', 'Nativa' (silvestre), 'Patusa', 'ICA-Zipa', 'Chitagá' y 'Única'. Para el bioensayo, se utilizaron semillas de trigo (*Triticum tensa vulgare L.*). Tanto los tubérculos de las variedades de papa, como las semillas de trigo utilizadas, fueron suministrados por la colección de CORPOICA de Tibaitata.

Químicos y equipos

(±)Ácido Abscísico (ABA) Sigma, metanol 80%, polivinilpirrolidina (PVP), ácido sulfúrico 3N (H_2SO_4), hidróxido de sodio 1N (NaOH), acetato de plomo (COOH Pb), acetato de etilo ($\text{HCOOCH}_2\text{CH}_3$), hidroxitoluenobutilado (BTH), solución tampón fosfato pH 8, ácido acético (COOH), sílica gel G-60, isopropanol, amoníaco (NH_3), hipoclorito de sodio y agua destilada.

Para la simulación de la helada, se utilizó un fitotrón marca Convirón.

Metodología

En el método empleado para la extracción del ABA en el presente trabajo, se tuvieron en cuenta las técnicas utilizadas por varios autores (Milborrow y Mallaby, 1975; Dathe y Semddner, 1978; Glenn y Kuo, 1972; Passos, 1992; Flórez y Pereira, 1997 y Rodríguez *et al.*, 1997), lo mismo que para su cuantificación por medio del bioensayo de la inhibición del coleóptilo de trigo (*Triticum tensa Vulgare L.*) (Passos, 1992; Rodríguez *et al.*, 1997 y Flórez y Pereira, 1997), en tejido vegetal de plantas de *Solanum tuberosum L.* a temperatura ambiente ($\sim 20^{\circ}\text{C}$) y sometidas a una simulación de helada (-4°C).

Extracción y cuantificación

Para detectar la presencia de sustancias con actividad inhibitoria, como el ABA, se recolectaron 5g de masa fresca de hojas del tercio medio de cada una de las plantas en estadio de prefloración. Los extractos foliares se separaron por extracción líquido-líquido y por cromatografía de capa fina, sometiéndolos, posteriormente, al bioensayo de la inhibición en la enlogación del coleóptilo de trigo (*Triticum tensa vulgare L.*).

El material vegetal se maceró con ayuda de mortero y pistilo, agregando nitrógeno líquido. Enseguida, la muestra macerada se colocó en un erlenmeyer con MeOH 80% acidificado (0,5% ácido acético) más BTH (40mg/L), en la proporción de 5g de masa fresca: 20mL de solución. La muestra se colocó en oscuridad y se agitó durante 24h a 4°C , se concentró en rotavapor, a temperatura inferior a 40°C , hasta la evaporación del metanol. Se retomó a volumen conocido con solución tampón fosfato pH 8, se lavó tres veces con una solución de acetato de plomo al 4% y ácido acético al 0,5% y se filtró en cada lavado. Al filtrado obtenido, se le adicionó PVP 50mg/mL de volumen original de la muestra y se filtró nuevamente. La solución obtenida se ajustó a un pH 2,5-3,0 con ácido clorhídrico o ácido sulfúrico 3N y se procedió a lavar la muestra tres veces con acetato de etilo, ester dietílico o cloroformo y se recolectó la fracción orgánica. Por último, el extracto se concentró hasta sequedad y se retomó a volumen conocido (2mL).

Para realizar el bioensayo de la inhibición del coleóptilo de trigo (*Triticum tensa vulgare L.*) en cada una de las variedades, con los extractos obtenidos con la metodología ante-

riormente descrita, se seleccionaron semillas de trigo por tamaño estándar y en buenas condiciones fitosanitarias. A continuación, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 10% durante 15 minutos y se lavaron cinco veces con agua destilada. El extracto se corrió en una placa de vidrio previamente preparada con 0,5mm de espesor de sílica gel G-60 (20g sílica:80mL agua) y activada a 110°C durante una hora. Una vez aplicado el extracto en la placa, ésta se colocó en una cuba cromatográfica saturada, teniendo como fase móvil isopropanol con amoniaco y agua (6:2:12 v/v). Después de la evaporación de los solventes, la placa se dividió en cuatro columnas (repeticiones) y en diez filas, las cuales corresponden a los Rfs 0,1 a 1,0. En cada uno de los Rfs con su repetición correspondiente, se raspó la sílica de la placa y se colocó en una caja de petri de 8cm de diámetro, se pulverizó uniformemente, se cubrió con papel filtro No.1 y se adicionaron 4mL de agua destilada.

