

La Serie Universitaria de la Fundación Juan March presenta resúmenes, realizados por el propio autor, de algunos estudios e investigaciones llevados a cabo por los becarios de la Fundación y aprobados por los Asesores Secretarios de los distintos Departamentos.

El texto íntegro de las Memorias correspondientes se encuentra en la Biblioteca de la Fundación (Castelló, 77. Madrid-6).

La lista completa de los trabajos aprobados se presenta, en forma de fichas, en los Cuadernos Bibliográficos que publica la Fundación Juan March.

Los trabajos publicados en Serie Universitaria abarcan las siguientes especialidades:
Arquitectura y Urbanismo; Artes Plásticas;
Biología; Ciencias Agrarias; Ciencias Sociales;
Comunicación Social; Derecho; Economía; Filosofía;
Física; Geología; Historia; Ingeniería;
Literatura y Filología; Matemáticas; Medicina,
Farmacia y Veterinaria; Música; Química; Teología.
A ellas corresponden los colores de la cubierta.

Edición no venal de 300 ejemplares que se reparte gratuitamente a investigadores, Bibliotecas y Centros especializados de toda España.

Fundación Juan March



FJM-Uni 174-Fur
Citokininas en agrios : actividad end
Furió Egea, José.
1031773



Biblioteca FJM

Fundación Juan March (Madrid)

SERIE UNIVERSITARIA



Fundación Juan March

José Furió Egea

Citokininas en agrios.
Actividad endógena,
efectos fisiológicos y
aplicaciones.

174 Citokininas en agrios. Actividad endógena, efectos fisiológicos y aplicaciones/José Furió Egea.

FJM
Uni-
174
Fur
174

Fundación Juan March
Serie Universitaria

174

José Furió Egea

Citokininas en agrios.
Actividad endógena,
efectos fisiológicos y
aplicaciones.



Fundación Juan March
Castelló, 77. Teléf. 225 44 55
Madrid - 6

Fundación Juan March (Madrid)

*Este trabajo fue realizado con una Beca de la
Convocatoria de España, 1979, individual
Departamento de BIOLOGIA.
Centro de trabajo: Departamento de Citricultura del Centro Regional de
Investigaciones y Desarrollo Agrario de Levante.
Moncada. (Valencia).*

Los textos publicados en esta Serie Universitaria son elaborados por
los propios autores e impresos por reproducción fotostática.

Depósito Legal.: M-924-1982

I.S.B.N.: 84-7075-223-5

Impresión: Gráficas Ibérica. Tarragona, 34. Madrid-7

I N D I C E

	<u>Página</u>
I. INTRODUCCION	5
1. Las citokinas naturales	5
2. Efectos biológicos	5
3. Bioensayos	7
4. Síntesis, transporte y lugares de acción	8
II. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS	10
1. Influencia de las citokinas sobre la división celular y proliferación de callos	10
2. Control hormonal de la organogénesis	10
3. Propagación de patrones de agrios mediante técnicas de cultivo de tejidos	11
4. Control de la floración	12
5. Incremento de la fructificación	12
6. Retraso de la maduración	13
7. Contenido endógeno	14
III. MATERIAL Y METODOS	14
1. Cultivo de entrenudos	14
2. Cultivo de células separadas	15
3. Propagación vegetativa "in vitro"	16
4. Estudio histológico de los tejidos en cultivo	17
5. Control de la floración	20
6. Incremento de la fructificación	20
7. Retraso de la maduración	21
8. Determinación de citokinas endógenas	23
IV. RESULTADOS Y DISCUSION	25
1. Influencia de las citokinas sobre la división celular y proliferación de callos	25
2. Control hormonal de la organogénesis	27

	<u>Página</u>
3. Propagación de patrones de agrios mediante técnicas de cultivo de tejidos	30
4. Control de la floración	32
5. Incremento de la fructificación	35
6. Retraso de la maduración	41
7. Contenido endógeno	45
V. BIBLIOGRAFIA	54

1- INTRODUCCION

Se aplica el término "citokinas" a un grupo de sustancias que promueven la división celular en los tejidos vegetales y tienen estructura química y efectos fisiológicos, como reguladores de crecimiento, similares a los de la kinetina (6-furfurilaminopurina), primera sustancia de estas características aislada e identificada por Miller et al. (1955). Este término fue propuesto por vez primera por Skoog, Strong y Miller en 1965, para distinguir esta familia de compuestos de las "kininas", grupo de sustancias químicamente distintas y de función biológica en los animales, y puesto que había que desechar el término "fitokinas" ante la evidencia de la presencia de citokinas en bacterias (Geffer y Russell, 1969) y células de algunos mamíferos (Gallo et al., 1969).

1.- Las citokinas naturales.- En el Cuadro I se presentan las estructuras de las citokinas conocidas y la referencia de los autores que las citaron por vez primera.

Posteriormente se han citado numerosos derivados de las citokinas ya descritas con actividad biológica en diversos bioensayos. Estos derivados se pueden agrupar en tres tipos: N-glucósidos (Yoshida y Oritani, 1972), con el grupo glucósido enlazado en N-3, N-7 ó N-9 del núcleo de la purina; O(4)-glucósidos (Parker et al., 1975); aminoácidos conjugados al N-3 ó N-9 de la purina (McLeod et al., 1975; Abe et al., 1976).

2.- Efectos biológicos.- El primer efecto biológico descrito, y que sirve de modo general para definir las citokinas, es la promoción de la división celular (Das et al., 1956; Patau et al., 1956).

Otro efecto biológico descrito por primera vez en cultivos de tejido de tabaco, es la inducción de yemas y la inhibición de la rizogénesis, efecto confirmado en otras especies (Wolter, 1964).

Las citokinas provocan también la expansión celular
Fundación Juan March (Madrid)

Concentración mínima detectable ** (M)	SUSTANCIA NOMBRE QUIMICO (síndimo o abreviatura)	ESTRUCTURA			FUENTE			AISLAMIENTO
		R ₁	R ₂	R ₃	Animales	Plantas	Bacterias	
10 ⁻¹⁰ 1X10	6-(3-metil-2-butenilamino) purina (21P)		H	H	+	+	+	Helgelson et al. 1966 Kiämbt et al. 1966 Hall et al. 1967 Robins et al. 1967
10 ⁻⁶ 1X10	6-(3-metil-2-butenilamino) 9-β-D-ribofuranosilpurina (2iPA)		H	Ribosa	+	+	+	Robins et al. 1967
10 ⁻⁶ 1X10	6-(3-metil-3-hidroxi)butilamino) purina *		H	H	?	?	?	Robins et al. 1967
10 ⁻¹¹ 5X10	6-(4-hidroxi-3-metil-2-trans-butenilamino) purina (Zeatina)		H	H	*** +	+	+	Latham et al. 1964
10 ⁻⁹ 4X10	6-(4-hidroxi-3-metil-2-cis-butenilamino) -9-β-D-ribofuranosilpurina (cis-ribosilzeatina)		H	Ribosa	+	+	+	Miller 1967
10 ⁻⁹ 1X10	6-(3-metil-2-butenilamino)-2-metil-9-β-D-ribofuranosilpurina (ms 21PA)		CH ₃	Ribosa	+	+	+	Burrows et al. 1968
10 ⁻¹⁰ 3X10	6-(4-hidroxi-3-metil-2-butenilamino)-2-metil-9-β-D-ribofuranosilpurina (ms-ribosilzeatina)		CH ₃	Ribosa	+	+	+	Hecht et al. 1969
10 ⁻⁹ 1X10	6-(3-metil-4-hidroxi)butilamino) purina (dihidrozeatina)		H	H	?	+	+	Koshimizu et al. 1967
10 ⁻⁹ 1X10	6-Furfurilaminopurina (Kinetina) *		H	H	?	?	?	Miller et al. 1955

* No aceptada generalmente como natural

** En el bioensayo de la médula de tabaco

*** También en los hongos

lar, fenómeno que ocasiona la inducción del crecimiento de las hojas (Probine y Barber, 1966).

Promueven también la formación de cloroplastos (Stetler y Laetsch, 1965) y la síntesis clorofila (Boasson y Laetsch, 1967). Retrasan también la senescencia de las hojas (Richmond y Lang, 1957).

Las citokininas inducen la formación de yemas laterales e inhiben la dominancia apical (Schmid, 1960).

También inducen la floración, tanto en plantas de día largo (Maheshwari y Venkataraman, 1966; Michniewicz y Kamienska, 1965) como de día corto (Chailakhian y Butenko, 1960). Intervienen en la regulación del sexo (Durand, 1966; Negi y Olmo, 1966).

Se ha descrito también el aumento del cuajado del fruto (Weaver et al., 1965) y la inducción de la partenocarpia (Crane y Van Overbeek, 1965); Van Overbeek (1962) propone un papel predominante de las citokininas en los primeros estadios del desarrollo del fruto.

Las citokininas aumentan la resistencia de las plantas a los factores adversos, tales como elevadas temperaturas (Mothes, 1964), bajas temperaturas (Kuraishi et al., 1966) y algunas infecciones, tales como la de *Pseudomonas tabaci* (Lovrekovich y Farkas, 1963).

Las citokininas retienen y acumulan metabolitos de bajo peso molecular, entre ellos, aminoácidos no protéicos como el aminoisobutírico (Egelbrecht, 1961; Mothes et al., 1959 y 1961).

Se ha postulado una interacción entre las citokininas y el ácido abscísico en el paso de período de latencia a crecimiento activo en yemas y semillas (Van Overbeek et al., 1967).

- 3.- Bioensayos.— La cuantificación del contenido endógeno en citokininas de un tejido, tropieza con importantes inconvenientes si se pretenden utilizar métodos puramente químicos. Estos se centran fundamentalmente en la dificultad que presenta su aislamiento y las grandes pérdidas de compuestos activos que se

producen a lo largo del proceso de extracción y purificación. Por otra parte las extremadamente bajas concentraciones de estos compuestos que se presentan en los tejidos naturales, hace que muchas veces los métodos físico-químicos de determinación no tengan sensibilidad suficiente.

Por todo ello, y a pesar de los grandes avances en las técnicas de separación e identificación por los métodos de cromatografía gaseosa, espectrometría de masas, cromatografía gas-líquido, cromatografía líquida de alta presión, etc., y de su aplicación satisfactoria al caso de las citokinas, siguen teniendo gran importancia los bioensayos específicos, basados en los efectos biológicos anteriormente vistos.

Los primeros bioensayos que se utilizaron se basaban en la promoción de la división celular, que aparece como la primera actividad biológica conocida de este tipo de fitohormonas, y a la que son muy sensibles diversos tejidos indiferenciados.

Otros bioensayos se basan en diversos efectos biológicos, pero los resultados obtenidos en cuanto a la determinación del contenido endógeno de citokinas, varían apreciablemente según se utilice uno u otro bioensayo, por lo que se recomienda siempre el uso de un bioensayo basado en la división celular para una determinación definitiva, ya que respecto a este proceso biológico, son activas todas las citokinas conocidas, siendo así que es el fenómeno que nos sirve para la definición de este grupo de sustancias. Los otros bioensayos, aunque más rápidos, son puramente indicativos, y tienen mayor utilidad a efectos de comparación entre distintos tejidos.

Síntesis, transporte y lugares de acción.- En principio, todas las células de un organismo vegetal están capacitadas para la síntesis de citokinas; sin embargo, es evidente que unos tejidos necesitan más que otros del aporte exógeno de citokinas para su crecimiento y que el contenido endógeno en estas fitohormonas varía de unos tejidos a otros, lo que hace pensar en una diferente capacidad de síntesis. Por otra parte, se ha puesto de manifiesto el transporte de las citokinas

por el floema (Black y Osborne, 1965) y por el xilema (Itai y Vaadia, 1965; Kende, 1965; Loeffler y Van Overbeek, 1964).

Se ha descrito la síntesis de citokinas en dos órganos, el ápice de la raíz y las semillas.

Apice de la raíz: La presencia de citokinas en las raíces fue puesta de manifiesto por Babcock y Morris (1970). Short y Torrey (1972) encontraron que el extremo terminal de 1 mm de las raicillas de plántulas de guisante, contenía 44 veces más citokinas libres que el segmento superior entre 1 y 5 mm. Sistemas radiculares sometidos a condiciones adversas de sequedad o de salinidad, producen una disminución en el contenido en citokinas de los exudados de xilema (Itai et al., 1968, 1973). En muchas especies se han dado referencias de los cambios de niveles de citokinas endógenas en los exudados de xilema en correspondencia con el estado de desarrollo de los distintos órganos de la planta (Luckwill y Whyte, 1968; Davey y Van Staden, 1978).

Semillas: Burrows y Carr (1970) observaron que los niveles endógenos de citokinas en las semillas en desarrollo de guisante, eran máximos en los períodos de máximo volumen del endospermo y en los períodos de más rápido crecimiento del embrión. Hahn et al. (1974) obtienen evidencia de la síntesis de citokinas en las semillas de guisantes mediante el cultivo "in vitro" de las mismas, ya que sin un suministro exógeno de estos reguladores de crecimiento, los contenidos endógenos aumentaban con el desarrollo del endospermo y del embrión.

En cuanto a los órganos donde se da un alto contenido en citokinas y se ha descrito la influencia de las mismas en su desarrollo, se han citado:

Las hojas: El contenido en citokinas libres va aumentando con su desarrollo (Engelrecht, 1972), y al llegar a la madurez el contenido es muy alto, pero predominan entonces los glucósidos (Hewett y Wareing, 1973; Van Staden, 1976), interpretados como formas de reserva o inactivadas.

Los frutos: Los frutos en desarrollo se han citado siempre como órganos con un gran contenido en citokinas

(Miller, 1965; Davey y Van Staden, 1978). La misión principal de estas citokininas sería la atracción de metabolitos y elementos minerales necesarios para el desarrollo del fruto (Seth y Wareing, 1967; Luckwill, 1977). Con la maduración van disminuyendo los niveles de estas hormonas (Davey y Van Staden, 1977 y 1978), aumentando la proporción de glucósidos respecto a las formas libres.

