

Evaluación de la Actividad Biológica de Distintos Brasinosteroides¹

A.R. Salinas*, M.S. Pabelo**,
S.R. Feldman***, F. Nakayama****

ABSTRACT

Brassinosteroids are structural analogues of a hormone isolated from lipoidal extract of rape (*Brassica napus* L.) pollen. This product has been shown to promote plant growth and is of interest because of its various applications in agronomy. Effects of three brassinosteroids, homobrassinolide (HoBr), epihomobrassinolide (EHoBr), and epihomocasterone (EHoC) in auxins, gibberellin and cytokinin bioassays are presented. The three products elicited different responses according to the tested species and among products. Brassinosteroids were highly active in the bending of second leaf lamina of dwarf rice seedlings, HoBr being the most effective. To a lesser extent, HoBr and EHoBr elicited gibberellin-like activity in a bean seedling bioassay. EHoC was ineffective in promoting callus growth in soybean cotyledons, and was inhibitory at high concentrations.

Palabras-clave: Brasinólidos, bioensayos-brasinólidos, epihomocasterona, epihomobrasinólido, homobrasinólido.

RESUMEN

Los brasinosteroides son análogos estructurales de una hormona aislada a partir de extractos de polen de *Brassica napus* L. Este producto evidenció un efecto promotor sobre el crecimiento vegetal y despertó interés por sus posibles aplicaciones en la agronomía. Se presentan en este trabajo los resultados del efecto de tres brasinosteroides: homobrasinólido (HoBr), epihomobrasinólido (EHoBr) y epihomocasterona (EHoC) en bioensayos para auxinas, giberelinas y citocininas. Los productos mostraron una respuesta diferencial según la especie y entre productos. En el bioensayo correspondiente a la inclinación de la lámina de la segunda hoja de arroz, los brasinosteroides probados mostraron una fuerte actividad auxínica en el siguiente orden decreciente: HoBr, EHoBr, EHoC. El HoBr y el EHoBr, en menor medida, manifestaron actividad tipo giberélica en el bioensayo de plántulas de frijol o "poroto". La EHoC no tuvo un efecto promotor sobre el crecimiento de callos de cotiledones de soja, sensibles a las citocininas y fue inhibitoria en concentraciones altas.

INTRODUCCIÓN

Mitchell *et al.* (1970) descubrieron una nueva hormona, presente en los extractos de polen de *Brassica napus* L. (nabo), con una fuerte actividad promotora del crecimiento vegetal. Una simple aplicación de 10 µg de extracto a un entrenudo joven de *Phaseolus vulgaris* L. cv. Pinto promovió el

alargamiento y engrosamiento del nudo tratado y del contiguo superior por una mayor división y agrandamiento celular (Worley y Mitchell 1971). Asimismo se observó un efecto sobre el crecimiento general de la planta, cuando se asperjaron plántulas de *Ulmus pumila* L. (olmo) (Mitchell *et al.* 1970) con el mismo extracto. En la bibliografía se menciona que posee actividad tipo auxina (Yopp *et al.* 1981), citocinina (Mandava *et al.* 1981) y giberelina (Yopp *et al.* 1979). Sin embargo, los bioensayos que muestran mayor sensibilidad se basan en la prueba del alargamiento del segundo entrenudo de *P. vulgaris* cv. Pinto y de la inclinación de la lámina de la segunda hoja de *Oryza sativa* L. (arroz) (Maeda 1965; Miller 1965).

Los brasinólidos mostraron un efecto promotor sobre el crecimiento de tejidos jóvenes en alargamiento, al variar la expresión de la respuesta en forma secuencial según la especie, como auxinas, giberelinas y citocininas (Sasse 1985). Según Eun *et al.* (1989), los brasinólidos provocaron un incremento del peso fresco de segmentos etiolados de *Cucurbita máxima* Duch. (calabaza), al promover un aumento de la concentración de ácido indolacético (AIA) y una disminución del

1 Recibido para publicar el 17 de julio de 1992. Los autores agradecen al doctor Baniel Bustos del Instituto de Química Orgánica de Síntesis (IQUIOS), Arg., por brindar los brasinosteroides sintetizados por él, y al ingeniero agrónomo Eligio N. Morandi, por su aporte a la discusión de los resultados. Las sugerencias del revisor mejoraron la versión final de este trabajo.