Para los tratamientos blanco y patrón, se tomaron ocho partes iguales: cuatro para el blanco y cuatro para el patrón. Para el tratamiento blanco, solamente, se adicionó agua destilada y, para el patrón, se adicionó ABA 10^{-3} M; después de media hora, se procedió al montaje del bioensayo. Se colocaron 10 semillas de trigo por caja de petri, las cuales se dejaron a temperatura ambiente y en oscuridad.

La cuantificación de la fitohormona se realizó mediante una curva de calibración de ABA (figura 1). Para esta curva, se tuvieron en cuenta las concentraciones entre 20mg y 100mg a intervalos de 20mg, tres repeticiones y la longitud del coleóptilo de trigo. Las mediciones de la longitud del coleóptilo, tanto para el bioensayo, como para la curva de calibración, se realizaron en tres muestreos (24h, 48h y 72h) y las muestras se compararon estadísticamente con el blanco y el patrón.

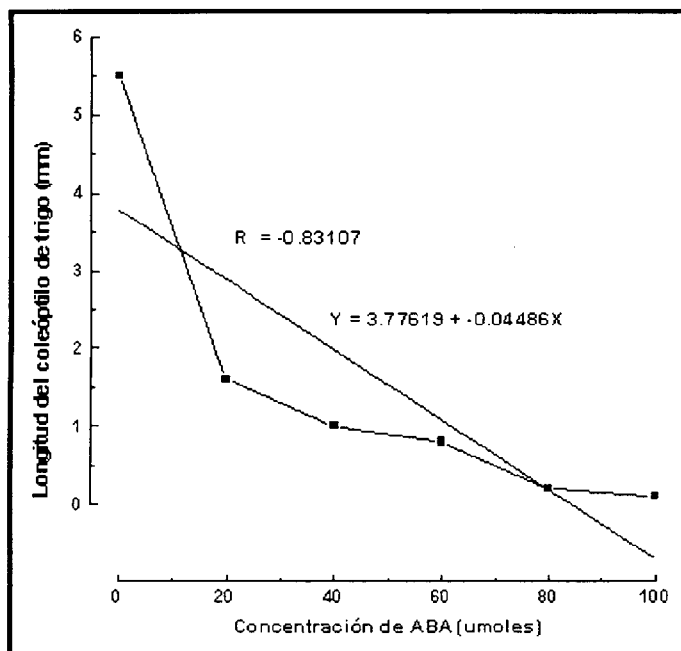


Figura 1. Regresión lineal de la curva patrón de ABA, para su determinación en las siete variedades de papa (*Solanum* sp.), antes y después de la simulación de la helada.

Análisis estadístico

El diseño estadístico utilizado fue completamente al azar. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) entre tratamientos y muestreos y se aplicó la prueba de comparación de Tukey al 5% de probabilidad, utilizando el programa SAS (Statistical Analysis System). Cada bioensayo (experimento) constó de 12 tratamientos con cuatro repeticiones y tres muestreos (24h, 48h y 72h) por variedad, para antes y después de la simulación de la helada. La variable en estudio es la inhibición de crecimiento del coleóptilo de trigo, para la determinación de la concentración de ABA.

RESULTADOS Y DISCUSION

Teniendo en cuenta los promedios obtenidos entre los muestreos, en la prueba de Tukey se observó que el mejor muestreo fue a las 72h (tercer muestreo), tanto antes, como después de la simulación de la helada, observándose las diferencias mínimas significativas (DMS) entre muestreos; por esta razón, se presentan los resultados correspondientes a las 72h. Se elaboraron gráficas con los porcentajes promedios de la inhibición del coleóptilo de trigo en relación con los Rfs. En las gráficas, podemos observar que, por encima del blanco (100%) y hasta la línea superior del DMS, corresponden los picos de promoción no significativos y, por encima de éste, corresponde a los picos de promoción significativos. Por debajo del blanco y hasta la línea inferior del DMS, corresponden a los picos de inhibición no significativos y por debajo de éste se encuentran los picos de inhibición significativos, que se pueden comparar con el patrón ABA (10^{-3} M).

