ALGUNOS FACTORES RELACIONADOS CON LA CAUSA DEL ENANISMO DE UN MUTANTE DE FRIJOL INDUCIDO POR RADIACION GAMMA

por

CARLOS MORALES RODRIGUEZ

Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA
Centro de Enseñanza e Investigación
Turrialba, Costa Rica

Junio, 1969

ALGUNOS FACTORES RELACIONADOS CON LA CAUSA DEL ENANISMO DE UN MUTANTE DE FRIJOL INDUCIDO POR RADIACION GAMMA

por

CARLOS MORALES RODRIGUEZ

Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA
Centro de Enseñanza e Investigación
Turrialba, Costa Rica

Junio, 1969

ALGUNOS FACTORES RELACIONADOS CON LA CAUSA DEL ENANISMO DE UN MUTANTE DE FRIJOL INDUCIDO POR RADIACION GAMMA

Tesis

Presentada al Consejo de la Escuela para Graduados como requisito parcial para optar el grado de

Magister Scientiae

en el

Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA

APROBADA: _____, Consejero
George L. Greene, Ph.D.

_____, Comité
Carl C. Moh, Ph.D.

_____, Comité
Antonio Pinchinat, Ph.D.

_____, Comité
Adalberto Gorbitz, Ing. Agr.

Junio, 1969

A mi madre, esposa é hijos:

Cuyo cariño, adhesión y
espíritu de sacrificio me
han acompañado durante
toda la vida.

AGRADECIMIENTO

El autor desea expresar su agradecimiento al Dr. George L. Greene, Consejero Principal, por su asesoramiento y acertada dirección en el trabajo de tesis. A los miembros de su Comité Consejaro, Drs. Carl C. Moh, Antonio Pinchinat y Adalberto Gorbitz, por la ayuda y sugerencias que permitieron culminar con éxito esta investigación. A los profesores, compañeros y demás personal del Instituto que en una u otra forma colaboraron para que continuara adelante en los estudios.

El autor también expresa su agradecimiento al Programa de Energía Nuclear (NEP), del Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas por su valiosa colaboración en la realización de esta investigación.

BIOGRAFIA

El autor nació en la ciudad de Granada, Nicaragua, en el año 1940. Sus estudios primarios y secundarios los realizó en su ciudad natal.

Ingresó a la Facultad de Agronomía, dependencia del Ministerio de Agricultura y Ganadería de Nicaragua, en 1960, habiéndose graduado de Ingeniero Agrónomo en Diciembre de 1965.

Durante el año de 1965 colaboró con el Ministerio de Agricultura en el departamento de Extensión Agrícola. En 1966 comenzó su trabajo en el Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA, en calidad de asistente del Departamento de Fisiología Vegetal del Programa de Energía Nuclear.

A partir de septiembre de 1967 ingresó a la Escuela de Graduados en calidad de estudiante, terminando sus estudios en junio de 1969.

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS

LISTA DE FIGURAS

ALGUNOS FACTORES RELACIONADOS CON LA CAUSA DEL ENANISMO DE UN MUTANTE DE FRIJOL INDUCIDO POR RADIACION GAMMA

INTRODUCCION

Entre los varios tipos de hormonas que regulan el crecimiento de las plantas, se encuentran las giberelinas, que estan estrechamente relacionadas con este proceso y con otros cambios cuantitativos experimentados durante el desarrollo de los tejidos.

Proaño y Greene (29) investigando semillas provenientes de plantas normales y de mutantes enanos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L. var.'Mexico-80R') lograron obtener del frijol normal un extracto que, aplicado a las plantas enanas, estimuló el crecimiento de éstas. Pensaron que este extracto bien podría contener un precursor de giberelinas que existe en forma de reserva en las semillas maduras.

Con el propósito de aclarar algunas interrogantes sobre las diferencias de crecimiento entre plantas normales y mutantes enanos de frijol, se inició la presente investigación que comprende los siguientes objetivos:

1. Separar y tratar de identificar por cromatografía de capa fina, los factores relacionados con el crecimiento que se encuentran en la fracción neutral, tanto de las semillas maduras de frijol normal (*Phaseolus vulgaris* L. var 'México-80R') como de las semillas del mutante enano.

2. Comparar por medio de pruebas biológicas, los efectos cuantitativos de los factores presentes en la fracción neutral de ambos extractos, para tratar de encontrar algunas diferencias biológicas entre los extractos de ambas líneas.

Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Fisiología Vegetal del Programa de Energía Nuclear (NEP) del Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA.

REVISION DE LITERATURA

I. Características generales de las giberelinas

Investigaciones hechas en Japón sobre el alargamiento del tallo del arroz producido por el hongo Gibberella fujikuroi (20), condujeron en 1939 a la separación de una sustancia cristalina que tiene la propiedad de promover el crecimiento de las plantas y que recibió el nombre de giberelina (6).

Actualmente se sabe que existen 90 giberelinas, pero sólo 20 se han podido caracterizar (8), de las cuales cuatro se han encontrado en plantas superiores (20). Difieren ligeramente unas de las otras en su estructura química, pero biológicamente se comportan en formas muy diferentes (8).

Phinney y West (28) clasifican las giberelinas en dos grupos de acuerdo con su actividad biológica: a) Giberelinas propiamente dichas, que son aquellos compuestos que tienen estructura química específica y un espectro muy amplio en su actividad biológica. b) Sustancias giberelinoides, que constituyen aquellos compuestos con una estructura química no determinada y que presentan límites más restringidos de actividad biológica.

II. Presencia de giberelinas en plantas superiores

La amplia respuesta de cricimiento de las plantas inducida por el ácido giberélico, la forma de giberelina más usada en las investigaciones, dió origen a la hipótesis de que las giberelinas formaban parte de las sustancias normales del crecimiento de las plantas superiores (18).

Investigaciones realizadas sobre semillas de frijol (Phaseolus vulgaris L. var 'Kentucky Wonder'), indicaron una íntima relación entre el contenido de giberelinas y el estado de desarrollo de las semillas (2). Corcoran y Phinney (4) encontraron un nivel significativamente mayor de sustancias giberelinoides en semillas tiernas de frijol que en semillas maduras. Otras investigaciones sobre semillas de frijol determinaron la presencia de dos materiales cristalinos que se denominaron factor I y factor II, se logró identificar el factor I como A_1* y el factor II como posible A_5* (27).

III. Algunos efectos biológicos de las giberelinas

Las giberelinas juegan un papel importante en el alargamiento y división celular en el tejido sub-apical (32). Experimentos hechos sobre plantas de frijol para determinar cual de las giberelinas promueve la mayor longitud de los tallos, lograron establecer que A_3 y A_4 presentan la mayor actividad, en orden decreciente A_5, A_6, A_7, A_9 y A_2, menos y A_8 ninguna (34).

Simultáneamente con la división y crecimiento de las células, las giberelinas producen actividad enzimática (32). Investigaciones realizadas por Kurayashi y Muir (19), establecieron que las giberelinas estimulan la formación de enzimas proteolíticas en las células. Ensayos hechos por Jones y Varner (17) indicaron que las giberelinas inducen la formación de la α-amilasa en el endosperma de cebada, en proporción logarítmica a la concentración de giberelinas.

* Se refiere a la serie de las sustancias giberelinas que van desde A_1 a A_{90}.

Los tratamientos con giberelinas dan en efecto, un rápido aumento en la concentración de auxinas en las plantas (16).

IV. Pruebas biológicas

Existen muchas pruebas biológicas que permiten determinar la presencia de giberelinas en un extracto. Para este objetivo se utilizan más las plantas enanas cuyo enanísmo se deba a un solo gen. Este sistema es el más sencillo para ser analizado al nivel fisiológico y bioquímico, ya que se piensa que un solo gen actúa controlando un paso particular en el proceso.

Plantas enanas de maíz

En los mutantes enanos de maíz, el enanismo se debe a un solo gen. Reaccionan a cantidades pequeñas de ácido giberélico y aparentemente no presentan respuesta a las auxinas y citoquinonas (34, 35).

Plantas enanas de frijol

Los mutantes enanos de frijol muestran actividad cuando se les aplican sustancias giberelinoides; su respuesta consiste en la elongación del tallo (24). Actualmente se usa como prueba cuantitativa la expansión de las hojas (15).

Investigaciones hechas por Greene y Proaño (12), sobre el contenido de giberelinas en mutantes enanos de frijol, mostraron que la aplicación acuosa de ácido giberélico a las hojas no altera en ninguna forma la clorofila.

V. Inhibidores de giberelinas

Los inhibidores de giberelinas son sustancias que causan cambios típicos en el crecimiento de las plantas, produciendo efecto contrario a los de las giberelinas, como por ejemplo, el retardo del crecimiento del tallo y las hojas; así mismi, afectan ciertas actividades enzimáticas de las plantas (25).

Estudios realizados sobre varios extractos originados de semillas y frutos de distintas especies de plantas, mostraron que muchos extractos, los llamados antigiberelinas, en forma natural suprimen el efecto del ácido giberélico. Por ejemplo, los extractos originados de Ceratonia siliqua, fueron parcialmente purificados y dieron cuatro sustancias inhibidoras de giberelinas cuya estructura química aún no se conoce (5).

