

# Contribución al estudio de las Fitohormonas

## Enraizamiento forzado - Estimulación de crecimiento

por FRANCISCO J. RIERA

Jefe del Servicio de Fruticultura y Elayotecnia de los Servicios Técnicos de Agricultura  
y Miembro del Instituto de Biología Aplicada (Sección de Genética Agrícola)  
del Consejo Superior de Investigaciones Científicas

EN nuestros trabajos de selección de porta-injertos, pies directos y patrones francos de frutales, tropezamos siempre con la misma dificultad: la multiplicación vegetativa (agámica) de la estirpe o línea clonal elegida, siempre que ésta se muestre rebelde al enraizamiento.

Esta dificultad nos decidió en 1942 a iniciar los ensayos con sustancias activadoras a fin de forzar el enraizamiento de los tipos elegidos y perpetuar las estirpes selectas con la pureza indispensable.

Pocos meses después de iniciar nuestros primeros ensayos, el ilustre Ingeniero Agrónomo D. JUAN MARCILLA publicaba en la revista «Agricultura» un interesante artículo de información y de estímulo para el planteamiento en España del estudio de tan importante cuestión.

La feliz coincidencia en Pamplona durante el pasado mes de septiembre (con motivo de la 1.<sup>a</sup> Reunión de estudios de genética aplicada) con el citado profesor MARCILLA y otro benemérito investigador, D. MOISÉS MARTÍNEZ ZAPORTA, director del Centro de Ampelografía y Viticultura (en el que vienen realizándose importantes ensayos en la vid sobre este mismo tema), nos deparó la oportunidad de conocer su autorizada opinión y nos alentó a proseguir nuestros esfuerzos.

A dichos señores, que tan amablemente acogieron la exposición de nuestro plan experimental, va dedicada, especialmente, esta modesta relación de los trabajos realizados y en curso de ejecución.

## I. EXPLORACION

A pesar de la escasez bibliográfica actual, la impresión de conjunto que puede formarse sobre esta cuestión a través de los contados libros y revistas extranjeras que por azar o de una manera más o menos furtiva llegan a nuestro alcance (en las difíciles circunstancias internacionales de estos momentos), es que ninguna de las conquistas de la biología vegetal es comparable a la difusión que en menos de una docena de años han conseguido los tratamientos a base de sustancias de crecimiento. Como en las grandes conquistas de la biología humana (vitaminas, hormonas), aquellas sustancias, llamadas, un poco abusivamente, fitohormonas, han conseguido desbordar la fantasía popular y se les ha atribuído un poder preponderante: «Parece que se ha querido hacer de estas sustancias, factores universales que presiden todas las fases de desarrollo de los vegetales superiores», escribía recientemente un biólogo contemporáneo.

Jardineros, horticultores, viveristas, en general, se han lanzado confiadamente a su ensayo, sirviéndose de los preparados que en forma más o menos solvente han lanzado al mercado las casas comerciales, a fin de obtener fácilmente la multiplicación de plantas difíciles, que de ordinario sólo pueden obtener por el sistema siempre lento, caro y enojoso del acodo.

No cabe duda que entre un acodo lateral o de cepa o bien aéreo, que requieren años, y un simple estaquillado tratado durante unas horas con unas sustancias activadoras que excitan el desarrollo de nuevos vestigios meristemáticos en raíces, la elección no es dudosa.

Además, la expectación era justificada: Sustancias que a unas dosis mínimas son capaces de organizar nuevos tejidos en raíces (enraizamiento) y provocar el alargamiento de las células del tallo y de los internodios (crecimiento).

Que, en cambio, a dosis fuertes o en tratamientos prolongados son tóxicas, es decir capaces de matar o cuando menos producir una fuerte desorganización de tejidos que degenera en tumores, escorificaciones, etc. (caso corriente en vegetales herbáceos). Que a estas mismas dosis fuertes, aplicadas a la punta, no se difunden hacia abajo y excitan entonces la formación de raíces en la extremidad aérea (según se ha observado en *Anchusa italica*). Que la misma dosis óptima que excita la formación de raíces, impide el alargamiento de los meristemas terminales radiculares, etc.

De aquí la gran desorientación en los primeros tiempos y que el exceso de optimismo de los primeros momentos, al frustrarse en parte, haya dado, quizá por reacción, una desconfianza igualmente excesiva entre los horticultores, a pesar de que las casas comerciales siguen pregonando éxitos en nuevas listas de plantas sometidas a enraizamiento forzado.

Afortunadamente, los laboratorios de biología y estaciones experimentales siguen laborando metódica y serenamente y al propio tiempo van situando fitas seguras que jalonan esta importantísima conquista de la química biológica, al margen de la desorientación provocada por el comercio al querer presentar como fácil y segura una práctica que en el fondo constituye un problema difícil cuya solución depende no solamente de la acción de la substancia activadora, sino también del concurso de los demás elementos coadyuvantes (de regulación, de nutrición, reservas, etc.) que constituyen el complejo órgano-formativo.

### Las principales fitohormonas

La biología vegetal también ha entrado en la era de las hormonas. Entre las que hacen referencia a crecimiento, unas se caracterizan por su acción de retraso, mientras que otras se manifiestan como agentes activadores.

Entre las primeras, por ejemplo: la separada por KÖKERMANN (1934) en jugos procedentes de manzanas, peras, etc., sirviéndose del éter como disolvente, con la que consigue retrasar la germinación de semillas de frutos carnosos y que denomina *blastocolina* (de «blastanein», germinar, y «colnein», entorpecer). Otras: la substancia inhibidora aislada por V. VEH y SÖDING en el endosperma de la semilla de los frutales, las substancias entorpecedoras de la fecundación señaladas por BORRIS (1936) en la formación de las semillas, las substancias inhibidoras de la germinación del maíz, ensayadas por NAUNDORF, etc.

Entre las segundas, como principales: la que acelera la maduración de los frutos (aumentando el metabolismo de los tejidos) aislada por MOLISH (1937) en jugos de manzanas maduras y las que activan el crecimiento, o sea las auxinas de F. W. WENT (1929), base de las modernas experiencias de enraizamiento forzado y estimulación de crecimiento, de las que nos ocupamos extensamente.

El hecho de obrar en pequeñas dosis lejos de su lugar de formación y ser movilizables a través del organismo vegetal, ha motivado la comparación de las sustancias activadoras vegetales con las hormonas animales, como si se tratara de la insulina, la tiroxina o la foliculina, por ejemplo, designándolas con el nombre sugestivo aunque no siempre justificado de fitohormonas.

Además de las auxinas de WENT, se han hecho intervenir en los procesos de organización de meristemos radiculares, otras hormonas como las *hormonas de herida* de HABERLANDT, la *traumatina* de ENGLISH Y BONNER, etc.

En el momento de redactar estas líneas, llegan hasta nosotros las sugerencias del Dr. K. FAHRENKAMP sobre posibilidad de tratamientos de estimulación vegetal con los mismos extractos de plantas medicinales (*digitalis, convallaria, adonis*), aplicadas en los colapsos cardíacos, a cuyo principio activo denomina *funcionina*.

En todas estas acciones precisa en primer lugar distinguir los efectos de la sustancia en sí misma y en sus relaciones con los demás biofactores de estimulación. En segundo lugar, determinar hasta dónde las reacciones producidas son de tipo normal (fisiológico) o bien anormal (parafisiológico) para la determinación de las dosis óptima y tóxica de cada sustancia ensayada.

## 2. HISTORIAL

En las investigaciones realizadas, se distinguen dos tipos de desarrollo o crecimiento.

- a) Crecimiento por división celular.
- b) Crecimiento por alargamiento (longitudinal).

Parece que la división celular obedece a varios principios activos, mientras que, por el contrario, el alargamiento es controlado por una sola sustancia.

Por lo general, en todas las partes de la planta donde se manifiesta un fuerte crecimiento (longitudinal) también se presentan hormonas de división celular, mientras que los órganos pobres en auxina contienen, igualmente, pocos principios activos de división.

Este paralelismo o correlación es fácilmente comprensible ya que junto a una división celular se ha de dar un alargamiento, y de aquí que las hormonas de división y las de alargamiento aparezcan juntas.

## I.—Hormona de la división celular

a) *Principios vitales.*

La vieja polémica entre PASTEUR y LIEBIG (1860) acerca de si además de las substancias de crecimiento hacían falta otras substancias para el desarrollo vegetal, a raíz de la célebre Memoria del primero sobre la fermentación alcohólica, quedó sepultada treinta años después de la muerte de este último, hasta que WILDIERS (1901) demuestra que con la solución nutritiva de PASTEUR (cenizas de plantas, sal amoniacal y un azúcar soluble) no se puede llegar a una división celular, sino que hace falta el concurso de otro factor que denomina *bíos*.

La nueva teoría de WILDIERS, tan combatida al principio, da lugar a una investigación base: COPPING (1921), trabajando en veinte especies diferentes, llega a la conclusión de que las especies silvestres ellas mismas producían este elemento *bíos*, mientras que las cultivadas en solución nutritiva no contenían tal elemento.

Las investigaciones posteriores han permitido determinar que este elemento *bíos* no es una sola substancia, sino que está integrada por diferentes factores:

El *bíos primero*, al cual separa precipitando una disolución de barita en alcohol.

El *bíos segundo*, al cual identifica por filtraje de esta misma disolución. Los dos factores eran inactivos, separadamente, pero juntos determinaban una acción de crecimiento.

En la Escuela de Utrech (a la que tanto debe la investigación bioquímica), KÖGL (1932) confirma la identificación del *bíos primero* a la *meso-inusita* (es decir, el mismo alcohol hidroaromático reconocido anteriormente por EASCOTT (1928)) y consigue absorber el *bíos segundo* con carbón animal, recuperándolo con acetona y amoníaco. Es en este filtrado de carbón animal que encuentra otro precipitado que denomina *bíos tercero*. Parece que este principio tampoco tiene acción por sí solo pero sí la tiene con el *bíos segundo*. La hormona activa del *bíos segundo* la denominó *biotina*.

Distinguió, por lo tanto, tres biofactores:

BIOS I. Precipitable en disolución amoniacal con acetato de plomo = Meso-inusita.

BIOS II. Absorbible con carbón animal = Biotina.

BIOS III. Obtenido por filtrado de carbón animal.

Se han encontrado principalmente estos biofactores en los granos de trigo y maíz en germinación, en los tejidos con más manifiesta tendencia a la división celular (capullos y zona de *cambium*). El polen, las semillas y las hojas, serían particularmente ricos en bíos.

Con las hormonas de distribución se han ensayado otras substancias de crecimiento de distención.

Así WENT Y THIMANN aumentan el poder formativo de raíces añadiendo oestron y triptofan.

Contemporáneamente, AMLONG Y NAUNDORF (1938) ensayan las sales metálicas como coadyuvantes de la acción de la hetero-auxina. Utilizan una mezcla 0.001 ‰ hetero-auxina-0.02 % Mg (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-0.02 % Mn Cl<sub>2</sub> en tratamiento durante 24 horas. Obtienen en *Tradescantia* a los 16 días después del tratamiento, 130 raíces; mientras que con la hetero-auxina sola, únicamente había dado 98 raíces.

#### b) Vitaminas.

Parece que en la vida de la planta representan el papel de hormonas de división celular.

KÖGL observa que no solamente la biotina sino también la vitamina B<sub>1</sub> (aneurina) condicionaba el crecimiento de embriones de guisante.

Experiencias análogas realizadas con la vitamina C (ácido escórbico), aceleran igualmente el crecimiento de los citados embriones.

Numerosos ensayos recientes confirman que las vitaminas también regulan la formación de raíces en la zona de corte.

AMLONG Y NAUNDORF (1938) demuestran los efectos de la B<sub>1</sub> (aneurina), B<sub>2</sub> (lactoflavina), C (ácido escórbico) sobre los internodios de *Callissia repens*.