Las yemas: Se ha descrito un alto contenido en citokininas en estos órganos (Kannagara y Booth, 1974; Davey y Van Staden, 1978), llegándose incluso a pensar en que constituirían un lugar de síntesis, pero Henson y Wareing (1977) demostraron que las citokininas presentes en las yemas eran resultado del transporte desde otros órganos.

II- ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

1.- Influencia de las citokininas sobre la división celular y proliferación de callos.- Los primeros trabajos sobre cultivo de tejidos de Citrus se encaminaron fundamentalmente a conseguir la proliferación de masas celulares "in vitro". Varios investigadores como Demétrides (1954) y Murashige y Tucker (1969) obtuvieron callos a partir de diversos tejidos aislados del tallo y del fruto de plantas del género Citrus.

En este trabajo se ha estudiado el efecto de las substancias hormonales sobre el crecimiento de los callos obtenidos a partir de entrenudos de Citrus limon (L.) cultivados in vitro. También se han determinado las condiciones para la separación, división y proliferación de células aisladas de estos callos.

2.- Control hormonal de la Organogénesis.- En los agrios, Rangan et al. (1968, 1969), Button y Bornman (1971), Navarro et al. (1979), han inducido la embriogénesis en tejido nucelar de semillas.

Grimblat (1972) obtuvo la diferenciación de yemas a partir de callos procedentes de tallos de plántulas de C. madurensis en un medio rico en citokininas. Primo y Harada

(1976) demuestran el control hormonal de la diferenciación de tallos, raíces y callos en citrange Troyer (híbrido de *C. sinensis* var. *W. navel* x *P. trifoliata*) determinando histológicamente el origen de los órganos neoformados y desarrollan una técnica de propagación vegetativa "in vitro" para esta planta.

En este trabajo se estudia el control hormonal de la organogénesis en plantas del género *Citrus* y *Poncirus* así como de un híbrido intergenérico, el citrange Troyer.

Propagación de patrones de agrios mediante técnicas de cultivo de tejidos.- Raj Bhansali y Arya (1978) estudian el efecto de diversas fitohormonas sobre la organogénesis de callos de *C. sinensis*, *C. grandis*, *C. aurantifolia* y *C. limetioides* con vistas a desarrollar sistemas de propagación "in vitro" para las mismas.

También se ha estudiado el cultivo "in vitro" de yemas vegetativas y el efecto de la aplicación de reguladores de crecimiento al medio de cultivo (Altman y Goren, 1971, 1974; Navarro et al., 1975).

Por último se ha conseguido regenerar plantas completas a partir de células individuales (Button y Botha, 1975) o protoplastos (Vardi et al., 1975).

La propagación de los portainjertos de agrios en la práctica, se realiza por semillas, manteniéndose la homogeneidad genética de la descendencia gracias al carácter poliembriónico de las especies utilizadas como portainjertos, en las cuales los embriones nucelares suelen predominar sobre el de origen sexual. Sin embargo como complemento a nuestro programa de mejora genética de patrones de agrios (Forner, 1977) en el cual se manejan híbridos o mutantes selectos que presentan caracteres juveniles, en los que deben pasar varios años para poder obtener frutos y semillas, es interesante disponer de sistemas de propagación vegetativa "in vitro" en los que partiendo de una pequeña cantidad de material vegetal pueda obtenerse rápidamente un número suficiente de plantas para realizar los ensayos de adaptación ecológica y tolerancia a

enfermedades.

En este trabajo se estudia comparativamente la capacidad de propagar diversas especies de Citrus utilizadas como patrones por diferentes sistemas de cultivo de tejidos "in vitro".

- 4.- Control de la floración.- El control de la floración de los agrios mediante la aplicación de substancias con actividad como reguladores del desarrollo ha sido ampliamente estudiado. El ácido gibberélico aplicado durante el período de inducción floral (noviembre-diciembre en nuestras condiciones) inhibe claramente la floración posterior de los agrios (Monselise y Halevy, 1964; Moss, 1970; Guardiola et al., 1977). Por el contrario el CCC (cloruro de cloroetiltrimetilamonio), el SADH (dimetil hidracido del ácido succínico) o el BOA (oxiacetato de benzotiazol) estimulan la floración en los limoneros (Monselise et al., 1966) aunque este efecto es menos acusado en el naranjo (Moss, 1971).

El efecto de las aplicaciones de citokinas sobre la floración de los agrios es prácticamente desconocido por lo que el objeto de esta parte del trabajo es conocer el efecto de este tipo de hormonas sobre la inducción floral en estas plantas.

- 5.- Incremento de la fructificación.- En los agrios, el ácido gibberélico (GA) ha sido ampliamente utilizado para conseguir un incremento del cuajado del fruto. Los efectos han sido favorables cuando las aplicaciones se han hecho a flores, frutos o ramas en diversas variedades (Hield et al., 1958; Soost y Burnett, 1961; Krezdorn y Cohen, 1962).

Los tratamientos a árboles completos de naranjos Valencia y Washington navel dieron sin embargo resultados poco satisfactorios en cuanto al incremento en la producción (Coggins et al., 1960; Hield, 1965; Moss, 1970). En general estos tratamientos producen un aumento inicial del número de frutos retenidos aunque posteriormente no se aprecia una mejora considerable en la cosecha final. Resultados semejantes

se obtuvieron en pomelo y limonero (Coggins et al., 1960, 1962). En clementino las aplicaciones de GA a árboles completos han dado como resultado un aumento del cuajado del fruto y de la producción, especialmente cuando los árboles se cultivan en condiciones de inadecuada polinización cruzada (Soost y Burnett, 1961; García Martínez y García Papí, 1979). En general, los distintos autores coinciden en afirmar que el aumento del número de frutos cuajados con estos tratamientos da lugar a una disminución del tamaño de los mismos.

A diferencia de las giberelinas cuyos efectos sobre la fructificación del naranjo han sido extensamente estudiados, se dispone de muy escasa información sobre la influencia de las citokininas en este proceso. Se ha observado que la kinetina aplicada a inflorescencias o frutos pequeños aumenta el porcentaje de éstos que cuajan (Moss, 1972; Primo et al., 1977; García Martínez y García Papí, 1979) aunque no se conocen bien los efectos de las aplicaciones al árbol entero.

En este trabajo se estudia el efecto de diversas concentraciones de citokininas aplicadas en diversos estados del desarrollo del fruto sobre su cuajado. Se han seleccionado las variedades de naranjo Navelate y Clementina fina por presentar ambas problemas de deficiente cuajado.

6.- Retraso de la maduración.- Los reguladores de crecimiento actúan de forma eficaz sobre diversos aspectos de la madurez de los frutos cítricos. Se ha demostrado que el GA retrasa la degradación de la corteza de frutos de diversos agrios (Coggins y Hield, 1958; Monselise, 1973; Soost y Burnett, 1961; Coggins et al., 1960). Un efecto similar, aunque quizá menos acusado, ha sido evidenciado al aplicar auxinas de síntesis como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (Stewart 1949).

Por otra parte la senescencia de la corteza del fruto produce en la misma una serie de alteraciones entre las que cabe destacar el reblandecimiento (Coggins y Lewis, 1965). Las aplicaciones de GA retrasan claramente la senescencia de

la corteza del fruto y afectan por tanto la aparición de todas estas alteraciones.

Los efectos de las citokinas sobre la senescencia de la corteza del fruto han sido mucho menos estudiados aunque se ha mostrado que la 6-benciladenina (6-bencilaminopurina) retrasa la degradación de la clorofila en naranjas (Eilati et al., 1969).

Debido al interés práctico que tienen los tratamientos que afectan la maduración o la conservación del fruto, en esta parte del trabajo se ha estudiado el efecto de las citokinas sobre el color, maduración y características de los frutos cítricos.

Contenido endógeno.- La primera referencia sobre citokinas en tejidos de Citrus la dan Khalifah y Lewis (1966), que comprobaron la presencia, en las semillas de limonero, de un factor que induce la división celular, aunque no identificaron la substancia en cuestión.

No hemos encontrado referencias sobre la presencia de citokinas en la raíz en los agrios, y aunque Wheaton y Bausher (1977) intentan identificarlas en el exudado de xilema de estas plantas, mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC) seguida de un bioensayo, los resultados no son concluyentes. La presencia de citokinas se ha comprobado en hojas de limonero de diferentes edades (Ilan y Goren, 1979), en yemas (Mingo, 1979) y en la corteza del fruto del naranjo (Erner et al., 1976). La escasez de información sobre el contenido endógeno de estas hormonas en los agrios justifica que en esta parte del trabajo se trate de profundizar en el conocimiento de la distribución y evolución de las mismas en diversos órganos tales como raíces, yemas florales y vegetativas y frutos en distintos estados de desarrollo.

- MATERIAL Y METODOS

Cultivo de entrenudos.- Para el estudio de la división celular y proliferación de callos se tomaron brotes jóvenes de

plantas de Citrus limon; para el estudio de la organogénesis se tomaron brotes jóvenes de plantas de Citrus sinensis Osbeck. var. Washington Navel, de Poncirus trifoliata R. y de su híbrido citrange Troyer.

Estas plantas fueron cultivadas en invernaderos a la temperatura de 22°C. durante el día y 18°C. durante la noche con un fotoperíodo de 16 horas. Después de obturar las extremidades cortadas con parafina fundida, los brotes se su mergen durante 5 minutos en agua adicionada de un mojante (Tween 20 al 0'1%) y posteriormente se desinfectan durante 15 minutos en una solución filtrada de hipoclorito cálcico al 7%. Después de lavarlos 3 veces con agua esteril se cor tan segmentos de entrenudos de aproximadamente 1 cm. de long itud que se dividen longitudinalmente en dos fragmentos. Es tos inóculos se cultivan asépticamente en un medio que con tiene los elementos minerales y vitaminas de MURASHIGE y SKOOG (1962), sacarosa al 5% y diferentes sustancias de cre cimiento del tipo auxinas y citokininas. El pH del medio se ajusta a 5'5 antes de adicionar el agar (Difco-Bacto) al 0'7%. Los medios se esterilizan en autoclave durante 20 min. a 120°C. Los cultivos se efectúan en tubos de 24 x 160 mm. con teniendo 20 ml. de medio y un solo inóculo manteniéndolos a una temperatura de 27°C durante el día y 24 durante la noche con un período de iluminación de 16 horas (a una intensidad luminosa de 3.000 lux aproximadamente que se consigue con lámparas fluorescentes tipo Gro-lux).

- 2.- Cultivo de células separadas.- Para la obtención de las sus pensiones celulares se utilizaron callos obtenidos a partir de segmentos de entrenudos. Estos callos se obtienen en el medio que contiene como sustancias de crecimiento 2,4-D $5 \cdot 10^{-6} M$ y BA $10^{-6} M$, pues se ha observado que este medio pro duce los callos más friables.

Para la separación de las células se han ensayado procedimientos enzimáticos y mecánicos. Se han utilizado di versas enzimas comerciales del tipo pectinasa, el número de células disociadas ha sido escaso. Se ha ensayado la acción

conjunta de estas pectinasas con enzimas del tipo celulasa a baja concentración (celulasa onozuka y driselasa al 0'5%). Pero no han producido el efecto sinérgico deseado. Tampoco ha mejorado la separación de las células la adición de manitol.

Se ha empleado con aceptables resultados un homogeneizador tipo "Potter Elvehjem", en el cual se introducen los callos partidos en pequeños pedazos junto con 15 ml de medio de cultivo. El líquido obtenido después de una separación de las células se filtra en un tamiz metálico de 0'038 mm de malla con objeto de eliminar los agregados celulares.

Las células aisladas se separan mediante una centrifugación a 1.000 r.p.m. durante 3 minutos. El líquido sobrenadante se decanta y las células se vuelven a eluir en un volumen de medio de cultivo tal que la concentración celular resultante sea de aproximadamente 10^4 células por ml, medida con un hematímetro de Malassez de 1 mm³. Todas las operaciones anteriormente descritas se realizan asépticamente. El medio de cultivo es el anteriormente citado, salvo la concentración de sacarosa, que en este caso es al 2%, y al que se han añadido como sustancias de crecimiento 2,4-D y BA a diferentes concentraciones. Los cultivos se realizan en placas petri de 5 cm de diámetro con 3 ml de suspensión por placa. Estas placas se cierran con "Parafilm" y se disponen cada seis en placas de 18 cm de diámetro, cuyo fondo está recubierto de papel de filtro humedecido con agua destilada, lo cual hace que se comporte como una cámara húmeda. Los cultivos se realizan a la temperatura de 27°C y a la oscuridad. Para cada medio de cultivo se contó el número de colonias en 5 placas petri.

- 3.- Propagación vegetativa "in vitro". - El presente estudio se realizó en las especies del género *Citrus*: *C. aurantium* Lin. (naranja amarga), *C. taiwanica* Tan & Shim, *C. medica* Linn (Cidra), *C. reticulata* Blanco (mandarino común), *C. reshni* Hort ex Tan (mandarino Cleopatra), *C. sinensis* (L) Osbeck (naranja dulce var Blanca común), *C. jambhiri* Lush (limón)

rugoso), *C. volkameriana* Pasquale, *C. Macrophylla* Wester; en la especie de *Poncirus*, *P. trifoliata* (L.) Raf. y en dos híbridos el citrange Troyer (híbrido de *C. sinensis* (L) Osbeck var Washington navel x *P. trifoliata* (L.) Raf.) y el Swingle Citrumelo C.P.B. 4475 (híbrido de *C. paradisi* Macf. var Duncan x *P. trifoliata* (L.) Raf.).

Se utilizaron tres sistemas de propagación vegetativa:

- A) Partiendo de un fragmento de entrenudo se induce la proliferación de callo y posteriormente la regeneración de yemas adventicias en un medio rico en citoquininas. Una vez desarrolladas estas yemas en pequeños tallos éstos se trasplantan a un medio rico en ANA para su enraizamiento.
- B) Se parte de una yema vegetativa, separada del tallo junto con una porción de tejido circundante y se cultiva en un medio con citoquininas con objeto de producir el desarrollo de brotes múltiples. Los tallos obtenidos se transfieren posteriormente a otro medio con ANA para su enraizamiento.
- C) Se parte de un segmento de brote de aproximadamente 1 cm. de longitud con una yema en su extremo superior que se coloca verticalmente sobre un medio de cultivo rico en ANA de forma que la yema quede completamente sumergida en el medio con objeto de provocar la neoformación de raíces en esta zona.