* Profesor Adjunto de Ecofisiología Vegetal; Facultad de Ciencias Agrarias; Investigador del Consejo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Rosario (CIUNR); C. C. 14 (2123), Zavalla (Santa Fe), Arg.

** Docente de Horticultura; Facultad de Ciencias Agrarias; Investigador del CIUNR, Arg.

*** Profesora Adjunta de Biología General; Facultad de Ciencias Agrarias; Investigador del CIUNR, Arg.

**** Profesor Titular de Ecofisiología Vegetal; Facultad de Ciencias Agrarias; Investigador Independiente del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Arg.

contenido de ácido abscísico (ABA). Además retardaron la abscisión de explantes de hoja y fruto en crecimiento de *Citrus madurensis* Lour. (calamondín), así mostraron mayor efecto que el AIA (Iwahori *et al.* 1990).

La estructura química del compuesto responsable de la promoción del crecimiento resultó ser un esteroide con una lactona en el anillo B y una cadena lateral asimétrica (2 a - 3 a - 22 a - 23 a tetrahidroxi - 24 a meti - β - homo - 7 oxa - 5 a colestano - 6 - ona), que se designa brasinólido (Frankland y Wareing 1960).

Posteriormente se aislaron compuestos con estructuras y propiedades fisicoquímicas y biológicas semejantes, a partir de las producidas por insectos en *Castanea sativa* L. (castaño) (Yokota *et al.* 1982), de hojas de *Thea sinensis* L. (camellia) (Okada y Mori 1983) y de semillas inmaduras de *Dolichos lablab* L. (chícharo o poroto de Egipto) (Baba *et al.* 1983). En todos los casos, los compuestos aislados se encontraron en microgramos por kilogramos de material fresco procesado. Schmidt *et al.* (1991) sostienen que la castasterona es un precursor metabólico de la síntesis del brasinólido en semillas de *Raphanus sativus* L. (rabanito).

A partir de 1991, se comenzó con la síntesis de análogos estructurales y se observaron diferencias en la actividad biológica relacionadas con variaciones en la configuración espacial y con los sustituyentes de la cadena lateral (brasinoesteroides) (Okada y Mori 1983; Takatsuto *et al.* 1983; Tizio 1980; Thompson *et al.* 1982).

Por sus pronunciados efectos sobre el crecimiento vegetal, estos compuestos tendrían promisorias perspectivas para el uso agrícola. Debido a ello, en el IQUIOS se encaró las síntesis de tres análogos estructurales del brasinólido: Epihomocastaterona (EH_0C), epihomobrasinólido (EH_0Br) y homobrasinólido (H_0Br), a partir del estigmasterol (Bustos 1986). Ese compuesto reúne dos ventajas: por su estructura, permite una economía de pasos en la ruta sintética; y es económicamente accesible al estar presente en el aceite de soja (12%-25% de la porción que no admite saponificación del aceite) (Bustos 1986). En este trabajo, se discutirá la respuesta biológica de EH_0Br y H_0Br frente a bioensayos para giberelinas, auxinas y citocininas.

MATERIALES Y METODOS

Bioensayo para giberelinas

Prueba del alargamiento del segundo entrenudo en plántulas de *Phaseolus vulgaris* cv. Pinto (Mitchell y Livingston 1973)

Plántulas de 'Pinto', seleccionadas por homogeneidad, se trataron mediante la aplicación unilateral sobre el segundo entrenudo con un desarrollo aproximado de 1 mm de longitud, con 10 μg del producto incorporado en 200 μg de lanolina. Los testigos se trataron sólo con lanolina.

Los experimentos con EHOc que incluyeron 12 líneas de 'Pinto' no mostraron diferencias estadísticas respecto del testigo, por lo que el EHOc fue excluido de los posteriores experimentos de este bioensayo.