Estudios comparativos en plantas de frijol, entre el efecto de las giberelinas y de sustancias inhibidoras sintéticas tales como el cloruro de (2-cloroetil)trimetil-amonio (CCC), establecieron que el CCC reduce tanto el crecimiento en altura, como el nivel endógeno de las giberelinas (31). La adición de CCC a un medio de cultivo de Gibberella fujikuroi disminuyó la producción del ácido giberélico, actuando como una barrera en la producción biosintética de las giberelinas y de sus precursores (7). El CCC aplicado a las semillas de cebada afecta las sustancias del crecimiento y activa las enzimas del catabolismo (11).

VI. Purificación e identificación de los extractos

La presencia de sustancias giberelinoides en plantas superiores ha estimualdo la introducción de nuevas técnicas analíticas.

Las primeras técnicas usadas para la purificación e identificación de los extractos fueron la columna de cromatografía, diálisis y cromatografía de papel (1). Actualmente se usa con más frecuencia la cromatografía de capa fina (30), ya que presenta algunas ventajas tales como comodidad, rapidez y sensibilidad. Para observar las sustancias giberelinoides sobre las placas de cromatografía, se hace necesario rociar las placas con reactivos que hagan sobresalir las sustancias que se buscan (23).

Detección bajo la luz ultravioleta

Esta prueba consiste en colocar las placas de cromatografía bajo la luz de una lámpara ultravioleta. Esto activa la mancha de las giberelinas dando una fluorescencia amarilla pero solamente después de la aplicación de ácido sulfúrico (1). Algunos investigadores consideran que la absorción de la luz ultravioleta está acorde con la estructura heteromolecular de las giberelinas y ésto fue confirmado por la absorción de la luz ultravioleta por los derivados "dienonas", sirviendo como modelo el ciclo hexadieno (6).

MATERIALES Y METODOS

Se usaron semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L. var. 'México-80R') provenientes unas de plantas normales, y otras de plantas enanas inducidas por mutación (26).

Las semillas de frijol normal y enano se sembraron en el invernadero. A los tres meses cuando las plantas alcanzaron la madurez, se procedió a cosecharlas. Las semillas obtenidas se emplearon posteriormente para obtener los extractos.

I. Extracción de las sustancias giberelinoides

Se hizo la extracción siguiendo el procedimiento descrito por Hashimoto y Rappaport (13). Se depositaron en un vaso 100 gramos de semillas agregándoles inmediatamente 150 ml de metanol al 50%. Este material fue homogenizado en un mezclador Omnimixer durante 5 minutos. Seguidamente el material homogenizado se colocó en un vaso de precipitación de 400 ml y se adicionó 150 ml más de metanol al 50%; se mezcló bien y se dejó en reposo por 24 horas a 4°C. Después de este tiempo se separó el precipitado del líquido supernadante (que fue de 250 ml), se filtró en un embudo "Buchner" sobre el cual se colocó papel filtro Whatman No. 1. Se redujo el volumen de la parte líquida obtenida después de la filtración, utilizando la evaporación a baja presión hasta eliminar todo el metanol. Se dejó así solamente la fase acuosa, a la que se le añadió agua destilada hasta que se obtuvo un volumen de 300 ml.

Esta fase acuosa resultante se ajustó a un pH de 7,5 con carbonato de sodio, luego se le agregó 300 ml de acetato de etilo y se colocó en un vaso de precipitación de 600 ml y se dejó en reposo por 24 horas a 4°C, con el objeto que el solvente extrajera todas las sustancias giberelinoides posibles. Posteriormente se separó la fase acuosa del acetato de etilo con la ayuda de un embudo separador, logrando de nuevo los 300 ml de acetado de etilo anteriormente utilizados, los que se guardaron en un matraz Erlenmayer de 600 ml a 4°C. A la fase acuosa resultante se le adicionó 300 ml de acetato de etilo y se dejó en reposo por 24 horas a 4°C; después de este tiempo se separó la fase acuosa de la orgánica y los 300 ml de acetato de etilo resultante se juntaron con el anterior formando un volumen de 600 ml. A este extracto de acetato de etilo de pH 7,5 se llamó "fracción neutral". Dicha fracción se pasó a través de una columna de vidrio que contenía sulfato de sodio anhidro, con el fin de extraer el agua que pudiera haber quedado en el solvente.

Esta fase se evaporó a baja presión y a temperatura del ambiente hasta sequedad; a este residuo se le adicionaron 10 ml de agua destilada libre de iones, quedando esta solución lista para ser usada en las pruebas biológicas.

Para los extractos utilizados en cromatografía, se detuvo la evaporación cuando el extracto inicial quedó reducido a un ml.

II. Separación de las sustancias activas por cromatografía de capa fina

Para este determinación se usó la técnica de cromatografía de capa fina descrita por McMillan y Suter (23).

Se prepararon en primer lugar placas con Gel H de Silica, tomando 30 gramos de Gel H de Silica en polvo, que se suspendieron en 65 ml de agua destilada. Con esta suspensión se cubrieron cinco placas de vidrio de 20,0 x 20,0 cm. Las placas así preparadas se dejaron secando durante una noche.

Antes de usar las placas, se calentaron en un horno por espacio de 30 minutos a 120°C, con el objeto de activarlas. Una vez que estuvieron frías se depositó sobre ellas la solución por separar. En todos los casos se usó 50 microlitros.

Las placas ya con las manchas de los extractos se colocaron en una cámara de vidrio que contenía el solvente formado por una mezcla de Benzeno:n-Butanol:Acido acético (75:25:5).

Cuando el solvente había recorrido una distancia de 15 cm sobre las placas, se retiraron éstas de la cámara de vidrio y se las puso a secar al medio ambiente. Una vez secas, las placas se atomizaron con ácido sulfúrico y agua (10:30). Seguidamente se colocaron en un horno a 120°C por 10 minutos e inmediatamente se procedió a observarlas bajo la luz de una lámpara ultravioleta.

Se prepararon otras placas con polvo de MN-Celulosa 300G para cromatografía de capa fina. Se pesaron 15 gramos de polvo de celulosa y se disolvió en 90 ml de agua destilada. Esta suspensión se pasó al aplicador y se procedió a cubrir las placas en la forma ya descrita. Se las dejaron posteriormente secar a la temperatura

del ambiente, y después se las activaron como en el caso anterior. Cuando estuvieron frías se procedió a colocar en ellas los diferentes extractos por identificar.

Las placas, ya con los extractos aplicados, fueron puestas en una cámara de vidrio que contenía el solvente conocido bajo el nombre de "semi-stench", el cual debe usarse 24 horas después de haberse preparado (8). La preparación del solvente se detalla en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Preparación del solvente para cromatografía "semi-stench".

Reactivos	Cantidad
Acido etileno diamino tetraacético	1,2 gr
14,8 N de hidróxido de amonio	115,0 ml
Agua destilada	935,0 ml
n-Propanol	350,0 ml
Isorpopanol	75,0 ml
n-Butanol	75,0 ml
Acido isobutírico	2500,0 ml

Cuando el solvente recorrió una distancia de 15 cm sobre la placa, ésta se sacó de la cámcara de vidrio y se puso a secar a la temperatura del ambiente y posteriormente se atomizó con ácido sulfúrico al 5% en etanol. Seguidamente se la colocó en el horno a 120°C por cinco minutos e inmediatamente se observó bajo la luz ultravioleta.

III. Determinación de la actividad biológica de los extractos

A. Cambio en el contenido de clorofila de las hojas de frijol mutante enano.

Este ensayo biológico se basa en las propiedades que presentan las giberelinas de expander las hojas y no alterar en ninguna forma el contenido de clorofila de las mismas (12).

1. Pruebas con los extractos de semillas de frijol

Se sembraron semillas de frijol enano en cajas de madera que contenían tierra tratada con bromuro de metilo. Estas cajas fueron colocadas en el invernadero bajo condiciones de humedad y temperatura ambiental.

Cuando las semillas germinaron se esperó cinco días (hasta que las hojas cotiledonales estuvieron desarrolladas) para comenzar los tratamientos. Después de este tiempo, se seleccionaron dos hojas por planta para cada repetición de los tratamientos. Se extrajo con un saca-bocado un disco de 38,48 mm^2 de superficie (7mm de diámetro) de cada hoja, procurando no tocar las venas principales. Estos dos discos se colocaron en un tubo de ensayo que contenía seis ml de metanol puro y se dejó en reposo por 24 horas con el propósito de que el solvente extrajera toda la clorofila de dichos discos. Seguidamente se midió la densidad óptica de la solución de clorofila en un volumen final de seis ml a 665 mμ en un espectrofotómetro.

A las hojas que se les habían sacado los discos,se les aplicaron los siguientes tratamientos:

a) Extracto crudo de frijol normal y enano

b) Extracto de frijol normal y enano, pasado por cromatografía de capa fina

c) Mancha del extracto de frijol normal y enano, aislada por cromatografía de capa fina.