En todos los casos las plantas enraizadas se pasan a maceta con un substrato adecuado a base de turba y arena al 50% y se fertilizan con la solución mineral de MURASHIGE y SKOOG (1962). Las macetas se introducen en bolsas de polietileno para reducir las pérdidas de humedad procediendo según el método descrito por NAVARRO et al. (1975).

La técnica utilizada para el cultivo de tejidos ha sido la descrita en el punto 1.

histológico sobre la diferenciación de órganos se ha realizado por el procedimiento siguiente:

4.1. Fijación.- Las muestras se fijan en una mezcla (FAA) con la siguiente composición: 90 ml. de alcohol etílico al 70%, 5 ml. de ácido acético glacial y 5 ml. de formalina comercial (formaldehído 40%). Siempre se utiliza un gran volumen de FAA en relación con el volumen del tejido. El período de fijación es de 1 a 2 días.

4.2. Deshidratación.- El tejido se lava durante 24 horas para eliminar totalmente el FAA. Para deshidratarlo se pasa durante 1 a 2 horas cada vez por una serie de soluciones de alcohol etílico de las siguientes concentraciones: 5%, 10% y 30%, la deshidratación se completa con mezclas de alcohol butírico terciario (TBA), alcohol etílico y agua, que progresivamente se reemplaza por TBA.

Se utilizan las siguientes soluciones:

- 1.- 50 ml. de H₂O, 40 ml. de alcohol etílico, 95% y 10 ml. de TBA.
- 2.- 30 ml. de H₂O, 50 ml. de alcohol etílico, 95% y 20 ml. de TBA.
- 3.- 15 ml. de H₂O, 50 ml. de alcohol etílico, 95% y 35 ml. de TBA.
- 4.- 45 ml. de alcohol etílico, 95% y 55 ml. de TBA.
- 5.- 25 ml. de alcohol absoluto y 75 ml. de TBA.
- 6.- 100% de TBA.

Las muestras se dejan en cada solución durante 4 horas excepto en la última (TBA, 100%) en la que se mantienen durante 8 a 10 horas en la estufa a 30°C.

4.3. Inclusión en parafina.- Se colocan las muestras con TBA suficiente para cubrirlas, en vasos que contienen parafina. Se introducen en una estufa a la temperatura de 65°C, y después de 4 horas, se reemplaza la parafina

utilizada por parafina fresca fundida.

Al cabo de 48 horas se vierte una capa de parafina fundida sobre pequeños moldes hechos con papel de aluminio y cuando comienza a solidificarse se colocan cuidadosamente las muestras añadiendo una nueva capa de parafina.

4.4. Cortes histológicos.- El tejido se corta en secciones de 10 μ mediante un microtomo tipo Minot.

4.5. Tinción.- El tejido se ha teñido con safranina y verde rápido según el siguiente proceso:

Con objeto de eliminar la parafina, las secciones se introducen en xileno durante 10 minutos y posteriormente se pasan a una mezcla de xileno y alcohol absoluto al 50% durante 5 minutos.

Para hidratar las secciones se mantienen 5 minutos en cada una de las siguientes soluciones de alcohol de concentraciones decrecientes: Alcohol absoluto, 95%, 70% y 50%.

Las secciones se tiñen a continuación con una solución de safranina al 0'5% (p/v) en etanol al 50% durante 2 horas. Posteriormente se lavan con agua, se pasan rápidamente por una serie creciente de soluciones alcohólicas del 70%, 90% y alcohol absoluto, y se tiñen durante 2-4 minutos con verde rápido (solución al 0'5% (p/v) en una mezcla de aceite de clavo y etanol al 50%).

Finalmente las secciones se pasan por una mezcla de aceite de clavo al 50%, alcohol absoluto al 25% y xileno al 25%, lavándose por último con xileno.

4.6. Estudio cromosómico de las plantas obtenidas.- Se cortan raicillas que tengan aproximadamente 0'5 cm. de longitud, se lavan con agua destilada y se tratan con colchicina al 1% (p/v) durante dos horas.

Después de este tratamiento previo se realiza la tinción según el método Feulgen. El tiempo óptimo de

hidrólisis, durante el cual las raíces se introducen en HCl 1N a 58-60°C ha sido 15 minutos. Posteriormente las raíces se lavan con agua destilada y se dejan en fucsina leucobásica hasta que la zona apical aparezca intensamente teñida.

Para el montaje se utiliza orceina acética al 1%.

5.- Control de la floración.- Se aplica kinetina a diferentes concentraciones (10, 20 y 50 ppm.) a árboles adultos de la variedad Washington Navel en diferentes momentos durante el período de parada invernal. La pulverización se realizó con una mochila atomizadora aplicando una cantidad aproximada a 6 litros por árbol de solución hormonal a la que se había añadido un mojante (Tween 20 al 0'1%). En cada tratamiento se utilizaron tres grupos de tres árboles cada uno distribuidos en bloques al azar. Los conteos de brotes florales y vegetativos se realizaron en la primavera siguiente y para ello se tomaron 4 ramas grandes por árbol distribuidas en la dirección de los puntos cardinales, realizándose en ellas el conteo del número total de flores, así como del número de inflorescencias florales, mixtas y brotes vegetativos.

6.- Incremento de la fructificación.-

6.1. Aplicación a frutos individuales.- Se aplicó kinetina a diferentes concentraciones (5, 10, 20 y 50 ppm.) a frutos individuales de la variedad Navelate, situados en diferentes posiciones, es decir frutos de brotes mixtos o florales.

Los tratamientos se efectuaron en momentos del desarrollo del fruto correspondientes a floración, caída de pétalos (principios de mayo), 15 días (frutos de 1 cm. aproximadamente) y un mes más tarde (principios de junio, frutos de 2-2'5 cm. aproximadamente).

La aplicación hormonal se realizó sumergiendo los frutos en una solución de dicha substancia a la que

Fundación Juan March (Madrid)

se había añadido un mojante (Tween 20 al 0'1%). Los frutos tratados así como los frutos testigos sin tratar que se dejaron en todos los árboles objeto de la experiencia, se marcaron individualmente mediante etiquetas, con el fin de seguir su evolución.

6.2. Aplicaciones a árboles completos.- Se aplicó kinetina a diferentes concentraciones (5, 10, 20 y 50 ppm.), pulverizando una solución de esta hormona a árboles adultos de las variedades Navelate y Clementina fina. Ambas variedades se seleccionaron por presentar problemas de cuajado de fruto. Para el ensayo se escogió un huerto de cada una de las variedades, que presentaban un arbolado homogéneo y donde previamente se comprobó que no existía ningún factor nutricional ni de cultivo que condicionase la producción. Cada tratamiento se realizó en 20 árboles, distribuidos en 5 bloques al azar de 4 árboles cada uno, dejándose sin tratar un número igual de árboles con la misma distribución. La pulverización se realizó con una mochila atomizadora aplicando una cantidad aproximada de 6 l por árbol de solución hormonal a la que se había añadido un mojante (Tween 20 al 0'1%). Se realizaron tratamientos en las épocas de la caída de pétalos (aproximadamente 80% de pétalos caídos), 15 días y 1 mes más tarde (principios de Junio). Los resultados se obtuvieron determinando, en la época de recolección del fruto, el peso de cosecha, el número de frutos por árbol y el tamaño de los mismos.

Retraso de la maduración.- Se aplicó kinetina a diferentes concentraciones (10, 20 y 50 ppm.) a frutos individuales de la variedad Valencia Late. Los frutos se eligieron al azar sin tener en cuenta posiciones relativas ni tamaños.

Los tratamientos se efectuaron en dos momentos: a mediados de Noviembre, con el fruto ya desarrollado pero totalmente verde, y a mediados de Diciembre, cuando el fruto ha comenzado el viraje de color.

La aplicación hormonal se realizó mojando los frutos con un pulverizador, con las correspondientes soluciones de kinetina a las que se añadió Tween 20 al 0'1%. Los frutos tratados se marcaron individualmente mediante etiquetas, para seguir su evolución. Se tomaron muestras de frutos tanto tratados como sin tratar a intervalos de 15 días, a fin de determinar su coloración, contenido en clorofila y carotenos e índice de madurez.

- La coloración de la corteza se determinó mediante un colorímetro Hunterlab, modelo D25P-2, que determina tres índices numéricos: L, que mide la luminosidad, y varía desde 0 (totalmente negro) hasta 100 (totalmente blanco); a, que mide la intensidad del rojo en valores positivos, la del verde en valores negativos, y marca el 0 para el gris y b, que mide la intensidad del amarillo en valores positivos, la del azul en valores negativos, y marca el 0 para el gris.
- Para evaluar el contenido en clorofila de la corteza, se realizó una extracción con acetona y posteriormente se determinó la absorbancia a 645 y 663 nm de longitud de onda, para determinar el contenido en clorofila a y b respectivamente. Los resultados se expresan finalmente en mg de clorofila total por g de peso fresco de corteza.
- La determinación del contenido en carotenos de la corteza se efectuó mediante extracción con éter etílico y hexano, y lectura de la absorbancia a 450 nm de longitud de onda. Los resultados se expresan finalmente en mg de carotenos por g de peso fresco de corteza.
- Para obtener el índice de madurez del zumo (relación sólidos totales/ácidos) se utilizó el método standard consistente en determinar los sólidos totales por refractometría y la acidez por valoración con hidróxido sódico 0'1N.

En el momento inicial y final de la experiencia se

caracterizaron los frutos determinando su diámetro, altura, espesor de corteza, peso de fruto, % de peso de corteza, % peso de jugo y % peso de pulpa.

Determinación de citokininas endógenas.-

8.1. Raíces.- Las raíces objeto de la experiencia se obtienen a partir de embriones germinados de citrange Troyer. Se toman semillas, a las cuales se ha quitado las cubiertas y se desinfectan durante 20 minutos en una solución de hipoclorito sódico al 0'7%. Posteriormente se lavan con agua estéril, y, en condiciones asépticas, se colocan los embriones en medio de cultivo solidificado con agar al 0'8%, que contiene las sales minerales de Murashige y Skoog. Los embriones se hacen germinar en la oscuridad a 28°C, y posteriormente, se deja crecer la plántula a la misma temperatura durante dos semanas con 16 h. de luz y 8 h. de oscuridad. Cuando las raicillas han alcanzado aproximadamente 2 cm., se toman para realizar las extracciones de citokininas.

8.2. Brotes y ovarios.- Los brotes y ovarios se obtienen mediante muestreo aleatorio en árboles adultos de las variedades Blanca Comuna, Washington Navel y Navelate; las muestras se transportan al laboratorio ya congeladas con nieve carbónica, y allí se liofilizan, se homogenizan y se almacenan liofilizadas a baja temperatura. Los brotes se tomaron en el mes de febrero, con una longitud máxima de 1/2 cm. Los ovarios se muestrearon antes y después de la caída de pétalos (finales de abril y mediados de marzo respectivamente).

8.3. Método de extracción y separación.- El material a analizar (6 g de peso fresco en el caso de las raíces, y 2 g de peso seco en el caso de las muestras liofilizadas) se extrae en etanol al 80%; primero durante 3 horas a temperatura ambiente y luego durante 20 horas a 4°C. Se fil-

tran las dos fracciones y se mezclan los dos filtrados. A continuación se evapora el etanol a vacío a 40°C y la fase acuosa se centrifuga durante una hora a 6.000 r.p.m. y el sobrenadante se ajusta a pH 2'5 para efectuar tres particiones con hexano. La fase acuosa se agita durante tres horas con polivinilpolipirrolidona (P.V.P. insoluble) para eliminar los fenoles, manteniéndose el pH a 6'5 -donde la absorción de las citokininas es mínima (Biddington y Thomas, 1976)- mediante la adición a partes iguales de tampón fosfato 0'5M. Se elimina la P.V.P. por filtrado y la fase acuosa se lleva a pH 8'5 para efectuar tres particiones con n-butanol con una duración total de 24 horas. La fase n-butanol se lleva a sequedad en vacío a 50°C y el extracto seco se rediluye en etanol para efectuar la cromatografía.

La cromatografía se realiza según describen Armstrong et al. (1969), en una columna de Sephadex LH-20, de 90 cm de longitud y 2'5 cm de diámetro, utilizando como eluyente etanol 35% a un flujo de 15 ml/h, recogiendo fracciones de 25 ml.

Las fracciones se pasan a erlenmeyers de 250 ml y se llevan a sequedad en estufa de corriente de aire a 45°C durante 24 h. El extracto seco se rediluye en medio de Murashige y Skoog para el test de médula de tabaco, y se efectúa el bioensayo tal como describen estos autores (Skoog y Miller, 1957), utilizando plantas de tabaco de la variedad Wisconsin 38 crecidas en un invernadero.

- 8.4. Difusión en agar.- En el caso de las raíces, se ha hecho una comprobación del contenido de citokininas en los ápices mediante una prueba de difusión en agar.

La determinación de la actividad de las citokininas difundidas a partir del ápice de la raíz se ha realizado según el siguiente método:

Las plántulas de Citrange Troyer, antes descritas, se esterilizan con hipoclorito sódico al 0'7% durante 10 minutos, después -trabajando siempre en condicio-

nes asépticas- se lavan con agua estéril, se corta la zona apical de la raíz a una distancia de 5 mm del extremo y se clavan los ápices por el lado cortado en unas placas de Petri de 6 cm. de diámetro que contienen el medio de Murashige y Skoog para el test de la médula de tabaco. El ápice de la raíz se mantiene húmedo con un papel de filtro estéril, empapado en agua, adosado a la tapa de la placa de Petri. Se cierra con Parafilm y se introduce en una cámara de cultivo a 24°C en posición invertida, para que la raíz mantenga su posición normal. Al cabo de un tiempo se quitan los ápices de la raíz y en su lugar se colocan fragmentos de médula de tabaco para el bioensayo, determinándose la cantidad de citokinas difundidas por el crecimiento de la médula al cabo de 21 días. En este ensayo se han utilizado 50 ápices de raíz por placa de Petri y se ha mantenido la difusión durante 36 horas.

