CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA SEMILLA BOTÁNICA Y EL PROCESO DE GERMINACIÓN EN MANDARINA CLEOPATRA (CitrusreshniHort ex Tan)

Nadina Nieves, María Blanco, Eduviges Borroto, J. González, J. C. Lorenzo, C. G. Borroto, A. González, O. Guerra y Janet Quiñones

ABSTRACT. The chemical composition of Cleopatra mandarin (*Citrus reshni* Hort ex Tan) mature seeds, except embryos, was studied. Carbohydrates were the most significative elements caused by their high concentration: sucrose (14.08 and 42.43 $mg.g^{-1}$ dry weight of cotyledons and internal teguments respectively) and fructose (8.97 $mg.g^{-1}$ dry weight of external teguments). Seeds from mature fruits were placed on wet cotton-containing Petri dishes, then a study about physical and biochemical changes during the first 35 days of germination process was carried out. The relationship between cotyledon and plantlet weights with germination percentage was determined. Grease, carbohydrate, and nitrogen related component roles on germination dynamics were evident. Protein movement from cotyledons to plantlets was demonstrated and the highest concentration was a low molar weight solution (α lactoalbumin).

Key words: botanical seed, cotyledon, carbohydrates, proteins, poliamines, electrophoresis, greases, nucleic acids, citrus, germination

RESUMEN. Se estudió la composición química de la testa, el tegmen y los cotiledones de semillas botánicas de mandarina Cleopatra (*Citrus reshni* Hort ex Tan), procedentes de frutos maduros. Los carbohidratos fueron los compuestos de mayor concentración: en los cotiledones y el tegmen, la sacarosa (14.08 y 42.43 $mg.g^{-1}$ de masa seca, respectivamente) y en la testa, la fructosa (8.97 $mg.g^{-1}$ de masa seca). Para la caracterización física y bioquímica de la germinación, las semillas de frutos maduros se colocaron en placas de Petri con algodón húmedo. El estudio se realizó durante los primeros 35 días del proceso de germinación. Se evaluó la relación entre el peso de los cotiledones y de las plántulas, y el porcentaje de semillas germinadas. En la dinámica de la germinación se demostró la participación de las grasas, los carbohidratos y los compuestos nitrogenados. Se demuestra la traslocación de proteínas desde los cotiledones hacia las plantas y fue la de mayor concentración una de baja masa molar (α lacto albúmina).

Palabras clave: semilla botánica, cotiledón, carbohidratos, proteínas, poliaminas, electroforesis, grasas, ácidos nucleicos, citrus, germinación

INTRODUCCIÓN

Acerca de la caracterización de las semillas de cítricos hay poca información. La investigación desarrollada por Díaz, Sánchez y Zayas (1981) sobre la caracterización química de las semillas de naranja (*Citrus sinensis* (L) Osbeck cv. Valencia), demostró que estas poseen un alto contenido de aceite, proteínas y minerales fundamentales.

Los cotiledones de las semillas de cítricos contienen grandes cantidades de proteínas de reserva, localizadas en orgánulos especializados nombrados cuerpos proteicos (García-Agustín y Primo-Millo, 1989).

Las semillas de *Citrus limo* L Burm tienen como más importante reserva de nitrógeno a las globulinas, las cuales constituyen el 26 % del total de proteínas. Las albúminas, las glutelinas y las prolaminas comprenden el 8, 7 y 3 %, respectivamente, de las proteínas totales (García-Agustín y Primo-Millo, 1990).

La germinación, como proceso que continúa a la formación de la semilla, constituye un evento significativo que nos permite comprender cómo interviene la composición química de la semilla en el crecimiento y desarrollo de las plantas.

El término germinación es utilizado para designar aquellos procesos que se inician con la imbibición del agua por la semilla seca, y finaliza cuando el embrión atraviesa la envoltura seminal (Vázquez y Torres, 1968). También puede definirse como una sucesión compleja de procesos físicos, fisiológicos y bioquímicos que culminan con la aparición de un nuevo organismo vegetal, biológicamente conformado a partir de su forma latente en la semilla (Rodríguez *et al.*, 1986). Ambos conceptos son reveladores de lo complicado de este fenómeno.