El extracto crudo, tanto de frijol normal como enano, es el que se evaporó a sequedad y se disolvió en agua destilada libre de iones. El extracto de frijol, pasado por cromatografía, es el que no se evaporó totalmente y cuando el extracto inicial quedó reducido a un ml, se pasó por cromatografía de capa fina extrayendo de nuevo las sustancias giberelinoides con acetato de etilo. Las manchas son aquellas partes de extracto que por cromatografía presentan características similares a las giberelinas.

Todos los extractos en sus diferentes formas estuvieron disueltos en agua destilada, y se les adicióno Tween-20 (fijador y esparcidor del solvente sobre las hojas) en una concentración de 0,05% e inmediatamente se atomizó sobre las hojas a razón de un ml por hoja. Para la aplicación de los extractos se usó un aplicador tipo DeVilbiss. Una vez que las plantas recibieron los diversos tratamientos se esperó ocho días para extraer de nuevo los discos en la manera ya descrita. Después se calcularon las diferencias de las densidades ópticas medidas antes y después de haber aplicado los tratamientos para los respectivos análisis estadísticos.

2. Pruebas con ácido giberélico.

Se realizaron varias pruebas usando el método anterior, pero con concentraciones conocidas de ácido giberélico para la construcción de la curva patrón, la cual sirvió para comparar la densidad

óptica obtenida de los extractos a fin de atribuir a éstos una actividad comparable en concentraciones de ácido giberélico. El ámbito probado tenía por límite de 10^{-3} hasta tres partes por millón de ácido giberélico.

De cada uno de los diversos tratamientos se hicieron 10 repeticiones.

B. Ensayo con semillas de lechuga (Lactuca sativa L. var. 'Merit')

Este ensayo se basa en las propiedades que presentan algunas sustancias giberelinoides de estimular el crecimiento del hipocótilo y raíz de las semillas de lechugas (Lactuca sativa L. var. 'Merit') (9).

Para este ensayo se usó semillas de lechugas de la variedad 'Merit', con las que se hicieron pruebas preliminares de germinación para tratar de obtener un material lo más uniforme posible.

Se usó el método descrito por Crozier y Audus (9). Para ello se tomaron 100 semillas que se depositaron en un papel filtro Whatman No. 1, el que a su vez se colocó en un plato de Petri. El papel filtro se humedeció con agua destilada a fin de mantener el ambiente saturado de humedad. Seguidamente las semillas se incubaron por 36 horas a 25°C.

Al cabo de éste tiempo se tomaron diez semillas para cada tratamiento y se colocaron en un papel filtro, el que a su vez se colocó en platos Petri. A continuación se le adicionó 0,1 ml de solución nutritiva Hoagland No. 2 y tres ml de los diversos tratamientos por probar, que fueron:

a) Extracto crudo de frijol normal y enano

b) Manchas de los extractos de frijol normal y enano, obtenidas por cromatografía de capa fina

c) Acido giberélico, en una concentración de 100 ppm

d) Cloruro de (2-cloroetil)trimetil-amonio (CCC) en una concentración de 500 ppm.

Una vez que las semillas recibieron los diversos tratamientos se incubaron por tres días a 25°C y a 16 horas de fotoperíodo. Se tomaron medidas de la altura del hipocótilo y de la longitud de las raíces. Se hicieron diez repeticiones por cada tratamiento.

Cuadro 2. Preparación de la solución nutritiva Hoagland No. 2.

Reactivos		Cantidad (ml) por litro de agua*
Fosfato ácido de amonio	1M	1
Nitrato de potásio	1M	6
Nitrato de calcio	1M	4
Sulfato de magnesio	1M	2
Micronutrimentos **		**Gramos por litro de agua**
Acido bórico		2,86
Cloruro de manganeso		1,85
Sulfato de zinc		0,22
Sulfato de cobre		0,08
Acido molybdico		0,02
Tartarato de hierro		0,05

El pH se ajusta a seis con 0,1 N de ácido sulfúrico (14).

** Se usa un ml de micronutrimento por litro de solución nutritiva.

* Se usa agua destilada libre de iones.

IV. Ensayos biológicos para tratar de identificar un posible inhibidor en plantas enanas

A. Aplicación foliar de los extractos a las hojas de frijol mutante enano.

Se sembraron semillas de frijol enano como en el caso de la determinación de la actividad biológica de los extractos, Se hicieron cuatro tratamientos:

a) Acido giberélico en una concentración de 1 ppm.

b) Extracto crudo de frijol normal

c) Mezcla de ácido giberélico con el extracto crudo de frijol enano

d) Mezcla del extracto crudo de frijol normal y enano.

Se seleccionaron dos hojas de una planta para cada repetición de los tratamientos, sacándose los discos como en los casos anteriores. Se hicieron diez repeticiones por cada tratamiento.

B. Ensayo en soluciones hidropónicas

Se sembraron semillas de frijol normal en cajas de madera que contenían tierra tratada con bromuro de metilo. Después de ocho días de haber germinado las semillas se trasladaron las plantas a los frascos que contenían los diversos tratamientos en solución nutritiva Hoagland No. 2 (14).

Se hicieron los siguientes tres tratamientos con tres repeticiones cada uno:

a) Solución nutritiva más CCC en una concentración de 1000 ppm.

b) Solución nutritiva más extracto crudo de frijol enano

c) Solo solución nutritiva, como control.

Después de 15 días de haber aplicado los tratamientos se tomaron medidas de la longitud de las raíces, altura de las plantas, peso fresco y seco de todas las plantas.

RESULTADOS

I. Separación de las giberelinas por cromatografía de capa fina

Usando el método de cromatografía de capa fina, se encontró que la fracción "neutral" de los extractos de semillas maduras de frijol normal y enano, carecen de A_3 (ácido giberélico) y A_7, como se aprecia en las figuras 1 y 5.

Se separaron seis manchas de cada extracto con valores de R_f* similares. De todas estas manchas, sólo la de R_f de 0,36 dió reacción con ácido sulfúrico y la luz ultravioleta (ver Figura 3). Esta mancha es la más obscura y fue la que mostró mayor actividad en las pruebas biológicas. Los estandares fueron encontrados a R_f 0,57 para A_3 y 0,76 para A_7: ambos dieron el color amarillo con ácido sulfúrico y luz ultravioleta, característica principal de las giberelinas.

Otros cromatogramas fueron hechos de la fracción neutral tanto del extracto de semillas de frijol normal y enano, pero en lugar de colocar manchas redondas de los extractos sobre las placas, se colocaron las manchas en forma de barra para ver sí era posible detectar algunas diferencias entre ambos extractos. No fue posible encontrar diferencias (ver Figura 4).

En las pruebas para la determinación de la actividad de los diferentes R_f del cromatograma de capa fina, y usando placas de Gel H de Silica, se obtuvieron los siguientes resultados: 1) El extracto de semillas de frijol normal mostró dos zonas de actividad que

* Se refiere a la relación de la distancia recorrida por la mancha y el solvente.

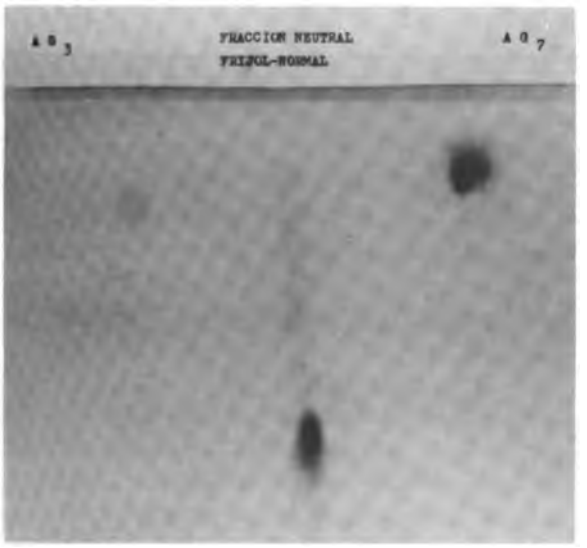

Fig. 1 Cromatograma (en Ben/But/ Ac.Acet) del extracto de frijol normal , A_3 y A_7.

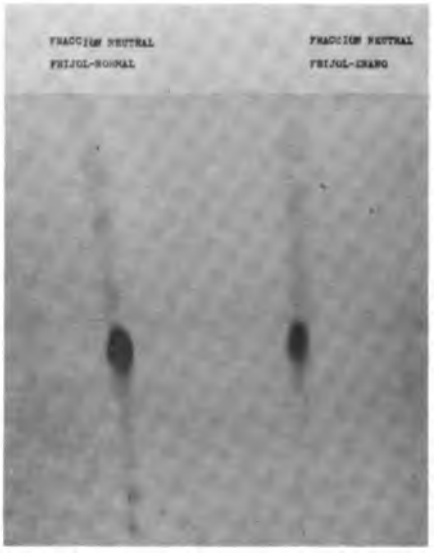

Fig. 2 Cromatograma de los extractos de frijol normal y enano (en Ben/ But/Ac.Acet.).