WENT Y WARNER (1938) confirman la acción positiva de la B<sub>1</sub> y LATZAR Y BOUILLENNE (1936) comprueban que la vitamina A (carotina) procedente del pigmento rojo de la zanahoria (carotte) produce efectos estimulantes.

Se han ensayado también otras hormonas de distribución celular y substancias nutritivas de reserva.

Entre las primeras, los extractos de levadura. AMLONG Y NAUNDORF (1937) consiguen potenciar la acción de la hetero-auxina aplicando sobre estacas de *Tradescantia*, levadura hervida en exceso.

Entre las segundas: El azúcar. BOUILLENNE, WENT (1933) MULLER

(1935) comprueban que en estacas sin hojas, se puede substituir el azúcar sumergiendo dichas estacas en una solución de azúcar de uva del 1.5 a 2 %.

c) *Hormonas de herida.*

Conjuntamente con las hormonas de división celular, se han identificado las hormonas de herida o necrohormonas, que aparecen en las partes próximas de la herida en las que provocan un aumento de división celular y una defensa de los tejidos heridos frente a los agentes exteriores.

HABERLANDT (1921) realizó interesantes experiencias sobre las hormonas de herida («Wundhormonen»). Por raspado de superficies de corte en tubérculos de la patata separó la necrohormona y demostró que la acción celular se anula o queda muy reducida sin dicha necrohormona.

WEHNELT (1927) trabajó con extractos alcohólicos de tejido vegetal así como con varias materias orgánicas: albúmina de huevo, inulina, agar, que estudió sobre leguminosas cortadas longitudinalmente.

Siguiendo la misma técnica de WEHNELT, posteriormente ENGLISH y BONNER (1937) obtienen un preparado concentrado que permitía una disolución de 1/12,800, designando al principio activo por «traumatina» ( $C_{10} H_{15} O_4 N$ ).

A estas mismas hormonas de herida se atribuye la rapidez e incremento de enraizamiento obtenido por AMLONG Y NAUNDORF (1938) en estacas de limonero y vid sometidas a un frotamiento previo.

## II.—Hormona de crecimiento longitudinal

### *Los tropismos y las hormonas.*

Durante muchos años se atribuyeron las funciones sensoriales de crecimiento a la acción de la luz: Fototropismo.

Las plantas de la ventana de una habitación se dirigen a la luz; lo propio hacen las plantas en los sombreros, las especies frutales y forestales en plantaciones masivas de las frutaledas y de los bosques, etcétera.

Pero ya DARWIN (1870) se pregunta ¿hay órganos específicos capaces de reaccionar a la luz o bien se trata de una excitación general?, y en su clásica experiencia ilumina las puntas de los pequeños gér-

menes de plantas herbáceas mientras oculta a la luz la parte inferior. Obtiene curvaturas normales que se mantienen cuando priva de la luz el extremo superior. Deduce en consecuencia que la extremidad de la planta puede captar la sensación y le atribuye una función sensorial.

Siguiendo las experiencias de DARWIN, el fisiólogo danés BOYSEN-JENSEN (1910) se ocupa de la conducción de las excitaciones. Ilumina lateralmente un germen de forma que quede una curvatura fototrópica permanente. Esta curva no se produce cuando ilumina únicamente el flanco de la planta en lugar del extremo. Corta entonces el extremo de la planta y la vuelve a pegar con gelatina: obtiene curvatura. Corrobora la función sensorial de la punta (o extremidad) atribuida por DARWIN.

Así siguen prevaleciendo durante algunos años las audaces concepciones de los fototropistas acerca la función sensorial de las plantas, hasta que SÖDING (1923) lanza la nueva teoría de que el elemento excitante actúa no solamente con el fototropismo sino en todo el crecimiento en general, y F. W. WENT (1928) comprueba la verdad de esta teoría y demuestra que este crecimiento se efectúa por medio de una hormona que él denomina *substancia de crecimiento*.

Decapitando la punta, corta la fuente de hormonas y se detiene el crecimiento. Este se reanuda cuando se substituye la punta cortada por un bloque de gelatina agar (del tipo de los bloques de inclusión) impregnado de substancia de crecimiento. El resultado todavía es más claro cuando el bloque se aplica lateralmente. En este caso, la parte donde se ha aplicado la substancia de crecimiento, se desarrolla más hacia un lado.

La consecuencia de este crecimiento es una curvatura. Midiendo la magnitud de esta curvatura, determinó la cantidad de substancia de crecimiento contenida en el agar. Así definió su célebre método de determinación de substancias de crecimiento por medio de la curvatura producida por las mismas, vulgarmente conocido por *Avena test*. Por *unidad avena* entiende la cantidad de substancia de crecimiento que se ha de suministrar a un tallo de avena decapitada para que dé una curvatura de  $10^\circ$ .

Siguiendo este método, se investigaron vegetales primero del grupo de las monocotiledóneas y después del de las dicotiledóneas y se encontraron gran cantidad de hormonas en los tallos, hojas, raíces, polen, frutos, semillas, etc.

El método sugerido por el fisiólogo holandés, permitió a otro

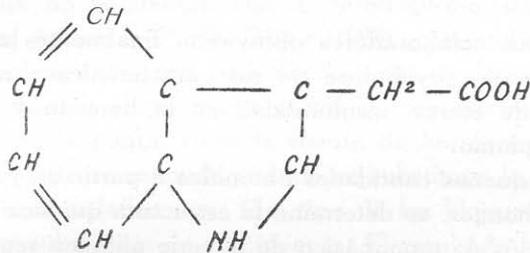


*La hetero-auxina.*

El descubrimiento e identificación de las auxinas, con toda su trascendencia y a pesar de su alto valor científico, hubiera permanecido probablemente mucho tiempo en la larga fase embrionaria que caracteriza los grandes descubrimientos de la ciencia pura, de no haber ocurrido un hecho casual y meramente fortuito.

Un paciente fué internado en una clínica de Utrech. Al observar su orina, KÖGL encontró más substancia activadora («Wuchsstoff») de la normal. Comprobada su capacidad activadora por medio del *Test avena* como si fuera auxina, pudo comprobar que no era idéntica a la auxina y que en cambio su fórmula correspondía a la del conocido ácido  $\beta$  indol-acético del que hasta aquel momento se desconocía su acción activadora del crecimiento.

Acido indol  $\beta$  acético (o indol-3-acético ó 3 indol-acético)  $C_{10}H_9O_2N$ .



Por motivos prácticos, KÖGL denominó a este ácido: *hetero-auxina*.

El paciente de Utrech, gracias a su flora bacteriana anormal que originaba cantidades apreciables de hetero-auxina, eliminadas por la orina, prestó un gran servicio a la ciencia.

Así se explica la rapidez con que han trascendido a la práctica las substancias activadoras y la revolución que en pocos años han producido en el campo de la biología vegetal.

Contrariamente a lo que ocurre en la mayoría de investigaciones del grupo hormonal, la casualidad facilitó el conocimiento del sucedáneo sintético y con él, la posibilidad de disponer de cantidades ilimitadas y fácilmente asequibles que han permitido su rápida vulgarización.

*Naturaleza de las sustancias de crecimiento.*

Inmediatamente se plantearon las cuestiones siguientes:

*Primera.* Habiendo dos hormonas diferentes ¿la sustancia de crecimiento de los vegetales es una misma sustancia o bien una sustancia diferente? SÖDING (1936) da una respuesta al comprobar en *Cephalaria* que dicha planta respondía a la sustancia activadora (incluida en agar) procedente de una docena de plantas distintas, con lo que demuestra que dicha sustancia es la misma para todos los vegetales.

*Segunda.* La cuestión de si la planta contiene la forma auxina o la de hetero-auxina, ya que las dos tienen la misma acción. WENT (1928), midiendo la velocidad de difusión de la sustancia en gelatina, determina el coeficiente de difusión y obteniendo el peso molecular establece unas cifras relativas del tamaño de la molécula (auxina=350; hetero-auxina=375). Así parece que la sustancia que se forma en el extremo de los vegetales es la auxina, mientras que en los hongos se forma la hetero-auxina como resultado del metabolismo (recuérdese que el ácido indol acético identificado en el enfermo de Utrech procedía de la descomposición bacteriana de los albuminoides).

*Tercera.* Parece entonces extraño que puedan tener acción semejante, productos de composición tan diferente. KÖGL da la explicación empleando la conocida imagen de FICHER, de la llave y la cerradura para los fermentos (respectivamente auxina y hetero-auxina). Otra imagen feliz es la de comparar la célula en donde tiene lugar la acción de la sustancia de crecimiento con una habitación: La auxina sería la puerta principal y la hetero-auxina la secundaria.

*Crecimiento del tallo y de la raíz.*

Dos cuestiones quedaban finalmente a dilucidar:

a) Las sustancias activadoras del crecimiento del tallo.

Los primeros investigadores suponían que dicha sustancia se preparaba en la punta y por lo tanto su difusión era exclusivamente en sentido descendente. Posteriormente CHOLODNY, LAIBACK, MEYER (1935), demuestran que existe una gran cantidad de auxina en las semillas y en los frutos, demostración que POHL (1936) relaciona con el crecimiento longitudinal.

La separación de las sustancias activadoras en las semillas mediante pequeños voltajes, permitió comprobar que si a las semillas desprovistas de auxina se les añadía de nuevo hetero-auxina, reanu-

daban el crecimiento normal, y así es como POHL llega a la conclusión de que el crecimiento terminal no es más que un proceso en marcha que se inicia en la misma germinación.

En consecuencia, únicamente las hojas verdes expuestas a la luz pueden llegar a preparar las sustancias activadoras. La auxina formada se depositaría en el fruto dentro del tejido de las jóvenes semillas. Después de la germinación pasaría del embrión a la planta en donde actuaría como sustancia de crecimiento, es decir pasaría en forma inactiva del endospermo al tallo en donde actuaría ya en forma activa.

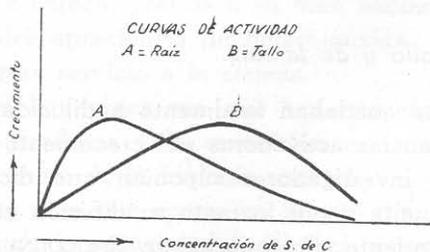
b) Las sustancias activadoras y el crecimiento de la raíz.

La auxina también se encuentra en la raíz. BOISSON-JENSEN (1936), sirviéndose de cloroformo extrae la auxina del extremo de las raíces y determina que la cantidad de hormona que se elabora en dicha parte terminal es inferior a la que se extrae de los tallos en veinte horas de contacto con azúcar y agar.

Siguiendo el método clásico, cortó las puntas de las raíces y pasadas 24 horas aplicó la sustancia activadora utilizando tiras de papel de filtro mojado con hetero-auxina llegando a las siguientes conclusiones:

1.º La hormona que en el tallo actúa acelerando, en la raíz actúa retrasando.

2.º En las raíces, grandes concentraciones retrasan y pequeñas aceleran, lo que atribuye a la diferencia de curva de actividad entre los dos órganos.



Como puede verse, la velocidad de crecimiento está en relación con la concentración de la sustancia activadora, y el punto óptimo del crecimiento corresponde a diferentes concentraciones.

## 3. REACCIONES PRODUCIDAS EN LOS TEJIDOS VEGETALES

El éxito sin precedentes en la historia de la fisiología vegetal obtenido por las fitohormonas (auxinas *a* y *b*) se debe, como queda expuesto, al feliz hallazgo de buenos sucedáneos entre los que figura en primer término el ácido indol  $\beta$  acético preparado fácilmente por vía de síntesis por lo que su uso ha trascendido rápidamente a la práctica.

Pero paralelamente a esta rápida vulgarización, la moderna biología experimental va precisando las reacciones de los vegetales a las hetero-auxinas, no solamente en función de las concentraciones y tiempo de acción del producto, sino también según las especies experimentadas y lugar de acción de la substancia sometida a ensayo.