Se utilizó un diseño estadístico de bloques completos al azar con seis repeticiones; se compararon los efectos del H_0Br , EH_0Br y del ácido giberélico (AG_3), bajo condiciones ambientales naturales. Las variables consideradas fueron la longitud del segundo y del tercer entrenudo, el número de nudos por planta y la longitud total del tallo principal, determinadas diariamente durante 12 días.

En otro experimento similar, conducido en cámara de crecimiento con luz fluorescente (blanco níveo), se compararon los efectos del H_0Br y EH_0Br en dos líneas de 'Pinto' (NI 038/1 y A 68) y se determinaron la longitud, el diámetro mayor, el peso fresco y el volumen del segundo entrenudo, la longitud del tercer entrenudo, el número de entrenudos por planta y la longitud total del tallo.

Prueba del alargamiento de hipocótilos de plántulas de *Lactuca sativa* L. (Frankland y Wareing 1960)

Esta prueba se realizó para detectar la actividad del tipo giberelina de EHOc , pues no hubo evidencia de ella al utilizar el bioensayo con 'Pinto'.

Las plántulas de lechuga cv. Gran Rapid, crecidas en cajas de Petri durante 48 h en la oscuridad a 25°C, fueron seleccionadas por uniformidad en la longitud de radículas (6 mm - 8 mm). Las plántulas se incubaron durante 5 d a 25 °C, bajo luz fluorescente, en solución de malato de potasio 2.5 mM con 5 µg/ml, 0.5 µg/ml, 0.005 µg/ml y 0 µg/ml de EHoC ó 10 µg/ml de AG₃.

Se utilizó un diseño estadístico completamente aleatorio con 10 repeticiones por tratamiento; al quinto día se midió la longitud de los hipocótilos.

Bioensayo para auxinas

Prueba de la inclinación de la lámina de la segunda hoja de plántulas de *Oryza sativa* (Maeda 1965)

El bioensayo de la inclinación de la lámina de la segunda hoja de arroz fue desarrollado como sistema para estudiar la actividad auxínica. Como se comprobó su especificidad y alta sensibilidad para ultramicrocantidades de brasinoesteroides (Michell *et al.* 1970), la mayoría de los investigadores japoneses lo adoptaron para evaluar la actividad de tipo brasinólido.

Las plántulas de arroz cv. Koshihikari, crecidas en la oscuridad durante 6 d a 30 °C en bandejas con vermiculita, fueron seleccionadas por uniformidad y se les extrajo, bajo luz rojo-amarilla, segmentos de la segunda hoja, que comprendían 1 cm de vaina y 1 cm de lámina. Los segmentos de hojas se incubaron 24 h en agua destilada, en la oscuridad, a 30 °C; luego, durante 48 h en solución buffer de malato de potasio 2.5 mM con uno de los tres brasinoesteroides mencionados. Se comparó su actividad al medir el ángulo descrito por la lámina en las concentraciones de 5 µg/ml, 0.5 µg/ml, 0.05 µg/ml y 0 µg/ml en un diseño estadístico de bloques completos al azar, con cuatro repeticiones.

Prueba del crecimiento recto de coleóptilos de *Triticum aestivum* L. (Tizio 1980)

Se seleccionaron plántulas de trigo cv. INTA Victoria, crecidas en la oscuridad durante 72 h a 25°C en bandejas con vermiculita, por coleóptilos de 30 mm de longitud. Bajo luz roja se eliminó 1 mm del ápice del coleóptilo y se tomaron 5 mm subapicales. Estos

segmentos se incubaron en solución acuosa de 5 µg/ml, 0.5 µg/ml, 0.05 µg/ml y 0 µg/ml de EHoC ó 10 µg/ml de AIA, durante 24 h a 25 grados centígrados.

Se evaluó el efecto de los tratamientos midiendo el alargamiento producido en las secciones de coleóptilos. Con ese fin, se usó un diseño estadístico completamente aleatorio.