Variedades Susceptibles

La variedad 'Chitagá', antes de la simulación de la helada (figura 2A), presenta una tendencia muy parecida al blanco, con ausencia de picos significativos de promoción o de inhibición. Para la misma variedad, después de la helada (figura 2B), se presentó un pico promotor significativo en el Rf 0,1 con un porcentaje de 150% y, de forma semejante, a antes de la simulación de la helada, no se presentaron picos de inhibición significativos, ratificando, así, la ausencia de algún compuesto inhibitorio.

Para la variedad 'ICA-Zipa', antes de la helada (figura 2A), se presentan picos promotores significativos, con el mayor porcentaje de promoción (272,5%) en el Rf 0,6. Después de la helada, no se observan picos de promoción ni de inhibición significativos (figura 2B), lo cual indica, también, que, en esta variedad, se presenta ausencia de ABA con respecto al blanco.

Por la técnica utilizada, no se detectó la presencia de sustancias inhibitorias en las variedades 'Chitagá' e 'ICA-Zipa'. Entre estas sustancias, se destaca el ABA, el cual promueve la síntesis de compuestos asociados con el ajuste osmótico y, por consiguiente, la planta carece de defensas contra los diferentes tipos de estrés ambientales, tales como el ocasionado por las bajas temperaturas (Davies, 1995). Experimentalmente, se observó que estas variedades murieron después de haber sido sometidas al estrés ocasionado por la simulación de la helada. La muerte en las plantas como respuesta al estrés por enfriamiento está relacionada con los cambios que experimentan las membranas cuando responden al frío. A medida que disminuye la temperatura de las plantas que son sensibles al enfriamiento, los lípidos de las membranas celulares se solidifican (se cristalizan) a una temperatura crítica que está determinada por la proporción que guarda entre