El material experimental lo han constituido: los tejidos cambiales, parénquimas vasculares, meristemos radiculares, etc., y los medios comparativos de cultivo: sales minerales y glucosa, a los que se han añadido en algunos casos como elementos excito-formativos, vitamina B<sub>1</sub>, cisteína, carotina, etc. (1).

En los tejidos cambiales (*Salix Caprea*) el ácido indol  $\beta$  acético ha determinado un aumento de proliferación, según la dosis, que ha originado voluminosas protuberancias de tejido parenquimatoso; pero estas neoformaciones no han producido raíces a ninguna concentración.

En los parénquimas vasculares (*Cotufa*) la hetero-auxina parece ser un factor indispensable de multiplicación para el desarrollo del parénquima vascular, pero éste tampoco produce raíces a ninguna dosis.

En los tejidos radiculares (zanahoria, endibia, col-nabo) obran activando según su concentración, es decir aumentando el volumen de las protuberancias que producen normalmente los tejidos.

Esta acción calogénica es óptima para una dosis determinada  $10^{-7}$  (0.0001<sup>o</sup>/<sub>100</sub>) a partir de la cual parece disminuir para dar lugar a una acción rizogénica que alcanzaría su máximo para una concentración  $10^{-6}$  (0.001<sup>o</sup>/<sub>100</sub>).

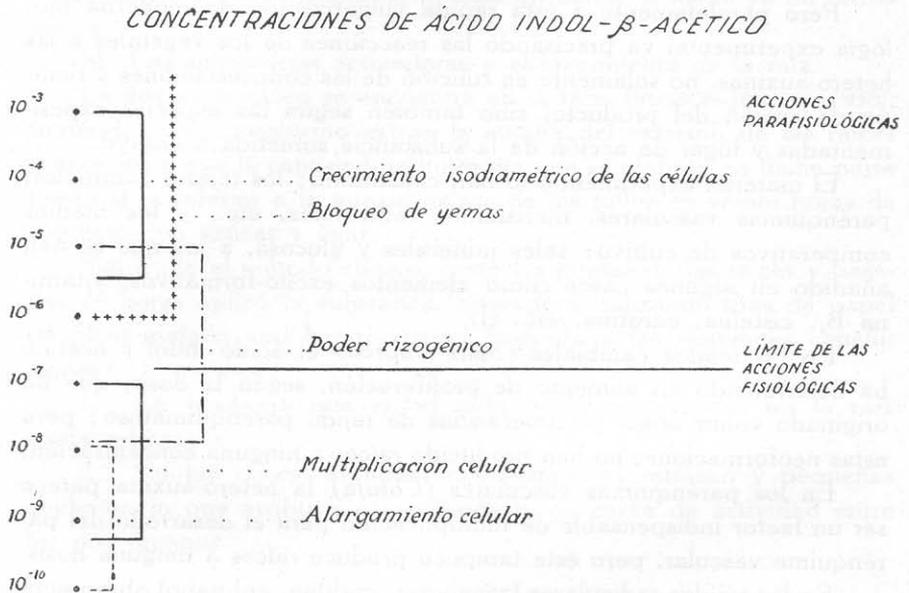
Si esta dosis aumenta a  $10^{-4}$  (0.10<sup>o</sup>/<sub>100</sub>) el indolacético deja de ser rizogénico y provoca la formación de vestigios meristemáticos en el seno de los tejidos que luego no evolucionan en raíz.

«En desquite —afirma GAUTHERET— esta concentración masiva de

(1) Resumimos por su interés y solvencia los resultados obtenidos por M. R. J. GAUTHERET en sus recientes investigaciones publicadas en su notable conferencia «Hetero-auxines et cultures de tissus végétaux» dada en la Sociedad de Química Biológica, de Francia, 20 de enero de 1942 )

substancias de crecimiento, provoca el crecimiento isodiamétrico de los elementos periféricos de los tejidos, que se hipertrofian sin tabicarse y se transforman en células gigantes, completamente aisladas». Estas células constituyen luego tejidos fuertemente desorganizados que degeneran en tumores, protuberancias, escoriaciones, etc.

En consonancia con estos resultados, el propio GAUTHERET confecciona el siguiente cuadro que traduce las distintas acciones de las substancias de crecimiento sobre la membrana celular.



Como puede verse, los órdenes de las concentraciones que corresponden a cada una de estas reacciones no son separados sino que se superponen en la vecindad de sus límites.

La reacción de alargamiento celular (crecimiento en sentido del eje) y la multiplicación celular (proliferación), pueden considerarse como fisiológicas, puesto que se manifiestan por concentraciones de hetero-auxina muy débiles comparables a las dosis de auxinas realmente presentes en los tejidos.

Por contra, la inhibición de la brotación y el crecimiento isodiamétrico (poder calogénico) de las células, no pueden ser consideradas como reacciones fisiológicas por exigir para manifestarse fuertes concentraciones de hetero-auxina, capaces de desorganizar los tejidos y

provocar su muerte, por lo que estas reacciones acompañadas de trastornos profundos se han considerado para fisiológicas.

En cuanto al valor rizogénico, está al límite de las acciones fisiológicas y para fisiológicas, es decir, que la organización de vestigios meristemáticos que han de dar origen a las raíces, se manifiesta según los casos bajo la influencia de dosis inferiores o superiores a la *concentración sensibilizante* que puede ser considerada como el verdadero *límite fisiológico*.

#### 4. DISCUSION

a) *¿Las hetero-auxinas pueden considerarse como fitohormonas?*

El origen de las fitohormonas debe buscarse, como queda expuesto, en el hecho de que los principales tropismos van ligados a un mecanismo hormonal.

Lo mismo el fototropismo que el geotropismo van unidos a la hormona de crecimiento que F. W. WENT hace obrar a voluntad aislándola e incluyéndola en cubitos de gelatina y que KÖGL y sus colaboradores (1934) identifican estableciendo la fórmula de la substancia activa constituida por la auxina *a* y auxina *b*.

En aquellos primeros tiempos, el papel de las fitohormonas tenía una explicación fácil: Las auxinas serían los agentes específicos de alargamiento celular y su desigual repartición bajo la influencia del peso y de la luz dirigida, explicarían las curvaturas geotrópica y fototrópica.

Pero diez años después, las cosas ya no se presentan con la misma simplicidad.

En primer lugar, se concreta la distinción entre las primeras hormonas de división de HABERLANDT, o sea las originadas en el tejido liberiano: Substancias éxito-formativas, difusibles, capaces de provocar a distancia la multiplicación celular que denomina *Hormonen* de *Leptome*, y las producidas bajo la influencia de una herida en cualquier tejido, que activan la proliferación celular de cicatrización y que denomina «Wundhormonen».

En segundo lugar se precisa la diferencia entre las hormonas de HABERLANDT, hormonas de división, y las auxinas de WENT y KÖGL capaces de provocar no la división celular, sino el alargamiento (hormonas de crecimiento), ya sea en el sentido longitudinal del eje, ya sea en ancho y en todas direcciones.

En tercer lugar se ha comprobado, como hemos visto, que las

auxinas pueden actuar sobre las células cambiales y activar las zonas generatrices dando lugar a un abultamiento de células, es decir, la formación del *callus*, y de aquí su poder calogénico. Al propio tiempo se ha demostrado que pueden excitar la formación de los meristemas primarios o más frecuentemente inhibirlo.

Finalmente los ensayos en estos últimos años van deslindando la capacidad de estas substancias para la organización de verdaderas trazas o vestigios radiculares a partir del periciclo, zonas generatrices u otros tejidos poco diferenciales. Con las conclusiones de los resultados obtenidos, se vislumbra una tendencia a considerar que las substancias de crecimiento activan simplemente la proliferación de las células y que los elementos meristemáticos sobre los que actúan no se organizan en vestigios de raíces más que bajo la influencia de otra hormona, la «rhizocaline», según BOUILLENNE, cuya naturaleza falta precisar.

La complicación aumenta todavía si se tiene en cuenta que el gran incremento que han tomado estos ensayos ha sido gracias a que se han efectuado no con la auxina pura, sino con sus sucedáneos.

El ácido indol  $\beta$  acético, al igual que los otros compuestos sintéticos de acción parecida (indol  $\beta$  butírico, naftaleno acético, naftil acético, etc.) obran a dosis diferentes de las verdaderas auxinas naturales *a* y *b* y no están como éstas realmente presentes en los tejidos ni en las manifestaciones fisiológicas de las plantas leñosas que interesa multiplicar, ya que hasta el momento su presencia sólo ha podido ser señalada en algunos vegetales: zanahoria, endibia, col-nabo, etc. (según LEFÈVRE). En cuanto a las relaciones entre la auxina *a* y la hetero-auxina, según P. CHOUARD (1940), parece pueden establecerse en la siguiente forma: «mientras indicios de auxina *a* aumentan mucho la formación de raíces producidas por la adición del máximo tolerable de hetero-auxina, indicios de hetero-auxina no cambian en nada la formación de raíces producidas por el máximo tolerable de auxina *a*.»

De aquí que se haya negado últimamente la filiación de fitohormonas a estos compuestos sintéticos por parte de los modernos biólogos y se designe a las hetero-auxinas simplemente «substancias de crecimiento» a pesar de que una parte de sus acciones se incluyen en el grupo de las fisiológicas normales porque se manifiestan a dosis muy débiles comparables a las trazas en que se encuentran en los tejidos las auxinas naturales, que se admiten como a tales fitohormonas.

Por otra parte, continúa todavía abierto el interrogante que traza GURWITCH en el último par de décadas al considerar la estimulación de la división mitótica de determinadas células como un proceso físico o más concretamente de una radiación. Es decir que según la teoría de las radiaciones mitogenéticas conocida por *fenómeno de GURWITCH*, las sustancias activas (hormonas, vitaminas, microfactores en general), más que por su función hormonal, actuarían por las radiaciones emanadas, capaces de producir inducción y ser detectadas por determinadas células sensibles, en las que desencadenarían la división mitótica y la consiguiente organización meristemática.

Por esto, uno de los más preclaros comentaristas de las teorías inductivas del célebre profesor de la Universidad de Leningrado, nuestro compañero Dr. A. ORIOL, escribía en «Arxius» el siguiente comentario, que sigue siendo actual como ocho años atrás: «Hoy día se está realizando una verdadera cruzada investigando los microfactores vegetales, que tanta influencia tienen sobre el crecimiento de los tejidos, y de manera especial los meristemas, las hormonas, auxinas, hetero-auxinas, los compuestos químicos (o indol-acéticos), elementos iónicos. Separar unas funciones de otras, obligará a sacar alguna experiencia de un capítulo para atribuirla a otro y quizás algún día se llegará a modificar gran parte de las concepciones funcionales, actualmente atribuidas a causas distintas.»

#### b) *Papel de las auxinas como sustancias activadoras*

Una de las principales objeciones que formulan los biólogos a los *auxinistas* es la de que practicándose los ensayos sobre vegetales enteros y fragmentos voluminosos, que exigen concentraciones de sustancia de crecimiento por lo menos mil veces superiores a las presentes en los tejidos, se hace difícil deslindar si las reacciones producidas son normales (fisiológicas) o bien van acompañadas de trastornos que provocan la desorganización de los tejidos (parafisiológicas).

Otra objeción es que no pudiendo eliminarse en los tratamientos en masa las posibles influencias debidas a traumatismos (heridas del corte), modificaciones de polaridad (posición de las estaquillas), movilización de reservas (lignificación según época), etc., resulta difícil discernir si las hetero-auxinas tienen solamente una acción específica de crecimiento o bien propiedades órgano-formativas.

Sin embargo, los resultados obtenidos en los cultivos de tejidos

comparados con los tratamientos masivos (estaquillas, hojas, raíces, etcétera) demuestran una correspondencia entre ambos, y actualmente se admite, de acuerdo con la nueva hipótesis de BOUILLENNE, que si bien las hetero-auxinas no poseen un poder rizogénico específico, pueden obrar sobre la multiplicación celular y provocar «macizos celulares de activa proliferación en cuyo seno los meristemas radiculares se organizan gracias a la acción de un factor distinto, la *rhizocaline*».