Bioensayo para citocininas

Prueba del crecimiento de callos de cotiledones de *Glycine max* L. (Miller 1965)

Se cultivaron *in vitro* callos de cotiledones de soja cv. Acme, sensibles a los niveles de citocininas en el medio de cultivo, sobre el medio de mantenimiento, solución mineral de Miller con 100 mg/l de inositol, 0.5 mg/l de ácido nicotínico, 0.1 mg/l de piridoxina-HCl, 0.1 mg/l de ácido naftil-acético, 0.5 mg/l de cinetina, 30 g/l de sacarosa y 10 g/l de agar pH 5.8. En un experimento se agregó EHoC a este medio de mantenimiento en concentraciones de 1 µg/ml, 0.5 µg/ml, 0.05 µg/ml y 0 µg por mililitro. Se midió el aumento del peso fresco de los callos a los 21 días. Se realizó con un diseño estadístico completamente aleatorio con 10 repeticiones.

En otro experimento, se comparó el crecimiento de los callos sobre los siguientes tratamientos: medio de mantenimiento, mismo medio con el agregado de 4 µg/ml de EHoC, medio basal sin cinetina ni EHoC, medio basal sin cinetina y con 4 µg/ml de EHoC.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Bioensayos para giberelinas

El bioensayo del alargamiento del segundo entrenudo de 'Pinto' fue originalmente desarrollado para evaluar la actividad giberelínica (Mitchell y Livingston 1973). Hasta el presente, este fue adoptado por el grupo del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América (USDA), en Beltsville, para este novel grupo de reguladores vegetales, por haberse constatado que los brasinoesteroides producen efectos específicos distintos de cualquier otro regulador conocido (Wada *et al.* 1981).

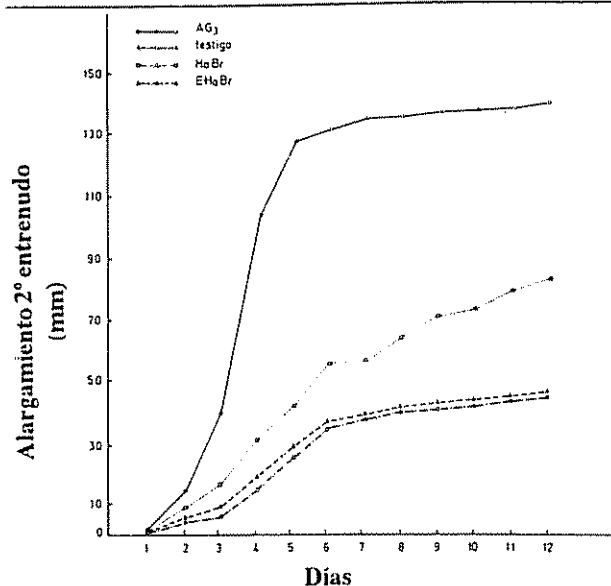


Fig. 1. Alargamiento del segundo entrenudo de plántulas de *P. vulgaris* cv. Pinto ante la aplicación de homobrasinólido (HoBr), lepihomobrasinólido (EHoBr) y ácido giberélico (AG₃).

En la Fig. 1 y el Cuadro 1 se muestra cómo el modelo de respuesta difiere entre los reguladores ensayados. Aun el HoBr, el más activo de los dos brasino-

esteroides probados, produjo una menor tasa de alargamiento (Fig. 1) y longitud total del entrenudo tratado (Cuadro 1) en relación con el ácido giberélico. El alargamiento fue acompañado de un engrosamiento (Cuadro 2) y una leve curvatura en la parte media y superior del entrenudo, por el incremento de la división y el agrandamiento celular.

Este efecto es característico de estos compuestos (Frankland y Wareing 1960) y distinto del de las giberelinas. El HoBr difiere del brasinólido natural en que el grupo metilo del C24 es sustituido por un etilo como única variante, que conduce a una menor actividad sobre el segundo entrenudo de 'Pinto' (Thompson *et al.* 1982).

El proceso de alargamiento del segundo entrenudo de 'Pinto' no se observó con EHoBr tanto con luz natural como con luz fluorescente (Fig. 1, cuadros 1 y 2), pero sí el engrosamiento característico (Cuadro 2). El EHoBr difiere del brasinólido natural por el grupo etilo en el C24 y por una trans-orientación de los OH en C22 y C23, en lugar de la cis-orientación del natural. El efecto del HoBr, como el del EHoBr sobre el alarga-

Cuadro 1. Efecto del homobrasinólido (HoBr), epihomobrasinólido (EHoBr) y ácido giberélico (AG₃) sobre algunos parámetros vegetativos en plántulas de *P. vulgaris* cv. Pinto a los 12 días del tratamiento.