En el trabajo se persigue caracterizar la composición química y el proceso de germinación de la semilla botánica de mandarina Cleopatra (*Citrus reshni* Hort ex Tan).

Nadina Nieves, Investigador Agregado; María Blanco y Dr. J. González, Investigadores Auxiliares; J. C. Lorenzo, Investigador; Dr. C. G. Borroto, Investigador Titular; A. González y Janet Quiñones, Especialistas y Eduviges Borroto y O. Guerra, reserva del Laboratorio de Bioquímica, Centro de Bioplantas, Instituto Superior Agrícola, carretera Morón km 9, Ciego de Avila, Cuba.

MATERIALES Y MÉTODOS

Caracterización química de la semilla botánica. La caracterización se hizo a semillas procedentes de frutos maduros, las que fueron divididas en sus diferentes partes: testa, tegmen y cotiledón, siendo separado el embrión.

Determinaciones

Proteínas solubles. Para la determinación de las proteínas solubles se utilizó un gramo de muestra que se maceró en frío, se le añadieron 10 mL de buffer PO_4- pH 6.0, se homogenizó por tres minutos a 3 000 g, se centrifugó a 4 000 g y se tomaron 20 μL del sobrenadante para el análisis, según la técnica descrita por Bradford (1976).

Electroforesis de proteínas. La muestra, previamente macerada (0.25 g), fue disuelta en 2.5 mL de buffer con la siguiente composición: Tris (125 mM, pH 6.75, SDS 4 %, β-Mercaptoetanol 10 %, al cual se le adicionó bromofenol azul como marcador electroforético y glicerol 20 % para aumentar la densidad). La mezcla fue incubada un minuto a 100°C y entonces se aplicaron 20 μL a geles de poliacrilamida (tres milímetros de grosor), donde la concentración respectiva de bisacrilamida y acrilamida fue de 0.5 y 10 % en el gel compactado, y de 0.74 y 28 % en el gel concentrador. Los geles de uno y siete centímetros de longitud respectivamente contuvieron 0.21 % de SDS y fueron *buferados* con 3 M de Tris (pH 8.9), el gel separador y el concentrador con Tris 0.5 M (pH 6.7). La corrida fue realizada a 50 mA con Tris (25 mM), glicina (190 mM, pH 8.3) conteniendo 0.1 % de SDS, como buffer del electrodo. La tinción se hizo con azul de coomássie en metanol-ácido acético-agua (2:1:7). Luego se visualizaron los esquemas correspondientes.

Poliaminas. La extracción de poliaminas se realizó a un gramo de tejido (testa, tegmen y cotiledón) empleando solución de $HClO_4$ 5 % frío durante una hora en baño de hielo, según la técnica descrita por Flores y Galston (1982). Las poliaminas fueron determinadas por HPLC en fase reversa. El método del estándar externo fue utilizado para verificar el recobrado.

Prolina. Los contenidos de prolina se evaluaron mediante la técnica descrita por Bates, Waldron y Teare (1973).

Acido nucleicos. El aislamiento de los ácidos nucleicos contenidos en los cotiledones de las semillas se realizó mediante la técnica de Tiuterev *et al.* (1976). En la cuantificación se empleó el método espectrofotométrico; los contenidos de ARN y ADN se calcularon según la fórmula de Spirin (1958).

Carbohidratos. Para determinar el contenido de carbohidratos a los diferentes componentes de la semilla, estos fueron secados en la estufa a 65°C, macerados y 100 mg de la muestra utilizados para el ensayo. Para los azúcares reductores se utilizó el método de Park y Johnson (1949), y para los azúcares totales y el almidón el de Mc Cready *et al.* (1950). La sacarosa, glucosa y fructosa se determinaron por la técnica propuesta por Yemm y Willis (1986).

Grasa bruta. Se analizó por el método del extracto etéreo (AOAC, 1965).