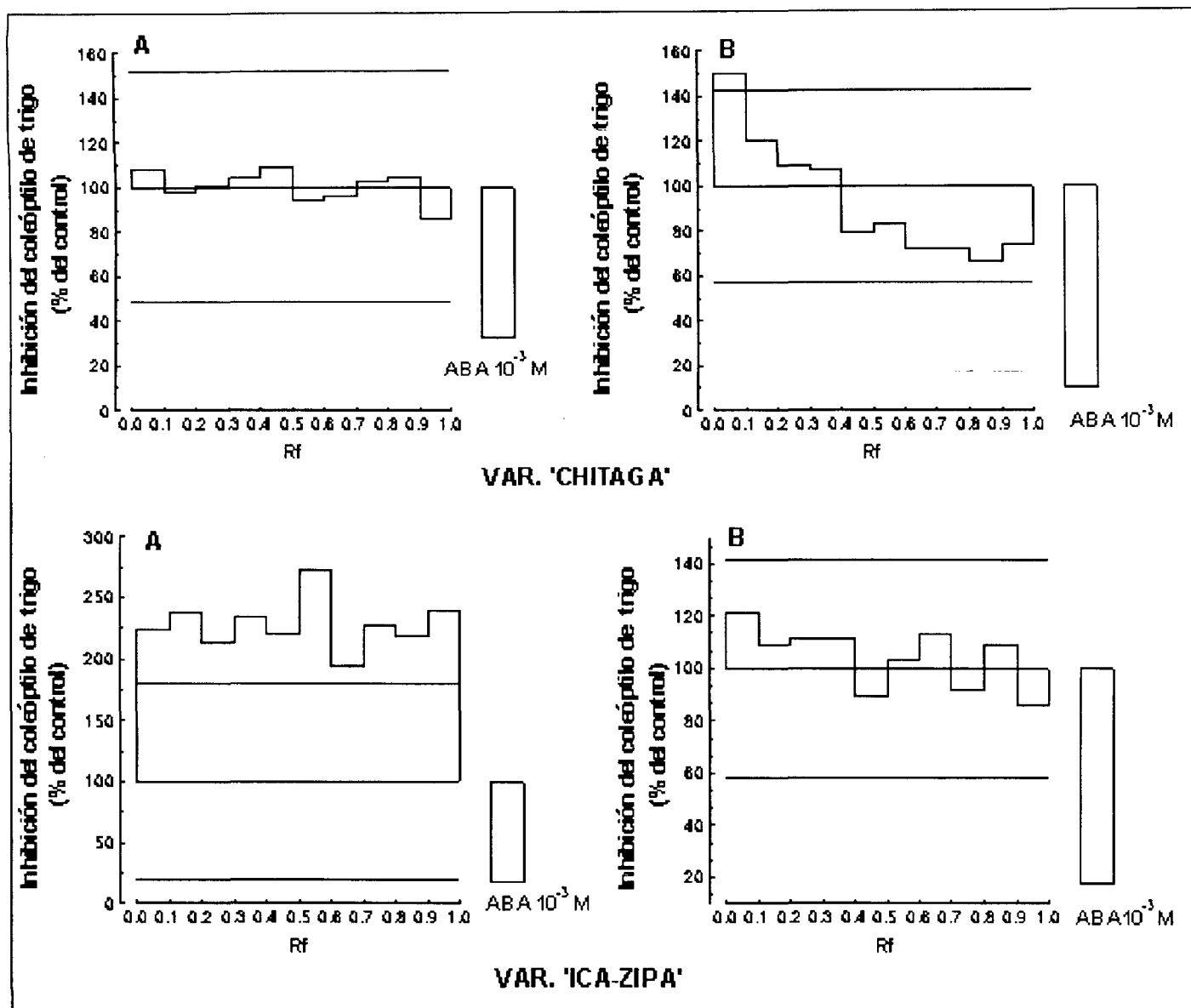


Figura 2. Inhibición observada en la fracción ácida, por el bioensayo de la elongación del coleóptilo de trigo en extractos foliares de 5g de masa fresca de papa, en estadio de prefloración, en las variedades 'Chitaga' e 'ICA-Zipa'.

A = Antes de la simulación de la helada. B = Después de la simulación de la helada

los ácidos grasos saturados y los insaturados. Esta temperatura crítica causada en la fase de transición que convierte el líquido en cristales resulta ser equivalente a la temperatura que causa el daño generado por el enfriamiento. El aumento en la proporción de los ácidos grasos insaturados o de la cantidad de esteroides hace que la membrana siga funcionando a temperaturas bajas (Salisbury, 1993).

Variedades tolerantes

En el extracto correspondiente a la variedad 'Nativa', antes de la simulación de la helada, no se observan picos de promoción, ni de inhibición significativos (figura 3A); entre tanto, en el cromatograma obtenido después de la simulación de la helada

(figura 3B), se presentan picos de inhibición significativos entre los Rfs 0,5 a 0,7 y 0,8 a 0,9, siendo el de mayor porcentaje de inhibición el Rf 0,5 a 0,6, con el 45%, evidenciando la probable presencia de un compuesto inhibidor estimulado por las bajas temperaturas simuladas.

La variedad 'Pastusa' (figura 3A), pese a que presentó picos de promoción significativos, no presentó picos de inhibición antes de la helada; sin embargo, después de la simulación de la helada, se observan picos de inhibición significativos entre los Rfs 0,6 a 1,0 (figura 3B), con porcentajes de inhibición entre 41,7% y 51,0%. Evidenciándose, también para esta variedad, la presencia de sustancias inhibitorias estimuladas por la simulación de la helada.

Para los extractos de la variedad 'Única' antes de la simulación de la helada (figura 3A), se observan picos de promoción