Tratamientos	Parámetros evaluados	Longitud promedio 2º entrenudo (mm)	Longitud promedio 3º entrenudo (mm)	Longitud total tallo principal (mm)	Entrenudos del tallo principal (núm.)
AG ₃		143.0 a	129.0 a	570.5 a	7.8 a
HoBr		84.3 b	44.6 b	103.9 b	5.8 b
EHoBr		47.0 c	41.0 b	86.1 b	5.0 c
Testigo		45.1 c	35.4 b	76.2 b	4.7 c

Nota: Para cada parámetro evaluado, los valores seguidos de igual letra no difieren del 5% (Duncan)

Cuadro 2. Efecto de HoBr y EHoBr sobre distintos parámetros evaluados en plántulas de dos líneas de *P. vulgaris* cv. Pinto a los 12 días del tratamiento.

Líneas	Tratamientos	Longitud 2º entrenudo (mm)	Diámetro mayor 2º entrenudo (mm)	Longitud x 3º entrenudo (mm)	Longitud total del tallo principal (mm)	Peso fresco 2º entrenudo (g)	Volumen x 2º entrenudo (cc)
NI 038/1	Testigo	51.00 bc	1.79 c	22.29 a	99.14 ab	0.13 c	0.13 b
	HoBr	100.00 a	3.29 b	15.86 a	127.42 a	0.39 a	0.41 a
	EHoBr	60.00 b	4.64 a	9.57 b	77.14 b	0.20 b	0.22 b
A 68	Testigo	47.40 c	2.07 c	17.43 a	70.00 b	0.15 b	0.17 b
	HoBr	68.30 b	3.21 b	5.86 b	75.10 b	0.27 a	0.28 a
	EHoBr	47.60 c	5.36 a	12.57 ab	66.90 b	0.21 ab	0.25 ab

Nota: Dentro de cada línea y para cada parámetro evaluado, valores seguidos de igual letra no difieren del cinco por ciento

miento del segundo entrenudo, no se transmitió al tercer entrenudo (Cuadro 2); así lo observaron también Worley y Mitchell (1971). Por el contrario hubo una inhibición del crecimiento diferencial según el cultivar y el producto. La longitud total del tallo no se vio afectada por los tratamientos (Cuadro 2); la línea NI 038/1 mostró mayor altura que la línea A 68. Probablemente hubo alteraciones en el sistema vascular, y el pulvínulo de la tercera hoja engrosó respecto del testigo; por eso, se redujo el tamaño del limbo foliar.

El HoBr fue el producto que promovió, en mayor medida, un aumento del peso fresco y del volumen del segundo entrenudo en ambas líneas probadas (Cuadro 2).

De los resultados obtenidos en el bioensayo del alargamiento del hipocótilo de las plántulas de lechuga (Fig. 2), se desprende que el EHoC no tiene acción giberelina. Por el contrario, la mayor concentración resultó inhibitoria sobre el alargamiento del hipocótilo respecto del testigo; sin embargo, los valores obtenidos con las menores concentraciones no fueron diferentes de los del testigo.

Bioensayo para auxinas

La actividad determinada en los brasinoesteroides sintetizados en IQUIOS, mostró que los tres compuestos fueron activos (Cuadro 3) en concentraciones menores que las citadas por la bibliografía (Maeda 1965; Takatsuto *et al.* 1983).

Contrario a lo sucedido en los bioensayos para giberelinas, la actividad comprobada para EHoC fue relativamente alta en este ensayo; también sucedió lo mismo respecto a los valores obtenidos por Takatsuto *et*

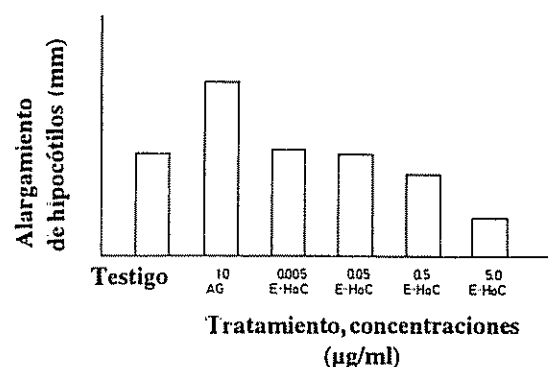


Fig. 2. Efecto del epi-homocasterona (EHoC) y del ácido giberílico (AG₃) sobre el alargamiento de hipocótilos de lechuga.

al. (1983). Estas diferencias podrían atribuirse a que se utilizan distintos genótipos de arroz.