Acido abscísico. Para la determinación de ABA en la testa, tegmen y cotiledón se utilizaron 20, 8 y 100 g respectivamente, empleando el método de Dathe y Sembdner (1978), con la siguiente modificación: antes de pasar por la columna de Sephadex la muestra fue pasada por un baño de PVP, según Glenn *et al.* (1972). La determinación se realizó por HPLC en fase reversa. La cuantificación del ABA fue hecha con estándar externo de la mezcla de isómeros a la concentración de 10^{-3} M.

Iones minerales. Se determinaron en cotiledones libres de testa, tegmen y embrión. El contenido de Cd, Pb, Hg, Fe, Cu y Zn fue determinado por absorción atómica. El fósforo se analizó por el método del complejo "vanado molibdo fosfórico", el nitrógeno por el método de Nessler y el potasio por fotometría de llama, todos según la Norma ramal de la agricultura (1987). Se determinaron el calcio y el magnesio por métodos complexométricos y el sodio por fotometría de llama (AOAC, 1965).

Dinámica de la germinación de la semilla botánica. Para la caracterización bioquímica de la germinación, las semillas de frutos maduros se colocaron en placas petri con algodón humedecido, en grupos de 50 con 17 repeticiones, para un total de 850 semillas en experimento, las que se evaluaron a los 0, 21, 28 y 35 días. Se consideró la semilla germinada cuando había emitido la radícula y se empleó la planta completa para las diferentes determinaciones, considerando la siguiente clasificación para la electroforesis de proteínas:

SG semilla sin germinar (se empleó solo el cotiledón),

I semillas germinando (se empleó el cotiledón y el embrión desarrollado),

II semillas germinadas (con raíces),

III germinadas, con plántulas menores de 1.5 cm de altura,

IV germinadas, con plántulas mayores de 1.5 cm de altura e iniciada la emisión de hojas, y

V germinadas, con plántulas mayores de 1.5 cm de altura y hojas diferenciadas.

La relación peso de los cotiledones y de las plántulas fue estudiada con relación al porcentaje de germinación. Además, en cotiledones de semillas germinadas y no germinadas, se determinaron proteínas solubles, prolina, poliaminas y carbohidratos (almidón, azúcares reductores y totales).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización química de la semilla botánica. La compleja interacción de la composición bioquímica, la estructura y las funciones de la semilla de mandarina se analizan a continuación.

En la Tabla I se muestran los resultados de los análisis de algunos de los principales constituyentes de la semilla: cotiledones, tegmen y testa obtenidos a partir de frutos maduros.

Tabla I. Caracterización de la semilla de mandarina Cleopatra

	Unidad de medida	Testa	Tegmen	Cotiledón
Masa cotiledón	g	-	-	0.07
Humedad	%	-	-	34.74
Masa seca res.	%	-	-	65.26
Grasa bruta	%	-	-	25.87
Glucosa	$mg.g^{-1}$ MS	N.D.	N.D.	N.D.
Fructuosa	$mg.g^{-1}$ MS	8.97	2.31	5.66
Sacarosa	$mg.g^{-1}$ MS	5.40	42.43	14.08
Almidón	$mg.g^{-1}$ MS	-	-	8.00
Proteína soluble	$mg.g^{-1}$ MF	0.04	0.56	1.67
Prolina libre	$mg.g^{-1}$ MF	$7.69 - 10^{-5}$	$1.68 - 10^{-3}$	$5.60 - 10^{-5}$
Putrescina	$mg.g^{-1}$ MF	$3.94 - 10^{-4}$	$9.80 - 10^{-4}$	$0.96 - 10^{-4}$
Espermidina	$mg.g^{-1}$ MF	$2.49 - 10^{-4}$	$5.27 - 10^{-4}$	$0.06 - 10^{-4}$
Espermina	$mg.g^{-1}$ MF	$43.90 - 10^{-4}$	$1.61 - 10^{-4}$	$0.054 - 10^{-4}$
ABA	$mg.g^{-1}$ MF	$198.40 - 10^{-4}$	$621.44 - 10^{-4}$	$202.52 - 10^{-3}$
ADN	$mg.g^{-1}$ MF	-	-	0.4580
ARN	$mg.g^{-1}$ MF	-	-	0.0712
N	$mg.g^{-1}$ MS	-	-	0.032
K	$mg.g^{-1}$ MS	-	-	0.029
P	$mg.g^{-1}$ MS	-	-	0.192
Fe	mgg^{-1} MS	-	-	0.023
Cu	$mg.g^{-1}$ MS	-	-	0.004
Zn	$mg.g^{-1}$ MS	-	-	0.004
Cd	$mg.g^{-1}$ MS	-	-	N.D.
Pb	$mg.g^{-1}$ MS	-	-	N.D.
Na	$mg.g^{-1}$ MS	-	-	0.002
Mg	$mg.g^{-1}$ MS	-	-	0.001
Ca	$mg.g^{-1}$ MS	-	-	0.005
Hg	$mg.g^{-1}$ MS	-	-	$8.5 - 10^{-5}$