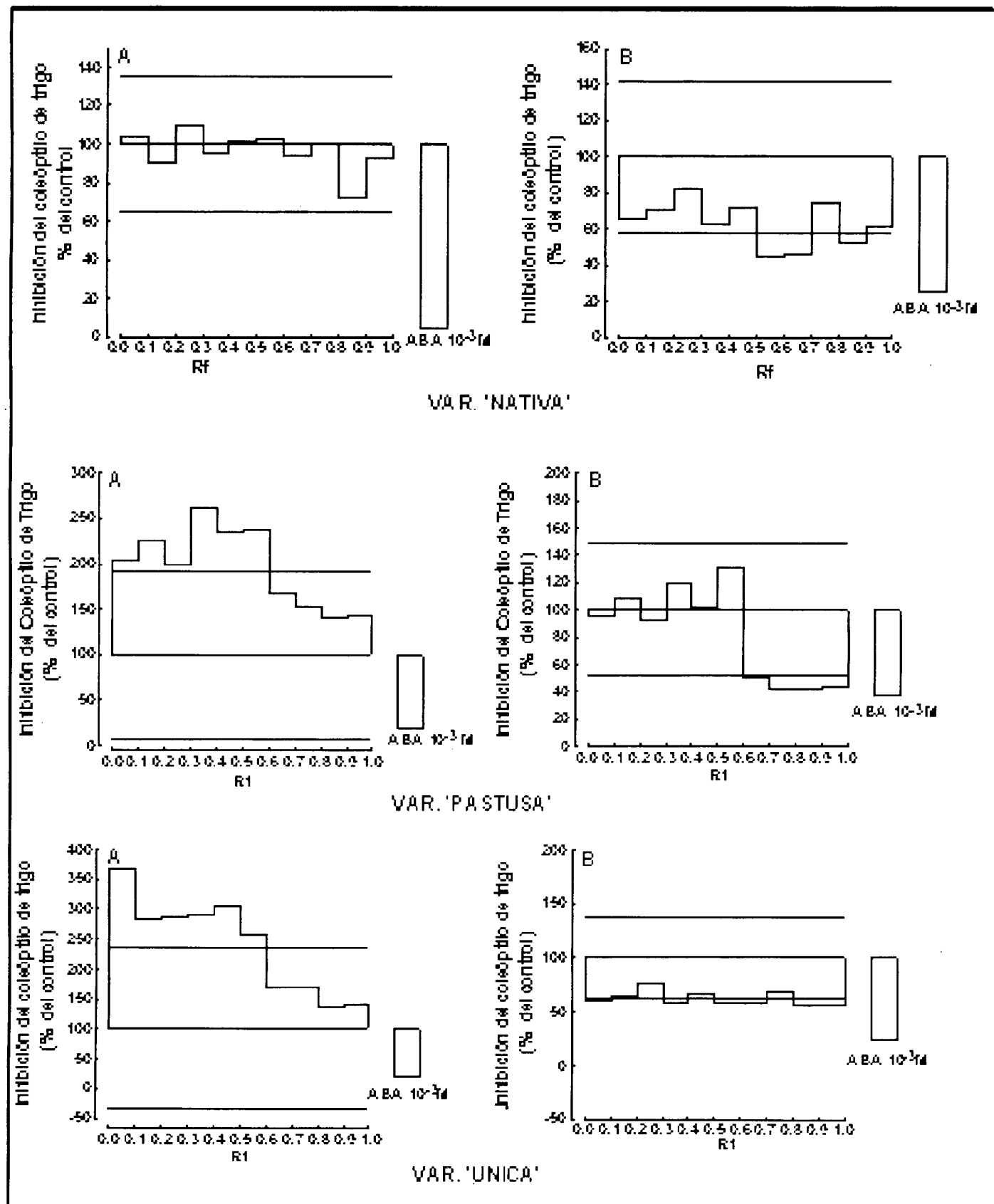


Figura 3. Inhibición observada en la fracción ácida, por el bioensayo de la elongación del coleóptilo de trigo en extractos foliares de 5g de masa fresca de papa, en estado de prefloración, en las variedades 'Nativa' 'Pastusa' y 'Única'.

A = Antes de la simulación de la helada. B = Después de la simulación de la helada