IV- RESULTADOS Y DISCUSION

1.- Influencia de las citokinas sobre la división celular y proliferación de callos.-

1.1. Formación de callos.- Las máximas proliferaciones de callo se han obtenido con las combinaciones ANA $5 \cdot 10^{-5} M$ + BA $10^{-6} M$ y 2,4-D $5 \cdot 10^{-6} M$ + BA $10^{-6} M$.

La tabla I muestra los efectos de varias citokinas (BA, Z, K) a diversas concentraciones, actuando en combinación con el 2,4-D $5 \cdot 10^{-6} M$. La concentración óptima para la proliferación de callo es diferente para cada citokina. La zeatina es la que produce un máximo crecimiento a más baja concentración ($5 \cdot 10^{-7} M$) mientras que la kinetina necesita la concentración más fuerte ($5 \cdot 10^{-6} M$) para producir un máximo efecto.

El estudio histológico muestra que las formaciones de callo provienen de células originadas por divisiones de las células del cambium.

Tabla I

EFFECTO DE TRES CITOKININAS, ACTUANDO EN COMBINACION CON 2,4-D $5 \cdot 10^{-6}$ M, SOBRE EL CRECIMIENTO DE LOS CALLOS OBTENIDOS A PARTIR DE SEGMENTOS DE ENTRENUDO DE LIMONERO

Concentración	6-benzilaminopurina		Kinetina		Zeatina	
	I.C.	P.S.	I.C.	P.S.	I.C.	P.S.
$5 \cdot 10^{-7}$ M	80'92±28'59	10'53	11'36± 3'07	15'94	97'51±35'43	9'10
10^{-6} M	92'45±32'26	9'98	36'83±18'49	13'16	63'01±24'86	12'47
$5 \cdot 10^{-6}$ M	72'05±21'15	11'17	82'40±23'66	10'14	51'89±19'72	12'56
10^{-5} M	23'60±12'61	16'96	81'35±31'75	11'26	20'14±12'97	14'21

I.C. = Índice de crecimiento = Peso fresco a los 45 días de cultivo/Peso fresco inicial.

P.S. = Porcentaje de peso seco del tejido.

1.2. Cultivo de células separadas.- En la tabla II se dan los efectos del 2,4-D y la BA, a diversas concentraciones sobre la división de las células aisladas. Como puede verse las primeras divisiones aparecen a los 5 ó 6 días de cultivo en los medios más favorables. El medio más favorable para la división celular es aquel que contiene como sustancias de crecimiento 1 mg/l de 2,4-D y 0'3 mg/l de BA.

2.- Control hormonal de la organogénesis.- Los resultados obtenidos muestran que tanto en el género Citrus como en Poncirus y en el híbrido citrange Troyer el control hormonal de la organogénesis se realiza según un modelo semejante.

Como puede verse en la Tabla III, en general los balances citokinas/auxinas favorables a las primeras (10:1) favorecen la formación de tallos. Las concentraciones elevadas de auxinas inducen la aparición de raíces, mientras que las citokinas inhiben este proceso. Los balances citokinas/auxinas equilibrados o favorables a las auxinas (1:1, 1:10) producen la proliferación de callo indiferenciado.

La diferenciación de yemas se produce al cabo de unas 6 semanas de cultivo en callos de naturaleza dura y compacta y color verdoso, que se desarrollan a partir de los fragmentos de entrenudo en los medios con balances altos de citokinas. Los callos no organógenos originados en los medios con un equilibrio hormonal adecuado son de naturaleza blanda y friable y su color es amarillento claro. Las raíces se originan en los medios ricos en auxinas, en su mayor parte directamente a partir del tejido original del entrenudo sin mediar la formación de callo.

El estudio histológico muestra que las formaciones de callo se inician a partir de formaciones meristemáticas derivadas de la zona cambial. Las yemas vegetativas se originan por diferenciación de las células parenquimáticas del callo y las raíces se inician a partir de la zona externa del cilindro central.

Aunque la organogénesis en ambos géneros parece es-

Tabla II
 EFECTO DE LA CONCENTRACION DE 2,4-D Y BA EN LA DIVISION DE LAS CELULAS SEPARADAS DE CA-
 LLOS DE LIMONERO.

Concentración de las substancias de crecimiento (mg/l)		Días transcurridos hasta las primeras divisiones	Número medio de colonias por placa Petri
2,4-D	BA		
0	0	-	-
0	0'1	-	-
0	0'3	-	-
0	1	-	-
0	3	-	-
0'1	0	-	-
0'1	0'1	10-12	2'2
0'1	0'3	10-12	3'8
0'1	1	12-14	1'8
0'1	3	12-14	1'7
0'3	0	-	-
0'3	0'1	8-9	9'8
0'3	0'3	7-8	11'2
0'3	1	8-9	6'2
0'3	3	8-9	6'4
1	0	10-12	1'6
1	0'1	5-6	31'6
1	0'3	5-6	35'8
1	1	7-8	21'2
1	3	7-8	10'4
3	0	10-12	1'8
3	0'1	7-8	22'0
3	0'3	7-8	23'6
3	1	7-8	22'2
3	3	7-8	16'4

Resultados después de 30 días de cultivo.

tar regulada por las hormonas de una forma semejante, aparecen claras diferencias en el comportamiento de las especies que se estudian en cuanto a capacidad de respuesta en la inducción de órganos por los reguladores de crecimiento. El género *Citrus* muestra una débil capacidad de regeneración de tallos en los tejidos que se utilizan en esta experiencia. Esta capacidad es en extremo baja en la variedad de naranjo dulce W. navel, aunque los resultados expuestos en otros trabajos muestran diferencias entre las especies de este género en cuanto a su potencialidad organogénica (Grimblat, 1972; Raj Bhansali y Arya, 1978).

Los fragmentos de tallo de *Citrus* muestran sin embargo una elevada capacidad de rizogénesis, cuando se cultivan en un medio con un suplemento adecuado de ANA. El *Poncirus trifoliata*, por el contrario, manifiesta una alta capacidad para la inducción de tallos por las citokininas y un escaso enraizamiento en los medios ricos en auxinas. El citrange Troyer responde tanto a las citokininas como a las auxinas regenerando tallos y raíces respectivamente, en cuantía igual o superior a la de sus especies progenitoras. Así este híbrido parece tener una capacidad para la regeneración de tallos en respuesta a la BA semejante a la del *Poncirus trifoliata*, mientras que el enraizamiento inducido por el ANA es similar al que se da en *Citrus* (Tabla III).

- 3.- Propagación de patrones de agrios mediante técnicas de cultivo de tejidos.- Se ha comprobado el efecto de la concentración de BA y ANA sobre la diferenciación de tallos a partir de fragmentos de entrenudos de las diferentes especies estudiadas. Como ya se ha expuesto en otros trabajos (Grimblat, 1972; Chaturvedi y Mitra, 1974; Primo y Harada, 1976) la presencia de una citokinina a concentración elevada es necesaria para la inducción de yemas. La concentración óptima de BA oscila entre los valores de 1 y 3 mgr/l para todas las especies en general. En algunos casos la adición de ANA a baja concentración (0.1 mgr/l) mejora sensiblemente el número de yemas que se producen por inóculo. Aparecen importantes diferencias en-

tre los patrones en cuanto a la respuesta de los tejidos que se cultivan a la inducción de tallos por las citokininas. Los mayores efectos se consiguen en el *C. medica*, citrange Troyer, Citrumelo y *P. trifoliata*, siendo sensiblemente inferiores en los otros.

Se ha comprobado el efecto de las citokininas sobre la proliferación de las yemas y el crecimiento de los brotes en las diferentes especies. Las concentraciones de BA que producen un número máximo de tallos oscilan entre los valores de 0'3 y 1 mgr/l. En algunos casos las concentraciones bajas de BA (0'1 mgr/l) favorecen ligeramente el desarrollo del brote. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por Navarro (1979) en el naranjo Robertson navel. En general el comportamiento de las especies ensayadas es semejante, no apareciendo diferencias importantes en el número de tallos que se producen en cada inóculo, aunque éstas son más acusadas en el crecimiento de los mismos, que en la mayor parte de los casos está en función del vigor de la propia especie.

En cuanto a la capacidad de enraizamiento de fragmentos de tallo joven, conteniendo al menos una yema, de los distintos patrones en función de la concentración de ANA en el medio, tanto el número de raíces por inóculo como el porcentaje de los mismos enraizados aumentan con la concentración de ANA en el medio, al menos dentro del rango de concentraciones utilizadas en esta experiencia. En este aspecto hemos observado que concentraciones de ANA superiores a 10 mgr/l han aumentado el enraizamiento, pero se han mostrado perjudiciales para el desarrollo del brote.

La capacidad de rizogénesis varía sensiblemente entre los distintos patrones siendo máxima en el cidro y mínima en el *P. trifoliata*.

En la Tabla IV se exponen las eficiencias de los tres sistemas de propagación empleados expresadas en función del número medio de plantas obtenidas por inóculo inicial. En el sistema A por tanto, los valores se refieren al nº medio de tallos por inóculo que se originan en el callo del entrenudo, afectado por el porcentaje de éstos que posteriormente enrai-

zan al ser transferidos a un medio adecuado. En el sistema B los valores expresan el número medio de tallos por inóculo que se obtienen del cultivo de yemas considerando como en el caso anterior la proporción de éstos que enraizan. En el sistema C los datos se refieren al porcentaje de enraizamiento de los segmentos de tallo conteniendo al menos una yema. En todos los casos las eficiencias se consideran para los medios que producen los resultados óptimos.

Como puede verse, el sistema de propagación A es el más eficaz en aquellos patrones que tienen una alta capacidad de regeneración de yemas adventicias como son el C. medica y el citrange Troyer. En los demás el sistema B se muestra más eficiente, siendo además más constante en su respuesta.

Otro aspecto a tener en cuenta, es el tiempo que se tarda en obtener las plantas propagadas por los distintos sistemas. Con el sistema A el tiempo medio de propagación oscila entre los 120-150 días, mientras que con el sistema B es de 75-100 días y con el C de 45-60 días. Por tanto aunque el sistema C es el menos eficiente desde el punto de vista de número de plantas propagadas por inóculo inicial, tiene a su favor que es notablemente más rápido que los otros.

También se ha estudiado en citrange Troyer la variabilidad morfológica y genética de las plantas propagadas (Tabla V). En este aspecto el sistema A produce un 26'7% de plantas aberrantes ya sea en sus características externas o en el número de cromosomas. Las plantas propagadas por los otros dos sistemas han mostrado una mayor homogeneidad.

Control de la floración.- Los resultados que se muestran en la Figura 1, indican que los tratamientos con kinetina durante el período de diferenciación floral (Noviembre-Diciembre en nuestras condiciones) inhiben la posterior floración del naranjo. Con las tres concentraciones ensayadas (10, 20 y 50 p.p.m.) aparecen diferencias significativas entre los árboles tratados y los testigos sin tratar en el número total de flores por rama así como en el de flores aisladas y en racimos sin hojas, que disminuyen respecto a los árboles control. En

Tabla IV

EFICIENCIA DE LOS SISTEMAS DE PROPAGACION ENSAYADOS EN LOS DISTINTOS PATRONES.

PATRON	SIST-A	SIST-B	SIST-C
	N° plantas/inóculo [*]	N° plantas/inóculo [*]	N° plantas/inóculo [*]
C. aurantium	0'16	2'90	0'78
C. taiwanica	0'39	2'70	0'67
C. medica	9'00	3'60	1'00
C. reticulata	-	1'04	0'43
C. reshni	-	1'54	0'40
C. sinensis	0'03	1'41	0'52
C. jambhiri	-	3'14	0'82
C. volkameriana	0'13	3'02	0'72
C. macrophylla	0'16	2'56	0'58
P. trifoliata	0'65	0'80	0'20
citrange Troyer	6'84	4'11	0'89
S. Citrumelo	1'62	2'94	0'52

* Número medio de plantas que pueden ser transplantadas a maceta por cada inóculo que se pone inicialmente en cultivo.

Tabla V
CAMBIOS CROMOSOMICOS QUE AFECTAN A LAS PLANTAS DE CITRANGE TROYER PROPAGADAS POR LOS DIFERENTES SISTEMAS.

	N° plantas observadas	diploides normales		diploides morfológicamente aberrantes y quimericas		Tetraploides		Poliploides		Aneuploides	
		N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
SIST-A	30	22	73'3	5	16'7	2	6'7	0	0	1*	3'3
SIST-B	30	29	96'7	1	3'3	0	0	0	0	0	0
SIST-C	30	30	100	0	0	0	0	0	0	0	0

* Probablemente trisómico.

cuanto a los efectos de estos tratamientos sobre la brotación, en la tabla VI se observa que las tres dosis de kinetina producen una reducción significativa del número de brotes florales y un aumento de los vegetativos, permaneciendo con escasas variaciones el de brotes mixtos, si bien aumenta su proporción relativa. Estos tratamientos disminuyen las relaciones flores/brote y flores/hojas en los brotes mixtos y aumentan la de hojas/brote tanto en los mixtos como en los vegetativos. En conjunto el máximo efecto se consigue con la pulverización de kinetina a la concentración de 20 p.p.m.

La Figura 1 muestra la influencia de la época de aplicación de la kinetina sobre la floración. Los tratamientos realizados entre la tercera semana de Octubre y la primera de Enero muestran diferencias significativas respecto a los testigos no tratados en cuanto a la inhibición de la floración e incremento del desarrollo vegetativo. La máxima efectividad significativa se consiguió con los tratamientos realizados en la 3ª semana de Noviembre y en la 1ª de Diciembre.