Como se observa, el 34.7 % de la semilla es agua, en tanto que el 65.26 % representa la masa seca de la semilla; de este el 25.87 % es de grasa bruta, valor que es inferior en un 36.62 % al informado para la semilla de naranja Valencia (Díaz, Sánchez y Zayas, 1981).

De los carbohidratos, el que se encuentra en mayor concentración es la sacarosa, mientras que la glucosa no fue detectada.

La composición orgánica de las semillas evidencia la actividad metabólica de los compuestos nitrogenados, detectándose una mayor concentración de proteínas, seguida de las poliaminas y por último la prolina libre.

Los niveles de ABA fueron muy superiores en el cotiledón con respecto a la testa y el tegmen.

El contenido de ADN es mayor que el de ARN, lo cual es característico de semillas en estado de madurez.

De los compuestos inorgánicos evaluados, la concentración de fósforo está seguida de la de nitrógeno y potasio, encontrándose con valores más bajos el calcio y el magnesio, justificando de este modo el rol metabólico de estos macroelementos.

Dinámica de la germinación de la semilla botánica. La Figura 1 ilustra los cambios en la masa fresca de los cotiledones y en el desarrollo de la plántula, durante la germinación y cuantificados a manera de porcentaje.

Como puede apreciarse, existe un incremento en la asimilación de agua por los tejidos de los cotiledones asociado a la elevación de estas, propias del proceso de imbibición como estadio inicial de la germinación. García-Agustín y Primo-Millo (1990) reconocen en este proceso varios momentos: el primero de ellos se corresponde con una rápida hidratación no metabólica ocurrida en las primeras 48 horas, seguido de un atenuado incremento durante los 14 días posteriores y a partir de ese momento decrece la masa fresca de los cotiledones.

La tendencia del comportamiento de estas semillas es similar, a pesar de la diferencia en la frecuencia de evaluación y de las condiciones de germinación, que demuestran el retraso que provoca la permanencia de la testa en el inicio del proceso. Son asociables la disminución de la masa fresca de los cotiledones con el aumento de este parámetro en las plántulas, una vez comenzado su crecimiento y desarrollo, lo que indica el empleo de sustratos endógenos en la actividad respiratoria y la transformación de reservas desde los cotiledones a las plántulas.

La caracterización bioquímica del proceso antes señalado se informa a continuación. Interprétese como tendencia el comportamiento no evaluado durante los primeros 21 días.

El porcentaje de grasas totales (Figura 2), en cotiledones de semillas germinadas y no germinadas en la evaluación realizada 21 días después del comienzo de la imbibición, es coincidente con la germinación según la Figura 1. En el caso de las semillas no germinadas, este comportamiento no ocurre hasta siete días después, en que se alcanzan valores próximos como condición previa para el inicio del proceso. Es conocida la función de reserva de las grasas en este tipo de semillas y la posible interconversión de moléculas biorgánicas para el inicio de la germinación, el desarrollo del embrión y crecimiento de la plántula.