El efecto promotor sobre la inclinación de la lámina de la segunda hoja de arroz fue mayor en los tratamientos de 0.5 µg/ml y 0.05 µg/ml, próximos a la saturación en la solución acuosa de los productos; los efectos producidos no fueron mayores, probablemente por ser una concentración inhibitoria o saturación de la respuesta (Tizio 1980).

Al evaluarse la actividad de EHoC en la prueba del crecimiento recto de los coleótilos de trigo en bioensayos específicos de auxinas, se constató que este brasinoesteroide promovió el alargamiento (Cuadro 4). No obstante, su efecto, en la mayor concentración, 5 µg/ml, fue sólo la tercera parte del provocado por 10 µg/ml AIA.

Cuadro 3. Efecto de HoBr, EHoBr y EHoC sobre la inclinación de la lámina de la segunda hoja de plántulas de *O. sativa* cv. Koshihikari.

Concentración (µg/ml)	Angulo de inclinación descrito por la lámina (grados)			Incremento en la inclinación con respecto del testigo (%)		
	HoBr	EHoBr	EHoC	HoBr	EHoBr	EHoC
0	111.0 c	111.0 c	111.0 c			
5	157.1 ab	146.1 b	140.9 b	41.5	31.6	26.9
0.5	174.4 a	167.7 a	151.3 b	57.1	51.1	36.3
0.05	169.6 a	158.8 ab	143.4 b	52.8	43.1	29.2

Nota: Para cada producto, valores seguidos de igual letra no difieren del 5% (Duncan)

Cuadro 4. Efecto de EHoC y AIA sobre el alargamiento de secciones de coleóptilos de trigo.

Tratamiento ($\mu\text{g/ml}$)	Longitud final de secciones de coleóptilo (mm)	Aumento de longitud respecto de testigos (%)
0	11.2 c	
10 AIA	12.9 a	15
5 EHoC	11.8 b	5
0.5 EHoC	11.5 b	2
0.05 EHoC	11.2 c	-

Nota: Valores seguidos de igual letra no difieren del 5% (Duncan)

Cuadro 5. Efecto de EHoC sobre el aumento de peso fresco de callos de cotiledones de soja, en un medio de Miller completo.

EHoC ($\mu\text{g/ml}$)	Aumento de peso fresco a los 21 días (miligramos por callo)
0	551.5 a
0.05	510.4 a
0.5	488.0 a
1.0	514.0 a

Nota: Valores seguidos de igual letra no difieren del 5% (Duncan)

Cuadro 6. Efecto de la EHoC y cinetina (Cin) sobre el aumento de peso fresco de callos de cotiledones de soja en un medio de Miller sin cinetina.

Tratamiento	Aumento de peso fresco (miligramo por callo)
0 Cin + 0 EHoC	90.1 b
0.5 $\mu\text{g/ml}$ Cin + 4.0 $\mu\text{g/ml}$ EHoC	91.7 b
0.5 $\mu\text{g/ml}$ Cin	227.5 a
0 Cin + 4.0 $\mu\text{g/ml}$	59.6 c

Nota: Valores seguidos de igual no difieren del 5% (Duncan)

Bioensayos para citocininas

El agregado de EHoC hasta 1 $\mu\text{g/ml}$ en el medio de mantenimiento de Miller, que contenía cinetina, no tuvo efecto alguno sobre el crecimiento de callos de cotiledones de soja en cultivo *in vitro* (Cuadro 5). En

concentraciones de 4 $\mu\text{g/ml}$ de EHoC, el efecto fue marcadamente inhibitorio (Cuadro 6). Los callos adquirieron una coloración oscura, en lugar del color blanquecino característico. Este efecto no fue contrarrestado por la cinetina.