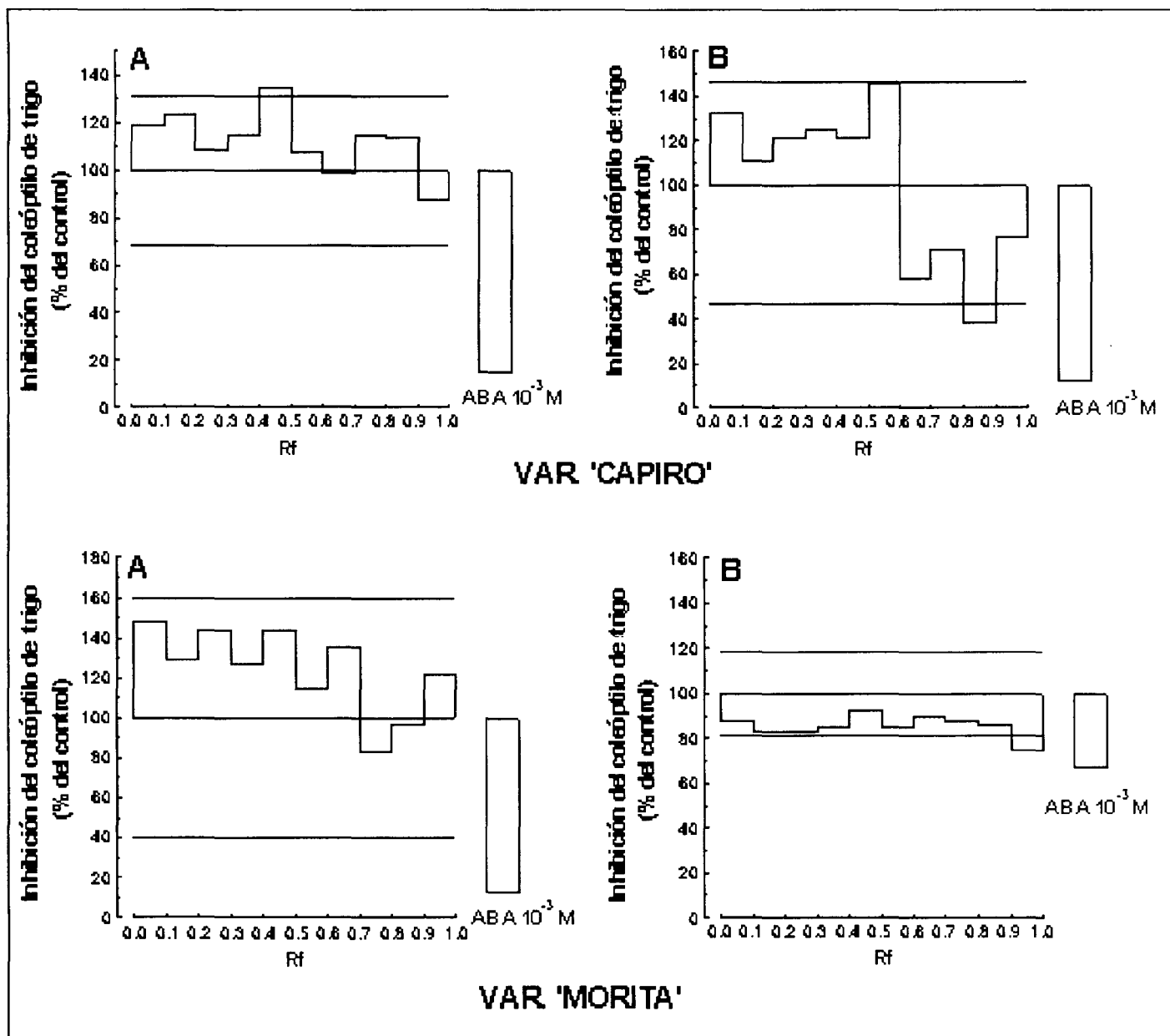


Figura 4. Inhibición observada en la fracción ácida, por el bioensayo de la elongación del coleóptilo de trigo en extractos foliares de 5g de masa fresca de papa, en estado de prefloración, en las variedades 'Capiro' y 'Morita'.

A = Antes de la simulación de la helada. B = Después de la simulación de la helada

significativos entre los Rfs 0,1 a 0,6, correspondientes a porcentajes entre 305,8% a 336,2%. En tanto que, después de la helada (figura 3B), se observan picos de inhibición significativos entre los Rfs 0,0 a 0,1; 0,3 a 0,4; 0,5 a 0,7 y 0,8 a 1,0, indicando síntesis de compuestos inhibidores después de producirse la simulación de la helada.

En la variedad 'Capiro', antes de la simulación de la helada (figura 4 A), no se presentan picos de inhibición significativos y se observa un pico de promoción significativo en el Rf 0,4 a 0,5, con un porcentaje del 134,9%. Después de la helada (figura 4B), se evidencia un pico significativo de inhibición entre los Rfs 0,8 a 0,9, con un porcentaje del 38,5%; indicando, también para esta

variedad, la síntesis de compuestos con actividad inhibitoria específica para el bioensayo, como resultado del fenómeno de estrés simulado.

La variedad 'Morita', antes de la helada (figura 4 A), no presenta picos ni de promoción ni de inhibición significativos. Sin embargo, después de la simulación de la helada (figura 4 B), presenta un pico de inhibición significativo entre los Rfs 0,9 y 1,0, con un porcentaje del 74,9%, inhibición menor que la de las variedades anteriores, pero indicando que hubo síntesis de compuestos inhibidores.