La dinámica de los carbohidratos (azúcares totales, reductores y almidón) muestra una tendencia similar a la antes analizada en las grasas. En las semillas germinadas, los contenidos de azúcares totales y el

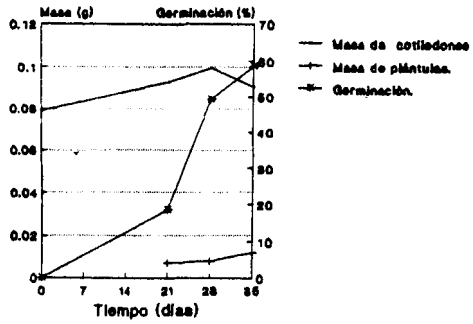


Figura 1. Cambios de masa durante la germinación

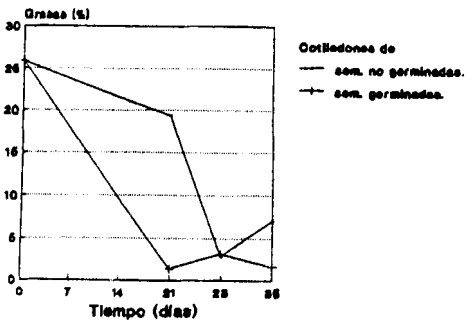
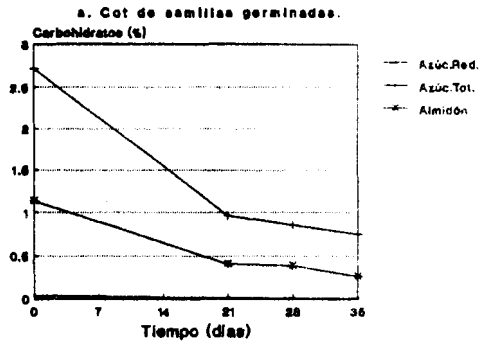


Figura 2. Variación de las grasas en semillas



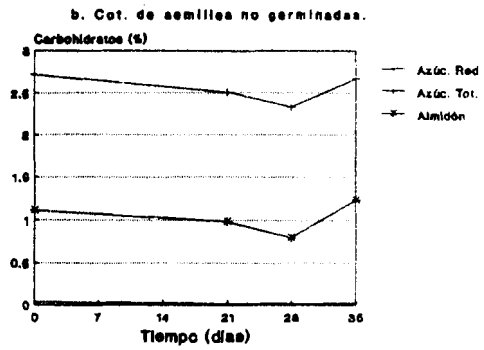


Figura 3. Cambios de los carbohidratos en semillas

almidón decrecen en el período previo a la fecha de inicio de la germinación y continúa posteriormente (Figura 3a).

Por su parte, en las semillas no germinadas este fenómeno se da a los 28 días, de igual modo al señalado en el caso de las grasas. Nótese que también con igual comportamiento a los 35 días se elevan los contenidos de ambos en estas semillas, las que finalmente germinan, sucediendo solo la más lenta movilización de estas biomoléculas (Figura 3b). En ambos casos los azúcares reductores exhiben valores mínimos.

Si se tiene en cuenta el valor de los monosacáridos en los procesos biosintéticos, requeridos para el desarrollo del embrión y crecimiento de la plántula, se manifiesta la interrelación del metabolismo intermediario de lípidos y carbohidratos, en especial asociado a la germinación de semillas, posiblemente involucradas las reacciones del Ciclo del Glioxalato.

En la Figura 4 se resumen los resultados de los análisis de compuestos nitrogenados. Las proteínas solubles también decrecen durante la etapa que antecede al inicio de la germinación; en las semillas germinadas esta reducción en los contenidos de proteínas solubles continúa marcadamente durante los 14 días posteriores, mientras en las semillas no germinadas en ese período ulterior se incrementan los niveles de proteínas solubles, haciéndose notables las diferencias entre las semillas con distintas capacidades germinativas (Figura 4a). Es conocido que las proteínas son la principal forma de reserva nitrogenada en las semillas de los cítricos y parecen estar localizadas en cuerpos proteínicos en los intersticios submoleculares de los cotiledones (García-Agustín y Primo-Millo, 1990). La rápida hidrólisis de las mismas supone su asociación con proteasas que asumen el papel autolítico durante la movilización de las reservas (Adams y Novellie, 1975; y Harris y Chrispeels, 1975).