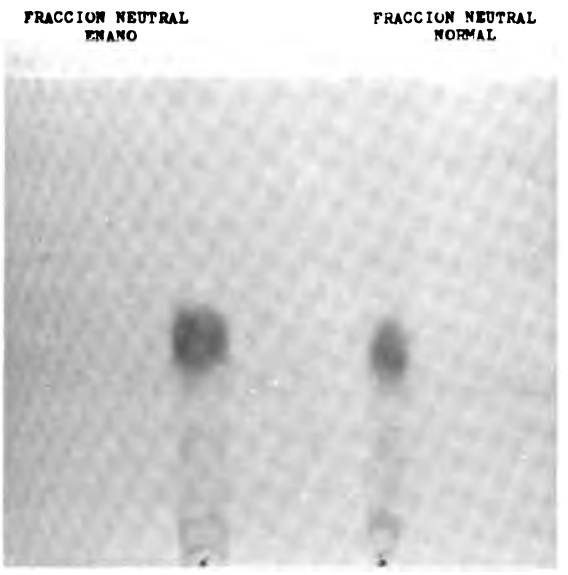

Fig. 3 Cromatograma (en Ben/But/ Ac.Acet.) de los extractos de frijol normal y enano.

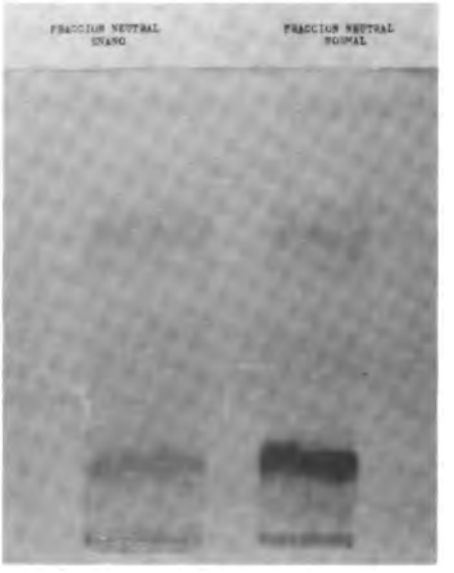

Fig. 4 Cromatograma (en Ben/But/Ac.Acet.) de los extractos de frijol normal y enano.

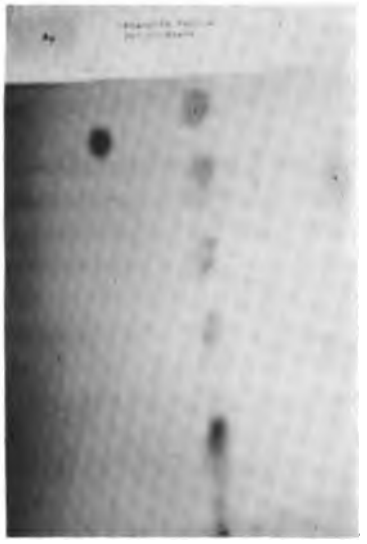

Fig. 5 Cromatograma (en Ben/But/Ac.Acet.) del extracto de frijol enano, A_3 y A_7.

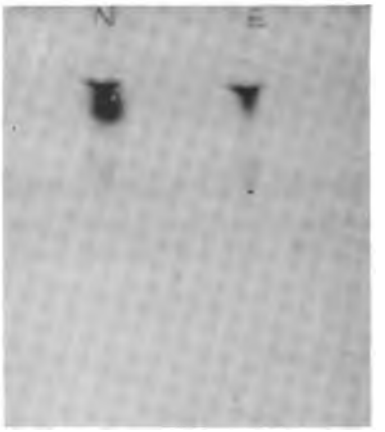

Fig. 6 Cromatograma (en 'semi-stench') de los extractos de frijol normal y enano.

Fig. 7 Cromatograma (en 'semi-stench') de los extractos de frijol normal y enano.

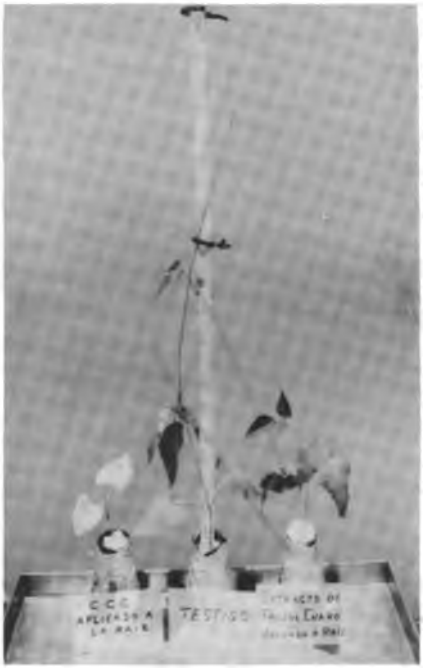

Fig. 11 Efecto del inhibidor natural y sintético en plantas de frijol normal.

corresponden más o menos a los R_f de 0,36 y 0,49. 2) El extracto de frijol enano manisfestó una zona de actividad que corresponde a un R_f de 0,36, además se encontró una zona que inhibió la actividad del extracto y que corresponde a un R_f de 0,96, pero en esta zona no fue posible detectar manchas visibles (ver Figuras 6 y 7).

Cuando se usaron las placas preparadas con polvo de celulosa y el solvente "semi-stench", se logró una mejor separación de las sustancias giberelinoides que en las placas de Gel H de Silica (ver Figuras 8 y 9). Al examinar dichas placas bajo la luz ultravioleta, se observaron dos manchas fluorescentes amarillas que posiblemente correspondan a dos sustancias giberelinoides, pero al hacer las pruebas de actividad de los diferentes R_f no se encontró respuesta de efecto. Posiblemente el solvente reacciónó con las manchas e interfirió con el efecto de las mismas.

II. Determinación de la actividad biológica de los extractos

A. Cambio del contenido de clorofila de las hojas de frijol mutante enano.

Se usó esta prueba para establecer la relación cuantitativa entre la actividad demostrada por la fracción neutral de los extractos obtenidos de semillas de frijol normal y enano y la actividad de un estandard que fue el ácido giberélico en forma de una sal de potasio con 80% de pureza y 20% de ingredientes orgánicos.

Para tener una base de comparación, fue necesario construir una curva patrón usando concentraciones conocidas de ácido giberélico con una variación que fluctuó de 10^{-3} a tres ppm (ver Figura

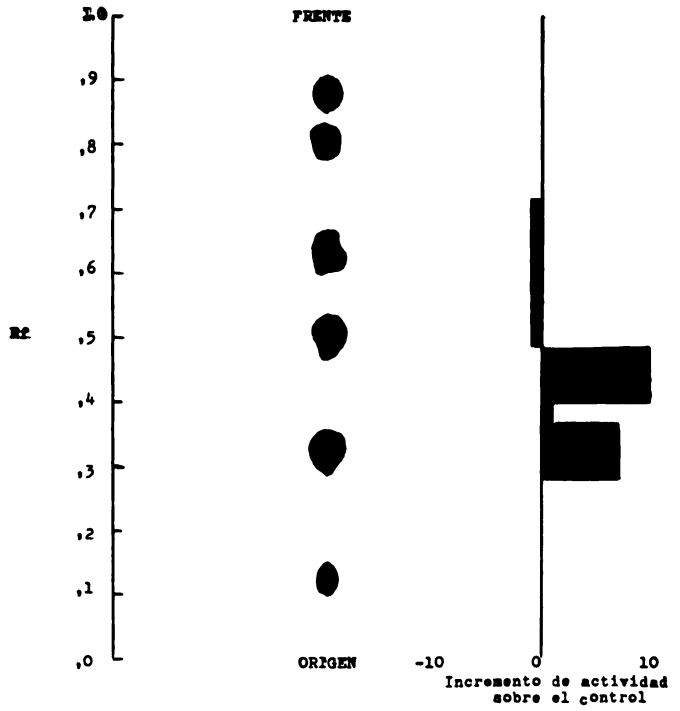

Fig. 6 A la izquierda representamos el cromatograma del extracto de frijol normal. A la derecha los resultados de la actividad de los diferentes Rf sobre el contenido de clorofila de las hojas de frijol enano. El área negra indica el incremento de actividad sobre el control.