Los modernos ensayos de cultivos de tejidos confirman que si bien la presencia de esta substancia de crecimiento no es indispensable para la multiplicación de tejidos en aquellas plantas que pueden hacer la síntesis de débiles cantidades de auxina y de hetero-auxinas, en otras (tubérculos de cotufa) contienen una substancia órgano-formativa que se agota en el curso de la maduración y que puede ser reemplazada por el ácido indolacético a una concentración  $10^{-8}$ .

Concuerdan con estos hechos las antes citadas investigaciones de POHL (1936) sobre semillas en germinación, en las que separa (mediante pequeños voltajes) las auxinas naturales, que substituye por auxinas sintéticas con cuya substitución consigue reanudar el crecimiento. Asimismo son bien interesantes a este objeto los resultados obtenidos recientemente por J. BALANSARD y P. PELLISSIER sobre la brotación epifítica tratada con substancias de crecimiento.

Comparando el cuadro de los resultados obtenidos en los enraizamientos de hojas en más de 100 especies tratadas, se observa que independientemente del éxito o fracaso obtenido en la formación de raíces y yemas en las especies rebeldes, la duración de supervivencia ha sido siempre a favor de las hojas tratadas y entre éstas ha sido superior el tiempo de conservación en las muestras impregnadas superficialmente que en las inmergidas por la base del limbo o por el vértice de la hoja, acción conservadora que en algunos casos puede por sí sola contribuir a la formación de dichas yemas y raíces.

De consiguiente, la substancia de crecimiento más que un papel eventualmente antiséptico (como se creyó en principio) o específicamente rizogénico (como se creyó después), se comportaría según los citados investigadores «como un agente de la conservación celular excitando la vida vegetativa además del crecimiento, antes de jugar el papel de agente de proliferación de las células que determinará la formación de yemas y raíces».

c) *El poder rizogénico de las hetero-auxinas*

Entre los problemas planteados por la aplicación de las hetero-auxinas, el más complicado es el de la rizogenesia.

Como se ha visto, el poder rizogénico de las sustancias de crecimiento es difícil fijarlo, por el momento, de un modo general, ya que depende tanto de la naturaleza de los vegetales como de la clase de tejidos tratados.

En efecto: hemos señalado que la organización de centros meristemáticos en el seno del tejido, puede evolucionar en raíces normales o bien degenerar en células gigantes (hipertrofiadas).

Depende simplemente de que la dosis mayor o menor que requieran para manifestarse, sea respectivamente superior o inferior a la concentración sensibilizante (límite fisiológico). Nos queda por señalar que recientes experiencias en meristemos radiculares (FIEDLER, GREIFER-HUBER y BURLET, 1940-1942) demuestran, contrariamente a la la opinión clásica, que las hetero-auxinas no intervienen en la proliferación de los meristemos de la raíz y que dichos meristemos son mucho más sensibles a dichas sustancias que los tallos y las hojas, ya que reaccionan a débiles dosis  $10^{-9}$  (0.000001 ‰).

Los resultados de estas mismas experiencias, concuerdan en el fondo con la hipótesis de BOUILLENNE según la cual, conforme acabamos de ver, la hetero-auxina si bien «no es un factor específico de la neoformación de raíces», actuaría sobre las células de los tejidos tratados, de una manera indirecta, por el intermedio de la raíz, provocando la secreción de una sustancia específica.

Obraría a manera de catalizador para la producción de dicha sustancia específica que a su vez movilizaría las otras sustancias activadoras y reguladoras, a las que se ha reconocido un poder órgano-formativo de los vestigios meristemáticos.

El poder rizogénico de la hetero-auxina, por consiguiente, y de un modo parecido a lo dicho en cuanto a su acción fisiológica o para-fisiológica, quedaría situado como elemento indirecto de activación entre una acción biocatalizadora y una acción reguladora en el proceso de organización de los meristemas radiculares:

Biocatalizadores ... ..	}	Rizocalina — sustancia específica.
		Hetero-auxina — sustancia intermedia.

Elementos de regulación.	}	Biotina, carotina, cisteína.
		Oestron, Triptofan.
Elementos nutritivos. ....	}	Sacarosa, Nitrogenados.
		Sales metálicas.
Substancias de reserva ...	}	Almidones, grasas.
		Albuminoides.

## 5. POSIBILIDADES DE USO PRACTICO

### a) *La dotación en substancia de crecimiento en relación al patrimonio biológico.*

El descubrimiento de los biofactores de estimulación, como la mayoría de revoluciones científicas, ha sido precedido por la intuición.

Algunos jardineros desde muy antiguo tomaban una semilla de trigo en germinación (muy rica en auxinas) y la introducían por un corte en la base de la estaquilla. Así favorecían la activación meristemática y la consiguiente emisión de raíces.

En los ensayos que han seguido a estas primeras prácticas intuitivas, han presidido las mismas normas que traza a todo buen horticultor la observación de los fenómenos naturales. Es sabido que la semilla al germinar recibe de la planta madre substancias de reserva: almidones, grasas, albúminas, etc., al propio tiempo que en su potencial biológico dispone de una dotación de substancia de crecimiento de la que depende en definitiva su poder germinativo.

En la mayoría de estacas de los vegetales que se multiplican por vía asexual, esta dotación no llega a alcanzar la proporción óptima de auxina, aparte de que su contingente en materias de reserva (según época, cultivo, lignificación) no siempre es suficiente.

El enraizamiento de dichas estacas parece obedecer a una cierta ley del mínimo, es decir, que la formación de raíces depende de aquel factor que se encuentra en menos cantidad.

Si existen, por ejemplo, substancias de crecimiento de distensión (triptofan), serán las de distribución (bíos), el factor dominante. Puede suceder también que ambos grupos de substancias se encuentren en proporción optimal, pero falte sacarosa. En dicho caso éste será el factor limitante y se conseguirá la acción deseada con sólo añadir azúcar soluble.

La acción combinada de estos diversos factores y su efecto favorable se explica en el sentido de que provocan conjuntamente cadenas físicoquímicas en las células que tienden al mismo objetivo: formación de raíces.

Aparte la gran cantidad de experiencias que confirman estos hechos, según queda expuesto al tratar de las substancias de crecimiento de distensión y de distribución, la misma naturaleza nos ofrece abundantes muestras en las diferencias que en cuanto al poder de enraizamiento tienen las distintas razas y estirpes no solamente dentro del mismo género, sino dentro de la especie y subespecie. Bastaría recordar en el campo frutal los casos del género *Prunus*, del género *Cydonia*, del género *Malus*, etc., en los que unas razas dan fácilmente barbados mientras que en otras no llega apenas a formarse callus viables.

Las primeras son naturalmente bien dotadas, mientras que en las segundas la dotación en substancia de crecimiento o en substancias de reserva es insuficiente.

Probablemente en unas y otras, las respectivas dotaciones de auxinas están subordinadas también a dotaciones o equipos cromosómicos (o cuando menos factoriales) que controlan la mayor o menor capacidad de enraizamiento, del mismo modo que dichos equipos controlan, en la poliploidía (o en la polisomía), la fertilidad, el gigantismo, la resistencia a las enfermedades, etc.

b) *La dotación en substancias de crecimiento en relación al período vegetativo y a la edad.*

Además de esta riqueza o pobreza del potencial en auxinas de cada vegetal, interesa saber qué parte de este patrimonio está destinada a la conservación o estimulación de las propiedades meristemáticas de los tejidos y su organización en raíces.

Esta cuestión se ha relacionado con la nutrición durante el ciclo vegetativo y con la edad, o más concretamente, la fase juvenil.

En cuanto al factor nutritivo, las notables diferencias observadas en los enraizamientos de estacas de una misma especie o estirpe cortadas en diferentes épocas del año, han hecho suponer que las modificaciones nutritivas internas en el curso de la estación serían en gran parte responsables de los resultados obtenidos y determinarían épocas óptimas en relación al contenido hormonal.

Estas épocas óptimas, como acaba de demostrar en el olivo

VIEIRA NATIVIDADE (1943), corresponderían al período de menor actividad fisiológica que sigue a la maduración de los frutos: «El declive empieza un poco antes de iniciarse el movimiento de las yemas de la copa y se acentúa rápidamente a medida que la actividad fisiológica se acelera (floración, crecimiento, fructificación, etc.). Estos procesos son precedidos de una emigración de reservas seguida de cerca de su rápido consumo en los puntos de más activo crecimiento».

Con sus interesantes experiencias realizadas en una planta tan a propósito como es el olivo, ha podido comprobar el competente agrónomo portugués no sólo la relación entre el crecimiento y las condiciones nutritivas internas a través de la clásica proporción de hidrocarbonados-azoe, sino además la mayor o menor dotación en auxinas demostrada por WENT y BOUILLENNE (1933), lo que le permite suponer «que la cantidad de auxinas o de otras sustancias necesarias para la formación de los primordios radiculares presentes en las estacas, varía también con el adelanto de la estación y puede constituir a partir de un momento dado un factor límite de enraizamiento».

En cuanto al factor edad, es un hecho ya conocido entre los horticultores que los mayores éxitos en los barbados son a favor de la fase juvenil, así como de los ramos adventicios formados en los mamelones y de los rebrotes o retoños de la raíz.

Por razones de orden práctico, se viene trabajando activamente en precisar la naturaleza y condiciones de esta fase juvenil característica no solamente de las tiernas plantas procedentes de semilla, sino también de ciertas formas de ramas de plantas adultas regeneradas.

Entre las primeras merecen una especial atención: las estacas herbáceas de la parte terminal del tallo, en plantas de semilla durante el primer año de desarrollo, y los retoños de jóvenes plantas de un año o de pocos meses cortadas junto al suelo.

Entre las segundas, han demostrado una mayor capacidad al enraizamiento: las formas juveniles de plantas adultas tales como rebrotes de raíz o de corona de árboles fuertemente podados, y las adventicias de los mamelones, óvalos, heridas del tallo, etc.

La juvenilidad, según el propio NATIVIDADE, sería una «manifestación externa de un estado nutritivo y hormonal particular» y el poder juvenil se apreciaría a través de la «capacidad de regeneración».

Estos estados vegetativos peculiares adquieren una gran importancia en los tratamientos actuales a base de hetero-auxinas, no sólo en relación al movimiento basípeto de las hormonas y a la capacidad

o aceleración del enraizamiento, sino además en cuanto a su posible misión movilizadora, ya que como demuestran las investigaciones de NATIVIDADE sobre heterofilia y propagación vegetativa en el olivo. «el tratamiento de este tipo de estacas con hetero-auxina, lo mismo que con sacarosa, puede romper el estado durmiente y determinar una emisión de raíces», conclusión parecida a la que llegan BALAN-SARD y PELLISIER, en sus trabajos sobre la multiplicación epifítica.

c) *Los ácidos orgánicos empleados como hetero-auxinas.*

Como hetero-auxinas, además del ácido indol  $\beta$  acético, se han ensayado otros ácidos orgánicos que han manifestado una acción análoga: activación de crecimiento, excitación de alargamiento de las células de los tallos, excitación de la formación de las raíces, etc.

Entre éstos, los principales: Acido  $\beta$  indolbutírico, ácido  $\beta$  indolpropiónico, ácido fenilacético, ácido  $\alpha$  naftalenoacético, ácido indoleno-3-acético, etc. Todos ellos han venido a aumentar el grupo de las hetero-auxinas, a pesar de no tener otra analogía química con las verdaderas auxinas que la de ser, como ellas, ácidos orgánicos. Es más, la mayoría de ellos ni llegan a encontrarse, siquiera, en las plantas, sino que son productos residuales de nutrición animal presentes en las orinas o simplemente productos de síntesis en el laboratorio.