Relacionada con la hidrólisis de proteínas, en particular con las prolaminas ricas en prolina, se incrementan los contenidos de este aminoácido proteico en forma libre durante la germinación de semillas de cítricos. Al igual que los resultados alcanzados por García-Agustín y Primo-Millo (1990) en las evaluaciones posteriores a la germinación y conversión, se reducen los contenidos de este aminoácido en su forma libre en ambos estados de los cotiledones, a diferencia del proteico que aumenta en los no germinados. Los aminoácidos libres evaluados en los cotiledones y el embrión indican el transporte desde los primeros hasta la plántula, como se traslocan en los diferentes órganos de los árboles adultos de cítricos (Kato, 1981; Moreno y García-Martínez, 1983; Legaz y Primo-Millo, 1984; Tadeo *et al.*, 1984; García-Agustín y Primo-Millo, 1990; y González, 1990).

Los contenidos de poliaminas (putrescina, espermidina y espermina) durante la germinación se muestran en la Figura 5 (a y b). En los cotiledones germinados y no germinados, las concentraciones de putrescina y espermidina disminuyen hasta los 21 días, excepto la putrescina de cotiledones germinados, la cual mantuvo niveles bajos similares a los 21, 28 y 36 días. La espermina, con valores muy bajos, no mostró cambios durante el período analizado.

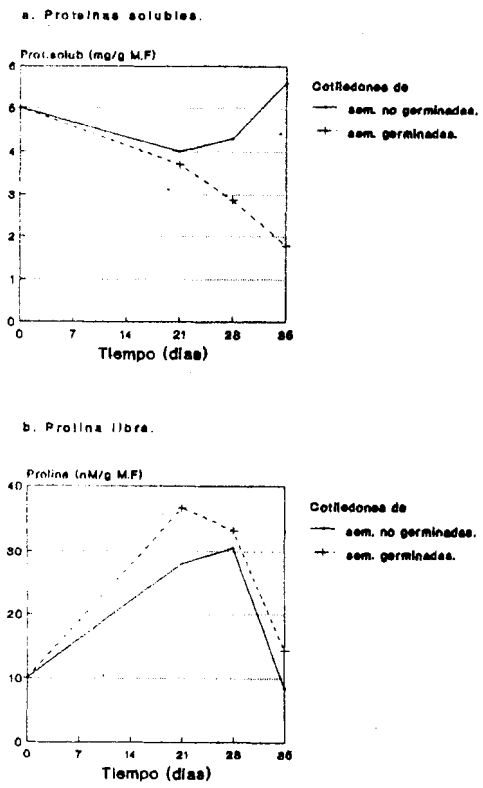


Figura 4. Variación de las proteínas y la prolina en semillas

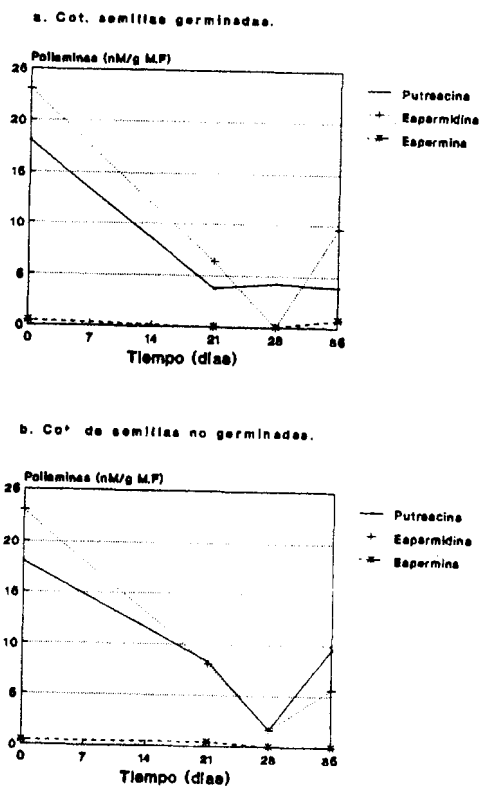
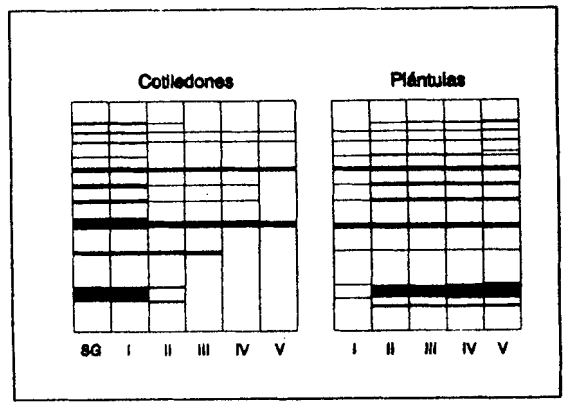