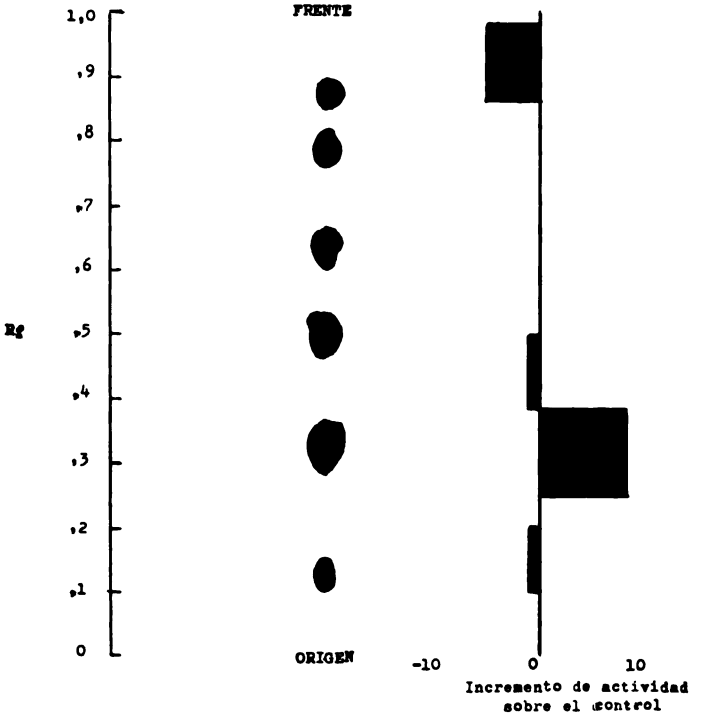

Fig. 7 Representación del cromatograma del extracto de frijol enano. A la derecha presentamos los resultados de actividad de los diferentes Rf sobre el contenido de clorofila de las hojas de frijol enano. El área negra indica el incremento de actividad sobre el control.

10). La línea de regresión así obtenida sirvió para comparar los valores de absorción de luz presentados por los extractos de frijol normal y enano, atribuyéndoles así una actividad relativa comparable con concentraciones conocidas de A_3.

La actividad biológica de las manchas de ambos extractos que presentan características similares a las sustancias giberelinoides, se presenta en el Cuadro 3.

En base a los valores de absorción de luz correspondiente a cada mancha de los extractos de frijol normal y enano, se hicieron comparaciones con los valores de absorción de luz alcanzado con las concentraciones conocidas de ácido giberélico (ver Cuado 4).

Se dió a las manchas de los extractos un valor aproximado de actividad que se puede expresar en concentraciones de ácido giberélico.

En forma cuantitativa la fraccion neutral de frijol normal y enano presentan una concentración de sustancias giberelinoides correspondiente a la respectiva actividad manifestada por las concentraciones de ácido giberélico con las cuales se aproxíma.

III. Pruebas biológicas de la fracción neutral de frijol normal y enano en sus diversas formas.

La reacción presentada por las plantas enanas al ser atomizadas con los extractos de frijol normal en su forma cruda y purificada se observa en el Cuadro 3.

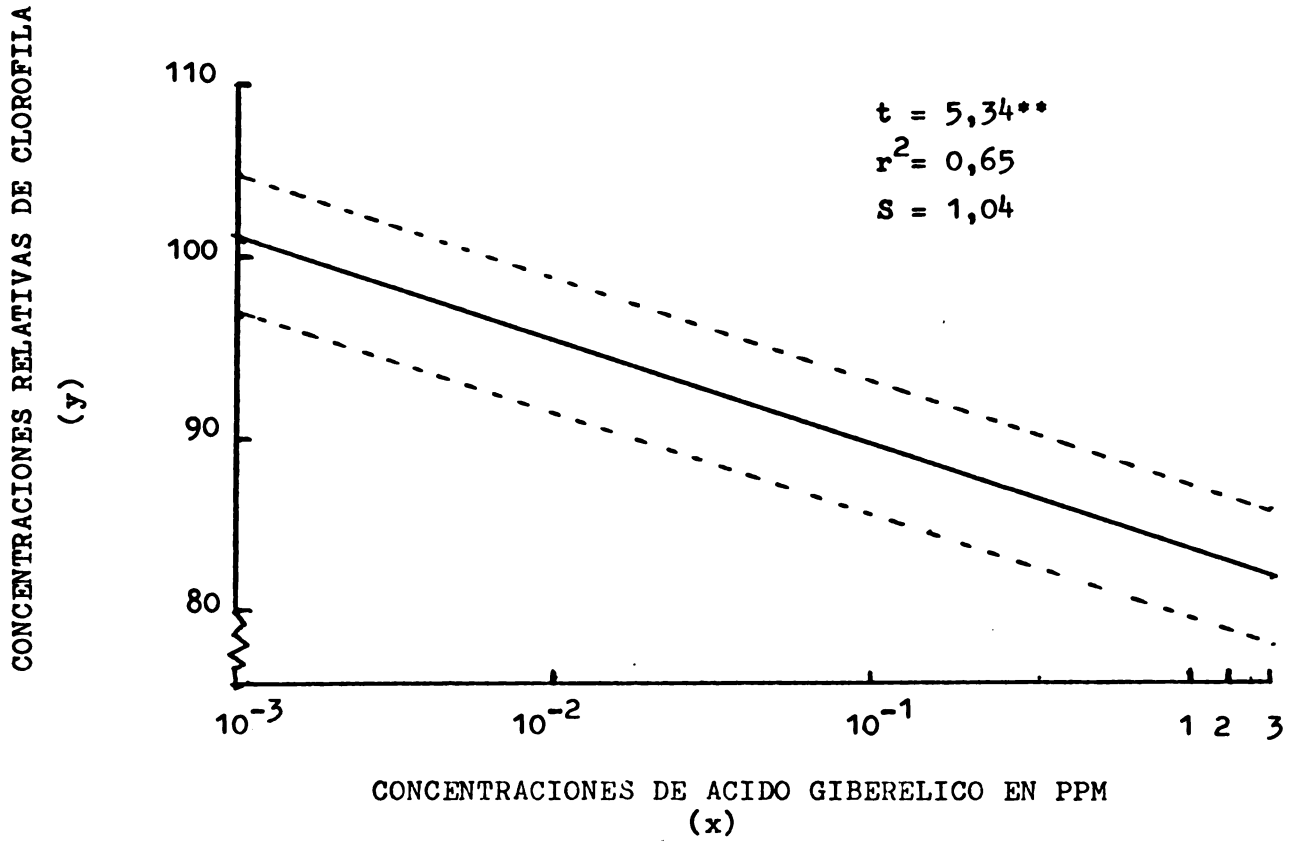

Fig. 10 - Regresión lineal correspondiente a los valores de absorción de luz al utilizar discos de hojas de frijol mutante enano (Phaseolus vulgaris var. México - 80R) y concentraciones conocidas de ácido giberélico.

Comparando las medias de los tratamientos por el método de Duncan, se encontró que el extracto de frijol normal pasado por cromatografía de capa fina dió un estímulo significativamente mayor en las hojas, en relación con las que recibieron la aplicación del extracto crudo del frijol normal o con el testigo. No se encontró diferencias significativa de respuesta entre el extracto crudo del frijol normal y el testigo, posiblemente debido a efecto de dosis (ver Cuadro 9).

En un segundo ensayo se probó el extracto crudo de semillas de frijol enano sobre las hojas de frijol enano, los resultados se presentan en el Cuadro 3. No se encontró diferencia de respuesta a los tratamientos.

Seguidamente se probó el extracto de frijol enano pero en este caso purificado por cromatografía, los resultados se presentan en el Cuadro 3. No se encontró diferencias significativa en el contenido de clorofila de las hojas.

Por cromatografía de capa fina se pudo determinar la presencia de manchas que cuando se les aplicó la solución de ácido sulfúrico y se las observó bajo la luz ultravioleta presentaron características similares a las sustancias giberelinoides. Estas manchas se encontraron tanto en el extracto de frijol normal como en el enano.

Para probar la actividad de dichas manchas se hizo un ensayo que consistió en la aplicación de las manchas de los extractos de frijol normal y enano separadas por cromatografía de capa

fina a las hojas de frijol enano. También se aplicaron las sustancias del extracto enano (sin las manchas). Los resultados se observan en el Cuadro 3.

Se encontró que las manchas de los extractos de semillas de frijol normal y enano dieron respuesta diferencial sobre el contenido de clorofila de las hojas de frijol enano tratadas con las sustancias del extracto de frijol enano (sin las manchas) y el testigo a un nivel de 1% de probabilidad. Al comparar las medias de los efectos de las manchas de ambos extractos no se encontraron diferencias significativas.

Para descartar la posibilidad de que existieran en el extracto de frijol normal otras sustancias que estimularan la expansión de las hojas de frijol enano además de su mancha de R_f 0,36, se probó el resto del cromatograma (sin la mancha). Los resultados se observan en el Cuadro 5.

Se compararon las medias de los tratamientos y no se encontraron diferencia significativa entre ellos.

IV. Pruebas biológicas con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L. var. 'Merit').

Se encontró que las semillas que recibieron la aplicación de A_3 dieron un aumento en la altura del hipocótilo, dando diferencia significativa de respuesta en relación de las plantas que fueron tratadas con CCC y el testigo, al nivel de 1% de probabilidad. Las plantas a las que se les aplicó CCC mostraron una disminución en el crecimiento del hipocótilo en relación con el testigo y con

las plantas tratadas con A_3. Esta diferencia fue significativa al nivel de 1 % de probabilidad.