Más recientemente se ha investigado la acción activadora de algunos gases tales como el etileno y el óxido de carbono; pero parece que se trata más bien de una acción amplificadora de los indicios de auxinas preexistentes.

Es difícil por el momento señalar cuál de ellos es el mejor. Las experiencias y ensayos efectuados demuestran que cada planta y hasta cada órgano tienen su manera propia de reaccionar a las hetero-auxinas. Unas responden al indol  $\beta$  acético, por ejemplo, mientras que para otras es el más tóxico y responden mejor al tratamiento con naftaleno acético, por ejemplo, que se ha revelado como el más activo, pero a la vez el más nocivo.

## 6. NUESTRO PLAN DE TRABAJO

Nuestro primer objetivo de ensayo fué muy modesto. Nos proponíamos únicamente trabajar con los productos preparados por casas comerciales solvente: «Belvitan», «Exuberone», «Hormodine», «Rocherol», etc., todos ellos a base del ácido indol-acético.

Sin embargo, las presentes circunstancias internacionales nos obligaron a cambiar de ruta, ya que gracias al esfuerzo y gentileza de la casa E. Merk Darmsdtadt nos fué más fácil conseguir las primeras materias: Acido indol-3-acético  $C_{10} H_9 O_2 N$ , ácido indol-3-butírico  $C_{12} H_{13} O_2 N$ , ácido naftil-1-acético  $C_{10} H_7 CH_2 CO_2 H$ , que fueron la base de nuestros ensayos conjuntamente con el ácido fenil acético, que nos ha sido también galantemente facilitado por el Laboratorio de Química orgánica de la Universidad de Barcelona, y los productos biológicos que nos suministraron los Laboratorios Esteve de esta ciudad.

A sus insignes directores al igual que al Gerente comercial de la Casa «Bayer» en Barcelona, por sus esfuerzos para proporcionarnos generosamente las muestras de «Belvitan», debemos la posibilidad de haber podido iniciar nuestros ensayos en tan difíciles momentos.

Enfocado así nuestro plan de trabajo, procuramos darle una amplia base experimental no sólo para corresponder al señalado favor que las citadas casas y entidades nos han dispensado, sino al propio tiempo para aportar nuestra modesta contribución al estudio de un problema que sigue apasionando los laboratorios de investigación y estaciones experimentales de todos los países, que dan a los problemas de biología vegetal la importancia que merecen.

#### *Orden de los ensayos:*

##### *Año 1942:*

Se ensayaron separadamente:

- |  |   |
|--|---|
| I.—Acido fenilacético ...                        | Dosis 20 mgr., 50 mgr. y 100 mgr./litro |
| II.—Betaxina (vitamina B <sub>1</sub> )          | » 25 mgr. y 50 mgr./litro               |
| III.—Colchicina (tintura) ...                    | » 50 mgr. y 100 mgr./litro              |
| IV.—Foliculina (hidrosolución cristalizada) .... | » 100 mgr./litro (10,000 U. I.)         |

Duración de los tratamientos=8 y 24 horas para cada grupo, respectivamente.

Epoca=18 de septiembre.

Localidad=Granja-Escuela de Caldas de Montbuy.

##### *Año 1943:*

1.º Se ensayaron separadamente:

I.—Acido indolacético ...	Dosis C=50 mgr./litro, c=25 mgr./litro
II.— » indolbutírico ...	» C=50 » » c=25 » »
III.— » naftilacético ...	» C=50 » » c=25 » »
IV.— » fenilacético ...	» C=50 » » c=25 » »
V.—Belvitan «Bayer»... ..	» C=50 » » c=25 » »

2.º Se ensayaron adicionalmente a I, II, III y IV:

A.—Betaxina (Vitamina B<sub>1</sub>) al 50 ‰.

B.—Foliculina (Hidrosolución) al 100 ‰.

C.—Sales metálicas: (Hidrosolución 0.02 % Mn Cl<sub>2</sub> + 0.02 % Mg (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

Duración de los tratamientos=12 y 24 horas por cada grupo, respectivamente.

Epocas=26 de agosto y 29 de septiembre.

Localidades=Granja-Escuela de Caldas de Montbuy y Campo Experimental en la finca Torre Blanca de San Felú de Llobregat.

Año 1944:

El plan experimental del año en curso en su primera parte es igual al de 1943, variando únicamente las épocas (22 de agosto y 26 de septiembre) y la duración de los tratamientos (12, 24 y 36 horas).

A pesar de que hemos tratado con distintas concentraciones y tiempos, como puede verse en nuestro orden de ensayos, nos hemos guiado para nuestros trabajos en las dosis consignadas en las tablas resumen de H. U. HAMLONG y G. NAUNDORF, en las que se marca una tendencia hacia:

1.º Concentraciones fuertes (0.050—0.100 ‰) y poco tiempo de inmersión (12-24 horas) para estaquillados difíciles, siempre que pueda tolerarlo su estado de lignificación media y que contengan al propio tiempo el máximo de reservas (final de verano u otoño).

2.º Concentraciones débiles (0.010—0.025 ‰) y largo tiempo de tratamiento (24-36 horas) para incrementar el enraizamiento en barbados fáciles y consistencias herbáceas o poco lignificadas (mitad de verano).

*Técnicas empleadas*

En nuestras primeras tentativas con brindillas herbáceas y de poca consistencia, ensayamos el método propuesto por WENT y THIMANN consistente en introducir la punta de la brindilla en la solución de hetero-auxina y sumergir la base en el agua teniendo en cuenta la difusión en descenso de la sustancia de crecimiento.

Abandonamos este sistema por la complicación que supone un dispositivo para doble inmersión y principalmente por la poca flexibilidad de las estaquillas frutales que nos interesaba, preferentemente, investigar.

Actualmente, seguimos la técnica de ZIMERMANN y HITCHCOK, la más corriente y generalizada por su simplicidad ya que basta introducir la base de los manojos de estaquillas en la solución de heteroauxina y lavar con agua corriente al final del tratamiento. La difusión se hace ascensionalmente a través de los vasos del líber para descender y actuar sobre los tejidos de la base en la zona de contacto.

#### *Preparación de las estaquillas*

La primera dificultad que se presenta en la elección del material, es la uniformidad de los pies de procedencia. Se ha procurado que las estaquillas procedieran de un número mínimo de plantas y éstas siempre obtenidas por multiplicación vegetativa: injerto (en melocotoneros, almendros), de cepa (en pies de East Malling) o acodo (en la vid).

La segunda dificultad estriba en elegir el estado de lignificación. Para solventarla, hemos distinguido tres estados según la época de tratamiento:

a) Poco lignificado = color de la piel verdáceo claro; hoja tierna persistente; doblez total (se dobla sin romperse).

b) Medio lignificado = color de la piel verdáceo oscuro; hoja madura todavía persistente; cruje al doblarlo (pero no llega a romperse).

c) Lignificado = color de la piel verde oscuro (el propio de la especie); la hoja se desprende fácilmente; se astilla al doblarlo.

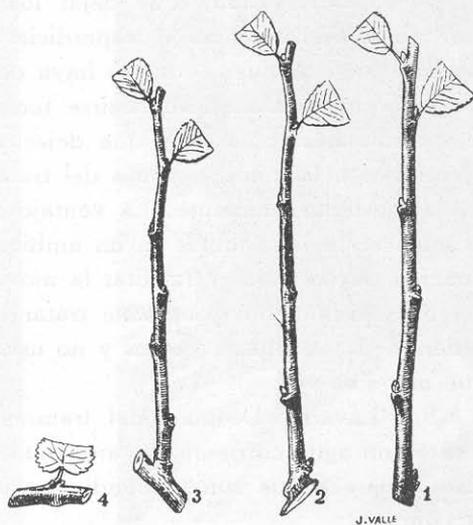
Esta distinción nos ha obligado a desperdiciar mucho material puesto que solamente han podido aprovecharse las partes centrales de las ramas del año; sólo excepcionalmente se han utilizado los terminales en el nogal y plantas de jardinería.

A cada estaquilla se han dejado de cinco a ocho yemas y se han suprimido todas las hojas, exceptuando las dos correspondientes a las últimas yemas. La longitud, corrientemente ha oscilado entre 10 y 15 centímetros. Únicamente en la vid se han cortado las estacas de 40 a 60 centímetros.

Se han preparado tres tipos de estaquillas: estaca simple para

la mayoría de frutales y vid, estaquilla de talón para magnolia, y de pata de caballo para el rosal y otras plantas de jardín (Fig. 1).

- Fig. 1
1. — Estaca simple.
  2. — Estaca de pata de caballo.
  3. — Estaca de talón.
  4. — Yema de inmersión total.



### Práctica del tratamiento

Hemos procurado en nuestros ensayos observar las principales normas que la práctica ha ido introduciendo en estos tratamientos:

1.º Iluminación. En estaquillas herbáceas o poco lignificadas, es conveniente la iluminación parcial de manera que queden expuestas a la luz únicamente las hojas de los extremos de las estaquillas, sometiendo a obscurecimiento los internodios basales (FISCHNICH, DROF-MÜLLER, NERVIUS, 1937-38). Por el contrario en estacas muy lignificadas y deshojadas, es mejor no iluminar dichas estacas hasta que empiecen a enraizar y mover las yemas (P. CHOUARD 1940).

2.º Temperatura. Parece que la óptima es de 25°. En estacas de vid, clase «Riesling» con un pretratamiento de doce horas y a una dosis de hetero-auxina, se consiguió elevar el índice de enraizamiento de 0.36 (a 20°C) a 1.16 (a 25°C). En cambio una temperatura de 30°C, se mostró desfavorable ya que el índice bajó a 0.74 (AMLONG 1938).

3.º Dosificación. Es conveniente preparar soluciones hidroalcohólicas concentradas preservadas de la luz (en especial para el ácido indol acético), y no proceder a las diluciones en agua hasta el momento del empleo.

4.º Recipientes. Es indispensable emplear para los baños de inmersión únicamente recipientes de zinc, cristal, barro cocido y vitrificado, nunca madera o en todo caso madera lacada.

5.º Cortes. Hay que dejar los cortes limpios, practicándolos con tijeras bien afiladas y desperdiciar la estaquilla o repetir el corte cuando por cualquier causa se haya deteriorado.

6.º Hojas. Deben suprimirse todas, excepto las dos o tres últimas terminales. Estas hay que dejarlas enteras durante la absorción y cortarlas a la mitad después del tratamiento.

7.º Medio ambiente. Es ventajoso, mientras dure el tratamiento, colocar las estaquillas en un ambiente seco para favorecer la traspiración de las hojas y facilitar la movilización de la sustancia activa.

8.º Aislamiento. Conviene tratar separadamente las estacas procedentes de distintas especies y no usar los baños de tratamiento más que una sola vez.

9.º Lavado. Después del tratamiento, hay que lavar repetidamente con agua corriente la parte tratada, ya que los restos de heteroauxina parece que son un medio favorable a las bacterias de putrefacción.

10. Dejar las estaquillas en lugar sombreado y fresco después del tratamiento mientras se va procediendo a su plantación en las tiendas.

### *Práctica de la plantación*

La plantación requiere asimismo cuidados esmerados, a cuyo conocimiento hemos llegado con la observación meticulosa de la marcha del estaquillado y a costa de los consiguientes fracasos que quisiéramos evitar a otros investigadores:

Para una buena plantación conviene:

1.º Plantar con la mayor rapidez posible las estacas tratadas, en las tiendas o barbales de enraizamiento.

2.º Procurar en la plantación no enterrar la base de la estaquilla a más profundidad que la tercera parte aproximadamente de la longitud de la misma, es decir, de tres a cinco centímetros en estaquillas cortadas de diez a quince centímetros de longitud.

3.º Apretar bien la tierra al clavar las estaquillas y regar suficientemente después de la plantación hasta que quede bien sazónada toda la capa de tierra alcanzada por las estacas.