Figura 5. Cambios en la concentración de poliaminas en semillas

Ha sido informado un incremento en el nivel de las poliaminas en los estados tempranos de la germinación (Villanueva, Adlakhna y Cantera-Soler, 1978), cuyo incremento puede ser crítico para la iniciación del proceso. Los resultados alcanzados en *Phaseolus mungo* (Villanueva, Adlakha y Cantera-Soler, 1978) evidencian estos cambios.

Los análisis en mandarina Cleopatra fueron llevados a cabo a partir de los 21 días, para semillas germinadas y no germinadas, por lo que no se observó la participación de las poliaminas en este proceso, lo que sí se mostró en el caso de los carbohidratos, las grasas y proteínas. Como fue señalado en los análisis de los aminoácidos, la intensidad de la actividad metabólica y la concentración de metabolitos está influida por la velocidad de traslocación de estos de unas partes a otras: en el caso de las semillas desde los cotiledones hasta las plántulas.

La Figura 6 muestra el resultado de la composición proteica separada por electroforesis en geles de poliacrilamida. Como se aprecia, en la medida en que progresa el crecimiento y desarrollo de la plántula, hay una gradual desaparición de las proteínas en los cotiledones; de modo inverso, estas se incrementan en las plántulas, lo que corrobora los resultados anteriormente expuestos en la Figura 4a. De igual forma, García-Agustín y Primo-Millo (1990) también refieren similares resultados en cuanto a la traslocación de proteínas hacia la joven planta, señalando además que al parecer es una proteína de baja masa molar la que más se trasloca, así como las proteínas extraídas de la fracción de globulinas. En los resultados que se analizan es también una proteína de baja masa molar la que se manifiesta en más alta concentración en los cotiledones, desaparece con rapidez en ellos y se manifiesta intensamente en las plantulitas en la medida en que avanza su crecimiento, correspondiendo, según los patrones, a la Alfa Lacto Albúmina.



LEYENDA

SG Semillas sin germinar.
I Semillas germinando sin raíces ni plántulas.
II Semillas germinadas con raíces.
III Germinadas con plantulas menores de 1.5 cm de altura.
IV Germinadas con plántulas mayores de 1.5 cm de altura e iniciada la emisión de hojas.
V Germinadas con plántulas mayores de 1.5 cm de altura y hojas diferenciadas.

Figura 6. Electroforesis de proteínas a cotiledones y plántulas en diferentes estados fisioló-

El trabajo ha permitido poner de manifiesto el papel de algunos constituyentes de la semilla, que tienen un papel relevante en los procesos de germinación en esta variedad, tales como la sacarosa, las grasas y los compuestos nitrogenados; en este último caso, ha resultado interesante comprobar su constitución y la traslocación de proteínas desde los cotiledones a las plantulitas, todo lo que puede servir como base para trabajos futuros en la biotecnología vegetal.

BIBLIOGRAFÍA

AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC /AOAC.-Washington : Assoc. of Official Agricultural Chemists, 1965.

Adams, C. A. y L. Novellie. Acid Hydrolases and Autolytic Properties of Protein Bodies and Spherosomes Isolated from Ungerminated Seeds of Sorghum bicolor (Lin) Moench. Plant Physiol. (Alexandria)55:7-11, 1975.

Bates, L. S., R. P. Waldron y L. D. Teare. Rapid Determination of Free Proline for Water-Stress Studies. Plant and Soil (La Haya)39(1):205-207, 1973.

Bradford, M. M. A Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein-Dye Binding. Anal. Biochem (Nueva York)72:248-254, 1976.

Cuba. MINAGRI. Norma ramal de la agricultura, 1987.