5.- Incremento de la fructificación.- La tabla VII muestra el efecto sobre el cuajado de diferentes concentraciones de kinetina y benciladenina (5, 10, 20, y 50 p.p.m.) aplicadas a frutos individuales de la variedad Navelate en diferentes estados de desarrollo. Las dosis óptimas de aplicación oscilan entre las 10-20 p.p.m. no apareciendo diferencias importantes en cuanto a efectividad entre la kinetina y la benciladenina. Las mayores respuestas se obtienen cuando la aplicación se realiza a ovarios o frutitos en los primeros estados de desarrollo (floración y caída de pétalos) mientras que estos tratamientos tienen escasa eficacia cuando se aplican a frutos en estados de desarrollo más avanzados (frutos de 2'5 cm. de diámetro o superiores).

Se aprecia también claramente que la probabilidad de cuajado de los frutos situados en brotes mixtos es superior a la de los frutos procedentes de brotes florales. Sin embargo en estos últimos el incremento de cuajado relativo inducido por la aplicación hormonal respecto a los frutos testigos sin

TABLA / VI EFECTOS DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE KINETINA SOBRE LA PROTECCIÓN DEL MARANTO WASHINGTON NIVEL

Concentración citolininas	Nº brotes rama	brotes florales		brotes mixtos			brotes mixtos con una sola flor			brotes vegetativos						
		Nº rama	X F/B	X	F/B	H/B	F/H	Nº rama	X	H/B	F/H	Nº	X	H/B		
0	74,42	48,83	65,61	2,15	5,42	7,28	3,80	1,92	1,98	9,00	12,09	2,32	0,43	11,17	15,01	3,33
kin 10 ppm	59,34 ^m	15,67 ^m	26,41	2,58	6,92	11,66	3,20	2,20	1,45	10,00	16,85	3,06	0,33	26,75 ^m	45,08	4,14
kin 20 ppm	50,47 ^m	12,14 ^m	24,05	2,57	6,41	12,70	3,13	2,25	1,39	8,00	15,85	3,26	0,31	23,92 ^m	47,39	4,56
kin 50 ppm	62,57 ^m	16,58 ^m	26,50	2,62	7,20	11,51	3,25	2,37	1,37	9,33	14,91	3,34	0,30	29,40 ^m	47,08	4,48

- Tratamientos efectuados en la 3ª semana de Noviembre

- ^m Diferencias significativas respecto al testigo con un nivel de probabilidad del 1 %

- kin = Kinetina (Furfuri aminopurina)

- F/B = relación Flores/brote

- H/B = relación Hojas/brote

tratar es notablemente superior.

Estos resultados muestran que la aplicación de citokininas a frutos individuales de Navelate provoca un aumento de su partenocarpia. Posiblemente este efecto está estrechamente relacionado con la atracción de productos fotosintéticos que inducen estas hormonas (Kriedemann, 1968) ya que los fallos en el cuajado del fruto, en parte se producen por una deficiente nutrición del mismo. En este aspecto, la mayor respuesta observada en los primeros estados de desarrollo del fruto podría deberse a que en estos momentos la disponibilidad de nutrientes en la planta es menor y la competencia por los mismos es máxima. Una explicación análoga tendría el hecho de que los frutos procedentes de brotes florales cuajan en menor proporción y responden en cuantía relativa mayor al tratamiento con estas hormonas, que los que se hallan en brotes mixtos, en los cuales las hojas próximas les aportan un suplemento adicional de fotoasimilados.

Los tratamientos con soluciones de citokininas a árboles completos de las variedades Navelate y Clementina, seleccionadas por presentar problemas de cuajado del fruto han dado como resultado un aumento significativo de la productividad de ambas. En las tablas VIII y IX se muestra que en las dos variedades el momento óptimo para la aplicación es el de la caída de pétalos, disminuyendo la eficacia de estos tratamientos posteriormente a medida que el fruto alcanza estados más avanzados de desarrollo. Las aplicaciones de estas hormonas realizadas en Junio cuando los frutos alcanzan tamaños superiores a los 2 cm. de diámetro en Navelate y 1 cm. en Clementina, son prácticamente ineficaces para aumentar la fructificación.

Cuando el tratamiento se realiza en el momento óptimo, tanto el peso de cosecha como el número de frutos por árbol aumenta con la concentración de benciladenina, al menos dentro del rango de valores utilizados en esta experiencia. Sin embargo el tamaño y peso del fruto disminuye sensiblemente correlacionándose esta disminución con el aumento de cosecha y número de frutos por árbol. En este aspecto consideramos

TABLA VII EFECTOS DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE KINETINA SOBRE EL CUAJADO DE FRUTOS DE LA VARIEDAD NAVELATE

Concentración citokininas	% de cuajado de frutos de brotes mixtos				% de cuajado de frutos de brotes florales			
	Momento de aplicación				Momento de aplicación			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV
0	36	39	47	83	3	5	16	66
Kin 5 ppm	58	60	52	85	22	26	24	71
Kin 10 ppm	64	78	69	79	34	39	42	68
Kin 20 ppm	72	76	82	87	41	47	51	69
Kin 50 ppm	61	65	65	72	32	34	38	68
BA 5 ppm	53	62	64	86	21	19	27	64
BA 10 ppm	62	70	76	88	36	41	38	70
BA 20 ppm	67	81	79	84	39	49	52	67
BA 50 ppm	60	59	64	81	28	32	33	69

I - Floración

II - Caída de pétalos

III - Frutos 1 cm diámetro

IV - Frutos 2,5 cm diámetro

TABLA VIII EFECTO DE LAS PULVERIZACIONES CON SOLUCIONES DE BENCILADENINA APLICADAS A ARBOLES COMPLETOS SOBRE LA PRODUCCION DE LA VARIEDAD NAVELATE

Concentración citokininas	Momento de aplicación	Producción Kgr/árbol	% respecto al testigo	Nº frutos árbol	% respecto al testigo	Peso medio por fruto(gr)	% respecto al testigo
0		76'2	100'0	469'2	100'0	162'4	100'0
	I	82'3 a	108'0	512'1 a	109'1	160'7	99'0
	II	74'8	98'2	470'7	100'3	158'9	97'8
BA 5 ppm	III	77'1	102'5	453'7	96'7	169'9	104'6
	I	87'4 ab	114'7	573'8 b	122'3	152'3 a	93'8
BA 10 ppm	II	84'9 a	111'4	543'8 ab	115'9	156'1	96'1
	III	74'2	97'4	444'8	94'8	166'8	102'7
	I	91'5 bc	120'1	607'1 c	129'4	150'7 a	92'8
BA 20 ppm	II	86'1 a	113'0	566'8 b	120'8	151'9 a	93'5
	III	80'1	105'1	470'0	100'2	170'4	104'9
	I	93'7 c	123'0	639'1 c	136'2	146'6 a	90'3
BA 50 ppm	II	86'8 a	113'9	597'8 bc	127'3	145'1 a	89'4
	III	75'2	98'7	434'9	92'7	172'9	106'5

I - Caída de pétalos (21-IV); II Frutos de 1 cm Ø (12-V) ; III Frutos de 2,5-3cm Ø (20-VI)

Los datos de una misma columna sin subíndice común difieren significativamente al 5 % de nivel de probabilidad.

TABLA IX EFECTO DE LAS PULVERIZACIONES CON SOLUCIONES DE BENCILADENINA APLICADAS A ARBOLES COMPLETOS SOBRE LA PRODUCCION DE LA VARIEDAD CLEMENTINA.

Concentración citokininas	Momento de aplicación	Producción Kgr/árbol	% respecto al testigo	Mg frutos árbol	% respecto al testigo	Peso medio por fruto (gr)	% respecto al testigo
0		61'2	100'0	893,4	100'0	68'5	100'0
	I	69'4	113'4	1.049'9	117'5	66'1	96'5
	II	67'2	109'8	1.007'5	112'8	66'7	100'3
BA 5 ppm	III	59'6	97'4	853'8	95'6	69'8	101'9
	I	78'6	128'4	1.271'8	142'4	61'8	90'2
	II	75'5	123'4	1.223'6	137'0	61'7	90'1
BA 10 ppm	III	62'2	101'6	886'0	99'2	70'2	102'5
	I	83'7	136'8	1.458'1	163'2	57'4	83'8
	II	80'9	132'2	1.373'5	153'7	58'9	86'0
BA 20 ppm	III	65'9	107'7	917'8	102'7	71'8	104'8
	I	86'4	141'2	1.608'9	180'1	53'7	78'4
	II	83'2	136'0	1.509'9	169'0	55'1	80'4
BA 50 ppm	III	64'1	104'7	874'4	97'9	73'3	107'0

I - Caída de pétalos (16-IV) , II - Frutos de 0,5 cm ø (5-V) , III - Frutos de 1-1'5 cm ø (4-VI)
 Los datos de una misma columna sin subíndice común difieren significativamente al 5 % de nivel de probabilidad.

que este efecto se debe más bien a que al cuajar mayor número de frutos éstos se desarrollan menos (efecto que por otra parte es bien conocido en los agrios) que a una acción directa de las citokininas afectando negativamente al desarrollo del fruto. Esta afirmación vendría parcialmente apoyada por el hecho de que cuando se realizan los tratamientos con citokininas en épocas en que son ineficaces para aumentar la productividad, el tamaño del fruto permanece inalterado. Por otra parte en las gráficas de la figura 2 se representa la curva de crecimiento del fruto cuando se aplican citokininas (benciladenina 20 p.p.m.) tanto a frutos individuales (A) como a árboles completos (B) de Navelate. Puede verse que la aplicación hormonal a frutos individuales provoca un incremento en el crecimiento de los frutos tratados respecto a los controles sin tratar. Sin embargo al cabo de cierto tiempo el desarrollo de ambos grupos de frutos se iguala y no aparecen diferencias ni en el tamaño ni en el peso definitivo en el momento de la maduración. Cuando se aplica la benciladenina al árbol completo se aprecia un ligero incremento del desarrollo de los frutitos respecto a los de los árboles sin tratar. Sin embargo las diferencias en la velocidad de crecimiento se mantienen por muy poco tiempo y al final, a causa del incremento de cuajado inducido por estas hormonas, el tamaño de los frutos de los árboles tratados es inferior en diámetro y peso al de los árboles testigo. Los resultados de estas experiencias pueden considerarse como evidencias claras de que las citokininas no actúan de forma directa en contra del desarrollo del fruto.

6.- Retraso de la maduración.- Los frutos tratados con soluciones de kinetina a mediados del mes de noviembre, experimentan un retraso significativo en su madurez externa (Tabla X). Este fenómeno se manifiesta en los datos obtenidos sobre la coloración y sobre el contenido en clorofila.

La medida del índice a (viraje del verde al rojo) nos muestra que todos los tratamientos con kinetina detienen el viraje en los quince primeros días, y que mantienen los frutos más verdes que las muestras no tratadas durante todo el mes

siguiente; incluso en la última medición, mes y medio más tarde del tratamiento, cuando todos los frutos han virado ya del verde al rojo, los valores del índice a para los frutos tratados son significativamente más bajos que los de los no tratados.

La medida del índice b (intensidad del amarillo) nos muestra que todos los tratamientos con kinetina mantienen más bajo este parámetro que en el caso de los frutos no tratados.

La medida del índice L (claridad del fruto) nos muestra que los tratamientos con kinetina retrasan el aclarado del color del fruto, retraso que se hace más significativo con el paso del tiempo.

La medida del contenido en clorofila nos muestra que, en los primeros quince días, los tratamientos con kinetina detienen la degradación de la clorofila, y que, durante un mes, todos los tratamientos mantienen el contenido en clorofila de la corteza del fruto más alto que los frutos no tratados. Sólo al cabo de mes y medio, los contenidos en clorofila de los frutos tratados y no tratados se igualan.

En cuanto al contenido en carotenos, si bien los tratamientos con kinetina parece que retrasan el incremento del mismo, sólo en las medidas efectuadas al mes y medio del tratamiento aparece una diferencia significativa en el contenido de estos compuestos en frutos tratados y sin tratar.

Los tratamientos con kinetina parece que no afectan significativamente a la madurez interna del fruto.

El 20 de Diciembre se hizo un nuevo tratamiento con kinetina en frutos no tratados previamente, para ver si se confirmaba algún efecto sobre la madurez interna del fruto. Como se puede observar en los datos de la tabla XII, no se obtienen diferencias significativas con los testigos, aunque aparece un ligero retraso del índice de madurez.

Los datos de la tabla XI nos muestran los efectos de los tratamientos con kinetina sobre otras características del fruto.

Los frutos tratados detienen o retrasan su crecimiento en tamaño, siendo este detenimiento más evidente en los

TABLA X - EVOLUCION DE LA MADUREZ INTERNA Y EXTERNA DE LOS FRUTOS TRATADOS EN NOVIEMBRE

M U E S T R A	F E C H A	CONCENT. KINETINA P.P.m.	COLOR CORTEZA			CLOROFILA CORTEZA	CAROTENOS CORTEZA	INDICE MADU- REZ INTERNA
			L	a	b			
18 Nov		0	38.99 a	- 13.00 a	18.22 a	0.72 a	0.019 a	2.472 b
4 Dic		0	54.11 be	- 7.41 b	29.14 b	0.54 b	0.024 a	2.482 b
		10	48.70 bde	- 12.93 a	24.23 c	0.80 a	0.018 a	2.483 b
		20	48.38 bde	- 12.93 a	23.94 c	0.60 b	0.014 b	2.817 b
		50	45.89 d	- 12.47 a	22.47 ca	0.72 a	0.019 a	3.020 b
20 Dic		0	58.45 be	+ 1.24 c	27.49 b	0.33 c	0.021 a	3.115 c
		10	52.55 bde	- 9.92 e	23.39 c	0.44 d	0.016 a	3.155 c
		20	51.81 d	- 10.55 e	22.21 c	0.49 bd	0.015 a	3.165 c
		50	48.30 d	- 11.18 ae	18.46 ca	0.46 d	0.019 a	3.160 c
8 Ene		0	63.76 c	+ 20.05 d	28.64 b	0.19 c	0.030 c	3.700 d
		10	56.00 e	+ 12.04 f	24.01 c	0.23 c	0.019 a	3.540 d
		20	56.85 e	+ 9.37 f	24.26 c	0.25 c	0.022 a	4.072 d
		50	54.86 e	+ 8.75 f	22.48 c	0.20 c	0.023 a	3.758 d

Los datos de una misma columna sin subíndice común difieren significativamente al 5 % de nivel de probabilidad.