4.º Procurar que los riegos sucesivos sean dados únicamente

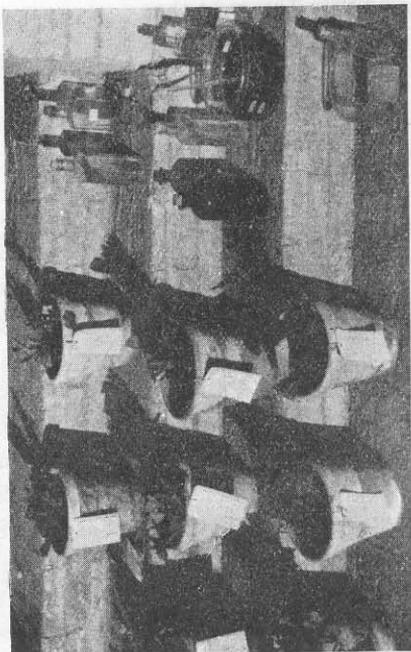
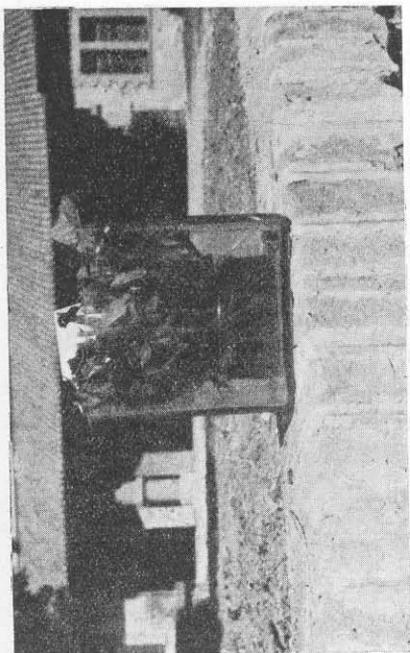


Lámina I

con agua finamente pulverizada al único objeto de mantener la humedad superficial.

5.º Disponer en dichas tiendas un subsuelo permeable que asegure un buen drenaje de las aguas eventuales (lluvia).

6.º Regular la sombra de las tiendas con la atención que los tiernos barbados requieren no sólo según las épocas del año, sino según las horas del día.

7.º Prever a tiempo la inminencia de una helada temprana, aumentando con una eficaz protección de la tienda la defensa de las tiernas plantas.

8.º Dar ligeras binas superficiales de limpieza y esponjamiento de la tierra siempre que su estado lo requiera.

9.º Evitar la infestación de la tierra del suelo de la tienda por las infecciones criptogámicas y larvarias que constituyen plaga en los invernaderos, por lo que hay que desechar tierras procedentes de tiendas ya usadas.

10. Vigilar la invasión de otros parásitos tales como, caracoles, limacos, etc., que con gran facilidad y preferencia se cobijan en las tiendas en donde hallan condiciones de temperatura y de humedad adecuadas.

## 7. INTERPRETACION DE RESULTADOS

### a) *Indice de enraizamiento*

La interpretación de los éxitos o fracasos obtenidos no puede fiarse a la somera observación y menos todavía a la imaginación. De aquí que se haya propuesto reducir a cifras concretas los resultados obtenidos a base del índice de enraizamiento seguido por AMLONG, NAUNDORF, J. JÜRGL, que van adaptando otros investigadores.

Estos índices son calculados teniendo en cuenta el número total de plantas (que por facilidad de interpretación y cálculo reducimos a cien), la proporción de enraizadas a no enraizadas y los tres estados de enraizamiento siguientes: débil, mediano y fuerte.

Los números correspondientes a cada uno de estos estados son multiplicados, respectivamente, por 1, 2 y 3:

Número de estacas débilmente enraizadas =  $b \times 1$

Número de estacas medianamente enraizadas =  $c \times 2$

Número de estacas fuertemente enraizadas =  $d \times 3$

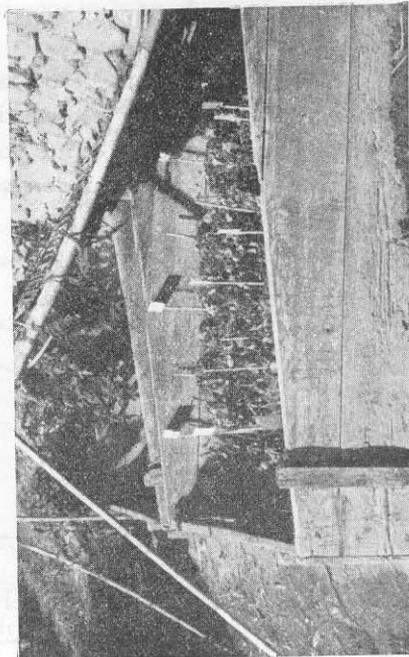
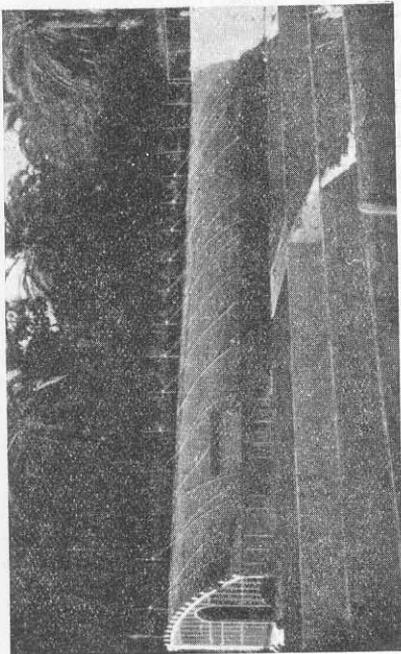
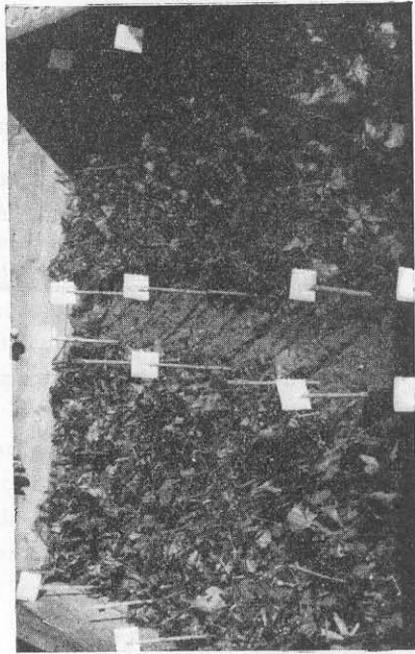


Lámina II

$$\text{Índice de enraizamiento} = \frac{b \times 1 + c \times 2 + d \times 3}{N}$$

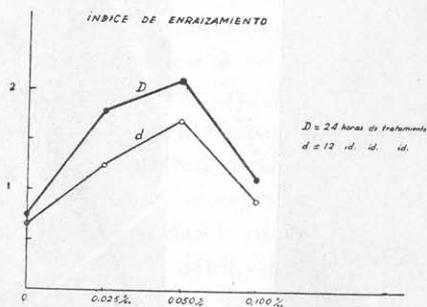
N = número total de estacas tratadas.

Calculamos a título de ejemplo los índices obtenidos por nosotros en un rosal de difícil arraigo, el rosal HOOVER, tratado con indolacético:

Duración tratamiento	Dosis	Total plantas	Con raíces	Sin raíces	Enraizamiento			Índice
					Débil	Me-diano	Fuerte	
Testimonio. . .	0 / 100	100	45	55	25	20	0	0,65
12 horas. . . .	0,025	100	75	25	35	30	10	1,25
	0,050	100	85	15	25	35	25	1,70
	0,100	100	60	40	35	20	5	0,90
Testimonio. . .	0 / 100	100	55	45	35	20	0	0,75
24 horas. . . .	0,025	100	85	15	20	35	30	1,80
	0,050	100	95	5	15	45	35	2,10
	0,100	100	65	35	20	45	0	1,10

Los índices obtenidos de las plantas tratadas ya acusan por sí solos la ventaja respecto a los testimonios no tratados y permiten apreciar además las diferencias entre los distintos tiempos y concentraciones

Estas diferencias pueden ser también registradas en la siguiente gráfica.



Como puede apreciarse, el máximo de eficacia ha correspondido a las dosis de 0,050 / 100 y 0,025 / 100 durante 24 horas de tratamiento. El aumento de esta dosis a 0,100 / 100 sólo ha mejorado el índice en los

tratamientos de 12 horas, mientras que en los de 24 horas lo ha rebajado.

b) *Comparación de ensayos*

Calcular los índices para todos nuestros ensayos sería una labor extensa y difícilmente registrable, tanto por la gran cantidad de los mismos, como por el número de fallas tenidos en muchos de ellos (no imputables al tratamiento en sí mismo, sino más bien a accidentes fortuitos, como queda expuesto). Por esto resumimos los resultados por otro sistema, a base de signos convencionales que se van generalizando entre los investigadores.

En la imposibilidad, por otra parte, de encuadrar todos los resultados correspondientes a cada producto, extractamos los correspondientes al más clásico y universalmente conocido: ácido indol  $\beta$  acético, a los que se pueden referir también los obtenidos con el producto *Belvitan* de la casa «Bayer».

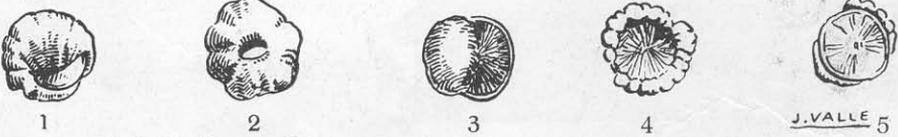
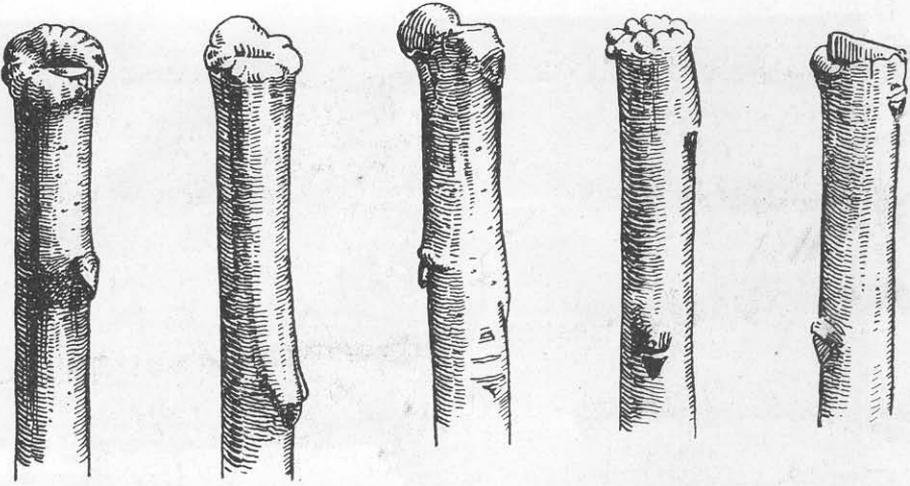
De los distintos tratamientos de cada ensayo, consignamos únicamente el más significativo (tratamiento óptimo), en el que registramos no solamente el enraizamiento obtenido, sino también los distintos tipos de *callus*: normales, defectuosos o bien nulos. En cuanto a los grados de enraizamiento, los expresamos por 1, 2 y 3, signos positivos, o sea según los mismos coeficientes por los que se valoran las estaquillas enraizadas en el cálculo del índice del enraizamiento.