Dathe, W. y G. Semddner. Distribution of Gibberellins and Abscisic Acid in Different Fruit Parts of Rye (Secalo cereals L.). Gibberellins LXVII. Biochem. Physiol. Pflanzen (Dordrech)173:440-449, 1978.

Díaz, A., R. Sánchez y J. P. Zayas. Caracterización química de la semilla de naranja Citrus sinensis cv. Valencia. Cienc. Téc. Agric. (La Habana)4(2):109-120, 1981.

Estudio de algunos aspectos bioquímicos del proceso de germinación en semillas de cuatro patrones cítricos./N. N. Rodríguez... /et al./.- **En**: Mem. Simp. Int. Citric. Trop. , 1986.-t2, p. 115-121.

Flores, H. E. y A. W. Galston. Analysis of Polyamines in Higher Plants by High Performance Liquid Chromatography. Plant Physiol. (Alexandria)69:701-706, 1982.

García-Agustín, P. y E. Primó-Millo. Ultrastructural and Biochemical Changes in Cotyledon Reserve Tissues during Germination of Citrus Seeds. J. Exp. Bot. (Oxford)40:383-390, 1989.

García-Agustín, P. y E. Primo-Millo. Changes in Some Nitrogenous Components during the Germination of Citrus Seeds. Scientia Hort. (Amsterdam)43:69-81, 1990.

Glenn, J. L. /et al./. Use of Insoluble Polyvinylpyrrolidone for Purification of Plant Extracts and Chromatography of Plant Hormones. Phytochemistry (Nueva York)11:345-351, 1972.

González, J. Los reguladores del crecimiento y la floración de los cítricos bajo condiciones tropicales. /J. González.- Tesis de grado (Dr. en Ciencias Agrícolas); INCA, 1990.

Harris, N. y M. J. Chrispeels. Histochemical and Biochemical Observations on Storage Protein Body Autolysis in Cotyledons of Germinating Mung Beans. Plant Physiol. (Alexandria)56-292-298, 1975.

Kato, T. Major Nitrogen Compounds Transported in Xylem Vessels from Roots to Top in Citrus Trees. Physiol. Plant. (Copenhagen)52:275-279, 1981.

Legaz, F. y E. Primo-Millo. Influence of Flowering, Summer and Autumn Flushes on the Absorption and Distribution of Nitrogen Compounds in Citrus. Proc. Soc. Citriculture 1:224-233, 1984.

Mc Cready, R. M. /et al./. Determination of Starch and Amylose in Vegetables. Application to Peas. Anal. Chem. (Nueva York)22:1156-1158, 1950.

Moreno, J. y J. L. García-Martínez. Seasonal Variation of Nitrogenous Compounds in the Xylem Sap of Citrus. Physiol. Plant.. (Copenhagen)59:669-675, 1983.

Park, J. T. y M. J. Johnson. A Submicrodetermination of Glucose. J. Biol. Chem. (Baltimore)181:149-151, 1949.

Spirin, A. Determinación espectrofotométrica de la cantidad total de ácidos nucleicos. Biojimia 23:656-662, 1958.

Tadeo, J. L. /et al./. Amino Acid Changes in Organs of Valencia late (C. sinensis (L) Osbeck) Young Trees during Growth Cycle. Proc. Int. Soc. Citriculture 1:241-245, 1984.

Utilización de métodos bioquímicos en las investigaciones de protección de plantas /S. Tiuterev.../et al./.- Leningrado, 1976.-136 p.

Vázquez, E. Fisiología Vegetal. /E. Vázquez, S. Torres.-La Habana : Ed. Pueblo y Educación, 1968.-290 p.

Villanueva, V., R. C. Adlakha y A. M. Cantera-Soler. Changes in Polyamine Concentration during Seed Germination. Phytochemistry (Nueva York)17:1245-1249, 1978.

Yemm, E. W. y A. J. Willis. The Estimation of Carbohydrates in Plant Extracts by Antrhone. J. Biochem. (Nueva York)57:508-514, 1986.

Recibido: 30 de enero de 1995
Aceptado: 3 de marzo de 1995