TABLA XI - EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS CON KINETINA EN LAS CARACTERÍSTICAS DEL FRUTO.

FECHA	18-XI		28-I							
	DATOS BIOMÉTRICOS		TESTIGO	TESTIGO	10 ppm	20 ppm	50 ppm.			
ALTURA FRUTO mm	57,88	a	63,48	b	58,65	c	59,59	c	57,82	a
DIÁMETRO FRUTO mm	59,48	a	63,41	b	61,28	c	61,62	c	59,25	a
ESPESOR CORTEZA mm	5,50	a	4,54	b	4,37	b	5,08	a	4,08	b
PESO FRUTO g	105,48	a	126,88	b	110,84	c	112,16	c	105,40	a
% PESO CORTEZA	47,10	a	43,57	b	45,36	ab	45,90	ab	45,35	ab
% PESO JUGO	46,47	a	50,01	b	48,58	ab	47,46	ab	47,29	ab
% PESO PULPA	6,43	a	6,42	a	6,06	a	6,64	a	7,36	a

Los datos de una misma columna sin subíndice común difieren significativamente al 5% de nivel de probabilidad.

TABLA XII CAMBIOS EN EL ÍNDICE DE MADUREZ INTERNA DE LOS FRUTOS TRATADOS CON KINETINA

FECHA TRATAMIENTO	MOMENTO INICIAL	28 DE ENERO			
		TESTIGO	10 ppm	20 ppm	50 ppm
18-XI	2,47 a	4,68 c	3,70 d	4,36 c	4,34 c
20-XII	3,11 b	4,68 c	4,52 c	4,36 c	4,13 c

tratamientos con kinetina a 50 p.p.m.; también los otros tratamientos producen frutos significativamente más pequeños que los testigos.

La maduración del fruto lleva consigo una disminución del espesor de la corteza (0.96 mm. en el caso de los testigos). Este cambio sólo se ve retrasado de forma significativa en el caso de los tratamientos con kinetina a 20 p.p.m.

La disminución del tamaño del fruto ya señalada, se corresponde con una disminución en el peso del mismo, que como en el caso del tamaño, es más evidente en los tratamientos con kinetina a 50 p.p.m. Sin embargo los porcentajes de este peso correspondientes a corteza y jugo no se ven significativamente afectados. Así pues, aunque la calidad del fruto no se ve afectada, la disminución del peso del fruto, que oscila entre 14.72 g y 21.48 g por fruto (a 20 y 50 p.p.m. respectivamente), hace que la disminución del tamaño del fruto sea un factor apreciable.

Contenido endógeno.-

7.1. Raíces.- Se ha demostrado la presencia de citokininas en las raíces del híbrido Citrange Troyer, afín al género Citrus.

En los extractos de dichas raíces, aparece claramente actividad de citokinina que se distribuye en diversas fracciones separadas cromatográficamente. En la representación gráfica de la actividad aparecen varias zonas claramente manifiestas de las cuales cabe distinguir dos por su intensidad y por su constancia en los diferentes extractos realizados. La primera zona coincide aproximadamente con la región de elución de la zeatina y ribosilzeatina (entre 200 y 450 ml), y es similar en intensidad en los extractos de ápice y de las zonas superiores de la raíz. La segunda zona se encuentra entre los volúmenes de elución de 600 y 850 ml, y la actividad es mucho más intensa en los extractos de ápice que en los

de las zonas superiores de la raíz (Figura 3).

La cuantificación total de la actividad de citokinina en diferentes extractos, referida a una curva standard de kinetina, ha dado en el caso de los ápices un valor de 1,310 μ gr por gramo de materia fresca, y en la zona superior de 0,950 μ gr por gramo de materia fresca (Tabla XIII).

El gradiente de actividad encontrado coincide con el señalado por Short y Torrey (1972) y con la idea general, apuntada en la introducción, sobre la localización de los lugares de síntesis de citokinas en las plantas superiores.

La presencia de citokinas en el ápice de la raíz se ve confirmada por la prueba de difusión en agar. Lógicamente, la actividad encontrada por gramo de peso fresco es mucho menor que en el caso de los extractos (0.03 μ g de kinetina equivalente por gr. de materia fresca), lo que se explica por el hecho de que medimos sólo las citokinas difundidas.

El hecho de haber encontrado actividad es una confirmación de la prueba anterior. Se puede pensar que este método no es idóneo para el estudio de la difusión de citokinas, ya que el AIA presente en el agar puede inducir el transporte de sustancias que de suyo no serían difusibles; es cierto que el método debe ser mejorado para que nos permita un estudio detallado del transporte de citokinas, pero también es cierto que las sustancias activas presentes en el agar, difusibles o no, estaban presentes en el ápice de la raíz, y el método, por lo tanto, es válido para nuestro propósito de confirmar la presencia de citokinas en dicho lugar.

- .2. Brotes.- Se ha estudiado el contenido en citokinas de los brotes vegetativos y florales de Citrus sinensis cv. Navelate.

En los extractos de los dos tipos de brotes se ha encontrado una clara actividad, que cuantificada con

referencia a una curva standard de kinetina, resulta ser mayor en los brotes vegetativos que en los florales (Tabla XIV). El contenido en citokininas de los brotes vegetativos es doble que el de los brotes florales. Teniendo en cuenta el efecto atribuido a la presencia de estas fitohormonas sobre la atracción preferencial de metabolitos hacia los lugares donde se encuentran en mayor concentración (Seth y Wareing, 1967; Luckwill, 1977), se puede suponer que las flores en formación se han de encontrar con un aporte deficiente de sustancias nutritivas como consecuencia de la competencia ventajosa de las hojas en formación.

El mayor contenido en citokininas de los brotes vegetativos de esta variedad, puede ser una explicación de la baja proporción de cuajado del fruto, ya que son pocas las flores que podrán llegar al inicio de este fenómeno con niveles adecuados de sustancias nutritivas.

3. Ovarios.- Se ha estudiado el contenido en citokininas en los ovarios de tres cultivares de *Citrus sinensis*: Blanca Comuna, Washington Navel y Navelate; el estudio se ha hecho antes y después de la caída de pétalos.

La variedad Blanca Comuna presenta frutos con semillas, mientras que las otras dos variedades presentan frutos partenocárpicos, pues sus anteras son estériles y sus óvulos, no fecundados, abortan con el desarrollo del fruto.

En Blanca Comuna, el contenido endógeno en citokininas se quintuplica después de la caída de pétalos (ovarios fecundados) (Tabla XV). En las variedades partenocárpicas no hay cambios importantes en los niveles de estas hormonas con la caída de pétalos, si bien, considerando el ovario en su totalidad, al aumento de tamaño corresponde un aumento en el contenido de citokininas en el órgano. Este comportamiento desigual se debe interpretar como resultado de la síntesis de estas fitohormonas en las semillas en desarrollo, descrita por Hahn et al.

(1974) en guisante, o por lo menos, como resultado del aporte de estas hormonas que precisan las semillas para su desarrollo (Burrows y Carr, 1970).

Antes de la caída de pétalos, los niveles de citokininas de las variedades partenocárpicas son apreciablemente mayores que en el caso de la variedad Blanca Comuna. Crane y Van Overbeek (1965) describieron, en Ficus cariaca, la inducción de la partenocarpia como efecto del tratamiento con kinetina. Los resultados aquí observados parece que confirman el papel de las citokininas en la partenocarpia.

En las tres variedades se observa un aumento en el contenido de citokininas del ovario después de la caída de pétalos. Esto confirma el papel de las citokininas en el desarrollo del fruto (Van Overbeek, 1962; Luckwill 1977) y está de acuerdo con los resultados obtenidos por Eeuwenes y Schwabe (1976) y por Davey y Van Staden (1977 y 1978) en Pisum sativum y Lupinus albus, respectivamente.

Al comparar entre sí las dos variedades partenocárpicas, se observa que, aunque las diferencias no sean tan notables como en el caso de la comparación con la variedad con semillas, existe un mayor contenido en citokininas en los ovarios de Washington Navel antes de la caída de pétalos; después de la caída de pétalos se igualan los niveles de estas hormonas. Esta ligera ventaja a favor de la variedad Washington Navel, antes de la caída de pétalos, puede ser significativa si tenemos en cuenta que esta variedad es más productiva que Navelate. Estos resultados estarían en concordancia con el efecto de aumento de cuajado del fruto por acción de las citokininas descrito por Weaver et al. (1965) en Vitis vinífera, y expuesto por nosotros en Citrus en nuestro capítulo de aplicaciones exógenas de citokininas.

TABLA XIII CONTENIDO ENDÓGENO DE CITOKININAS EN RAÍCES

DATOS BIOMÉTRICOS	MITAD APICAL	MITAD BASAL
LONGITUD MÁXIMA	50 mm	50 mm
Mg Kinetina/g Peso Fresco	1.310	0.950

TABLA XIV - CONTENIDO ENDÓGENO DE CITOKININAS EN BROTES

DATOS BIOMÉTRICOS	VEGETATIVOS	FLORALES
LONGITUD MÁXIMA	4 mm	4 mm
PORCENTAJE AGUA LIBRE	72.7	75.8
Mg Kinetina/g Peso fresco	2.184	1.029

TABLA XV - CONTENIDO ENDÓGENO DE CITOKININAS EN OVARIOS

DATOS BIOMÉTRICOS	ANTES CAIDA DE PÉTALOS			DESPUÉS CAIDA DE PÉTALOS		
	BLANCA COMUNA	WASHINGTON NAVEL	NAVELATE	BLANCA COMUNA	WASHINGTON NAVEL	NAVELATE
PESO OVARIO (mg)	28.8	45.6	46.0	11.3	106.5	119.5
PORCENTAJE AGUA LIBRE	63.5	64.2	66.1	63.7	65.0	66.8
Mg Kinetina/g Peso fresco	0.690	1.160	0.910	3.172	0.920	0.910
Mg Kinetina/OVARIO	0.020	0.052	0.041	0.353	0.098	0.109

Figura 1: - Gráfica A.- Efecto de la aplicación de diferentes concentraciones de kinetina sobre la floración de la variedad Navelate.

$$r \frac{FB}{VB} = \text{relación brotes florales/brotes vegetativos.}$$

- Gráfica B.- Efecto de la época de aplicación de kinetina sobre la floración de la variedad Navelate, en tratamientos con una concentración de 20 p.p.m.

Figura 2: Efecto de la aplicación de benciladenina a la concentración de 20 p.p.m., en el momento de la floración, sobre el crecimiento del fruto, expresado en incremento del diámetro, en la variedad Navelate.

- Gráfica A.- Aplicaciones a frutos individuales.

- Gráfica B.- Aplicaciones a árboles enteros.

Figura 3: Distribución de la actividad de citokininas en las fracciones separadas en una cromatografía en columna de Sephadex LH-20 de extractos de raíz de plántulas de cítrange Troyer.

La actividad se mide mediante el bioensayo de la médula de tabaco, y se refiere a los valores encontrados para una curva standard con soluciones de kinetina expresados a la derecha de las gráficas.

El área sombreada representa una actividad estadísticamente significativa a un nivel de probabilidad del 95%.

ZR.- Zona de elución correspondiente a una solución patrón de ribosilzeatina.

Z.- Zona de elución correspondiente a una solución patrón de zeatina.

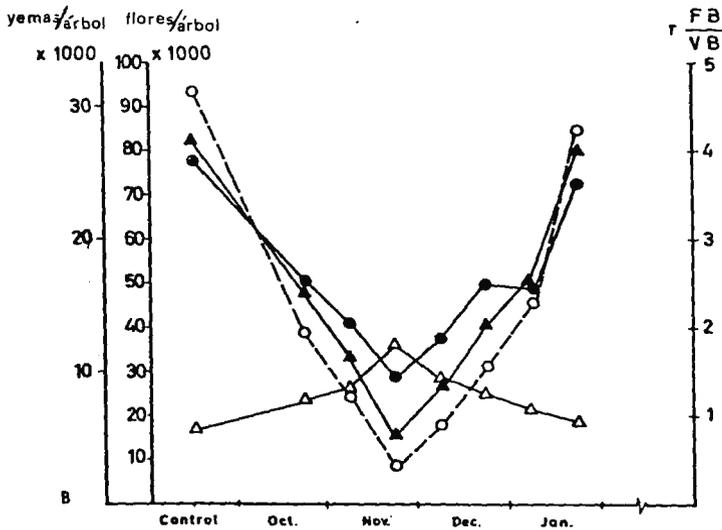
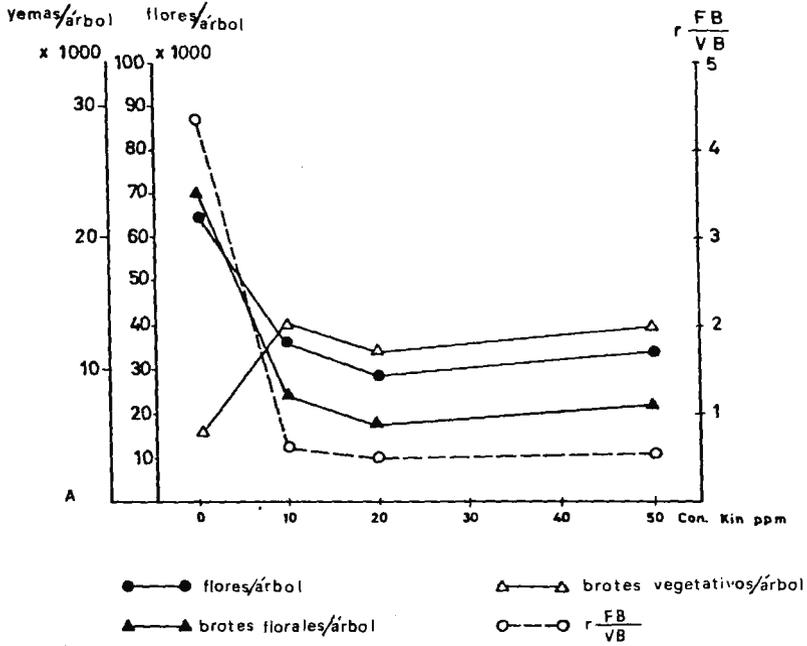