*Signos convencionales:*

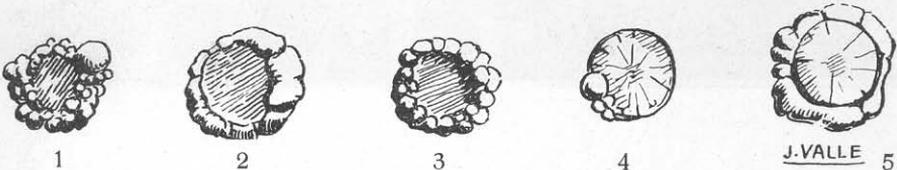
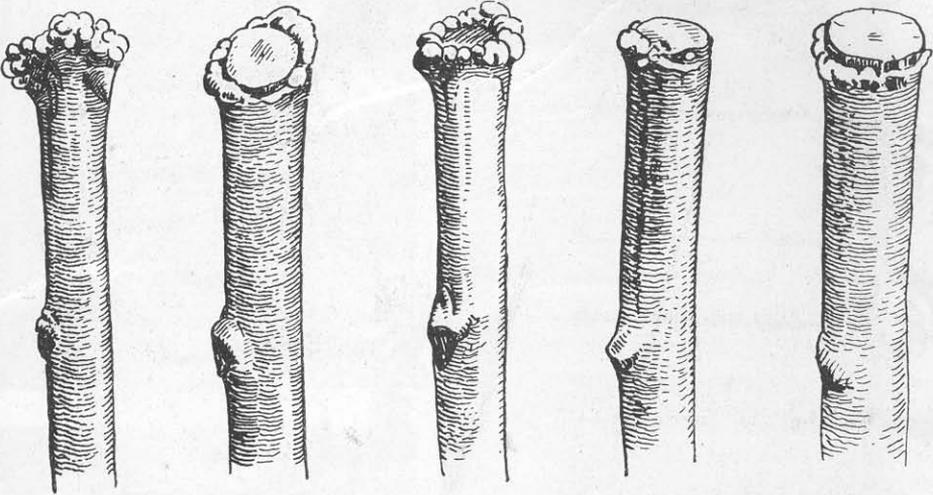
- Poco lignificada
  - == Medianamente lignificada
  - === Muy lignificada
  - ∑ *Callus* defectuoso
  - » normal
  - × Sin *callus*
  - Ausencia de raíces
  - + Débilmente enraizadas
  - ++ Medianamente enraizadas
  - +++ Fuertemente enraizadas
- E. M. Pies de East Mallng.

PLANTA	Estado lignif.	Tratamiento óptimo		Neoformaciones		Enraizamiento		OBSERVACIONES
		Dosis ‰	Tiempo horas	Testim.	Tratad.	Testim.	Tratad.	
Manzano común (Nav.)	====	0.050	12	M	O	+	++	Estaquilla simple
» XII (E. M.)	====	»	»	M	O	-	+	» »
» XV (E. M.)	====	»	»	M	O	+	+	» »
» XVI (E. M.)	====	»	»	M	O	-	+	» »
M. Northern Spy	====	0.025	24	M	O	+	+	» »
M. Amarillo de Metz	====	0.050	12	X	M	-	-	» »
Paraíso inglés h. a.	====	»	»	O	M	+	++	» »
Doucín (E. M.)	====	»	»	X	M	-	+	» »
Peral común (Gorbea)	====	»	»	X	M	-	+	» »
» hoja de roble	====	0.025	24	M	M	+	++	» »
Cydonia vulgaris	====	0.050	12	O	M	++	+++	» »
Membrillero A (E. M.)	====	»	»	M	M	+	+	» »
» B (E. M.)	====	»	»	M	M	+	++	» »
» C (E. M.)	====	»	»	M	M	+	+	» »
Mirabolán blanco	====	0.025	24	O	M	++	+++	» »
» encarnado	====	»	»	M	M	+	++	» »
Prunus Mahaleb.	====	?	?	X	X	-	-	» »
Cerasus Avium	====	?	?	X	X	-	-	» »
Almendro común	====	0.025	24	M	M	-	+	» »
» «desmai»	====	»	»	M	M	-	+	» »
Melocotonero común	====	0.025	24	X	M	-	+	» »
» «Cofrentes»	====	»	»	X	M	-	+	» »
Rupestris Lot	====	0.050	24	O	O	++	+++	Estaq. simp. yema aislada
Chasselas x Berlandieri 41-B.	====	0.100	12	M	M	+	++	» »
Berlandieri x Riparia 161-49.	====	»	»	M	M	+	++	» »
Berlandieri x Riparia 420-A.	====	»	»	O	M	++	+++	» »
Olivo común	====	0.050	24	X	M	-	+	Estaquilla simple
» «Arbequina»	====	»	»	X	M	-	+	» »
Abies pectinata	====	?	?	X	X	-	-	Estaq. de pata
Eucalyptus globulus	====	?	?	X	X	-	-	Estaq. de talón
Juglans regia	====	0.050	24	X	M	-	+	Estaq. de pata y de talón
Quercus Ilex	====	?	?	X	X	-	-	Estaq. de talón
Quercus hispanica	====	?	?	X	X	-	-	» »
Pinus laricio.	====	?	?	X	X	-	-	» »
Myrtus communis	====	0.050	12	M	O	-	+	Estaq. de pata
Taxus baccata	====	0.025	24	M	O	+	++	» »
Rosa Spinossissima	====	0.050	24	O	O	++	+++	» »
Rosal Hoover	====	»	»	M	O	+	+++	» »
Nerium Oleander	====	0.025	24	X	M	-	-	» »
Spiraea prunifolia	====	0.050	12	M	M	+	++	» »
Hedera Helix	====	0.025	24	M	M	+	++	» »
Magnolia grandiflora	====	0.100	12	X	M	-	+	» »
Thuja gigantea	====	0.050	12	M	O	+	++	» »

Lámina III

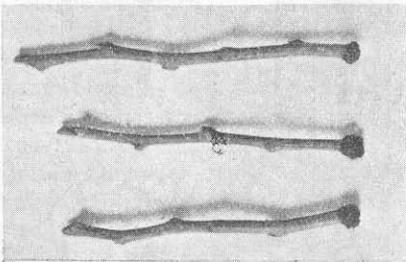


Manzano: 1-2. Callus viables. — 3. Id. incipiente. — 4. Id. defectuoso. — 5. Id. nulo.

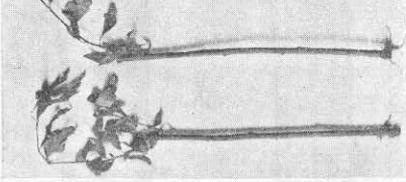


Peral: 1. Callus defectuoso. — 2-3. Id. viables. — 4. Id. incipiente. — 5. Id. nulo.

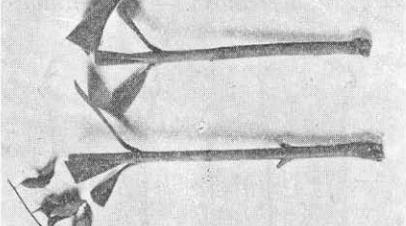
1



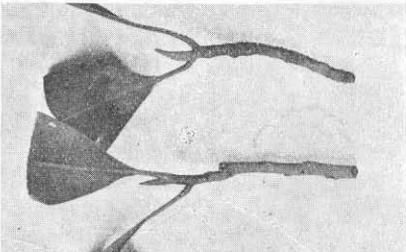
2



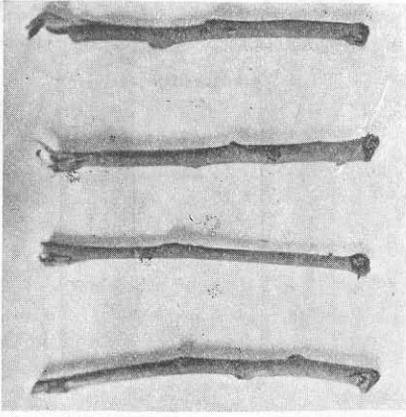
3



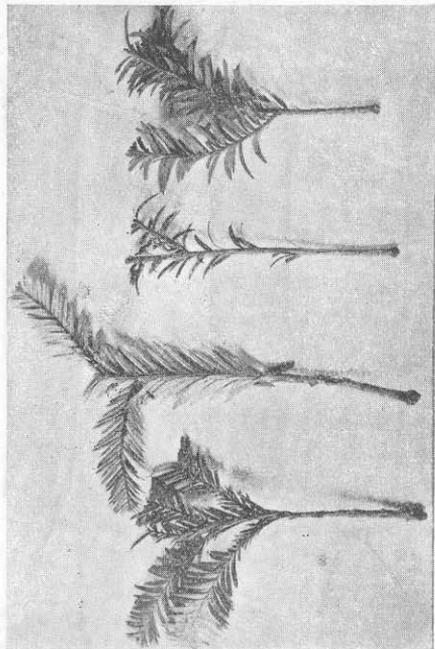
4



5



6



7

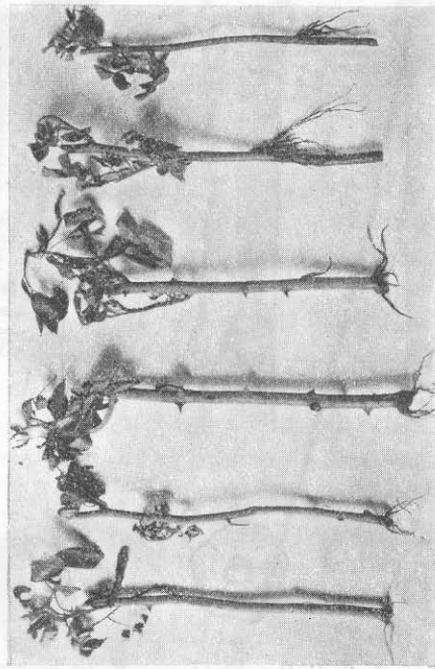
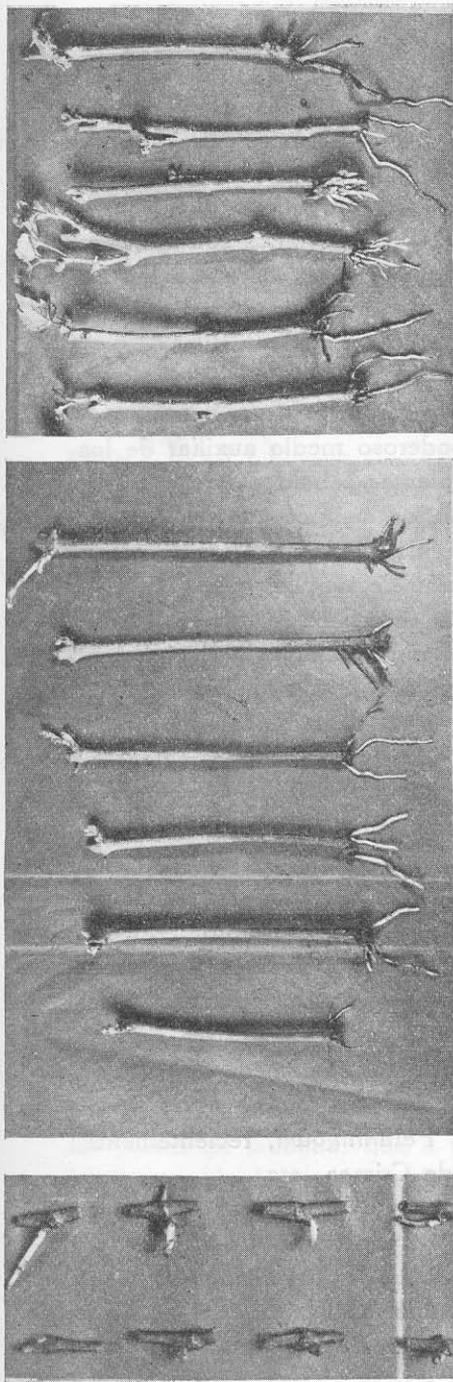
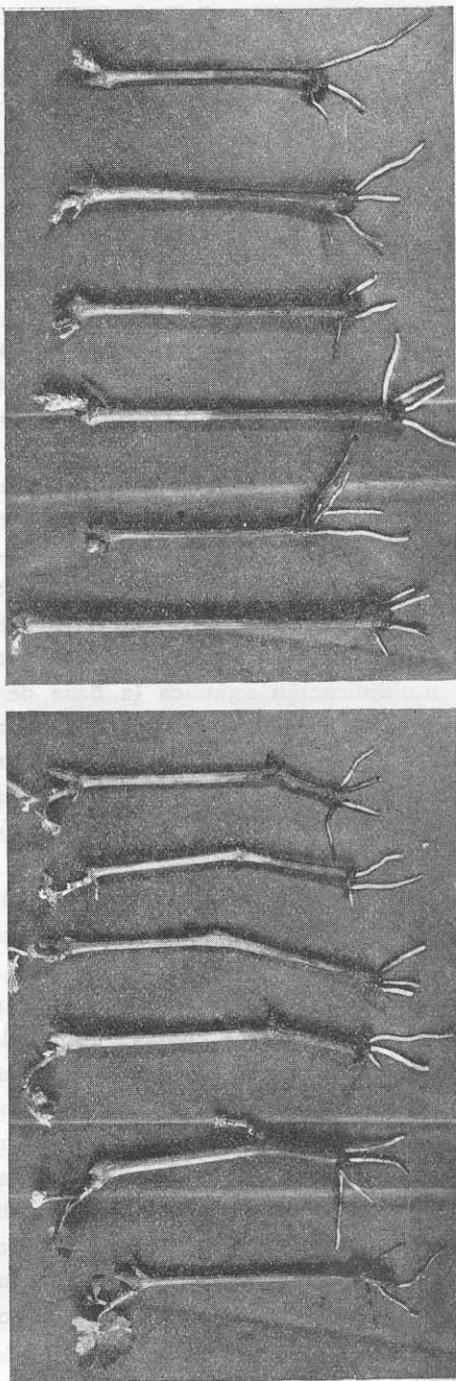