Las variedades tolerantes a la helada fueron las de mayor concentración de sustancias inhibitoras entre los Rfs 0,5 a 0,9

(Harbone, 1984 y Saavedra, 1993), probablemente ABA, registradas de acuerdo con la curva de calibración (figura 1). En orden descendente son: 'Capiro', 75,93mM, en equivalentes de ABA (Rf 0,9); 'Pastusa', 68,35mM, en equivalentes de ABA (Rf 0,8); y 'Nativa', 65,45mM, en equivalentes de ABA (Rf 0,6). Estas variedades, experimentalmente, volvieron a las condiciones óptimas inmediatamente después del estrés. Las variedades menos tolerantes fueron 'Morita' y 'Única' con 64,78mM, en equivalentes de ABA (Rf 0,8) y 58,54mM, en equivalentes de ABA (Rf 0,9), respectivamente. Estas dos variedades, después de la simulación de la helada, volvieron a condiciones normales durante 15 días, muriendo poco después.

Por la especificidad de la extracción (fracción ácida) y del bioensayo de la inhibición del coleóptilo de trigo (*Triticum tensa vulgare* L.), es posible asociar la actividad inhibitoria detectada entre los Rfs 0,5 a 0,9, en cada una de las variedades, con la presencia de ABA, ya que, según Harbone (1984), ésta es la región donde se localiza el ácido abscísico, en un sistema de cromatografía de capa fina, similar al desarrollado en el presente trabajo.

Al someter las plantas a un estrés por enfriamiento, éstas pueden presentar una deformación biológica elástica, produciendo cambios en la función de la planta, la cual restituye su nivel óptimo cuando el estrés biológico ha cesado (Levitt, 1980). La resistencia a las heladas se basa en la tolerancia a la formación del hielo extracelular (Taiz y Zeiger, 1998) y, por consiguiente, a la deshidratación severa o a evitar el congelamiento, en especial al sobreenfriamiento. Una fitohormona que hace posible que la planta sea resistente es el ABA; este compuesto actuaría como un mensajero bioquímico en la planta sometida a condiciones de estrés y se ligaría a un receptor molecular específico localizado en el plasmalema celular y el complejo hormona-receptor desencadenaría una serie de pasos metabólicos en el citoplasma celular, hasta la síntesis de los compuestos encargados del ajuste osmótico, ciertamente prolina (Ducan y Widholm, 1991), permitiendo que la planta sobreviva al fenómeno. Así, en principio, tanto mayor sea su capacidad de sintetizar estos compuestos, tanto mayor será su capacidad de tolerancia y, en éste caso, al estrés por bajas temperaturas. Es común que los cristales de hielo comiencen a formarse en los espacios extracelulares y que el agua, presente en las células, se salga al difundirse y se condense en las crecientes masas de hielo. Cuando estos cristales de hielo se funden en las plantas que son resistentes al frío, el agua regresa a las células y éstas reinician su metabolismo. En las plantas que no están aclimatadas, puede ocurrir algún daño en la membrana y en otros componentes celulares y, por éso, el metabolismo no puede reiniciarse y el agua no vuelve a entrar íntegramente a la célula (Sakai y Larcher, 1987).

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos al Programa Nacional de Ecofisiología Vegetal de Corpoica. A los doctores Marcos Daquinta, director de Biotecnología Vegetal y Romelio Rodríguez, asistente del Departamento de Bioquímica y a todo el personal del Programa de Investigación y Producción de Biotecnología Vegetal de la Universidad de Ciego de Avila en Cuba, por sus valiosos aportes de las investigaciones realizadas en este centro.