Figura 1

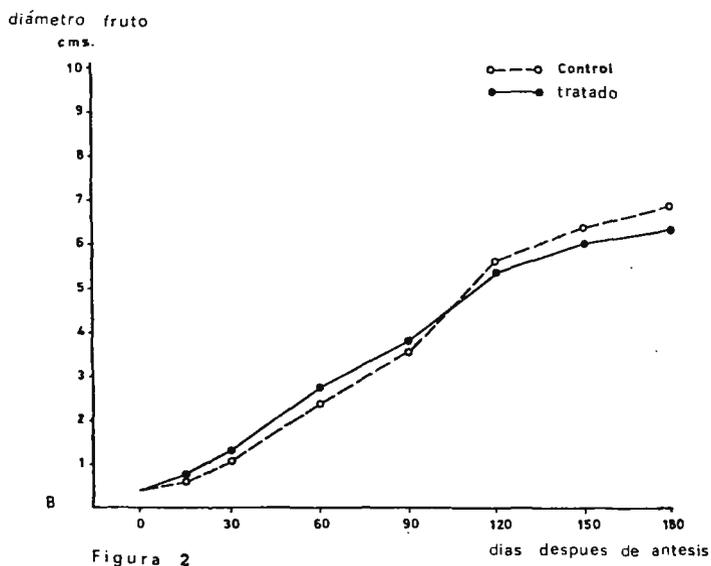
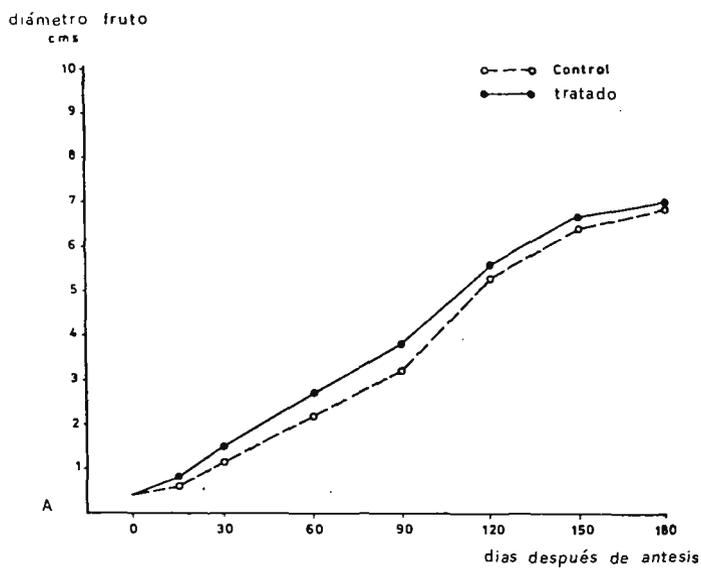


Figura 2

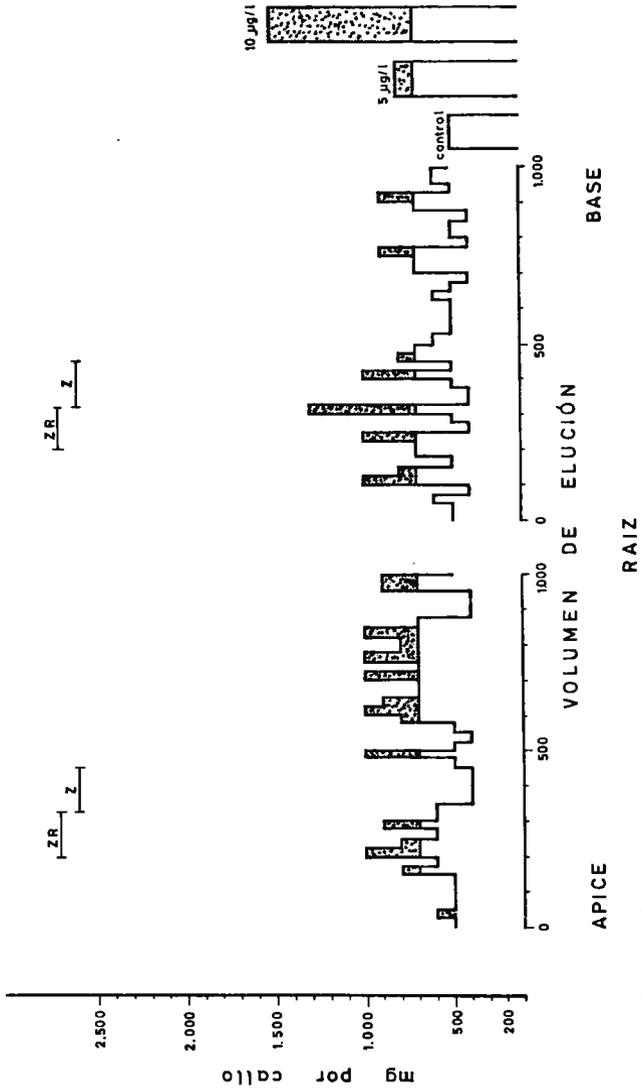


Figura 3

V- BIBLIOGRAFIA

- ABE, H.; UCHIYAMA, H.; TANAKA, Y.; SAITO, H. - Tetrahedron Lett. 3807-10 (1976).
- ALTMAN, A.; GOREN, R. - Plant Physiol 47, 844-846 (1971).
- ALTMAN, A.; GOREN, R. - Physiol. Plantarum 30, 240-245 (1974).
- ALTMAN, A.; GOREN, R. - Physiol. Plantarum 32, 55-61 (1974 b).
- ARMSTRONG, D.J.; BURROWS, W.J.; EVANS, P.K.; SKOOG, F. - Biochem. Biophys. Res. Commun, 37 (3), 451-56 (1969).
- BABCOCK, D.F.; MORRIS, R.O. - Biochemistry 9; 3701-5 (1970).
- BIDDINGTON, N.L.; THOMAS, T.H. - J. Chromatography 121 (1), 107-9 (1976).
- BLACK, M.K.; OSBORNE, D.J. - Plant. Physiol. 40, 676-80 (1965).
- BOASSON, R.; LAETSCH, W.M. - Experientia 23, 968 (1967).
- BURROWS, W.J.; ARMSTRONG, D.J.; SKOOG, F.; HECHT, S.M.; BOYLE, J.T.A.; LEONARD, N.J.; OCCOLOWITZ, J. - Biochemistry 8, 3071-76 (1969).
- BURROWS, W.J.; CARR, D.J. - Physiol. Plant. 23, 1064-70 (1970).
- BUTTON, J.; BORNMAN, C.H. - J. South African Botany 37, 127-134 (1971 a).
- BUTTON, J.; BORNMAN, C.H. - Citrus Subtrop Fruit J. Sept. 453, 11-14 (1971 b).
- BUTTON, J.; BOTHA, C.E.J. - J. Exp. Bot. 26, 723-729 (1975).
- CHAILAKHIAN, M.Kh.; BUTENKO, R.G. - Dokl. Akad. Nauk. SSSR 129, 293-296 (1960).
- CHATURVEDI, H.C.; MITRA, G.C. - Hort. Sci. 9, 118-120 (1974).
- COGGINS, C.W.Jr.; HIELD, H.Z. - Calif. Agr. 12 (9), 11 (1958).
- COGGINS, C.W.Jr.; HIELD, H.Z.; BOSWELL, S.B. - Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 76, 199-207 (1960).
- COGGINS, C.W.Jr.; HIELD, H.Z.; BURNS, R.M. - Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 81, 223-26 (1962).

- COGGINS, C.W.Jr.; HIELD, H.Z.; GARBER, M.J. - Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 76, 193-98 (1960).
- COGGINS, C.W.Jr.; LEWIS, L.N. - Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 86, 272-79 (1965).
- CRANE, J.C.; VAN OVERBEEK, J. - Science 147, 1468 (1965).
- DAS, N.K.; PATAU, K.; SKOOG, F. - Physiol. Plant 9, 640-651 (1956).
- DAVEY, J.E.; VAN STADEN, J. - Physiol. Plant 39, 221-224 (1977).
- DAVEY, J.E.; VAN STADEN, J. - Physiol. Plant 43, 77-93 (1978).
- DEMETRIADES, S.D. - An. Inst. Phytopath. Benaki. 8, 103-104 (1954).
- DURAND, B. - C.R. Acad. Sci. 263, 1309-11 (1966).
- EEUWENS, C.J.; SCHWABE, W.W. - J. Exp. Bot. 26, 1-14 (1975).
- EILATI, S.K.; GOLDSCHMIDT, E.E.; MONSELISE, S.P. - Experientia 25, 209-10 (1969).
- ENGELBRECHT, L. - Flora 150, 73-86 (1961).
- ENGELBRECHT, L. - Biochem. Physiol. Pflanz. 163, 335-343 (1972).
- ERNER, Y.; GOREN, R.; MONSELISE, S.P. - J. Hortic. Sci. 51 (3), 367-74 (1976).
- FORNER, J.B. - Informe Anual C.R.I.D.A. 07 pp. 74-75 (1977).
- GALLO, R.G.; WHANG-PENG, J.; PERRY, S. - Science 165, 400-2 (1969)
- GARCIA-MARTINEZ, J.L.; GARCIA-PAPI, M.A. - Scientia Hort. 10, 285-93 (1979).
- GEFTER, M.L.; RUSSELL, R.L. - J. Mol. Biol. 39, 145-157 (1969).
- GRIMBLAT, V. - J. An. Soc. Hort. Sci. 97, 599-603 (1972).
- GUARDIOLA, J.L. - Proc. Citriculture 2, 696-99 (1977).
- HAHN, H.; ZACUS, R.; KENDE, H. - Naturwissenschaften 61, 170 (1974).
- HALL, R.H.; ROBINS, M.J.; STASIUK, L.; THEDFORD, R. - J. Amer. Chem. Soc. 88, 2614-15 (1966).

- HECHT, S.M.; LEONARD, N.J.; OCCOLOWITZ, J.; BURROWS, W.J.;
ARMSTRONG, D.J.; SKOOG, F.; BOCK, R.M.; GILLAM, I.; TENER, G.M. -
Biochem. Biophys. Res. Commun. 35, 205-209 (1969).
- HELGESON, J.P.; LEONARD, N.J. - Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 56,
60-63 (1966).
- HENSON, I.E.; WAREING, P.F. - New Phytol. 78, 27-33 (1977).
- HEWETT, E.W.; WAREING, P.F. - Physiol. Plant. 29, 386-89 (1973).
- HIELD, H.Z. - Hilgardia 36 (6), 297-311 (1965).
- HIELD, H.Z.; COGGINS, C.W.Jr.; GARBER, M.J. - Calif. Agr. 12 (5)
9-11 (1958).
- ILAN, I.; GOREN, R. - Physiol. Plant. 45, 93-95 (1979).
- ITAI, C.; BEN-ZIONI, A.; ORDIN, L. - Physiol. Plant. 29, 355-60
(1973).
- ITAI, C.; RICHMOND, A.; VAADIA, Y. - Isr. J. Bot. 17, 187-93
(1968).
- ITAI, C.; VAADIA, Y. - Physiol. Plant. 18, 941-44 (1965).
- KANNANGARA, T.; BOOTH, A. - J. Exp. Bot. 25, 459-467 (1974).
- KENDE, H. - Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 53, 1302-307 (1965).
- KHALIFAH, R.A.; LEAWIS, L.N. - Nature 212, 1472-73 (1966).
- KLAMBT, D.; THIES, G.; SKOOG, F. - Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 56,
52-59 (1966).
- KOSHIMIZA, K.; KUSAKI, T.; MITSUI, T.; MATSUBARA, S. - Tetrahe-
dron Lett. 14, 1317-20 (1967).
- KREZDORN, A.H.; COHEN, M. - Proc. Fla. State Hort. Soc. 75, 53-60
(1962).
- KRIEDEMANN, P.E. - Aust. J. Biol. Sci. 21, 569-71 (1968).
- KURAIISHI, S.; TEZUKA, T.; USHIJIMA, T.; TAZAKI, T. - Plant Cell
Physiol 7, 705-706 (1966).
- LETHAM, D.S.; SHANON, J.S., McDONALD, T.R. - Proc. Chem. Soc.
London p. 230 (1964).

- LOEFFLER, J.E.; VAN OVERBEEK, J. - In "Regulateurs naturels de la croissance végétale", pp. 77-82. CNRS, Paris (1964).
- LOVREKOVICH, B.; FARKAS, G.B. - Nature (London) 198, 710 (1963).
- LUCKWILL, L.C. - In ACS Symposium Series 37. Pesticide Chemistry in the 20th Century (J.R. Plimmer, ed.) Am. Chem. Soc. pp. 293-304 (1977).
- LUCKWILL, L.C.; WHYTE, P. - In Plant Growth Regulators, Soc. Chem. Ind. (London) Monogr. 31, 87-101 (1968).
- MAHESHWARI, S.; VENKATARAMAN, R. - Planta 70, 304-6 (1966).
- McLEOD, J.E.; SUMMONS, R.E.; PARKER, C.W.; LETHAM, D.S. - J. Chem. Soc. 809-10 (1975).
- MICHNIEWICZ, M.; KAMIENSKA, A. - Naturwissenschaften 52, 623 (1965).
- MILLER, C.O. - Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 54, 1052-1058 (1965).
- MILLER, C.O. - Science, 157, 1055-56 (1967).
- MILLER, C.O.; SKOOG, F.; OKUMURA, F.S.; VON SALTZA, M.H.; STRONG, F.M. - J. Amer. Chem. Soc. 77, 2662 (1955).
- MILLER, C.O.; SKOOG, F.; VON SALTZA, M.H.; STRONG, F.M. - J. Amer. Chem. Soc. 77, 1392 (1955).
- MINGO, A. - An. I.N.I.A. Ser. Prod. Veg. n° 9 (1979).
- MONSELISE, S.P. - I Congreso Mundial de Citricultura. Murcia-Valencia. 1973, Vol. II pp. 393-398.
- MONSELISE, S.P.; GOREN, R.; HALEVY, A.H. - Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 89, 195-200 (1966).
- MONSELISE, S.P.; HALEVY, A.H. - Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 84, 141-146 (1964).
- MOSS, G.I. - Aust. J. Agric. Res. 21, 233-42 (1970).
- MOSS, G.I. - Aust. J. Agric. Res. 22, 625-29 (1971).
- MOSS, G.I. - Aust. J. Exptl. Agric. Animal Hus. 114, 96-102 (1972)
- MOTHES, K. - In "Regulateurs Naturels de la croissance végétale" pp. 131-140. CNRS. Paris (1964).