La longitud de las raíces fue significativamente mayor en las plantas que fueron tratadas con A_3 en relación con las plantas tratadas con CCC a un nivel de 5 % de probabilidad. No se detectó una diferencia significativa entre las plantas que recibieron A_3 y el testigo. La longitud de las raíces de las plantas que recibieron CCC como tratamiento, disminuyó en relación con el testigo y a las plantas que recibieron aplicación de A_3, dando una diferencia significativa a un nivel de 5 % de probabilidad (ver Cuadro 6).

El segundo ensayo consistió en aplicar a las semillas de lechuga previamente germinadas, los extractos crudos de semillas maduras de frijol normal y enano. Los resultados se presentan en el Cuadro 7.

Al comparar las medias de los tratamientos se encontró que la altura del hipocótilo de las plantas de lechuga que recibieron el extracto de frijol normal fue mayor en relación con la altura del hipocótilo de las plantas tratadas con el extracto de semillas de frijol enano y el testigo, a un nivel de 1 % de probabilidad. Entre las plantas que recibieron el extracto de frijol enano y el testigo no se detectó diferencia significativa.

La longitud de las raíces de las plantas de lechuga que recibieron el extracto de frijol enano fue mayor en relación con la longitud de las raíces de las plantas que fueron tratadas con el extracto de frijol normal y el testigo, al nivel de 1 % de

probabilidad. Se encontraron diferencias altamente significativas entre la longitud de las raíces de las plantas tratadas con el extracto de frijol normal y el testigo.

El tercer ensayo consistió en la aplicación de las manchas de los extractos tanto del frijol normal como del enano a las semillas de lechuga previamente germinadas, estas manchas son las que presentaron por cromatografía, características similares a las sustancias giberelinoides. Los resultados se presentan en el Cuadro 8.

Comparando las medias de los tratamientos no se encontraron diferencias significativas en la respuesta de los tratamientos en lo que respecta a la altura del hipocótilo.

Respecto a la longitud de las raíces se manifestaron diferencias significativas entre las plantas que recibieron la mancha del extracto de frijol normal y el testigo que fue el que mostró mayor longitud (a un nivel de 5 % de probabilidad). No se encontró diferencia significativa entre la longitud de las raíces de las plantas que recibieron como tratamiento la aplicación tanto de la mancha del extracto de frijol normal como enano.

V. Ensayos biológicos para tratar de identificar un posible inhibidor en el extracto de semillas de frijol enano.

Cuando se aplicó el extracto de frijol enano en su forma cruda y purificada a las hojas de frijol enano no manifestó actividad, pero si, las manchas aisladas del mismo extracto; en base a estos resultados, se planearon ensayos para tratar de detectar la presencia de una posible sustancia inhibidora en dicho

extracto.

El primer ensayo consistió en la aplicación a las hojas de frijol enano, varios tratamientos cuyos resultados se presentan en el Cuadro 9.

Comparando las medias de los tratamientos se encontró que tanto A_3 en la concentración de 1 ppm, la mezcla de A_3 con el extracto crudo de frijol enano y el extracto crudo de frijol normal, dieron efecto significativo sobre la expansión foliar de los discos de las hojas de frijol enano que recibieron la aplicación de los extractos de frijol enano, la mezcla de los extractos de frijol enano y normal y el testigo, a un nivel de 1 % de probabilidad. No se encontraron diferencias entre los tres tratamientos que estimularon la expansión foliar de las hojas del frijol enano.

El peso seco de los discos disminuyó en aquellas hojas que recibieron los tratamientos de A_3, la mezcla de A_3 y el extracto crudo de frijol enano y el extracto crudo de frijol normal. Esta disminución fue significativa sobre el peso seco de los discos que recibieron los tratamientos del extracto de frijol enano, la mezcla del extracto de frijol enano y normal y el testigo a un nivel de 5 % de probabilidad. No se encontró diferencia de peso entre los discos de las hojas que recibieron los tratamientos de A_3, la mezcla de A_3 con el extracto de frijol enano y el extracto de frijol normal.

El segundo ensayo biológico para determinar la presencia de una sustancia inhibidora en el extracto de semillas de frijol enano,

consistió en aplicar el extracto de frijol enano a las raíces de las plantas de frijol normal y tratar de comparar la respuesta con un inhibidor sintético como el CCC. Los resultados se presentan en el Cuadro 10.

Comparando las medias de los tratamientos se encontró que el CCC produjo disminución en el peso fresco de las plantas en relación con las que recibieron los tratamientos del extracto de frijol enano y el testigo, a un nivel de 1 % de probabilidad. Las plantas que recibieron el tratamiento del extracto de frijol enano no mostraron diferencias significativas en relación con el testigo.

El peso seco de las plantas que recibieron la aplicación de CCC mostró diferencia sobre el peso seco de las plantas que recibieron el extracto del frijol enano y el testigo. El peso seco de las plantas que recibieron la aplicación del extracto de frijol enano fue menor que el testigo, dando una diferencia significativa al 1 % de probabilidad.

Se hizo análisis de la altura de las plantas y longitud de las raíces. Los resultados se presentan en el Cuadro 11.

Comparando las medias de la altura de las plantas y la longitud de sus raíces, se encontró que tanto el inhibidor natural del extracto de frijol enano como el CCC disminuyeron la altura de las plantas en relación al testigo en un nivel de 1 % de probabilidad. Cuando comparamos la altura de las plantas tratadas con CCC y el inhibidor natural, se logró determinar que el CCC disminuyó en mayor proporción dicha altura que el inhibidor natural.

Esta diferencia fue significativa a un nivel de 1 % de probabilidad.

En lo que respecta a la longitud de las raíces, el CCC acortó dicha longitud en relación con las plantas que recibieron la aplicación del extracto crudo del frijol enano y el testigo, dando una diferencia significativa a un nivel de 5 % de probabilidad. No se encontró diferencia entre la longitud de las raíces de las plantas que recibieron la aplicación del extracto del frijol enano y el testigo.

DISCUSION

En las pruebas biológicas con los extractos, se encontró que mientras ambas manchas de R_f 0,36 dieron actividad similar, los extractos crudos de las dos líneas de frijol (normal y enano) dieron resultados completamente diferentes. Se logró establecer que tanto el extracto de frijol normal como de enano guardan la misma relación en lo que se refiere a la cantidad y actividad de sus sustancias giberelinoides.

Las sustancias giberelinoides que están presentes en los extractos de frijol normal y enano, al ponerse en contacto con las hojas de frijol enano estimularon la expansión de las mismas. Esta observación muestra relación con lo investigado por Greene y Proaño (12), quienes encontraron que A_3 induce una reducción en el contenido de clorofila de las hojas, pero no alteró en ninguna forma la clorofila ya que este fenómnno está relacionado solamente con la expansión de las hojas. Apoyado en esta propiedad de las giberelinas, se desarrolló un método que determinó cuantitativamente los cambios en el contenido de clorofila de las hojas ocasionado por la expansión foliar inducida por las sustancias giberelinoides. Con base a los resultados expuestos podemos decir que este método funciona eficientemente y es bueno para determinar la presencia de sustancias giberelinoides en diversos extractos.

En los ensayos con las semillas de lechuga se encontró que las manchas activas de ambos extractos no manifestaron actividad, pero cuando se probaron los extractos crudos de ambas líneas de

frijol sobre dichas semillas, el extracto de frijol normal mostró actividad, lo que demuestra la existencia de más de una sustancia giberelinoide en dichos extractos. Este hecho se comprobó posteriormente en cromatografía de capa fina, cuando se usaron las placas de celulosa y el "semi-stench" como solvente.

Aplicaciones de A_3 estimularon el crecimiento del hipocótilo y raiz de las plantas de lechuga, lo que concuerda con lo investigado por Frankland (10), quien determinó que A_3 estimula el crecimiento del hipocótilo en proporción logarítmica a su concentración. El CCC produjo una reducción tanto en la altura del hipocótilo como en la longitud de las raíces, coincidiendo con lo expuesto por Gaspar y Lacoppe (11), quienes consideran que el CCC actúa como una barrera en la síntesis de las sustancias giberelinoides.

En la determinación de la actividad de los extractos se detectó en el extracto de frijol normal una pequeña zona de inhibición, pero esta zona fue mayor en el extracto de frijol enano, lo que nos hace pensar en la posibilidad de que los rayos gamma afectaron al gen que controla a través del sistema enzimático la producción de una sustancia inhibidora, que probablemente forma parte del sistema regulador del crecimiento normal de la planta.

Se logró determinar en el extracto de frijol enano la presencia de una sustancia inhibidora específica ya que no produce efecto cuando se mezcla con A_3, pero cuando se mezcla con el extracto de frijol normal inhibe la acción de las sustancias giberelinoides presentes en dicho extracto. Esto pone de manifiesto que el enanismo de las plantas usadas en nuestra investigación posiblemente

está relacionado con esta sustancia inhibidora.