La ausencia de actividad tipo citocinina fue evidente en este bioensayo y coincidió con los resultados hallados por Mandava *et al.* (1981) en el bioensayo de expansión del epicótilo de arveja enana y de síntesis en oscuridad de la betacianina, en hojas de *Amaranthus* (Mandava 1988).

CONCLUSIONES

De los tres brasinoesteroides probados, sólo HoBr mostró una actividad similar al AG_3 que favorece la división y la elongación celular. El escaso efecto promotor del EHoBr se vió afectado por el genotipo del material utilizado. Las diferencias estructurales entre EHoC y HoBr, un grupo etilo en C24, los OH con trans-orientación en C22 y C23 y la carencia de la unión lactonia del anillo β (Thompson *et al.* 1982) determinarían la falta de actividad de la misma.

El comportamiento evidenciado por HoBr, EHoBr y EHoC en los bioensayos de arroz y de trigo fue similar al de las auxinas y podría atribuirse al aumento en la concentración de AIA por una modificación en la velocidad de la biosíntesis y el transporte de AIA (Eun *et al.* 1989); también, al descenso del pH en el nivel de la pared celular, que favoreció la disminución de la rigidez de la pared. Así se tuvo, probablemente, una vía de acción diferente a la del AIA (Miller 1965; Takatsuto *et al.* 1983).

El efecto inhibitorio en altas concentraciones de EHoC sobre los callos de cotiledones de soja, podría deberse a una promoción de la senescencia, tal como Mandava *et al.* (1981) observaron al trabajar con explantes de *Rumex obtusifolius*.

Dentro del grupo estudiado, el HoBr fue el que manifestó mayor efecto promotor del crecimiento, ya que fueron evidentes las actividades auxínica y giberélica; por lo tanto sería interesante probar su efecto sobre especies sensibles a tratamientos con estos reguladores (vid, tomate, pimiento, alcachofa, apio y *Citrus*).