- MOTHES, K.; ENGELBRECHT, L.; KULAEVA, O. - *Flora* 147, 445-64 (1959).
- MOTHES, K.; ENGELBRECHT, L. - *Phytochemistry* 1, 58-62 (1961).
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. - *Physiologia Plantarum* 15, 473-97 (1962).
- MURASHIGE, T.; TUCKER, D.P.H. - *Proc. First. Intn. Citrus Symposium* 3, 1155-1161 (1969).
- NAVARRO, L. - *Bol. Serv. Plagas* 5, 127-148 (1979).
- NAVARRO, L.; ROISTACHER, C.N.; MURASHIGE, T. - *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 100 (5), 471-479 (1975).
- NEGI, S.S.; OLMO, H.P. - *Science* 152, 1624-25 (1966).
- PARKER, C.W.; LETHAM, D.S.; WILSON, M.M.; JENKINS, I.D.; McLEOD, J.K. - *Ann. Bot.* 39, 375-6 (1975).
- PATAU, K.; DAS, N.K.; SKOOG, F. - *Physiol. Plant.* 10, 949-966 (1956).
- PRIMO-MILLO, E.; HARADA, H. - In R. Jacques (Ed.). *Etudes de Biologie Vegetale* pp. 221-230 (1976).
- PRIMO-MILLO, E.; HARADA, H. - *An. I.N.I.A. Ser. Prod. Veg.* n° 6 pp. 9-26 (1976).
- PRIMO-MILLO, E.; IBANEZ VILAR, R.; NAVARRO LUCAS, A. - *Rev. ATA*, 17, 3 (1977).
- PROBINE, M.C.; BARBER, N.F. - *Aust. J. Biol. Sci.* 19, 439-457 (1966).
- RAJ BHANSALI, R.; ARYA, H.C. - *Proc. Int. Soc. Citriculture* 135-140. Sydney (1978).
- RANGAN, T.S.; MURASHIGE, T.; BITTERS, W.P. - *Hort. Sci.* 3, 226-227 (1968).
- RANGAN, T.S.; MURASHIGE, T.; BITTERS, W.P. - In Chapman, H.D. (Ed): *Proc. Int. Citrus Symp.* pp. 225-229. Riverside. Univ. California (1969).
- RICHMOND, A.E.; LANG, A. - *Science* 125, 650-51 (1957).

- SCHMID, M.S. - Auxin kinetin interaction in lateral bud inhibition. M.S. Thesis, University of Wisconsin (1960).
- SETH, A.K.; WAREING, P.F. - J. Exp. Bot. 18, 65-77 (1967).
- SHORT, K.C.; TORREY, J.G. - Plant. Physiol. 49, 155-60 (1972).
- SKOOG, F.; MILLER, C.O. - Symp. Soc. Exp. Biol. 11, 118-31 (1957).
- SKOOG, F.; STRONG, F.M.; MILLER, C.O. - Science 148, 532-533 (1965).
- SOORT, R.K.; BURNETT, R.H. - Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 77, 194-201 (1961).
- STETLER, D.A.; LAETSCH, W.M. - Science 149, 1387-1388 (1965).
- STEWART, W.S. - Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 54, 109-117 (1949).
- VAN OVERBEEK, J. - Plant Sci. Symp. (Campbell Soup Co.) pp. 37-56 (1962).
- VAN OVERBEEK, J.; LOEFFLER, J.E.; MASON, M.I.R. - Plant Physiol. 42, Suppl. 11 (1967).
- VAN STADEN, J. - Physiol. Plant. 36, 225-28 (1976).
- VARDI, A.; SPIEGEL-ROY, P.; GALUN, E. - Plant. Sci. Letters 4, 231-236 (1975).
- WEAVER, R.J.; VAN OVERBEEK, J.; POOLE, R.M. - Nature (London) 206, 952 (1965).
- WHEATON, T.A.; BAUSHER, M.G. - Proc. Int. Soc. Citriculture 2, 673-76 (1977).
- WOLTER, K.E. - In vitro cultivation of ash, aspen and pin oak callus tissues. Ph. D. Thesis, University of Wisconsin (1964)
- YOSHIDA, R.; ORITANI, T. - Plant Cell Physiol. 13, 337-43 (1972).



FUNDACION JUAN MARCH

SERIE UNIVERSITARIA

TITULOS PUBLICADOS

Serie Verde

(Matemáticas, Física, Química, Biología, Medicina)

- 2 Mulet, A.:
Estudio del control y regulación, mediante un calculador numérico, de una operación de rectificación discontinua.
- 4 Santiuste, J. M.:
Combustión de compuestos oxigenados.
- 5 Vicent López, J. L.:
Películas ferromagnéticas a baja temperatura.
- 7 Salvá Lacombe, J. A.:
Mantenimiento del hígado dador in vitro en cirugía experimental.
- 8 Plá Carrera, J.:
Estructuras algebraicas de los sistemas lógicos deductivos.
- 11 Drake Moyano, J. M.:
Simulación electrónica del aparato vestibular.
- 19 Purroy Unanua, A.:
Estudios sobre la hormona Natriurética.
- 20 Serrano Molina, J. S.:
Análisis de acciones miocárdicas de bloqueantes Beta-adrenérgicos.
- 22 Pascual Acosta, A.:
Algunos tópicos sobre teoría de la información.
- 25 I Semana de Biología:
Neurobiología.
- 26 I Semana de Biología:
Genética.
- 27 I Semana de Biología:
Genética.
- 28 Zugasti Arbizu, V.:
Analizador diferencial digital para control en tiempo real.
- 29 Alonso, J. A.:
Transferencia de carga en aleaciones binarias.
- 30 Sebastián Franco, J. L.:
Estabilidad de osciladores no sinusoidales en el rango de microondas.
- 39 Blasco Olcina, J. L.:
Compacidad numerable y pseudocompacidad del producto de dos espacios topológicos.
- 44 Sánchez Rodríguez, L.:
Estudio de mutantes de saccharomyces cerevisiae.
- 45 Acha Catalina, J. I.:
Sistema automático para la exploración del campo visual.
- 47 García-Sancho Martín, F. J.:
Uso del ácido salicílico para la medida del pH intracelular.
- 48 García García, A.:
Relación entre iones calcio, fármacos ionóforos y liberación de noradrenalina.
- 49 Trillas, E., y Alsina C.:
Introducción a los espacios métricos generalizados.
- 50 Pando Ramos, E.:
Síntesis de antibióticos aminoglicosídicos modificados.
- 51 Orozco, F., y López-Fanjul, C.:
Utilización óptima de las diferencias genéticas entre razas en la mejora.

- 52 Gallego Fernández, A.:
Adaptación visual.
- 55 Castellet Solanas, M.:
Una contribución al estudio de las teorías de cohomología generalizadas.
- 56 Sánchez Lazo, P.:
Fructosa 1,6 Bisfosfatasa de hígado de conejo: modificación por proteasas lisosomales.
- 57 Carrasco Llamas, L.:
Estudios sobre la expresión genética de virus animales.
- 59 Afonso Rodríguez, C. N.:
Efectos magneto-ópticos de simetría par en metales ferromagnéticos.
- 63 Vidal Costa, F.:
A la escucha de los sonidos cerca de T_λ en el 4^{er} líquido.
- 65 Andréu Morales, J. M.:
Una proteína asociada a membrana y sus subunidades.
- 66 Blázquez Fernández, E.:
Desarrollo ontogénico de los receptores de membrana para insulina y glucagón.
- 69 Vallejo Vicente, M.:
Razas vacunas autóctonas en vías de extinción.
- 76 Martín Pérez, R. C.:
Estudio de la susceptibilidad magnetoeléctrica en el Cr_2O_3 policristalino.
- 80 Guerra Suárez, M.ª D.:
Reacción de Amidas con compuestos organoaluminicos.
- 82 Lamas de León, L.:
Mecanismo de las reacciones de iodación y acoplamiento en el tiroides.
- 84 Repollés Moliner, J.:
Nitrosación de aminas secundarias como factor de carcinogénesis ambiental.
- 86 II Semana de Biología:
Flora y fauna acuáticas.
- 87 II Semana de Biología:
Botánica.
- 88 II Semana de Biología:
Zoología.
- 89 II Semana de Biología:
Zoología.
- 91 Viéitez Martín, J. M.:
Ecología comparada de dos playas de las Rías de Pontevedra y Vigo.
- 92 Cortijo Mérida, M., y García Blanco, F.:
Estudios estructurales de la glucógeno fosforilasa b.
- 93 Aguilar Benítez de Lugo, E.:
Regulación de la secreción de LH y prolactina en cuadros anovulatorios experimentales.
- 95 Bueno de las Heras, J. L.:
Empleo de polielectrolitos para la floculación de suspensiones de partículas de carbón.
- 96 Núñez Alvarez, C., y Ballester Pérez, A.:
Lixiviación del cinabrio mediante el empleo de agentes complejantes.
- 101 Fernández de Heredia, C.:
Regulación de la expresión genética a nivel de transcripción durante la diferenciación de *Artemia salina*.
- 103 Guix Pericas, M.:
Estudio morfométrico, óptico y ultraestructural de los Inmunocitos en la enfermedad celíaca.
- 105 Llobera i Sande, M.:
Gluconeogénesis «in vivo» en ratas sometidas a distintos estados tiroideos.
- 106 Usón Finkenzeller, J. M.:
Estudio clásico de las correcciones radiactivas en el átomo de hidrógeno.
- 107 Gallán Jiménez, R.:
Teoría de la dimensión.
- 111 Obregón Perea, J. M.:
Detección precoz del hipotiroidismo congénito.

- 115 Cacicedo Egües, L.:
Mecanismos moleculares de acción de hormonas tiroideas sobre la regulación de la hormona tirótrota.
- 121 Rodríguez García, R.:
Caracterización de lisozimas de diferentes especies.
- 122 Carravedo Fantova, M.:
Introducción a las Orquídeas Españolas.
- 125 Martínez-Almoyna Rullán, C.:
Contribución al estudio de la Manometría Ano-rectal en niños normales y con alteraciones de la continencia anal.
- 127 Marro, J.:
Dinámica de transiciones de fase: Teoría y simulación numérica de la evolución temporal de aleaciones metálicas enfriadas rápidamente.
- 129 Gracla García, M.:
Estudio de cerámicas de Interés arqueológico por espectroscopia Mössbauer.
- 131 García Sevilla, J. A.:
Receptores opiáceos, endorfinas y regulación de la síntesis de monoaminas en el sistema nervioso central.
- 132 Rodríguez de Bodas, A.:
Aplicación de la espectroscopia de RPE al estudio conformacional del ribosoma y el tRNA.
- 136 Aragón Reyes, J. J.:
Interacción del Ciclo de los Purín Nucleótidos con el Ciclo del Acido Cítrico en Músculo Esquelético de Rata durante el Ejercicio.
- 139 Genís Gálvez, J. M.:
Estudio citológico de la retina del camaleón.
- 140 Segura Cámara, P. M.:
Las sales de tiazolio ancladas a soporte polimérico insoluble como catalizadores en química orgánica.
- 141 Vicent López, J. L.:
Efectos anómalos de transporte eléctrico en conductores a baja temperatura.
- 143 Nieto Vesperinas, M.:
Técnicas de prolongación analítica en el problema de reconstrucción del objeto en óptica.
- 145 Arias Pérez, J.:
Encefalopatía portosistémica experimental.
- 147 Palanca Soler, A.:
Aspectos Faunísticos y Ecológicos de Carábidos Altoaragoneses.
- 150 Vioque Cubero, B.:
Estudio de procesos bioquímicos implicados en la abscisión de la acetuna.
- 151 González López, J.:
La verdadera morfología y fisiología de Azotobacter: células germinales.
- 152 Calle García, C.:
Papel modulador de los glucocorticoides en la población de receptores para insulina y glucagón.
- 154 Alberdi Alonso, M.^a T.:
Paleoecología del yacimiento del Neógeno continental de Los Valles de Fuentidueña (Segovia).
- 156 Gella Tomás, F. J.:
Estudio de la fosforilasa kinasa de hígado y leucocitos: purificación, características y regulación de su actividad.
- 157 Margalef Mir, R.:
Distribución de los macrofitos de las aguas dulces y salobres del E. y NE. de España y dependencia de la composición química del medio.
- 158 Alvarez Fernández-Represa, J.:
Reimplantación experimental de la extremidad posterior en perros.
- 161 Tomás Ferré, J. M.^a:
Secreción y reutilización de trifosfato de adenosina (ATP) por sinaptosomas colinérgicos.
- 163 Ferrándiz Leal, J. M.:
Estudio analítico del movimiento de rotación lunar.

- 164 Rubió Lois, M.; Uriz Lespe, M.ª J., y Bibiloni Rotger, M.ª A.:
Contribución a la fauna de esponjas del litoral catalán. Esponjas córneas.
- 165 Velasco Rodríguez, V. R.:
Propiedades dinámicas y termodinámicas de superficies de sólidos.
- 166 Moreno Castillo, I.:
Ciclo anual del zooplancton costero de Gijón.
- 168 Durán García, S.:
Receptores insulínicos en hipotálamo de rata: localización subcelular y mecanismo (s) de regulación.
- 169 Martínez Pardo, R.:
Estudio del mecanismo secretor de hormona juvenil en oncopeltus fasciatus.
- 171 García Jiménez, J.:
Fusariosis del gladiolo: un estudio preliminar.
- 173 Fernández Aláez, C.:
Análisis estructural en sabinares de la provincia de León.