El CCC y el extracto de frijol enano, cuando se aplicarion a las raíces de las plantas de frijol normal, disminuyeron el peso fresco y seco de las plantas, pero el inhibidor natural lo hizo en menor proporción. Esto probablemente se debió a efecto de dosificación. Ambos inhibidores disminuyeron la altura de las plantas. En lo que respecta a la longitud de las raíces el CCC produjo disminución de la longitud, contrario al efecto del inhibidor natural que estimuló el crecimiento de ellas, lo que demuestra una vez más la especificidad de esta sustancia.

Todas estas pruebas han reforzado la idea de que el control del crecimiento de las plantas enanas de frijol, se debe a efecto de esta sustancia inhibidora, que posiblemente no está presente en el extracto de frijol normal en la misma cantidad que en el extracto enano o existe en él, en una forma menos poderosa. Es bien conocido en otras hormonas del crecimiento la presencia de sustancias inhibidoras que limitan la actividad de dichas hormonas para que no se produzca un desarrollo ilimitado que termine por dañar la vida de la planta. En este caso parece que la mutación en enano permite que la sustancia inhibidora suprima completamente la acción de las giberelinas.

Aparentemente el mecanismo de acción de esta sustancia inhibidora es competitivo ya que no afecta en ninguna forma las propiedades químicas de las sustancias giberelinoides presentes en el extracto de frijol enano cuando se separan por cromatografía, pero cuando se encuentran tanto las sustancias giberelinoides como la

inhibidora juntas en el extracto, se frena la acción posiblemente en el sitio donde actúa la hormona. Por ejemplo, si este "sitio" es una enzima, podemos pensar que esta sustancia inhibidora se combina con el grupo activo de la enzima. Cuando esto ocurre, se encuentra bloqueado todo avance posterior de la reacción y la enzima es inactivada. En cierto sentido, podemos decir que el inhibidor compite con el sustrato por la enzima.

CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos de esta investigación sacamos las siguientes conclusiones:

1. El método propuesto para determinar cuantitativamente los cambios en el contenido de clorofila de las hojas funciona eficientemente y es bueno para detectar la presencia de las sustancias giberelinoides en los diversos extractos.
2. Los extractos neutrales de las semillas de frijol normal y enano mostraron poseer las mismas sustancias giberelinoides. Estas sustancias manifestaron actividades idénticas en las diversas pruebas biológicas.
3. El extracto neutral de frijol enano separado por cromatografía muestra una zona de inhibición que inmoviliza la acción de las sustancias giberelinoides presentes en los extractos de ambas líneas de frijol. Esta zona de inhibición se encuentra también en el frijol normal pero es menos poderosa.
4. Probablemente esta sustancia inhibidora controle el crecimiento de las plantas enanas de frijol ya que suprime completamente la acción de sustancias giberelinoides.

RESUMEN

Esta investigación tuvo como principal objetivo el estudio de los factores relacionados con el crecimiento y que se encuentran en la fracción neutral de los extractos de semillas de frijol normal y enano, que aparentemente controlan el crecimiento de estas plantas.

En las pruebas de cromatografía de capa fina se determinó que tanto el extracto de semillas de frijol normal como del enano, tienen las mismas sustancias giberelinoides, las que mostraron en las diversas pruebas biológicas poseer igual actividad.

Se logró determinar en el extracto de semillas de frijol enano la presencia de una sustancia inhibidora específica, que inmoviliza las sustancias giberelinoides de los extractos de frijol normal y enano. Posiblemente esta sustancia inhibidora controla directa o indirectamente el crecimiento de las plantas enanas de frijol.

SUMMARY

The neutral ethyl acetate fractions of normal and Dwarf-1 mutant *Phaseolus vulgaris* L. seeds were analyzed by thin-layer chromatography and found to be identical in gibberellin content. Bioassays with these fractions using a dwarf bean leaf disc test revealed that the gibberellins isolated from either line were equally capably of reversing dwarfism. The Dwarf-1 fraction contained in addition a substance which was specifically inhibitory to the neutral fraction gibberellins. Dwarfism was attributed to an imbalance in the inhibitors regulating the gibberellins rather than in the hormones themselves.

Cuadro 3. Diferencias promedias del contenido de clorofila de los discos de hojas de frijol enano, sacados antes y después de haber aplicado la fracción neutral de los extractos de semillas de frijol.

Fuente del extracto	Diferencies promedias de absorción de luz del extracto de clorofila en metanol a 665 mμ
a. Manchas aisladas de los extractos obtenidos de igual cantidad de semillas	
Normal	65,0* (ver Nota 1 en pág. 40)
Enano	73,0*
Testigo	95,0
b. Efecto del extracto de semillas de frijol normal purificado por cromatografía	
Crudo	39,0^{ns} (ver Nota 2 en pág. 40)
Purificado	63,0*
Testigo	32,5
c. Efecto del extracto crudo de frijol enano (ver Nota 3,pág. 40)	
Crudo	50,0^{ns}
Testigo	60,0
d. Efecto del extracto de semillas de frijol enano purificado por cromatografía (ver Nota 4 en la página 40).	
Purificado	27,5^{ns}
Testigo	29,5
e. Diferencias entre los efectos de las manchas aisladas por cromatografía y los extractos crudos (ver Nota 5 en pág. 40).	
Extracto crudo de enano	105,0^{ns}
Mancha del extracto de enano	129,5*
Mancha del extracto de normal	132,0*
Testigo	103,5

* Diferencia significativa al 5% de probabilidad en relacion con el testigo.

ns No significativo

Se compararon las medias de los tratamientos por la prueba de Duncan

Nota 1: Las diferencias entre las manchas del extracto de frijol normal y enano no fueron significatovas.

Nota 2: ANALISIS DE VARIANCIA

Fuente de variación	Grados de libertad	Cuadrados medios Contenido de clorofila
Tratamiento	2	2.577,08**
Error	27	398,61

Nota 3: ANALISIS DE VARIANCIA

Fuente de variación	Grados de libertad	Cuadrados medios Contenido de clorofila
Tratamiento	1	10^{ns}
Error	8	360

Nota 4: ANALISIS DE VARIANCIA

Fuente de variación	Grados de libertad	Cuadrados medios Contenido de clorofila
Tratamiento	1	40^{ns}
Error	8	1.190

Nota 5: ANALISIS DE VARIANCIA

Fuente de variación	Grados de libertad	Cuadrados medios Contenido de clorofila
Tratamiento	3	2.245,35**
Error	34	6,021

** Significativo al 1% de probabilidad.

Cuadro 4. Actividad equivalente de las manchas de los extractos neutros de frijol normal y enano en término del ácido giberélico. Se usó el ensayo de los discos.

Fuente de la mancha	Actividad equivalente de A_3
Normal	0,1 µg ml^{-1}
Enano	0,01µg ml^{-1}

Cuadro 5. Diferencias promedios de absorción de luz. Se usó el ensayo de los discos y las sustancias del resto del cromatograma del extracto del frijol normal (sin las manchas activas).

Tratamientos	Diferencias promedios de absorción de luz
Rest. del cromat. del ext. de frijol normal	$64,50^{ns}$
Testigo	69,00

ANALISIS DE VARIANCIA

Fuente de variación	Grados de libertad	Cuadrados medios Contenido de clorofila
Tratamientos	1	$101,25^{ns}$
Error	18	322,92

Cuadro 6. Valores promedios de la altura del hipocótilo y la longitud de las raíces en milímetros de las plantas de lechugas tratadas con A_3 y CCC.

Tratamientos	Alt. del hipocótilo (mm)	Long. de las raíces (mm)
A_3	29,0*	$22,0^{ns}$
CCC	5,1*	16,1*
Testigo	6,7	23,1

(ver nota 1 en la página 42)

Nota 1: ANALISIS DE VARIANCIA

Fuente de variación	Grados de libertad	Cuadrados medios Alt. hipocót.	Long. raíces
Tratamientos	2	1.675,05*	158,08*
Error	27	65,63	4,54

Cuadro 7. Valores promedios de la altura del hipocótilo y la longitud de las raíces en milímetros de las plantas de lechugas tratadas con el extracto de frijol normal y enano.

Tratamientos	Promedios Alt. hipocót. (mm)	Long. de raíces (mm)
Ext. de frijol normal	15,14*	8,00^{ns}
Ext. de frijol enano	4,00^{ns}	14,20*
Testigo	3,80	11,10

ANALISIS DE VARIANCIA

Fuente de variación	Grados de libertad	Cuadrados medios Alt. hipocót.	Long. raíces
Tratamientos	2	1.329,03**	96,10**
Error	27	4,11	6,46

Cuadro 8. Valores promedios de la altura del hipocótilo y la longitud de las raíces en milímetros de las plantas de lechugas tratadas con las manchas activas de ambos extractos de frijol normal y enano.

Tratamientos	Promedios Alt. Hipocótilo (mm)	Long. raíces (mm)
Mancha del ext. normal	5,00^{ns}	27,00^{ns}
Mancha del ext. enano	5,00^{ns}	24,70^{ns}
Testigo	5,50	29,80

(ver Nota 1 en la página 43)

Nota 1: ANALISIS DE VIARIANCIA

Fuente de variación	Grados de libertad	Cuadrados medios Alt. hipocót. (mm)	Long. raíces (mm)
Tratamientos	2	0,85^{ns}	65,23*
Error	27	0,61	10,73

Cuadro 9. Diferencias promedios del contenido de clorofila de los discos de hojas de frijol enano y peso seco de los mismos. Se usó el ensayo de los discos.