Lámina IV. — Tipos de Callus a los cinco meses después de tratados: septiembre-febrero (testimonios de comparación fallados y secados). — 1. Peral común. — 2. Spirea Wanch. — 3. Nervium oleander. — 4. Magnolia. — 5. Manzano común. — 6. Taraxacum officinale. — 7. Rosal Hoover.



4



3

Lámina V. — Tipos de enraizamiento a los cinco meses después del tratamiento: septiembre-febrero (los testimonios de comparación en primer lugar). — 1. Berlandieri × Riparia 161-49. — 2. Rupestris Lot. — 3. Chasselas × Berlandieri 41-B. — 4. Berlandieri × Riparia 420-A. — 0. Las cuatro clases tratadas por inmersión total.

NOTA. La gran fragilidad de las tiernas raicillas en este estado de desarrollo tanto como las dificultades de arranque en esta época (febrero), unidas a los riesgos por traslado desde el campo a la cámara fotográfica han sido la causa de que la mayoría de ejemplares aparezcan fuertemente mutilados. Hemos preferido, sin embargo, la reproducción de la red radicular incompleta (pero sin retocados), en honor a la verdad.

## 8. ENSAYOS FUTUROS

A pesar de que la aplicación de las sustancias de crecimiento dista mucho de tener aquel valor universal y omnímodo que le atribuye la propaganda comercial, los resultados obtenidos son suficientes para alentar nuevos ensayos en vistas a mejorar el rendimiento y calidad de los barbados fáciles y a ayudar la formación de raíz o cuando menos de las neoformaciones viables en los difíciles.

Bajo este último punto de vista, si bien estos «específicos» de la biología vegetal no han conseguido, por el momento, un éxito espectacular, constituyen, sin embargo, un poderoso medio auxiliar de los sistemas clásicos de multiplicación de plantas rebeldes: tiendas, estufas húmedas, etc., mientras invaden otros campos como la fecundación de flores, maduración de frutos, tratamientos de virus filtrables, estados de degeneración, germinación de semillas viejas, etc.

Por lo que a nuestro objetivo actual se refiere, su acción positiva nos sería particularmente eficaz, como indicábamos al principio, en la multiplicación agámica (a base de un simple estaquillado) de los porta-injertos elegidos, que permitiría seleccionar fácilmente líneas clonales de patrones óptimos: por su vigor (como en los melocotoneros francos), por su rusticidad (como en los *Prunus Myrabolan*), por su resistencia en enfermedades (como en los pies de Northern Spy), etc.

Nos sería igualmente útil en todos aquellos casos de propagación por cepa baja: como en los Doucin, Paradís, Brompton, Brussel y la mayoría de pies de East Malling; en la perpetuación de ciertos pies exóticos de gran interés como porta-injertos, pero que fructifican mal en nuestros climas: como algunos perales silvestres centro-europeos, melocotoneros húngaros, membrilleros balcánicos, etc.; en la multiplicación de pies de difícil adquisición, tales como *Malus Prunifolia*, originario de Siberia, *Amigdalus*, *Petunikhovii*, recientemente introducido por EVREINOFF, procedente de Crimea, etc.

No cabe decir, finalmente, el interés que representaría para la Fruticultura la posibilidad de obtener por este método productores directos de todas aquellas estirpes, variedades o mutaciones frutales que por su mala afinidad soldan defectuosamente sobre el porta-injerto, con todos sus inconvenientes y defectos: caducidad, falta de vigor, chancro, etc.

En nuestros futuros ensayos pensamos insistir sobre las cuestiones siguientes:

1. Época del tratamiento.—A la vista de los resultados que demuestran la diversa movilización de materias activas y de reservas dentro del ciclo vegetativo, creemos conveniente elegir en lo sucesivo aquellas épocas más a propósito a cada especie, teniendo en cuenta que los descensos de la concentración tanto de hidrocarburos como de auxinas coinciden con el período de mayor actividad fisiológica de la planta (floración, fructificación, crecimiento, etc.).

2. Edad y lignificación de las estaquillas.—Después de los recientes trabajos de VIEIRA NATIVIDADE en el olivo, a que nos hemos referido, así como de los de STOUTEMYER, MANEY y PICKETT, sobre manzano, y BIALE y HALMA en *Citrus*, pensamos que es conveniente aprovechar los estados juveniles, ya sean de jóvenes plantas procedentes de raíz, o bien retoños y renuevos de plantas viejas en vías de regeneración, a fin de ver hasta qué punto puede sumarse su mayor capacidad a la acción de la hetero-auxina.

3. Materias de reserva.—Todos los resultados positivos y negativos registrados en trabajos de esta índole, inducen a creer que la eficacia del sistema va unida al suministro de materias de reserva, entre las que figuran en primer término la sacarosa, las sales metálicas y algunos bíos, Biotina. En nuestros futuros ensayos nos proponemos dar a dichas materias de reserva la importancia que les corresponde.

4. Tratamientos sucesivos.—Independientemente de las concentraciones (dosis) y duración (tiempos) de los tratamientos, todos los indicios permiten suponer que el éxito va íntimamente unido a la repetición del tratamiento, ya sea en el breve intervalo de unos días o bien en el espacio de algunos meses. A este fin nos proponemos este mismo año hacer un segundo tratamiento de invierno a todas aquellas estaquillas no enraizadas, pero con *callus* bien formados.

5. Pasta.—Finalmente pensamos ensayar las hetero-auxinas en las pastas de lanolina, que a pesar de su costoso empleo han dado buenos resultados en vegetales reacios: *Pirus comunis*, *Prunus cerasus*, *Prunus pisardi*, etc.

Igualmente nos proponemos aplicar estas pastas a la activación de injertos y de una manera especial en casos de poca afinidad, por tratarse de distintas especies como peral y membrillero, por ejemplo, que según el vigor respectivo originan soldaduras más o menos deficientes.

De mayor interés sería todavía esta aplicación si llegáramos a comprobar, como sugieren HAMLONG y NAUNDORF en sus experiencias con «Belvitan» en *Juniperus Sabina*, injertado sobre *J. Virginiana*, que la zona de soldadura queda organizada para la emisión de raíces, lo que permitiría, en nuestro caso, practicar mejor la forma de afrancamiento del peral. actualmente seguida, y facilitaría la obtención de pies directos por el intermedio del injerto con un pie transitorio (membrillero) para aquellas variedades de peral de poco vigor.

Como puede verse, amplias perspectivas ofrecen las fitohormonas a importantes problemas de la biología vegetal que lo son al propio tiempo de la Economía Nacional.

A su solución práctica y efectiva se dirige la labor paciente y árdua del investigador con la satisfacción del deber cumplido, ya que como apunta muy oportunamente el profesor MARCILLA en el artículo ya citado: «Las tareas de la investigación científica, y especialmente de la aplicada a la Agricultura, son indudablemente atrayentes; pero estas tareas son lentas, parcas en éxitos como fecundas en desilusiones por resultados aparentemente negativos y nada espectaculares.» A ella dedicamos nuestros esfuerzos sin otra aspiración que contribuir modesta y austeramente al progreso de la ciencia agronómica y a una mayor elevación «para a cultura do espírito, que todos têm de desenvolver», como proclamaba con elevado criterio nuestro apreciado colega portugués el profesor SOUZA DA CÁMARA, en su memorable conferencia sobre Investigaciones Agronómicas.

## BIBLIOGRAFIA

- AMLONG, H. U., UND NAUNDORF, G.—1918. Die Wuchshormone in der gärtnerischen Praxis. Berlin.
- BALANSARD, J., ET PELLISSIER, F.—1942. Le rôle de l'hétéro-auxine dans la conservation des feuilles au cours du Bouturage épiphyllé. Lab. Hist. Nat. Marseille.
- BOUILLENNE, R. DE M.—1938. Contribution a l'étude des facteurs de la neoformation et de la croissance des résines. Bull. Soc. Roy. Bot. de Belgique.
- BOUILLENNE, R., AND WENT, F. W.—1933. Recherches Experimentales sur la Neoformation des Racines dans les Plantules et les Boutures des plantes Superieures. Ann. Jard. Bot. Buitenzorg (Java), 43 : 25-202.
- BOYSEN-JENSEN, P.—1935. Die Wuchsstofftheorie, Jena 1935.
- BOYSEN-JENSEN, P.—1936. Growth hormones in plants, New-York.
- CÂMARA, ANTONIO.—1941. Investigações Agnômicas. I Cong. Nac. De Cien. Naturais. Lisboa.
- CHOUARD, P.—1940. Les hormones de bouturage. Rev. Hort. Paris.
- ENGLISH, J. U., BONNER, J.—1937. The wound hormones of plants J. of. biol. Chem. 121, 791.
- EVREINOFF, V. A.—1940. L'importance et la diversité du generes *Prunus* dans l'arboriculture fruitière. Rev. Hort.
- GAUTHERET, R. J.—1942. Hétéro-auxines et cultures des tissus végétoux. B. de la S. Chim. Biologique. Paris.
- KÖGL, F., ET COLLAB.—1934. Hoppe-Seyler's Zeitch. Physiol.
- MARCILLA ARRAZOLA, J.—1942. Algo nuevo para viticultores y viveristas. Revista Agricultura. Madrid.
- MARTÍNEZ ZAPORTA, MOISÉS.—1944. Podas en verde. Rev. Agricultura. Madrid.
- NATIVIDADE, J. V.—1943. A Heterofilia da oliveira do ponto de vista da propagação vegetativa. Agronomia Lusitana. Vol. 5. Tom. 2. Lisboa.
- ORIOU ANGUERA, A.—1937. Radiacions mitogenètiques. Arx. E. S. A. Vols. I y II (1935-36). Barcelona.
- ORTEGA, MIGUEL.—1939. Vitaminas como biocatalizadores. Rev. de Oc. Madrid.
- PRIEGO JARAMILLO, J. M.—1933. Multiplicación del olivo. Madrid.
- RIERA, F. J.—1941. Pleomorfismo y esterilidad ovárica del olivo. Anales E. P. A. y S. A. Vol. I. Fas. I-II.
- SÖDING, H.—1938. Die rolle des auxines in der höheren Pflanse. Z. S. Bot. 32,497.
- WENT, F. W., AND THIMANN, K. V.—1937. Phytohormones, The Macmillan Company. New York.