LITERATURA CITADA

- ADDICOT, F. T., H. R. CARNS, J. L. LYON, D. E. SMITH y J. L. McMEANS. On the physiology of abscisins. *Proc. Fifth Intern. Confo Plant Growth Regulators*. Paris Edition du CNRS. 687-703. 1964
- AZCON -BIETO J. y M. TALON. Fisiología y bioquímica vegetal. Iberoamericana McGraw-Hill, Nueva York, 581p. 1993
- CONFORTH, J. W., B. V. MILBORROW, G. RYBACK y P. F. WAREING. Chemistry and physiology of dormins in sycamore. *Nature*, 205:1269-1270. 1965
- DATHE, W. y G. SEMDDNER. Distribution of gibberellins and ABA in different fruits parts of ryes (*Secale cereale* L.). *Pflanzen Physiol.*, 178:440-442. 1978
- DAVIES, P. Plant hormones. Physiology, biochemistry and molecular biology, Kluwer Academic Publishers, London, p. 140-155. 1995
- DUCAN, D. R. y J. M. WIDHOLM. Proline is not the primary determinant of chilling tolerance induced by manitol or abscisic in regenerable maize callus cultures. *Plant Physiol.*, 95:1284-87. 1991
- DÜRING, H. Analysis of abscisic acid and 3 indole-acetic acid from fruits of *Vitis vinifera* L. by high pressure liquid chromatography. *Experientia*, 33:1666-1667. 1977
- DURLEY, R. C., T. KANNANGARA y G. M. SIMPSON. Analysis of abscisins and 3-indolacetic acid in leaves of *Sorghum bicolor* by high performance liquid chromatography. *Can. J. Bot.*, 56:157-161. 1978
- FLOREZ R., V. J. Análisis hormonal en plantas: Tendencias actuales. *Agronomía Colombiana*, 14(2):144-147. 1997
- FLOREZ R., V. J. y M. F. D. A. PEREIRA. Estudo do controle fotoperiódico e hormonal da floração em *Solidago x luteus*, tesis de doctorado, Universidad Estatal de Campinas - UNICAMP, Campinas, Brasil, 154p. 1997
- GLENM, J. L. y C. C. KUO. Use of insoluble polyvinylpyrrolidone for purification of plant extracts and chromatography of plant hormones. *Phytochemistry*, 11:345-351. 1972
- GUTIERREZ, M. Métodos avanzados en fisiología vegetal y experimental. México: Instituto de Recursos Naturales. Colegio de Posgraduados en Ciencias Agrícolas, p. 43-53. 1994
- HARBONE, J. B. Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis. Chapman and Hall, Hong Kong, p. 4-117. 1984
- LARQUE, A. Studies on hormonal aspects of plant growth in relation to chemical and environmental treatments. Tesis de doctorado, Universidad de Londres. 216p. 1975
- LEVITT, J. Response of plants to environmental stresses. Vol. I-II, Academy Press, London, p.55-88. 1980
- MILBORROW, B. The identification of (\pm) Abscisin II (\pm dormin) in plants and measurement of its concentrations. *Planta*, 76:93-113. 1967
- MILBORROW, B. y R. MALLABY. Occurrence of methyl (\pm) abscisate as an artefact of extraction. *J. Exp. Bot.*, 26:741-48. 1975
- OHKUMA, K., O. E. SMITH, J. L. LYON y F. T. ADDICOTT. Abscisin II, an abscission accelerating substance from young cotton fruit. *Science*, 142:1592-1593. 1963
- PASSOS, P. *Métodos analíticos e laboratoriais em fisiologia vegetal*. Embrapa. p. 187-190. 1992

- RODRIGUEZ, M. y A. SAAVEDRA. El bioensayo de la inhibición del crecimiento del coleóptilo de trigo (*Triticum aestivum* L.). *Agrociencia*, 42:27-34. 1980
- RODRIGUEZ, R., J. SANCHEZ y O. GONZALEZ. Empleo de reguladores del crecimiento en la adaptación de vitroplantas y estacas de *Ixora Coccinea* c.v. Gullermina. *Agrícola Vergel*, 190:555-558. 1997
- SAAVEDRA, A. Aislamiento y cuantificación de los reguladores del crecimiento vegetal. *Fisiología vegetal experimental*, Trillas, México, p. 117-123. 1993
- SAKAI, A. and W. LARCHER. Frost survival of plants. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. 1987
- SALISBURY, F. B. y C. W. ROSS. *Fisiología vegetal*. Grupo editorial Iberoamérica. México. 759p. 1993
- TAIZ, L. y E. ZEIGER. *Plant physiology*, 2ª. ed., Sinauer Associates Inc. Publishers, Massachusetts, 988p. 1998
- WEILER, E. W. Immunoassay of plant growth regulators. *Annual Review of Plant Physiology*, 25:85-95. 1984
- WEILER, E. W. Radioimmunoassay for the determination of free and conjugated abscisic acid. *Plant*, 144: 255-263. 1979
- ZEEVAART, J. A. y E. A. CREELMAN. Metabolism and physiology of abscisic acid. *Annual Review of plant physiology and plant molecular biology*, 39: 439-473. 1988