Tratamientos	Promedios Dif. de Absor. de luz a 665 mμ	Peso seco de los discos (mg)
Ext. de frijol normal	237,14**	16,46*
Mezcla de (A_3 + Ext. enano)	245,00**	16,40*
Acido giberélico	235,71**	15,48*
Ext. de frijol enano	151,18^{ns}	21,17^{ns}
Mezcla de los Ext.(Nor + Ena)	150,00^{ns}	21,31^{ns}
Testigo	159,00^{ns}	21,28^{ns}

ANALISIS DE VARIANCIA

Fuente de variación	Grados de libertad	Cuadrados medios Cont. clorofila	Peso seco (mg)
Tratamientos	5	335.836,96**	69,08**
Error	37	22,77	7,32

Cuadro 10. Valores promedios del peso fresco y seco de las plantas normales de frijol, tratadas con el extracto de semillas de frijol enano y CCC

Tratamientos	Promedios Peso fresco(mg)	Peso seco(mg)
CCC	2.729,0*	196,0*
Ext. de frijol enano	8.747,0^{ns}	687,0*
Testigo	9.357,0	916,0

(ver Nota 1 en la página 44)

Nota 1: ANALISIS DE VARIANCIA

Fuente de variación	Grados de libertad	Cuadrados medios Peso fresco	Peso seco
Tratamientos	2	43 1260.211*	409.021,44*
Error	6	1 1392.704	2.574,45

Cuadro 11. Valores promedios de la altura y longitud de las raíces de las plantas de frijol normal, tratadas con el extracto de frijol enano y CCC.

Tratamientos	Promedios Alt. de plantas (cm)	Long. de raíces (cm)
CCC	15,33*	8,50*
Ext. de frijol enano	38,33*	23,00*
Testigo	85,57	17,80

ANALISIS DE VARIANCIA

Fuente de variación	Grados de libertad	Cuadrados medios Alt. de planta (cm)	Long. de raíces (cm)
Tratamientos	2	3.858,11*	168,69*
Error	6	114,58	8,75

LITERATURA CITADA

1. ADLER, N. et al. Evidence for the widespread occurrence of a gibberellic acid-like substance in higher plant. American Chemical Society. (Advance in Chemistry Serie No. 28). Washington, D. C. pp. 26-36. 1961.

2. CARR, D. J. y SKENE, K. G. Diauxic growth curves of seeds with special reference to French bean (Phaseolus vulgaris L.) Australian Journal of Biological Science 14: 1-12 1960.

3. CATHEY, H. M. Growth evaluations of four gibberellins and several derivatives. Plant Physiology 33, supl. XLIII. 1958.

4. CORCORAN, M. R. y PHINNEY, B. O. Changes in amount of gibberellin-like substances in developing seed of Echinosystis lupinus and Phaseolus. Physiologia Plantarum 15: 252-262 1962.

5. _____, et al. Natural inhibitors of gibberellin-induced growth. American Chemical Society. (Advances in Chemistry Serie No. 28). Washington, D. C. pp. 152-158 1961.

6. CROSS, E. B. et al. The structures of fungal gibberellins. American Chemical Society. (Advances in Chemistry Serie No. 28). Washington, D. C. pp. 152-158 1961.

7. _____ y MYERS, L. P. The effect of plant growth retardants on the biosynthesis of diterpenes by gibberella fujikuroi. Phytochemistry 8(1): 79-83 1969.

8. CROWLEY, J. G., MOSES, V. y ULLRICH, J. A versatile solvent to replace phenol for the paper chromatography of radioactive intermediary metabolites. Univ. Calif. Lawrence Rad. Lab. Bio-Organ. Chem. Quart. Rept. UCRL 10743: 1-12 Feb.1963.

9. CROZIER, A. y AUDUS, L. J. Biological and chromatographic properties of two gibberellin-like compounds from etiolated Phaseolus multiflorus seedlings. Phytochemistry 7(8): 1923-1931 1968.

10. FRANKLAND, B. y WAREING, F. P. Effect of gibberellic acid on hypocotyl growth of Lettuce seedlings. Nature 185: 255-256. 1960.

11. GASPAR, T. y LACOPPE, J. The effect of CCC and Amo1618 on growth, Catalase, Peroxidase and Indoleacetic acid oxidas activity of young barley seedlings. Physiologia Plantarum 21(5): 1105-1109 1969.

12. GREENE, G. L. y PROAÑO, V. A. Gibberellin-induced paling in leaves of a dwarf bean mutant. Turrialba 18(1): 70-72 1968.

13. HASHIMOTO, T. y RAPPAPORT, L. Variation in endogenous gibberellins in developing bean seed. I. Occurrence of neutral and acidic substances. Plant Physiology 41(4): 623-628 1966.

14. HOAGLAND, D. R. y ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. Univ. Calif. College of Agriculture. Berkeley, Calif. Circular 347. pp. 31 1938.

15. HUMPHRIES, E. C. Effect of gibberellic and kinetin on growth of the primary leaf od dwarf bean (Phaseolus vulgaris L.) Nature 181: 1081 1958.

16. JACOBS, P. W. y KIRK, C. S. Effect of gibberellins acid on elongation and long life of Coleus petioles. Plant Physiology 41(3): 487-490 1955.

17. JONES, R. L. y VARNER, J. F. Bioassay of gibberellins. Planta 72(2): 155-161 1967.

18. KATO, J., PURVES, W. K. y PHINNEY, B. O. Gibberellins-like substances in plants. Nature 196: 687-688 1962.

19. KURAISHI, S. y MUIR, R. M. Increase diffusible auxin after treatment with gibberellin. Science 137: 760 1962.

20. KURASAWA, E. Experimental studies on the nature of the substances excreted by 'bakanae' fungus. Trans. Nat. Hist. Soc. Formosa 16(87): 213-217 1962. (Original no consultado, citado en Feucht, J. R. y Watson, D. P. The effect of gibberellins on internodal tissues of Phaseolus vulgaris L. American Journal of Botany 45(6): 520-522 1958).

21. LEOPOL, A. C. Plant growth and development. New York, McGraw-Hill, 466 p. 1964.

22. LIBERMAN, J. L. y JOHNSON, M. P. Reversible photoreaction controlling expansion of etiolated bean disc. Science 121: 440-441 1955.

23. McMILLAN, J. y SUTER, P. J. Thin-layer chromatography of the gibberellins. Nature 197: 790-796 1963.

24. MITCHELL, J. E. y ANGEL, C. R. Plant growth regulating substances obtained from cultures of Fusarium moniliforme Phytopathology 40: 872-873 1950.

25. MICHNIEWICZ, M. y STANISLAWSKI, J. J. A comparison between the effect of gibberellins and 2-chloroethyl trimethylammonium cloride (CCC) on some biochemical processess in bean plant. I. Effect on catalase and peroxidase activity. Acta. Soc. Bot. Pol. 34(2): 215-223 1965.

26. MOH, C. C. y ALAN, J. J. Bean mutant induced by ionizing radiation. I. Dwarf mutant. Turrialba 14(2): 82-84 1964.

27. PHINNEY, B. O. y WEST, C. A. Gibberellins as native plant growth regulators. Annual Review of Plant Physiology 11: 411-439 1960.

28. _____ y WEST, C. A. Gibberellins from flowering plant. I. Isolation and properties of a gibberellin from Phaseolus vulgaris L. Journal of the American Chemical Society 81: 2424-2427 1959.

29. PROAÑO, S. V. Estudios de las sustancias giberelinoides en semillas maduras y plantas normales y enanas de frijol (Phaseolus vulgaris L.) var. México-80R. Tesis Mg. Sc. Turrialba, Costa Rica IICA 74 p. 1967.

30. RANDERAT, K. Thin-layer chromatography. Trans. from German by D. D. Libman. London Academic Press 250 p. 1963.

31. RIED, D. M. y CARR, D. J. Effects of dwarfing compound, CCC, on the production and export of gibberellin-like substances by root systems. Planta 73(1): 1-11 1967.

32. SACH, H. R. Gibberellin, auxin, growth retardant effects upon cell division and shoot histogenesis. American Chemical Society. (Advances in Chemistry Serie No. 28) Washington, D. C. pp. 49-58 1961.

33. WEST, C. A. y PHINNEY, B. O. Properties of gibberellin-like factors from extracts of higher plant. Plant Physiology 31 (suppl): xx 1956.

34. WITTWER, S. y BUKOBAC, L. Quantitative and qualitative differences in plant response to the gibberellins. Am J. Botany 49: 524-529 1962.

35. ZWEIG, G., DEVAY, J. E. y COSEN, G. R. On the biosynthesis of gibberellins by the use of C^{14} labeled substrates. Plant Physiology 33(suppl): XXXVIII 1958.

Date Due