LITERATURA CITADA

- ABE, H; NAKAMURA, K; MORISHITA, T; UCHIYAMA, M.; TAKATSUTO, S.; IKEKAWA, N. 1984. Endogenous brassinosteroids of rice plant: Castasterone and dolichosterone. *Agricultural and Biological Chemistry* 48(4):1103-1104.
- BABA, J.; YOKOTA, T.; TAKAHASHI, N. 1983. Brassinolide-related new bioactive steroids from *Dolichos lablab* seed. *Agricultural and Biological Chemistry* 47(3):695-661.
- BUSTOS, D A. 1986. Síntesis de brasinoesteroides: Análisis de la reacción de adición electrofílica al doble enlace C22, C23 de estigmasterol. Tesis Doctoral UNR, Departamento de Química Orgánica/IQUIOS. 322 p.
- EUN, J.; KURAISHI, S.; SAKURAI, N. 1989. Changes in levels of auxin and abscisic acid and the evolution of ethylene in squash hypocotyls after treatment with brassinolide. *Plant and Cell Physiology* 30(6):807-810.
- FRANKLAND, B.; WAREING, P F. 1960. Effect of gibberellic acid on hypocotyl growth of lettuce seedlings. *Nature* 185: 255-256.
- GROVE, M D.; SPENCER, G F.; ROHWEDDER, W. K.; MANDAVA, N.; WORLEY, J. F.; WARTHEN, J. D.; STEFFENS, G. L.; FLIPPEN-ANDERSON, J. L.; COOK, J. C. 1979. Brassinolide: A plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen. *Nature* 281:216-217.
- IWAHORI, S.; TOMINAGA, S.; HIGUCHI, S. 1990. Retardation of abscission of citrus leaf and fruitlet explants by brassinolide. *Plant Growth Regulation* 9:119-125.
- MAEDA, E. 1965. Rate of lamina inclination in excised rice leaves. *Physiologia Plantarum* 18:813-827.
- MANDAVA, N. B.; SASSE, J. M.; YOPP, J. H. 1981. Brassinolide: A growth-promoting steroidal lactone. II. Activity in selected gibberellin and cytokinin bioassays. *Physiologia Plantarum* 53:453-461.
- MANDAVA, N. B. 1988. Plant growth promoting brassinosteroids. *Annual Review of Plant Physiology* 39:23-52.
- MILLER, C. 1965. Evidence for the natural occurrence of zeatin and derivatives: Compounds from maize which promote cell division. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 54(4):1052-1058.
- MITCHELL, J. W.; MANDAVA, N.; WORLEY, J. F.; PLIMMER, J. R. 1970. Brassins: A new family of plant hormones from rape pollen. *Nature* 225:1065-1066.
- MITCHELL, J. W.; GREGORY, L. E. 1972. Enhancement of overall plant growth: A new response to Brassins. *Nature New Biology* 239:253-254.
- MITCHELL, J. W.; LIVINGSTON, G. A. 1973. Métodos para el estudio de hormonas vegetales y sustancias reguladoras del crecimiento. Méx., Trillas.
- MORICHITA, T.; ABE, H.; UCHIYAMA, M.; MARUMO, S.; TAKATSUTO, S.; IKEKAWA, N. 1983. Evidence for plant growth promoting brassinosteroids in leaves of *Thea sinensis*. *Phytochemistry* 22(4):1051-1053.
- OKADA, K.; MORI, K. 1983. Synthesis of brassinolide analogs and their plant growth-promoting activity. *Agricultural and Biological Chemistry* 47(1):89-95.
- ROMANI, G.; MARRE, M. I.; BONETTI, A.; CERANA, R.; LADO, P.; MARRE, E. 1983. Effects of a brassinosteroid on growth and electrogenic proton extrusion in maize root segments. *Physiologia Plantarum* 59:528-532.
- SASSE, J. M. 1985. The place of brassinolide in the sequential response to plant growth regulators in elongating tissue. *Physiologia Plantarum* 63:303-308.
- SCHMIDI, J.; YOKOTA, T.; ADAM, G.; TAKAHASHI, N. 1991. Castasterone and brassinolide in *Raphanus sativus* seeds. *Phytochemistry* 30(1):364-365.
- TAKATSUTO, S.; YAZAWA, N.; IKEKAWA, N.; MORISHITA, T.; ABE, H. 1993. Synthesis of (24R)-28-homobrassinolide analogues and structure-activity relationships of brassinosteroids in the rice-lamina inclination test. *Phytochemistry* 22(6):1393-1397.
- THOMPSON, J. J.; MEIDT, W. T.; MANDAVA, N. B.; DUTKY, S. R.; LUSBY, W. R.; SPAULDING, D. W. 1982. Synthesis of brassinosteroids and relationship of structure to plant growth-promoting effects. *Steroids* 39:89-105.
- TIZIO, R. M. 1980. Reguladores del crecimiento. In *Fisiología Vegetal*. E. M. Sivori, E. R. Montaldi, O. H. Caso (Eds.). Buenos Aires, Hemisferio Sur. Cap. 15, p. 441-534.
- WADA, K.; MARUMO, S.; IKEKAWA, N.; MORISAKI, M.; MORI, K. 1981. Brassinolide and homobrassinolide promotion of lamina inclination of rice seedlings. *Plant and Cell Physiology* 22(2):323-325.
- WORLEY, J. F.; MITCHELL, J. W. 1971. Growth responses induced by brassins (fatty plant hormones) in bean plant. *Journal of the American Society of Horticultural Sciences* 96(3):270-273.
- YOKOTA, T.; ARIMA, M.; TAKAHASHI, N. 1982. Castasterone: A new phytosterol with plant-hormone potency from chestnut insect call. *Tetrahedron Letters* 23(12):1275-1278.
- YOPP, J. H.; COLCLASURE, G. C.; MANDAVA, N. 1979. Effects of brassin complex on auxin and gibberellin mediated events in the morphogenesis of the etiolated bean hypocotyl. *Physiologia Plantarum* 46:247-254.
- YOPP, J. H.; MANDAVA, N. B.; SASSE, J. M. 1981. Brassinolide: A growth-promoting steroidal lactone. I. Activity in selected auxin bioassays. *Physiologia Plantarum* 53:445-452.